



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Jênifer Silva Nogueira

**ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE *Dendrocalamus asper*  
E MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guadua* (BAMBUSOIDEAE,  
POACEAE)**

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Brasília, 2018

Jênifer Silva Nogueira

**ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE *Dendrocalamus asper* E  
MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guadua* (BAMBUSOIDEAE,  
POACEAE)**

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, com pesquisa desenvolvida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, para obtenção do título de Doutora em Botânica.

Brasília, 2018

## Folha de Aprovação

Tese de Doutorado apresentada por Jênifer Silva Nogueira, com o título: ESTRATÉGIAS PARA GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE *Dendrocalamus asper* E MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guadua* (BAMBUSOIDEAE, POACEAE) ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UnB como requisito à obtenção do título de Doutora.

A Tese foi aprovada em sua forma final pela comissão julgadora instituída pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da UnB.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

---

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira (Presidente)  
Embrpa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Departamento de Botânica, IB/UnB

---

Dr. Thomas C. Rhys Williams (Membro interno)  
Departamento de Botânica, IB/UnB

---

Dr. João Batista Teixeira  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Membro externo)

---

Dra. Jaqueline Martins Vasconcelos (Membro externo)  
Universidade Federal de Rondônia, UNIR

---

Dra. Maria Elvira de Rezende (Membro externo, Suplente)  
Embrapa Quarentena Vegetal

*Ofereço*

*À minha, mãe Luceneida Silva*

*Ao meu, pai João Faria Nogueira*

*Dedico*

*À minha avó, Nelcionita Clara de Castro*

## **Agradecimentos**

À minha mãe Luceneida pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu pai João Faria e minha madrastra Weiva por todo incentivo.

À minha vizinha Sonita, que mesmo com toda sua simplicidade sempre me incentivou a seguir em frente.

Aos meus irmãos Danillo, Vinicius, Weider e Myllane pela compreensão da minha ausência e principalmente, por terem me presenteado com meus amados sobrinhos Emanuelle, Joaquim, Ana Livia e João Pedro, meus recarregadores de energia.

Ao namorado, amigo e companheiro de todas as horas André Carvalho.

Ao meu orientador Jonny Everson Scherwinski Pereira por me receber em seu grupo de pesquisa e possibilitar excelentes condições de trabalho.

A todos os professores do departamento de Botânica da UnB que contribuíram de alguma forma nesse processo, seja durante as disciplinas ou durante as etapas de defesa do projeto e de qualificação. Especialmente a professora Sueli pelas contribuições durante o estágio docência, ao professor Thomas, pela orientação durante o estágio docência e pelo auxílio fundamental nas análises bioquímicas e também a professora Cássia pelo excelente trabalho a frente da coordenação do programa.

Aos funcionários do departamento e as secretárias do IB, particularmente Sarah Lee.

Aos colegas que passaram pelo LCT II da Embrapa Recursos Genéticos Amanda Kenya, Cheila Ferreira, Fernanda Furlan, Filipe Sathler, Giuliano Frugeri, Glória, Hugo Gomes, Inaê Mariê, Jéssica Barbosa, Luciana Lacerda, Patrícia Bartos, Paulo César, Paloma Lima, Rafaela Liz, Raphael Ferreira, Rennan Meira, Samanta Siqueira e Talita Balzon, que contribuíram de forma direta e indireta com o desenvolvimento dos experimentos e agradeço principalmente, pela convivência diária e os momentos de descontração.

À Zanderluce Gomes Luis amiga desde a graduação, por me mostrar este árduo e gratificante caminho; à Gabriela Nogueira por pegar sempre no meu pé e não me deixar esquecer de como é a convivência entre irmãos; à Emília Saleh por ser tão mãezona; e Jaqueline Martins por ter um coração enorme. Obrigada pela amizade, pelos jantares, conversas jogadas fora e mesmo com cada uma seguindo seu caminho e seus compromissos não terem deixado de dar tanto apoio.

Aos colegas de pós-graduação do PPG-Botânica e demais programas da UnB, com quem convivi, mesmo que brevemente, Ana Fabricia, Cíntia Bonatto, Daiane Gonzaga, Edriana Araújo, Fernanda Catenacci, Natasha Silva e Thiago Moreira.

Às amigas irmãs Aurélie Pionchon, Katiane Godoi e Kélvia Simene que mesmo com a distância não deixaram de estar sempre presentes.

À Mariana Carvalho pela amizade, conversas filosóficas e principalmente por me abrigar nos momentos iniciais e finais desta jornada.

Às “colegas de quarto” hoje amigas para a vida Camila Ananias, Maria Cunha e Auricélia Miranda e as demais companheiras de moradia, porém não menos importantes, Ada Vidal, Ariane Pandolfo, Isis Caniello e Lívia Nascimento.

Ao André Xavier de Souza, analista do LCT II, pelo pronto auxílio e paciência.

Ao Dr. João Batista Teixeira e Dra. Maria Elvira por suas inúmeras contribuições a esta pesquisa, durante a avaliação do projeto e/ou dos resultados parciais.

Ao Dr. Luciano Paulino pelo auxílio na tentativa de eliminar os contaminantes dos explantes durante o desenvolvimento dos estudos e possibilitar a identificação de bactérias de ocorrência em bambus. E à Dra. Arailde Fontes Urben pela identificação de fungos de ocorrência em bambus.

Ao Instituto Jatobás e ao Vitor Marçal pela disponibilização de sementes e mudas de bambu para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Cnpq e a Capes pela concessão de bolsa DTI e de doutorado.

A todos não nomeados aqui, mas que de alguma forma agregaram conhecimento, boas energias e auxiliaram no meu desenvolvimento profissional, pessoal e espiritual.

## RESUMO

Neste trabalho foram estudadas três espécies de bambus lenhosos sendo uma espécie nativa da Ásia (*Dendrocalamus asper*), uma nativa das Américas (*Guadua angustifolia*) e a última endêmica da região Centro-oeste (*Guadua magna*), com o objetivo de elucidar questões sobre a germinação, conservação *ex situ* e micropropagação. Dessa forma, referente as sementes e a germinação de *D. asper*, foram realizados estudos de germinação em papel germitest, substrato Bioplant e meio de cultivo de MS em duas condições de luminosidade: claro e escuro. Também foram realizados testes para desinfestação de sementes com NaOCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>. Além da avaliação da germinação em tubos de ensaio com de MS semissólido e em biorreatores RITA com meio de MS líquido com adição (Sac+) ou não (Sac-) ao meio. Como resultado o meio de cultivo *in vitro* aliado a desinfestação com cloreto de mercúrio foi o mais promissor para germinação de *D. asper* independente das condições de luminosidade. Após a germinação de sementes e o desenvolvimento de plantas com três fenótipos distintos (verde, variegado e albino), quantificou-se o DNA nuclear através de citometria de fluxo e os fenótipos não apresentaram diferenças na quantidade de DNA. Durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal, também realizou-se a caracterização anatômica, histoquímica e análise bioquímicas, constatando-se que as sementes desta espécie possuem endosperma amiláceo, camada de aleurona e embrião maduro bem desenvolvido. Sendo o amido o metabólito mais abundante, seguido por proteínas e lipídeos. Para o protocolo de criopreservação, sementes de *D. asper* foram dessecadas por 0, 24, 48, 96 e 144 horas em dessecador. Ao término de cada período de dessecação as sementes foram divididas em três partes: uma parte foi seca em estufa por 24 horas para medir o teor de umidade; a segunda parte foi colocada para germinar em meio de MS e a terceira parte foi imersa em nitrogênio líquido (-196 °C) por 48 horas, depois desse período foram descongeladas e inoculadas em meio de MS. A dessecação de sementes por até 144 horas garantiu um teor de umidade de cerca de 5% e não influenciou na germinabilidade tanto em nenhum dos tratamentos (-NL e +NL), o que indica o possível comportamento ortodoxo destas sementes. A conservação *ex vitro* foi realizada a partir do armazenamento de sementes sob as temperaturas de 25 (controle), 6, -20 e -196 °C por 0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias. Após cada período de armazenamento as sementes foram inoculadas em tubos com meio de MS. As plantas obtidas da germinação foram aclimatizadas. Nos períodos de armazenamento de 0, 360 e 600 dias foram coletadas sementes para realização de análises bioquímicas, onde quantificou-se amido, proteínas e lipídeos. Sementes de *D. asper* mantem sua viabilidade por até 600 dias quando conservadas nas temperaturas de -20 °C e -196 °C, enquanto na temperatura de 25 °C ocorre decréscimo acentuado da viabilidade aos 600 dias, além de ocorrer o desenvolvimento anormal de plantas. A análise da composição bioquímica das sementes conservadas corroborou com os resultados obtidos no experimento de germinação, apresentando poucas diferenças para os metabólitos entre os períodos de armazenamento. Para as espécies *G. magna* e *G. angustifolia* objetivou-se desenvolver um protocolo de micropropagação completo, a partir de mudas mantidas em casa de vegetação onde foram tratadas ou não com fungicida Mythos. Em laboratório, para etapa de estabelecimento segmentos nodais foram inoculados em meio de MS com diferentes formulações: MS normal; MS com 3,0 m.L<sup>-1</sup> de PPM e MS com 1 m.L.L<sup>-1</sup> de fungicida Carbendazin. A adição de Carbendazin e PPM ao meio, reduziram a contaminação em *G. magna* e não influenciaram a taxa de contaminação e brotação em *G. agustifolia*. Em seguida, as brotações obtidas da etapa de estabelecimento que estavam livres de contaminação, foram multiplicadas em meio de MS

com 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em duas consistências: líquida e semissólida por cinco subcultivos e ao final desse período realizou-se a verificação da fidelidade genética dos clones através de marcadores ISSR. De maneira geral, o meio líquido se mostrou mais eficiente em comparação ao meio semissólido para as duas espécies estudadas e o uso de marcadores ISSR, permitiu verificar a similaridade de 87% entre as duas espécies e ausência de polimorfismo entre os clones obtidos durante a multiplicação em ML e MSS. O enraizamento foi realizado em meio MS1/2 acrescido de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB também nas consistências: líquida e semissólida. Em seguida as plantas foram aclimatizadas em substrato Bioplant e câmara de crescimento BOD. No enraizamento, a adição de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB no meio líquido ou semissólido possibilitou um enraizamento de 45% no ML e 30% no MSS para *G. magna* e 53% ML e 62% MSS para *G. angustifolia*. Para o desenvolvimento de um protocolo completo de micropropagação para *G. magna*, foram utilizadas sementes coletadas em áreas naturais, que foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaOCl<sub>2</sub>), cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) e/ou fungicida sistêmico Carbendazin isolados ou em combinação e adicionados ao meio de cultivo. O hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio e fungicida sistêmico Carbendazin podem ser utilizados para desinfestação de sementes e no meio de cultivo sem interferir na germinação. Para a multiplicação foram avaliadas as citocininas CKs: 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (Kn) e metatopolina (mT) nas concentrações 0,0; 6,66, 13,32, 19,98 e 26,64 µM em meio de MS líquido. Ao final desta etapa realizou-se a quantificação de clorofila e a análise de fidelidade genética com auxílio de marcadores ISSR para os melhores tratamentos. Também foram avaliados os sistemas de cultivo MSS, MLE e MLA com 6,66 µM de mT e explantes de diferentes posições do broto (1º nó, 2º nó, 3º nó, base do broto e broto inicial). Durante a multiplicação a citocinina mT na concentração de 6,66 µM, explantes da base, do broto e o meio líquido possibilitam as melhores taxas de multiplicação. Brotações oriundas de meio de multiplicação com Kn apresentaram menores teores de clorofila. A realização de cinco subcultivos, não induziu a ocorrência e variações somaclonais nas brotações de *G. magna*. O enraizamento de microestacas foi realizado em meio de MS semissólido com as auxinas ácido indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações 0,0; 1,23; 2,45; 4,90; 9,80 e 14,70 µM. Também foram avaliadas as concentrações do meio de MS (MS1/4, MS1/2, MS3/4 e MS) e explantes de diferentes posições do broto (1º nó, 2º nó, 3º nó, base do broto e broto inicial). Ao final da etapa de enraizamento as plantas foram aclimatizadas e avaliou-se a sobrevivência. Para o enraizamento a auxina AIB na concentração 4,90 µM induziu a melhor taxa de enraizamento. Enquanto a utilização de brotos iniciais como explante em meio de MS em qualquer concentração (MS1/4, MS1/2, MS3/4 e MS) também induziram boas taxas de enraizamento. Para todos os experimentos de aclimatização plantas inteiras com raízes e parte aérea bem desenvolvidos apresentam até 100% de sobrevivência.

**Palavras-chave:** Bambusoideae, cultivo *in vitro*, conservação *ex vitro*, micropropagação, fidelidade genética, metabolismo primário



## ABSTRACT

In this work three woody bamboos species were studied: a native species of Asia (*Dendrocalamus asper*), a native of the Americas (*Guadua angustifolia*) and the last is endemic of the Central-western region (*Guadua magna*), with the objective of elucidating questions about the germination, *ex situ* conservation and micropropagation. So, the germination studies were carried out on germitest paper, Bioplant substrate and MS medium in two light conditions (light and dark). The tests were also carried out for seed disinfestation with NaOCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub>. Moreover the evaluation of germination in test tubes with semi-solid MS and in RITA bioreactors with liquid MS medium with addition (Sac) or not (Sac-) in the medium. As a result, the *in vitro* culture medium combined with disinfestation with mercury chloride was the most promising for germination of *D. asper*, regardless of the light conditions. After the seed germination and the development of plants with three distinct phenotypes (green, variegated and albino), the nuclear DNA was quantified by flow cytometry. The phenotypes showed no differences in the amount of DNA. During the germination and post-seminal development, the anatomical characterization, histochemistry and biochemical analysis were also carried out. It was verified that the seeds of this species have amylaceous endosperm, aleurone layer and well developed mature embryo. Where the starch is the most abundant metabolite, followed by proteins and lipids. For the cryopreservation protocol, *D. asper* seeds were desiccated for 0, 24, 48, 96 and 144 hours in desiccator. At the end of each desiccation period the seeds were divided into three parts: one part was oven-dried for 24 hours to measure the moisture content; the second part was placed to germinate in MS medium and the third part was immersed in liquid nitrogen (-196 °C) for 48 hours, after that period they were thawed and inoculated in MS medium. The desiccation of seeds for up to 144 hours guaranteed a moisture content of about 5% and did not influence the germinability in either of the treatments (-NL and +NL), indicating the possible orthodox behavior of these seeds. *Ex vitro* conservation was performed from the storage of seeds under the temperatures of 25 (control), 6, -20 and -196 °C for 0, 30, 90, 180, 360 and 600 days. After each storage period the seeds were inoculated in tubes with MS medium. The plants obtained from the germination were acclimatized. In the storage periods of 0, 360 and 600 days seeds were collected for biochemical analysis, where starch, proteins and lipids were quantified. Seeds of *D. asper* maintain their viability for up to 600 days when stored at temperatures of -20 °C and -196 °C, while at 25 °C there is a marked decrease in viability at 600 days, moreover it is observed an abnormal development of plants. The biochemical composition analysis of the conserved seeds corroborated with the results obtained in the germination experiments, presenting few differences for metabolites among the storage periods. For the species *G. magna* and *G. angustifolia* it was aimed to develop a complete micropropagation protocol, from seedlings kept in a greenhouse where they were treated with a fungicide (Mythos) or not. In the laboratory, nodal segments were inoculated in MS medium with different formulations: normal MS; MS with 3.0 m.L<sup>-1</sup> of PPM and MS with 1 m.L.L<sup>-1</sup> of Carbendazin fungicide. The addition of Carbendazin and PPM in the medium reduced the contamination in *G. magna* and did not influence the rate of contamination and sprouting in *G. agustifolia*. Then, the free of contamination sprouts, obtained from the establishment stage, were multiplied in MS medium with 3.0 mg.L<sup>-1</sup> BAP in two consistencies: liquid and semi-solid by five subcultures and at the end of this period, the genetic fidelity of the clones was verified through ISSR markers. In general, the liquid medium was more efficient in comparison to the semi-solid medium for the two species studied and the use of ISSR markers allowed to

verify the similarity of 87% between the two species and absence of polymorphism among the clones obtained during multiplication in LM and SSM. The rooting was carried out in MS1/2 medium plus 3.0 mg.L<sup>-1</sup> of IBA also in the consistencies: liquid and semisolid. Then the plants were acclimatized on Bioplant substrate and B.O.D. growth chamber. In rooting, the addition of 3.0 mg.L<sup>-1</sup> IBA in the liquid or semi-solid medium allowed a 45% rooting in the LM and 30% in the SSM for *G. magna* and 53% LM and 62% SSM for *G. angustifolia*. For the development of a complete micropropagation protocol for *G. magna*, seeds collected in natural areas were used that were disinfested with sodium hypochlorite (NaOCl<sub>2</sub>), mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>) and/or systemic fungicide Carbendazin alone or in combination and added to the culture medium. Sodium hypochlorite, mercury chloride and systemic fungicide Carbendazin can be used for seed disinfestation and in the culture medium without interfering with germination. For the multiplication, the cytokinins (CKs) were evaluated: 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (Kn) and meta-topolin (mT) in concentrations 0.0; 6.66, 13.32, 19.98 and 26.64 µM in liquid MS medium. At the end of this step, chlorophyll quantification and genetic fidelity analysis were performed using ISSR markers for the best treatments. The semisolid medium (SSM), liquid medium stationary (LMST) and liquid medium shaking (LMSH) culture systems with 6.66 µM mT and explants from different shoot positions (1st node, 2nd node, 3rd node, bud base and initial bud) were also evaluated. During the multiplication, cytokinin mT at 6.66 µM concentration, explants from the base, bud and the liquid medium provide better multiplication rates. Sprouting from medium of multiplication with Kn had lower levels of chlorophyll. The realization of five subcultures, did not induce the occurrence and somaclonal variations in the shoots of *G. magna*. The micro-stem rooting was performed in semisolid MS medium with the auxins indolacetic acid (IAA), naphthaleneacetic acid (NAA) and indolbutiric acid (IBA) in concentrations 0.0, 1.23, 2.45, 4.90, 9.80 and 14.70 µM). The concentrations of MS medium (MS1/4, MS1/2, MS3/4 and MS) and explants from different shoot positions (1st node, 2nd node, 3rd node, bud base and initial bud) were also evaluated. At the end of the rooting stage the plants were acclimatized and their survival was evaluated. For rooting of the auxin IBA at the concentration of 4.90 µM induced the best rooting rate. While the use of initial buds as an explant in MS medium at any concentration (MS1/4, MS1/2, MS3/4 and MS) also induced good rooting rates. For all acclimatization experiments, whole plants with well developed roots and shoots have up to 100% of survival.

**Key words:** Bambusoideae, *in vitro* culture, *ex vitro* conservation, micropropagation, genetic fidelity, primary metabolites

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Representação esquemática do bambu e suas partes vegetativas. ....	5
Figura 2. Sistema de desenvolvimento do rizoma (a) e do colmo (b) do grupo paquimorfo.....	7
Figura 3. Sistema de desenvolvimento do rizoma e colmo do grupo leptomorfo.....	8
Figura 4. Representação esquemática das folhas de bambu.....	9
Figura 5. Distribuição de bambus no mundo.....	11

### CAPÍTULO I

Figura 1. Germinação de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> em diferentes sistemas de germinação e duas condições de luminosidade.....	522
Figura 2. Aspecto de sementes e da germinação de <i>Dendrocalamus asper</i> em diferentes sistemas de germinação.....	53
Figura 3. Frequência de fenótipos verdes, variegados e albinos durante a germinação de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> em diferentes sistemas de germinação. ....	544
Figura 4. Germinação e contaminação de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> cultivadas <i>in vitro</i> após desinfestação com hipoclorito de sódio (NaOCl <sub>2</sub> ) e cloreto de mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) e mantidas em luz e escuro.....	555
Figura 5. Percentagem de germinação e percentagem de contaminação de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> em meio semissólido (Tubos) e em meio líquido (RITA), acrescido de sacarose (Sac+) ou não (Sac- ).....	566
Figura 6. Germinação de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> em biorreator do tipo RITA®.....	57
7	
Figura 7. Histogramas relativos à análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA de plantas oriundas da germinação de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> obtidos usando o tampão Marie.....	58

Figura 8. Seções histológicas longitudinais da porção basal da semente durante os eventos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de <i>Dendrocalamus asper in vitro</i> coradas com Azul de Toluidina.....	60
Figura 9. Seções histológicas longitudinais da porção basal da semente durante os eventos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de <i>Dendrocalamus asper in vitro</i> coradas com Lugol.....	62
2	
Figura 10. Seções histológicas longitudinais da porção basal da semente durante os eventos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de <i>Dendrocalamus asper in vitro</i> coradas com PAS.....	63
3	
Figura 11. Seções histológicas longitudinais da porção basal da semente durante os eventos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de <i>Dendrocalamus asper in vitro</i> coradas com Xylidine Ponceau.....	644
Figura 12. Percentagem de amido, proteína e lipídios em relação a massa seca de endosperma (A), raiz (B) e parte aérea (C) durante e após a germinação de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> .....	65
5	

## CAPÍTULO II

Figura 1. Teor de umidade e germinação (%) de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> submetidas à dessecação.....	811
Figura 2. Desenvolvimento pós-seminal de plantas de <i>Dendrocalamus asper</i> após a criopreservação de sementes (+NL) ou não (-NL) em função do tempo de dessecação.....	822

## CAPÍTULO III

Figura 1. Influência do período de armazenamento (0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias) e diferentes temperaturas (25, 6, -20 e -196 °C) na germinação (%) de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> durante a conservação. ....	97
Figura 2. Plantas de <i>Dendrocalamus asper</i> aos 30 dias em casa de vegetação, oriundas de sementes germinadas em meio de cultivo <i>in vitro</i> , após a conservação de sementes por períodos	

de 0, 90, 180, 360 e 600 dias sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196°C.....	101
Figura 3. Percentagem de amido, proteína e lipídios em relação a massa seca de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> mantidas sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196°C por zero (A), 365 (B) e 600 dias de conservação.....	1033

#### CAPÍTULO IV

Figura 1. Contaminação e brotação de <i>Guadua magna</i> durante o estabelecimento <i>in vitro</i> em diferentes formulações do meio de cultivo.....	121
Figura 2. Contaminação e brotação de <i>Guadua angustifolia</i> durante o estabelecimento <i>in vitro</i> em diferentes formulações do meio de MS, MS+FUNG (Meio de MS + Fungicida Carbendazin®) e MS+PPM (Meio de MS + Plant Preservative Mixture®).....	122
Figura 3. Estimativa de produção de mudas de <i>Guadua magna</i> por meio do cultivo <i>in vitro</i> ...	126
Figura 4. Estimativa de produção de mudas de <i>Guadua angustifolia</i> por meio do cultivo <i>in vitro</i> .....	127
Figura 5. Aspecto geral da micropropagação de <i>Guadua magna</i> .....	130
Figura 6. Aspecto geral da micropropagação de <i>Guadua angustifolia</i> .....	131
Figura 7. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA da relação entre os clones de <i>Guadua magna</i> e <i>Guadua angustifolia</i> multiplicados <i>in vitro</i> em meio de MS na consistência líquida (ML) e na consistência semissólida (MSS).....	132
Figura 8. Análise da fidelidade genética de plantas de <i>Guadua magna</i> micropropagadas por multiplicação <i>in vitro</i> ao longo de cinco subcultivos.....	133
Figura 9. Análise da fidelidade genética de plantas de <i>Guadua angustifolia</i> micropropagadas por multiplicação <i>in vitro</i> ao longo de cinco subcultivos.....	133

#### CAPÍTULO V

Figura 1. Aspecto das brotações de <i>Guadua magna</i> utilizadas como fonte de explantes e posicionamento dos explantes no broto desenvolvido durante a multiplicação nos sistemas de cultivo: meio semissólido (MSS), meio líquido estacionário (MLE) e meio líquido agitação (MLA).....	153
3	
Figura 2. Germinação de sementes de <i>Guadua magna</i> em meio de cultivo <i>in vitro</i> , após 60 dias de cultivo.....	1588

Figura 3. Desenvolvimento pós-seminal de plântulas de <i>Guadua magna</i> após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	1599
Figura 4. Avaliação da taxa de brotação (A) e número de brotos (B), comprimento de brotos (C), número de nós (D), número de folhas (E), percentagem de formação de raízes (F), número de raízes (G) e comprimento de raízes (H) da média de cinco subcultivos em meio de multiplicação com BAP, Kn e mT nas concentrações de 0,0; 6,66; 13,32; 19,98 e 26,64 $\mu\text{M}$ após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> de brotações <i>Guadua magna</i> .....	1622
Figura 5. Aspecto visual de brotações de <i>Guadua magna</i> formadas após cinco subcultivos, multiplicadas em meio MS com BAP, Kn e mT nas concentrações de 0,0; 6,66; 13,32; 19,98 e 26,64 $\mu\text{M}$ ..	1677
Figura 6. Quantificação de Clorofila a, Clorofila b e Carotenóides ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em folhas de brotações de <i>Guadua magna</i> micropropagadas <i>in vitro</i> após cinco subcultivos em meio de MS suplementado com BAP, Kn e mT nas concentrações de 0,0; 6,66 e 13,32 $\mu\text{M}$ .....	1688
Figura 7. Análise da fidelidade genética de clones de <i>Guadua magna</i> micropropagados por multiplicação <i>in vitro</i> ao longo de cinco subcultivos. ....	1699
Figura 8. Percentagem de brotação após 30 dias em meio de multiplicação com 6,6 $\mu\text{M}$ de mT sob diferentes sistemas de cultivo (meio semissólido - MSS, meio líquido estacionário MLE e meio líquido sob agitação MLA) e utilizando diferentes tipos de explantes (1º nó, 2º nó, 3º nó, base e broto).....	17070
Figura 9. Aspecto de brotações de <i>Guadua magna</i> formadas após 30 dias de cultivo em meio de multiplicação com 6,6 $\mu\text{M}$ de mT em meio semissólido (MSS), meio líquido estacionário (MLE) e meio líquido sob agitação (MLA). ....	1733
Figura 10. Percentagem de enraizamento (A), número de raízes (B) e comprimentos de raízes (C) de microestacas inoculadas em meio de MS suplementado com as auxinas AIA, ANA e AIB nas concentrações 0,0; 1,23; 2,45; 4,90; 9,80 e 14,70 $\mu\text{M}$ após 60 dias em meio de enraizamento.....	175
Figura 11. Percentagem de enraizamento (A), número de raízes (B) e comprimentos de raízes (C) de explantes oriundos de diferentes posições do broto (1º nó, 2º nó, 3º nó, base e broto), inoculadas em meio de MS em diferentes concentrações de sais (MS1/4, MS1/2, MS3/4 e MS) suplementado com 4,90 $\mu\text{M}$ de AIB, após 60 dias em meio de enraizamento.....	1766
Figura 12. Plantas de <i>Guadua magna</i> enraizadas em meio de MS suplementado com 4,90 $\mu\text{M}$ de AIB em frascos com capacidade de 250 mL (A). Planta de <i>Guadua magna</i> após 60 dias em meio de enraizamento em meio de MS suplementado com	

9,80 $\mu$ M de AIB (B).....	1788	Figura 13. Percentagem de sobrevivência de plantas oriundas do enraizamento após 30 dias de aclimatização..
.....	1799	Figura 14. Aclimatização de plantas de <i>Guadua magna</i> após 30 dias em substrato Bioplant (A) e terra PE (B) e mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD. ....
	18080	

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Desenvolvimentos de plantas de <i>Dendrocalamus asper</i> germinadas <i>in vitro</i> após desinfestação e mantidas em condições de luz e escuro, após 30 dias em meio de cultivo. ...	555
Tabela 2. Desenvolvimento de plantas oriundas da germinação de sementes em de <i>Dendrocalamus asper</i> em meio semissólido (Tubos) e em meio líquido (RITA), acrescido de sacarose (Sac+) ou não (Sac-). Comprimento colmo, comprimento raiz, número de raízes e número de folhas. ....	577
Tabela 3. Quantificação e identificação de ácidos graxos em relação a $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca do endosperma, raiz e parte aérea durante e após a germinação de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> .....	67

### CAPÍTULO III

Tabela 1. Desenvolvimento pós-seminal de plantas de <i>Dendrocalamus asper</i> após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> de sementes conservadas por 0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C. ....	99
Tabela 2. Sobrevivência e desenvolvimento de plantas de <i>Dendrocalamus asper</i> aos 30 dias de aclimatização, oriundas de sementes conservadas por 0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C. ....	1000
Tabela 3. Quantificação e identificação de ácidos graxos em relação a $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca de sementes de <i>Dendrocalamus asper</i> mantidas sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196°C por zero (A), 365 (B) e 600 (C) dias de conservação.....	104

### CAPÍTULO IV

Tabela 1. <i>Primers</i> ISSR utilizados na análise de fidelidade genética de clones de <i>Guadua magna</i> e <i>Guadua angustifolia</i> produzidos após cinco subcultivos e suas respectivas sequencias.....	118
Tabela 2. Número e altura de brotos, número de nós, taxa de multiplicação e número de folhas durante a multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Guadua magna</i> em razão do número de subcultivos e da consistência semissólida (MSS) ou líquido (ML) do meio de cultura. ....	124
Tabela 3. Número e altura de brotos, número de nós, taxa de multiplicação e número de folhas durante a multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Guadua angustifolia</i> em razão do número de subcultivos e da consistência semissólida (MSS) ou líquida (ML) do meio de cultura. ....	125



Tabela 4. Percentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes em resposta ao enraizamento de plantas de <i>Guadua magna</i> e <i>Guadua angustifolia</i> em ML e MSS.....	128
Tabela 5. Altura de brotos, número de nós, número de folhas, e percentagem de sobrevivência de <i>Guadua magna</i> e <i>Guadua angustifolia</i> após de 30 dias de aclimatização em câmara de crescimento a temperatura de 25±1 °C por 30 dias. ....	128

## CAPÍTULO V

Tabela 1. Tratamentos de desinfestação de sementes de <i>Guadua magna</i> para cultivo <i>in vitro</i> . .....	1488
Tabela 2. Primers ISSR utilizados na análise de fidelidade genética de clones de <i>Guadua magna</i> produzidos após cinco subcultivos e suas respectivas sequencias. ....	1522
Tabela 3. Número de brotos, altura de brotos, número de nós, número de folhas, número de raízes, comprimento de raízes e percentagem de formação de raízes durante a multiplicação de segmentos nodais de <i>Guadua magna</i> em meio de MS com BAP, Kn e mT nas concentrações de 0,0; 6,6; 13,32; 19,98 e 26,64 µM durante cinco subcultivos.....	1633
Tabela 4. Avaliação do número de brotos, comprimento de brotos, número de nós e número de folhas após 30 dias em meio de multiplicação com 6,66 µM de mT nos sistemas de cultivo MSS, MLE e MLA, utilizando explantes de diferentes posições do colmo 1º nó, 2º nó, 3º nó, base e broto.....	1711

## LISTA DE ABTEVIATURAS

<b>μL</b>	Microlitros (unidade de medida de volume)
<b>μM</b>	Micromolar (unidade de medida de moles por volume)
<b>μm</b>	Micrômetro (unidade de medida de comprimento)
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>AIB</b>	Ácido 3-indolbutírico
<b>ANA</b>	Ácido naftaleno acético
<b>BAP</b>	6-benzilaminopurina
<b>CK</b>	Citocinina
<b>DMF</b>	N,N-dimetilformamida
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>FAA</b>	Formaldeído, ácido acético e álcool etílico
<b>g</b>	O grama (unidade de medida de massa).
<b>ISSR</b>	Inter Simple Sequence Repeats
<b>KN</b>	Cinetina
<b>mg</b>	Miligramas (unidade de medida de massa)
<b>mL</b>	Mililitro (unidade de medida de volume)
<b>ML</b>	Meio líquido
<b>MLA</b>	Meio líquido agitação
<b>MLE</b>	Meio líquido estacionário
<b>MS</b>	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
<b>MSS</b>	Meio semissólido
<b>mT</b>	Meta-topolina
<b>NL</b>	Nitrogênio líquido
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PPM</b>	Plant Preservative Mixture
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona-10
<b>Sac</b>	Sacarose
<b>TU</b>	Teor de umidade

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Família Poaceae.....	4
2.2 Aspectos botânicos da subfamília Bambusoideae .....	5
2.3 Distribuição geográfica de Bambusoideae .....	10
2.4 Gênero <i>Dendrocalamus</i> Nees .....	11
2.5 Gênero <i>Guadua</i> Kunth .....	12
2.6 Importância econômica do bambu.....	13
2.7 Propagação de bambus .....	15
2.7.1 Germinação.....	15
2.7.2 Micropropagação .....	166
i) seleção de plantas matrizes .....	17
ii) estabelecimento .....	18
iii) multiplicação.....	18
iv) enraizamento .....	19
v) aclimatização.....	20
2.8 Conservação de germoplasma .....	21
2.9 Fidelidade genética e variações somaclonais .....	22
2.9.1 Marcadores moleculares .....	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

## CAPÍTULO I

### **GERMINAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS EM SEMENTES DE BAMBU (*Dendrocalamus asper* {Schult. & Schult. f.} Backer ex K. Heyne)**

RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	433
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	455
2.1 Material vegetal .....	455
2.2 Determinação de protocolos de germinação e desinfestação de sementes .....	455
2.2.1 Avaliação de diferentes condições de cultivo na germinação de sementes.....	455
2.2.2 Avaliação da germinação <i>in vitro</i> em função de diferentes protocolos de desinfestação. .....	466

2.2.3 Influência do sistema de cultivo <i>in vitro</i> e da sacarose na germinação de sementes ....	466
2.2.4 Condições de cultivo .....	477
2.2.5 Análise estatística .....	488
2.3 Análise das plantas germinadas por citometria de fluxo .....	488
2.4 Caracterização anatômica e histoquímica.....	499
2.5 Mobilização de reservas .....	499
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	511
3.1 Avaliação de diferentes condições de cultivo na germinação de sementes.....	511
3.2 Avaliação da germinação <i>in vitro</i> em função de diferentes protocolos de desinfestação	533
3.3 Influência do sistema de cultivo <i>in vitro</i> e da sacarose na germinação de sementes .....	566
3.4 Quantificação de DNA por citometria de fluxo.....	588
3.5 Caracterização anatômica e histoquímica.....	588
3.6 Mobilização de reservas .....	644
4. CONCLUSÕES .....	688
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## CAPÍTULO II

### TOLERÂNCIA DE SEMENTES DE BAMBU (*Dendrocalamus asper*) À DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO

RESUMO.....	74
ABSTRACT.....	75
1. INTRODUÇÃO.....	766
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	788
2.1 Material vegetal .....	788
2.2 Curva de dessecação .....	788
2.3 Criopreservação de sementes .....	788
2.4 Coleta de dados e análise estatística .....	799
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	80
4. CONCLUSÕES .....	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85

## CAPÍTULO III

### CONSERVAÇÃO *EX SITU* E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE BAMBU (*Dendrocalamus asper* {Schult. & Schult. f.} Backer ex K. Heyne)

RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1. INTRODUÇÃO.....	900
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1. Material vegetal.....	922
2.2. Determinação de protocolo para a conservação <i>ex situ</i> de sementes.....	922
2.2.1. Determinação da umidade.....	922
2.2.2. Conservação <i>ex situ</i> das sementes a médio-longo prazo.....	922
2.2.3 Análise estatística.....	933
2.3 Aclimatização.....	933
2.4 Análises bioquímicas de sementes.....	944
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	945
3.1 Determinação de protocolo para a conservação <i>ex situ</i> de sementes.....	955
3.1.1. Determinação da umidade.....	955
3.1.2 Conservação <i>ex situ</i> das sementes a médio-longo prazo.....	955
3.2 Aclimatização.....	988
3.3 Análises bioquímicas de sementes.....	1011
4. CONCLUSÕES.....	1045
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	1066

#### **CAPÍTULO IV**

### **MICROPROPAGAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS DE ESPÉCIES DE BAMBU DO GÊNERO *GUADUA* (BAMBUSOIDEAE, POACEAE)**

RESUMO.....	110
ABSTRACT.....	111
1. INTRODUÇÃO.....	112
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	114
2.1. Material vegetal.....	114
2.2. Estabelecimento do material vegetal <i>in vitro</i> .....	114
2.3. Multiplicação.....	115
2.4. Enraizamento e aclimatização.....	116
2.5. Condições de cultivo.....	116
2.7 Fidelidade genética - ISSR.....	1168
3. RESULTADOS.....	120
3.1. Estabelecimento do material vegetal <i>in vitro</i> .....	120

3.2. Multiplicação.....	120
3.3. Enraizamento e aclimatização.....	127
3.4 Fidelidade genética - ISSR .....	129
4. DISCUSSÃO .....	134
5. CONCLUSÕES .....	137
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	138

## **CAPÍTULO V**

### **MICROPROPAGAÇÃO DE *Guadua magna* (POACEAE, BAMBUSOIDEAE) E ANÁLISE MOLECULAR POR ISSR DOS CLONES REGENERADOS**

RESUMO.....	142
ABSTRACT.....	143
1. INTRODUÇÃO.....	1444
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	1477
2.1 Material vegetal .....	1477
2.2 Determinação de protocolos para desinfestação de sementes .....	1477
2.3 Multiplicação de plântulas oriundas da germinação.....	1488
2.4 Indução de multiplicação de brotações através de citocininas em diferentes concentrações .....	1499
2.4.1 Quantificação de clorofila e carotenoides em plantas micropropagadas.....	1499
2.4.2 Análise da fidelidade genética de clones micropropagados através de marcadores ISSR.....	150
50	
2.5 Multiplicação de explantes oriundos de diferentes posições do broto em três sistemas de cultivo .....	1522
2.6 Enraizamento de microestacas utilizando auxinas em diferentes concentrações .....	1544
2.7 Enraizamento de explantes oriundos de diferentes posições no broto em meio com sais de MS em diferentes concentrações .....	1544
2.8 Condições de cultivo <i>in vitro</i> .....	155
2.9 Aclimatização de plantas obtidas durante o enraizamento <i>in vitro</i> .....	1555
3.0 Análises estatísticas .....	1566
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	1577
3.1 Determinação de protocolos para desinfestação de sementes .....	1577
3.2 Indução de multiplicação de brotações através de citocininas em diferentes concentrações .....	16060

3.2.1	Quantificação de clorofila e carotenoides em plantas micropropagadas.....	1677
3.2.2	Análise da fidelidade genética de clones micropropagados através de marcadores ISSR.....	169
9		
3.3	Multiplicação de explantes oriundos de diferentes posições do broto em três sistemas de cultivo .....	170
3.4	Enraizamento de microestacas utilizando auxinas em diferentes concentrações .....	1733
3.5	Enraizamento de explantes de diferentes posições no broto em meio com sais de MS em diferentes concentrações.....	1744
3.6	Aclimatização de plantas obtidas do enraizamento <i>in vitro</i> .....	17777
4.	CONCLUSÃO.....	181
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	1822

## 1. INTRODUÇÃO

O bambu é um dos representantes da família Poaceae, subfamília Bambusoideae, com cerca de 120 gêneros e 1.641 espécies, distribuídos em todos os continentes, exceto o europeu e antártico (Das et al., 2008; Soreng et al., 2015). A Lista das Espécies da Flora do Brasil cita 35 gêneros e 258 espécies de bambus nativos, distribuídos em duas tribos, Olyreae e Bambuseae, representando 18% de todas as espécies de bambus do mundo (Filgueiras et al., 2015). Representantes desta gramínea podem ser encontrados nos principais biomas brasileiros, como na Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Filgueiras et al., 2015). Na Região Amazônica, as florestas abertas com bambus do gênero *Guadua* cobrem cerca de 180.000 km<sup>2</sup>, incluindo o Oeste do Estado do Amazonas, o Estado do Acre, o Nordeste do Peru e o Norte da Bolívia, constituindo a maior floresta nativa contínua de bambus do mundo (Judziewicz et al., 1999; Filgueiras; Gonçalves, 2004).

Os bambus são gramíneas arborescentes, apresentando no solo um sistema subterrâneo rizomatoso bem desenvolvido, composto pelo rizoma e a raiz. A parte aérea é composta pelo colmo lignificado, com nós e entrenós cobertos por folhas (Silva, 2005; Gonçalves et al., 2011). Apresentam rápido crescimento e incremento de biomassa que, após longos períodos de crescimento exclusivamente vegetativo (Griscom; Ashton, 2003, 2006), não raramente culminam com o florescimento, seguido de morte generalizada da população (Grombone-Guaratini et al., 2011). O crescimento pode ser do tipo simpodial (entouceirantes) ou monopodial (alastrantes), este último considerado de hábito invasivo (Devi; Singh, 2009).

Além de possuir excelentes características físicas, químicas e mecânicas, os bambus são considerados eficientes sequestradores de carbono, podendo ser utilizados em reflorestamentos, na recomposição de matas ciliares e, também, como protetores e regeneradores ambientais (Brias; Hunde, 2009; Afonso, 2011). Porém, devido a qualidade física de seus colmos, várias espécies de bambus também podem ser utilizadas como matérias primas em obras de engenharia (Ghavami; Marinho, 2005; Pereira, 2011), ou ainda, na fabricação de papel, a atividade mais explorada no Brasil (Duarte et al., 2007).

Os bambus lenhosos possuem ciclos reprodutivos que variam de 1 a 120 anos, quando ocorre, principalmente, o florescimento gregário que culmina com o florescimento, produção de sementes, seguido de morte da touceira (Azzini et al., 1982; Thapliyal et al., 2015). Dessa forma, a regeneração da floresta de bambu depende da regeneração natural das sementes, que é um processo lento (Wang et al., 2007). A germinação destas sementes em laboratório, pode auxiliar na regeneração das florestas, aumentando a disponibilidade de plantas. Adicionalmente, possibilita a compreensão do comportamento fisiológico durante a



germinação. De acordo com Bahru et al. (2015), estudar a ecologia da germinação de sementes, permite selecionar as condições favoráveis para germinação mais rápida, produzindo plantas vigorosas, que poderão ser utilizadas na produção de mudas em em larga escala.

Os recursos genéticos vegetais podem ser conservados *in situ*, que é a conservação da espécie em seu habitat, e *ex situ*, que consiste na retirada das plantas do seu habitat natural e sua transferência para condições de armazenamento artificiais (Nick et al., 2010). A preservação de germoplasma *ex situ* de plantas, por meio do uso de sementes, tem sido considerada uma das formas mais eficientes de conservação (Engels; Engelmann, 1998; Jain, 2011). Contudo, cada espécie possui características próprias quanto à tolerância a temperaturas reduzidas e baixa umidade, o que impede que o armazenamento de sementes seja aplicado a todas as espécies de plantas com a mesma eficácia, sendo fatores determinantes para a conservação (Rajanaidu; Ainul, 2013). Portanto, para preencher esta lacuna de investigação é imperativo encontrar métodos de conservação *ex situ* adequados ao bambu (Bahru et al., 2015), uma área pouco estudada até o momento, devido as características intrínsecas das plantas da família.

Com os longos ciclos reprodutivos e a baixa produção de sementes, a propagação do bambu tem ocorrido de forma vegetativa, por divisão das touceiras, partes de rizomas, ou ainda, secções de colmos, variando de acordo com a espécie (Medina et al., 1962; Azzini et al., 1978; Salgado; Godoy Jr., 2002; Silva, 2005). Estas técnicas demandam grande quantidade de material e espaço (Gielis; Oprins, 2002; Silva, 2005), se tornando onerosas e de baixo rendimento (Azzini et al., 1978). Dessa forma, as técnicas de micropropagação podem constituir uma alternativa viável para propagação destas plantas (Jiménez et al., 2006; García-Ramírez et al., 2010). De fato, o cultivo *in vitro* já tem sido utilizado para propagação de bambus, principalmente para as espécies asiáticas. Na literatura, vários protocolos já foram estabelecidos (Jiménez et al., 2006; Shirin; Rana, 2007; Mishra et al., 2008; Banerjee; Gantait, 2011; Goyal et al., 2015). No Brasil, o desenvolvimento de protocolos para espécies com importância econômica ainda se encontra no início. Para que a micropropagação seja de fato viável e o cultivo *in vitro* seja utilizado de maneira eficaz, é necessário que se estabeleçam protocolos específicos, que permitam a propagação em escala de espécies de bambus de interesse, de maneira prática, segura e econômica (Singh et al., 2012; Anand et al., 2013; García-Ramírez et al., 2014).

No entanto, embora a técnica possa ser considerada como uma ferramenta de grande aplicabilidade para a propagação do bambu, a micropropagação pode ser limitada se no decorrer do processo provocar mudanças genéticas e epigenéticas (não herdáveis) no material em cultivo, ou seja, induzindo a geração de variações somaclonais (Baránek et al., 2010; Jaligot et

al., 2011). No cultivo *in vitro* o aparecimento dessas variações ocorre com certa frequência (Yang et al., 2010) e o uso de marcadores moleculares tem sido eficiente na detecção de diferentes tipos de variações em plantas, embora em bambus seus usos ainda sejam restritos (Yeasmin et al., 2014).

Objetivou-se com o presente trabalho desenvolver estratégias de germinação, conservação *ex situ* de sementes e micropropagação de espécies bambus dos gêneros *Guadua* e *Dendrocalamus*. Adicionalmente, o trabalho também avaliou aspectos anatômicos e bioquímicos da germinação e desenvolvimento pós-seminal, além de avaliar a fidelidade genética por marcadores moleculares das plantas produzidas por micropropagação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Poaceae

A família Poaceae é uma das mais diversificadas famílias de Angiospermas. É a quarta maior família em número de espécies no mundo (The Plant List, 2013), totalizando 771 gêneros e aproximadamente 12.074 espécies (Soreng et al., 2015), precedidas respectivamente das famílias: Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae (Shirasuna; Filgueiras, 2013).

Poaceae é considerado um grupo monofilético (GPWG, 2011) e pertence às monocotiledôneas (Chase; Reveal, 2009). Alguns representantes da família Poaceae são considerados de grande importância alimentícia e econômica para a humanidade (Sungkaew et al., 2009), por serem os componentes alimentares básicos, como são os casos do arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), milho (*Zea mays* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L. subsp. vulgare) e da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Schmidt; Longhi-Wagner, 2009).

De acordo com o Soreng et al. (2015) são reconhecidas 12 subfamílias dentro da família Poaceae: Anomochlooideae, Aristidoideae, Arundinoideae, Bambusoideae, Chloridoideae, Danthonioideae, Micraioideae, Oryzoideae, Panicoideae, Pharoideae, Puelioideae e Pooideae. A Bambusoideae é representada no mundo por 120 gêneros e 1.641 espécies (Soreng et al., 2015), sendo distribuídas em todos os continentes, com exceção do continente europeu (Das et al., 2008; Singh et al., 2013) e antártico, que não possuem espécies nativas (Shirasuna; Filgueiras, 2013; Soreng et al., 2015).

Esta subfamília é constituída pelos bambus e reúne três clados: as tribos Olyreae (bambus herbáceos), Bambuseae (bambus lignificados de clima tropical e subtropical) e Arundinarieae (bambus lignificados de clima temperado) (Sungkaew et al., 2009; Shirasuna; Filgueiras, 2013; Soreng et al., 2015; Filgueiras; Viana, 2017). No Brasil, há representantes das tribos Olyreae e Bambuseae (Filgueiras; Viana, 2017).

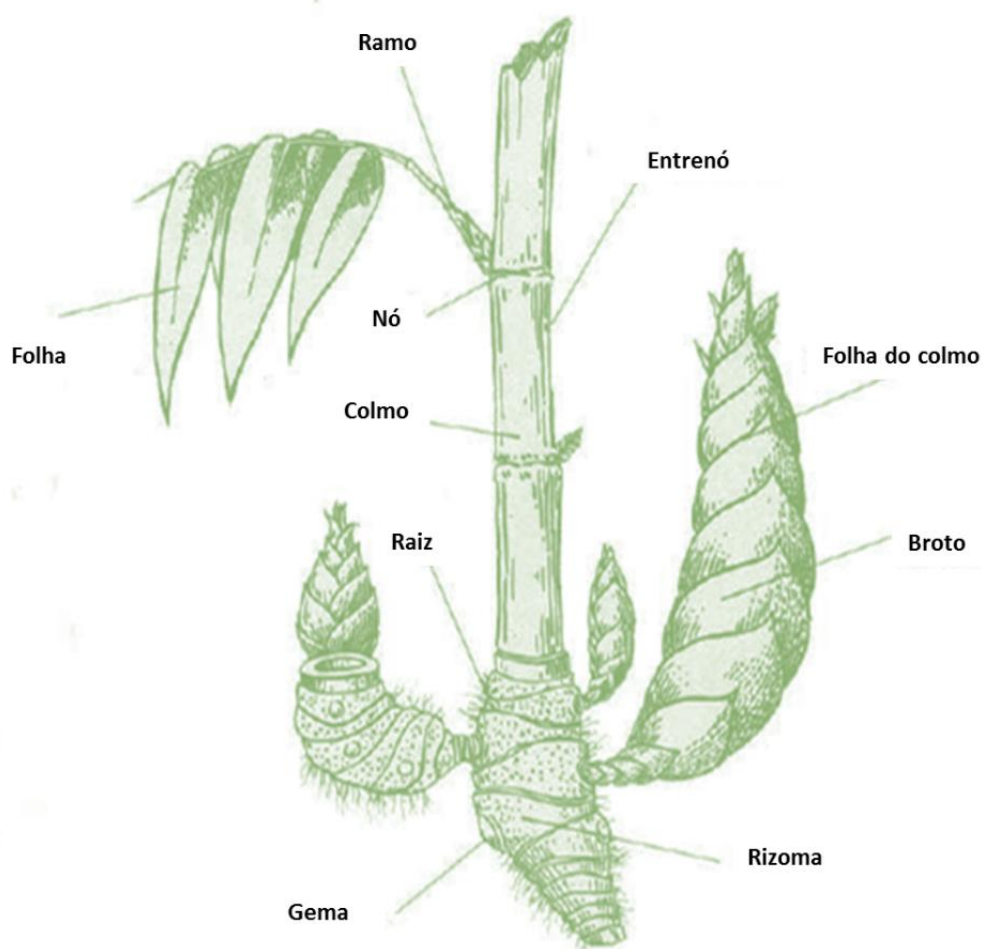
A Lista das Espécies da Flora do Brasil cita 35 gêneros e 258 espécies de bambus nativos, distribuídos em duas destas tribos: Olyreae e Bambuseae, (Filgueiras et al., 2015). A tribo Olyreae é composta por bambus herbáceos e tem 17 gêneros e 93 espécies, enquanto Bambuseae é composta por bambus lignificados ou lenhosos e apresenta 18 gêneros e 165 espécies. O número de bambus endêmicos no Brasil alcança 12 gêneros e 175 espécies (Filgueiras; Viana, 2017).

## 2.2 Aspectos botânicos da subfamília Bambusoideae

A subfamília Bambusoideae é caracterizada pelas seguintes sinapomorfias: plantas perenes (raro anuais), hábito rizomatoso, ramificação simples ou complexa, folhas pseudopecioladas, mesofilo com células invaginantes fortemente assimétricas, associadas a células fusóides e células buliformes, tricomas bicelulares (micropelos) alongados, com paredes delgadas (Judziewicz et al., 1999; BPG, 2012; Shirasuna; Filgueiras, 2013).

Os representantes podem variar de alguns centímetros a 40 metros de altura, apresentando diversos hábitos de crescimento, desde eretos com os colmos fortemente agregados, eretos com o colmo difuso, eretos e arqueados no ápice, decumbentes, alastrantes e apoiantes ou escandentes (Judziewicz et al., 1999).

Embora sejam gramíneas, as espécies da subfamília Bambusoideae possuem hábito arborescente e, tais como as árvores, apresentam parte aérea constituída pelo colmo, folhas e ramificações, e outra subterrânea composta pelo rizoma e raiz (Figura 1) (Ghavami; Marinho, 2005; Silva, 2005).



**Figura 1.** Representação esquemática do bambu e suas partes vegetativas (adaptado de NMBA, 2004).

O bambu é uma das plantas que possui as maiores velocidades de crescimento do reino vegetal (Qisheng et al., 2002; Galvão et al., 2009; Silva et al., 2011). Podem ter desde poucos milímetros até dezenas de centímetros de diâmetro (Filgueiras; Viana, 2017). Existem algumas espécies de bambu que podem crescer de 15 a 28 centímetros de altura por dia (Nath et al., 2004), atingindo de 30 a 40 metros de altura na fase adulta em até 120 dias (Qisheng et al., 2002).

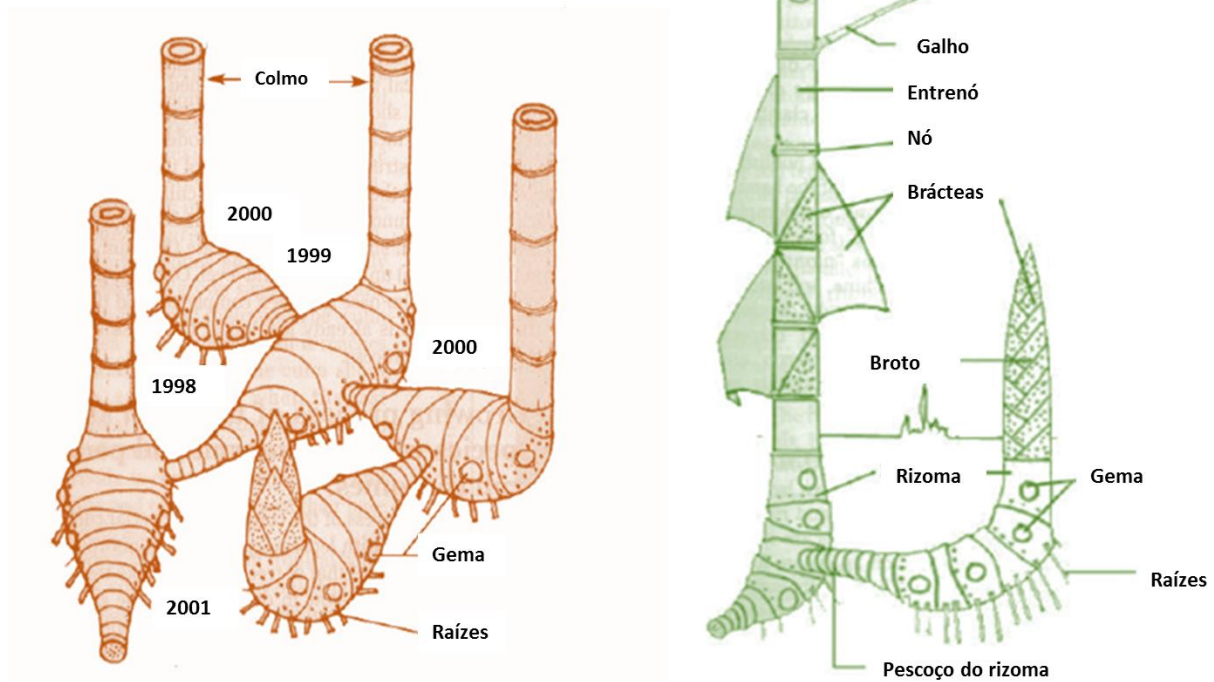
Na fase juvenil ocorre a queda das folhas caulinares e desenvolvimento dos galhos e folhas da ramagem. A fase adulta é caracterizada, geralmente, pela mudança da cor verde brilhante para o verde opaco. O colmo começa a envelhecer quando os entrenós ficam amarelados e os galhos da porção média secam. O grau de desenvolvimento vegetativo dos bambus é determinado pela mudança nos colmos, por meio da lignificação dos tecidos, espessamento das paredes das fibras e perda de umidade (Qisheng et al., 2002; Londoño, 2002; Galvão et al., 2009).

O rizoma é o elemento básico da touceira, responsável pela propagação e interligação dos colmos, sendo estruturas axiais segmentadas, constituídas alternadamente por nós e entrenós. O rizoma é caracterizado pela presença de raízes, bainhas e gemas laterais (Londoño, 2002; Beraldo et al., 2003; Stapleton, 2014). É um eixo segmentado tipicamente subterrâneo que constitui a estrutura de suporte da planta, e tem papel importante na absorção de água e nutrientes do solo, já que as raízes adventícias estão diretamente conectadas a esta estrutura (Londoño, 2002; Silva, 2005).

Os bambus são divididos em dois grupos distintos quanto ao tipo de crescimento do rizoma: os paquimorfos (simpodiais) e os leptomorfos (monopodiais). Muitos autores propõem o tipo anfimórfico (anfipodial) como um terceiro grupo que dispõe de ambas as características anteriores (Judziewicz, 1999; Londoño, 2002; Silva, 2005; Filgueiras; Viana, 2017).

O grupo de bambus com rizomas do tipo paquimorfos são também denominados entouceirantes ou simpodiais (Londoño, 2002; Silva, 2005; Stapleton, 2014; Filgueiras; Viana, 2017) (Figura 2). De maneira geral, os rizomas deste grupo possuem forma de bulbo e entrenós curtos e grossos, com raízes na parte inferior. Contém gemas laterais dormentes que se ativam anualmente e desenvolvem novos rizomas e, da gema apical deste novo rizoma, surge um novo colmo. Esse processo contínuo permite que os rizomas se desenvolvam formando touceiras densas. Bambus com este tipo de rizoma ocorrem em regiões de clima tropical e são representados, principalmente pelos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Guadua* (Londoño, 2002; Silva, 2005; Stapleton, 2014).

Os bambus monopodiais ou alastrantes possuem rizomas que são do tipo leptomorfo, considerados de hábito invasivo e, geralmente, distribuídos em regiões temperadas (Figura 3).

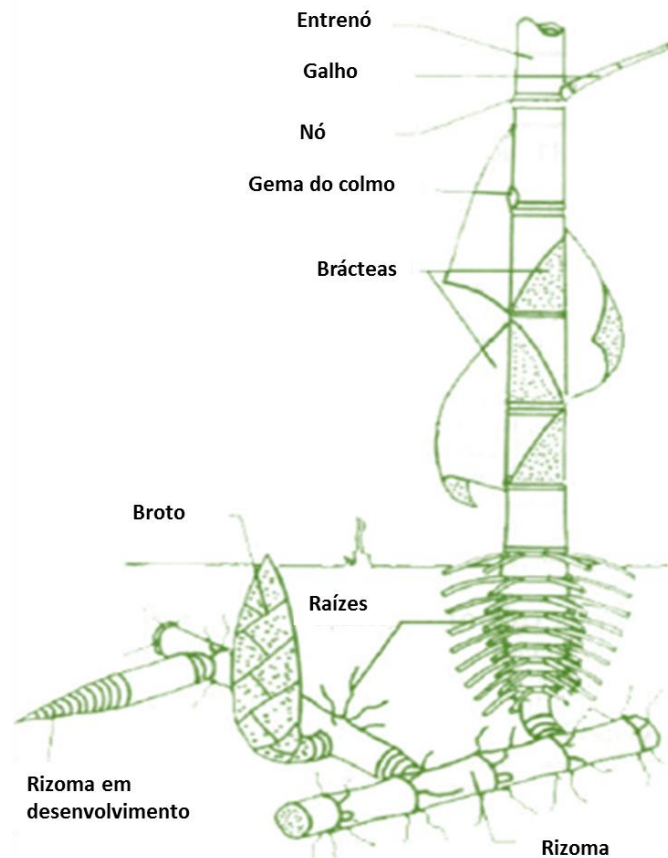


**Figura 2.** Sistema de desenvolvimento do rizoma (a) e do colmo (b) do grupo paquimorfo (adaptado de Hidalgo-López, 2003).

As plantas são caracterizadas por apresentarem rizomas alongados, duros, finos, de forma cilíndrica e normalmente, de diâmetro menor que os colmos eretos que irão originar. As gemas laterais são solitárias e se transformam diretamente em colmos, sendo poucas as que podem se transformar em um novo rizoma. Todos os nós possuem raízes e são bem espaçados, o que confere a característica de bambus alastrantes. Um importante representante desse tipo de bambu é o gênero *Phyllostachys* que, apesar de ser de clima temperado, é bastante difundido no Brasil (Londoño, 2002; Silva, 2005; Stapleton, 2014).

Por ser uma monocotiledônea, os bambus são destituídos de raiz principal, apresentando raiz fasciculada que parte dos rizomas e chega a profundidades proporcionais ao tamanho da copa de cada espécie. O termo sistema radicular não é adequado aos bambus, sendo mais indicado o termo sistema subterrâneo, que define o conjunto de rizomas e raízes (Silva, 2005).

A parte aérea dos bambus é constituída pelo colmo, um eixo segmentado que emerge do rizoma, formados por nós e entrenós (Qisheng et al., 2002; Londoño, 2002; Stapleton, 2014) e gemas, e apresentam rica diversidade de forma, podendo ser sólidos, fistulosos ou medulosos, eretos, arqueados, apoiantes ou escandentes (Filgueiras; Viana, 2017). Com o crescimento da planta, cada novo nó interno é envolvido por uma folha caulinar protetora, a bainha. Os colmos



**Figura 3.** Sistema de desenvolvimento do rizoma e colmo do grupo leptomorfo (Adaptado de Hidalgo-López, 2003).

são formados por fibras, vasos condutores de seiva, que estão desuniformemente distribuídos na seção transversal, envolvidos pelo parênquima (Qisheng et al., 2002; Ghavami; Marinho, 2005). Os entrenós podem ser ocos, como ocorre na maioria das espécies de bambu, ou podem ser sólidos, como ocorre em *Chusquea* e algumas espécies de *Merostachys* e *Guadua* (Qisheng et al., 2001; Londoño, 2002; Ghavami; Marinho, 2005). Características como comprimento, espessura da parede, diâmetro, presença de cera, pêlos e cerdas nos nós, podem ser utilizados para distinção de gêneros e, até mesmo, de espécies (Londoño, 2002; Stapleton, 2014).

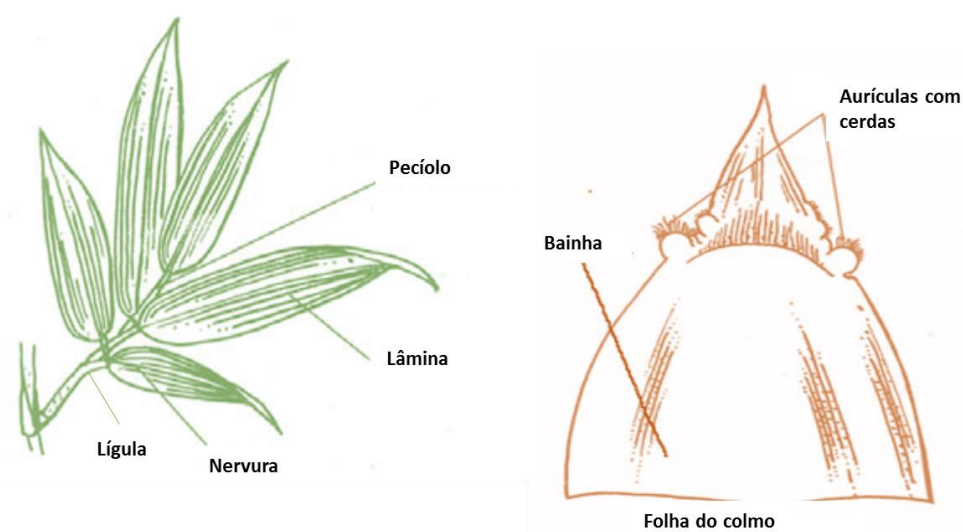
No bambu, as folhas são lanceoladas e pseudopecioladas, compostas por bainha e lâmina foliar com lígula na região de transição (Judziewicz et al., 1999; Filgueiras; Viana, 2017), como ilustrado na Figura 4. Enquanto a bainha tem a função de proteger as gemas do colmo, as lâminas foliares são responsáveis pela fotossíntese. Tanto as folhas dos ramos jovens, como as folhas dos colmos lignificados podem apresentar fímbrias, ou seja, cerdas que se desenvolvem na junção entre a bainha e a região ligular (Judziewicz et al., 1999; Londoño, 2002; Stapleton, 2014; Filgueiras; Viana, 2017). As folhas são importantes em estudos

taxonômicos, sobretudo quando avaliadas anatomicamente (Londoño, 2002; Filgueiras; Viana, 2017).

As flores dos bambus são agrupadas em pequenas inflorescências denominadas espiguetas, que, por sua vez, reúnem-se em sinflorescências (Filgueiras; Viana, 2017). De acordo com Filgueiras e Viana (2017) a floração dos bambus é distinta das demais angiospermas, pois florescem ciclicamente e depois de uma floração em massa toda a população morre. O fenômeno, conhecido como monocarpia, ocorre em muitas espécies da tribo Bambuseae, porém é raro em Olyreae, cujas plantas são pluricárpicas, isto é, florescem anualmente, algumas florescendo continuamente durante grande parte do ano. Em bambus monocárpicas é possível encontrar ciclos de florescimentos que variam de 1 a 120 anos (Filgueiras, 1988; BPG, 2012; Waghmare; Bagde, 2013).

Geralmente, o florescimento ocorre após longos períodos de crescimento exclusivamente vegetativo (Griscom; Ashton, 2003, 2006), seguido de morte generalizada da população (Azzini et al., 1982; Grombone-Guaratini et al., 2011; Thapliyal et al., 2015), normalmente em ondas que duram de 2 a 3 anos, em uma mesma área geográfica (Thapliyal et al., 2015). Várias espécies de bambus morrem ao florescer devido à energia despendida pela planta para a formação de um grande número de sementes (Filgueiras, 1988) e, também, pelo fato dos ápices meristemáticos serem degenerados durante a floração (Ramanayake et al., 2006).

O florescimento em ondas, seguido da morte da touceira é do tipo gregário e, dependendo da espécie, podem ser descritos outros dois padrões de florescimento: o contínuo e o esporádico (Thapliyal et al., 2015). O florescimento contínuo é observado na maioria dos



**Figura 4.** Representação esquemática das folhas de bambu (adaptado de NMBA, 2004).



bambus herbáceos, ocorrendo todos os anos sem prejuízos para a planta, embora as sementes não sejam viáveis (Filgueiras, 1988; Thapliyal et al., 2015). O florescimento esporádico não possui muito padrão e parece ser causado por fatores ambientais (como a seca ou frio) e não por fatores genéticos. Este tipo de floração pode ocorrer em touceiras isoladas, ou em todas dentro de uma mesma área, não produzem sementes viáveis e raramente morrem após a floração (Azzini et al., 1982; Thapliyal et al., 2015).

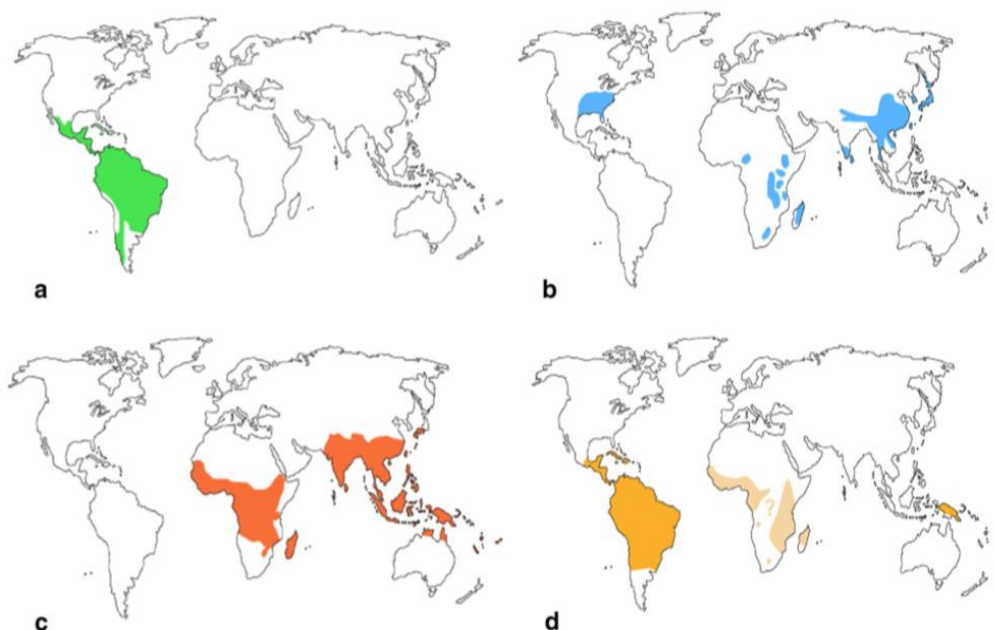
Após o florescimento do bambu ocorre a frutificação. Na maioria das vezes, o fruto é seco, de tamanho reduzido, com pericarpo fino revestindo a semente, conhecido como cariopse, podendo ser morfológicamente comparado com um grão de arroz ou de trigo (Wong, 2004; Das et al., 2008). Dentre as mais de 1400 espécies de bambus existentes em todo mundo, estão descritos apenas três tipos de sementes, reconhecidos por sua morfologia: cariopse, glande e bacca (Thapliyal et al., 2015).

Na semente do tipo cariopse, exclusivo da família Poaceae, o pericarpo é membranoso, fino, macio e preso ao revestimento da semente (GPWG, 2001; Thapliyal et al., 2015). O embrião é lateral, ao contrário de outras monocotiledôneas, e é altamente diferenciado (GPWG, 2001). O fruto tem uma sutura ventral, semelhante a uma depressão, que é quase tão longa quanto o fruto inteiro. A semente tipo glande, tem o pericarpo duro, liso e separado do revestimento da semente e nenhuma sutura ventral. Já a semente do tipo bacca, possui o pericarpo carnoso e espesso, separado do revestimento da semente. As sementes deste tipo são esféricas e estão entre as maiores sementes de bambu, ocorrendo nos gêneros *Cyrtochloa*, *Dinochloa*, *Melocalamus*, *Melocanna* e *Sphaerobambos* (Wong, 2004; Silva, 2005; Das et al., 2008; Thapliyal et al., 2015).

### 2.3 Distribuição geográfica de *Bambusoideae*

As populações de bambus se distribuem naturalmente dos trópicos às regiões temperadas (Figura 5). No entanto, apresentam maior ocorrência nas zonas quentes e com chuvas abundantes. Estima-se que espécies de bambu ocupem cerca de 18 milhões de hectares em ecossistemas florestais mundiais, incluindo a Ásia, África e Américas (Brias; Hunde 2009; Guerreiro; Lizarazu, 2010). Do total de 1.641 espécies distribuídas em 120 gêneros de bambus conhecidos no mundo (Soreng et al., 2015), a América Latina possui 39% das espécies e 31% dos gêneros (BPG, 201). Somente no Brasil ocorrem 35 gêneros e 258 espécies nativas, representando 18% de todas as espécies de bambus do mundo (Filgueiras et al., 2015; Filgueiras; Viana, 2017). Desse total, 173 espécies são endêmicas (Filgueiras et al., 2015), o que torna o Brasil o país com a maior diversidade de bambus do continente Americano (Grombone-Guaratini et al., 2011).

A distribuição ocorre nos principais biomas brasileiros, que incluem a Mata Atlântica, com 65% das espécies, Amazônia, com 26%, e o Cerrado, com 9% (Filgueiras; Gonçalves 2004). Estudos realizados por meio de imagens de satélites, demonstraram a existência de uma floresta de bambus nativos no estado do Acre (Beraldo; Pereira, 2007), onde predominam bambus do gênero *Guadua*. Além de cobrir uma grande faixa do estado, as populações naturais de bambus também cobrem áreas da Bolívia e Peru (Filgueiras; Gonçalves, 2004).



**Figura 5.** Distribuição de bambus no mundo; a. Bambu lenhoso Neotropical; b. Bambu lenhoso de região temperada; c. Bambu lenhoso Paleotropical; d. Bambus herbáceos (Fonte: Adaptado de Yeasmin et al., 2014).

#### 2.4 Gênero *Dendrocalamus* Nees

O gênero *Dendrocalamus* é um dos mais relevantes da subfamília Bambusoideae por apresentar numerosos usos na construção, na indústria farmacêutica, na produção de móveis, de papel, artesanatos, entre outros usos (Montiel; Sánchez, 2006b). Constituído por 29 espécies, distribuídas no subcontinente Indiano e ao sudeste da Ásia e da Península da Malásia, principalmente em altitudes de 0-1500 metros e adaptando-se a solos secos e úmidos, crescem melhor em solos ricos e tolera baixas temperaturas de até  $-3^{\circ}\text{C}$  (Seethalakshmi; Kumar, 1998; Montiel; Sánchez, 2006a).

Facilmente reconhecido por seus colmos de paredes espessas, nós dilatados e raízes aéreas nos nós mais baixos (Dransfield, 1980). Algumas espécies desse gênero chegam a atingir 30 metros ou mais de altura. *Dendrocalamus* são fonte de tabashir (secreção sílica que alguns bambus apresentam) e são a base da indústria de papel na Índia (Dahlgren et al., 1985).

Dentre as espécies do gênero, o *Dendrocalamus asper* ({Schult. & Schult. f.} Backer ex K. Heyne) se destaca pela qualidade e resistência de sua madeira. É uma espécie asiática, originada no Sudeste da Ásia, provavelmente natural da Malásia, introduzida e cultivada em vários países tropicais (Ciaramello; Azzini, 1971; Montiel; Sanchez, 2006b). É um bambu de hábito perene, rizoma paquimorfo, colmos eretos de porte gigante de 15 a 20 metros de altura, colmos com diâmetro de 12 cm, com raízes aéreas saindo dos nós (Clayton et al., 2006; Shirasuna, 2012).

Shirasuna (2012) ressalta que essa espécie é, algumas vezes, erroneamente classificada como *Dendrocalamus giganteus* (Munro). É também conhecida como *Bambusa aspera* Schultes f. (1830), *Gigantochloa aspera* (Schultes f.) Kurz (1876), *Dendrocalamus flagellifer* e *Dendrocalamus marrillianus* Elmer (1915) (Montiel; Sanchez, 2006b), e comumente conhecida como bambu gigante (Montiel; Sanchez, 2006b).

## 2.5 Gênero *Guadua* Kunth

O gênero *Guadua* foi estabelecido em 1822 pelo botânico alemão Karl Sigismund Kunth, que utilizou o termo “*guadua*” que já era empregado pelos indígenas da Colômbia e Equador. Este gênero reúne aproximadamente 30 espécies que se distribuem do norte do México ao sul da Argentina (Londoño, 2004). Os bambus do gênero *Guadua* são endêmicos das Américas e se destacam entre os bambus lenhosos do Novo Mundo por sua importância social, econômica e cultural e o seu uso remonta a época pré-colombiana (Londoño, 2004; Silva, 2005). De acordo com Filgueiras e Viana (2017) dentro do gênero em questão são reconhecidas 19 espécies nativas e cinco endêmicas distribuídas no Brasil. Os especialistas apontam ainda a existência de várias espécies não descritas em praticamente todas as regiões do país (Filgueiras; Viana, 2017).

As espécies de *Guadua* são plantas com colmos que vão desde eretos e arqueados no ápice a escandentes, de porte médio a grande, com até 30 m de comprimento e 22 cm de diâmetro (Londoño, 2001; Galvão et al., 2009; Schmidt; Longhi-Wagner, 2009). Distingue-se facilmente dos demais da tribo pela conspícua presença de espinhos nos nós, cujo número e formato variam entre as espécies (Filgueiras; Viana, 2017). Rizomas paquimorfos e colmos ocos são encontrados na maioria das espécies (Judziewicz et al., 1999; Londoño, 2001; Schmidt; Longhi-Wagner, 2009). As ramificações originam-se das gemas localizadas nos nós da porção mediana do colmo e são alternadas (Silva, 2005; Schmidt; Longhi-Wagner, 2009). As folhas caulinares são pseudopeciouladas, persistentes, podendo acompanhar o colmo por boa parte de sua existência. As folhas dos ramos são pseudopeciouladas, às vezes apresentando

dimensões maiores em plantas ou ramos jovens e menores nas adultas (Londoño, 2001; Silva, 2005; Galvão et al., 2009; Schmidt; Longhi-Wagner, 2009).

As espécies de *Guadua* que dominam na floresta de terra firme no sudoeste da Amazônia são componente natural da floresta amazônica na região do Alto Amazonas, que cobre aproximadamente 11% desta floresta (Londoño, 2004). Localmente conhecidas como tabocais no Brasil e pacaes no Peru, essas florestas ocupam uma área estimada em 161.500 km<sup>2</sup> (Carvalho et al., 2013). No sudoeste da Amazônia as espécies de *Guadua* que dominam a floresta de terra firme são *Guadua weberbaueri* Pilg. e *Guadua sarcocarpa* Londoño e P.M. Peterson (Londoño; Peterson, 1991), além da ocorrência de outras espécies como *Guadua paniculata* Munro e *Guadua superba*. Destas duas últimas *G. paniculata* é a espécie de mais ampla distribuição, estendendo-se desde o México até o Brasil, onde ocorre desde o Pará até o Rio Grande do Sul. Enquanto *G. superba* ocorre no Acre, Amazonas e Pará e seus colmos podem atingir 30 metros de altura e 15 centímetros de diâmetro (Filgueiras; Viana, 2017).

De acordo com Filgueiras e Viana (2017) uma espécie (*Guadua* sp.) que ocupa grandes extensões no estado do Acre permanece não identificada apesar da grande importância na economia regional. Atualmente, pode-se apenas afirmar que se trata de espécie com grande afinidade morfológica com *G. angustifolia*. O assunto encontra-se sob investigação por Filgueiras e Shirasuna, ambos do Instituto de Botânica de São Paulo

O *Guadua magna* Filgueiras e Londoño, apesar de ocorrer apenas as margens de rios ao longo de matas ciliares do Brasil Central (Filgueiras; Londoño, 2011), assim como as espécies predominantes nos tabocais do Acre, possuem grande potencial para utilização em vários setores como a construção civil, produção energética, bem como na fabricação de papel e celulose (Ostapiv; Fagundes, 2008). No entanto, esta espécie consta na lista de espécies ameaçadas (Filgueiras; Viana, 2017).

Já a espécie *Guadua angustifolia* é uma espécie perene com colmos eretos (20,0-30,0 metros de altura e 10-13 cm de diâmetro) e com espinhos nos seus nós (Clayton et al., 2006). Também chamado de bambu gigante da região neotropical, trata-se de uma planta nativa de ampla ocorrência na Venezuela, Colômbia e Equador e tem sido amplamente introduzida em países Andinos e da América Central (Judziewicz et al., 1999). Seus usos estão associados à construção civil, produção de lenha, fabricação de artesanato e móveis, e proteção de solo e de fontes de água (Marulanda et al., 2005).

## 2.6 Importância econômica do bambu

O bambu é conhecido desde a antiguidade, principalmente na China, e tem sido utilizado para os mais diversos fins, devido suas características como resistência, flexibilidade,

durabilidade, versatilidade, facilidade de reprodução vegetativa, rápido crescimento e adaptabilidade a climas e solos diferentes (Beraldo; Pereira, 2007). Como matéria-prima lignocelulósica, o bambu possui interessantes usos agronômicos e tecnológicos, devido a perenidade das touceiras, rápido desenvolvimento vegetativo, ciclos de colheita curtos e elevados níveis de produção de biomassa (Beraldo et al., 2003; Brias; Hunde, 2009). Além disso, essa planta possui excelentes características físicas, químicas e mecânicas, sendo um eficiente sequestrador de carbono, podendo ser utilizada em reflorestamentos, na recomposição de matas ciliares, prevenção da erosão em encostas e também como um protetor e regenerador ambiental (Nath et al., 2009; Brias; Hunde, 2009; Potters et al., 2009), pois o aumento da permeabilidade do solo reduz o escoamento superficial, a perda de evaporação, permite uma maior penetração de água no solo e aumenta a capacidade de drenagem do solo (Nath et al., 2009). Adicionalmente, pode ser empregado em diversas aplicações ao natural ou após passar pelas etapas de cura, tratamento e pós-tratamento, podendo ser utilizado inclusive como material em projetos de engenharia (Ghavami; Marinho, 2005).

O colmo do bambu possui fibras longas e versáteis que permitem sua utilização na fabricação do papel (Duarte et al., 2007). Os teores de lignina, associados à alta resistência conferida pelos colmos, tornam os bambus extremamente úteis na construção civil (Ghavami; Marinho, 2005; Widyawijatnoko; Trautz, 2009). Além disso, pode ser largamente utilizado na produção de móveis e utensílios domésticos (Mishra, 2009), na produção de bioenergia (Satoshi et al., 2004; Arruda; Quirino, 2008), na confecção de instrumentos musicais (Singh; Devi, 2009), no paisagismo (Tombolato et al., 2012), na alimentação (Singhal et al., 2013) e até mesmo na medicina (Zhang et al., 2010; Singhal et al., 2013).

Estudos asiáticos e europeus demonstram que o bambu pode ser utilizado em substituição à madeira em um quarto de suas aplicações, poupando alguns hectares de florestas por ano (Soriano, 2008; Widyawijatnoko; Trautz, 2009). Devido a todas essas características, o uso do bambu gera emprego e renda para milhares de pessoas em países asiáticos, principalmente na China, onde o bambu é um importante componente florestal, que combina seu plantio, manejo e aplicações de ecologia com economia e benefícios sociais (Qisheng et al., 2002; Devi; Singh, 2009; Mishra, 2009).

Em países como Colômbia, Equador, Costa Rica e Cuba várias espécies de bambu têm sido amplamente utilizadas como material de construção para habitações populares (Jiménez et al., 2006). No Brasil, apesar desta matéria-prima ainda ser pouco utilizada, já existem algumas indústrias na região nordeste utilizando suas fibras para produção de papel e para produção energética (Duarte; Moraes, 2007; Greco et al., 2015), como material de engenharia para a

construção civil (Hidalgo-López, 2003; Ghavami; Marinho, 2005), além de vasta utilização em artesanatos e paisagismo (Tombolato et al., 2012).

## *2.7 Propagação de bambus*

### *2.7.1 Germinação*

O primeiro processo fisiológico do estabelecimento de uma nova planta é a germinação de sementes, onde há o predomínio de atividades catabólicas e de mobilização de reservas, que culminará com o desenvolvimento do eixo embrionário. Do ponto de vista fisiológico, a germinação inicia-se com a embebição ou reidratação dos tecidos da semente, com subsequente reativação do metabolismo energético (respiração), estimulando a divisão, o alongamento celular e o desenvolvimento do embrião, que culmina com o aparecimento da raiz primária ou outra estrutura embrionária na superfície do diásporo, sendo essa característica o primeiro indício de germinação (Bewley, 2001; Sert et al., 2009). Em condições laboratoriais, considera-se uma semente germinada quando há protusão de 1 a 2 mm da raiz primária. Sob o conceito da fitotecnia, o diásporo é considerado germinado quando a planta emerge do solo (Sert et al., 2009).

Quanto ao aspecto morfofisiológico, a germinação de gramíneas é do tipo hipogeia, onde o cotilédone permanece abaixo do solo, o epicótilo se alonga, com emergência da parte aérea, o epicótilo se dobra e, à medida que a plúmula cresce é levada para superfície do solo. As reservas presentes nos cotilédones são utilizadas pela plântula em desenvolvimento até serem esgotadas, e o restante do diásporo se decompõe com o tempo (Sert et al., 2009; Fontaneli et al., 2012).

A composição dos tecidos de reserva é governada geneticamente e as sementes, durante a sua formação, podem acumular carboidratos, proteínas e lipídios. Dentre os carboidratos, destacam-se o amido, a hemicelulose, açúcares como sacarose, frutose, galactose, estaquiase e rafinose. Os lipídios são um tipo de reserva presentes em sementes de Poaceae. As proteínas podem ser solúveis ou insolúveis em água. As albuminas são proteínas solúveis, enquanto as globulinas e prolaminas, que são armazenadas nos grãos de aleurona presentes nos cereais, são insolúveis em água (Bewley, 2001; Sert et al., 2009).

Durante a germinação, as reservas são degradadas para, posteriormente, serem mobilizadas para diferentes partes do embrião, auxiliando o crescimento da plântula até que ela se torne autotrófica. O processo metabólico por meio do qual as reservas são degradadas depende de sua composição química (Buckeridge et al., 2004).

As características químicas, físicas e mecânicas do bambu são definidas pela sua constituição estrutural e as propriedades do colmo são determinadas, principalmente, pela estrutura anatômica (Londoño et al., 2002; Luis et al., 2017). Dessa forma, o estudo anatômico pode se constituir como uma importante ferramenta para auxiliar na definição do potencial de uso e melhor forma de utilização das diferentes espécies, além de ser uma área determinante para estudos de taxonomia em bambus (Luis et al., 2017). Assim, a caracterização anatômica da germinação pode auxiliar na melhor compreensão dos processos envolvidos nesta etapa. No entanto, de acordo com Luis et al. (2017) ainda são escassos e fragmentados os trabalhos descrevendo a anatomia dos órgãos vegetativos de bambu e a bibliografia existente tende a concentrar-se nos colmos, em virtude da maior importância econômica desse órgão.

Apesar da importância da germinação para produção de plantas, pouco se sabe sobre as principais características germinativas, anatômicas e mobilização de reservas durante esta etapa. Sabe-se que as sementes de bambus lenhosos que possuem florescimento gregário são produzidas em longos intervalos, logo após o florescimento, culminando com a morte da touceira (Azzini et al., 1982; Thapliyal et al., 2015). Estas sementes não possuem nenhum tipo de dormência, mas perdem a viabilidade rapidamente, quando mantidas em condições ambientais normais (Richa et al., 2006).

Embora as sementes de bambu sejam excelentes material para propagação e conservação de germoplasma, a disponibilidade limitada de sementes, limitações na viabilidade e o pouco conhecimento sobre métodos adequados para o armazenamento são problemas práticos que interferem diretamente na propagação em escala de bambus, a partir do uso de sementes (Bahru et al., 2015).

A percentagem de germinação pode ser alta (80-100%) se a semeadura das sementes ocorrer sob a sombra, logo após a colheita (Thapliyal et al., 2015; Singh et al., 2017). O período de germinação varia de quatro a vinte dias em sementes ortodoxas, enquanto que para sementes recalcitrantes de *Melocanna* e *Ochlandra* pode ser menor (Singh et al., 2017). Estudos de viabilidade de sementes podem ser realizados usando métodos bioquímicos, como o teste do tetrazólio, enquanto a germinação pode ser testada em uma variedade de condições, como por exemplo, entre ou sobre folhas de papel absorvente, em areia ou em meio água-ágar (Ashmore et al., 2015), bem como, diferentes substratos e meio de cultivo.

### *2.7.2 Micropropagação*

A micropropagação constitui uma ferramenta alternativa e importante para a propagação do bambu, oferecendo vantagens sobre as técnicas de propagação vegetativa convencionais (Jiménez et al., 2006; García-Ramírez et al., 2010), pois pode possibilitar a produção em larga

escala de mudas a partir de tecidos e órgãos de plantas doadoras, com a vantagem de manter a identidade genética do material propagado (Nogueira et al., 2017). Utilizando para tanto uma pequena quantidade de material propagativo (Menezes et al., 2012), em meios de cultura específicos, condições assépticas, luminosidade e temperatura controladas (Grattapaglia; Machado, 1998; Singh et al., 2013).

A propagação *in vitro* do bambu pode ser feita por organogênese, embriogênese somática ou por multiplicação de segmentos nodais (Thiruvengadam et al., 2011; Singh et al., 2013). De fato, protocolos de propagação vegetativa *in vitro* têm sido estabelecidos para diferentes espécies de bambu: *Bambusa balcooa* (Das; Pal, 2005), *Guadua angustifolia* (Jiménez et al., 2006), *Dracaena sanderiana* (Gradaille et al., 2010), *Bambusa nutans* (Ndiaye et al., 2006; Mehta et al., 2010), *Bambusa vulgaris* (Negi; Saxena, 2011) e *Bambusa balcooa* (Mudoi; Borthakur, 2009; Sharma; Sarma, 2011). Em todos estes estudos, os protocolos foram eficientes na propagação *in vitro* das espécies de bambu.

As técnicas de propagação vegetativa *in vitro* possuem um grande potencial para atender à demanda de material vegetal de bambu, com as mesmas características da planta matriz. No entanto, pode apresentar alguns problemas, como contaminação por fungos e bactérias, necrose dos explantes durante a multiplicação, ocorrência de variações somaclonais, baixa percentagem de enraizamento e sobrevivência durante a fase de aclimatização (Ramanayake et al., 2006; Negi; Saxena, 2011; Singh et al., 2013).

De acordo com Nogueira et al., (2017) a micropropagação é constituída essencialmente de cinco etapas distintas, porém dependentes e que podem ser assim organizadas: i) seleção de plantas matrizes; ii) estabelecimento *in vitro* de cultivos; iii) multiplicação/proliferação de brotos; iv) enraizamento e; v) aclimatização.

#### *i) seleção de plantas matrizes*

Consiste na seleção de plantas de onde serão retirados os propágulos para cultivo, dependendo do propágulo a ser utilizado, o ideal é dispor sempre de matrizes em bancos ativos de germoplasma (BAG), coleções de trabalho, mantidos preferencialmente em casa de vegetação nas quais é possível que se realizem práticas fitossanitárias nas plantas antes do processo de estabelecimento *in vitro* dos propágulos. Plantas em campo, apesar de também poderem servir como fontes de propágulos, estão expostas a condições ambientais naturais, o que pode ocasionar níveis altos de contaminação no momento do estabelecimento *in vitro* (Nogueira et al., 2017).



## *ii) estabelecimento*

A princípio qualquer tipo de propágulo vegetativo, desde que vivo, pode ser empregado para iniciar a propagação *in vitro* do bambu. Para a micropropagação de bambus, vários tipos de propágulos têm sido empregados para o início do cultivo, sendo os mais utilizados aqueles provenientes da germinação de sementes, ápices caulinares e microestacas com gemas axilares, neste último caso necessariamente obtidos de brotações jovens coletadas da planta-matriz adulta (Nogueira et al., 2017)

Em bambu é bastante comum a ocorrência de contaminação fúngica e bacteriana durante a etapa estabelecimento *in vitro* (Anand et al., 2013). Por isso, inúmeros procedimentos e produtos são utilizados para a desinfestação dos propágulos (explantes). Entre os mais utilizados estão o etanol, normalmente utilizado à 70%, e o hipoclorito de sódio em concentrações variadas (Garcia-Ramirez et al., 2007; Dutra et al., 2009). O cloreto de mercúrio também é utilizado, embora seja bastante fitotóxico e utilizado em concentrações inferiores às daquelas do hipoclorito (Grattapaglia; Machado, 1998; Brar et al., 2013; Goyal et al., 2015). Outros agentes desinfestantes, como o PPM® (Preservative Plant Mixture), fungicidas e bactericidas (Arya et al., 1999; Niedz; Bausher, 2002; Jimenez et al., 2006; Mishra et al., 2008), também podem ser utilizados nos protocolos de desinfestação.

Após a desinfestação, os explantes são inoculados em meio de cultura específicos e mantidos em ambiente com temperatura e luminosidade controladas. Nessa fase, a composição do meio pode variar de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie (Dutra et al., 2009). Dentre as diferentes formulações de meio de cultivo, o meio de MS (Murashige; Skoog, 1962) tem sido o mais frequentemente utilizado para o estabelecimento de diferentes espécies de bambu *in vitro* (Ndiaye et al., 2006; Singh et al., 2012).

## *iii) multiplicação*

Para que ocorra a proliferação dos explantes, utilizam-se meios de multiplicação. Nessa fase, o objetivo é obter o maior número de plantas em menor tempo possível (Xavier et al., 2007). Para isso, faz-se necessário uma metodologia eficiente, que produza partes aéreas homogêneas e de boa qualidade (Grattapaglia; Machado, 1998).

Assim, brotações oriundas da fase de estabelecimento são inoculadas em meio de cultura contendo combinações de citocininas, como 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e tiadizuron (TDZ) e meta-Topolina (mT), eventualmente auxinas, como o ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido indol-3-acético (AIA), em combinação com as citocininas, dependendo da espécie e do tipo de explante utilizado (Caldas et al., 1998; Dutra et al., 2009; Nogueira et al., 2017). Para evitar a necrose dos tecidos é importante que o meio

seja renovado frequentemente, sendo o tempo e a quantidade de subcultivos influenciado pela espécie (Negi; Saxena, 2011)

Os meios podem ter a consistência líquida ou semissólida. Os meios de cultura líquidos têm proporcionado alta eficiência para a micropropagação de diversas espécies vegetais, inclusive diferentes de espécies de bambu (Ramanayake et al., 2008; Devi et al., 2012; Nogueira et al., 2017). Meios líquidos são rapidamente preparados, menos onerosos e proporcionam maior homogeneidade, uma vez que a difusão dos componentes do meio é facilitada, quando comparados aos de consistência semissólida (Siqueira et al., 2013). No meio semissólido, há diferenças nas quantidades de nutrientes que se estabelecem à medida que os tecidos crescem. A natureza física do meio semissólido possibilita apenas a adsorção dos nutrientes pelas partes da planta que estão em contato direto com o meio, o que pode refletir em baixa produção de biomassa (Caldas et al., 1998).

Segundo Nogueira et al. (2017) durante a etapa de multiplicação inúmeros subcultivos podem ocorrer até se atingir o número desejado de plantas, com idêntica composição genética da planta-matriz (clone). Ainda de acordo com estes autores, subcultivos são necessários devido ao esgotamento dos constituintes do meio de cultura (carboidrato, sais minerais e vitaminas), além do acúmulo de compostos como o etileno e os polifenóis, que podem ser deletérios à cultura.

Entre os sistemas de micropropagação que vêm sendo desenvolvidos para melhoria do processo de produção de mudas *in vitro*, estão os sistemas de biorreatores. Os biorreatores são equipamentos utilizados para a micropropagação clonal sob imersão temporária ou permanente de células, tecidos e/ou órgãos, tendo como objetivo final a produção de mudas em larga escala (Teixeira, 2002; 2006; Dutra et al., 2009). Este sistema utiliza meios líquidos, que podem proporcionar incremento em produtividade e eficiência no processo de propagação (Penchel et al., 2007; Dutra et al., 2009), sendo de rápido preparo e de baixo custo, permitindo maior homogeneidade de nutrientes (Caldas et al., 1998) e, conseqüentemente, melhoria no aproveitamento do meio nutritivo pelas plantas (Lemos et al., 2001; Arencibia et al., 2008; Garcia-Ramirez et al., 2014).

#### *iv) enraizamento*

A etapa de enraizamento é recomendável para a obtenção de um sistema radicular bem formado e funcional, que irá favorecer a sobrevivência e o crescimento *ex vitro* das plantas, evitando possíveis perdas por morte durante a aclimatização (Nogueira et al., 2017). No entanto, esta etapa tem sido um dos gargalos durante a realização da propagação *in vitro* de bambus (Brar et al., 2013). Por isso, as auxinas podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação

no meio de enraizamento, sendo que o ácido indol-3-acético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e o ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) são as auxinas mais empregadas (Grattapaglia; Machado, 1998). Tipos e concentrações de auxinas são as variáveis que mais influenciam no enraizamento, (Grattapaglia; Machado, 1998). Outro fator que pode influenciar na indução das raízes é a luminosidade, pois a presença de luz pode ocasionar a redução dos teores endógenos de AIA, assim como o acúmulo de fenóis e seus subprodutos que inibem o enraizamento (Assis; Teixeira, 1998).

Várias pesquisas têm sido realizadas, buscando incrementar as percentagens de enraizamento *in vitro* em diferentes espécies de bambu. Nesse sentido, em trabalhos com *Bambusa vulgaris* “vitatta” (Ramanayake et al., 2006); *Bambusa nutans* (Yasodha et al., 2008); *Bambusa atra*, *Dendrocalamus giganteus* e *D. hookeri* (Ramanayake et al., 2008) foi avaliado a influência de diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) no enraizamento destas espécies, tendo sido observado até 100% de enraizamento.

#### v) aclimatização

A aclimatização é a última etapa da micropropagação e pode ser considerada bastante crítica, pois as plantas micropropagadas podem não sobreviver. Nesta etapa, as plantas produzidas *in vitro*, em um ambiente completamente controlado, são transferidas para o ambiente *ex vitro*, onde estão sujeitas a maior contato com o ambiente, podendo ocasionar danos as plantas. Dessa forma, a mudança de um ambiente para outro deve ocorrer paulatinamente e proporcionar condições para que as plantas sobrevivam, a partir da redução do estresse causado pela diferença entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* (Schuck et al., 2012).

Antes da fase de aclimatização propriamente dita, uma fase de pré-aclimatização pode ser importante (Berilli et al., 2011; Patel et al., 2015). Nesta fase procura-se superar dificuldades de adaptação das plantas no meio de cultivo para a fase de aclimatização, geralmente em solo, pois as folhas das plantas *in vitro* são geralmente finas, tenras e fotossinteticamente pouco ativas e, por isso, mal adaptadas às condições *ex vitro* (Berilli et al., 2011). A pré-aclimatização visa à antecipação de alterações morfológicas e fisiológicas que minimizem o impacto decorrente da transição para casas de vegetação, tais como aumento da densidade de fluxo luminoso, baixa umidade relativa do ambiente, variações da temperatura, dentre outros (Berilli et al., 2011; Patel et al., 2015).

O sucesso da etapa de aclimatização também está relacionado ao uso de substratos, de forma que, suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem facilitar ou limitar a sobrevivência, a formação de novas raízes e o crescimento das plantas (Nogueira et al, 2017). Os substratos devem possuir boa coesão entre as partículas e boa aderência junto às raízes (Lima

et al., 2007), além de boa aeração, associado à elevada capacidade de retenção de água (Schuck et al., 2012). De forma geral, os substratos utilizados na aclimatização de mudas micropropagadas devem prover às plantas um bom desenvolvimento durante o processo, de forma a proporcionar a formação de mudas de qualidade, em menor tempo e a menores custos (Berilli et al., 2011).

## 2.8 Conservação de germoplasma

Atualmente, os recursos genéticos são conservados em bancos e coleções de germoplasma que são unidades conservadoras de germoplasma de uso imediato ou com potencial para uso futuro (Santos; Bettencourt, 2002). Os recursos genéticos vegetais podem ser conservados *in situ*, que é a conservação da espécie em seu habitat, permitindo que a planta continue o seu processo evolutivo, e *ex situ*, que consiste na retirada dos recursos genéticos do seu habitat e sua transferência para condições de armazenamento artificiais (Nick et al., 2010), como bancos de sementes, coleções de campo, além de coleções *in vitro* (Kapai et al., 2010). De acordo com Veiga et al. (2006), a conservação *ex situ* desdobra-se em várias modalidades, entre as quais destacam-se a conservação *in vitro*, as coleções de campo, em câmaras frias e em nitrogênio líquido (-196°).

A conservação *ex situ* é uma opção viável para espécies de interesse econômico ou que possuem dificuldades de propagação (Engels; Engelmann, 1998), como ocorre com as espécies de bambu, que possuem longos ciclos de floração, reduzindo assim, a disponibilidade de sementes para conservação a curto, médio e longo prazo.

A conservação de germoplasma *ex situ* de plantas, por meio do uso de sementes, tem sido considerada uma das formas mais eficientes de conservação (Engels; Engelmann, 1998; Jain, 2011). Contudo, cada espécie possui características próprias quanto a tolerância a temperaturas reduzidas e baixa umidade, o que impede que o armazenamento de sementes seja aplicado a todas as espécies de plantas com a mesma eficácia, pois são fatores determinantes para a conservação (Rajanaidu; Ainul, 2013).

Quando se pretende a conservação de determinada espécie por sementes, é essencial que se conheça o comportamento de armazenamento para que possam ser determinadas as estratégias e condições de armazenamento mais adequadas (Ashmore et al., 2015; Hong; Ellis, 1996).

As sementes podem ser classificadas em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias, com relação as respostas fisiológicas relacionadas a tolerância a dessecação e ao resfriamento (Ellis et al., 1990). Sementes ortodoxas podem ser dessecadas a teores baixos de umidade (5% ou menos), sem que ocorram danos celulares, além delas tolerarem o armazenamento em baixas

temperaturas por longos períodos, com pouca ou nenhuma perda de viabilidade (Bonner, 1990; Engelmann, 2004).

As sementes recalcitrantes possuem alto teor de umidade e são sensíveis à perda de água, não sobrevivendo quando submetidas às mesmas condições utilizadas para armazenar as sementes ortodoxas (Walters et al., 2013). Já as sementes intermediárias podem ser armazenadas nas mesmas condições que as ortodoxas, embora por períodos menores (Bonner, 1990). Sementes intermediárias são moderadamente sensíveis à dessecação, ou seja, toleram a perda de água suficiente para evitar a formação de cristais de gelo, porém, não toleram o resfriamento por longos períodos, tornando suscetíveis a lesões causadas pela temperatura (Ellis et al. 1991).

O uso da criopreservação tem sido utilizado como uma estratégia interessante para conservação a longo prazo de espécies de interesse medicinal, agroflorestral, horticultural e biotecnológico (Keller et al., 2013). Consiste na manutenção do material vegetal de interesse sob ultra-baixa temperatura, geralmente em nitrogênio líquido (-196 °C) (Rajanaidu; Ainul, 2013). Essas temperaturas proporcionam uma redução drástica do metabolismo celular, mantendo intacto o material biológico conservado e assegurando-lhe alta estabilidade genética e fisiológica, na presença ou ausência de substâncias crioprotetoras (Engelmann, 2004).

Panis et al. (2005) afirmaram que a chave para o sucesso da criopreservação não está com a tolerância ao congelamento, mas com a tolerância à desidratação e sua indução. Uma vez que o maior desafio para os protocolos de criopreservação é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. De acordo com Santos e Salomão (2010) o congelamento ultrarrápido promove a desidratação das células antes do congelamento, evitando a formação de grandes cristais de gelo dentro das células

A criopreservação de material vegetal tem avançado significativamente nas últimas décadas, principalmente para as culturas tropicais. No entanto, embora existam vários procedimentos criogênicos para diferentes espécies, o emprego rotineiro da criopreservação na biodiversidade vegetal é ainda considerado limitado (Panis; Lambardi, 2006), sobretudo para o bambu.

## *2.9 Fidelidade genética e variações somaclonais*

As técnicas de micropropagação teoricamente produzem plantas com a mesma identidade genética do material vegetal de origem, ou seja, com a mesma fidelidade genética da planta mãe. Entretanto, podem ocorrer variações somaclonais que se baseiam no surgimento de mudanças fenotípicas de origem genética, devido a variações em nível de DNA que se tornam herdáveis nas gerações seguintes, ou epigenética, que são variações transitórias devido

ao estresse fisiológico que o material sofre quando submetido ao cultivo *in vitro* (Baránek et al., 2010; Jaligot et al., 2011).

As variações somaclonais podem ocorrer em decorrência de uma série de fatores, tais como a fonte e o estado fisiológico do explante, o genótipo da planta mãe, o grau de organização meristemática, a presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo, as propriedades físicas e químicas do meio de cultura, o tempo de permanência *in vitro*, a temperatura e a luminosidade do cultivo, entre outros (Bairu et al., 2011).

Dentre os mecanismos causadores de variação somaclonal destacam-se as variações cromossômicas, as ativações de transposons, as metilações do DNA, as poliploidias e as mutações nucleares e citoplasmáticas. No entanto, nem sempre as variações somaclonais irão acarretar variações fenotípicas. Às vezes essas variações são bem mais pontuais, como por exemplo, em nível de base do DNA, podendo ocasionar dessa forma, alteração na síntese de aminoácidos e, conseqüentemente, prejuízos na produção de compostos orgânicos essenciais (Wang; Wang, 2012).

No cultivo *in vitro* o aparecimento dessas variações ocorre com certa frequência (Yang et al., 2010). A forma mais eficiente e precisa de identificar e monitorar essas variações genéticas tem sido pelo uso de técnicas moleculares, que possibilitam detectar polimorfismos em nível de DNA.

### *2.9.1 Marcadores moleculares*

Marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, ou ainda, como uma sequência direta da estrutura do DNA, possibilitando a detecção de polimorfismos diretamente das sequências e, conseqüentemente, a diferenciação de dois ou mais genótipos (Agarwal et al., 2008). Diversos marcadores têm sido amplamente aplicados em estudos sobre variação genética, classificação sistemática e relações filogenéticas entre bambus, como marcadores do tipo RFLP, RAPD, AFLP, SCARs, ISSR, SSRs, EST-SSRs (Das et al., 2008). Entre estes, Yeasmin et al. (2014) descreve dois como sendo potenciais para estudo da diversidade genética, o RAPD e o ISSR, que podem ser utilizados também para a verificação da fidelidade clonal.

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma tecnologia de baixo custo, simples e rápida (Belaj et al., 2001; Deshwall et al., 2005). Exige pequena quantidade de DNA genômico e pode verificar elevado nível de polimorfismo (Williams et al., 1990), além de não necessitar de informações prévias da sequência do DNA (Ferreira; Grattapaglia, 1998). A técnica tem sido empregada na análise da diversidade e identificação de germoplasma de diversas plantas (Kapteyn; Simon, 2002). Contudo, RAPD apresenta algumas limitações,

incluindo dominância, lócus homólogos incertos e, especialmente, a sensibilidade às condições de reação (Qian et al., 2001; Bakkappa et al., 2011). De acordo com estes últimos autores, para resolver alguns destes problemas, marcadores de repetição como o ISSR, podem ser utilizados.

Os marcadores ISSRs são microssatélites que se encontram dentro de regiões de repetição (Joshi et al., 2000; Bakkappa et al., 2011) e possuem grande potencial para determinar a diversidade intra e inter-genômica em comparação com outros primers arbitrários, uma vez que revelam variação dentro das regiões exclusivas do genoma em vários loci simultaneamente (Yeasmin et al., 2014). Eles exibem especificidade com a sequência de marcadores, sem a exigência de qualquer conhecimento prévio da sequência do genoma para a síntese do primer (Joshi et al., 2000; Bakkappa et al., 2011). Esta técnica tornou-se popular entre muitos pesquisadores que trabalham com bambu para estudo de fidelidade genética (Lin et al., 2010; Mukherjee et al., 2010).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o bambu utilizando os marcadores RAPD e ISSR. Na Índia, 26 espécies de bambu foram identificadas usando RAPD (Eevera et al., 2008). Tian et al. (2011) utilizaram 7 primers ISSR para avaliar a diversidade genética entre 7 populações de *Dendrocalamus giganteus*, na China. Já Shalini et al. (2013) usaram 24 marcadores RAPD e 4 marcadores ISSR para verificar a relação genética entre 10 espécies de bambu. Negi e Saxena (2010) usaram primers ISSR para verificar a fidelidade clonal de plantas de *Bambusa balcoa* micropropagadas. Já Anand et al. (2013) usaram marcadores RAPD e ISSR para verificar a fidelidade clonal de *Bambusa bambos* quando comparadas com a planta mãe.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, D. G. Bambu nativo (*Guadua* spp.): Alternativa de desenvolvimento econômico e sustentável para o Estado do Acre. 2011. 49 p. (**Pós-graduação em Gestão da Indústria Madeireira**). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2011.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Vol.27, p.617-631, 2008.
- ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In vitro* propagation of an edible bamboo *Bambusa bamboos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, Vol.2, n.4. 2013.
- ARENCIBIA, A.D.; BERNAL, A.; YANG, L.; CORTEGAZA, L.; CARMONA, E.R.; PÉREZ, A.; HU, C.J.; LI, Y.R.; ZAYAS, C.M.; SANTANA, I. New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). **Plant Science**, Vol.147, p.487-496. 2008. DOI:10.1016/j.plantsci.2008.05.024.
- ARRUDA, L.M.; QUIRINO, W.F. Caracterização energética de bambu (*Guadua magna*). **Anais**: 3º Congresso Internacional de Bioenergia e BIOTech fair, 2008. Curitiba, Paraná, 2008.
- ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; ARYA, D. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, Vol.18, p.879-882. 1999.
- ASHMORE, S.E.; MARTYN, A.; SOMMERVILLE, K.; ERRINGTON, G. **Seed biology**. In: Crop Wild Relatives and Climate Change. John Wiley e Sons, 2015.
- ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998. p.261-296.
- AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; NAGAI, V. Propagação vegetativa do bambu-gigante. **Bragantia**. Vol.37, nota 1, p.1-3. 1978.
- AZZINI, A.; ARANHA, C.; MARY, R. Florescimento e frutificação em bambu. **Bragantia**, Vol. 41, n. 18, p.175-180. 1982.
- BAHRU, T.; MULATU, Y.; KIDANE, B. Germination ecology of *Arundinaria alpina* (K. Schum) and *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich.) Munro seeds: Indigeneous bamboo species in Ethiopia. **International Journal of Biodiversity**, Vol. 2015, 8p. 2015.



- BAKKAPPA, S.; TALEBI, E.; SUBRAMANYA, G. Role of molecular markers (RAPD & ISSR) in silkworm conservation. **International Journal of Advanced Biological Research**, Vol. 1, n. 1, p. 1-7. 2011.
- BAMBOO PHYLOGENY GROUP - BPG. An update tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society*, Vol.24, n.1, p.1-10, 2012.
- BANERJEE, M.; GANTAIT, S. A two step method accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. **Physiology Molecular Biology of Plants**, Vol.17, n.4, p.387-393. 2011.
- BARÁNEK, M.; KRIZAN, B.; ONDRUSIKOVA, E.; PIDRA, M. DNA - methylation changes in grapevine somaclones following *in vitro* culture and thermotherapy. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Vol.101, p.11-22, 2010.
- BELAJ, A.; TRUJILO, I.; ROSA, R.; RALLO, L.; GIMENEZ, M. J. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. **Journal of the American Society for Horticulture Science**, Vol.126, p.64–71. 2001.
- BERALDO, A.L.; PEREIRA, M. A. R. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, São Paulo. 2007. 23p.
- BERALDO, A.L.; AZZINI, A.; GHAVAMI, K.; PEREIRA, M.A.R. Bambu: Características e Aplicações. In: FREIRE, W. J.; BERALDO, A. L. (Coord.). **Tecnologias e Materiais Alternativos de Construções**. Campinas: Editora Unicamp, 2003. 333p.
- BERILLI, S.S.; CARVALHO, A.J.C.; FREITAS, S.J.; FARIA, D.C.; MARINHO, C.S. Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Vol. 33, n. 1, p. 208-214. 2011.
- BEWLEY, J. D. Seed Germination and Reserve Mobilization. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–7, 2001.
- BONNER, F. Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. **Forest Ecology and Management**, Vol. 35, p. 35-43. 1990.
- BRAR, J.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* seed germination of economically important edible bamboo *Dendrocalamus membranaceus* Munro. **Indian Journal of Experimental Biology**, Vol.51, p.88-96, 2013.
- BRIAS, V.; HUNDE, T. **Bamboo Cultivation Manual**. Guidelines for cultivating Ethiopian highland bamboo. United Nations Industrial Development Organization. 2009. 58p.

- BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 31-50, 2004.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH. v.1. 1998. p. 183-260.
- CARVALHO, A.L.de; NELSON, B.W.; BIANCHINI, M.C.; PLAGNOL, D.; KUPLICH, T.M.; DALY, D.C. Bamboo-dominated forests of the southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves. **Plos One**, Vol. 8, n. 1. 2013.
- CHASE, M.W.; REVEAL, J.L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanic Journal of the Linnean Society**, Vol.161, p.122-127. 2009.
- CIARAMELLO, D.; AZZINI, A. Bambu como matéria prima para papel. V – Estudos sobre o emprego de quatro espécies de *Dendrocalamus*, na produção de celulose sulfato. **Bragantia**, Vol. 30, n. 24. 1971.
- CLAYTON, W.D.; VORONTSOVA, M.S; HARMAN, K.T.; WILLIAMSON, H. **Grass Base - The Online World Grass Flora**. 2006. Disponível em: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. Acessado em: 08 de Junho de 2016.
- DAS, M.; PAL, A. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Vol.81, p.109-112. 2005.
- DAS, M.; BHATTACHARYA, S.; SINGH, P.; FILGUEIRAS, T. S.; PAL, A. Bamboo taxonomy and diversity in the era of molecular markers. **Advances in Botanical Research**, Vol.47, p.226-260, 2008.
- DESHWALL, R. P. S.; SINGH, R.; MALIK, K.; RANDHAWA, G. J. Assessment of genetic diversity and genetic relationships among 29 populations of *Azadirachta indica* A. Juss. using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Vol.52, p.285–292. 2005.
- DEVI, W.S.; BENGYELLA, L.; SHARMA, G.J. *In vitro* seed germination and micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro using seeds. **Biotechnology**, 2012. DOI: 10.3923/biotech.2012.
- DEVI, S.; SINGH, B. A study on the environmental role and economic potential of *Arundinaria callosa*, Munro. **Annals: VIII World Bamboo Congress**, 2009. Vol. 03, Bamboo and Environment. Tailândia, 2009. p. 2-9.

- DAHLGREN, R.M.T.; CLIFORD, H.T.; YEO, P.F. **The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy**. Springer-Verlag. Berlin. 520p. 1985.
- DRANSFIELD, S. Bamboo Taxonomy in the Indo-Malesian Region. **Bamboo Research in Asia**. Singapore, p 121-130. 1980.
- DUARTE, J.; MORAES, R.; L. Bamboo - a fiber to be discovered by the industry. **O Papel**, p.46-48, 2007.
- DUTRA, L.F.; WENDING, I.; BRONDANI, G.E. A Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.58, p.49-59, 2009.
- EEVERA, T.; RAJANDRAN, K.; SARADHA, S.; LASHMI, A. Analysis of genetic variation in selected bamboo species using RAPD. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, Vol.2 n.1, p.54-56. 2008.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**, Vol. 41, n. 230, p. 1167-1174. 1990.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H.; SOETISNA, U. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. **Seed Science Research**, Vol. 1, p. 99-104. 1991.
- ENGELMANN F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Vol. 40, n. 5, p. 427-433. 2004.
- ENGELS, J. M. M.; ENGELMANN, F. Botanic gardens and agricultural genebanks: building on complementary strengths for more effective global conservation of plant genetic resources. **Annals**. Fifth international botanic gardens conservation congress, Kirst- Enbosch, South Africa, p.14-18. 1998.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.
- FILGUEIRAS, T. S. Bambus nativos do Distrito Federal, Brasil (Gramineae: Bambusoideae). **Revista Brasileira Botânica**, Vol. 11, p. 47-66. 1988.
- FILGUEIRAS, T. S., GONÇALVES, A. P. S. A Checklist of the Basal Grasses and Bamboos in Brazil (POACEAE). **The Journal of the American Bamboo Society**, Vol.18, n.1, p.7-18. 2004.
- FILGUEIRAS, T.S.; LONDOÑO, X. A giant new *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) from Central Brazil. **Anais: I Seminário Nacional do Bambu**, 2006. 2 ed. Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, 2011. p.27-32.

FILGUEIRAS, T.S.; LONGHI-WAGNER, H.M.; VIANA, P.L.; ZANIN, A.; GUGLIERI, A.; OLIVEIRA, R.C.; CANTO-DOROW, T.S.; SHIRASUNA, R.T.; VALLS, J.F.M.; OLIVEIRAS, R.P.; RODRIGUES, R.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P.; WELKER, C.A.D. 2015. Poaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000193>>. Acesso em 16 Nov. 2017.

FILGUEIRAS, T.S.; VIANA, P.L. Bambus brasileiros: morfologia, taxonomia, distribuição e conservação. In: DRUMOND, P.M.; WIEDEMAN, G. (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH, 2017. p.10-27.

FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P.; FONTANELLI, R.S. Morfologia de gramíneas forrageiras. In: Forrageiras para integração lavoura-pecuária na região sul-brasileira. In: FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P.; FONTANELI, R.S (Orgs). **Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região sul-brasileira**. 2ed. - Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. p. 51-58

GALVÃO, F.; AUGUSTIN, C. R.; CURCIO, G. R.; DOMANOWSKI, B. P.; KOREZA, C.; SAWZU, A. T.; BONNET, A. Autoecologia de *Guadua* aff. *paraguayana* (Poaceae). **Pesquisa Floresta Brasileira**, Vol.58, p.5-16. 2009.

GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; FREIRE-SEIJO, M.; FAJARDO, L.; TEJEDA, M.; REYES, M. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var *Vittata*. **Biotechnología vegetal**, Vol. 7, n. 3, p. 153-158, 2007.

GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; FREIRE-SEIJO, M.; PÉREZ, B. R.; HURTADO, O. Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. em diferentes épocas del año. **Biotechnologia Vegetal**, Vol.10, n.3, p.151-156, 2010.

GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; GONZÁLES, M.G.; MENDONZA, E.Q.; FREIRE-SEIJO, M.; CÁRDENAS, M.L.O.; MORENO-BERMÚDEZ, L.J.; RIBALTA, O.H. Effect of BA treatments on morphology and physiology of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in Temporary Immersion. **American Journal of Plant Sciences**, Vol.5, p.205-211, 2014.

GHAVAMI, K.; MARINHO, A. B. Propriedades físicas e mecânicas do colmo inteiro do bambu da espécie *Guadua angustifolia*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Vol..9, n.1, p.107-114, 2005.

- GIELIS, J.; OPRINS, J. 2002. **Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality**. Disponível <www.oprins.be> Acesso: Julho/2014.
- GONÇALVES, A. P. S.; OKANO, R. M. C.; VIEIRA, M. F.; FILGUEIRAS, T. S. Bambus (Bambusoideae: Poaceae) do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais: Florística e Morfologia. **Anais: I Seminário Nacional do Bambu**, 2006. 2. ed. Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, 2011. p.43-48.
- GOYAL A. K.; PRADHAN, S.; BASISTHA, B. C.; SEN, A. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. **3 Biotech**, 2015. DOI 10.1007/s13205-014-0244-7.
- GPWG (Grass Phylogeny Working Group). Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. Vol.88, p.373-457. 2001.
- GRADAILLE, M. D.; RODRÍGUEZ, D. P.; MAS, Y. L.; TORRIJO, F. S. Propagación *in vitro* de Bambú Chino (*Dracaena sanderiana* L.). **Ciencia y Tecnología**, Vol.3, n.1, p.7-13. 2010.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: [s. n.], v. 1, p. 509. 1998.
- GRECO, T.M.; PINTO, M.M.; TOMBOLATO, A.F.C. Diversity of bamboo in Brazil. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**, Vol.23, n.1, p.1-16, 2015.
- GRISCOM, B. W.; ASHTON, P. M. S. Bamboo control of forest succession: *Guadua sarcocarpa* in Southeastern Peru. **Forest Ecology and Management**, Vol.175, p.445-454. 2003.
- GRISCOM, B, W.; ASHTON, P. M. S. A self perpetuating bamboo disturbance cycle in a Neotropical forest. **Journal of Tropical Ecology**, Vol..22 p.587-597. 2006.
- GROMBONE-GUARATINI, M. T.; NASCIMENTO, A. A.; SANTOS-GONÇALVES, A. P. Flowering and fruiting of *Aulonemia aristulata*: a gynomonocious woody bamboo species from Atlantic Forest in Brazil. **Revista Brasileira Botânica**, Vol.34, n.1, p.135-140. 2011.
- GUERREIRO, C. I.; LIZARAZU, M. A. Flowering of *Bambusa tuldooides* (Poaceae, Bambusoideae, Bambuseae) in Southern South America. **Darwiniana**, Vol.8, n.1, p.25-31. 2010.
- HIDALGO-LÓPEZ, O. **Bamboo: the gift of the gods**. Bogota: Oscar Hidalgo-López (Ed.). 2003. 553 p.

- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. A protocol to determinate seed storage behaviour. **International Plant Genetic Resource Institute Technology Bulletin**, Vol. 1, p. 1-55. 1996
- JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, Vol. 118, p. 153-166. 2011.
- JALIGOT, E.; ADLER, S.; DEBLADIS, E.; BEULE, T.; RICHAUD, F.; ILBERT, P.; FINNEGAN, E. J.; RIVAL, A. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the *in vitro*-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, Vol.108, p.1453-1462, 2011.
- JIMÉNEZ, V. M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Vol.86, p.389-395. 2006.
- JOSHI, S. P.; GUPTA, V. S.; AGARWAL, R. K.; RANJEKAR, P. K.; BRAR, D. S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetic**, Vol.100, p.1311–1320. 2000.
- JUDZIEWICZ, E. J.; CLARK, L. G.; LONDOÑO, X.; STERN, M. **American bamboos**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution. 1999. 392p.
- KAPAI, V.Y.; KAPOOR, P.; RAO, I.U. *In vitro* propagation for conservation of rare and threatened plants of India – A review. **International Journal of Biological Technology**, Vol.1, n.2, p.1-14, 2010.
- KAPTEYN, J.; SIMON, J.E. The use of RAPDs for assessment of identity, diversity, and quality of Echinacea. In: JANICK, J.; WHIPEKEY, A. (eds). **Trends in new crops and new uses**. ASHS Press, Alexandria, 2002. p 509-513.
- KELLER, E. R. J.; SENULA, A.; HÖFER, M.; HEINE-DOBBERNACK, E.; SCHUMACHER, H. M.; Cryopreservation of plant cells. In: **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Biopreparation, and Cell Technology**. John Wiley e Sons, 2013.
- LEMONS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Vol.23, p.482-487, 2001.
- LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; FIGUEIREDO, P.M.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Substratos para aclimatização de plantas micropropagadas de *Mentha viridis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Vol. 5, supl. 2, p. 672-674. 2007.

- LIN, X. C.; LOU, Y. F.; LIU, J.; PENG, J. S.; LIAO, G. L.; FANG, W. Cross breeding of *Phyllostachys* species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers. **Genetic and Molecular Resource**, Vol. 9, p.1398–1404. 2010.
- LONDOÑO, X. *Guadua Kunth*. In: WANDERLEY, M. G.L; SHEPHERD G.J.; GIULIETTI, A.M. Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. São Paulo, SP: Instituto de Botânica. FAPESP: HUTECH, 2001.
- LONDOÑO, X. **Distribucion, morfologia, taxonomia, anatomia, silvicultura y usos de los bambues del nuevo mundo**. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2002. Disponível<<http://www.hof-landlust.de/scb/taller.html>> Acesso: março, 2015.
- LONDOÑO, X. La Subtribu Guaduinae de América. **Anais: Simpósio Internacional Guadua**. Pereira, Colômbia, 2004.
- LONDOÑO, X.; PETERSON, P.M. “*Guadua sarcocarpa* (Poaceae: Bambuseae), a new species of Amazonian bamboo with fleshy fruits”. **Systematic Botany**, Vol. 16, p. 630-638. 1991.
- LUIS, Z.G.; NOGUEIRA, J.S.; RIBEIRO, D.G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Caracterização anatômica de órgãos vegetativos de bambu (Poaceae, Bambusoideae). In: DRUMOND, P.M.; WIEDEMAN, G (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH, 2017. p.10-27.
- MARULANDA, M.L.; GUTIÉRREZ, L.G.; MÁRQUEZ, M.P. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. **Actualites Biologues**, Vol. 27, n. 82, p. 5-15, 2005.
- MEDINA, J.C.; CIARAMELLO, D.; CASTRO, G.A.P. Propagação vegetativa do bambu imperial (*Bambusa vulgaris* Schrad. var. vittata A. et C. Riv.). **Bragantia**, Vol.21, n.37, 1962.
- MEHTA, R.; SHARMA, V.; SOOD, A.; SHARMA, M.; SHARMA, R. K. Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of *in vitro* - derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall. using AFLP markers. **European Journal of Forest Research**, Vol.130, p.729–736. 2011.
- MENEZES, T.P.; GOMES, W.A.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* HAW. **Bioscience Journal**, Vol.28, n.6, p.868-876, 2012.
- MISHRA, Y.; PATEL, P. K.; YADAV, S.; SHIRIN, F.; ANSARI, S. A. A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. **Scientia Horticulturae**, Vol.115, p.315-318. 2008.

- MISHRA, D. Experience with livelihood development projects – a case study of Chhattisgarh, India. **Annals: VIII World Bamboo Congress**, 2009. Vol. 07, p. 71-80. Bamboo for Community and Economic Development. Tailândia, 2009.
- MONTIEL, M.; SANCHEZ, E. Ultraestructura de Bambúes del Género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) Cultivados em Costa Rica III: *Dendrocalamus giganteus*. **Revista de Biología Tropical**, Vol. 54, suppl. 2, p. 59-63. 2006a.
- MONTIEL, M.; SANCHEZ, E. Ultraestructura de Bambúes del Género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) Cultivados em Costa Rica IV: *Dendrocalamus asper*, Clones Taiwán y Tailandia. **Revista de Biología Tropical**, Vol. 54, suppl. 2, p. 65-75. 2006b.
- MUDOI, K. D.; BORTHAKUR, M. *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field grown culms and scope for upscaling. **Current Science**, Vol.96, n.7, p.962-966. 2009.
- MUKHERJEE, A. K.; RATHA, S.; DHAR, S.; DEBATA, A. K.; ACHARYA, P. K.; MANDAL, S.; PANDA, P. C.; MAHAPATRA, A.K. Genetic relationships among 22 Taxa of Bamboo revealed by ISSR and EST-Based random primers. **Biochemical Genetics**, v.48, p.1015-1025. 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Vol.15, p.473-497. 1962.
- NATH, A. J.; DAS, G.; DAS, A. K. Phenology and Culm Growth of *Bambusa cacharensis* R. Majumdar in Barak Valley, Assam, North-East India. **The Journal of the American Bamboo Society**, Vol.18, n.1, p.7-18. 2004.
- NMBA. **Processing bamboo shoots**. Training manual. New Delhi, India. 2004. 27p.
- NDIAYE, A.; NIANG, D.; DIOP, D.; SAGNA, M.; GASSAMA, Y.K.; SOOD, A. Effects of some factors on the *in vitro* seeds germination of *Oxytenanthera abyssinca* (A. Rich.) Munro. **Indian Journal Applied Research**, Vol. 5, n. 7, p.3-7. 2015.
- NDIAYE, A.; DIALLO, M. S.; NIANG, D.; GASSAMA-DIA, Y. K. *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. **African Journal of Biotechnology**, Vol.5, n.13, p.1245-1248. 2006.
- NEGI, D.; SAXENA, S. Micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through axillary shoot proliferation. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Vol.47, p.604-610. 2011.



NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. **Conservação *ex situ* dos recursos fitogenéticos**. In: PEREIRA, T. N. S. Germoplasma: Conservação, manejo e uso no Melhoramento de Plantas. Viçosa, MG, Arca, 2010. p. 59-88.

NIEDZ, R.P.; BAUSHER, M.G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse - and field-grow trees. ***In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant***, Vol.38, p.468-471, 2002.

NOGUEIRA, J.S.; COSTA, F.H.S.; VALE, P.A.A.; LUIS, Z.G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P.M.; WIEDEMAN, G. (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH, 2017. p.103-129.

OSTAPIV, F.; FAGUNDES, E. D. Perspectivas para o desenvolvimento da cultura e da cadeia produtiva do bambu no Paraná: tendo como referência a inovação, a educação tecnológica e o modelo produtivo chinês. **Athena – Revista Científica de Educação**, Vol.10, n.10. 2008.

PANIS B, LAMBARDI M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE J, SONNINO A. (eds.) **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. FAO, Corporate Document Repository, p. 61-78. 2006.

PATEL, B.; GAMI, B.; PATEL, N.; BARIA, V. One step pre-hardening micropropagation of *Bambusa balcoa* Roxb. **Journal of Phytology**, Vol. 7, p. 1-9. 2015. DOI:10.5455/jp.205-06-02.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. **Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro***. In: Borém, A. (Ed.). Biotecnologia Florestal. Viçosa: UFV, 2007, cap. 4, p. 75-92.

PEREIRA, M. A. R. Manejo e produção de bambu gigante (*Dendrocalamus giganteus*) cultivado na Unesp de Bauru/SP e determinação de características mecânicas de ripas laminadas. **Anais: I Seminário Nacional do Bambu**, 2006. 2. ed. Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, 2011. p.93-105

POTTERS, G.; BREMS, A.; VALCKE, R.; DEWILL, R.; D’HAESE, L.; SAMSON, R.; GIELIS, J. Energy crops in western Europe: is bamboo an acceptable alternative? **Annals: VIII World Bamboo Congress**, 2009. Vol 03, Bamboo and Environment. Tailândia, 2009. p.22-34.

- QIAN, W.; GE, S.; HONG, D.Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Vol.102, p.440-449. 2001.
- QISHENG, Z.; SHENXUE, J.; YONGYU, T. Industrial utilization on bamboo. INBAR: **Technical Report**, n.26, 2002.
- RAJANAIDU, N.; AINUL, M.M. Advanced biotechnology and breeding centre, malaysian palm oil board. In: Normah, M.N.; Chin, H.F.; Reed, B.M. (Eds.) **Conservation of Tropical Plant Species**, Springer, New York. 2013.
- RAMANAYAKE, S. M. S. D.; MEEMADUMA, V. N.; WEERAWARDENE, T. E. *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). **Scientia Horticulturae**, Vol.110, p.109-113. 2006.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; MADDEGODA, K.M.M.N.; VITHARANA, M.C.; CHATURANI, G.D.C. Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. **Scientia Horticulturae**, Vol.118, p.270-273, 2008.
- RICHA; SHARMA, M.L.; BALA, N. Endogeneous levels of plant growth subctances seeds of five bamboo species in relation to seed viability. **Indian Journal Plant Physiology**, Vol. 11, n. 4, p. 358-363, 2006.
- SALGADO, A. L. B.; GODOY JÚNIOR, G. O bambu no Brasil, em nossa vida, nossa cultura, seu cultivo e utilização. **Anais: Seminário Internacional do uso do Bambu na Construção Civil**. 2002. Maceió, Alagoas. 2002.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Vol. 4, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.
- SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. Lisboa: Instituto Nacional de Investigação Agrária. 2002. 207p.
- SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N. Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Criopreservação. **Documentos**, 319. Brasília, 2010. 16p.
- SATOSHI, F.; SHIMA, K.; CHIBA, K. Heavy metal absorption ability of bamboo charcoal and effect as a mulching material. **Journal of the Japanese Society of Revegetation Technology**, Vol.30, n.1, p. 39-44, 2004.

- SERT, M.A.; BONATO, C.M.; SOUZA, L.A. Germinação da semente. In: **Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação**. Ponta Grossa, PR: TODAPALAVRA. Cap. 2, p. 88-118. 2009.
- SCHMIDT, R.; LONGHI-WAGNER, H. M. A tribo Bambuseae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Vol.7, p.71-128. 2009.
- SEETHALAKSHMI, K.K.; KUMAR, M.M. Bamboos of India: **A compendium**. Bamboo Information Centre, KFRI, Peechi, India and INBAR, New Delhi, India. ISBN 81-86247-25-4, 1998. pp. 342.
- SHALINI, A.; MEENA, R. K.; TARAFDAR, S.; THAKUR, S. Evaluation of genetic diversity in bamboo through DNA marker and study of association with morphological traits. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, Vol.2, n.8, p.78-83. July, 2013.
- SHARMA, P.; SARMA, K. P. *In vitro* propagation of *Bambusa balcooa* for a better environment. **Annals: International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences (ICABPS)**. Bangkok. 2011.
- SHIRASUNA, R. T. Bambus nativos (Poaceae: Bambusoideae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. **Dissertação** (Mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 2012.
- SHIRASUNA, R. T.; FILGUEIRAS, T. S. Bambus nativos (Poaceae-Bambusoideae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, Vol.40, n.2, p.315-359. 2013.
- SHIRIN, F.; RANA, P. K. *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. **Plant Biotechnology Reports**, Vol.1, p.141-147. 2007.
- SILVA, R. M. C. 2005. **O bambu no Brasil e no mundo**. Disponível <[http://www.embambu.com.br/imagens/bambu\\_brasil\\_mundo.pdf](http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo.pdf)> Acesso: Jan/2014.
- SILVA, I.F.; PEREIRA, D.S.; SILVA, S.R.F. Estudos morfológicos do bambu (*Bambusa* cf. *vulgaris* L.) uma espécie invasora em área de Mata Atlântica no Parque Municipal de Macéio – Alagoas. **Revista Semente**, Vol. 6, n. 6, p. 99-109, 2011.
- SINGH, B.; DEVI, S. Bamboo – A renewable natural resource and valuable raw material of Cottage industries. **Annals: VIII World Bamboo Congress, 2009**. Vol. 07, Bamboo for Community and Economic Development. Tailândia, 2009. p.3-12.
- SINGH, S.R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* {Schult. & Schult. F.} Backer ex k. Heyne): an exotic edible bamboo.

**Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Vol.21, n.2, p.220-228, 2012. DOI 10.1007/s13562-011-0095-9. 2012.

SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. **Acta Physiologiae Plantarum**, Vol.35, p.419-430. 2013.

SINGH, G.; RICHA; SHARMA, M.L. A review article – bamboo seed viability. **International Journal of Current Advanced Research**, Vol. 6, n. 1, p. 1690-1691, 2017.

SINGHAL, P.; BAL, L. M.; SATYA, S.; SUDHAKAR, P.; NAIK, S. N. Bamboo shoots: a novel source of nutrition and medicine. **Critical Reviews in Food and Nutrition**, Vol. 53, n. 5, 2013.

SIQUEIRA, D.L.; SANTOS, D.; SALOMÃO, L.C.C.; SILVA, F.F.; BARROS, Z.J. Micropropagação de bananeira 'Maça', cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. **Revista Ceres**, Vol.60, n.6, p.745-751, 2013.

SORIANO, F. P. **Sustainable bamboo utilization in Thailand**. ITTO Tropical Forest Update. Fev, 2008. p.15-17.

SORENG, R. J.; PETERSON, P. M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; ZULOAGA, F. O.; JUDZIEWICZ, E. J.; FILGUEIRAS, T. S.; DAVIS, J. I.; MORRONE, O. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**, Vol. 53, p.117-137, 2015.

STAPLETON, C. **Bamboo Identification**. 2014. Disponível<<http://bamboo-identification.co.uk/index.html>. Acesso: Março, 2015.

SCHUCK, M.R.; LIPSKI, B.; SILVA, A.L.L.; CARVALHO, D.C.; BIASI, L.A. Acclimatization of micropropagated plants of fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) in different substrates. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Vol. 3, n. 4, p. 206-212. 2012.

SUNGKAEW, S.; STAPLETON, C. M. A.; SALAMIN, N.; HODKINSON, T. R. Nonmonophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae. **Journal of Plant Research**, Vol.122, p.95-108. 2009.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Vol.4, n.24, p.36-41, 2002.

TEIXEIRA, J. B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 27 p.

THAPLIYAL, M.; JOSHI, G.; BEHERA, F. Bamboo: **Flowering, seed germination and storage**. In: KAUSHIK, S.; SINGH, Y. P.; KUMAR, D.; THAPLIYAL, M.; BARTH WAL, S. Bamboos in India. National Forest Library and information Centre Forest Research Institute. 2015. p. 89-108.

THE PLANT LIST. Version 1.1. Published on the Internet. 2013. Disponível: <<http://www.theplantlist.org/>> Acesso: Outubro de 2014.

THIRUVENGADAM, M.; REKHA, K.T.; CHUNG, I.M. Rapid *in vitro* micropropagation of *Bambusa oldhamii* Munro. **Philippine Agricultural Scientist**, Vol.94, n.1, p.7-13. 2011.

TIAN, B.; YANG, H. Q.; WONG, K. M.; LIU, A. Z.; RUAN, Z. Y. ISSR analysis shows low genetic diversity versus high genetic differentiation for giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae), in China populations. **Genetic Resource and Crop Evolution**, Vol.59, p.901-908. 2012.

TOMBOLATO, A. F. C.; GRECO, T. M.; PINTO, M. M. Dez espécies de bambus exóticos mais comuns no paisagismo no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Vol. 18, n.2, 2012. p.105-144.

VEIGA, R. F. de A. A criocervação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agrônômico (IAC). **O Agrônômico**, Vol.58, n.1/2, p.19-21. 2006.

WAGHMARE, V. N; BAGDE, U. S. Random amplified polymorphic DNA based genetic characterization of four important species of Bamboo found in Raigad district, Maharashtra State, India. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 12, n. 28, pp.4446-4452. 2013. DOI: 10.5897/AJB2013.12033.

WALTERS C, BERJAK P, PAMMENTER N, KENNEDY K, RAVEN P. Preservation of recalcitrant seeds. **Science**, Vol. 339, n. 6122, p. 915-16. 2013.

WANG, W.; FRANKLIN, S. B.; CIRTAIN, M. C. Seed germination and seedling growth in the arrow bamboo *Fargesia qinlingensis*. **Ecology Research**, Vol. 22, p. 467-474. 2007. DOI 10.1007/s11284-006-0027-7

WIDYAWIJATNOKO, A.; TRAUTZ, M. Conventional vs. substitutive bamboo construction: the classification of bamboo construction. **Annals: VIII World Bamboo Congress, 2009**. Vol.10, Architecture and Engineering. Tailândia, 2009. p. 17-46.

WILLIAMS, J. G.K.; KUBELIK, K. J.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Vol.18, p.6531-6535. 1990.

WONG, K. M. **The Amazing Grass: A Guide to The Diversity and Study of Bamboos in Southeast Asia**, International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) e University of Malaya. 2004.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e Enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**, Viçosa: Ed. UFV, 2007.

YANG, J. L.; SEONG, E.S.; KIM, M.J.; GHIMIRE, B.K.; KANG, W.H.; YU, C.Y.; LI, C.H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Vol.100, n.1, p. 49-58. 2010.

YASODHA, R.; KAMALA, S.; KUMAR, S.P.A.; KUMAR, P.D.; KALAIARASI, K. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. **Scientia Horticulturae**, Vol.116, p.113-116. 2008.

YEASMIN, L.; ALI, M. N.; GANTAIT, S.; CHAKRABORTY, S. Bamboo: an overview on its genetic diversity and characterization. **3 Biotech**, 2014. DOI 10.1007/s13205-014-0201-5.

ZHANG, J.; GONG, J.; DING, Y.; LU, B.; WU, X.; ZHANG, Y. Antibacterial activity of water-phase extracts from bamboo shavings against food spoilage microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, Vol.9, n.45, p.7710-7717. 2010.

## **CAPÍTULO I**

### **GERMINAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS EM SEMENTES DE BAMBU [*Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne]**

## RESUMO

*Dendrocalamus asper* é uma espécie de bambu lenhoso de origem asiática e introduzida no Brasil. Trata-se de uma espécie monocárpica, com longos ciclos de floração e com produção irregular de sementes. Assim, nos raros eventos de florescimento é essencial que se estude o maior número possível de fatores envolvidos na germinação das sementes. Adicionalmente, é importante também realizar estudos que busquem elucidar a composição e mobilização de reservas, além da caracterização anatômica e histoquímica, de forma a melhorar o conhecimento sobre o processo de germinação da espécie. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar sistemas de germinação, descrever anatômica, histoquímica e bioquimicamente a germinação e o desenvolvimento pós-seminal de sementes de bambu da espécie *D. asper*. Para tanto, foram realizados testes de germinação em papel germitest, substrato Bioplant e meio de cultivo de MS, em duas condições de cultivo: claro e escuro. Também foram realizados testes para desinfestação de sementes com hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}_2$ ) e cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), além da avaliação da germinação em tubos de ensaio com meio de MS semissólido e em biorreatores RITA com meio de cultura MS líquido, com ou sem a adição de sacarose. Após a germinação das sementes, verificou-se a quantidade de DNA nuclear presente nos fenótipos: verde, variegado e albino por citometria de fluxo. Entre os sistemas de cultivo e agentes desinfestantes avaliados, o sistema de cultivo *in vitro* aliado à desinfestação com  $\text{HgCl}_2$  foram os tratamentos mais promissores para germinação de *D. asper* não havendo diferenças entre as condições de luminosidade. Os fenótipos de coloração verde, variegado e albino resultantes da germinação não apresentam diferenças na quantidade de DNA nuclear. As sementes desta espécie possuem endosperma amiláceo, camada de aleurona e embrião maduro bem desenvolvido, sendo o amido o constituinte mais abundante, seguido por proteínas e lipídios.

**Palavras-chave:** Sementes, cortes histológicos, metabólitos primários, desinfestação



## ABSTRACT

*Dendrocalamus asper* is a woody bamboo species native to Asian Continent and introduced in Brazil. It is a monocarpic species with long flowering cycles and irregular seed production. Thus, in the rare flowering events it is essential to study the greatest possible number of factors involved in seed germination. In addition, it is also important to carry out studies that seek to elucidate the composition and mobilization of reserves, besides seeds anatomical and histochemical characterization, in order to improve the knowledge about the germination process. Thus, the objective of this study was to evaluate germination systems and to describe anatomically, histochemically and biochemically the germination and post-seminal development of *D. asper* seeds. For that, germination tests were carried out on germitest-type paper, bioplant substrate and MS medium, under light and dark culture conditions. It was also realized germination tests using NaOCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub> to disinfestation, besides evaluations of seed germination in test tubes or RITA bioreactors in semisolid or liquid consistencies, with or without sucrose, respectively. After germination, the nuclear DNA content on phenotypes green, variegated and albino were quantified by flow cytometry. Among the cultivation systems and disinfectant agents, the in vitro system ally to HgCl<sub>2</sub> were the best treatments for seed germination, not having been observed differences between light and dark culture conditions. Cytometric evaluations of green, variegated and albino genotypes obtained during germination process do not presented significant differences in nuclear DNA content. The seeds of this species have amylaceous endosperm, aleurone layer and a well-developed mature embryo, with starch being the most abundant constituent, followed by protein and lipids.

**Keywords:** Seeds, histological sections, primary metabolites, disinfestation

## 1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho se propôs estudar a espécie *Dendrocalamus asper* [(Schult. & Schult.f.) Backer ex K.Heyne], pois a mesma se destaca pelas excelentes qualidades da madeira, além da resistência. É uma espécie asiática, originada no Sudeste da Ásia, provavelmente da Malásia, introduzida e cultivada em vários países tropicais (Ciaramello; Azzini, 1971; Montiel; Sanchez, 2006), inclusive no Brasil (Filgueiras; Santos-Gonçalves, 2004). Assim como a maioria dos bambus lenhosos, *D. asper* é monocárpico e com produção de sementes irregular, podendo a floração ocorrer a cada 100 anos, seguida pela morte dos colmos (McClure, 1996; Arya et al., 1999).

Diante disso, compreende-se que a irregularidade na produção de sementes, dificulta estudos de viabilidade, germinabilidade e armazenamento (Bahru et al., 2015), bem como inviabiliza a utilização de sementes para a propagação em escala (Arya et al., 1999; Bahru et al., 2015). Assim, quando os raros eventos de florescimento ocorrem, torna-se essencial estudar a ecologia da germinação (Bahru et al., 2015).

Diversos estudos referentes a ecologia da germinação podem ser realizados, como tratamentos de pré-semeadura, luminosidade, germinação folhas de papel, em areia ou em meio água-ágar (Bahru et al., 2015), bem como, diferentes substratos e meio de cultivo, além de soluções desinfestantes que também podem ser testadas, buscando reduzir a contaminação durante a germinação. Estudos que busquem elucidar a composição e a mobilização de reservas, da mesma forma que a caracterização anatômica e histoquímica de sementes e da germinação propriamente dita também são importantes, possibilitando assim, um melhor conhecimento sobre a espécie.

A germinação de sementes é o primeiro processo fisiológico do estabelecimento de uma planta, onde há o predomínio de atividades catabólicas e de mobilização de reservas, que culminará com o desenvolvimento do eixo embrionário (Bewley et al., 2013; Sert et al., 2009; Nonogaki, 2006). A composição dos tecidos de reserva é governada geneticamente, e as sementes, durante a sua formação, podem acumular carboidratos, proteínas e lipídios. Durante a germinação, as reservas devem ser degradadas para, posteriormente, serem mobilizadas para diferentes partes do embrião, auxiliando o crescimento da plântula até que ela se torne autotrófica. O processo metabólico por meio do qual as reservas são degradadas depende de sua composição química (Bewlwy et al., 2013; Sert et al., 2009; Buckeridge et al., 2004a; Bewley, 2001).

Lipídios, carboidratos, amido e proteínas são mobilizados por enzimas hidrolíticas distintas, onde os genes de muitas podem ser transcritas e sintetizadas de novo (Bewley et al.,

2013; Buckeridge et al., 2004b). Em alguns casos, os lipídios e proteínas de reserva têm como produto final do catabolismo a sacarose e aminoácidos, respectivamente, que são translocados aos tecidos em crescimento, enquanto carboidratos e amido são convertidos em açúcares menores, como maltose e glicose (Buckeridge et al., 2004b).

Assim como a mobilização de reservas, a compreensão da anatomia e da histoquímica assume papel chave na compreensão dos mecanismos associados à germinação, permitindo a visualização das alterações celulares e de tecidos relacionadas a este processo, assim como à mobilização das reservas para o desenvolvimento da plântula após a germinação (Ataíde, 2013).

O objetivo desse estudo foi avaliar sistemas de germinação, caracterizar estruturas anatômicas envolvidas neste processo, bem como avaliar a mobilização de reservas e o desenvolvimento pós-seminal de *Dendrocalamus asper* e, assim, inferir sobre o comportamento fisiológico, anatômico, histoquímico e bioquímico das sementes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram executados no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF.

### 2.1 *Material vegetal*

As sementes usadas neste experimento foram gentilmente cedidas pelo Instituto Jatobás. O lote utilizado foi coletado a partir de touceiras adultas de plantas matrizes de *Dendrocalamus asper* que floresceram em outubro de 2015, em Pardinho – SP. Antes do início dos experimentos, a cariopse que recobre a semente foi removida manualmente, o que possibilitou, num primeiro momento, o descarte de sementes chochas e/ou mal formadas.

### 2.2 *Determinação de protocolos de germinação e desinfestação de sementes*

#### 2.2.1 *Avaliação de condições de luminosidade e tipos de substrato na germinação de sementes*

Para selecionar a condição mais eficiente para germinação de sementes de *D. asper*, utilizaram-se três sistemas distintos: a) papel germitest (controle); b) substrato comercial Bioplant®; c) meio de cultivo de MS (Murashige; Skoog, 1962). Além dos substratos, duas condições de luminosidade foram testadas: claro e escuro.

Inicialmente, realizou-se a assepsia das sementes a partir da rápida lavagem destas com detergente neutro e enxague em água corrente, até a completa remoção do detergente. Em capela de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70% por 3 minutos, seguido por imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl<sub>2</sub>) com 2,5% de cloro ativo por 20 minutos, seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada.

Uma vez desinfestadas, as sementes foram então colocadas para germinar nos diferentes sistemas testados: em bandejas do tipo gerbox (24,5 x 24,5 cm), cobertas com papel germitest umidificado; substrato comercial Bioplant® distribuído em bandejas de plástico de 98 células (3,5 x 3,5 cm) e umidificado; enquanto em capela de fluxo laminar, inoculou-se as sementes em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura de MS.

Para os tratamentos mantidos na presença de luz, o fotoperíodo foi de 16 horas, sob intensidade luminosa de de 52  $\mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Já para aqueles mantidos na ausência de luz, a condição de obscuridade foi mantida durante todo o período de realização do experimento.

Para cada tratamento considerou-se como uma repetição: uma caixa tipo gerbox com papel germitest, contendo 25 sementes; cada conjunto de 10 células (3,5 x 3,5 cm) por bandeja com substrato, com uma semente por célula; e cada conjunto de 25 tubos com uma semente

cada. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, com duas condições de luminosidade e três sistemas de germinação, totalizando seis tratamentos. Após 30 dias do cultivo, avaliou-se a percentagem de germinação em cada sistema de cultivo. Foram consideradas germinadas, as sementes que apresentaram emissão do epicótilo, para equiparar a germinação no substrato com os demais sistemas de germinação, onde era possível visualizar a emissão da radícula.

### 2.2.2 Avaliação da germinação *in vitro* em função de diferentes agentes de desinfestação

Na busca de um protocolo melhorado a ser utilizado para desinfestação de sementes de *D. asper*, comparou-se a eficiência do cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) com o hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}_2$ ) na etapa de desinfestação para germinação *in vitro* das sementes.

Assim como no experimento anterior, as sementes foram inicialmente lavadas com detergente neutro e enxaguadas em água corrente, até a remoção total do detergente. A etapa de desinfestação foi conduzida em capela de fluxo laminar com imersões das sementes em: a) álcool 70% por 1 minuto, seguido por 5 minutos de Cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) a 0,1%; e b) álcool 70% por 3 minutos, seguido por 20 minutos de Hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}_2$ ) com 2,5% de cloro ativo. Finalmente, as sementes desinfestadas foram lavadas 3 vezes com água destilada e autoclavada. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em duas condições de luminosidade: a) sob luz – em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiação de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ; e b) escuro – em câmara escura, com temperatura de  $25 \pm 2$  °C e ausência total de luz.

A inoculação das sementes foi realizada em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 utilizando dois agentes desinfestantes e duas condições de luminosidade, totalizando 4 tratamentos. Cada tratamento foi constituído por 10 repetições, com uma semente por parcela.

As avaliações referentes a percentagem de germinação, percentagem de contaminação, altura dos colmos que foi medido da base até a interseção da folha mais jovem, número de raízes, comprimento de raízes e número de folhas foram realizadas 30 dias após a inoculação das sementes.

### 2.2.3 Influência do sistema de cultivo *in vitro* e da sacarose na germinação de sementes

Buscando selecionar o melhor sistema de germinação *in vitro* para sementes de *D. asper*, comparou-se a eficiência da germinação em meios de consistência semissólida e líquida, além da presença e ausência de sacarose no meio de cultura. O meio semissólido foi distribuído em tubos de ensaio (25 x 150 mm), enquanto o meio líquido foi distribuído em recipiente de imersão temporária automatizado (RITA®). Os tubos de ensaio e os frascos do biorreator RITA® foram preenchidos com 10 e 250 mL de meio de MS modificado, respectivamente, o qual foi formulado com e sem a presença de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

O biorreator modelo RITA® foi formado por frascos de 1 L de capacidade, divididos em dois compartimentos: um contendo as sementes e o outro com os 250 mL de meio de cultura. Estes frascos foram conectados, através de mangueiras de silicone, a um compressor de ar diretamente ligado a um temporizador eletrônico (Siemens 7LF4 111). Nesse sistema, a cada 6 horas o ar fornecido pelo compressor e esterilizado por uma membrana de 0,22 µm, entrava nos frascos e fazia com que o meio de cultura líquido fosse impulsionado para a parte superior do frasco, onde se localizavam as sementes que ficavam submersas durante um período de 1 minuto, até que o compressor de ar fosse desligado e o meio retrocedesse por gravidade para a parte inferior do frasco.

Baseado no experimento anterior, a desinfestação das sementes teve início a partir da lavagem com detergente neutro e enxague em água corrente, até a completa remoção do detergente. Em capela de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70% por 1 minuto e, em seguida, em Cloreto de mercúrio a 0,1% por 5 minutos, quando então foram enxaguadas por três vezes em água destilada e autoclavada.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, sendo dois sistemas de germinação RITA e tubos de ensaio e duas formulações de meio de MS com ou sem a adição de sacarose, totalizando quatro tratamentos. Nos tratamentos, uma semente foi distribuída por tubo de ensaio e 30 sementes por frasco do biorreator RITA®. Cada conjunto de 10 tubos e cada frasco foram considerados como uma parcela por repetição, sendo o experimento formado por três repetições por tratamento.

As avaliações sobre as percentagens de contaminação e germinação, além do comprimento dos brotos e número de folhas foram realizadas 30 dias após a inoculação das sementes.

#### 2.2.4 Condições de cultivo

Nos experimentos em que não foram descritos a elaboração do meio de cultivo e as condições de cultivo, utilizou-se o meio composto pelos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis,

MO). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C a 1,5 atm por 20 minutos. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C, luminosidade de 52 μm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

### 2.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos nos os experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (menos de 10 tratamentos) ou Scott-Knott (mais de 10 tratamentos) a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011). Em todos os experimentos, dados referentes à percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno  $(x/100)^{1/2}$ .

### 2.3 Análise das plantas germinadas por citometria de fluxo

Durante a realização dos experimentos de germinação, observou-se a ocorrência de plantas com três fenótipos distintos. Estas diferenças foram observadas em relação a coloração das folhas: verde, variegada e albina. Então, a partir da utilização da citometria de fluxo, analisou-se a variação na quantidade de DNA nuclear presente nestes três fenótipos.

Foram utilizadas entre 20-30 mg de folhas obtidas de plantas jovens de bambu germinadas *in vitro* e do padrão externo *Pisum sativum* L. (9,09 pg de DNA). Os tecidos foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração resfriado para liberação dos núcleos (Dolezel et al., 1994). O tampão utilizado para estas análises foi o Marie (Marie e Brown, 1993), constituído de 50mM glicose, 15 mM NaCl, 15 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50 mM citrato de sódio, 0,5% Tween 20, 50 mM HEPES (pH 7,2) e 1% (m/v) polivinilpirrolidona-10 (PVP-10).

Após o processo de extração, a suspensão de núcleos foi aspirada com auxílio de pipeta de Pasteur e filtrada através de uma malha de 50 μm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 μL de uma solução de 1mg.mL<sup>-1</sup> de Iodeto de Propídeo. O conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula:

$$DNA \text{ amostra} = \left[ \frac{G1 \text{ amostra}}{G1 \text{ padrão}} \right] X DNA \text{ padrão}$$

As análises foram realizadas em citômetro de fluxo Accuri C6 e os histogramas analisados pelo software BD Accuri Cflow Plus, permitindo assim, calcular a estimativa de DNA nuclear (pg). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições por fenótipo, sendo que cada repetição, foi composta por uma planta e uma leitura.

#### 2.4 Caracterização anatômica e histoquímica

Para os tempos 0, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de germinação das sementes, cinco plantas foram fixadas em FAA 70% por 24 h sob vácuo e armazenadas em álcool 70% até a retirada de amostras de todos os tempos. Após uma série de desidratações alcoólicas (80, 90 e 100%), cada uma durando cerca de duas horas, as amostras foram embebidas e incluídas em historresina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha), com algumas modificações em relação ao tempo de cada etapa (álcool + resina: 1 semana; resina 1<sup>a</sup> vez: oito horas; resina 2<sup>a</sup> vez: 48 horas; Solução A: 6 horas; Solução B: uma semana em freezer), com vácuos frequentes durante cada etapa, com exceção da etapa em que as plantas foram colocadas na solução B. Seções longitudinais das amostras foram cortadas de forma seriada em micrótomo rotativo manual (Leica RM 2125RT) a 0,7 µm, posicionadas e distendidas em lâminas de vidro para posterior coloração. Para análise anatômica, as lâminas foram coradas com azul de toluidina a 5% (O'Brien et al., 1964).

As análises histoquímicas foram feitas com lugol para a observação de amido (Jensen, 1962), PAS (reagente de Schiff) para polissacarídeos neutros (O'Brien; McCully, 1981) e Xylidine Ponceau para proteínas (Vidal, 1970). As secções histológicas foram preservadas e as lâminas e lamínulas foram montadas com Entellan®. As lâminas foram analisadas com microscópio Leica (DM 750) com sistema de captura de imagem e utilizando-se o software Leica Application Suite (LAS EZ).

#### 2.5 Mobilização de reservas

Sementes e plantas de *Dendrocalamus asper* foram coletadas aos 0, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de germinação. Inicialmente, o material fresco foi pesado, congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, liofilizado por 72 horas. Após a liofilização, as amostras foram pesadas novamente para obter a massa seca. Nos tempos 14, 21 e 28 dias as plantas oriundas da germinação foram divididas em endosperma, raiz e parte aérea, sendo as amostras congeladas e liofilizadas separadamente. O experimento foi montado de modo inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento sendo cada repetição formada por 10 sementes.

Amostras contendo 10 mg de material vegetal foram lavadas em 4 ciclos de extração com etanol 80%. O pellet contendo amido foi solubilizado e extraído pelo método enzimático de Amaral et al. (2007). As enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase (Megazyme) foram utilizadas em 2 ciclos e a dosagem foi feita com adição de GODPOD, utilizando método colorimétrico em equipamento Spectra Max 190 (Molecular Devices) e analisadas com ajuda do programa Soft Max v. 6.1.



As proteínas foram quantificadas utilizando o método Bradford (1976). Para tanto, 10 mg de amostra foi diluída em tampão PBS (Phosphate Buffer Saline – pH 7,4) em eppendorf de 1,5 mL e mantidas em geladeira “overnight”. A dosagem de proteína foi realizada utilizando método colorimétrico em equipamento Spectra Max 190 (Molecular Devices) e analisadas com ajuda do programa Soft Max v. 6.1.

Os lipídios foram quantificados e classificados utilizando a técnica de derivatização *in situ* e analisados por GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry). Para a análise foram utilizadas 10 mg da massa seca adicionado a 0,2 mL de metanol/clorofórmio (1:2 v/v), 0,3 mL de HCl à 5%, aquecidos a 85 °C por 1 hora, seguido pela adição de 1 mL de hexano e mais 1 hora de leve agitação. Posteriormente a fase não-polar (superior) foi retirada e analisada (Laurens et al., 2012).

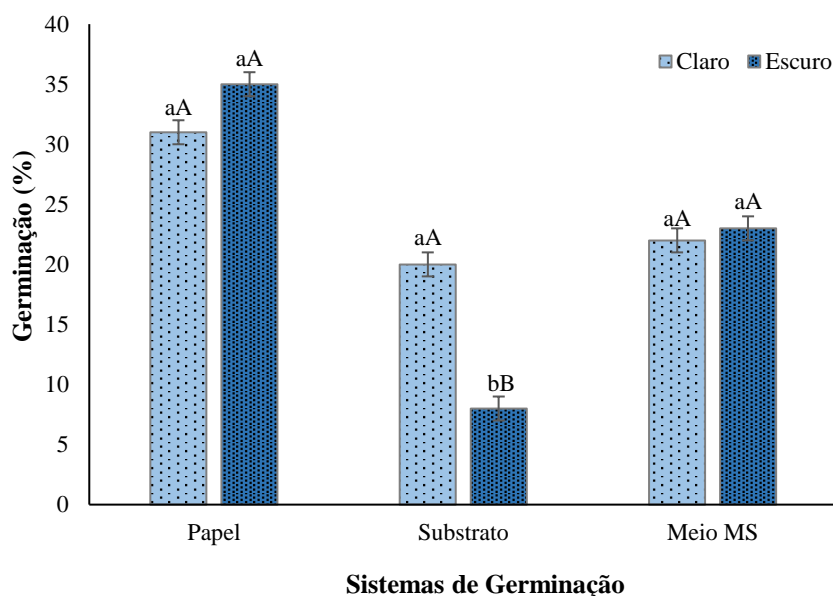
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação de condições de luminosidade e tipos de substrato na germinação de sementes

A germinação de sementes de *Dendrocalamus asper* em diferentes substratos de germinação e luminosidade apresentou as maiores percentagens em papel germitest (35%) e em meio de cultivo MS (23%), independentemente da germinação ser na presença de luz ou no escuro (Figura 1). Em substrato comercial, especialmente em condições de luz, os índices de germinação das sementes também não diferiram dos demais substratos, embora tenham apresentado taxas de germinação levemente menores em relação aos melhores tratamentos (20%).

Altas percentagens de germinação (80-100%) podem ser obtidas, se as sementes forem semeadas logo após a coleta e sob a sombra (Thapliyal, 1991; Singh et al., 2017). Abe e Shibata (2013), estudando a germinação de *Sasa veitchii* var. *hirsuta*, uma espécie monocárpica de regiões temperadas, em diferentes substratos, também avaliando condições de luz e escuro, não encontraram diferenças significativas entre as condições de luminosidade estudadas. Já Wang et al. (2007) relataram maiores percentagens de germinação para sementes de *Fargesia qinlingensis*, um bambu de regiões montanhosas da China, na ausência de luz. De acordo com Brar et al. (2013), apesar da luz ser uma variável importante, não é requisito para iniciar o processo germinativo em algumas espécies, incluindo *Dendrocalamus asper*, que apresenta sementes fotoblásticas neutras. Essa característica, corrobora o fato de luz e escuro terem apresentado percentagens de germinação semelhantes no papel germitest e no meio de cultivo *in vitro*,

Com exceção do substrato comercial no escuro, os demais sistemas se mostraram promissores para a germinação de sementes de *Dendrocalamus asper*. No entanto, a germinação utilizando meio de cultivo *in vitro*, quando comparado aos outros sistemas, também apresentou índices semelhantes aos melhores, com vantagens como a possibilidade de: utilização de ambiente controlado, disponibilidade de nutrientes, que permite maior disponibilidade de mudas em menor tempo, sem a necessidade de manuseio dos explantes após inoculação das sementes. Além disso, permite ampliar a disponibilidade de explantes livres de contaminação, que podem ser utilizados na etapa de multiplicação *in vitro*. O sistema de germinação *in vitro* tem sido utilizado para otimizar a etapa de germinação e aumentar a disponibilidade de mudas em um espaço de tempo menor, do que habitualmente ocorre nas áreas naturais (Arya et al., 1999; Brar et al., 2013; Ndiaye et al., 2015).

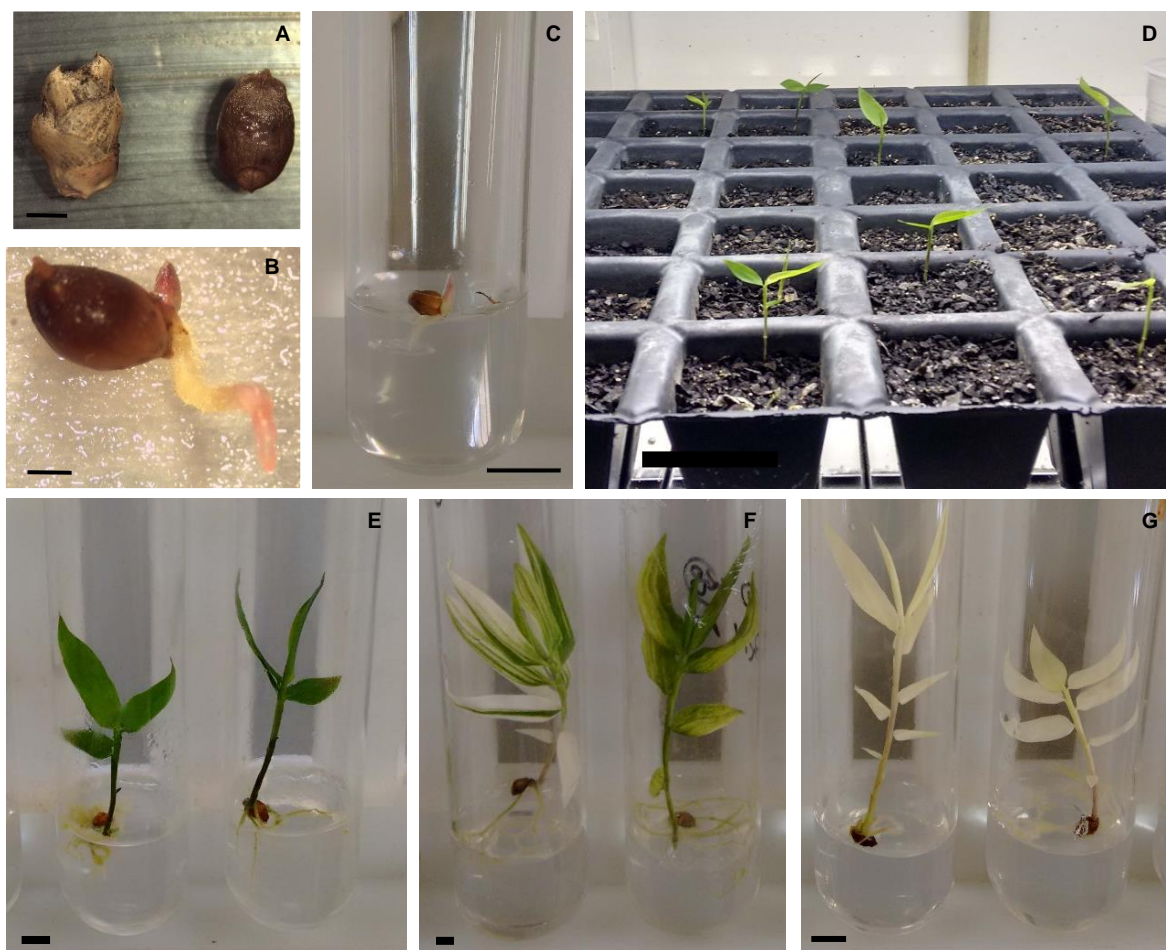


**Figura 1.** Germinação de sementes de *Dendrocalamus asper* em diferentes sistemas de germinação e duas condições de luminosidade. Sistemas de germinação: Papel germitest, substrato e meio de MS; condições de luminosidade: luz e escuro. Letras minúsculas comparam a luminosidade e letras maiúsculas comparam sistemas de germinação, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As sementes de *Dendrocalamus asper* são do tipo cariopse (Figura 2 A), podendo ser morfológicamente comparadas com um grão de arroz ou de trigo (Wong, 2004; Das et al., 2008). Apresentam germinação do tipo hipógea, onde os cotilédones permanecem no solo e o coleóptilo se alonga, com emergência da parte aérea (Sert et al., 2009).

Durante a germinação nos três sistemas de cultivo (Figura 2 B, C e D), verificou-se o início da germinação a partir do sétimo dia de cultivo, nas sementes cultivadas em papel germitest e cultivo *in vitro*. Todavia as sementes em substrato comercial apresentaram emissão do epicótilo somente após 15 dias de cultivo. De acordo com Singh et al., (2017) o período de germinação pode variar de quatro a vinte dias em sementes ortodoxas, enquanto para sementes recalcitrantes de *Melocana* e *Ochlandra* pode ser menor.

As sementes foram mantidas sob o mesmo sistema de cultivo durante 30 dias, com exceção das sementes germinadas em papel germitest que, após a germinação, foram transferidas para o substrato Bioplant. Após este período, observou-se o desenvolvimento de plantas normais, com raízes e parte aérea. No entanto, entre as plantas formadas nos três sistemas de cultivo, verificou-se a ocorrência de três fenótipos distintos: plantas verdes normais, plantas variegadas e plantas albinas (Figura 2 E, F e G). As plantas verdes normais ocorreram com a frequência de 69,9, 90,9 e 81% em papel germitest, substrato Bioplant e meio MS, respectivamente. O fenótipo variegado foi observado numa frequência que variou de 4,8 a 9,1% nos três sistemas de cultivo, enquanto o fenótipo albino foi observado nos sistemas de cultivo

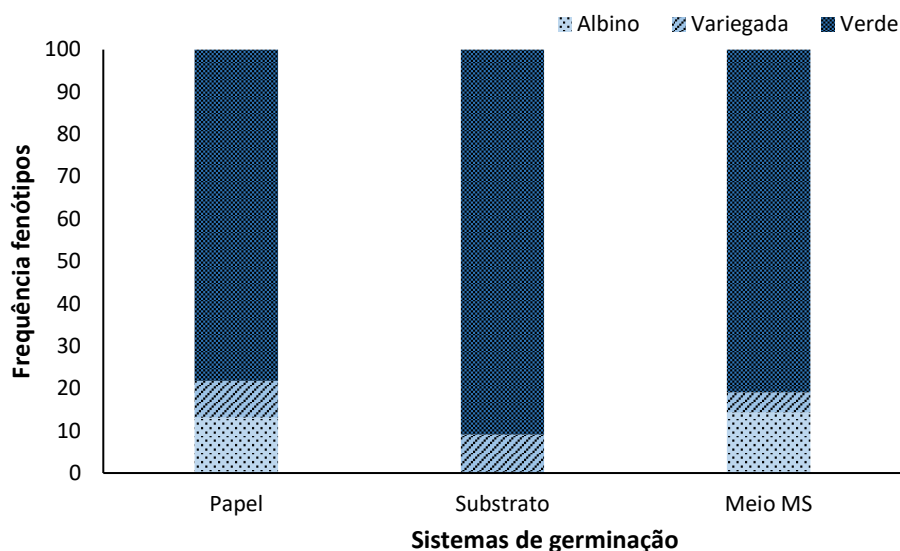


**Figura 2.** Aspecto de sementes e da germinação de *Dendrocalamus asper* em diferentes sistemas de germinação. A – Semente revestida pela cariopse e após sua remoção. B – Germinação em papel germitest aos 7 dias. C – Germinação em meio de cultivo *in vitro* aos 7 dias. D – Germinação em substrato comercial (Bioplant®), aos 30 dias. E – Plantas verdes germinadas em meio de cultivo *in vitro* aos 30 dias. F – Plantas variegadas germinadas em meio de cultivo *in vitro* aos 30 dias. G – Plantas albinas germinadas em meio de cultivo *in vitro* aos 30 dias. Barras: A e B: 2 mm; C, D e F: 1 cm.

em meio MS e papel germitest (14,3 e 13%), representativamente, como pode ser visto na Figura 3. Kumar e Banerjee (2014) relataram ocorrência de regenerantes albinos de *D. asper*, oriundos da multiplicação *in vitro* por longo prazo e desenvolveram um protocolo para multiplicação em massa destes regenerantes, visando plantações para fins de reflorestamento.

### 3.2 Avaliação da germinação *in vitro* em função de diferentes agentes de desinfestação

Para a germinação de sementes em meio de cultivo de MS em duas condições de luminosidade, após a desinfestação com hipoclorito de sódio e/ou cloreto de mercúrio, verificou-se que a desinfestação com cloreto de mercúrio e a germinação no escuro proporcionaram as maiores percentagens de germinação (60%) e a menor percentagem de

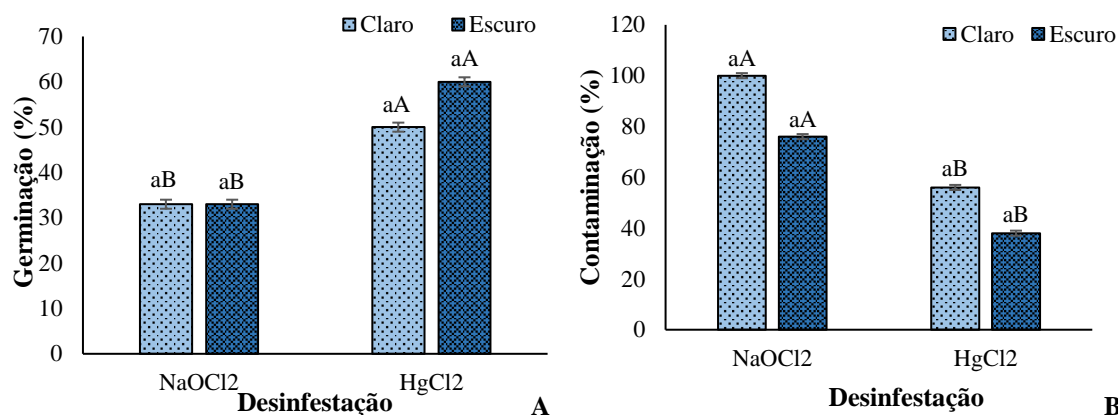


**Figura 3.** Frequência de fenótipos verdes, variegados e albinos durante a germinação de sementes de *Dendrocalamus asper* em diferentes sistemas de germinação: papel germitest, substrato Bioplant, meio de cultivo MS.

contaminação (38%), como apresentado na Figura 4A e 4B. Embora as percentagens de germinação e contaminação não tenham apresentado diferenças significativas entre as condições de luz e escuro, a utilização de cloreto de mercúrio se mostrou significativamente superior ao hipoclorito de sódio, proporcionando a redução dos índices de contaminação pela metade e, conseqüentemente, permitindo as maiores taxas de germinação das sementes (Figura 4A e 4B).

Durante o estabelecimento de bambus *in vitro*, não é incomum a ocorrência de fungos e bactérias, especialmente quando sementes são utilizadas como explantes (Brar et al., 2013). Ndiaye et al. (2015), utilizando 0,1% de cloreto de mercúrio por 20 minutos na desinfestação de sementes de *Oxytenanthera abyssinica* conseguiram reduzir a contaminação para apenas 4%.

Brar et al. (2013) conseguiram 75% de sementes de *Dendrocalamus membranaceus*, nativo do Sul da Ásia, descontaminadas, quando utilizaram 0,1% de Cloreto de mercúrio em combinação com Hipoclorito de sódio 15% por 10 minutos. De acordo com estes autores, sementes de bambu apresentam germinação melhorada na sombra do que na luz direta. No entanto, Bahru et al. (2015) descrevem em um mesmo trabalho a maior percentagem de germinação de *A. alpina* no escuro que na luz e, percentagens de germinação de *Oxytenanthera abssynica* sem diferenças em condições de luz ou escuro. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente estudo, uma vez que sementes de *D. asper* demonstraram o mesmo comportamento germinativo quando em presença de luz ou escuro.



**Figura 4.** Germinação (A) e contaminação (B) de sementes de *Dendrocalamus asper*, cultivadas *in vitro* após desinfestação com hipoclorito de sódio (NaOCl<sub>2</sub>) e cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) e mantidas em luz e escuro. Letras maiúsculas comparam desinfestantes (NaOCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>) e letras minúsculas comparam condição de luminosidade (claro e escuro) durante a germinação, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Ao longo dos 30 dias em que as sementes permaneceram no meio de cultura de germinação, observou-se o desenvolvimento de plântulas oriundas da germinação, tanto na luz quanto no escuro. Os colmos desenvolveram-se da mesma maneira, independente do agente desinfestante utilizado e da condição de luminosidade em que foram mantidos (Tabela 1). A maior quantidade de raízes por planta foi observada em condições de luz e quando se utilizou o hipoclorito de sódio como agente desinfestante, enquanto o comprimento das raízes foi maior quando se utilizou o cloreto de mercúrio na desinfestação, nas duas condições de luminosidade testadas. As folhas foram formadas em quantidade superior, quando as plantas foram mantidas na luz, independente do agente desinfestante utilizado.

**Tabela 1.** Desenvolvimentos de plantas de *Dendrocalamus asper* germinadas *in vitro* após desinfestação e mantidas em condições de luz e escuro, após 30 dias em meio de cultivo

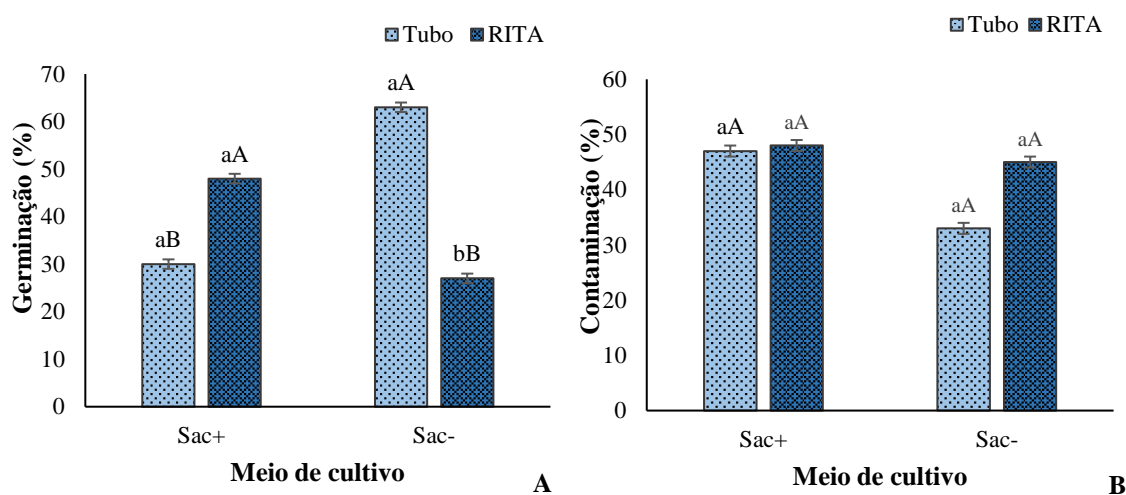
Agentes Desinfestantes	Condições de luminosidade	
	Luz	Escuro
Altura do Colmo (cm)		
NaOCl <sub>2</sub>	1,6±0,2 aA	1,6±0,3 aA
HgCl <sub>2</sub>	1,4±0,2 aA	2,2±0,4 aA
Número de Raízes		
NaOCl <sub>2</sub>	2,7±0,3 aA	1,1±0,2 aB
HgCl <sub>2</sub>	1,7±0,2 bA	1,6±0,14 aA
Comprimento de Raízes (cm)		
NaOCl <sub>2</sub>	0,7±0,1 bA	0,4±0,1 bA
HgCl <sub>2</sub>	1,9±0,2 aA	2,2±0,3 aA
Número de Folhas		
NaOCl <sub>2</sub>	1,4±0,3 aA	0,3±0,1 aB
HgCl <sub>2</sub>	1,4±0,2 aA	0,7±0,2 aB

Os valores representam a média das repetições ± o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 3.3 Influência do sistema de cultivo *in vitro* e da sacarose na germinação de sementes

Os dois sistemas de cultivo testados na germinação – tubos de ensaio e biorreator RITA – se mostraram promissores, como ferramenta para auxiliar na germinação de sementes de *D. asper*. No biorreator do tipo RITA, o meio líquido hidrata o explante a cada 6 horas quando ocorre a aeração e agitação do meio, por meio do sistema de compressores a ele acoplado. Neste sistema, observou-se uma porcentagem de 48% de sementes germinadas na presença de sacarose e 27% em meio sem sacarose, diferindo significativamente do meio semissólido em tubos de ensaio, que apresentou germinação de 63% no meio sem adição de sacarose e 30% no meio com adição de sacarose.

A ausência de sacarose em meio líquido nos biorreatores parece ter interferido negativamente na germinação e diferiu significativamente do meio líquido com presença de sacarose, que garantiu maior porcentagem de germinação (Figura 5A). No meio semissólido, o fato das sementes estarem em contato direto com o meio, pode ter influenciado a maior porcentagem de germinação observada. O contato das sementes com o meio, aliado a presença de sacarose também pode ter influenciado o aparecimento de microrganismos que acabaram interferindo na germinação. Apesar da porcentagem de contaminação ter variado de 33-48%, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5B).



**Figura 5.** Percentagem de germinação e percentagem de contaminação de sementes de *Dendrocalamus asper* em meio semissólido (Tubos) e em meio líquido (RITA), acrescido ou de sacarose (Sac+ ou Sac-). A – Percentagem de germinação de sementes de *Dendrocalamus asper* em meio semissólido e em meio líquido, acrescido de sacarose (Sac+) ou não (Sac-). B – Percentagem de contaminação de sementes em meio semissólido, acrescido de sacarose (Sac+) ou não (Sac-). Letras minúsculas comparam sistemas de germinação (tubo de ensaio e biorreator RITA) e letras maiúsculas comparam presença (Sac+) e ausência (Sac-) de sacarose no meio de cultivo para a germinação, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 6.** Germinação de sementes de *Dendrocalamus asper* em biorreator do tipo RITA®. A - Germinação em meio líquido em biorreator RITA®, após 30 dias (vista externa). B - Germinação em meio líquido no biorreator RITA®, após 30 dias (vista interna).

Embora o meio semissólido, sem adição de sacarose, tenha possibilitado maior germinação de sementes, durante o desenvolvimento das plantas nestes mesmos sistemas, observou-se que o biorreator possibilitou, de maneira geral, melhor desenvolvimento das plantas (Figura 6A e 6B). Nesse sistema e na presença de sacarose, verificou-se maior altura de colmo (5,4 cm) e maior número de raízes (2,7); e também possibilitou a formação de maior número de folhas (4,3 e 4,2) na presença e ausência de sacarose (Tabela 2).

A maior vantagem do sistema de biorreatores do tipo RITA sobre o meio semissólido em tubos de ensaio parece ser a facilidade de manuseio e troca do meio quando necessário, com a mínima manipulação dos explantes.

**Tabela 2.** Desenvolvimento de plantas oriundas da germinação de sementes em de *Dendrocalamus asper* em meio semissólido (Tubos) e em meio líquido (RITA), acrescido de sacarose (Sac+) ou não (Sac-)

Altura do Colmo (cm)*		
	RITA	TUBO
Sac+	5,4 ± 0,41 aA	3,1 ± 0,60 aB
Sac-	4,1 ± 0,55 aA	2,8 ± 0,48 aA
Comprimento Raiz (cm)*		
	RITA	TUBO
Sac+	2,6 ± 0,24 aA	2,8 ± 0,55 aA
Sac-	3,1 ± 0,51 aA	2,6 ± 0,49 aA
Número de Raízes*		
	RITA	TUBO
Sac+	2,7 ± 0,41 aA	1,4 ± 0,30 aB
Sac-	1,8 ± 0,37 bA	1,6 ± 0,16 aA
Número de Folhas*		
	RITA	TUBO
Sac+	4,3 ± 0,28 aA	3,1 ± 0,40 aA
Sac-	4,3 ± 0,38 aA	2,6 ± 0,45 aB

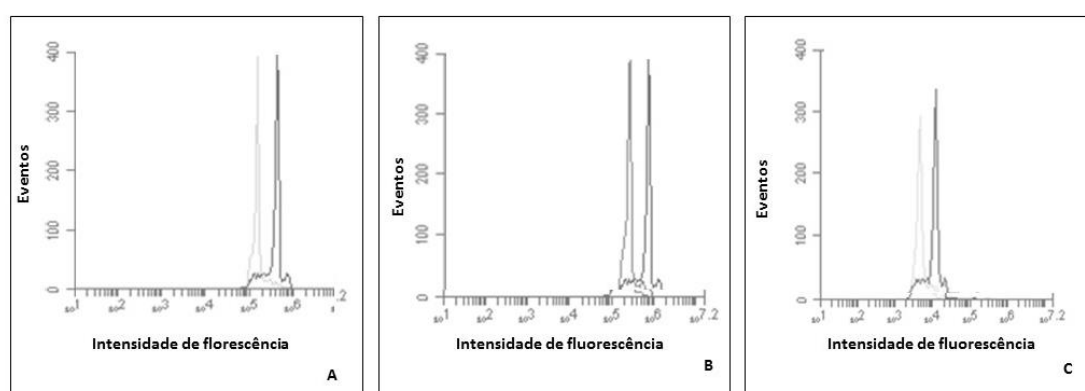
Os valores representam a média das repetições ± o erro padrão da média. Diferenças significativas pelo teste Tukey com  $P \leq 0,05$  são indicadas por \* e médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.



### 3.4 Quantificação de DNA por citometria de fluxo

Durante os experimentos de germinação de *D. asper* observou-se a ocorrência de três fenótipos entre as plantas formadas. Entre estes fenótipos, ocorreram plantas com folhas verdes (Figura 2E), com folhas variegadas (Figura 2F) e folhas albinas (Figura 2H).

A análise por citometria de fluxo das folhas destas plantas resultou em um pico G1 de DNA com boa resolução e coeficiente de variação inferiores à 4%. Apesar da discrepância fenotípica observada nas plantas após a germinação, estas não apresentaram variações na quantidade relativa de DNA. As plantas normais verdes apresentaram em média 3,33 pg, as variegadas 3,31 pg e as albinas 3,24 pg de DNA nuclear. Histogramas representativos dos três fenótipos de *D. asper* estão mostrados na Figura 7.



**Figura 7.** Histogramas relativos à análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA de plantas oriundas da germinação de sementes de *Dendrocalamus. asper* obtidos usando o tampão Marie. O primeiro pico corresponde ao padrão ervilha e o segundo pico corresponde ao bambu. A – Fenótipo verde; B – Fenótipo variegado; C – Fenótipo albino.

Segundo Carvalho e Antunes Filho (1954) o desenvolvimento anormal da clorofila resultando em variegação das folhas pode ser observado em numerosas espécies vegetais. Essa característica manifesta-se pelo aparecimento de áreas da folha com formas e dimensões variadas, as quais se apresentam com coloração desde verde-clara até esbranquiçada ou albina. Na grande maioria dos casos estudados, tem-se determinado que os vários padrões de variegação das folhas estão sob controle direto de fatores genéticos. No entanto, através da análise de plantas de bambu por citometria de fluxo, verificou-se que a ocorrência de variegação e albinismo não estão relacionados diretamente ao conteúdo relativo de DNA das plantas, sendo necessários estudos mais aprofundados, com marcadores moleculares, para verificar as causas destas alterações fenotípicas nas folhas de *D. asper*, após a germinação.

### 3.5 Caracterização anatômica e histoquímica

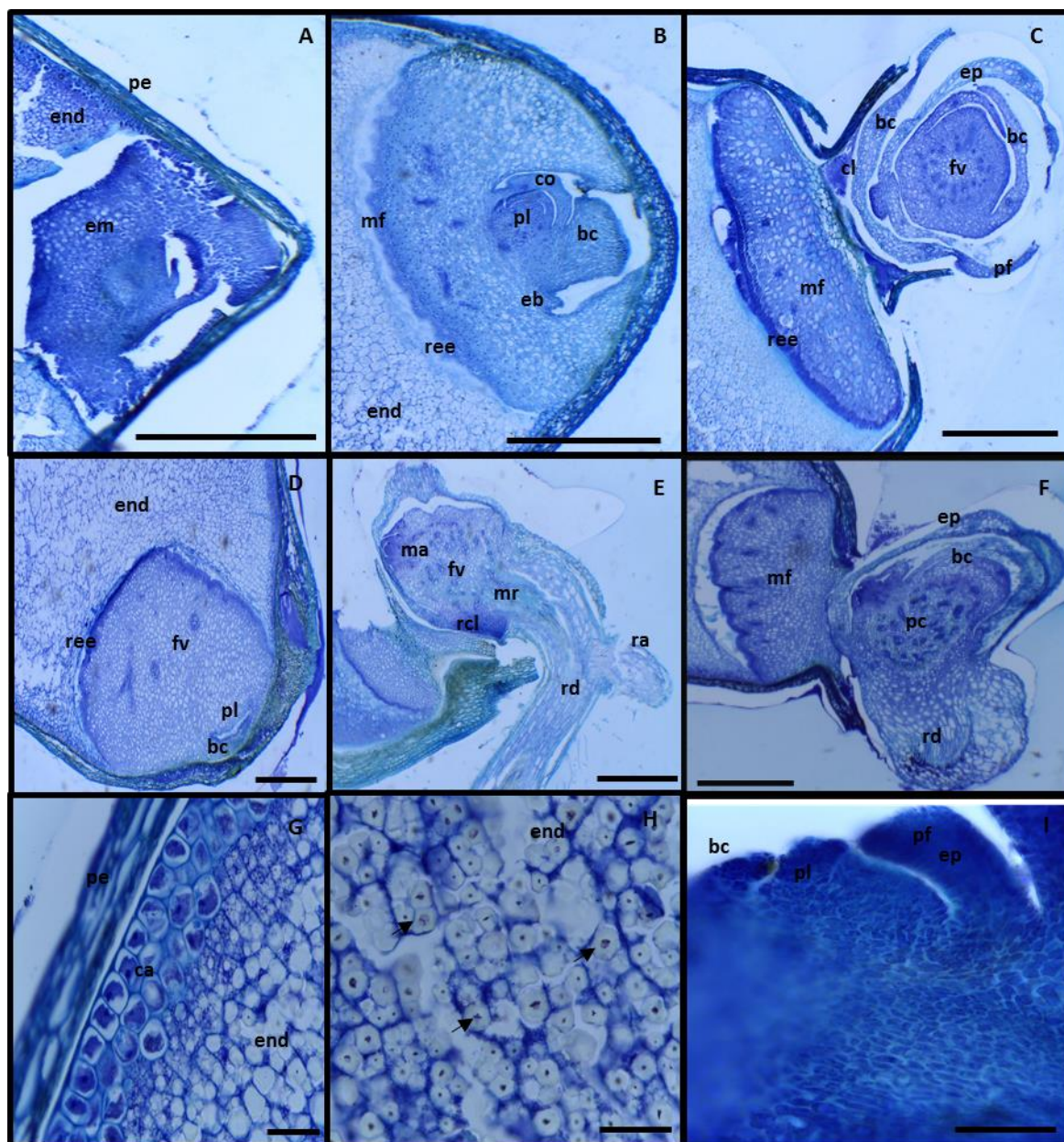
As sementes de *Dendrocalamus asper* são albuminosas, com embrião periférico basal e diferenciado (Figura 8 A-F). O endosperma ocupa grande parte da semente, cerca de 3/4 e constitui-se de células isodiamétricas preenchidas com grãos de amido (Figura 8D e 8H), com pelo menos três camadas de células formando a camada de aleurona localizada na região periférica do endosperma, revestida pelo pericarpo (Figura 8G).

O embrião maduro, antes do início do processo germinativo, ocupa cerca de 1/4 da semente e apresenta escutelo, coleóptilo, plúmula, mesocótilo, raiz de origem endógena e coleorriza (Figura 8 A-F). O epiblasto, excrescência lateral oposta ao escutelo, também pode ser observado (Figura 8B). As células que constituem o embrião são meristemáticas e formam a protoderme, o meristema fundamental e o procâmbio (Figura 8 E-F). O embrião é circundado por uma região de camadas celulares que não acumulam reservas (Figura 8 C-D).

O cotilédone é dividido em três regiões: hiperfilo (escutelo), que é a parte superior do cotilédone; bainha, que é reduzida à região basal do coleóptilo; e hipofilo (coleóptilo), estrutura que protege a plúmula (Figura 8 B-F, I). A plúmula apresenta meristema apical caulinar envolvido pelos primórdios foliares (Figura 8I). O mesocótilo é o eixo que se estende da região basal do coleóptilo até a inserção do nó cotiledonar (primeiro entrenó) (Figura 8 C e E). A partir da região do nó cotiledonar, origina-se a primeira raiz presente no embrião e também as demais raízes adventícias da plântula (Figura 8E-F).

A coleorriza envolve a raiz endógena e é uma estrutura não vascularizada, preenchida pelo meristema fundamental e delimitada pela protoderme (Figura 8C, E, F). Todas as estruturas observadas nas sementes de *D. asper* corroboram com Nakamura e Scatena (2009) ao caracterizarem cariopses de Poaceae.

De acordo com Burrieza et al. (2014), em sementes maduras o endosperma amiláceo é preservado como tecido de reserva, com células uniformes. As células acumulam amido em plastídios e também acumulam corpos proteicos em prolaminas. A camada de aleurona se situa logo abaixo do pericarpo e estas células podem conter antocianinas, responsável pela cor das sementes (Becraft; Yi, 2011; Slinwiska, Bewley, 2014). A quantidade de camadas de células que constituem a camada de aleurona varia de espécie para espécie. Esta camada é constituída por células que armazenam proteínas, lipídios e nutrientes minerais para serem usados durante a germinação (Becraft; Yi, 2011; Burrieza et al., 2014). Após a germinação da semente, presume-se que as proteínas de armazenamento forneçam os aminoácidos necessários para a síntese de enzimas hidrolíticas necessárias para a mobilização de amido no endosperma



**Figura 8.** Seções histológicas longitudinais da porção basal da semente durante os eventos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de *Dendrocalamus asper* *in vitro* e coradas com Azul de Toluidina. A: tempo 0; B: 3 dias; C: 7 dias; D: 14 dias; E: 21 dias; F: 28 dias após a germinação; G: Camada periférica da semente; H: Endoderme amilácea; I: Região apical do embrião. Legenda: pe: pericarpo, end: endoderme; em: embrião; mf: meristema fundamental; ree: região envolvente do embrião; pl: plúmula; eb: epiblasto; co: coleóptilo; ep: epicótilo; bc: bainha cotiledonar; fv: feixe vascular; cl: coleorriza; ma: meristema apical; mr: meristema radicular; pc: procambio; rd: radícula; ra: raiz adventícia; ca: camada de aleurona; pr: protoderme. A seta indica grãos de amido. Barra: A, B, C, E e F = 500 µm; D e I = 200 µm; G e H = 50 µm.

amiláceo e as células da camada de aleurona morrem por autofagia (Bethke et al., 1998; Becraft; Yi, 2011).

A região envolvente do embrião compreende várias camadas celulares que envolvem completamente o embrião jovem e são caracterizadas por seus densos conteúdos citoplasmáticos, pequenos vacúolos e um complexo sistema de membrana, mas não acumulam

reservas (Burrieza et al., 2014; Sabelli, Larkins, 2009). O embrião de monocotiledôneas consiste de um eixo embrionário com um único cotilédone, tem radícula e hipocótilo, epicótilo e plúmula (ápice do embrião). A radícula contém meristema de raiz e após a germinação, dará origem a raiz embrionária (Slinwiska, Bewley, 2014). O cotilédone é transformado no escutelo absorvente que fica entre o endosperma e o eixo embrionário. O meristema apical do embrião é coberto pelo coleótilo e contém vários primórdios foliares (Burrieza et al. 2014; Slinwiska, Bewley, 2014).

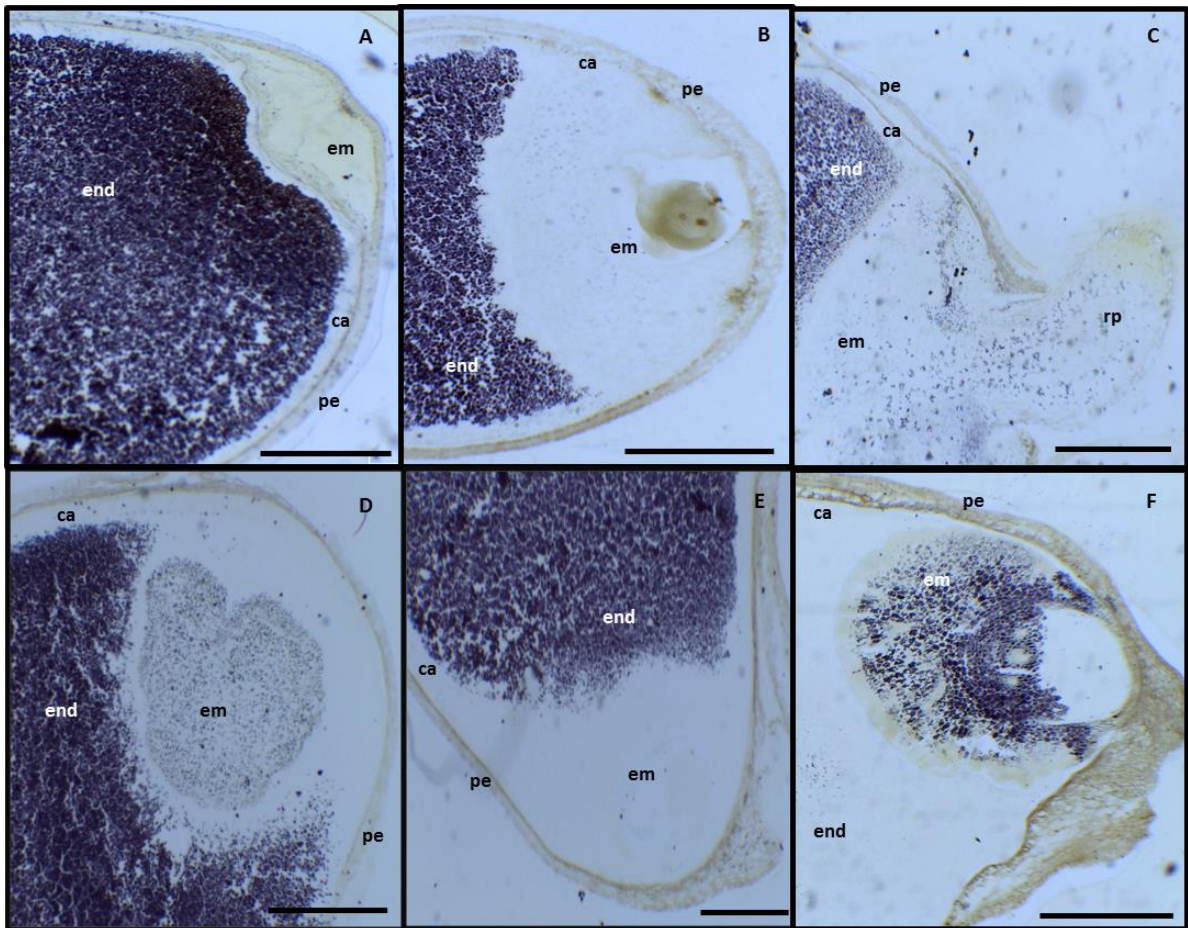
A coleoriza é um tecido embrionário multicelular não vascularizado que cobre o meristema apical da raiz de cereais e, durante a germinação é separada da radícula (Burrieza et al., 2014; Slinwiska, Bewley, 2014).

A análise histológica corrobora com a análise morfológica da germinação, que aos sete dias havia emitido raiz e parte aérea, já com emissão do epicótilo (Figura 8C). Aos 14 dias, durante o desenvolvimento pós-seminal é possível observar feixes vasculares, estruturas foliares, bem como a emissão de raiz adventícia (Figura 8D-F).

A partir das análises histoquímicas da semente foi possível verificar que as células do endosperma possuem grandes quantidades de grãos de amido, prioritariamente no endosperma de sementes maduras, até os 21 dias de germinação (Figura 9A-E). A partir de 28 dias observou-se o acúmulo de amido na região do embrião e ausência na região do endosperma (Figura 9E e 9F). O amido presente no endosperma de gramíneas ocupa grande parte do volume celular (Tetlow, 2010) e é uma importante fonte de carbono para a respiração e a síntese de polímeros contendo carbono durante o crescimento da plântula, até o momento que possa ser fornecido de forma autotrófica pela fotossíntese (Buckeridge et al., 2004; Slinwiska, Bewley, 2014).

A presença de amido também foi identificada ao corar os cortes com PAS (Periodic Acid Schiff), além de outros polissacarídeos de reserva em todas as estruturas da semente, como no embrião, na região envolvente do embrião, no pericarpo e também na camada de aleurona, mas com maior concentração no endosperma (Figura 10). Nas sementes maduras, antes da germinação, o embrião apresentou uma coloração forte em todas as estruturas da semente (Figura 10A). A partir do terceiro dia de germinação, observou-se que o PAS corou principalmente a parede celular das células (Figura 10B-F). Aos 28 dias a camada de aleurona apresentou uma coloração mais translúcida, evidenciando a degradação de polissacarídeos presentes nesta estrutura.

De maneira geral amido é o mais prevalente dos carboidratos insolúveis nas sementes, embora as hemiceluloses associadas à parede celular estejam presentes em algumas espécies como a principal reserva de carboidratos. Os oligossacarídeos da família rafinose também estão

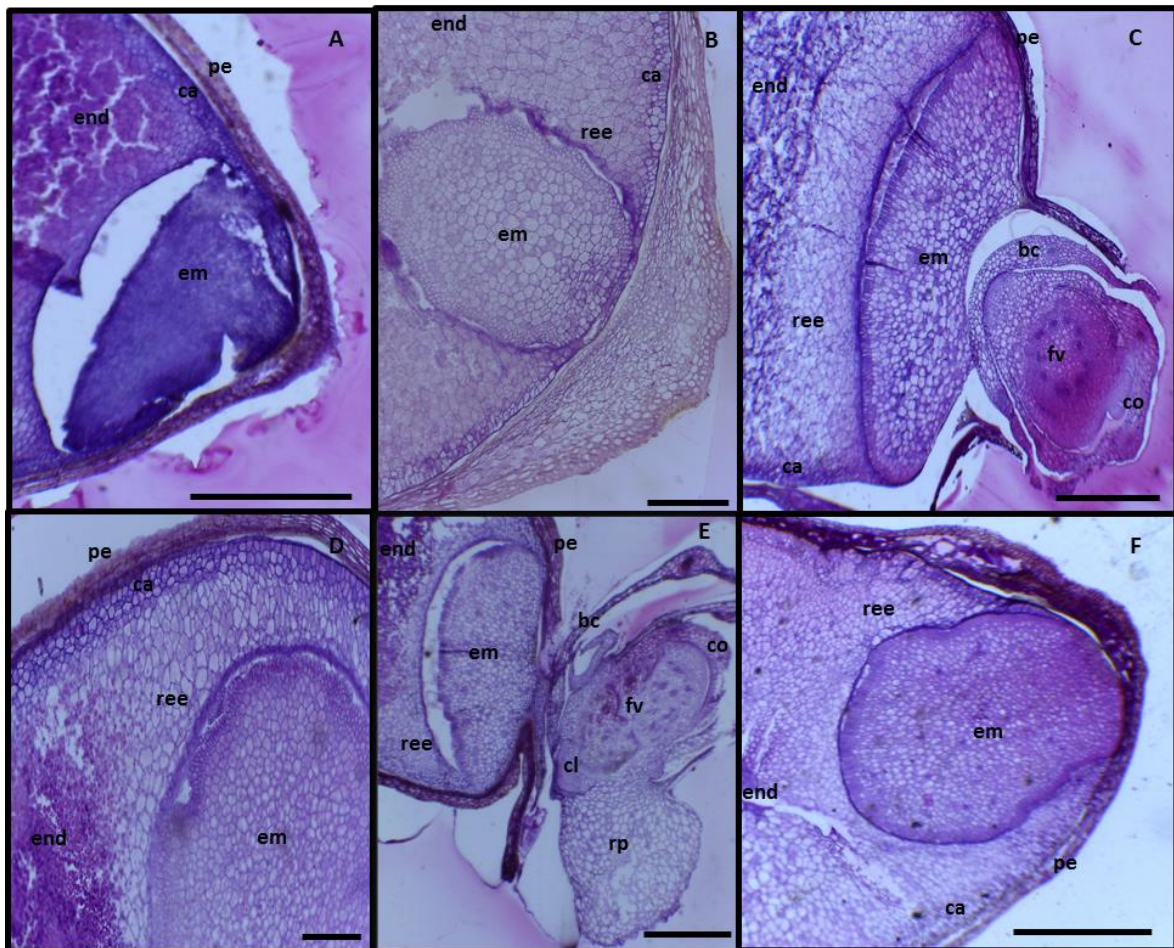


**Figura 9.** Seções histológicas longitudinais da porção basal da semente durante os eventos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de *Dendrocalmus asper in vitro* e coradas com Lugol. A: tempo 0; B: 3 dias; C: 7 dias; D: 14 dias; E: 21 dias; F: 28 dias após a germinação. Legenda: pe: pericarpo, end: endosperma; ca: camada de aleurona; em: embrião; rp: raiz principal. Barra: A, B, D e F = 500  $\mu$ m; C e E = 200  $\mu$ m.

frequentemente presentes no embrião, mas em quantidades relativamente menores em comparação com os carboidratos poliméricos (Black et al., 2006).

Os açúcares de baixo peso molecular ocorrem no citoplasma de muitas espécies e representam 1% de massa seca de embriões em gramíneas. Estes açúcares são utilizados como substrato inicial para respiração, durante a germinação e para o crescimento das plântulas, antes da mobilização das principais reservas de amido ou hemicelulose. Além disso, também podem desempenhar um papel na tolerância à dessecação da semente madura (Slinwiska, Bewley, 2014).

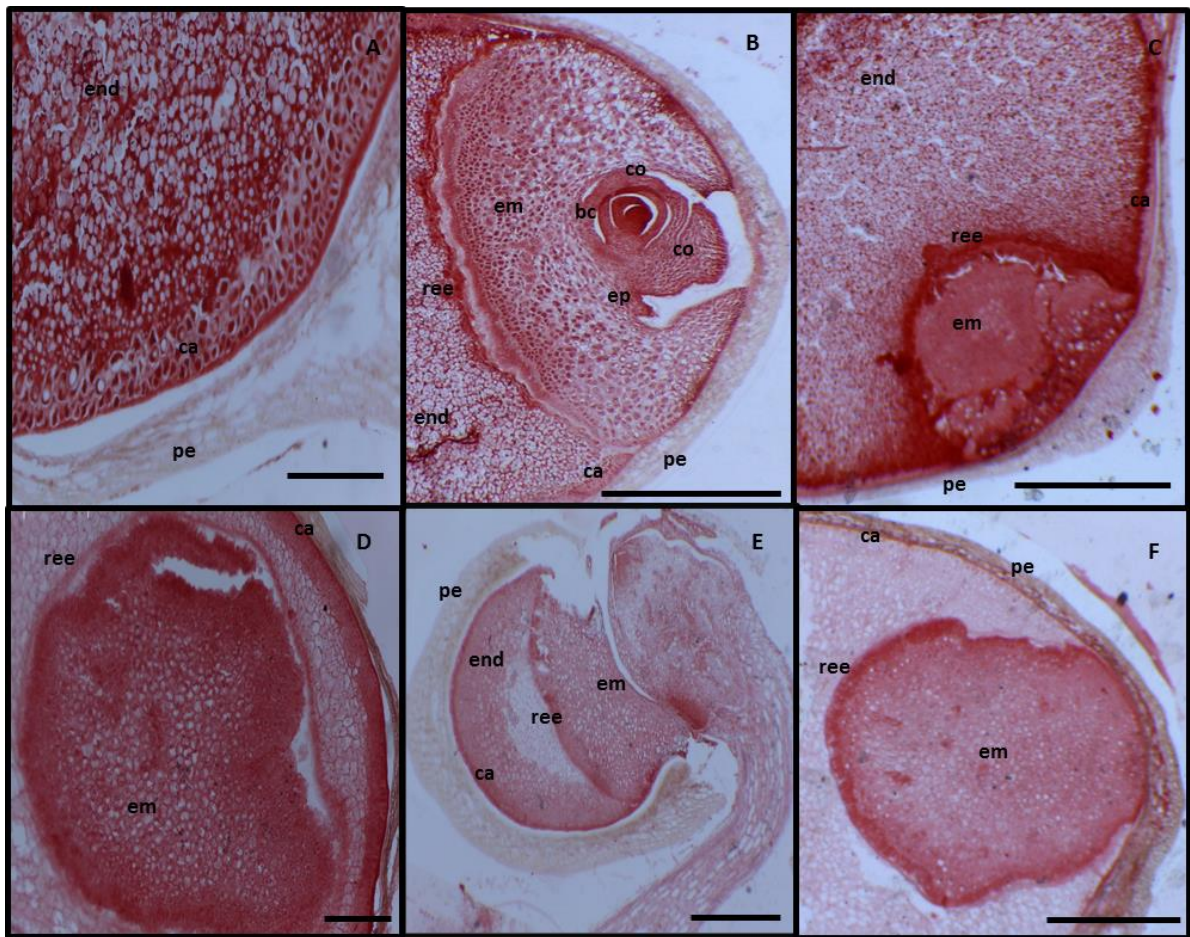
As proteínas foram evidenciadas utilizando o corante Xylidine Ponceau e, assim como os polissacarídeos de reserva, as proteínas ocorreram em todas as partes da semente e do embrião (Figura 11 A-F). Apresentam-se em forma de grânulos proteicos nas células do endosperma, na camada de aleurona, na região envolvente do embrião e na região cotiledonar. Durante a germinação observou-se a redução de corpos proteicos, assim como aconteceu com os polissacarídeos, na camada de aleurona aos 28 dias de desenvolvimento pós-seminal.



**Figura 10.** Seções histológicas longitudinais da porção basal da semente durante os eventos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de *Dendrocalamus asper in vitro* e coradas com PAS. A: tempo 0; B: 3 dias; C: 7 dias; D: 14 dias; E: 21 dias; F: 28 dias após a germinação. Legenda: pe: pericarpo, end: endosperma; ca: camada de aleurona; em: embrião; ree: região envolvente do embrião; bc: bainha cotiledonar; fv: feixe vascular; co: coleótilo; cl: coleoriza; rp: raiz principal. Barra: A, E, e F = 500  $\mu$ m; B, C e D = 200  $\mu$ m.

As proteínas, de maneira geral, são fonte de carbono, nitrogênio e enxofre armazenados que, de acordo com suas funções, relações bioquímicas e moleculares podem ser classificadas em: a) proteínas de reserva, cuja função é armazenar nitrogênio, carbono e enxofre; b) proteínas estruturais e metabólicas, que são essenciais para o crescimento e estrutura da semente e; c) proteínas de proteção, que podem conferir resistência a patógenos microbianos, invertebrados ou dessecação (Buckeridge et al., 2004a). Em alguns casos, as proteínas podem apresentar uma combinação de funções como reserva e proteção (Bewley, 2001).

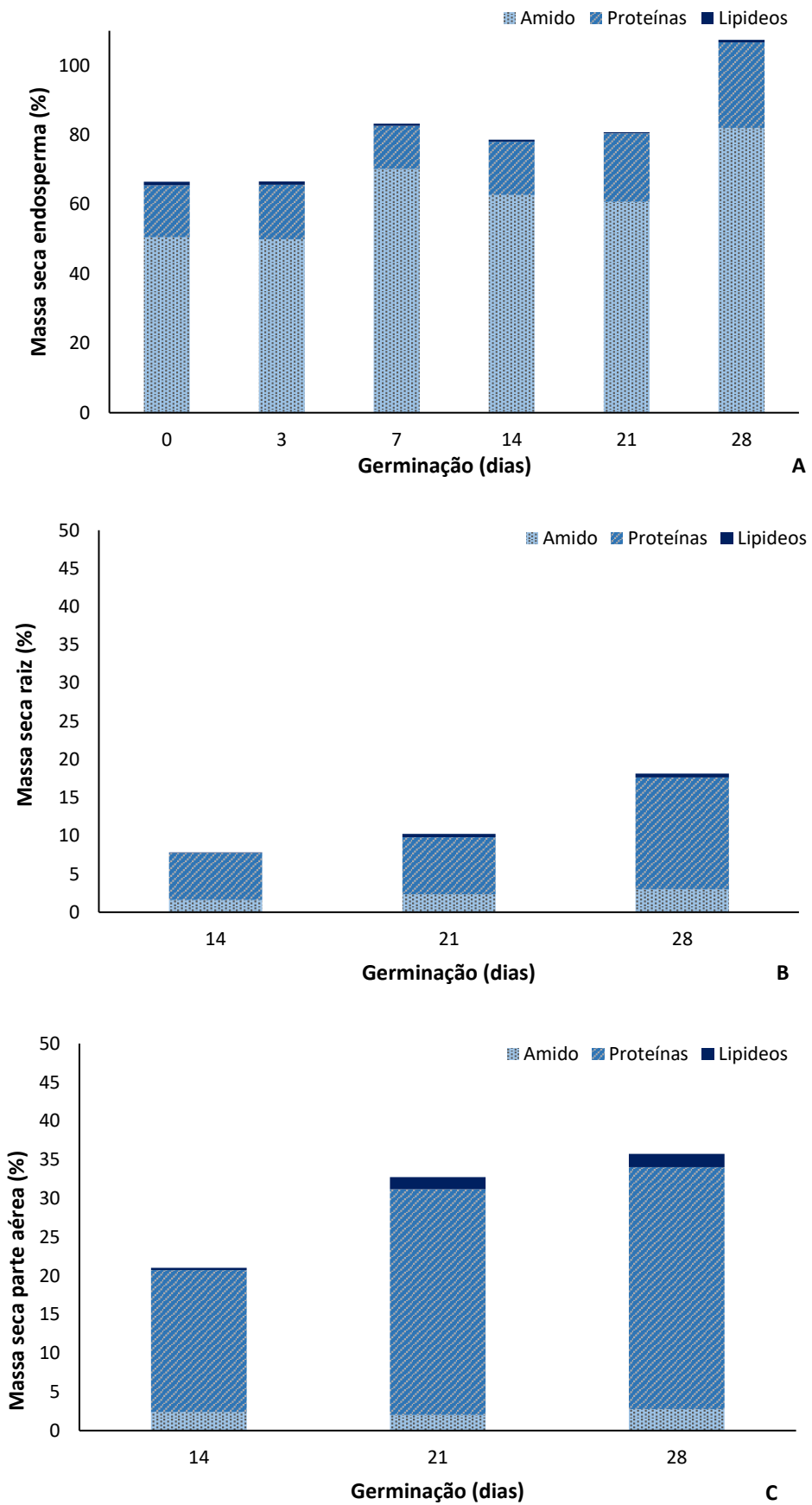
Prolaminas são muitas vezes o principal tipo de proteína de armazenamento em gramíneas e estão ausentes em dicotiledôneas e gimnospermas. Algumas sementes de gramíneas, no entanto, contêm globulinas como a principal proteína de armazenamento (Slinwiska, Bewley, 2014).



**Figura 11.** Seções histológicas da porção basal da semente durante os eventos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de *Dendrocalamus asper in vitro* em cortes longitudinais e coradas com Xylidine Ponceau. A: tempo 0; B: 3 dias; C: 7 dias; D: 14 dias; E: 21 dias; F: 28 dias após a germinação. Legenda: pe: pericarpo, end: endoderme; ca: camada de aleurona; em: embrião; ree: região envolvente do embrião; bc: bainha cotiledonar; co: coleóptilo; es: escutelo; ep: epiblasto. Barra: B, C, e E = 500  $\mu$ m; A, D e F = 200  $\mu$ m.

### 3.6 Mobilização de reservas

As análises bioquímicas para amido, proteínas e lipídios permitiram observar o processo de mobilização de reservas durante a germinação e o desenvolvimento pós-seminal (Figura 12 A-C). O amido foi o composto mais abundante nas sementes até os 28 dias de germinação. Apesar de não ter sido observada diferenças significativas para a percentagem de amido por massa seca, aos sete e aos 28 dias houve um acúmulo deste metabólito (Figura 12 A). No entanto, como evidenciado pela análise histoquímica os eventos relacionados à germinação consomem o amido de reserva das sementes. O que ocorre aos 28 dias é o acúmulo do produto da fotossíntese, visto que nesse período a plântula já havia se tornado autotrófica. Uma vez que, ao separar as estruturas (semente, parte aérea e raízes) para as análises bioquímicas, uma porção da parte aérea e das raízes ainda permaneciam aderidas a semente.



**Figura 12.** Percentagem de amido, proteína e lipídios em relação a massa seca de endosperma (A), raiz (B) e parte aérea (C) durante e após a germinação de sementes de *Dendrocalamus asper*.



Além de amido, as sementes de *D. asper* apresentaram quantidades consideráveis de proteínas e pequena quantidade de lipídios. Proteínas e lipídios também não apresentaram diferenças significativas entre os períodos de avaliação da germinação. No entanto, apresentaram acúmulo destes compostos aos 28 dias (Figura 12 A).

Durante o desenvolvimento pós-seminal as raízes e parte aérea formadas apresentaram na sua composição proteína como principal metabólito, seguida por amido e lipídios. Apesar de não ter ocorrido diferenças significativas entre os tempos avaliados, observou-se as maiores porcentagens destes compostos aos 28 dias (Figura 12 B-C).

As reservas das sementes têm basicamente duas funções que se relacionam com a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula que apresente a capacidade de se manter de forma autotrófica. As reservas podem funcionar com fonte de energia para manter processos metabólicos em funcionamento e/ou como fonte de matéria para construção de tecidos vegetais que irão constituir a plântula (Buckeridge et al., 2004a).

Em *Caesalpinia peltophoroides* o teor de amido mostrou uma ligeira redução durante a germinação e o crescimento das plântulas (Corte et al., 2006). O teor de proteínas solúveis dos cotilédones das sementes *Dalbergia nigra* diminuíram gradualmente ao longo vários períodos de hidratação (Ataíde et al., 2013).

A mobilização de proteínas é necessária para atender a demanda por aminoácidos durante os primeiros estágios da germinação e é a primeira fonte de nitrogênio a ser utilizada pela semente (Soriano et al., 2011). Durante o processo de germinação, o desenvolvimento do eixo embrionário e a síntese de novas proteínas também dependem do fornecimento de aminoácidos apropriados derivados da degradação das proteínas de armazenamento (Bewley et al., 2013).

Dentre os tipos de ácidos graxos encontrados em sementes de *D. asper* foi possível identificar a presença do ácido araquídico, behênico, elaídico, erúcico, linoleico, linolênico, oleico, palmítico e palmitoleico (Tabela 3). Todos os ácidos graxos listados foram encontrados no endosperma em todos os tempos de avaliação da germinação e desenvolvimentos pós-seminal. No entanto, o ácido linoleico, palmítico, palmitoleico e oleico foram encontrados em maiores concentrações que os demais (Tabela 3).

Após os 14 dias de germinação, observou-se a ocorrência destes mesmos ácidos graxos nas raízes e parte aérea, com exceção do ácido oleico. Nas raízes, apesar de em pequenas concentrações, o ácido linoleico, linolênico, palmítico e palmitoleico se mostraram mais abundantes (Tabela 3). Já na parte aérea, a concentração de ácido linolênico foi bem superior que os demais ácidos graxos a partir dos 21 dias (Tabela 3).

**Tabela 3.** Quantificação e identificação de ácidos graxos em relação  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de massa seca do endosperma, raiz e parte aérea durante e após a germinação de sementes de *Dendrocalamus asper*

Ácidos Graxos	Período de germinação (dias)					
	0	3	7	14	21	28
<b>Endosperma (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}</math> MS)</b>						
Ácido palmítico (C16)	8,8±2,7 bA	10,3±0,6 bA	7,8±0,1 aA	6,4±2,9 bB	9,1±2,3 bA	4,4±1,9 aB
Ácido palmitoleico (C16:1)	6,4±1,8 bA	7,4±0,4 bA	5,7±0,06 aA	4,7±1,9 bA	6,5±1,5 bA	3,4±1,3 aA
Ácido oleico (C18:1)	4,4±2,2 cA	4,2±0,9 cA	1,4±2,2 bA	2,5±1,0 cA	2,6±3,1 cA	0,3±2,8 bA
Ácido linoleico (C18:2)	17,2±5,9 aA	18,9±1,0 aA	9,0±0,5 aB	9,9±1,6 aB	15,7±5,5 aA	6,4±0,2 aB
Ácido linolênico (C18:3)	0,6±0,2 cA	0,7±0,07 cA	0,1±0,01 bA	0,3±0,1 cA	0,9±0,1 cA	0,4±0,2 bA
Ácido araquídico (C20)	0,6±0,1 cA	0,6±0,01 cA	0,4±0,05 bA	0,5±0,2 cA	0,5±0,1 cA	0,3±0,1 bA
Ácido elaídico (C20:1)	0,3±0,01 cA	0,3±0,08 cA	0,3±0,07 bA	0,2±0,04 cA	0,3±0,02 cA	0,3±0,05 bA
Ácido behênico (C22)	1,1±0,12 cA	1,1±0,01 cA	1,0±0,04 bA	0,9±0,1 cA	1,0±0,1 cA	0,8±0,1 bA
Ácido erúcico (C22:1)	0,9±0,07 cA	0,8±0,14 cA	0,7±0,09 bA	0,6±0,05 cA	0,8±0,1 cA	0,5±0,2 bA
<b>Raiz (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}</math> MS)</b>						
Ácido palmítico (C16)	-	-	-	0,0±0,0 aB	4,3±1,4 aA	2,5±0,2 aA
Ácido palmitoleico (C16:1)	-	-	-	0,0±0,0 aB	3,3±0,9 aA	2,0±0,6 aA
Ácido oleico (C18:1)	-	-	-	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 bA	0,0±0,0 bA
Ácido linoleico (C18:2)	-	-	-	0,0±0,0 aB	3,4±1,9 aA	1,4±0,4 aB
Ácido linolênico (C18:3)	-	-	-	0,0±0,0 aB	2,9±0,6 aA	2,6±1,0 aA
Ácido araquídico (C20)	-	-	-	0,2±0,02 aA	0,7±0,1 bA	0,7±0,2 bA
Ácido elaídico (C20:1)	-	-	-	0,1±0,01 aA	0,5±0,1 bA	0,5±0,1 bA
Ácido behênico (C22)	-	-	-	0,7±0,1 aA	0,8±0,05 bA	0,8±0,07 bA
Ácido erúcico (C22:1)	-	-	-	0,0±0,0 aA	0,5±0,03 bA	0,3±0,02 bA
<b>Parte aérea (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}</math> MS)</b>						
Ácido palmítico (C16)	-	-	-	0,0±0,0 aB	4,3±10 aA	2,5±0,9 aA
Ácido palmitoleico (C16:1)	-	-	-	0,0±0,0 aB	3,3±0,7 aA	1,9±0,6 aA
Ácido oleico (C18:1)	-	-	-	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 bA	0,0±0,0 bA
Ácido linoleico (C18:2)	-	-	-	0,0±0,0 aB	3,3±1,5 aA	1,4±0,6 aB
Ácido linolênico (C18:3)	-	-	-	0,0±0,0 aB	2,9±1,8 bA	2,6±0,8 aA
Ácido araquídico (C20)	-	-	-	0,2±0,2 aA	0,7±0,04 aA	0,7±0,02 bA
Ácido elaídico (C20:1)	-	-	-	0,1±0,01 aA	0,5±0,06 aA	0,5±0,03 bA
Ácido behênico (C22)	-	-	-	0,6±0,05 aA	0,8±0,06 aA	0,7±0,1 bA
Ácido erúcico (C22:1)	-	-	-	0,0±0,0 aA	0,5±0,06 aA	0,3±0,03 bA

#### 4. CONCLUSÕES

O meio de cultivo *in vitro* aliado a desinfestação das sementes com cloreto de mercúrio é o mais indicado para germinação de sementes de *Dendrocalamus asper*.

Durante a germinação de sementes de *D. asper* ocorre o desenvolvimento de plantas com fenótipos verde, variegado e albino, com maior frequência do verde.

Anatomicamente as sementes são constituídas por endosperma amiláceo, camada de aleurona logo abaixo do pericarpo e embrião constituído por cotilédone, radícula, epicótilo e plúmula.

O principal metabólito de reserva é amido, seguido por proteínas e lipídios. Entre os principais ácidos graxos encontrados no endosperma estão o ácido linoleico, palmítico, palmitoleico e oleico. Nas raízes são o ácido linoleico, linolênico, palmítico e palmitoleico os mais abundantes. Na parte aérea o ácido linolênico é o mais abundante.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L.I.V; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, p. 325-431, 2007.

ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; ARYA, D. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**. Vol. 18, p. 879-882. 1999.

ATAÍDE, G. DA M. Fisiologia, bioquímica e anatomia de sementes de *Melanoxylon braúna* Schott. (Fabaceae) germinadas sob diferentes temperaturas. **Tese** (doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2013.

ATAIDE, G.M.; LIMA E BORGES, E.E.; GONÇALVES, J.F.C.; GUIMARÃES, V.M.; FLORES, A.V.; BICALHO, E.M. Alterations in seed reserves of *Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr All. Ex Benth) during hydration. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 1, p. 56-63, 2013.

BAHRU, T.; MULATU, Y.; KIDANE, B. Germination ecology of *Arundinaria lpine* (K. Schum) and *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich.) Munro seeds: Indigeneous bamboo species in Ethiopia. **International Journal of Biodiversity**. Vol. 2015, 8p. 2015.

BECRAFT, P.W.; YI, G. Regulation of aleurone development in cereal grains. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 5, p. 1669-1675, 2011.

BETHKE, P.; SWANSON, S.J.; HILLMER, S.; JONES, R.L. From storage compartment to lytic organelle: the metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. **Annals of Botany**, v. 82, p. 399-412, 1998.

BEWLEY, J. D. Seed Germination and Reserve Mobilization. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–7, 2001.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. Nova York: Springer, 2013. 392 p.

BLACK, M.; BEWLEY, J.D.; HALMER, P. **The Encyclopedia of Seeds**. Science, Technology and Uses. CAB International, Wallingford, UK, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. Vol. 72, p. 248-254, 1976.

- BRAR, J.; ANAND, M.; SOOD, A. *in vitro* germination of economically importante edible bamboo *Dendrocalamus membranaceus* Munro. **Indian Journal Experimental Biology**. Vol. 51, p 88-96. 2013.
- BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 31-50, 2004a.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 163-185, 2004b.
- BURRIEZA, H.P.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, M.P.; MALDONADO, S. Analogous reserve distribution and tissue characteristics in quinoa and grass seeds suggest convergent evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-11, 2014.
- CIARAMELLO, D.; AZZINI, A. Bambu como matéria prima para papel. V – Estudos sobre o emprego de quatro espécies de *Dendrocalamus*, na produção de celulose sulfato. **Bragantia**. Vol. 30, n. 24. 1971.
- DAS, M.; BHATTACHARYA, S.; SINGH, P.; FILGUEIRAS, T. S.; PAL, A. Bamboo taxonomy and diversity in the era of molecular markers. **Advances in Botanical Research**, Vol.47, p.226-260, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. Vol.35, n.6, p.1039-1042. 2011.
- FILGUEIRAS, T. S.; SANTOS-GONÇALVES, A. P. A Checklist of the Basal Grasses and Bamboos in Brazil (POACEAE). **The Journal of the American Bamboo Society**. Vol.18, n.1, p.7-18. 2004.
- JENSEN, W.A. 1962 In: KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.
- KUMAR, V.; BANERJEE, M. Albino regenerants proliferation of *Dendrocalamus asper* *in vitro*. **World Journal of Agricultural Sciences**. Vol. 10, n. 1, p. 9-13. 2014. DOI:10.5829/idosi.wjas.2014.10.1.1755.

- LAURENS, L.M.; QUINN, M.; VAN WYCHEN, S.; TEMPLETON, D.W.; WOLFRUM, E.J. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by *in situ* transesterification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n.1, p. 167-178, 2012.
- McCLURE, F.A. The bamboos – a fresh perspective. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1996.
- MONTIEL, M.; SANCHEZ, E. Ultraestructura de Bambúes del Género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) Cultivados em Costa Rica IV: *Dendrocalamus asper*, Clones Taiwán y Tailandia. **Revista Biología Tropical**. Vol. 54, suppl. 2, p. 65-75, dec. 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**. Vol.15, p.473-497. 1962.
- NAKAMURA, A.T.; SCATENA, V.L. Desenvolvimento pós-seminal de espécies de Poaceae (Poales). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 212-222, 2009.
- NDIAYE, A.; NIANG, D.; DIOP, D.; SAGNA, M.; GASSAMA, Y.K.; SOOD, A. Effects of some factors on the *in vitro* seeds germination of *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich.) Munro. **Indian Journal Applied Research**. Vol. 5, n. 7, p.3-7, 2015.
- NONOGAKI, H. Seed Germination—The Biochemical and Molecular Mechanisms. **Breeding Science**, v. 56, p. 93–105, 2006.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59, 368–373, 1964.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. Métodos histoquímicos aplicados às sementes. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013, 40 p., 1981.
- SABELLI, P. A.; LARKINS, B. A. The development of endosperm in grasses. **Plant Physiology**, v.149, p. 14–26, 2009. doi: 10.1104/pp.108.129437.
- SERT, M.A.; BONATO, C.M.; SOUZA, L.A. **Germinação da semente**. In: Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa, PR: TODAPALAVRA. Cap. 2, p. 88-118. 2009.
- SLIWINSKA, E.; BEWLEY, D. Overview of seed development, anatomy and morphology. In; GALLAGHER, R.S. **Seeds: The ecology of regeneration in plant communities**. 3 ed. CAB International, 2014.

- SINGH, G.; RICHA; SHARMA, M. L. A Review Article - Bamboo seed viability. **International Journal of Current Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 1690–1691, 2017.
- SORIANO, D.; OROZCO-SEGOVIA, A.; MARQUEZ-GUZMA, J.; KITAJIMA, K.; BUEN, A.G.; HUANTE, P. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. **Annals of Botany**, v. 107, p. 939-951, 2011. doi:aob. oxfordjournals.org/content/early/2011/03/07/aob.mcr041.
- THAPLIYAL, R.C.; SOOD, O.P.; RAWAT, M.M.S. Effect of moisture content and storage temperature on the viability of *Bambusa tulda* seed. **The International Tree Crops Journal**. Vol. 7, p. 67-75. 1991.
- TETLOW, I.J. Starch biosynthesis in developing seeds. **Seed Science**, v. 21, p. 5-32, 2010. I. J. (2010). doi: 10.1017/S0960258510000292.
- VIDAL, 1970 In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. Métodos histoquímicos aplicados às sementes. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013, 40 p.
- WANG, W.; FRANKLIN, S. B.; CIRTAIN, M. C. Seed germination and seedling growth in the arrow bamboo *Fargesia qinlingensis*. **Ecology Research**. Vol. 22, p. 467-474. 2007. DOI 10.1007/s11284-006-0027-7.
- WONG, K. M. **The Amazing Grass: A Guide to The Diversity and Study of Bamboos in Southeast Asia**. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) e University of Malaya. 2004.

## **CAPÍTULO II**

### **TOLERÂNCIA DE SEMENTES DE BAMBU (*Dendrocalamus asper*) À DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO**



## RESUMO

A conservação de sementes é a técnica convencional de conservar recursos genéticos de plantas por longo prazo. A criopreservação é uma alternativa para sementes que não toleram a conservação por métodos convencionais, uma vez que permite conservar material por longos períodos em temperaturas extremamente baixas (-196°C). No entanto, o sucesso da criopreservação depende da dessecação das sementes, que garanta o teor de umidade ideal para a conservação. Sementes de bambu perdem a viabilidade rapidamente, se mantidas em condições naturais. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um simplificado e eficiente protocolo para a criopreservação de sementes de *Dendrocalamus asper*. Assim, sementes de *D. asper* foram dessecadas por 0, 24, 48, 96 e 144 horas em dessecador contendo sílica em gel. Ao término de cada período de dessecação, uma parte das sementes foram secas em estufa por 24 horas para verificar o teor de umidade. Uma segunda parte das sementes foi colocada para germinar em meio de MS, enquanto uma terceira parte foi imersa em nitrogênio líquido (-196 °C) por 48 horas. Após esse período, as sementes criopreservadas foram descongeladas e inoculadas em meio de MS. Foi observado que a dessecação de sementes por até 144 horas garantiu um teor de umidade de cerca de 5%. Nesta umidade, as sementes não apresentaram diferenças na germinabilidade tanto para o tratamento controle (NL-), quanto para sementes criopreservadas (NL+). Este resultado indica o possível comportamento ortodoxo das sementes de *D. asper*. Adicionalmente, a temperatura criogênica também não interferiu no desenvolvimento pós-seminal, sendo observada a formação de plantas normais e inteiras com sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos.

**Palavras-chave:** Poaceae, bambu, sementes, teor de umidade, temperatura, conservação *ex situ*

## ABSTRACT

Seed conservation is the conventional technique to conserve plant genetic resources by long-term. Cryopreservation is an alternative for seeds that do not tolerate conventional conservation methods, once it allows materials storage for long-term in extremely low temperatures (-196°C). However, cryopreservation successful depends on seeds dehydration to convenient moisture levels for the storage. Bamboo seeds lost viability quickly, if they were kept under natural conditions. In this context, the objective of this work was develop a simple and efficient protocol for seed cryopreservation of *Dendrocalamus asper*. For that, *D. asper* seeds were dissected for 0, 24, 48, 96 and 144 h in a desiccator containing silica gel. At the end of each period, a part of the seeds was dried in a drying oven for 24 h to moisture determination. A second part of the seeds was placed to germinate in a Murashige and Skoog medium formulation (MS), while a third part was immersed in liquid nitrogen (LN+; (-196°C) for 48 h. After this period, cryopreserved seeds were thawed and inoculated in MS medium. It was observed that seeds desiccation for up to 144 h promoted a moisture content of about 5%. At this moisture, the seeds do not presented differences in the germinability at +LN treatment, as well as in the control treatment (-LN). This result indicate that *D. asper* seeds present a orthodox behavior. The cryogenic temperature also does not interfered on post-seminal development, been observed plantlets with normal formations of roots and aerial parts.

**Keywords:** Poaceae, bamboo, seeds, moisture content, liquid nitrogen temperature, *ex situ* conservation

## 1. INTRODUÇÃO

A conservação de sementes é a técnica convencional para conservar recursos genéticos em longo prazo (Hamilton et al., 2013). No entanto, atenção deve ser dada às características fisiológicas das sementes que podem afetar a longevidade quando submetidas a baixos níveis de umidade e temperaturas (Wetzel et al., 2003). Convencionalmente, existem três classificações quanto ao comportamento das sementes em relação ao armazenamento: sementes ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias.

As sementes que são tolerantes à dessecação extrema, podendo serem conservadas por longos períodos de tempo com baixos conteúdos de água e a baixas temperaturas, são chamadas de sementes ortodoxas (Engelmann et al., 2013; Rajainadul; Ainul, 2013). As sementes recalcitrantes têm alto teor de umidade e são sensíveis à perda de água. Assim, elas não sobrevivem quando submetidas às mesmas condições usadas para armazenar sementes ortodoxas (Walters et al., 2013). As sementes intermediárias, em geral, resistem a dessecação a níveis baixos, mas perdem a viabilidade abaixo de 10-12% de teor de umidade (Walters, 2015). E, diferentemente das sementes ortodoxas, elas normalmente perdem a viabilidade mais rapidamente a temperaturas baixas (Hong; Ellis, 1996).

Dentre as técnicas de conservação, a criopreservação pode ser uma alternativa para aquelas sementes que não toleram a conservação por métodos convencionais, uma vez que permite conservar material por longos períodos em temperaturas extremamente baixas (-196°C) (Santos, 2001; Engelmann, 2011). As principais vantagens de se armazenar material vegetal em nitrogênio líquido são o baixo custo de armazenamento por não necessitar de sistema de refrigeração, a longevidade da conservação e o espaço físico reduzido (Santos, 2001; Camillo et al., 2009). No entanto, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação do material para um teor de umidade que seja baixo o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúria por desidratação (Santos, 2001; Walters et al., 2004; Engemann, 2011).

Neste trabalho, a espécie de estudo é o *Dendrocalamus asper* [(Schult. & Schult. F.) Baker ex K. Heyne], uma espécie tropical, gigante e simpodial, que apresenta dificuldades, com a produção irregular de sementes, devido ao longo ciclo de floração e a natureza monocárpica da planta (Banerjee et al., 2011; Singh et al., 2012, 2013). De fato, a sementes produzidas pela maioria das espécies de bambus lenhosos perdem a viabilidade em alguns meses com o envelhecimento e em condições naturais, comprometendo o vigor da germinação (Thomas et al., 1988; Singh et al., 2017). Diante disto, compreende-se a importância de manter as sementes sob condições controladas, buscando manter a viabilidade por mais tempo, podendo ser

explorada para vários usos (Singh et al., 2017). Ainda mais que sementes de bambu com baixos níveis de umidade podem ser conservadas a baixas temperaturas por longos períodos (Thapliyal et al., 1991).

Na literatura, é possível encontrar alguns estudos relacionados a conservação *ex situ* de sementes de bambu. Richa et al. (2006) conservaram sementes de *Bambusa bambos*, *Dendrocalamus membranaceus*, *Gigantocloa albociliata* e *Thamocalamus Siamensis* a temperatura de 4°C pelo período de um ano, observando uma diminuição considerável da germinação após este período. Rawat e Thapliyal (2003) descreveram o comportamento similar ao ortodoxo para sementes de *Dendrocalamus membraneus*, que mantiveram sua viabilidade por maior período quando armazenadas na temperatura de 5°C e umidades de 7,1 e 5,3%. Estes mesmos autores relataram a manutenção da viabilidade de sementes de *Dendrocalamus strictus* armazenadas por três anos com umidade de 2,8; 4,7; 6,3 e 8,9% sob as temperaturas de 5 e -5°C. Pillai et al. (2016) observaram que a redução do teor de umidade para 8% e o armazenamento a 4 °C garantem a viabilidade de sementes de *Dendrocalamus sikkimensis* por até 36 meses.

Apesar de alguns poucos autores terem relatado a importância da umidade e da temperatura para a conservação de sementes de bambus, ainda são escassos trabalhos que visem elucidar o comportamento das sementes durante o armazenamento, principalmente que utilizem temperaturas ultra baixas como a do nitrogênio líquido, combinadas com a redução do teor de umidade das sementes para conservação. Por isso, o desenvolvimento de estratégias de conservação *ex situ* utilizando temperaturas criogênicas e verificando a capacidade de dessecação de sementes dessa espécie são essenciais, podendo garantir não somente a preservação de espécies, mas também para o suprimento viável de sementes ao longo do tempo, auxiliando no desenvolvimento de tecnologias para a produção e exploração comercial da cultura.

No presente trabalho, objetivou-se desenvolver um simplificado e eficiente protocolo para a criopreservação, a partir da dessecação e conservação de sementes de *Dendrocalamus asper* em temperaturas ultra baixas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

As sementes usadas neste experimento foram gentilmente cedidas pelo Instituto Jatobás. O lote utilizado foi coletado a partir de touceiras adultas de plantas matrizes de *Dendrocalamus asper* que floresceram em outubro de 2015 no município de Pardinho – SP.

Antes do início dos experimentos, a cariopse que recobre a semente foi removida manualmente, o que possibilitou, num primeiro momento, o descarte de sementes chochas e/ou malformadas.

### 2.2 Curva de dessecação

Para a dessecação, as sementes foram acondicionadas em dessecador contendo sílica gel pelo período de 0, 24, 48, 96 e 144 horas. O teor de umidade (TU) das sementes foi determinado após cada período de dessecação, por meio de teste de estufa a 105 °C por 24 horas. A percentagem de umidade das sementes foi calculada com base no peso úmido, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$TU (\%) = \frac{100 (P - p)}{P - t}$$

Onde,

P = peso inicial da semente após 0, 24, 48, 96 e 144 horas em dessecador

p = peso final da semente, após 24 horas em estufa

t = peso da placa de alumínio

### 2.3 Criopreservação de sementes

Após cada período de dessecação em sílica gel (0, 24, 48, 96 e 144 horas), uma parte das sementes foi colocada para germinar e outra parte foi imersa em nitrogênio líquido (-196°C) (+NL). Para tanto, em câmara de fluxo laminar, as sementes dos tratamentos controles (-NL) foram desinfestadas por imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto, 5 minutos em HgCl<sub>2</sub> (0,1%) e lavagem por três vezes em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de germinação. O meio de germinação das sementes foi constituído pelos sais de MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 2% de sacarose e gelificado com 2,3g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO). O meio teve o pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem à 121 °C e 1,1 atm de pressão, durante 20 minutos.

Para as sementes criopreservadas, após cada tempo de dessecação, estas foram transferidas imediatamente para criotubos estéreis (capacidade para 2 mL), os quais foram acondicionados em tubos de alumínio (canister) e imersos diretamente em +NL por 48 horas.

Para o descongelamento, os canisteres foram retirados do +NL e os criotubos com as sementes criopreservadas foram mergulhados em banho-maria a 40 °C por 90 segundos (descongelamento rápido). Em seguida, as sementes foram retiradas dos criotubos, desinfestadas e inoculadas em meio de germinação, nas mesmas condições das sementes dos tratamentos controle.

Os tubos de ensaio contendo as sementes foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2$  °C, luminosidade de  $52 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

Os aspectos morfológicos da germinação *in vitro* de sementes e desenvolvimento de plântulas de bambu foram caracterizados semanalmente, por um período de até 4 semanas. O critério utilizado neste estudo para determinar a germinação foi a protrusão da radícula.

#### 2.4 Coleta de dados e análise estatística

Os experimentos foram planejados seguindo delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $7\times 2$ , sete períodos de dessecação por dois métodos de conservação (+NL e -NL), totalizando 14 tratamentos. Cada tratamento foi formado por três repetições constituídas por 10 sementes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os dados de percentagem de germinação foram previamente transformados segundo arco-seno  $(x/100)^{1/2}$ . A curva de dessecação foi construída por meio de regressão polinomial. Os dados da ANOVA e de regressão foram feitos com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (Ferreira 2011).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dessecação de sementes de bambu permitiu a redução de forma gradativa e constante do teor de umidade, com diferença de 5,6% entre tempo inicial e o tempo final de dessecação (Figura 1A). A redução da umidade das sementes não afetou a viabilidade, visto ter sido observado 50% de germinabilidade no tempo inicial e a mesma germinabilidade após 144 horas, nas sementes do tratamento controle (-NL) (Figura 1B). Da mesma maneira, a viabilidade das sementes criopreservadas (+NL) também não foi alterada, com uma redução de 50% no tempo inicial para 44% após 144 horas, mas sem diferença significativa entre os resultados.

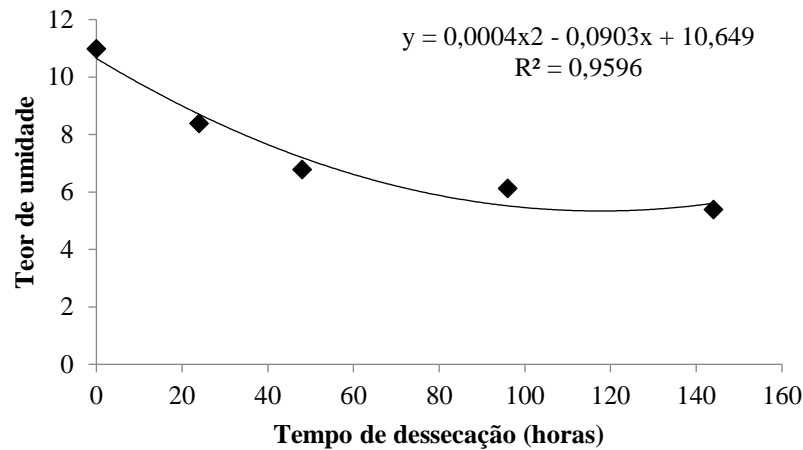
O início da germinação, considerado a partir da protusão radícula seguida da plúmula foi observado a partir do sétimo dia de cultivo. Com 14 dias, havia plantas com sistema radicular e parte aérea formadas, independentemente de as sementes serem do tratamento controle ou criopreservadas.

De acordo com Thapliyal et al. (1991) sementes de *Bambusa tulda* mantém a viabilidade por um período curto se conservadas em condições não controladas. Mas, se armazenadas após a secagem e em condições controladas como baixas temperaturas, podem ser mantidas por longos períodos. Rawat e Thapliyal (2003), com base em uma equação de viabilidade, demonstraram o comportamento ortodoxo de sementes de *Dendrocalamus membranaceus*, já que espera-se que as sementes desta espécie possam ser armazenadas por cerca de 45 anos a 5% de umidade e temperatura de -18 °C.

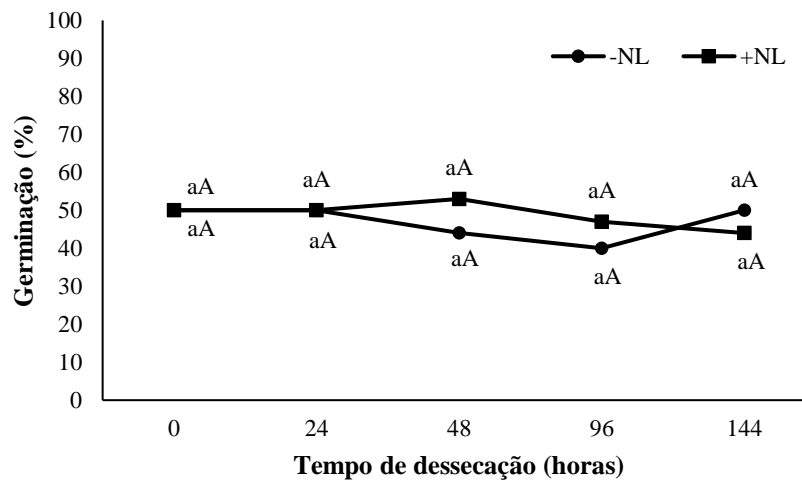
Rawat e Thapliyal (2003) descreveram o comportamento ortodoxo para sementes de *Dendrocalamus membranaceus* ao reduzirem o teor de umidade e armazenamento para 5°C. Ndiaye et al. (2015) relataram a viabilidade de sementes de *Oxytenanthera abyssinica* por 8 anos, quando conservadas a 4 °C, assim como descrito por Lakshimi et al. (2014) para sementes de *Dendrocalamus brandissi*, que podem ser conservadas por até 36 meses a 4 °C.

Neste trabalho, as sementes de *Dendrocalamus asper* ao manterem a viabilidade após a dessecação (cerca de 5,0% de umidade) e tolerarem a temperatura ultra baixa do nitrogênio líquido, demonstram se encaixar no conceito de sementes ortodoxas, ou seja, tolerantes à dessecação e a baixas temperaturas, sugerindo suportarem longos períodos de armazenamento nestas condições.

Existem alguns relatos na literatura sobre a utilização de temperaturas criogênicas para conservação de sementes de *Astronium urundeuva* e *Schinopsis brasiliensis* (Gonzaga et al., 2003), *Elaies guineensis* (Camillo et al., 2009), *Jatropha curcas* (Goldfarb et al., 2010), *Encholirium spectabile* (Ferrari et al., 2016), bem como de embriões zigóticos de *Acrocomia*



A



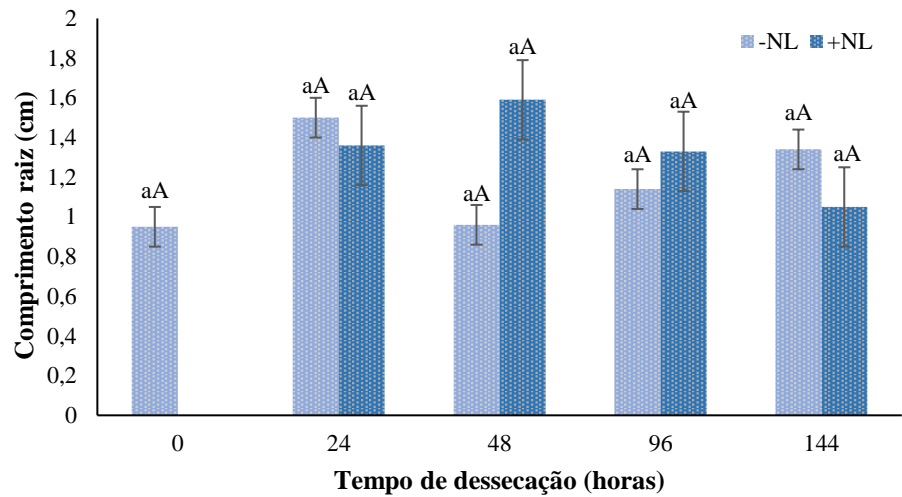
B

**Figura 1.** Teor de umidade e germinação (%) de sementes de *Dendrocalamus asper* submetidas à dessecação. A: Teor de umidade em função do período de dessecação por até 144 horas. B: Germinação (%) de sementes desseccadas por até 144 horas. Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo segundo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

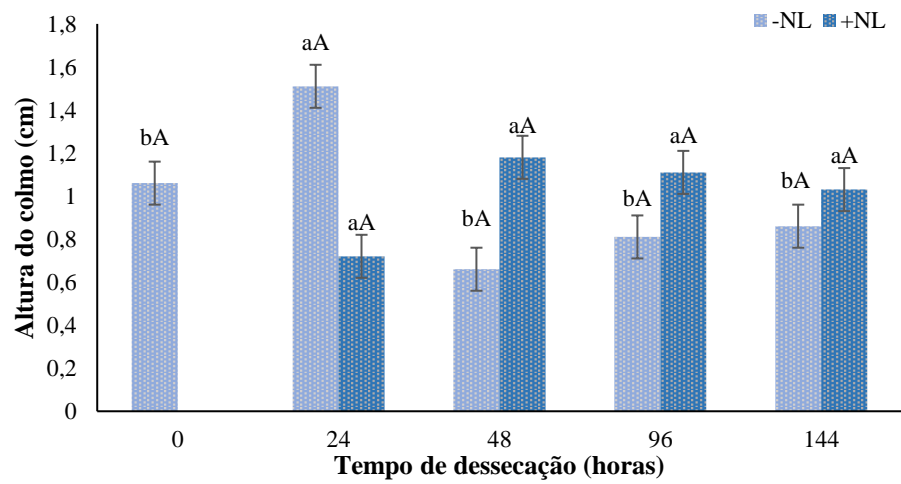
*aculeata* (Luis; Scherwinski-Pereria, 2017). Em gramíneas, existem relatos da criopreservação para sementes e embriões de *Zea mays* (Sudarmonowati et al., 2001; Usman; Abdulmalik, 2010), suspensão de células de embriogênicas de *Oryza sativa* (Huang et al., 1995) e ápices caulinares de *Saccharum* sp. (Nogueira et al., 2013). No entanto, não foram encontrados registros da utilização de criopreservação para conservação de sementes de bambus, o que reforça a importância deste estudo.

De acordo com a avaliação do desenvolvimento pós-seminal das plantas, verificaram-se diferenças significativas nas sementes do tratamento controle durante o desenvolvimento do colmo e do número de folhas, quando as sementes foram desseccadas por 24 horas (Figura 2B-C). Quando as sementes foram desseccadas por até 144 horas não foram observadas diferenças para desenvolvimento das raízes, colmo e número de folhas em plantas obtidas de sementes

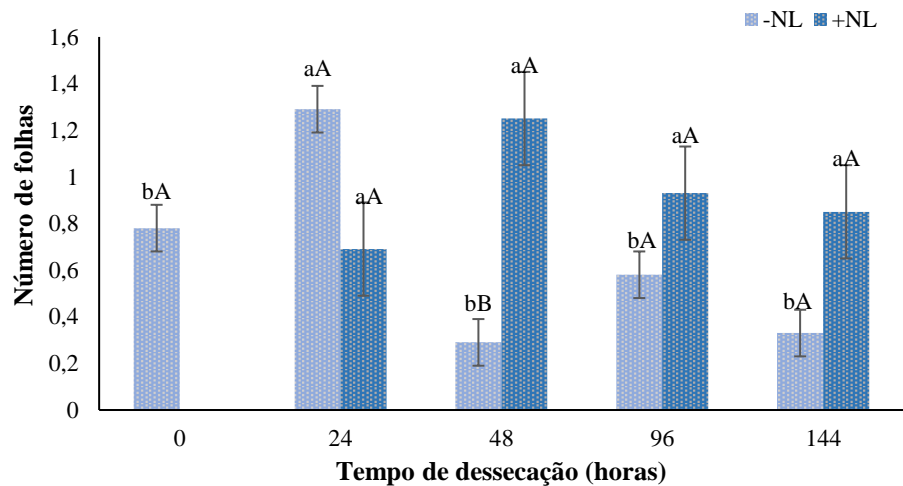




A



B



C

**Figura 2.** Desenvolvimento pós-seminal de plantas de *Dendrocalamus asper* após a criopreservação de sementes (+NL) ou não (-NL) em função do tempo de dessecação A: Comprimento da raiz. B: Altura do colmo. C: Número de folhas. Letras minúsculas iguais entre os tratamentos criopreservados (+NL) e não-criopreservados (-NL), dentro de cada tempo de dessecação e maiúsculas entre os tempos de dessecação, dentro de cada tratamento (+NL ou -NL) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

criopreservadas (Figuras 2A, B e C). De forma geral, plantas obtidas de sementes do tratamento controle (-NL) e da criopreservação (+NL) apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento das raízes, dos colmos e do número de folhas. A criopreservação das sementes não influenciou o desenvolvimento pós-seminal das plantas de *Dendrocalamus asper*.

De acordo com Maxwell e Johnson (2000) danos permanentes podem ocorrer em consequência do estresse sofrido pelas células e tecidos do material vegetal imerso em +NL reduzindo assim, o vigor das plantas. No entanto, no presente estudo, as plantas obtidas de sementes criopreservadas parecem não ter sofrido danos nos tecidos das sementes. Uma vez que permitiram o desenvolvimento pós-seminal de plantas normais e inteiras. Luis e Scherwinski-Pereira (2017), também relataram boa regeneração de plantas, após a conservação de embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata* submetidos a temperaturas criogênicas. Prada et al. (2015) relataram que o desenvolvimento e o comprimento da planta foram significativamente menores quando os embriões de *Jatropha curcas* não foram desidratados antes da exposição ao NL. Estes estudos elucidam a importância da redução do teor de umidade dos explantes a serem criopreservados, antes da exposição as temperaturas ultra baixas do NL.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo indicam, de forma pioneira, um possível comportamento ortodoxo das sementes de *Dendrocalamus asper*, que toleraram a dessecação até cerca de 5% de umidade, além de suportarem as temperaturas ultrabaixas do nitrogênio líquido.

O desenvolvimento pós-seminal produziu plantas bem formadas com raízes, colmos e folhas bem desenvolvidos, independente das sementes terem sido criopreservadas (+NL) ou não (-NL).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANERJEE, M.; GANTAIT, S.; PRAMANIK, B. R. A two step method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. **Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology**, Vol. 17, n. 4, p. 387–93, out. 2011.

CAMILLO, J.; GOMES, Z.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Vol. 44, n. 2, p. 211–215, 2009.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, Vol. 23, n. 1, p. 27–33, 2010.

GOMES LUIS, ZANDERLUCE SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A simple and efficient protocol for the cryopreservation of zygotic embryos of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD. ex MART.], a tropical species with a capacity for biofuel production. **CryoLetters**, Vol. 38, n. 1, p. 7–16, 2017.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Vol.35, n.6, p.1039-1042. 2011.

FERRARI, E.A.P.; COLOMBO, R.C.; FARIA, R.T.; TAKANE, R.J. Cryopreservation of seeds of *Enchlorium spectabile* Martius ex Schultes f. by vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**, Vol. 47, n.1, p. 172-177, 2016.

GONZAGA, T. W. C. et al. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Vol. 5, n. 2, p. 145–154, 2003.

HAMILTON, K. N. et al. A comparative study of seed morphology in relation to desiccation tolerance and other physiological responses in 71 Eastern Australian rainforest species. **Plant Species Biology**, Vol. 28, n. 1, p. 51–62, 2013.

HUANG, C.N.; WANG, J.H.; YAN, Q.S.; ZHANG, X.Q.; YAN, Q.F. Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Reports**, Vol. 14, p. 730-734, 1995.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

NOGUEIRA, G.F.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Survival of sugarcane

shoot tips after cryopreservation by droplet-vitrification. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Vol. 48, n. 11, p. 1524-1527, 2013.

PRADA, J. A. et al. Cryopreservation of Seeds and Embryos of *Jatropha curcas* L. **American Journal of Plant Sciences**, Vol. 6, n. January, p. 172–180, 2015.

RAWAT, M. M. S.; THAPLIYAL, R. C. Storage behaviour of bamboo (*Dendrocalamus membranaceus*) seeds. **Seed Science and Technology**, Vol. 31, p. 397–403, 2003.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 60–65, 2001.

SINGH, S. R. et al. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* {Schult. & Schult. F.} Backer ex k. Heyne): an exotic edible bamboo. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 21, n. 2, p. 220–228, 13 dez. 2012.

SINGH, S. R. et al. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo—a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Vol. 19, n. 1, p. 21–41, 2013.

SUDARMONOWATI, E.; FITRYATMI, I.; SADJAD, S. Cryopreservation of tru-seed and embryo of maize and soybean for long-term storage. **Indian Journal of Agricultural Science**, Vol. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.

THAPLIYAL, R. C.; SOOD, O. P.; RAWAT, M. M. S. Effect of moisture content and storage temperature on the viability of *Bambusa tulda* seed. **International Tree Crops Journal**, Vol. 7, p. 67–75, 1991.

USMAN, I.S.; ABDULMALIK, M.M. Cryopreservation of embryonic axes of maize (*Zea mays* L.) by vitrification protocol. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 9, n. 52, p. 8955-8957, 2010.

WANG, W.; FRANKLIN, S. B.; CIRTAIN, M. C. Seed germination and seedling growth in the arrow bamboo *Fargesia qinlingensis*. **Ecological Research**, Vol. 22, p. 467–474, 15 set. 2007.

WETZEL, M. M. V. S.; REIS, R. B.; RAMOS, K. M. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular Técnica, 26**: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 5, 2003.

### **CAPÍTULO III**

#### **CONSERVAÇÃO *EX SITU* E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE BAMBU [*Dendrocalamus asper* (Sult. & Sult. f.) Backer ex K. Heyne]**

## RESUMO

*Dendrocalamus asper* é uma espécie de bambu lenhoso nativa da Ásia e introduzida no Brasil. A espécie possui floração monocárpica com ciclos longos de florescimento e produção irregular de sementes, as quais perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas em condições inadequadas. Tradicionalmente, a conservação da diversidade genética tem sido feita por meio de sementes. Mas para que isso possa ser feito, o comportamento das sementes deve ser conhecido para que seja definida a melhor estratégia de conservação. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar o comportamento e as condições de armazenamento a médio-longo prazo, além de avaliar o comportamento de metabólitos primários ao longo do armazenamento. Para tanto, sementes com teor de umidade de 11%, acondicionadas em embalagens aluminizadas, foram conservadas sob temperaturas de 25 (controle), 6, -20 e -196 °C por 0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias. Após cada período de armazenamento, as sementes foram desinfestadas e inoculadas em tubos de ensaio com meio de MS para germinação e posterior aclimatização das plantas. Adicionalmente, nos períodos de armazenamento de 0, 360 e 600 dias, amostras de sementes foram coletadas para realização de análises bioquímicas, onde quantificou-se amido, proteínas e lipídeos. Verificou-se que sementes de *D. asper* mantem sua viabilidade por até 600 dias quando conservadas nas temperaturas de -20 °C e -196 °C, produzindo plantas normais e inteiras após o desenvolvimento pós-seminal. Já à 6 °C as sementes podem ser mantidas somente por até 360 dias. Na temperatura de 25 °C ocorre decréscimo da viabilidade aos 360 dias e redução acentuada na germinação aos 600 dias, além de ocorrer o desenvolvimento anormal de plantas. Quanto a aclimatização, observou-se que plantas que possuem raízes e parte aérea bem formadas apresentam alto índice de sobrevivência ao final do processo. A análise da composição bioquímica das sementes registrou como principal metabólito primário o amido, seguido por proteínas e, em menores quantidades, os lipídios. Neste trabalho também foi observada a presença de ácidos graxos como o ácido linoleico, palmítico e palmitoleico, em maiores quantidades que os demais, na composição das sementes conservadas.

**Palavras-chave:** Poaceae, bambu, armazenamento de sementes, temperatura, metabolismo primário

## ABSTRACT

*Dendrocalamus asper* is a woody bamboo native of Asia and introduced in Brazil. The species has monocarpic flowering with long cycles of flowering and irregular seed production, which lose viability quickly when stored under inadequate conditions. Traditionally, conservation of genetic resources has been done through seeds. However, for this to be done, seed behavior must be known to define the best conservation strategy. The objective of this work was to characterize the medium-long term storage behavior of seeds, as well as to evaluate the primary metabolites behavior along storage. For this, seeds were conditioned in aluminized packages with a moisture content of 11% and stored under temperatures of 25 (control), 6, -20 and -196 °C for 0, 30, 90, 180, 360 and 600 days. After each storage period, the seeds were disinfested and inoculated in test tubes with MS medium for germination and subsequent plant acclimatization. Additionally, in the storage periods of 0, 360 and 600 days, seed samples were collected for biochemical analysis, where starch, proteins and lipids were quantified. It was verified that *D. asper* seeds maintain the viability for up to 600 days when stored at -20 °C and -196 °C with production of normal and whole plants after post-seminal development. Already at 6 °C the seeds can be maintained only for up to 360 days. At 25 °C seed viability decreased at 360 days and at 600 days there is a marked reduction in germination, in addition to abnormal plant development. In the acclimatization, it was observed that when plants have well-formed roots and aerial part, a high survival rate occurs at the end of the process. The biochemical composition analysis of the seeds registered as the main primary metabolite the starch, followed by proteins and, in smaller amounts, lipids. In this work, fatty acids, such as linoleic, palmitic and palmitoleic acids, were also observed in larger quantities than others, in the composition of the conserved seeds.

**Keywords:** Poaceae, bamboo, seed storage, temperature, primary metabolism



## 1. INTRODUÇÃO

*Dendrocalamus asper* ({Schult. & Schult.f.} Backer ex K. Heyne) se destaca pela excelente qualidade e resistência de sua madeira. É uma espécie asiática, nativa da China (Singh et al., 2013; Kumar; Banerjee, 2014), introduzida e cultivada em vários países tropicais (Ciaramello; Azzini, 1971; Montiel; Sanchez, 2006), inclusive o Brasil (Filgueiras; Santos-Gonçalves, 2004). Assim como a maioria de bambus lenhosos, possui floração monocárpica com ciclos que podem atingir 100 anos e produção irregular de sementes, seguida pela morte generalizada dos colmos (McClure, 1996; Arya et al., 1999).

Diante disso, compreende-se que a irregularidade na produção de sementes, dificulta estudos de viabilidade, germinabilidade e armazenamento (Bahru et al., 2015). E, uma vez que as sementes de bambu perdem a viabilidade em um curto período de tempo, a conservação destas é influenciada pelo período de tempo e condições de armazenamento como: a umidade relativa que rege o teor de umidade e a temperatura que influenciam a taxa metabólica das sementes (Singh et al., 2017).

A conservação da diversidade genética de plantas por meio do uso de sementes tem sido considerada uma das mais eficientes formas de conservação (Engels; Engelman, 1998; Bonner, 2008; Jain, 2011). No entanto, é essencial que se conheça o comportamento das sementes da espécie a ser trabalhada, para que possam ser determinadas as estratégias e condições de armazenamento mais adequada para a conservação da sua qualidade fisiológica (Hong; Ellis, 1996; Bonner, 2008; Costa, 2009).

De maneira geral, observações do comportamento das sementes durante o armazenamento sugeriram que a composição química é um fator importante na longevidade, viabilidade e vigor (Richa et al., 2006; Bonner, 2008; Singh et al., 2016). Além de afetar uma ampla gama de mudanças, deterioração e degradação de reservas presentes nas sementes (Richa et al., 2006; Bonner, 2008; Thapliyal et al., 2015). Como por exemplo, ocorre com sementes oleaginosas que não toleram tanto o armazenamento quanto as sementes amiláceas, com algumas exceções (Bonner, 2008). Ainda de acordo com estes autores, não há um consenso sobre a composição química ser um fator crítico na longevidade das sementes sob condições de armazenamento. No entanto, há evidências que sugerem que concentrações relativas de carboidratos específicos, desempenham papel fundamental na tolerância a dessecação de sementes durante o armazenamento (Lin e Huang, 1994).

Com relação a fisiologia das sementes durante o armazenamento Roberts (1973) dividiu as sementes em dois grupos: ortodoxo e recalcitrante. Sementes ortodoxas são aquelas que podem ser secas para um teor de umidade de 10% ou menos e podem ser armazenadas com

sucesso em temperaturas de sub-congelamento. As sementes recalcitrantes, por outro lado, são aquelas que não toleram a dessecação e, portanto, não podem ser armazenadas em temperaturas de congelamento (Roberts, 1973). Estas sementes não sobrevivem quando submetidas às mesmas condições usadas para armazenar sementes ortodoxas (Walters et al., 2013). Além destes dois grupos Ellis et al (1990) sugeriram um terceiro, o grupo de sementes intermediárias. Este grupo de sementes, normalmente perde a viabilidade mais rapidamente em temperaturas baixas (Hong; Ellis, 1996).

Apesar dos inúmeros relatos na literatura sobre conservação de sementes, a grande maioria deles se limita a identificar o comportamento e as condições de armazenamento, sendo poucos os que buscam elucidar aspectos bioquímico e morfológicos da germinação. Adicionalmente, estudos sobre a longevidade de sementes para conservação de bambu após a floração gregária, são praticamente inexistentes (Singh et al., 2017).

Entre os trabalhos disponíveis para diferentes espécies de bambu, há relatos de rápida perda de viabilidade e vigor das sementes de bambu quando conservadas sob temperatura ambiente ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ) como descrito por Singh et al. (2016a) para *Dendrocalamus strictus*, *Dendrocalamus hamiltonii* e *Bambusa bambos*. Singh et al. (2016b) relataram a redução de taxas de germinação em sementes recém-colhidas de *Dendrocalamus hamiltonii* de 80% para 0% após 12 meses de conservação. Bahru et al. (2015) relataram que o vigor e a viabilidade das sementes de *Arundinarua alpina* diminuem gradualmente com o aumento do tempo de armazenamento. Em contrapartida, Ayana et al. (2012) descreveram que sementes de *Oxytenanthera abyssinica*, armazenadas em recipientes herméticos, conservam sua viabilidade por até 2 anos.

Dessa forma, observa-se a importância de estudos relacionados a conservação *ex situ* de sementes de bambu das mais variadas espécies, quando houver a disponibilidade de sementes para tanto. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi caracterizar o comportamento e as condições de armazenamento a médio-longo prazo de sementes de *Dendrocalamus asper*, além de avaliar o comportamento do metabolismo primário das sementes durante o armazenamento e, assim, inferir sobre o comportamento fisiológico das sementes desta espécie durante a conservação *ex situ*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram executados no Laboratório de Cultura de Tecidos II e anexos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF.

### 2.1. *Material vegetal*

As sementes de *Dendrocalamus asper* utilizadas para execução dos experimentos foram gentilmente cedidas pelo Instituto Jatobás. O lote utilizado foi coletado a partir de touceiras adultas de plantas matrizes que floresceram em outubro de 2015, em Pardinho/SP. Antes do início dos experimentos, realizou-se a remoção manual das cariopses que recobriam as sementes, permitindo assim, a seleção e o descarte das sementes chochas e/ou malformadas.

### 2.2. *Determinação de protocolo para a conservação ex situ de sementes*

#### 2.2.1. *Determinação da umidade*

O teor de umidade das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas (Brasil, 2009). O teor de umidade das sementes foi calculada com base no peso úmido, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$TU (\%) = \frac{100 (P - p)}{P - t}$$

Onde,

P = peso inicial da semente após o período de dessecação

p = peso final da semente, após secagem em estufa e;

t = peso do recipiente utilizado para a pesagem.

Na obtenção do teor de umidade utilizou-se 4 repetições de 25 sementes, cada.

#### 2.2.2. *Conservação ex situ das sementes a médio-longo prazo*

Para a conservação *ex situ*, sementes foram armazenadas com a umidade inicial de 11%, em tubos do tipo eppendorf de 1,8 mL e estes, por sua vez, acondicionados em embalagens aluminizadas trifoliadas, lacradas em seladora elétrica e armazenadas sob as temperaturas de 25 (controle), 6, -20 e -196 °C. Na temperatura de -196 °C, as sementes foram acondicionadas em criotubos e colocadas em embalagens aluminizadas, que foram acondicionadas em tubos cilíndricos de alumínio (canisteres) e colocadas em botijões contendo nitrogênio líquido (+NL). As sementes permaneceram armazenadas por períodos de 0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias.

Após cada período de armazenamento, os envelopes com as sementes foram retirados das respectivas temperaturas de conservação. As sementes conservadas nas temperaturas de -20 e -196 °C foram descongeladas em banho-maria a 40 °C por 2 minutos, ao final de cada

período de conservação. Em seguida, foram desinfestadas por imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto e imersas por 5 minutos em HgCl<sub>2</sub> 0,1%. Posteriormente, as sementes foram enxaguadas por três vezes em água destilada e autoclavada. Logo após, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo meio de cultura de MS (Murashige; Skoog, 1962), onde o pH do meio foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a 121 °C a 1,5 atm por 20 minutos. Os materiais foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, luminosidade de  $52 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

A viabilidade da conservação das sementes, após cada período de armazenamento em diferentes temperaturas, foi verificada por meio da germinação *in vitro*, após 30 dias de cultivo. O critério utilizado para constatar a germinação foi a emissão da radícula. O desenvolvimento das plantas foi avaliado por meio da análise da altura do colmo, número de raízes, comprimento de raízes e número de folhas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x6 com quatro temperaturas de conservação e seis períodos de armazenamento, totalizando 24 tratamentos. Cada tratamento foi constituído por 4 repetições, cada qual composto por 25 sementes.

### 2.2.3 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011). Os dados referentes à percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno  $(x/100)^{1/2}$ .

### 2.3 Aclimatização

Após o desenvolvimento pós-seminal, as plantas que apresentavam raízes e parte aérea bem desenvolvidas foram transferidas para substrato para a etapa de aclimatização, iniciando-se com a retirada do plástico filme que vedam as tampas dos tubos, 24 horas antes da retirada das plantas dos tubos de ensaio. Em seguida, as plantas foram retiradas do meio cultivo e as raízes lavadas para remoção de resíduos de meio, sendo transplantadas para copos plásticos com capacidade de 300 mL, contendo substrato comercial Bioplant® e mantidas em câmara de crescimento à  $25 \pm 1$  °C por 30 dias. Para a formação de um ambiente com alta umidade e melhor adaptação das plantas a este ambiente, os recipientes plásticos contendo o substrato foram cobertos com um saco plástico de polietileno (15,5x21 cm). Durante a aclimatização, foram feitas aberturas nos sacos plásticos que recobriam as plantas aos sete e 14 dias de aclimatização.

Aos 21 dias os sacos plásticos foram removidos, deixando as plantas em contato direto com o ambiente externo até completar os 30 dias de aclimatização.

A sobrevivência das plantas foi avaliada após 30 dias de aclimatização, além de parâmetros morfológicos como número de colmos, comprimento de colmos (cm) e número de folhas.

#### 2.4 Análises bioquímicas de sementes

Sementes de *Dendrocalamus asper* foram coletadas durante a avaliação da conservação assim que o experimento foi montado (tempo zero), 360 e 600 dias de conservação em quatro temperaturas (25, 6, -20 e -196°C). Inicialmente, o material fresco foi pesado, congelado em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado por 72 horas. Após a liofilização, as amostras foram pesadas novamente para obter a massa seca. O experimento foi montado de modo inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento sendo cada repetição formada por 10 sementes.

Para a quantificação de açúcares solúveis totais, amostras contendo 10 mg de material vegetal foram extraídos em 4 ciclos de extração com etanol 80%. A dosagem foi feita pelo método fenol-sulfúrico e quantificação colorimétrica (Dubois et al., 1956). O espectrômetro utilizado foi o Shimadzu UV-1800, com leitura da absorbância em 490 nm, com a curva padrão de glicose. O amido restante da extração de AST foi solubilizado e extraído pelo método enzimático de Amaral et al. (2007). As enzimas  $\alpha$ amilase e amiloglicosidase (Megazyme) foram utilizadas em 2 ciclos e a dosagem foi feita com adição de GODPOD, utilizando método colorimétrico em equipamento Spectra Max 190 (Molecular Devices) e analisadas com ajuda do programa Soft Max v. 6.1.

As proteínas foram quantificadas utilizando o método Bradford (1976), onde 10 mg de amostra foi diluída em tampão PBS (Phosphate Buffer Saline – pH 7,4) em eppendorf de 1,5 mL, e mantidas em geladeira “over-nigth”. A dosagem de proteína foi realizada utilizando método colorimétrico em equipamento Spectra Max 190 (Molecular Devices) e analisadas com ajuda do programa Soft Max v. 6.1.

Os lipídios foram quantificados e classificados utilizando a técnica de derivatização *in situ* em GC-MS, utilizando 10 mg da massa seca adicionado a 0,2 mL de metanol/clorofórmio (1:2 v/v), 0,3 mL de HCl à 5%, aquecidos a 85 °C por 1 hora, seguido pela adição de 1 mL de hexano e mais 60 minutos de leve agitação. Posteriormente a fase não-polar (superior) foi retirada e analisada (Laurens et al., 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Determinação de protocolo para a conservação *ex situ* de sementes

##### 3.1.1. Determinação da umidade

O método de secagem de sementes em estufa possibilitou verificar que o lote de sementes que foi conservado em diferentes temperaturas estava com umidade em torno de 11%. Segundo Bonner (2008) as taxas metabólicas das sementes durante o armazenamento, podem ser minimizadas de acordo com o teor de umidade, que determina como baixas temperaturas podem ser definidas. Para armazenamento em temperaturas de -15 °C o limite de umidade deve ser de 20% de umidade; abaixo de -15 °C o limite deve ser de 15%; e em armazenamento criogênico em nitrogênio líquido (-196 °C) o limite de umidade deve ser de 13%.

Durante o armazenamento sementes de *Bambusa tulda* Thapliyal et al. (1991), observaram que sementes com umidade de 10,2% e 6,6% apresentaram 57 e 70% de germinação, respectivamente, mesmo depois de um período de 12 meses. Em contrapartida, quando as sementes foram armazenadas com umidade superior a 14%, estes mesmos autores observaram reduções drásticas da germinação e até mesmo degradação das sementes.

##### 3.1.2 Conservação *ex situ* das sementes a médio-longo prazo

De maneira geral, sementes de *D. asper* armazenadas nas temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C apresentaram diferenças significativas na percentagem de germinação a partir dos 360 dias de armazenamento (Figura 1). Quando as sementes foram armazenadas a 25 °C a germinação permaneceu constante até os 180 dias. A partir disso observou-se decréscimo significativo da percentagem de germinação até os 600 dias (14%), diferindo dos demais períodos de armazenamento.

Quando as sementes foram armazenadas a 6 °C, a germinação se manteve constante até os 360 dias de conservação. No entanto, aos 600 dias de armazenamento a germinação reduziu consideravelmente, chegando a 33% e diferindo dos demais períodos de armazenamento dentro desta temperatura. As percentagens de germinação observadas para as sementes conservadas a -20 °C, sofreram uma ampla variação ao longo dos períodos de armazenamento. Onde apresentaram as maiores percentagens de germinação aos 30 (65%) e aos 180 dias (61%) em comparação com os demais períodos de armazenamento, reduzindo a 38% aos 600 dias de armazenamento. No entanto, a percentagem de germinação aos 600 dias de conservação (38%) foi estatisticamente igual a percentagem de germinação no tempo zero (50%) e ao 90 dias de conservação (42%). A heterogeneidade observada no lote de sementes durante os experimentos

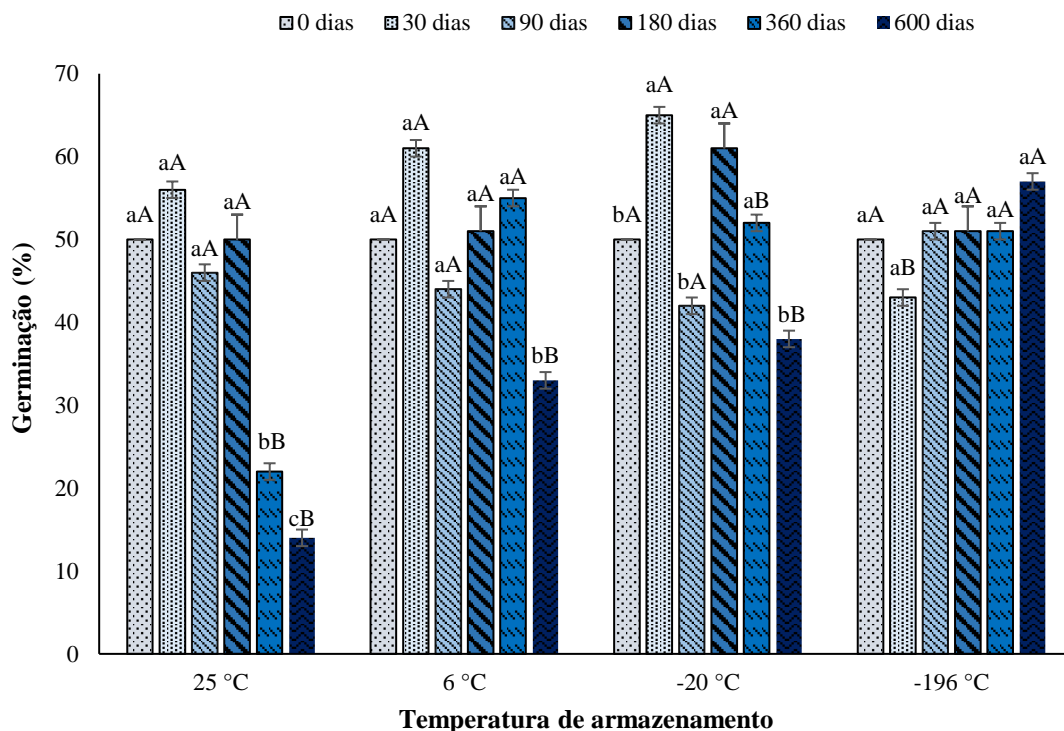
de germinação (Cap I), pode ter influenciado a variação da porcentagem de germinação observada ao longo dos períodos de armazenamento na temperatura de -20 °C. Isso por que, não se conhecia a viabilidade das sementes no momento do direcionamento das mesmas para cada tratamento.

Enquanto a porcentagem de germinação foi variável ao longo do tempo nas temperaturas de 25, 6 e -20 °C, inclusive com redução desta porcentagem ao final do tempo de avaliação de 60 dias, as sementes armazenadas na temperatura de -196 °C (+NL) apresentaram germinação constante ao longo dos seis períodos de armazenamento.

Dessa forma, apesar da oscilação da porcentagem de germinação das sementes conservadas na temperatura de -20 °C ao longo dos períodos de armazenamento, as sementes ainda mantiveram boa porcentagem de germinação aos 600 dias de conservação, e se mantiveram completamente viáveis na temperatura de -196 °C. Este fato, sugere que as sementes possuem comportamento descrito para sementes ortodoxas, uma vez que toleram a dessecação a cerca de 5% (Cap II) e toleram o armazenamento a baixas temperaturas (6 °C), temperaturas de sub-congelamento (-20 °C) e temperaturas criogênicas (-196 °C) pelo menos até 600 dias de conservação, nesta última temperatura.

De acordo com Bonner (2008) se o período de armazenamento pretendido for de 3 anos ou menos, temperaturas de 0 a 5 °C são suficientes. Para longos períodos de armazenamento devem ser utilizadas temperaturas de -18 a -20 °C. Enquanto para programas de conservação de germoplasma a longo prazo, sementes ortodoxas podem ser secas para um teor de umidade de 5 a 10% e armazenadas em nitrogênio líquido. Engelmann (2004) descreve que temperaturas de armazenamento ultra baixas proporcionam uma redução drástica do metabolismo celular, mantendo intacto o material biológico conservado e assegurando-lhe alta estabilidade genética e fisiológica ao longo do armazenamento.

Até o momento, não há relatos na literatura sobre a tolerância de sementes de bambu a dessecação a níveis baixos de umidade e conservadas a baixas temperaturas por longos períodos de armazenamento. Bahru et al. (2015) relatam o armazenamento de sementes de bambu da espécie *Arundinaria alpina* por até 360 dias em temperatura de 21/22 °C, observando redução da germinação ao longo do tempo a qual variou de 73% para 30% aos 360 dias. Ayana et al. (2012) armazenaram sementes de *Oxytenanthera abyssinica* por até 24 meses e também relataram redução na germinação ao longo do período de armazenamento. Esses dados corroboram com os obtidos neste trabalho, uma vez que sementes armazenadas a 25 °C apresentaram redução da germinação após 600 dias de armazenamento.



**Figura 1.** Influência do período de armazenamento (0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias) e diferentes temperaturas (25, 6, -20 e -196 °C) na germinação (%) de sementes de *Dendrocalamus asper* durante a conservação. Letras maiúsculas iguais entre as temperaturas, dentro de cada período de armazenamento, e minúsculas iguais entre os períodos de armazenamento, dentro de cada temperatura, pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Com relação aos parâmetros morfológicos das plantas oriundas da germinação, como altura do colmo, número e comprimento de raízes, além do número de folhas, observou-se que as plantas apresentaram desenvolvimento variável ao longo dos períodos de armazenamento, sendo estes parâmetros mais constantes na temperatura de 6 °C (Tabela 1). A altura dos colmos foi variável ao longo dos períodos de armazenamento das sementes para as quatro temperaturas estudadas, chegando a 2,2 cm aos 90 dias em 25 °C e reduzindo acentuadamente para pouco mais de 0,1 cm aos 600 dias para a mesma temperatura. Nas demais temperaturas não foi observada redução tão acentuada na altura dos colmos.

As plantas oriundas das sementes armazenadas a 6 °C apresentaram número de raízes formadas e o comprimento de raízes constantes ao longo dos períodos de armazenamento. Já para as demais temperaturas, estes parâmetros foram variáveis, alcançando média de 2,6 raízes formadas aos 90 dias em 25 °C e comprimento de raiz de 2,3 cm aos 360 dias em -196 °C. Em contrapartida, aos 600 dias de armazenamento em 25 °C o número de raízes foi igual a 1,0 (semelhante ao controle) e o comprimento das raízes foi de 0,15 cm.

A avaliação do número de folhas demonstrou a influência negativa da conservação de sementes na temperatura de 25 °C, onde a partir dos 180 dias de conservação foi possível



observar redução do número de folhas formadas nesta temperatura. Sendo que aos 600 dias de conservação, após 30 dias de desenvolvimento *in vitro* não foi observada a formação de folhas, produzindo dessa forma, plantas incompletas. Para as demais temperaturas, foi observada menor formação de folhas aos 0 e aos 90 dias de conservação. De maneira geral, a temperatura de 25 °C foi a que produziu folhas em menores quantidades, quando comparadas as demais temperaturas.

A partir da avaliação dos parâmetros morfológicos, observou-se que sementes conservadas a temperaturas ultra baixas em +NL por até 600 dias foram capazes de formar plantas completas, com raiz e parte aérea bem desenvolvidas. As sementes conservadas em 25°C, diminuíram a viabilidade e perderam a capacidade de formar plantas completas.

### 3.2 Aclimatização

A conservação de sementes nas temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C por até 600 dias, não influenciou a sobrevivência de plantas aclimatizadas por 30 dias em substrato Bioplant. A percentagem de sobrevivência variou de 80 a 100%, não havendo diferença entre os tratamentos (Tabela 2). No entanto, a conservação de sementes por 600 dias na temperatura de 25 °C não produziu plantas normais e completas. Dessa forma, não houve aclimatização de plantas oriundas desta temperatura de conservação.

Assim como para sobrevivência, os parâmetros morfológicos referentes ao número e altura de colmos não sofreram influência das temperaturas de conservação (Tabela 2). No entanto, observou-se menores números de brotos no último período de conservação para todas as temperaturas, assim como no período inicial nas temperaturas de 6, -20 e -196°C. A altura dos colmos também sofreu redução aos 600 dias de conservação, para as temperaturas de -20 e -196°C. Assim como na temperatura de -20°C no tempo zero, aos 30 e 90 dias de conservação.

Para o parâmetro número de folhas, foram observadas diferenças significativas ao longo do tempo, mas não foram observadas entre as temperaturas de armazenamento. Plantas com maior quantidade de folhas foram observadas aos 180 dias, quando se originaram de sementes armazenadas nas temperaturas de 25, 6 e -20 °C. Enquanto, na temperatura de -196 °C a produção de folhas se manteve constante ao longo dos períodos de armazenamento, com redução apenas aos 600 dias de conservação.

O sucesso da aclimatização pode estar relacionado a etapa de pré-aclimatização (Berilli et al., 2011; Patel et al., 2015). Uma vez que esta visa à antecipação de alterações morfológicas e fisiológicas que minimizem o impacto decorrente da transição para casas de vegetação, tais como aumento da densidade de fluxo luminoso, baixa umidade relativa do ambiente, variações da temperatura, dentre outros (Berilli et al., 2011; Patel et al., 2015). Neste trabalho, as plantas

**Tabela 1.** Desenvolvimento pós-seminal de plantas de *Dendrocalamus asper* após 30 dias de cultivo *in vitro* de sementes conservadas por 0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C

Temperatura de conservação	Período de Conservação (dias)						Regressão	R <sup>2</sup>
	0	30	90	180	360	600		
Altura do Colmo (cm)								
25 °C	1,1±0,4 aB	2,0±0,2 aA	2,2±0,2 aA	1,4±0,2 aB	1,4±0,3 aB	0,12±0,0 bC	y=1,5681+0,0026x	73,7**
6 °C	1,1±0,4 aA	1,9±0,2 aA	1,4±0,2 bB	1,8±0,2 aA	1,7±0,2 aA	1,6±0,2 aA	y=1,3981+0,0024x	26,6 <sup>ns</sup>
-20 °C	1,1±0,4 aB	1,7±0,2 aA	1,2±0,1 bB	2,1±0,2 aA	1,7±0,2 aA	1,2±0,1 aB	y=1,2582+0,0044x	53,9**
-196 °C	1,1±0,4 aA	1,7±0,2 aA	1,5±0,2 bB	1,6±0,2 aA	1,5±0,2 aA	1,3±0,1 aA	y=1,3798+0,0017x	25,2 <sup>ns</sup>
Número de Raízes								
25 °C	1,0±0,4 aC	1,9±0,2 aB	2,6±0,2 aA	1,3±0,1 aC	1,2±0,1 aC	1,0±0,0 bC	y=1,6625+0,0004x	23,6 <sup>ns</sup>
6 °C	1,0±0,4 aA	1,6±0,1 bA	1,6±0,1 bA	1,5±0,2 aA	1,3±0,1 aA	1,8±0,2 aA	y=1,3408+0,0003x	39,2 <sup>ns</sup>
-20 °C	1,0±0,4 aB	1,4±0,2 bB	2,0±0,2 bA	1,7±0,1 aA	1,4±0,1 aB	1,7±0,1 aA	y=1,3144+0,0022x	21,9 <sup>ns</sup>
-196 °C	1,0±0,4 aB	1,3±0,1 bB	1,9±0,1 bA	1,3±0,1 aB	1,3±0,1 aB	1,7±0,1 aA	y=1,2895+0,00005x	21,6 <sup>ns</sup>
Comprimento de Raízes (cm)								
25 °C	1,1±0,5 aA	1,6±0,2 aA	2,1±0,2 aA	1,4±0,3 aA	1,8±0,4 aA	0,15±0,0 bB	y=1,3543+0,0047x	78,1**
6 °C	1,1±0,5 aA	1,6±0,2 aA	1,4±0,3 aB	2,2±0,3 aA	2,4±0,3 aA	1,9±0,3 aA	y=1,1561+0,0068x	88,5**
-20 °C	1,1±0,5 aA	1,1±0,2 aA	1,1±0,2 aB	1,8±0,2 aA	2,3±0,3 aA	1,2±0,2 aB	y=0,9000+0,0070x	79,6*
-196 °C	1,1±0,5 aA	1,3±0,2 aA	1,4±0,2 aB	1,8±0,3 aA	2,3±0,4 aA	1,5±0,2 aA	y=1,0692+0,0062x	92,9**
Número de Folhas								
25 °C	0,8±0,4 aB	1,9±0,2 aA	2,2±0,2 aA	1,4±0,2 bB	1,0±0,3 bB	0,00±0,0 bB	y=0,9309+0,0064x	60,7*
6 °C	0,8±0,4 aB	1,9±0,2 aA	1,2±0,2 bB	1,9±0,2 aA	1,5±0,2 aA	1,6±0,2 aA	y=1,2224+0,0030x	21,2 <sup>ns</sup>
-20 °C	0,8±0,4 aB	1,4±0,1 bA	1,0±0,2 bB	2,2±0,2 aA	1,5±0,2 aA	0,8±0,2 aB	y=1,4172+0,0024x	67,7*
-196 °C	0,8±0,4 aB	1,7±0,2 aA	1,4±0,2 aB	1,6±0,2 aB	1,3±0,3 aA	1,0±0,1 aA	y=1,1810+0,0028x	37,0 <sup>ns</sup>

Os valores representam a média das repetições ± o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, entre as temperaturas e dentro de cada período de conservação e maiúscula na linha, entre os períodos de conservação e dentro de cada temperatura não diferem significativamente pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade. Coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>): \* significativo a 1% de probabilidade; \*\* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo

**Tabela 2.** Sobrevivência e desenvolvimento de plantas de *Dendrocalamus asper* aos 30 dias de aclimatização, oriundas de sementes conservadas por 0, 30, 90, 180, 360 e 600 dias sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C

Temperatura de Conservação	Período de Conservação (dias)					
	0	30	90	180	360	600
Sobrevivência						
25 °C	94,0±0,1 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	90,0±0,1 aA	90,0±0,1 aA	-
6 °C	94,0±0,1 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	90,0±0,1 aA	90,0±0,1 aA	100±0,0 aA
-20 °C	94,0±0,1 aA	93,0±0,1 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA
-196 °C	94,0±0,1 aA	93,0±0,1 aA	100±0,0 aA	80,0±0,1 aA	100±0,0 aA	90,0±0,2 aA
Número de Colmos						
25 °C	1,6±0,2 aA	1,8±0,3 aA	1,9±0,4 aA	2,1±0,2 aA	1,6±0,2 aA	-
6 °C	1,6±0,2 aB	2,0±0,1 aA	1,6±0,2 aB	2,2±0,2 aA	2,4±0,5 aA	1,0±0,0 aB
-20 °C	1,6±0,2 aB	1,7±0,1 aB	1,9±0,2 aA	2,2±0,2 aA	2,2±0,2 aA	1,0±0,0 aB
-196 °C	1,6±0,2 aB	2,1±0,2 aA	1,5±0,2 aB	2,0±0,4 aA	2,0±0,2 aA	1,0±0,0 aB
Altura do Colmo (cm)						
25 °C	6,8±0,6 aA	6,4±0,5 aA	7,1±0,8 aA	6,8±0,7 aA	5,5±0,9 aA	-
6 °C	6,8±0,6 aA	7,4±0,6 aA	6,4±0,5 aA	6,8±0,7 aA	6,6±0,9 aA	6,1±0,5 aA
-20 °C	6,8±0,6 aB	6,2±0,4 aB	6,6±0,5 aB	7,5±0,5 aA	8,1±0,9 aA	4,8±0,2 aB
-196 °C	6,8±0,6 aA	7,3±0,7 aA	7,3±0,6 aA	7,2±0,5 aA	6,0±0,8 aA	3,5±0,8 aB
Número de Folhas						
25 °C	16,4±1,7 aC	17,7±1,9 aC	20,9±2,1 aB	26,8±2,9 aA	14,1±2,0 aC	-
6 °C	16,4±1,7 aB	19,7±1,3 aB	17,1±1,3 aB	25,1±1,6 aA	20,9±3,1 aB	9,4±0,2 aC
-20 °C	16,4±1,7 aB	16,5±1,4 aB	18,3±1,7 aB	28,0±1,7 aA	17,0±2,0 aB	8,5±0,2 aC
-196 °C	16,4±1,7 aA	20,2±1,5 aA	17,3±1,3 aA	23,4±2,9 aA	18,4±2,1 aA	7,0±0,1 aB
Número de Nós						
25 °C	2,2±0,5 aB	2,7±0,8 aB	3,9±0,4 aA	5,0±0,7 aA	3,6±0,5 aA	-
6 °C	2,2±0,5 aB	3,3±0,3 aB	3,3±0,3 aB	5,1±0,3 aA	4,9±0,8 aA	4,2±0,2 aA
-20 °C	2,2±0,5 aB	2,5±0,3 aB	4,0±0,5 aA	4,6±0,6 aA	5,3±0,7 aA	3,5±0,2 aC
-196 °C	2,2±0,5 aB	3,5±0,4 aA	4,1±0,6 aA	4,5±0,4 aA	4,8±0,4 aA	3,0±0,1 aB

Os valores representam a média das repetições  $\pm$  o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, entre as temperaturas e dentro de cada período de conservação e maiúscula na linha, entre os períodos de conservação e dentro de cada temperatura não diferem significativamente pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade. Coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>): \* significativo a 1% de probabilidade; \*\* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo.

foram sendo colocadas em contato com o meio externo, gradativamente, não tendo sido observadas perdas significativas ao final da etapa de aclimatização. Fato este, que pode caracterizar uma importante etapa a ser seguida durante a aclimatização de plantas de bambu, após o desenvolvimento pós-seminal de sementes cultivadas *in vitro*, principalmente, após a conservação de sementes por médio-longo prazo.



**Figura 2.** Plantas de *Dendrocalamus asper* aos 30 dias em casa de vegetação, oriundas de sementes germinadas em meio MS, após a conservação de sementes por períodos de 0, 90, 180, 360 e 600 dias sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196°C.

### 3.3 Análises bioquímicas de sementes

Entre os principais compostos de reserva em sementes de *D. asper* foi possível verificar que amidos representaram a maior percentagem de massa seca em relação aos compostos de reserva analisados no endosperma. Entretanto, aos 600 dias de conservação houve uma redução significativa na percentagem de amido nas temperaturas de 6 e -20°C (Figura 3A). Não foi observada variação significativa deste metabólito nas demais temperaturas ao longo do período de conservação.

As proteínas foram o segundo composto mais abundante no endosperma das sementes e de maneira geral, permaneceram constantes durante o período de conservação, apresentado menores concentrações no tempo zero nas temperaturas de -20°C e +NL e aos 365 em -20°C (Figura 3B).

Os lipídios foram os compostos com menor abundância no endosperma das sementes. Observou-se uma redução significativa deste composto aos 365 dias de conservação, para todas as temperaturas avaliadas. E aos 600 dias de conservação, houve diferença significativa entre as temperaturas de 25 e 6°C, com menor concentração de lipídios que as demais temperaturas.

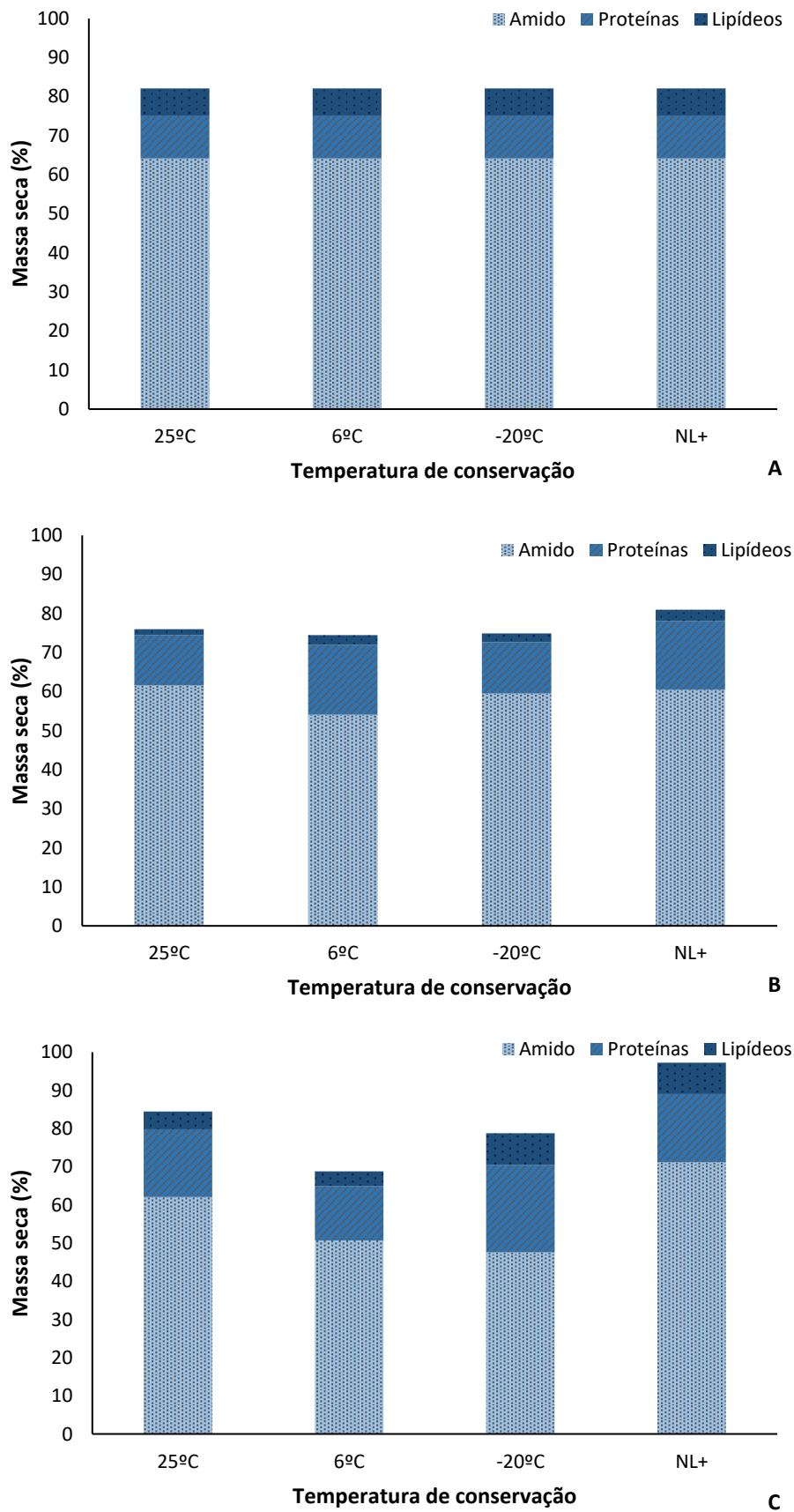
Dentre os tipos de ácidos graxos encontrados em sementes de *D. asper* durante a conservação foi possível identificar a presença do ácido palmítico, palmitoleico, oleico, linolênico, araquídico, elaídico, behênico e erúdicico (Figura 4), tendo sido observadas maiores concentrações o ácido linoleico, palmítico, palmitoleico nas sementes, antes da conservação (tempo zero) (Figura 4 A). Após 365 dias de conservação, observou-se uma redução no teor

dos ácidos graxos e interação significativa entre os teores de ácidos graxos e as temperaturas de conservação, onde na temperatura de 25°C o ácido palmítico e o ácido palmitoleico apresentaram maiores concentrações, 2,85 e 2,34, respectivamente. Já para as temperaturas de 6°C (5,45), -20°C (3,85) e +NL (7,22) o ácido linoleico apresentou maiores concentrações que os demais ácidos graxos e maior concentração deste ácido graxo para sementes conservadas em +NL (Figura 4 B). No último período de conservação o teor dos ácidos graxos apresentou um aumento e o ácido linoleico apresentou os maiores teores nas quatro temperaturas de conservação, principalmente para as temperaturas de congelamento -20°C e +NL (Figura 4 C).

Singh et al. (2016b) ao estudarem sementes frescas de *Dendrocalamus. hamiltonii* e *Dendrocalamus strictus* em comparação com sementes armazenadas por 18 meses, correlacionaram a viabilidade das sementes com a presença de metabólitos primários. Para Singh et al. (2017) a deterioração da qualidade da semente depende de dois fatores ambientais: a umidade relativa que rege o teor de umidade e a temperatura que influenciam a taxa metabólica de sementes. Bonner (2008) relata que proteínas são mais higroscópicas, seguidas por carboidratos e lipídios e que estas diferenças são refletidas no equilíbrio do teor de umidade das sementes com a umidade relativa do ar. Ainda relatam que sementes amiláceas possuem maior equilíbrio de umidade que sementes oleaginosas. Este equilíbrio acontece com base nas diferenças de pressão de vapor do ambiente e das sementes e na natureza química das sementes.

Carboidratos, proteínas e ácidos graxos são geralmente acumulados durante a maturação, sendo o amido a principal fonte de carbono e energia para o crescimento das plântulas (Silva et al., 2016). A aquisição da tolerância à dessecação ocorre nos estágios posteriores da maturação da semente e tem sido correlacionada com quantidades aumentadas de compostos protetores decorrentes dessas reservas (Berjak; Pammenter 2007). No entanto, a correlação entre a deterioração da semente e os principais compostos de armazenamento (óleo, amido e proteínas) ou antioxidantes lipossolúveis foi encontrada, e sugeriu-se que o comportamento do armazenamento de sementes está mais correlacionado com o equilíbrio redox celular (principalmente glutaciona) ou com a presença de antioxidantes e compostos protetores (Nagel et al., 2014; Kocsy 2015).

De acordo com Mello et al. (2010) pequenas quantidades de ácidos graxos saturados foram relatadas em sementes tolerantes à dessecação, em comparação com sementes intolerantes, tanto em triacilgliceróis como em componentes da membrana.



**Figura 3.** Percentagem de amido, proteína e lipídios em relação a massa seca de sementes de *Dendrocalamus asper* mantidas sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196°C por zero (A), 365 (B) e 600 (C) dias de conservação.

**Tabela 3.** Quantificação e identificação de ácidos graxos em relação a  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de massa seca de sementes de *Dendrocalamus asper* mantidas sob temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C por zero, 360 e 600 dias de conservação

Ácidos graxos	Temperatura de conservação			
	25°C	6°C	-20°C	NL+
<b>0 dias de conservação</b>				
Ácido palmítico (C16)	8,4±0,5 bA	8,4±0,5 bA	8,4±0,5 bA	8,4±0,5 bA
Ácido palmitoleico (C16:1)	6,1±0,4 cA	6,1±0,4 cA	6,1±0,4 cA	6,1±0,4 cA
Ácido oleico (C18:1)	1,6±0,7 dA	1,6±0,7 dA	1,6±0,7 dA	1,6±0,7 dA
Ácido linoleico (C18:2)	11,3±1,1 aA	11,3±1,1 aA	11,3±1,1 aA	11,3±1,1 aA
Ácido linolênico (C18:3)	0,2±0,04 eA	0,2±0,04 eA	0,2±0,04 eA	0,2±0,04 eA
Ácido araquídico (C20)	0,5±0,04 eA	0,5±0,04 eA	0,5±0,04 eA	0,5±0,04 eA
Ácido elaídico (C20:1)	0,3±0,05 eA	0,3±0,05 eA	0,3±0,05 eA	0,3±0,05 eA
Ácido behênico (C22)	1,0±0,0 eA	1,0±0,0 eA	1,0±0,0 eA	1,0±0,0 eA
Ácido erúxico (C22:1)	0,4±0,01 eA	0,4±0,2 eA	0,4±0,2 eA	0,4±0,2 eA
<b>360 dias de conservação</b>				
Ácido palmítico (C16)	2,9±0,08 aA	3,7±0,8 bA	3,2±0,5 aA	3,3±0,8 bA
Ácido palmitoleico (C16:1)	2,3±0,02 aA	2,9±0,5 bA	2,6±0,4 aA	2,7±0,5 bA
Ácido oleico (C18:1)	0,0±0,0 bA	0,3±0,0 cA	0,0±0,0 bA	0,6±0,9 cA
Ácido linoleico (C18:2)	1,1±0,9 bD	5,5±1,4 aB	3,9±0,5 aC	7,2±2,8 aA
Ácido linolênico (C18:3)	0,0±0,0 bA	0,05±0,01 cA	0,08±0,01 bA	0,09±0,01 cA
Ácido araquídico (C20)	0,2±0,07 bA	0,3±0,06 cA	0,3±0,04 bA	0,4±0,03 cA
Ácido elaídico (C20:1)	0,2±0,06 bA	0,2±0,05 cA	0,2±0,1 bA	0,1±0,07 cA
Ácido behênico (C22)	0,8±0,05 bA	0,8±0,07 cA	0,9±0,05 bA	0,9±0,03 cA
Ácido erúxico (C22:1)	0,6±0,06 bA	0,5±0,0 cA	0,48±0,0 bA	0,7±0,02 cA
<b>600 dias de conservação</b>				
Ácido palmítico (C16)	7,1±0,9 bA	4,9±0,8 bB	7,6±1,1 bA	7,0±1,2 bB
Ácido palmitoleico (C16:1)	5,2±0,6 bA	3,8±0,5 bA	5,6±0,7 cA	5,2±0,8 bA
Ácido oleico (C18:1)	2,0±0,9 cA	2,2±0,4 cA	2,6±0,9 dA	3,3±0,6 cA
Ácido linoleico (C18:2)	10,0±1,3 aB	9,6±2,9 aB	14,0±2,5 aA	13,8±2,4 aA
Ácido linolênico (C18:3)	0,2±0,05 cA	0,2±0,02 cA	0,5±0,08 dA	0,4±0,08 dA
Ácido araquídico (C20)	0,5±0,05 cA	0,5±0,06 cA	0,5±0,07 dA	0,6±0,04 dA
Ácido elaídico (C20:1)	0,3±0,05 cA	0,2±0,06 cA	0,3±0,06 dA	0,2±0,08 dA
Ácido behênico (C22)	1,0±0,08 cA	1,0±0,04 cA	1,0±0,07 dA	1,0±0,02 dA
Ácido erúxico (C22:1)	0,8±0,03 cA	0,8±0,04 cA	0,8±0,02 dA	0,9±0,07 dA

#### 4. CONCLUSÕES

Sementes de *Dendrocalamus asper* mantem sua viabilidade após conservação sob temperatura ultrabaixa em +NL por até 600 dias e, a conservação nesta condição, não interfere no desenvolvimento pós-seminal, produzindo plantas normais e inteiras.

A germinação de sementes mantidas sob armazenamento na temperatura de -20 °C se mostrou variável ao longo dos períodos de armazenamento. Porém, mantendo a mesma viabilidade do período inicial ao final da conservação. Esse fato, indica comportamento condizente com o de sementes ortodoxas.

A conservação na temperatura de 6 °C garantiu a viabilidade das sementes até os 360 dias de conservação, com redução a partir dos 600 dias e o desenvolvimento pós-seminal produziu plantas normais e inteiras.

Sementes armazenadas na temperatura de 25°C iniciam a redução de viabilidade a partir dos 360 dias e, aos 600 dias ocorre o desenvolvimento anormal de plantas oriundas destas sementes conservadas.

Independente do período e da temperatura de conservação, quando as plantas possuem raízes e parte aérea bem formadas a aclimatização ocorre satisfatoriamente.

O principal metabolito de reserva é o amido, seguido por proteínas e, em menores concentrações, lipídios. Além disso, apresentam na sua constituição os ácidos graxos linoleico, palmítico e palmitoleico em maiores quantidades.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L.I.V; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, p. 325-431, 2007.

ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; DEV ARYA, I. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, Vol. 18, p. 879-882, 1999.

AYANA, D.A.; TADESSE, Z.; KEBEDE, Y. Effect of storage media and storage time on germination and field emergence of *Oxytenanthera abyssinica* seeds. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, Vol. 1 No. 3, p. 218-226. 2012

BAHRU, T.; MULATU, Y.; KIDANE, B. Germination ecology of *Arundinaria alpina* (K. Schum) and *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich.) Munro seeds: Indigeneous bamboo species in Ethiopia. **International Journal of Biodiversity**, Vol. 2015, 8p. 2015.

BERILLI, S. DA S; CARVALHO, A. J. C. de; FREITAS, S. de J.; FARIA, D. C.; MARINHO, C. S. Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 208–214, 2011.

BONNER, F. Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. **Forest Ecology and Management**, Vol. 35, p. 35-43. 1990.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Vol. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p. 2009.

CIARAMELLO, D.; AZZINI, A. Bambu como matéria prima para papel. V – Estudos sobre o emprego de quatro espécies de *Dendrocalamus*, na produção de celulose sulfato. **Bragantia**, Vol. 30, n. 24. 1971.

COSTA, C. J. Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado. **Documentos/Embrapa Cerrados**, 265, p. 30, 2009.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**, Vol. 41, n. 230, p. 1167-1174. 1990.

- ENGELMANN F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Vol. 40, n. 5, p. 427-433. 2004.
- ENGELS, J. M. M.; ENGELMANN, F. Botanic gardens and agricultural genebanks: building on complementary strengths for more effective global conservation of plant genetic resources. Proc. Fifth international botanic gardens conservation congress, Kirst- Enbosch, South Africa, p.14-18. 1998.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Vol.35, n.6, p.1039-1042. 2011.
- FILGUEIRAS, T.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **The Journal of American Bamboo Society**, Vol. 18, n. 1, p. 7-18. 2004.
- GOLDFARB, M; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 1, 2010.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. A protocol to determinate seed storage behaviour. **International Plant Genetic Resources**. Technical Bulletin, n. 1, Vol. 1, p. 1-55. 1996.
- JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, Vol. 118, p. 153-166. 2011.
- KUMAR, V.; BANERJEE, M. Albino regenerants proliferation of *Dendrocalamus asper* *in vitro*. **World Journal of Agricultural Sciences**, Vol 10, n. 1, p. 9-13, 2014. DOI: 10.5829/idosi.wjas.2014.10.1.1755.
- LAURENS, L.M.; QUINN, M.; VAN WYCHEN, S.; TEMPLETON, D.W.; WOLFRUM, E.J. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by *in situ* transesterification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n.1, p. 167-178, 2012.
- LIN, T.P.; HUANG, N.H. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 45, p. 1289–1294, 1994.
- McCLURE, F.A. **The bamboos – a fresh perspective**. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1996.
- MONTIEL, M.; SANCHÉZ, E. Ultraestructura de Bambúes del Género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) Cultivados em Costa Rica IV: *Dendrocalamus asper*, Clones Taiwán y Tailandia. **Revista Biología Tropical**, Vol. 54, suppl. 2, p. 65-75, 2006.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497. 1962.
- PATEL, B; GAMI, B.; PATEL, N; BARIA, V. One step pre-hardening micro propagation of *Bambusa balcooa* Roxb. **Journal of Phytology**, p. 1-9, 2015.
- RAJANAIDU, N.; AINUL, M.M. Advanced biotechnology and breeding centre, malaysian palm oil board In: Normah, M.N.; Chin, H.F.; Reed, B.M. (Eds.) **Conservation of Tropical Plant Species**. Springer, New York. 2013.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**. Vol. 1, p. 499-514, 1973.
- SINGH, G.; RICHA. Viability loss of *Dendrocalamus hamiltonii* seeds with storage associated with membrane phase behaviour and hormonal analysis. **International Journal of Life Sciences**, Vol. 4, n. 4, p. 547-553, 2016.
- SINGH, G.; RICHA; SHARMA, M.L. Viability loss of bamboo seeds of three species associated with membrane phase behaviour during storage. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Vol. 5, n. 11, p. 1634-1642, 2016.
- SINGH, S.R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. KALIA, R.K. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. **Acta Physiology Plant**, Vol. 35, p. 419–430, 2013. DOI 10.1007/s11738-012-1084-x.
- THAPLIYAL, M.; JOSHI, G.; BEHERA, F. Bamboo: **Flowering, seed germination and storage**. In: KAUSHIK, S.; SINGH, Y. P.; KUMAR, D.; THAPLIYAL, M.; BARTHWAL, S. Bamboos in India. National Forest Library and information Centre Forest Research Institute. 2015. p. 89-108.
- VAN SLAGEREN, M. W. The Millennium Seed Bank: building partnerships in arid regions for the conservation of wild species. **Journal of Arid Environments**, Vol. 54, n. 1, p. 195–201, 2003
- WALTERS C, BERJAK P, PAMMENTER N, KENNEDY K, RAVEN P. Preservation of recalcitrant seeds. **Science**, Vol. 339, n. 6122, p. 915-16. 2013.
- WETZEL, M. M. V. S.; REIS, R. B.; RAMOS, K. M. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular Técnica, 26**: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 5, 2003.

## **CAPÍTULO IV**

### **MICROPROPAGAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS DE ESPÉCIES DE BAMBU DO GÊNERO *GUADUA* (BAMBUSOIDEAE, POACEAE)**

## RESUMO

O gênero *Guadua*, um dos representantes da família Poaceae, se destaca entre os bambus lenhosos do novo mundo. Entre as espécies de ocorrência desse gênero tem-se o *Guadua magna*, que é endêmico do Brasil, e *Guadua angustifolia* que ocorre amplamente na Venezuela, Colômbia e Equador. Como a reprodução destes bambus tem ocorrido quase que exclusivamente por propagação vegetativa, a micropropagação tem sido considerada uma técnica promissora, alternativamente as técnicas convencionais. Neste trabalho objetivou-se estabelecer um protocolo de micropropagação eficiente para *G. magna* e *G. angustifolia*, capaz de garantir a sobrevivência na aclimatização e a fidelidade genética dos clones produzidos. Plantas matrizes destas duas espécies foram mantidas em casa de vegetação, onde as mudas de *G. magna* foram separadas em dois grupos: o primeiro pulverizado com fungicida de contato Mythos e o segundo não pulverizado. As mudas de *G. angustifolia* não receberam o tratamento com fungicida. Para a etapa de estabelecimento *in vitro*, segmentos nodais, com pelo menos uma gema, foram desinfestados e inoculados em meio de MS com diferentes formulações: MS normal; MS com 3,0 mL<sup>-1</sup> de PPM® e MS com 1 mL.L<sup>-1</sup> de fungicida Carbendazin®. Em seguida, as brotações obtidas da etapa de estabelecimento que estavam livres de contaminação foram multiplicadas por até cinco subcultivos em meio de MS com 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em duas consistências do meio: líquida e semissólida. O enraizamento foi realizado em meio 1/2MS acrescido de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB também nas consistências líquida e semissólida dos meios. Em seguida as plantas foram aclimatizadas em substrato Bioplant em câmara de crescimento. Ao final do quinto subcultivo de multiplicação realizou-se a verificação da fidelidade genética das plantas produzidas, através de marcadores ISSR. Durante a etapa de estabelecimento *in vitro*, a adição de Carbendazin e PPM ao meio de cultura reduziu a contaminação em *G. magna*, enquanto para *G. angustifolia* não foi observado influências sobre a taxa de contaminação e brotação. . Na etapa de multiplicação, o meio líquido se mostrou mais eficiente em comparação ao meio semissólido suplementado com 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP para ambas as espécies estudadas. Para o enraizamento, a adição de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB no meio líquido ou semissólido possibilitou um enraizamento de até 45% para *G. magna* e e 62% para *G. angustifolia*. Durante a aclimatização, ambas as espécies apresentaram altas percentagens de sobrevivência. O uso de marcadores ISSR permitiu verificar a similaridade de 87% entre as duas espécies e ausência de polimorfismo entre os clones obtidos.

**Palavras-chave:** Micropropagação, meio líquido, *Guadua*, fidelidade genética, marcador ISSR

## ABSTRACT

*Guadua* genus, one of the representatives of the family Poaceae, stands out among the woody bamboos of the new world. *Guadua magna* and *G. angustifolia* are two representative species of this genus. While the first is endemic in Brazil, the second one occurs widely in Venezuela, Colombia and Ecuador. As reproduction of these bamboos has occurred almost exclusively by vegetative propagation, micropropagation has been considered as a promising technique, alternatively to the conventional techniques. The objective of this work was to establish an efficient micropropagation protocol for *G. magna* and *G. angustifolia*, capable of guaranteeing the survival, after plant acclimatization, and the genetic fidelity of the produced clones. The mother plants of these two species were kept in a greenhouse, where *G. magna* plants were separated into two groups: the first one sprayed with Mythos contact fungicide and the second group not sprayed. *G. angustifolia* mother plants were not treated with fungicide. For the *in vitro* establishment stage, nodal segments with at least one lateral bud were disinfested and inoculated in MS medium with different formulations: normal MS; MS with 3.0 mL.L<sup>-1</sup> PPM® and MS with 1 mL.L<sup>-1</sup> of Carbendazin® fungicide. Then, the shoots obtained from the establishment stage free of contamination were multiplied by up to five subcultures in MS medium with 3.0 mg.L<sup>-1</sup> BAP in two medium consistencies: liquid and semisolid. The shoot rooting was performed in 1/2MS medium, added of 3.0 mg.L<sup>-1</sup> IBA, also in the liquid and semi-solid consistencies. Then, the plants were acclimatized in Bioplant substrate on a growth chamber. At the end of the fifth multiplication subculture, the genetic fidelity of produced plants was verified through ISSR markers. During the *in vitro* establishment stage, the addition of Carbendazin and PPM into culture medium reduced the contamination for *G. magna*, whereas for *G. angustifolia* no influences were observed. During the multiplication stage, the liquid medium showed to be more efficient in comparison to the semi-solid medium for both the studied species. The addition of 3.0 mg.L<sup>-1</sup> IBA in the medium allowed a shoot rooting rates of up to 45% for *G. magna* and 62% for *G. angustifolia*, which during acclimatization presented high survival. The use of ISSR markers allowed verifying a similarity of 87% between the two species and absence of polymorphism among clones.

**Keywords:** Micropropagation, liquid medium, *Guadua*, genetic fidelity, ISSR marker

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Guadua* Kunt pertence à família Poaceae e subfamília Bambusoideae. É endêmico das Américas e se destaca entre os bambus lenhosos do Novo Mundo por sua importância social, econômica e cultural, com uso remontando à época pré-colombiana (Londoño, 2004; Silva, 2005). Espécies do gênero estão distribuídas do Norte do México ao Sul da Argentina (Londoño, 2004). De acordo com Filgueiras e Viana (2017), dentro do gênero em questão são reconhecidas 19 espécies nativas e cinco endêmicas distribuídas no Brasil. *Guadua magna* (Londoño e Filg.) é uma das espécies endêmicas do Brasil, que apresenta caracteres morfológicos semelhantes a *Guadua chacoensis* [(Rojas Acosta) Londoño e P.M. Peterson] e *Guadua angustifolia* (Kunth) (Filgueiras; Londoño, 2006).

*Guadua magna* é popularmente conhecida como Taquaruçu e ocorre ao longo de matas ciliares em margens de rios do Brasil Central. A espécie é perene com colmos eretos (12,6-23,4 metros de altura e 6-12 cm de diâmetro em sua fase adulta), com folhas urticantes e amarronzadas de até 20 cm de comprimento e presença de espinhos (com cerca de 3 cm) (Filgueiras; Londoño, 2006). *Guadua angustifolia* é uma espécie perene com colmos eretos (20,0-30,0 metros de altura e 10-13 cm de diâmetro) e com espinhos nos seus nós (Clayton et al., 2006). Também chamado de bambu gigante da região neotropical, trata-se de uma planta nativa de ampla ocorrência na Venezuela, Colômbia e Equador e tem sido amplamente introduzida em países Andinos e da América Central (Judziewicz et al., 1999).

As limitações da propagação convencional de bambus, que se dá quase que exclusivamente por meio de propagação vegetativa, pela divisão de touceiras, parte de rizomas e seções do colmo (Gielis; Oprins, 2002; Singh, 2009; Nadha et al., 2011), bem como os longos ciclos de floração (BPG, 2012; Waghmare; Bagde, 2013), justificam a necessidade de novas abordagens para o desenvolvimento de protocolos reprodutíveis e eficientes, visando à propagação em larga escala (Nadha et al., 2011). Nesse sentido, a micropropagação é uma alternativa promissora em relação as técnicas convencionais de propagação de bambus (Jiménez et al., 2006; García-Ramírez et al., 2010; Nadha et al., 2011).

Como *G. magna* é uma espécie que foi descrita, relativamente, há pouco tempo ainda existem poucos estudos a seu respeito, principalmente sobre métodos de cultivo *in vitro*. Para *G. angustifolia* é possível encontrar alguns protocolos de desinfestação (García et al., 2004; Ramírez et al., 2009), estabelecimento (Mendonza et al., 2010) e demais etapas da micropropagação (Jiménez et al., 2006; Nadha et al., 2010) descritos na literatura. Contudo, os resultados são muitas vezes divergentes e nem sempre possíveis de serem reproduzidos.

As técnicas de micropropagação, teoricamente, produzem plantas com a mesma identidade genética do material vegetal de origem, ou seja, com a mesma característica genética da planta mãe (Baránek et al., 2010; Jaligot et al., 2011). Entretanto, podem ocorrer variações somaclonais em decorrência de uma série de fatores, tais como a fonte e o estado fisiológico do explante, o genótipo da planta mãe, o grau de organização meristemática, a presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo, as propriedades físicas e químicas do meio de cultura, o tempo de permanência *in vitro*, a temperatura e a luminosidade do cultivo, entre outros (Bairu et al., 2011).

Os marcadores ISSRs são microssatélites que se encontram dentro de regiões de repetição (Joshi et al, 2000; Bakkappa et al., 2011) e possuem grande potencial para determinar a diversidade intra e inter-genômica em comparação com outros *primers* arbitrários, uma vez que revelam variação dentro das regiões exclusivas do genoma em vários loci simultaneamente (Yeasmin et al., 2014). Eles exibem especificidade com a sequência de marcadores, sem a exigência de qualquer conhecimento prévio da sequência do genoma para a síntese do primer (Joshi et al., 2000; Bakkappa et al., 2011). Esta técnica tornou-se popular entre pesquisadores que trabalham com bambu para estudo de fidelidade genética (Lin et al., 2010; Mukherjee et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação eficiente para as espécies de *Guadua magna* e *Guadua angustifolia*, abrangendo as etapas de estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização, buscando a produção de mudas idênticas à planta-matriz.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram executados no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF.

### 2.1. *Material vegetal*

As mudas de *G. magna* utilizadas como fonte de explantes, foram obtidas de plantas matrizes em regiões naturais (Santa Terezinha – GO), logo após a dispersão de sementes. Plântulas em desenvolvimento foram coletadas, transplantadas para vasos e mantidas em casas de vegetação. Os explantes utilizados nos trabalhos com *Guadua angustifolia* foram obtidos de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação.

Para *Guadua magna* duas condições de pré-cultivo foram realizadas, antes do estabelecimento: a) matrizes tratadas com fungicida de contato Mythos® (0,7 mL.L<sup>-1</sup>), pelo período de um mês, com aplicações semanais, além de irrigação diária, somente na base das plantas; b) matrizes apenas irrigadas diariamente pelo período de um mês, sem aplicação de fungicida. Os grupos de matrizes mantidas em casa de vegetação foram compostos por cinco plantas em cada tratamento.

Para de *G. angustifolia* a matriz utilizada foi apenas irrigada diariamente, por período de um mês, anterior a instalação do experimento de estabelecimento *in vitro*.

### 2.2. *Estabelecimento do material vegetal in vitro*

Segmentos nodais com 1,0 - 2,0 cm e com pelo menos uma gema lateral foram coletados, tanto das matrizes de *G. magna* quanto de *G. angustifolia*. Após a remoção da bainha foliar, selecionou-se os segmentos que possuíam as gemas formadas. Na etapa de pré-desinfestação, os segmentos nodais foram lavados com detergente neutro e enxaguados em água corrente até retirada total do detergente.

A etapa de desinfestação foi conduzida em capela de fluxo laminar com imersões dos segmentos nodais inicialmente em álcool 70% por 1 minuto, seguido de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) a 0,1% por 5 minutos e por mais 30 minutos em fungicida Carbendazin 1mL.L<sup>-1</sup>. Finalmente, os segmentos nodais foram enxaguados por 3 vezes em água destilada e autoclavada.

A inoculação dos segmentos nodais foi realizada em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de MS (Murashige; Skoog, 1962), em três formulações diferenciadas: MS na sua composição normal; MS combinado com 3 mL.L<sup>-1</sup> de PPM® (Plant Preservative Mixture) e meio de MS combinado com 1 mL.L<sup>-1</sup> do fungicida Carbendazin®. Nestas três

formulações do meio de MS foi adicionado 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO).

As avaliações referentes a percentagem de contaminação e de brotação, além de altura dos brotos e número de folhas foram realizadas 30 dias após a inoculação das microestacas *in vitro*. Para *G. magna*, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema em fatorial 2 x 3 (aplicação ou não de fungicida nas matrizes x diferentes formulações do meio de MS). Para *G. angustifolia*, o delineamento foi o inteiramente casualizado constituído por 3 tratamentos (diferentes formulações do meio de MS). Os tratamentos foram compostos por pelo menos 10 repetições, sendo cada parcela constituída por um segmento nodal.

### 2.3. Multiplicação

As brotações livres de contaminação, obtidas durante a etapa de estabelecimento, foram transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de multiplicação. Nesta etapa foram testadas duas consistências do meio de cultura: MS líquido e MS semissólido. Em ambas as consistências, os meios foram adicionados de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 3 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP), conforme descrito por Jiménez et al. (2006). Para a consistência semissólida foi adicionado 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO).

Das touceiras formadas ao final de cada subcultivo foram eliminadas as estruturas mortas ou senescentes, as quais foram transferidas para novo meio de multiplicação líquido ou semissólido, de acordo com o tratamento, deixando-se, em média, de 2 a 3 brotações por unidade experimental.

As avaliações referentes ao número de brotos e altura de brotos, número de nós, número de folhas e percentagem de sobrevivência foram realizadas a cada 30 dias, por um período de até cinco subcultivos sucessivos. Ao final do processo, foi estimada a produção de mudas em razão do número de nós e brotos produzidos em cada subcultivo utilizando a fórmula:

$$EPM = (M_{1Sub} - \%EM) * (M_{2Sub} - \%EM) * (M_{3Sub} - \%EM) * (M_{4Sub} - \%EM) * (M_{5Sub} - \%EM)$$

Onde:

EPM = Estimativa de produção de mudas

M = média de nós ou brotos em cada subcultivo

%EM = percentagem de explantes mortos ou não desenvolvidos em cada subcultivos

Os tratamentos foram compostos por 10 repetições, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (consistência do meio de cultura x número de subcultivos).

#### 2.4. Enraizamento e aclimatização

Ao final do quinto subcultivo, o material multiplicado foi transferido para tubos de ensaio (15 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de MS com metade da concentração dos seus sais, na consistência líquida e semissólida, acrescido de 3 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB) (Waikhon; Louis, 2014). Além da auxina, foi adicionado ao meio 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e, para solidificação do meio semissólido, 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio. Após 30 dias de cultivo, verificou-se a percentagem de enraizamento, número de raízes formadas e o comprimento das raízes.

Ao final da etapa de enraizamento, as plantas obtidas *in vitro* que apresentavam raízes e parte aérea bem desenvolvidas foram transferidas para etapa de aclimatização, iniciando-se com a retirada da vedação das tampas por 24 horas, antes da remoção das plantas dos frascos de cultivo. Em seguida, as plantas foram retiradas do meio cultivo, as raízes lavadas para remoção de resíduos de meio, transplantadas para copos plásticos com capacidade de 300 mL, contendo substrato comercial Bioplant® e mantidas em câmara de crescimento a temperatura de 25±1 °C por 30 dias. Para a formação de um ambiente com alta umidade e melhor adaptação das plantas a este ambiente, os recipientes plásticos contendo o substrato foram cobertos com um saco plástico de polietileno (15,5x21). A cada cinco dias, as extremidades dos sacos plásticos foram cortadas, permitindo trocas gasosas com o ambiente externo, até a sua remoção completa, após 15 dias. A sobrevivência das plantas foi avaliada após 30 dias de aclimatização.

#### 2.5. Condições de cultivo

Todos os meios utilizados nos experimentos tiveram o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da adição de Phytigel e da autoclavagem a 121°C a 1,5 atm por 20 minutos. Em todas as etapas *in vitro*, as condições de cultivo foram em sala de crescimento, com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiação de 50 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas LED.

#### 2.6. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

#### 2.7 Fidelidade genética - ISSR

Ao final do quinto subcultivo do experimento de multiplicação, foram selecionadas amostras de pelo menos 14 plantas de cada meio (MSS e ML) para *G. magna* e 8 plantas de

cada consistência de meio (MSS e ML) para *G. angustifolia*, para verificação da fidelidade genética através da utilização de marcadores ISSR.

Para a extração do DNA foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (1990). Em tubos eppendorf de 2 mL identificados e com suas amostras correspondentes foram adicionados 100 mg de tecido congelado, oito beads magnéticas e adicionado 700 µL do tampão CTAB+ 2-mercaptoetanol. A maceração pela vibração das beads foi realizada em Tissue Lyser por 120 segundos. Em seguida, as amostras foram misturadas em agitador tipo vortex por 10 segundos e incubadas em banho-maria a 65 ° C por 60 min; os tubos foram agitados de 10 em 10 minutos para facilitar a solubilização e homogeneização da suspensão. Em capela de exaustão, foi adicionado 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA 24:1) em cada tubo para auxiliar na purificação do DNA. Para a homogeneização das amostras, os eppendorf foram agitados por 30 segundos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 min a 11.000 rpm.

Após a centrifugação, foram retirados aproximadamente 540 µL da fase sobrenadante e transferida para um novo eppendorf de 1,5 mL (previamente identificado) acrescentado de isopropanol gelado (400 µL) e realizando a homogeneização das amostras. Em seguida, os tubos foram armazenados em freezer (-20°C) por 1h, agitando a cada 15 minutos. Seguido por centrifugação a 12.000 rpm durante 10 min. O isopropanol foi descartado e o pellet de DNA lavado com 500 µL de etanol 70%, os tubos centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. Esta etapa foi realizada por duas vezes, seguida pela última lavagem com 500 µL de etanol 100%, seguida por centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Os tubos foram mantidos abertos “overnight”, sob papel toalha e temperatura ambiente para secagem do DNA. Após a secagem do DNA, o pellet foi então ressuscitado em 100 µL de tampão TE contendo RNase (1 µl/100 mL de TBE). Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 1 hora, agitados em vortex antes e depois da incubação.

O DNA foi quantificado em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (13 µl/90 mL de TBE 1X). Amostras muito concentradas, foram diluídas para 3 ng/µl e permaneceram congeladas até amplificação do PCR.

As reações para amplificação do DNA foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems), onde foram efetuados 35 ciclos de amplificação constituídos de uma etapa de iniciação de 5 minutos a 94 °C, seguido por uma etapa de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, uma etapa de ligação do primer ISSR ao DNA molde (pareamento) a 56 °C por 45 segundos, seguido por 1 min a 72°C e, ao final, a etapa de extensão a 72°C, por 7 minutos.

**Tabela 1.** Primers ISSR utilizados na análise de fidelidade genética de clones de *Guadua magna* e *G. angustifolia* produzidos após cinco subcultivos e suas respectivas sequências

Quantidade	Código do Primer	Sequência do Primer (5' - 3')
1	11zm	TGTCACACACACACACAC
2	12zm	GGTCACACACACACACAC
3	15zm	GTGCACACACACACACAC
4	16zm	CGGCACACACACACACAC
5	17zm	CAGCTCTCTCTCTCTCTC
6	18zm	GTGCTCTCTCTCTCTCTC
7	19zm	CCTGCACACACACACACAC
8	35zm	AGCAGCAGCAGCG-
9	38zm	AGCAGCAGCAGCAT
10	39zm	AGCAGCAGCAGCAC
11	50zm	CCAGCTGCTGCTGCT
12	51zm	GCACCCACACACACACACACA
13	52zm	GGCACCACACACACACACACA
14	53zm	CGCAACACACACACACACACA
15	54zm	GGCTACACACACACACACACA
16	55zm	CCTCCACACACACACACACACA
17	56zm	GCTACCACACACACACACACA
18	57zm	CGTCCACACACACACACACACA
19	58zm	CGAACCACACACACACACACA
20	UBC 10	GAGAGAGAGAGAGAGAT

O volume total de cada amostra amplificada foi de 13 µl: 3 µl de DNA adicionados a 10 µl de mix de reação PCR [1,3 µl de tampão 10X (constituído de 500 mM de Tris-HCl pH 8,0; 200 mM de KCl; 2,5 mg mL<sup>-1</sup> de BSA; 200 mM de Tartazine e 1% de Ficol), 1,3 µl de dNTP + 1,3 µl de BSA (dNTP a 2,5 mM; BSA 2,5 mg/ml), 0,246 µl de Taq polimerase (5 µl/ml) e 3 µl de primer (1,2 mM) e completado o volume final com água ultrapura (Mili-Q). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo 15 µl/100ml em solução de TBE (Tris – base 0,1M, ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) 1X, a uma voltagem de 200 volts por 30 min. Posteriormente, os géis foram fotografados em luz UV no qual foi utilizado o marcador de DNA 1 kb “lader” (Invitrogen) para estimar o tamanho molecular dos fragmentos amplificados. Foram testados 57 primers em oito amostras de DNA, selecionadas aleatoriamente do conjunto total de 48 plantas avaliadas, 30 plantas de *G. magna* e 18 plantas de *G. angustifolia*. Os vinte primers que apresentaram melhor resolução e fragmentos mais polimórficos de DNA foram adotados e estão relacionados na tabela 1.

Para análise dos marcadores ISSR, cada fragmento visualizado foi considerado um loco de DNA. Estes marcadores foram então avaliados como dados binários, utilizando-se “1” para indicar presença e “0” para indicar ausência do fragmento. Em seguida, os dados binários foram utilizados para estimar níveis de alteração genômica ocasionados em decorrência do cultivo *in vitro*.

Para tanto, foi dividido o número de mutações observadas (fragmentos polimórficos) pelo número total de fragmentos amplificados. Para a determinação do número de mutações, utilizou-se o princípio de que um fragmento é considerado polimórfico se estiver ausente em pelo menos um dos clones e presente nos demais ou presente em pelo menos um clone e ausente nos demais.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estabelecimento do material vegetal *in vitro*

O tratamento prévio das plantas matrizes de *G. magna* com o fungicida de contato pelo período de 30 dias, com aplicações semanais, não influenciou a redução da taxa de contaminação durante o estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais, quando comparado ao tratamento onde as matrizes não foram tratadas. No entanto, a adição do fungicida sistêmico Carbendazin®, bem como o bacteriostático PPM ao meio de cultivo de MS, influenciaram positivamente na redução da contaminação (Figura 1A).

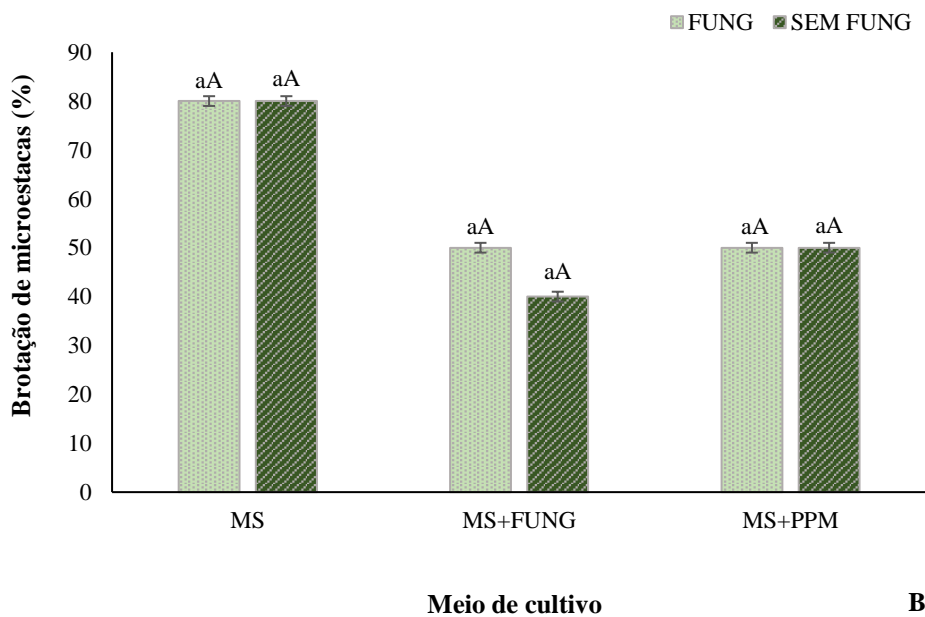
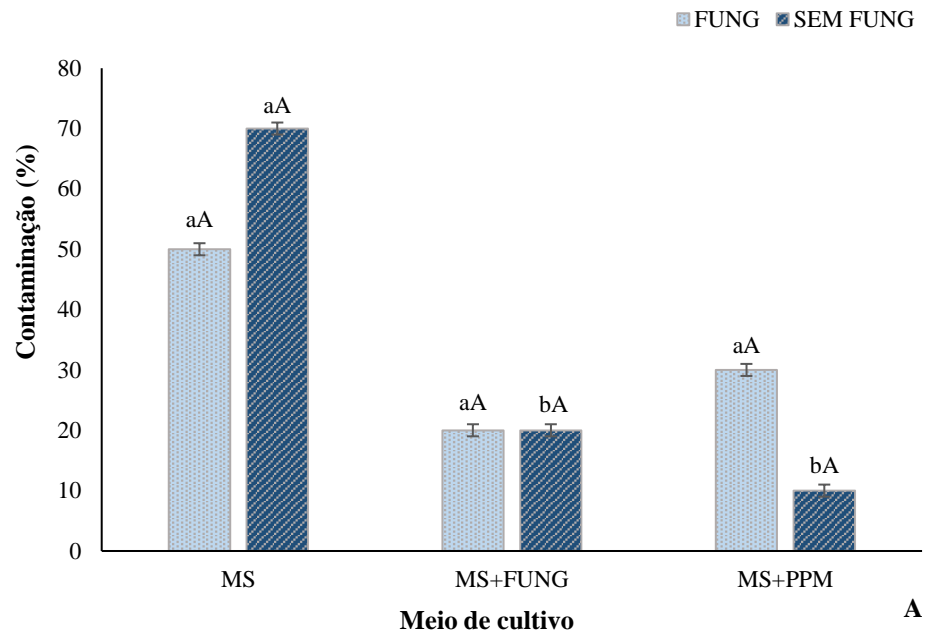
A aplicação prévia do fungicida Mythos®, assim como a adição do fungicida Carbendazin® e do bacteriostático PPM® ao meio, não diferiram estatisticamente para percentagem de brotação de microestacas de *G. magna*, quando comparados aos tratamentos onde não houve a aplicação do fungicida Mythos® e ao meio de MS sem adição de fungicida Carbendazin® e do bacteriostático PPM® (Figura 1B). Porém, é possível notar que a percentagem de brotação no meio de MS adicionado de fungicida Carbendazin® e PPM® foram menores que em meio de MS, onde se obteve 80% de brotação, independente do tratamento prévio das plantas matrizes em casa de vegetação com ou sem fungicida.

Durante o estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais de *Guadua angustifolia* em meio de MS pelo período de 30 dias, não se observaram diferenças estatísticas significativas para a contaminação entre os tratamentos (Figura 2A). As taxas de brotação também não apresentaram diferenças estatísticas nas diferentes formulações do meio (Figura 2B). Diante do exposto, verificou-se que o meio de MS proporcionou maior taxa de brotação (70%), mas ao mesmo tempo, maior taxa de contaminação (60%).

#### 3.2. Multiplicação

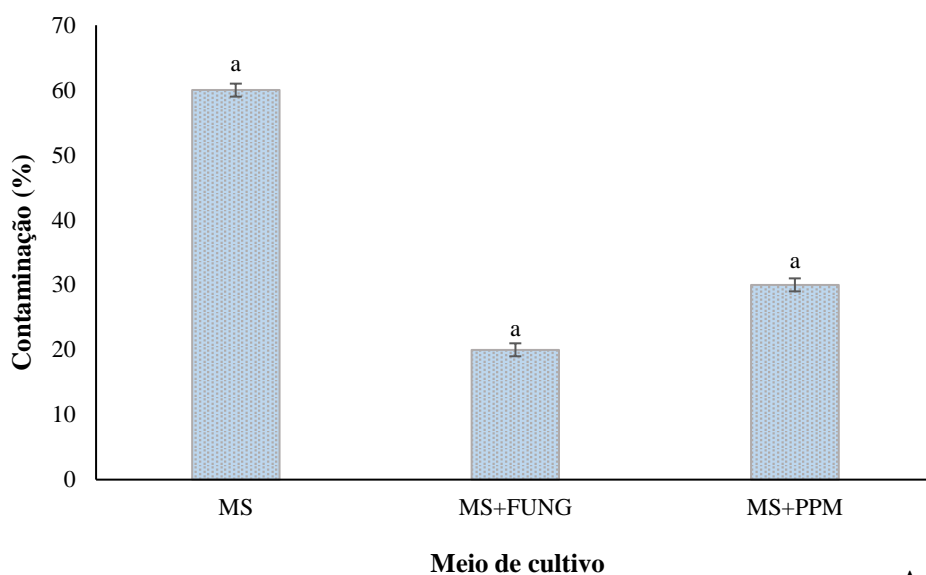
As brotações obtidas durante o estabelecimento e livres de contaminação foram destinados à fase de multiplicação. Nesta etapa pode-se observar que, na média geral, as variáveis avaliadas não apresentaram diferenças significativas entre os meios de consistência líquida e semissólida testados, com exceção das variáveis número de nós e número de folhas, em que o meio de consistência líquida proporcionou valores maiores para essas variáveis (Tabela 2).

Ao longo dos cinco subcultivos efetuados, o número de brotos permaneceu igual no meio líquido e no meio semissólido até o quarto subcultivo, observando-se uma redução significativa no quinto subcultivo, para 1,5 no ML e 1,6 no MSS. Não foram observadas diferenças significativas para número de brotos, entre as duas consistências de meio avaliadas.

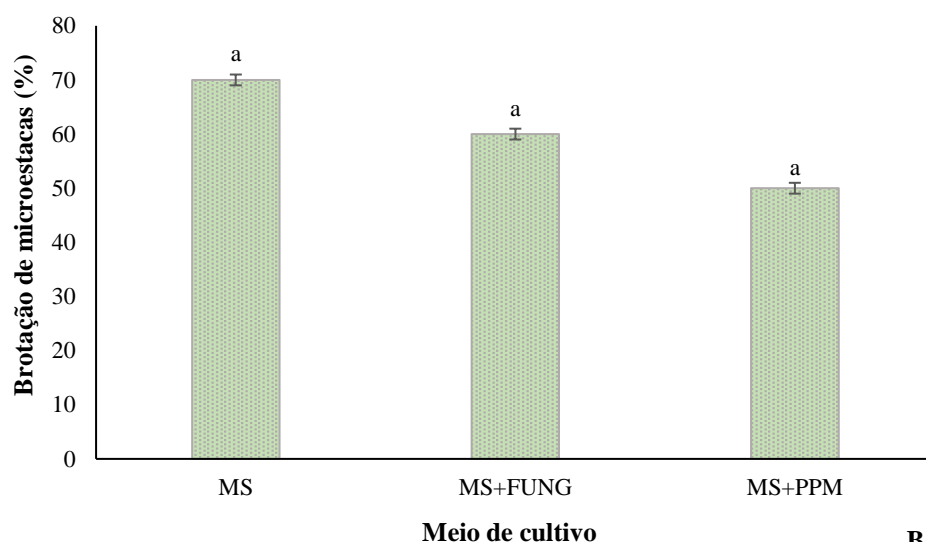


**Figura 1.** Contaminação e brotação de *Guadua magna* durante o estabelecimento *in vitro* em diferentes formulações do meio de cultivo. A - Contaminação (%) de segmento nodais com tratamento prévio e sem tratamento prévio com fungicida Mythos®, após 30 dias de estabelecimento *in vitro* em meio de MS, MS+FUNG (Meio de MS + Fungicida Carbendazin®) e MS+PPM (Meio de MS + Plant Preservative Mixture®); B – Brotação de microestacas a partir de segmento nodais de *Guadua magna* com tratamento prévio e sem tratamento prévio com fungicida, após 30 dias de estabelecimento *in vitro* em meio de MS, MS+FUNG (Meio de MS + Fungicida Carbendazin®) e MS+PPM (Meio de MS + Plant Preservative Mixture®). Letras maiúsculas comparam o tratamento prévio com fungicida ou sem fungicida dentro de cada formulação de meio e letras minúsculas comparam as diferentes formulações do meio de cultivo dentro do tratamento prévio com ou sem fungicida, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.





A



B

**Figura 2.** Contaminação (A) e brotação (B) de *Guadua angustifolia* durante o estabelecimento *in vitro* em diferentes formulações do meio de MS, MS+FUNG (Meio de MS + Fungicida Carbendazin®) e MS+PPM (Meio de MS + Plant Preservative Mixture®) Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para a variável altura de brotos, em meio líquido houve aumento do comprimento a partir do quarto subcultivo (5,0 cm) e, em meio semissólido, o maior comprimento foi observado no primeiro subcultivo (3,3 cm), com redução desta variável a partir do segundo subcultivo. Ao comparar as duas consistências de meio, o ML se mostrou significativamente superior ao MSS para desenvolvimento da altura dos brotos (Tabela 2).

Ao avaliar o número de nós formados em cada subcultivo, verificou-se redução significativa na formação destes a partir do terceiro subcultivo em ML, enquanto em MSS essa redução foi observada já a partir do segundo subcultivo, com menor formação de nós no quinto

subcultivo (1,2). Comparando as consistências do meio observou-se diferença significativa apenas no segundo subcultivo, onde o ML permitiu a formação de uma média de 6,3 nós, enquanto o MSS possibilitou a formação de apenas 2,7 nós.

Para a variável número de folhas, verificou-se que o ML possibilitou maior formação de folhas do segundo ao quarto subcultivo, com menor formação de folhas no primeiro (9,5) e quinto (6,3) subcultivos. Enquanto, no MSS não houve diferença significativa entre os subcultivos. Entre as consistências de meio, observou-se diferença significativa no segundo, terceiro e quarto subcultivos, onde o ML possibilitou a maior formação de folhas do que o MSS.

Ao longo dos cinco subcultivos avaliou-se também, a sobrevivência dos brotos utilizados como explantes para a multiplicação e verificou-se que no ML houve redução significativa da taxa de sobrevivência a partir do quarto subcultivo (47%). Enquanto, no MSS essa redução ocorreu apenas no quinto subcultivo (43%).

Durante a multiplicação de *G. angustifolia*, observou-se que na comparação das médias finais para a maioria das variáveis avaliadas, exceto a sobrevivência, o meio de consistência líquida foi o que permitiu melhor desenvolvimento das plantas ao final dos cinco subcultivos (Tabela 3).

Ao avaliar o número de brotos, observou-se menor formação de brotos em ML durante o primeiro e o quinto subcultivos, 1,7 e 2,6 brotos, respectivamente. Para o meio MSS não foi observada diferença ao longo dos subcultivos. Entre as consistências de meio, houve diferença significativa entre o ML e o MSS com 5,9 e 2,4 brotos, respectivamente, apenas no terceiro subcultivo. Para as variáveis altura de brotos e número de nós, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os subcultivos e nem entre as consistências de meio.

Todavia para número de folhas, observou-se que ao longo dos subcultivos houve maior formação no terceiro (13,5) e no quarto (10,9) subcultivos em ML. Em meio MSS não houve diferença significativa ao longo dos subcultivos. Ao comparar as duas consistências de meio, observou-se que o ML possibilitou maior número de folhas do segundo ao quarto subcultivo.

Ao avaliar a taxa de sobrevivência dos brotos de *G. angustifolia* observou-se que o ML durante o quarto subcultivo, possibilitou menor sobrevivência dos explantes (64%) ao longo dos cinco subcultivos e entre as duas consistências de meio.

No presente estudo, foram utilizados conjuntos de 2 a 3 brotos como fonte de explantes para etapa de multiplicação. No entanto, tanto em *G. magna* quanto em *G. angustifolia*, os segmentos nodais são capazes de produzir novas brotações, quando colocados em meio de multiplicação. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos na etapa de multiplicação, realizou-se o cálculo de estimativa de produção mudas em relação ao número de nós produzidos e também, em relação ao número de brotos ao longo dos cinco subcultivos (Figuras 3 e 4).

**Tabela 2.** Número e altura de brotos, número de nós, número de folhas e sobrevivência dos explantes em meio de cultura durante a multiplicação *in vitro* de *Guadua magna* em razão do número de subcultivos e da consistência semissólida (MSS) ou líquido (ML) do meio de cultura

Meio de cultivo	Subcultivos					Média	Equação	R <sup>2</sup>
	1°	2°	3°	4°	5°			
Número de brotos								
ML	4,0±0,6 aA	4,1±0,7 aA	3,8±0,5 aA	3,5±0,4 aA	1,5±0,4 aB	3,3±0,3 a	y=-0,2032x <sup>2</sup> +0,6383x+3,5366	92,46*
MSS	4,9±0,5 aA	3,1±0,5 aA	3,1±0,4 aA	3,5±0,8 aA	1,6±0,2 aB	2,9±0,2 a	y=-0,0026x <sup>2</sup> -0,6114x+5,1125	68,9*
Altura de brotos (cm)								
ML	4,1±0,1 aB	4,2±0,2 aB	3,9±0,2 aB	5,0±0,4 aA	4,7±0,4 aA	4,3±0,3 a	y=0,0552x <sup>2</sup> -0,1491x+4,1951	63,07*
MSS	3,3±0,2 bA	2,4±0,2 bB	2,5±0,1 bB	2,6±0,2 bB	2,5±0,2 bB	2,6±0,1 b	y=0,1187x <sup>2</sup> -0,8567x+3,9392	70,5*
Número de nós								
ML	5,5 ±0,6 aA	6,3±0,7 aA	4,2±0,4 aB	3,5±0,6 aB	2,3±0,8 aB	4,5±0,3 a	y=7,3663-0,9848x	89,1*
MSS	5,7±0,5 aA	2,7±0,3 bB	2,9±0,6 aB	3,7±0,6 aB	1,2±0,1 aC	3,3±0,3 b	y=5,9667-0,8823x	59,7*
Número de folhas								
ML	9,5±0,9 aB	12,5±0,8 aA	11,3±1,5 aA	13,6±0,8 aA	6,3±0,9 aB	11,0±1,7 a	y=-1,1767x <sup>2</sup> +6,4482x+4,0850	78,9*
MSS	9,6±0,8 aA	6,9±0,7 bA	7,3±1,1 bA	8,1±1,2 bA	4,4±0,5 aA	6,7±0,4 b	y=-0,1133x <sup>2</sup> -0,2325x+9,2112	58,8*
Sobrevivência dos explantes em meio de cultura (%)								
ML	100±0,0 aA	100±0,0 aA	93,0±0,04 aA	47,0±0,1 bB	67,0±0,1 aB	83,0±0,1 a	y=-0,0023x <sup>2</sup> -0,1023x+1,1533	66,9*
MSS	100±0,0 aA	100±0,0 aA	81,0±0,07 aA	100±0,0 aA	43,0±0,1 aB	79,0±0,04 a	y=-0,0523x <sup>2</sup> +0,2038x+0,8171	69,6*

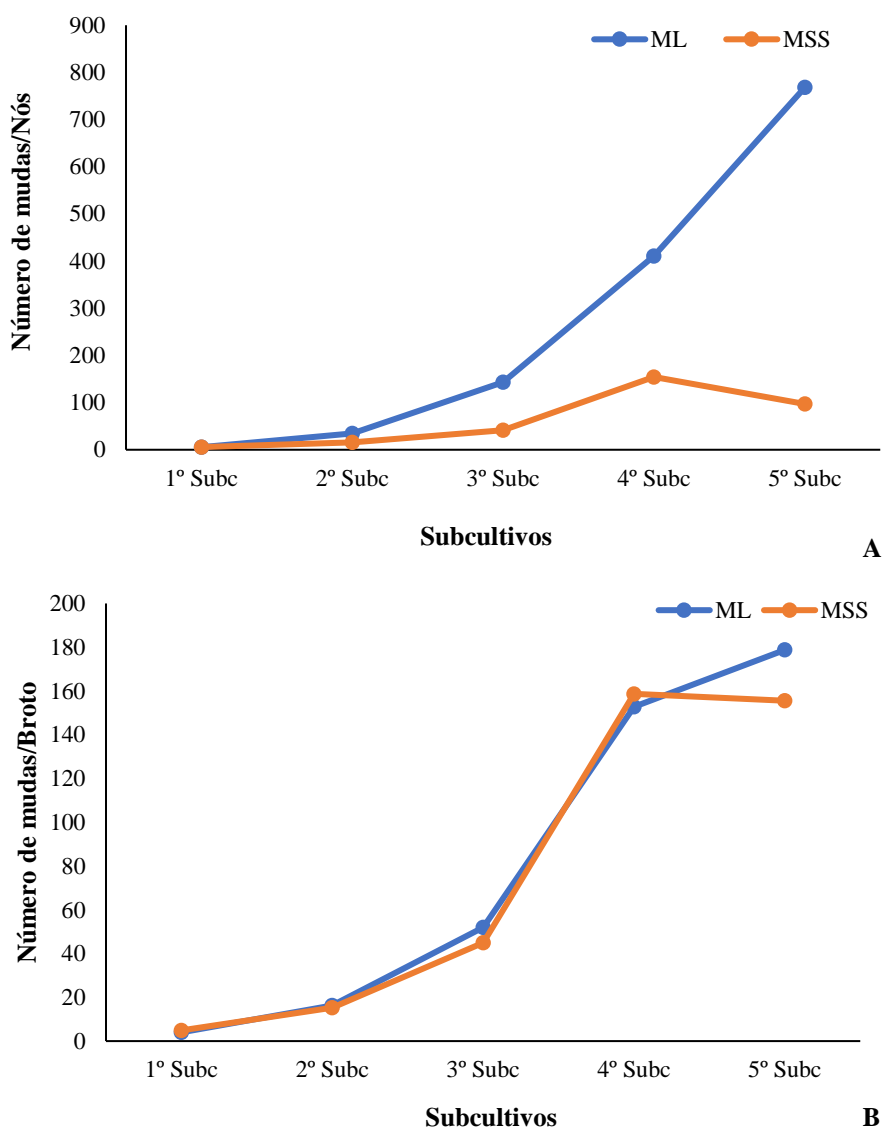
Os valores representam a média das repetições ± o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferiram significativamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) da equação de regressão: \* significativo a 1% de probabilidade; \*\* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo.

**Tabela 3.** Número e altura de brotos, número de nós, número de folhas e sobrevivência dos explantes em meio de cultura durante a multiplicação *in vitro* de *Guadua angustifolia* em razão do número de subcultivos e da consistência semissólida (MSS) ou líquida (ML) do meio de cultura

Meio de cultivo	Subcultivos					Média	Equação	R <sup>2</sup>
	1°	2°	3°	4°	5°			
Número de brotos								
ML	1,7±0,4 aB	3,6±0,7 aB	5,9±1,0 aA	4,8±0,9 aA	2,63±0,5 aB	3,7±0,4 a	y=-0,8348x <sup>2</sup> +5,3149x-3,0345	93,6*
MSS	2,0±0,5 aA	2,4±0,4 aA	2,4±0,3 bA	3,0±0,5 aA	2,4±0,4 aA	2,4±0,2 b	y=-0,0931x <sup>2</sup> +0,7011x+1,3561	62,9 <sup>ns</sup>
Altura brotos (cm)								
ML	2,4±0,2 aA	2,6±0,1 aA	2,4±0,3 aA	2,5±0,2 aA	2,7±0,1 aA	2,5±0,1 a	y=0,0156x <sup>2</sup> -0,0439x+2,4673	42,23 <sup>ns</sup>
MSS	2,2±0,2 aA	2,2±0,1 aA	2,0±0,2 aA	2,0±0,2 aA	2,1±0,2 aA	2,1±0,1 b	y=0,0185x <sup>2</sup> -0,1445x+2,3513	76,5 <sup>ns</sup>
Número de nós								
ML	4,5±0,3 aA	4,6±0,6 aA	5,6±0,8 aA	4,2±0,7 aA	2,6±0,4 aB	4,4±0,3 a	y=-0,4081x <sup>2</sup> +2,0201x+2,7064	89,1**
MSS	3,5±0,6 aA	2,8±0,5 aA	1,3±0,2 aA	2,9±0,4 aA	2,8±0,3 aA	2,7±0,2 b	y=0,3088x <sup>2</sup> -1,9654x+5,1405	56,0 <sup>ns</sup>
Número de folhas								
ML	4,7±0,7 aB	7,3±0,9 aB	13,5±1,7 aA	10,9±1,6 aA	6,3±1,2 aB	8,6±0,7 a	y=-1,6567x <sup>2</sup> +10,6056x-5,0633	83,3*
MSS	4,3±0,7 aA	3,9±0,7 bA	3,0±0,5 bA	6,3±1,1 bA	4,1±0,5 aA	4,3±0,3 b	y=0,0477x <sup>2</sup> -0,0863x+4,0705	7,2 <sup>ns</sup>
Sobrevivência dos explantes em meio de cultura (%)								
ML	80,0±0,1 aA	81,0±0,1 aA	93,0±0,5 aA	64,0±0,2 bB	88,0±0,1 aA	79,0±0,1 b	y=0,0062x <sup>2</sup> -0,0598x+0,8983	3,2 <sup>ns</sup>
MSS	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	88,0±0,1 aA	88,0±0,1 aA	95,0±0,05 a	y=-0,0802x <sup>2</sup> +0,3471x+0,9960	29,9**

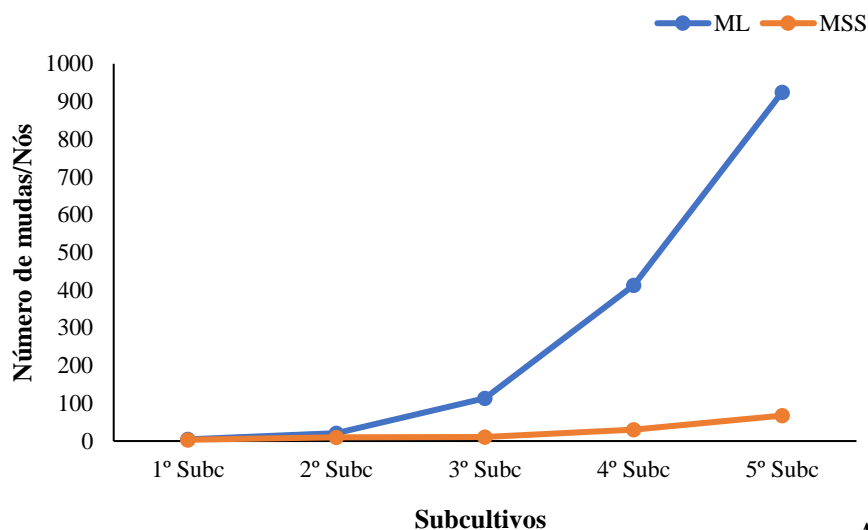
Os valores representam a média das repetições ± o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna e maiúscula na linha) não diferiram significativamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>): \* significativo a 1% de probabilidade; \*\* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo.

Assim, se os segmentos nodais fossem utilizados como explantes durante a fase de multiplicação de *G. magna* seria possível obter cerca de 768 plantas em ML e 97 plantas em MSS plantas, a partir de um único nó, ao final de cinco meses de cultivo (Figura 3A). Já, a partir de brotos seria possível obter 178 plantas em ML e 155 plantas em MSS ao final de cinco subcultivos (Figura 3B).

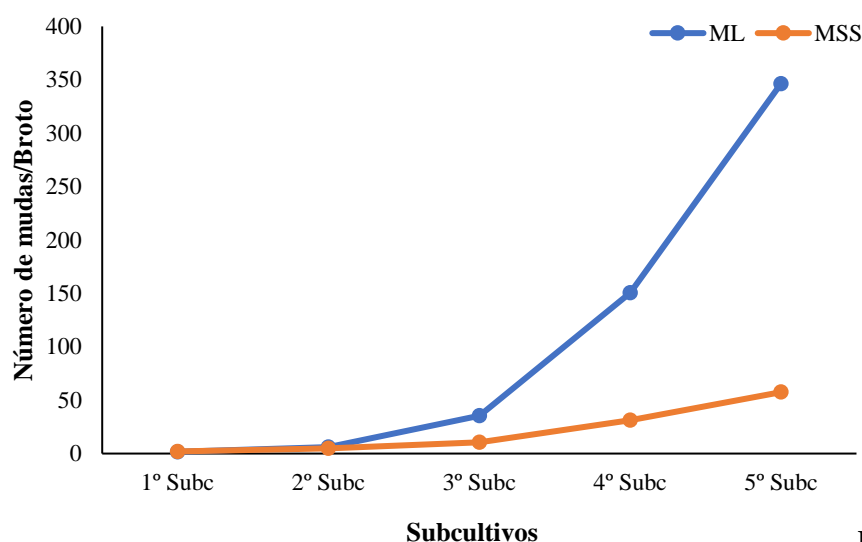


**Figura 3.** Estimativa de produção de mudas *in vitro* de *Guadua magna*. A – Estimativa de produção de mudas de *Guadua magna* multiplicadas em ML (meio líquido) e MSS (meio semissólido) em relação ao número de nós, ao final de cinco subcultivos de 30 dias cada. B - Estimativa de produção de mudas de *Guadua magna* multiplicadas em ML (meio líquido) e MSS (meio semissólido) em relação ao número de brotos, ao final do 5 subcultivos de 30 dias cada.

Para *G. angustifolia* seria possível produzir cerca de 924 plantas em ML e 67 plantas em MSS a partir de um único segmento nodal (Figura 4A). A partir dos brotos seria possível a obtenção de cerca de 346 plantas em ML e 57 plantas em MSS ao final de cinco meses de cultivo (Figura 4B).



A



B

**Figura 4.** Estimativa de produção de mudas *in vitro* de *Guadua angustifolia*. A – Estimativa de produção de mudas de *Guadua angustifolia* multiplicadas em ML (meio líquido) e MSS (meio semissólido) em relação ao número de nós, ao final de cinco subcultivos de 30 dias cada. B - Estimativa de produção de mudas de *Guadua angustifolia* multiplicadas em ML (meio líquido) e MSS (meio semissólido) em relação ao número de brotos, ao final do 5 subcultivos de 30 dias cada.

### 3.3. Enraizamento e aclimatização

Para o enraizamento de *G. magna* observou-se que a adição de  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB nos meios ML e MSS possibilitou baixas percentagens de enraizamento (45% e 30%, respectivamente) e não diferiram estatisticamente. Assim como para *G. angustifolia*, os meios ML e MSS não diferiram estatisticamente e possibilitaram a formação de 53% e 62% de brotos enraizados, respectivamente (Tabela 4).

Plantas de *G. magna* e plantas de *G. angustifolia* não apresentaram diferenças significativas para número e comprimento de raízes, em ambas consistências de meio avaliadas.

No entanto, plantas de *G. magna* produziram maior número de raízes, com maior comprimento, em ML, quando comparado ao MSS.

**Tabela 4.** Percentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento de raízes em resposta a etapa de enraizamento de plantas de *Guadua magna* e *Guadua angustifolia* em ML e MSS

Consistência do meio	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento de raízes
<i>Guadua magna</i>			
ML	45,0±0,1 a	5,3±2,1 a	1,7±1,0 a
MSS	30,0±0,1 a	4,2±0,9 a	0,8±0,1 a
<i>Guadua angustifolia</i>			
ML	53,0±0,1 a	2,8±1,2 a	0,4±0,1 a
MSS	62,0±0,1 a	2,0±0,4 a	0,5±0,1 a

Os valores representam a média das repetições ± o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao processo de aclimatização, plantas de *G. magna* oriundas de meio de enraizamento ML e MSS apresentaram comportamentos semelhantes (Tabela 5). Dentre as variáveis analisadas, observou-se diferença estatística apenas para altura dos brotos, que foi maior nas plantas oriundas do ML. A percentagem de sobrevivência variou de 83 a 100%, para o ML e MSS, respectivamente. Visualmente, as plantas oriundas do ML apresentaram um aspecto mais vigoroso que as oriundas do MSS.

**Tabela 5.** Altura de brotos, número de nós, número de folhas, e percentagem de sobrevivência de *Guadua magna* e *Guadua angustifolia* após de 30 dias de aclimatização em câmara de crescimento a temperatura de 25±1 °C por 30 dias, de plantas oriundas do ML e MSS

Consistência do meio	Altura de Brotos	Número de Folhas	Número de Nós	Sobrevivência (%)
<i>Guadua magna</i>				
ML	3,94±0,6 a	15,83±3,2 a	6,67±0,9 a	83,0±0,16 a
MSS	2,39±0,3 b	8,33±1,3 a	5,17±0,9 a	100±0,00 a
<i>Guadua angustifolia</i>				
ML	3,61±0,9 a	6,88±1,9 a	4,33±0,7 a	100±0,00 a
MSS	2,16±0,3 a	5,60± 1,3 a	3,60±0,4 a	80,0±0,13 a

Os valores representam a média das repetições ± o erro padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As plantas de *G. angustifolia* também apresentaram desenvolvimento semelhante durante a etapa de aclimatização, não tendo sido observado diferenças estatísticas entre as variáveis avaliadas (Tabela 5). A percentagem de sobrevivência variou de 80 a 100% entre MSS e ML, respectivamente. De maneira geral, a consistência do meio de enraizamento que originou as plantas de *G. angustifolia* a serem aclimatizadas, não influenciou no aspecto morfológico das plantas aclimatizadas.

Todas as etapas da micropropagação de *G. magna* e *G. angustifolia*, descritas anteriormente estão ilustradas na Figuras 5 e 6, respectivamente.

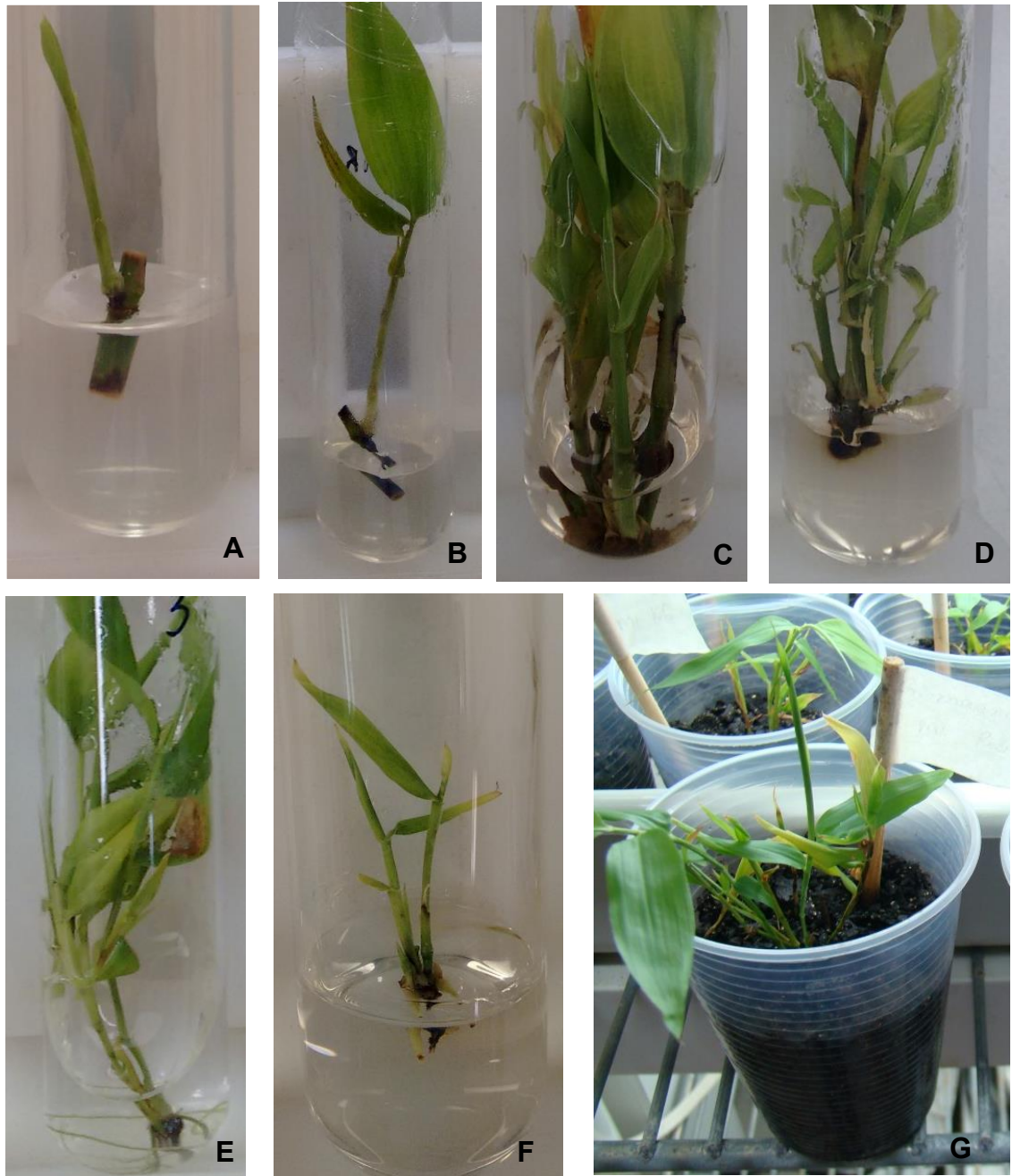
### 3.4 Fidelidade genética - ISSR

Para análise da fidelidade genética foram testados inicialmente 57 *primers*, entre os quais, apenas 20 *primers* permitiram à amplificação de 223 *locos* para *G. magna* e 230 *locos* para *G. angustifolia*. Através do dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA (agrupamento aos pares pela média aritmética não ponderada), após a avaliação da consistência dos nós pelo método de reamostragem bootstrap, da relação genética entre os clones de *G. magna* e *G. angustifolia* micropropagados *in vitro* (Figura 7) pode-se observar que as duas espécies pertencentes ao mesmo gênero, possuem 87% de similaridade entre si.

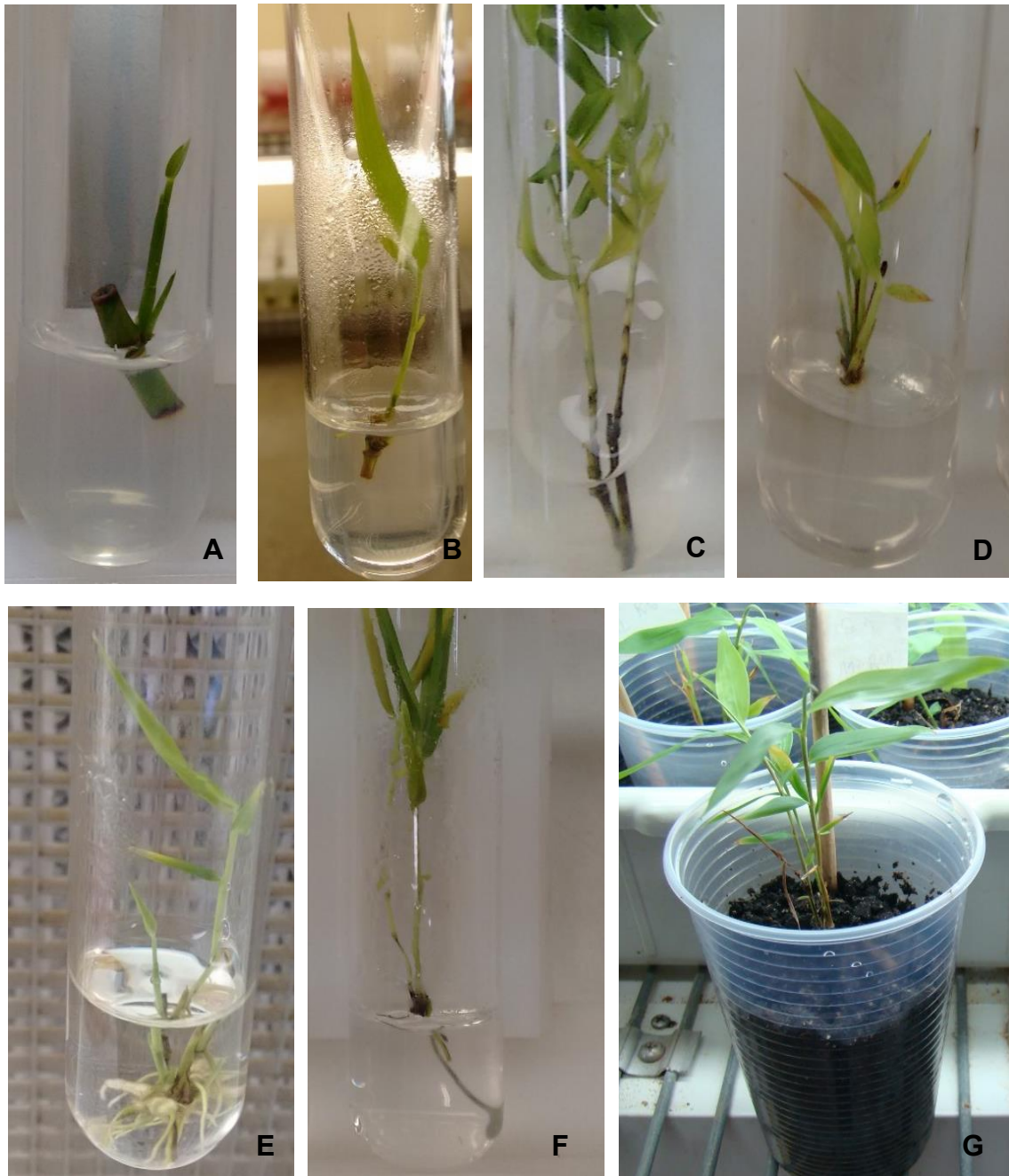
Entre os clones de *G. magna* não foi possível observar a ocorrência de polimorfismo entre os sistemas de cultivo ML e MSS (Figura 8). No entanto, é possível observar a ocorrência de dois grupos distintos dentro desta espécie, que englobam indivíduos micropropagados tanto em ML, quanto em MSS (Figura 7).

Já para *G. angustifolia* todos os clones produzidos se agruparam uniformemente e não foram observadas formação de bandas polimórficas pelos *primers* ISSR (Figura 9).

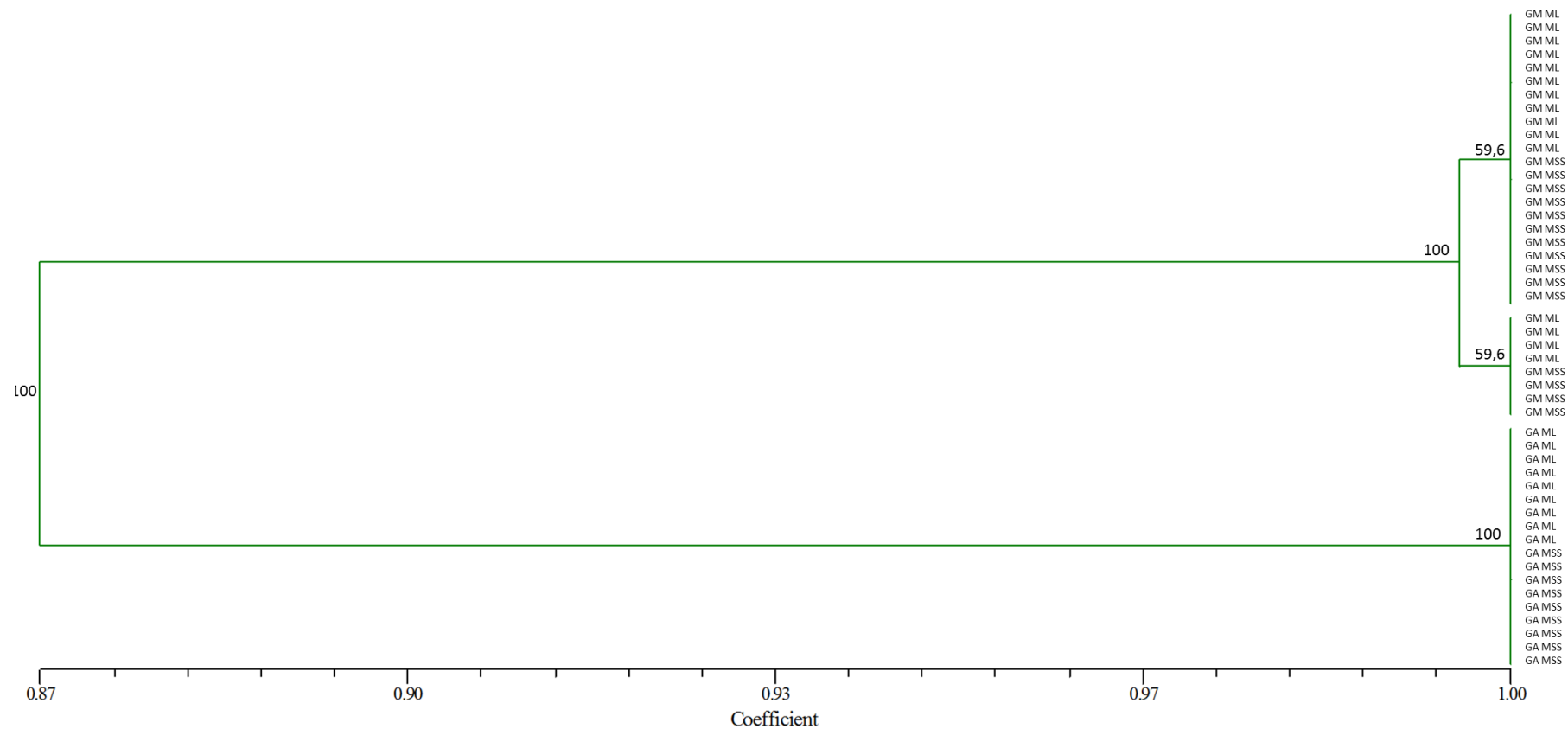




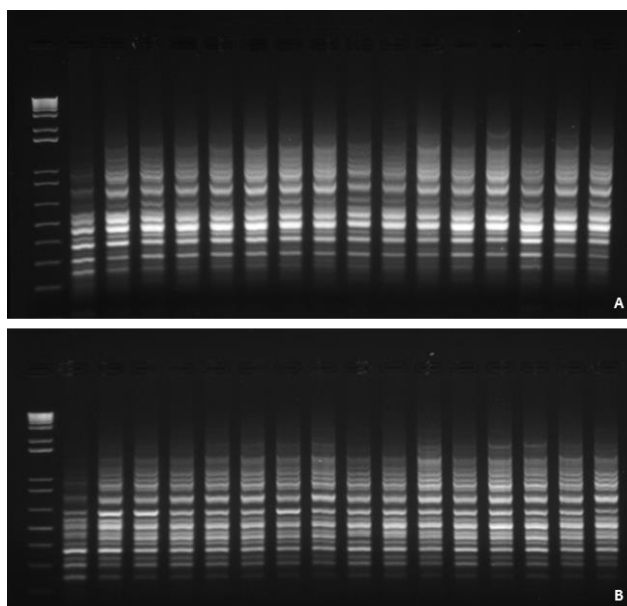
**Figura 5.** Aspecto geral da micropropagação de *Guadua magna*. **A** – Estabelecimento de segmentos nodais em meio de cultura aos 10 dias; **B** – Estabelecimento de segmentos nodais em meio de cultura aos 30 dias; **C** – Multibrotações após o 3º subcultivo em meio líquido; **D** – Multibrotações após o 3º subcultivo em meio semissólido; **E** – Enraizamento em meio líquido contendo 3 mg.L<sup>-1</sup> de AIB; **F** - Enraizamento em meio seissólido contendo 3 mg.L<sup>-1</sup> de AIB; **G** - Planta de bambu, oriundas da micropropagação em meio líquido após 30 dias do período de aclimatização.



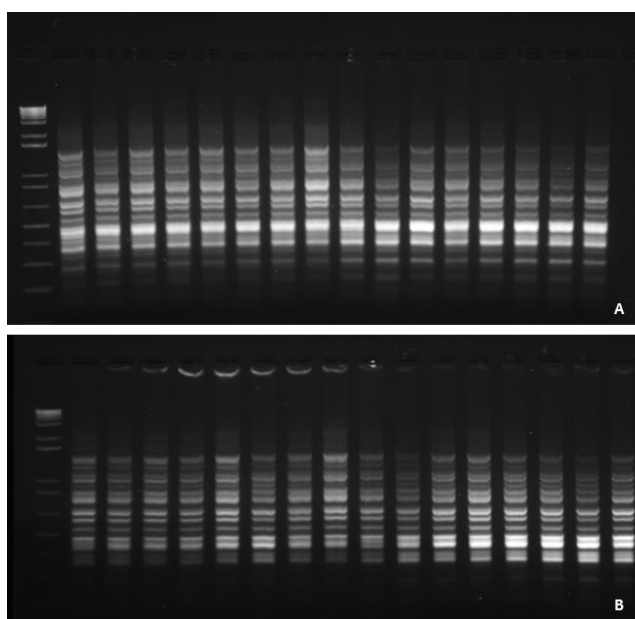
**Figura 6.** Aspecto geral da micropropagação de *Guadua angustifolia*. **A** – Estabelecimento de segmentos nodais em meio de cultura aos 10 dias; **B** – Estabelecimento de segmentos nodais em meio de cultura aos 30 dias; **C** – Multibrotações após o 3º subcultivo em meio líquido; **D** – Multibrotações após o 3º subcultivo em meio semissólido; **E** – Enraizamento em meio líquido contendo  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB; **F** - Enraizamento em meio seissólido contendo  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB; **G** - Planta de bambu, oriundas da micropropagação em meio líquido após 30 dias do período de aclimatização.



**Figura 7.** Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA da relação entre os clones de *Guadua magna* e *Guadua angustifolia* multiplicados *in vitro* em meio de MS na consistência líquida (ML) e na consistência semissólida (MSS). (GM ML – *Guadua magna* em consistência líquida; GM MSS – *Guadua magna* em consistência semissólida; GA ML – *Guadua angustifolia* em consistência líquida; GA MSS – *Guadua angustifolia* em consistência semissólida).



**Figura 8.** Análise da fidelidade genética de plantas de *Guadua magna* micropropagadas por multiplicação *in vitro* ao longo de cinco subcultivos. A – Primer 53zm na amplificação do DNA de 30 indivíduos, oriundos dos meios de multiplicação nas consistências MSS e ML. B - Primer 54zm na amplificação do DNA de 30 indivíduos, oriundos dos meios de multiplicação nas consistências MSS e ML.



**Figura 9.** Análise da fidelidade genética de plantas de *Guadua angustifolia* micropropagadas por multiplicação *in vitro* ao longo de cinco subcultivos. A – Primer 53zm na amplificação do DNA de 18 indivíduos, oriundos dos meios de multiplicação nas consistências MSS e ML. B - Primer 54zm na amplificação do DNA de 18 indivíduos, oriundos dos meios de multiplicação nas consistências MSS e ML.

#### 4. DISCUSSÃO

A micropropagação tem sido amplamente utilizada para propagação de várias espécies de bambu, principalmente as espécies de origem asiática (Mishra et al., 2008; Negi; Saxena, 2011; Singh et al., 2012; Waikhon; Louis, 2014). No entanto, espécies americanas como o *Guadua angustifolia* e, principalmente, *Guadua magna* ainda não contam com protocolos eficientes de micropropagação, devido a problemas no estabelecimento, como necrose dos explantes, oxidação do material vegetal, bem como a contaminação por fungos e bactérias (Cruz et al., 2007). Ainda de acordo com estes autores, a própria anatomia das espécies lenhosas, contribui para a presença de microrganismos nos explantes a serem utilizados para o estabelecimento. Diante disso, se torna justificável a utilização de fungicidas em plantas matrizes, que terão seus explantes destinados a micropropagação, visando reduzir os focos de contaminação, antes do estabelecimento *in vitro*.

Buscando reduzir a contaminação durante a etapa de estabelecimento, vários autores têm relatado a utilização de fungicidas e de cloreto de mercúrio durante a desinfestação dos explantes (Ramanayake et al., 1997; Jiménez et al., 2006; Mishra et al., 2008; Singh et al., 2012), bem como a adição de agentes antifúngicos e bacteriostáticos ao meio de cultura. Jiménez et al. (2006), estudando *G. angustifolia* reduziram a contaminação de material de campo quando realizaram uma pré-desinfestação com fungicida Benomyl, assim como para o material oriundo de casa de vegetação, quando adicionaram PPM ao meio de cultivo. Ramanayake et al. (1997) reduziram a taxa de contaminação durante a micropropagação de segmentos nodais de *Dendrocalamus giganteus* ao adicionarem fungicida Benlate® no meio de cultura. No presente trabalho, a adição de fungicida e de PPM ao meio de cultivo, se mostrou como alternativa viável para redução da contaminação durante o estabelecimento *in vitro*, onde a contaminação não ultrapassou 30% quando se utilizou estes agentes.

As taxas de brotação, após 30 dias do estabelecimento *in vitro*, variaram entre 40 e 80% para *G. magna* e de 50 a 70% para *G. angustifolia*, mesmo nos meios em que houve a adição de fungicida e PPM, respectivamente, que de certa forma poderiam acarretar algum efeito fitotóxico aos explantes. As percentagens de brotação foram bem superiores as relatadas por Jiménez et al. (2006), que obtiveram apenas 13% de brotação no meio com ausência de BAP e 37,5% em meio suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, quando realizaram a micropropagação de *G. angustifolia*.

Jiménez et al. (2006) e Devi et al. (2012) relataram que, ao suplementarem o meio de MS com 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, as taxas de multiplicação são maiores do que quando utilizaram este regulador em concentrações mais elevadas ou mais baixas durante a multiplicação de *D.*

*membraneceus* e *G. angustifolia*, respectivamente. Estes mesmos autores, relataram que multiplicação é mais efetiva quando realizada a partir de touceiras, com conjuntos de 3-5 brotos. No entanto, em nosso trabalho, principalmente para *G. magna* foi possível realizar a multiplicação a partir de segmentos nodais isolados, ou seja, por microestacas (dados não mostrados).

Durante o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, principalmente na etapa de multiplicação é essencial a renovação do meio de cultivo, principalmente do meio líquido, visando evitar a liberação de compostos fenólicos no meio e, conseqüentemente, a necrose dos explantes (Negi; Saxena, 2011; Mudoi et al., 2013). De acordo com o descrito com Sandhu et al. (2017), a transferência regular para o meio fresco é essencial para manter o crescimento e o vigor dos brotos e evitar a oxidação fenólica. Tanto para *G. magna* quanto para *G. angustifolia*, com a renovação do meio cultivo a cada 30 dias, observou-se pouca ou nenhuma deposição de compostos fenólicos no meio. No entanto, foi observado um escurecimento na base dos explantes, principalmente, quando em contato com o meio.

Para a maioria das variáveis avaliadas ao longo dos subcultivos, os meios de consistências líquida e semissólida se comportaram estatisticamente iguais. Apesar de o meio líquido ter apresentado médias superiores que o semissólido, para algumas variáveis. Negi e Saxena (2011) ao realizarem a micropropagação de *Bambusa balcooa*, relatam que o meio líquido permitiu maior taxa de multiplicação do que o meio semissólido. Além disso, os autores descreveram ainda, a ocorrência de hiperhidricidade nos explantes, depois de cultivos subsequentes no meio líquido, o que não foi observado durante os cultivos subsequentes das espécies neste estudo.

Ao final do quinto subcultivo, observou-se uma queda acentuada do desenvolvimento das plantas, quando comparadas aos subcultivos anteriores. Esse fato corrobora com Mishra et al. (2008) que descrevem uma diminuição drástica da taxa de multiplicação de *Bambusa tulda* após o quinto subcultivo, com a ocorrência de brotos amarelados e atrofiados. Devi et al. (2012) também relataram decréscimo na multiplicação de *Dendrocalamus membraneceus* após o quinto subcultivo. Dessa forma, pode-se inferir que a multiplicação destas espécies por cinco subcultivos ou mais, não é efetiva para produção de novas plantas

A estimativa de produção de mudas ao final dos cinco subcultivos possibilitou visualizar a maior eficiência do meio líquido na multiplicação de *G. magna* e *G. angustifolia*, quando comparado ao meio semissólido, tanto para utilização de segmentos nodais ou de brotos como fonte de explantes.

Durante a etapa de enraizamento, é comum o uso de diferentes auxinas que diferem nas suas atividades fisiológicas, dependendo da extensão em que elas se movem através dos tecidos,

se mantêm ligadas ao interior da célula ou são metabolizadas (Singh et al., 2012). A utilização da concentração de 3 mg.L<sup>-1</sup> de AIB em meio de MS com metade da concentração de sais não possibilitou uma formação de raízes satisfatórias para ambas as espécies. Assim como demonstrado por Waikhom e Loius (2014), que descreveram valores semelhantes ao utilizarem esta mesma concentração de AIB no enraizamento de *Bambusa tulda* (45%) e *Melocanna bacífera* (55%). Mishra et al. (2008), mesmo utilizando diferentes concentrações de AIB para enraizamento de *Bambusa tulda*, não conseguiram uma percentagem de enraizamento superior a 60%.

Sandhu et al. (2017) relata que a etapa de enraizamento é um passo fundamental de qualquer sistema de propagação *in vitro* de bambu. Dessa forma, é imprescindível a realização de novos experimentos com diferentes auxinas em diferentes concentrações para selecionar a mais indicada para o enraizamento de *G. magna* e *G. angustifolia*, buscando otimizar o protocolo para enraizamento obtido até o momento.

Na etapa de aclimatização, as plantas enraizadas demonstraram boa adaptação ao novo ambiente e desenvolveram-se de forma satisfatória, produzindo plantas que podem ser transplantadas para o campo. O sucesso na etapa de aclimatização, pode determinar a eficiência do protocolo de micropropagação.

Durante a propagação *in vitro* há sempre a possibilidade de ocorrer variação genética (Negi; Saxena, 2011; Goyal et al., 2014). No entanto, no presente estudo, mesmo após cinco subcultivos subsequentes, não foi observada a ocorrência de bandas polimórficas entre as consistências de meio ML e MSS utilizadas para produção dos clones. Assim como descrito por Singh et al. (2012) e Goyal et. al (2014) para *Dendrocalamus asper*, Negi e Saxena (2011) para *Bambusa nutans* e Negi e Saxena (2010) para *Bambusa balcooa* que descreveram o mesmo padrão de bandas monomórficas, quando utilizaram marcadores ISSR.

Apesar dos clones de *G. magna* terem sido agrupados em dois grupos distintos com cerca de 99,5% de similaridade, não se pode inferir que seja referente à variação somaclonal, pois durante a fase de estabelecimento foram utilizadas cinco matrizes oriundas de sementes, com fonte de explantes. Dessa forma, essa distinção observada pode ser com relação a estas matrizes. Diante disso, torna-se imprescindível para trabalhos futuros, manter a identificação das plantas que servirão de fonte de explantes, para garantir a confiabilidade dos dados obtidos.

## 5. CONCLUSÕES

Para duas espécies objeto do estudo (*G. magna* e *G. angustifolia*) a adição de fungicida Carbendazin e de PPM ao meio de MS, auxiliam consideravelmente para a redução das taxas de contaminação e, não influenciam nas taxas de brotação, quando comparadas ao meio de MS.

Durante a etapa de multiplicação, após cinco subcultivos, o meio líquido garante maior produção de mudas por explante, que o meio semissólido para as duas espécies estudadas.

Durante o enraizamento a utilização de AIB na concentração de 3 mg.L<sup>-1</sup> produz baixas percentagens de enraizamento para *G. magna* e para *G. angustifolia*. No entanto, as raízes formadas durante esta etapa, permitem altas taxas de sobrevivência das plantas aclimatizadas.

As duas espécies de *Guadua*, apresentam características promissoras para micropropagação, utilizando o protocolo descrito neste trabalho, garantindo a produção de mudas em larga escala.

O uso de marcadores ISSR, permitiu verificar a similaridade de 87% entre as duas espécies e ausência de polimorfismo entre os clones obtidos em meio de multiplicação ML e MSS.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAMBOO PHYLOGENY GROUP - BPG. An update tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, Vol.24, n.1, p.1-10, 2012.

CLAYTON, W.D.; VORONTSOVA, M.S; HARMAN, K.T.; WILLIAMSON, H. **Grass Base - The Online World Grass Flora**. 2006. Disponível em: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. Acessado em: 08 de Junho de 2016.

CRUZ, M.; GARCÍA, Y.; SÁNCHEZ C.; ALVARADO, Y.; ACOSTA, M.; ROQUE, B.; LEIVA, M.; FREIRE, M. Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. **Biotecnología Vegetal**, Vol.7, n.1, p.9-13, 2007.

DEVI, W.S.; BENGYELLA, L.; SHARMA, G.J. *In vitro* seed germination and micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro using seeds. **Biotechnology**, 2012. DOI: 10.3923/biotech.2012.

DOYLE, J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Vol.12, p.13-15, 1990.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Vol. 35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FILGUEIRAS, T.S.; LONDOÑO, X. A giant new *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) from Central Brazil. **Anais: I Seminário Nacional do Bambu**, 2006. 2 ed. Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, 2011. p.27-32.

FILGUEIRAS, T.S.; VIANA, P.L. Bambus brasileiros: morfologia, taxonomia, distribuição e conservação. In: DRUMOND, P.M.; WIDEMAN, G (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH, 2017. p.10-27.

GARCÍA, M.B.; ARALUCE, C.R.; RUBIO, Y.C.; RODRIGUEZ, S.M.; FERIA, R.V. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. **Biotecnología Vegetal**, Vol.4, n. 4, p.237-242, 2004.

GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; FREIRE-SEIJO, M.; PÉREZ, B. R.; HURTADO, O. Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. em diferentes épocas del año. **Biotecnología Vegetal**, Vol.10, n.3, p.151-156, 2010.

- GIELIS, J.; OPRINS, J. **Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality**. 2002. Disponível em: [www.oprins.be](http://www.oprins.be). Acesso em: 02 de Julho de 2015.
- GOYAL, A.K.; PRADHAN, S.; BASISTHA, B.C.; SEN, A. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. **Biotechnology**, Vol. 5, n. 4, p. 473-482, 2015. DOI 10.1007/s13205-014-0244-7
- JIMÉNEZ, V. M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Vol. 86, p.389-395, 2006.
- JUDZIEWICZ, E. J.; CLARK, L. G.; LONDOÑO, X.; STERN, M. **American bamboos**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution. 1999. 392p.
- LONDOÑO, X. La Subtribu Guaduinae de América. **Anais: Simpósio Internacional Guadua**. Pereira, Colômbia, 2004.
- MENDONZA, M.R.; TAMAYO, A.C.; PACHECO, A. Establecimiento de um protocolo para la multiplicación *in vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*): Fase 1. **Tierra Tropical**, Vol. 6, n. 2, p.191-199. 2010.
- MISHRA, Y.; PATEL, P. K.; YADAV, S.; SHIRIN, F.; ANSARI, S. A. A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. **Scientia Horticulturae**, Vol.115, p.315-318, 2008.
- MUDOI, K.D.; SAIKIA, S.P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal Biotechnology**, Vol. 12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Vol. 15, p.473-497, 1962.
- NADHA, H.K.; KUMAR, R.; SHARMA, R.K.; ANAND, M.; SOOD, A. Evaluation of clonal fidelity of *in vitro* raised plants of *Guadua angustifolia* Kunth using DNA-based markers. **Journal of Medicinal Plants Research**, Vol.5, n.23, p.5636-5641, 2011.
- NEGI D.; SAXENA, S. Ascertaining clonal fidelity of tissue culture raised plants of *Bambusa balcooa* Roxb. using inter simple sequence repeat markers. **New Forest**, Vol. 40, p. 1–8, 2010.
- NEGI, D.; SAXENA, S. Micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through axillary shoot proliferation. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Vol. 47, p. 604-610. 2011.

- RAMANAYAKE, S.M.S.D. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. **Plant Science**, Vol. 129, p.213-223, 1997.
- RAMÍREZ, L.A.; CASTAÑO, S.M.; LÓPEZ, R. Identificación de Bacterias que afectan el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. **Revista Investigaciones Universidad del Quindío**, Vol. 19, p.151- 158, 2009.
- SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Vol. 0, n. 0, p. 0, 2017.
- SHIRASUNA, R.T. *Guadua* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB106301>>. Acesso em: 16 Mai. 2016.
- SILVA, R. M. C. 2005. **O bambu no Brasil e no mundo**. Disponível <[http://www.embambu.com.br/imagens/bambu\\_brasil\\_mundo.pdf](http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo.pdf)> Acesso: Jan/2014.
- SINGH, S.R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* [(Schult. & Schult. F.) Backer ex k. Heyne]: an exotic edible bamboo. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 21, n. 2, p. 220-228, 2012. DOI 10.1007/s13562-011-0095-9
- WAGHMARE, V.N.; BAGDE, U.S. Random amplified polymorphic DNA based genetic charecterization of four importante species of bamboo, found in Raigad district, Maharashtra State, India. **African Journal Biotechnology**, Vol. 12, n. 28, p. 4446-4452, 2013. DOI: 10.5897/AJB2013.12033.
- WAIKHOM, S.D.; LOUIS, B. An Effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melocanna baccifera*) through nodal culture. **Scientific World Journal**, Vol. 2014, 8p. 2014. DOI: [dx.doi.org/10.1155/2014/345794](https://doi.org/10.1155/2014/345794).

## **CAPÍTULO V**

### **MICROPROPAGAÇÃO DE *Guadua magna* (POACEAE, BAMBUSOIDEAE) E ANÁLISE MOLECULAR POR ISSR DOS CLONES REGENERADOS**

## RESUMO

Neste trabalho objetivou-se desenvolver um protocolo eficiente para micropropagação de *Guadua magna*, com etapas de estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização bem definidas, garantido a produção de clones idênticos à planta-matriz e livres de variações somaclonais. Para tanto, utilizou-se sementes coletadas em áreas naturais, que foram desinfestadas com hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}_2$ ), cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) e fungicida sistêmico Carbendazin, isolados ou em combinação, e que também foram adicionados ao meio de cultivo. Para a multiplicação foram avaliadas as citocininas (CKs): 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (Kn) e metatopolina (mT), nas concentrações 0,0; 6,66, 13,32, 19,98 e 26,64  $\mu\text{M}$  em meio de MS líquido. Ao final desta etapa realizou-se a quantificação de clorofila e a análise de fidelidade genética com auxílio de marcadores ISSR para os melhores tratamentos. Nesse estudo também foram avaliados os sistemas de cultivo semissólido (MSS), líquido estacionário (MLE) e líquido sob agitação (MLA), com 6,66  $\mu\text{M}$  de mT e explantes de diferentes posições do broto. O enraizamento das microestacas foi realizado em meio de MS semissólido com as auxinas: ácido indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB), nas concentrações de 0,0; 1,23; 2,45; 4,90; 9,80 e 14,70  $\mu\text{M}$ . Também foram avaliadas as concentrações de sais do meio de MS (MS1/4, MS1/2, MS3/4 e MS) e explantes de diferentes posições do. Ao final da etapa de enraizamento as plantas foram aclimatizadas e avaliadas quanto a sobrevivência. Verificou-se que o hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio e fungicida sistêmico Carbendazin podem ser utilizados para desinfestação de sementes e no meio de cultivo, sem interferir na germinação. Durante a multiplicação, as melhores taxas de multiplicação foram obtidas com a metatopolina na concentração de 6,66  $\mu\text{M}$  e utilizando-se explantes da base do broto em meio líquido. Brotações oriundas de meio de multiplicação com Kn apresentaram menores teores de clorofila. A realização de cinco subcultivos não induziu a ocorrência e variações somaclonais nas brotações de *G. magna*. O AIB na concentração 4,90  $\mu\text{M}$  induziu a melhor taxa de enraizamento, independente da concentração de sais do MS. Plantas inteiras com raízes e parte aérea bem desenvolvidas apresentaram até 100% de sobrevivência durante a aclimatização.

**Palavras-chave:** Germinação, propagação, citocininas, auxinas, fidelidade genética

## ABSTRACT

The objective of this work was to develop an efficient protocol for *Guadua magna* micropropagation, with well-defined of establishment, multiplication, rooting and acclimatization stages, guaranteeing the production of clones identical to the mother plants and free of somaclonal variations. For this purpose, seeds collected in natural were disinfested with sodium hypochlorite (NaOCl<sub>2</sub>), mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>) and Carbendazin® fungicide, alone or in combinations, which were also added to the culture medium. For the multiplication, it was evaluated the cytokinins (CKs) 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (Kn) and meta-Topoline (mT), at 0.0; 6.66, 13.32, 19.98 and 26.64 µM in liquid MS medium. At the end of this stage, the chlorophyll quantification and genetic fidelity analysis by ISSR of the multiplied plants were performed. In this study, semi-solid (MSS), liquid stationary (MLE) and liquid under agitation (MLA) systems, added with 6.66 µM mT besides the explant origin according different shoot positions were evaluated (1st node, 2nd node, 3rd node, bud base and initial bud). The shoot rooting was performed in semi-solid MS medium with the auxins: indoleacetic acid (IAA), naphthaleneacetic acid (NAA) and indolebutyric acid (IBA), at concentrations of 0.0; 1.23; 2.45; 4.90; 9.80 and 14.70 µM. In this stage, the concentrations of MS salts (1/4MS, 1/2MS, 3/4MS and full MS) and explants from different bud positions in the shoot were also evaluated. At the end of the rooting stage the plants were acclimatized and evaluated for survival. It was verified that sodium hypochlorite, mercury chloride and the Carbendazin fungicide can be used for seed disinfestation in the culture medium, without interfering with germination. During multiplication, the best multiplication rates were obtained in liquid medium with mT at 6.66 µM and using explants of the shoot base. Shoots from multiplication medium with Kn had the lowest levels of chlorophyll. The realization of five subcultures did not induce the occurrence and somaclonal variations in shoots of *G. magna*. AIB at 4.90 µM induced the best rooting rate, independently of MS salts concentration. Whole plants with well-developed roots and aerial parts showed up to 100% survival during acclimatization.

**Keywords:** Germination, propagation, cytokinins, auxins, genetic fidelity

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país do continente americano com a maior diversidade de espécies de bambus (Grombone-Guaratini et al., 2011), com ocorrência de 35 gêneros e 258 espécies de bambus nativos, distribuídos em duas tribos: Olyreae e Bambuseae, (Filgueiras et al., 2015). De fato, representantes desta gramínea podem ser encontrados nos principais biomas brasileiros, como na Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Filgueiras et al., 2015).

Dentre os bambus lenhosos da tribo Bambuseae, o gênero *Guadua* Kunth que é endêmico das Américas (Londoño, 2004), é terceiro maior em ocorrência no Brasil (Filgueiras; Santos-Gonçalves, 2004), com 19 espécies nativas reconhecidas, sendo cinco destas endêmicas (Filgueiras; Viana, 2017). Entre estas espécies endêmicas, está o *Guadua magna* que ocorre em margens de rios ao longo de matas ciliares do Brasil Central e ainda não foram descritas em outras localidades, o qual regionalmente é conhecido como “Taquaruçu”. *G. magna* possui excelentes características para potenciais aplicações na engenharia civil, habitação, fabricação de móveis e usos gerais (Filgueiras; Londoño, 2006). No entanto, por se tratar de uma espécie endêmica, há pouco descrita, ainda existem poucos estudos relacionados a hábitos, biologia, propagação e usos de forma geral.

Sabe-se que a propagação convencional de bambus pode ser feita por meio de sementes, colmos, rizomas ou secção de colmos (Azzini et al., 1978; Devi; Singh, 2009). O hábito de florescimento gregário e a baixa viabilidade das sementes, torna incerta a propagação por sementes (Bag et al., 2000). As demais técnicas, apesar de serem amplamente aplicadas para propagação em larga escala, apresentam o inconveniente de demandar grandes quantidades de material e espaço físico (Gielis et al., 2002; Silva, 2005), o que as tornam onerosas e de baixo rendimento (Azzini et al., 1978; Devi; Singh, 2009).

Neste contexto, a cultura de tecidos possui um enorme potencial, oferecendo vantagens sobre as técnicas de propagação vegetativa convencionais (Jiménez et al., 2006; Ramanayake et al., 2006; García-Ramírez et al., 2010). Abrange ferramentas que auxiliam na propagação de bambus de forma efetiva, a partir da utilização de órgãos de plantas doadoras, com a vantagem de manter a identidade genética do material propagado e capaz de produzir mudas em larga escala (Nogueira et al., 2017). Para tanto, utilizam uma pequena quantidade de material propagativo de diferentes fontes de explantes (Menezes et al., 2012; Anand et al., 2013), em meios de cultura específicos, combinados com reguladores de crescimento, em condições assépticas, de luminosidade e temperatura controladas (Grattapaglia; Machado, 1998; Singh et

al., 2013), bem como meios para enraizamento, rustificação e aclimatização de plantas micropropagadas (Shirin; Rana, 2007; Singh et al. 2012; Sharma; Sarma, 2013).

Dessa forma, a micropropagação deve ser constituída essencialmente de cinco etapas distintas, porém dependentes: 1) seleção de plantas matrizes; 2) estabelecimento *in vitro* de cultivos; 3) multiplicação/proliferação de brotos; 4) enraizamento e; 5) aclimatização (Nogueira et al., 2017). No entanto, pode apresentar alguns problemas, como contaminação por fungos e bactérias, que podem ocorrer de forma superficial ou sistêmica, necrose dos explantes durante a multiplicação, hiperhidricidade, oxidação dos meios de cultivo, ocorrência de variações somaclonais, bem como baixa percentagem de enraizamento e sobrevivência durante a fase de aclimatização (Lin; Chang, 1998; Kevers et al. 2004; Ramanayake et al., 2006; Jiménez; Guevara, 2007; Dutta-Mudoj et al. 2009; Banerjee et al., 2011; Negi; Saxena, 2011; Singh et al., 2013; Waikhom; Louis, 2014).

A etapa da micropropagação responsável pela proliferação dos explantes, produzindo maior número de plantas em menor tempo possível é a multiplicação. Durante esta etapa, citocininas (CK) são amplamente utilizadas para proliferação de brotos de bambus, especialmente a 6-benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (Kn) (Arya et al., 1999; Banerjee et al., 2011; Singh et al., 2012; Dutta-Mudoj et al., 2013) e mais recentemente, a meta-topolina [6-(3-hidroxibenzilamino)purina] (mT) uma CK aromática, tem sido utilizada para melhorar os protocolos de micropropagação de espécies de interesse econômico (Werbrouck et al., 1996; Niedz; Evens, 2010; 2011; Wojtania, 2010; Montalbán et al., 2011; Gentile et al., 2016).

Ainda durante a etapa de multiplicação, a utilização do meio líquido pode proporcionar alta eficiência para a micropropagação de diversas espécies vegetais, inclusive diferentes espécies de bambus (Ramanayake et al., 2008; Devi et al., 2012; Nogueira et al., 2017). Por serem rapidamente preparados, menos custosos e proporcionarem maior homogeneidade (Siqueira et al., 2013). Facilitando dessa forma, inúmeros subcultivos que podem ocorrer para renovação dos constituintes do meio, evitando o acúmulo de compostos deletérios como o etileno e polifenóis e, até se atingir o número desejado de plantas, com idêntica composição genética da planta-matriz (clone) (Nogueira et al., 2017).

Progressos consideráveis têm sido obtidos em protocolos de micropropagação desenvolvidos para várias espécies de bambus. *Bambusa balcooa* (Das; Pal, 2005; Sharma; Sarma, 2011), *Guadua angustifolia* (Jiménez et al., 2006), *Bambusa glaucenscens* (Shirin; Rana, 2007), *Dracaena sanderiana* (Gradaille et al., 2010), *Bambusa nutans* (Ndiaye et al., 2006; Mehta et al., 2010), *Bambusa vulgaris* (García-Ramirez et al., 2010; Negi; Saxena, 2011), *Bambusa balcooa* (Dutta-Mudoj; Borthakur, 2009; Sharma; Sarma, 2011), *Dendrocalamus asper* (Singh et al., 2012) e *Bambusa bamboos* (Anand et al., 2013). Em todos estes estudos os



protocolos foram eficientes para a propagação *in vitro* das espécies de bambu. No entanto, alguns protocolos não são reproduzíveis na sua totalidade, principalmente, devido as características intrínsecas de cada espécie. Elucidando dessa forma, a importância de se desenvolver protocolos específicos e eficientes para espécies que apresentam características de interesse econômico e ainda pouco estudadas, como acontece com *G. magna*.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente abrangendo todas as etapas de micropropagação, utilizando sementes de *G. magna* como explante inicial, definindo procedimentos para o estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização. Ao final do processo, as plantas produzidas foram avaliadas quanto à fidelidade genética por marcadores ISSR.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 *Material vegetal*

As sementes de *Guadua magna* foram coletadas em novembro de 2014, em tabocais próximos ao rio Crixás-Açu, em Santa Teresinha (GO). Foram retiradas sementes de seis touceiras de uma mesma população (Touceira 1: 14°18'04,92"S – 49°33'23,81"O; Touceira 2: 14°18'11,65"S – 49°33'19,46"O; Touceira 3: 14°18'11,70"S – 49°33'18,99"O; Touceira 4: 14°18'11,14"S – 49°33'22,81"O; Touceira 5: 14°18'12,93"S – 49°33'28,59"O; Touceira 6: 14°18'11,16"S – 49°33'27,96"O). O material coletado foi depositado no herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF. Após a coleta, realizou-se a seleção e a retirada manual das cariopses, descartando as sementes chochas.

### 2.2 *Determinação de protocolos para desinfestação de sementes*

Inicialmente, as sementes passaram por uma etapa de pré-desinfestação, utilizando água e detergente comercial sob agitação por 30 minutos, e posterior lavagem com água corrente por três minutos. Em capela de fluxo laminar, as sementes foram mergulhadas em álcool 70% por um minuto e logo após, colocadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl<sub>2</sub>), cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) e o fungicida sistêmico Carbendazin<sup>®</sup>, sozinhos ou em combinação e em diferentes concentrações. Os tratamentos utilizados, estão descritos na Tabela 1.

Após o tempo de desinfestação de cada tratamento, os explantes foram lavados três vezes com água destilada e autoclavada e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL meio de cultura para o cultivo das sementes. Como meio de cultura foi utilizado o meio de MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO).

Os testes com os agentes desinfestantes, foram divididos em dois experimentos. O experimento 1 foi executado logo após a coleta das sementes. Já o experimento 2 foi realizado aproximadamente após 30 dias, observando-se os resultados obtidos no primeiro experimento. Durante o intervalo dos dois experimentos as sementes foram acondicionadas em sacos de papel e armazenadas a 5 °C, com cerca de 21% de umidade.

As avaliações de germinação, contaminação, comprimento da parte aérea e comprimento da raiz foram realizadas aos 7, 14, 21, 28 e 60 dias após a inoculação das sementes no meio de cultivo de MS.

**Tabela 1.** Tratamentos de desinfestação de sementes de *Guadua magna* para cultivo *in vitro*

Experimento	Tratamento	Agente desinfestante	Tempo (minutos)	Fungicida	Tempo (minutos)
1	H	Hipoclorito de sódio (NaOCl <sub>2</sub> ) 12%	10'		
1	H+F	Hipoclorito de sódio (NaOCl <sub>2</sub> ) 12%	10'	Carbendazin 0,1%	10
1	M	Cloreto de Mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) 0,1%	5'		
1	M+F	Cloreto de Mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) 0,1%	5'	Carbendazin 0,1%	10
2	H+M	Hipoclorito de sódio (NaOCl <sub>2</sub> ) 12% + Cloreto de Mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) 0,1%	10' – 5'		
2	H+M+F10'	Hipoclorito de sódio (NaOCl <sub>2</sub> ) 12% + Cloreto de Mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) 0,1%	10' – 5'	Carbendazin 0,1%	10
2	H+M+F60'	Hipoclorito de sódio (NaOCl <sub>2</sub> ) 12% + Cloreto de Mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) 0,1%	10' – 5'	Carbendazin 0,1%	60
2	H+M+F16h	Hipoclorito de sódio (NaOCl <sub>2</sub> ) 12% + Cloreto de Mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) 0,1%	10' – 5'	Carbendazin 0,1%	16 horas
2	H2,5	Hipoclorito de sódio (NaOCl <sub>2</sub> ) 2,5%	20'		

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituído por quatro tratamentos para o experimento 1 e por cinco tratamentos no experimento 2. Cada tratamento foi constituído por 10 repetições com 2 tubos por repetição contendo uma semente cada tubo de ensaio.

### 2.3 Multiplicação de plântulas oriundas da germinação

As plântulas obtidas da germinação de sementes de *G. magna* e livres de contaminação foram mantidas em meio de multiplicação líquido, constituído de sais de MS suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 13,32 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP), de acordo com o proposto por Jiménez et al., (2006). Inicialmente, plantas com cerca de 4,0 cm de altura foram multiplicadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio. Quando ocorreu a multiplicação e o desenvolvimento das plantas em forma de touceiras (aglomerados de brotos) com cerca de cinco de brotos, houve a transferência destas brotações para frascos pequenos com capacidade de 250 mL e contendo 30 mL de meio. Em seguida, as touceiras com mais de

10 brotos foram transferidas para frascos maiores com capacidade de 750 mL e contendo 100 mL de meio, mantendo a mesma formulação do meio de cultivo.

Durante a multiplicação as brotações foram mantidas por 30 dias em cada recipiente (tubos de ensaio, frascos pequenos, frascos maiores) antes da troca de recipiente e renovação do meio. Quando as brotações foram colocadas nos frascos maiores, realizou-se seis subcultivos com renovação do meio a cada 30 dias, com remoção das partes mortas ou senescentes da brotação e divisão das brotações maiores (com mais de 10 brotos) em outras menores, mantendo pelo menos um aglomerado de três brotos. A multiplicação das plântulas oriundas da germinação, foi realizada com o objetivo de manter um estoque de plantas para utilização nos experimentos seguintes.

#### *2.4 Indução de multiplicação de brotações através de citocininas em diferentes concentrações*

Segmentos nodais contendo uma gema e com cerca de 1,0 centímetro, obtidos de brotações mantidas em meio de multiplicação estoque, foram utilizados como fonte de explante e cultivados em meio líquido contendo sais de MS, acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e as citocininas (CK) 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (Kn) e meta-topolina (mT) nas concentrações de 0; 6,66; 13,32; 19,98 e 26,64 µM. Os explantes foram cultivados em 30 mL de meio, distribuídos em frascos com capacidade de 250 mL.

As avaliações referentes a taxa de brotação (segmentos nodais com brotação/segmentos nodais inoculados) foram realizadas somente ao final do primeiro subcultivo, uma vez, que nos demais subcultivos não foram inoculados segmentos nodais, mas, mantidas as brotações produzidas. Variáveis como número e altura de brotos, número de nós, número de folhas, percentagem de formação de raízes, número de raízes e comprimento de raízes foram medidas a cada 30 dias, por um período de cinco subcultivos.

Neste experimento, os tratamentos foram compostos por cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo quatro explantes. As repetições foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5, sendo três tipos de citocininas em cinco concentrações diferentes para cada subcultivos separadamente, totalizando 15 tratamentos. Este experimento completo foi executado por duas vezes, sendo que os dados foram obtidos da média destas duas repetições biológicas.

##### *2.4.1 Quantificação de clorofila e carotenoides em plantas micropropagadas*

Ao final do quinto subcultivo do experimento de multiplicação foram selecionados os tratamentos com 0,0; 6,66 e 13,32 µM de BAP, Kn e mT para dosagem de clorofila. Como

alguns dos demais tratamentos não apresentaram folhas em quantidade e tamanho suficientes para realização desta análise, optou-se pela avaliação dos tratamentos que, de maneira geral, possibilitaram melhores taxas de multiplicação.

No dia anterior a coleta do material vegetal fresco, foram preparados os recipientes para receber as amostras, de forma que eppendorfs de 2 mL preenchidos com 1,5 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) (Vetec) foram cobertos com papel alumínio para não ocorrer influência da luz. Para dosagem de clorofila, foi coletado um disco de 0,9 cm de diâmetro de cada amostra e colocado nos eppendorfs contendo DMF. Os eppendorfs foram mantidos em congelador a 4°C, sem presença de luminosidade por 48 horas para completa extração da clorofila.

Ao término das 48 horas realizou-se a leitura das absorbâncias (Ab) das amostras em comprimentos de onda de 664, 647 e 480 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, para determinar respectivamente as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides. Para o cálculo da concentração destes pigmentos, utilizou-se a fórmula de Welburn (1994):

$$Ca = 12,0 A_{664} - 3,11 A_{647}$$

$$Cb = 20,78 A_{647} - 4,88 A_{664}$$

$$Cx+c = (1000 A_{480} - 1,12 Ca - 34,07 Cb)/245$$

Onde:

Ca: quantidade de clorofila *a* em µg/ml

Cb: quantidade de clorofila *b* em µg/ml

Cx+c: quantidade de carotenoides em µg/ml

Os dados das concentrações foram transformados de µg/ml para µg/cm<sup>2</sup>, utilizando a fórmula:

$$\text{Concentração em } \mu\text{g/cm}^2 = \text{Concentração em } \mu\text{g/ml/área}$$

Onde:

$$\text{Área} = \pi * (0,9/2)^2$$

#### 2.4.2 Análise da fidelidade genética de clones micropropagados através de marcadores ISSR

Ao final do quinto subcultivo do experimento de multiplicação, amostras foram selecionadas dos tratamentos que possibilitaram a maior multiplicação ao longo dos subcultivos, além do tratamento controle, sendo selecionadas amostras de pelo menos 10 plantas de cada um dos tratamentos com 0,0; 6,66 e 13,32 µM de BAP, Kn e mT para verificação da fidelidade genética através da utilização de marcadores ISSR.

Para a extração do DNA foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (1990). Em tubos eppendorf de 2 mL identificados e com suas amostras correspondentes foram adicionados 100 mg de tecido congelado, oito beads magnéticas e adicionado 700  $\mu$ L do tampão CTAB+ 2-mercaptoetanol. A maceração pela vibração das beads foi realizada em Tissue Lyser por 120 segundos. Em seguida, as amostras foram misturadas em agitador tipo vortex por 10 segundos e incubadas em banho-maria a 65 ° C por 60 min; os tubos foram agitados de 10 em 10 min para facilitar a solubilização e homogeneização da suspensão. Em capela de exaustão, foi adicionado 600  $\mu$ L de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA 24:1) em cada tubo para auxiliar na purificação do DNA. Para a homogeneização das amostras, os eppendorfs foram agitados por 30 segundos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 min a 11.000 rpm.

Após a centrifugação foram retirados aproximadamente 540  $\mu$ L da fase sobrenadante e transferida para um novo eppendorf de 1,5 mL (previamente identificado) acrescentado de isopropanol gelado (400  $\mu$ L) e realizando a homogeneização das amostras. Em seguida, os tubos foram armazenados em freezer (-20°C) por 1h, agitando a cada 15 minutos, seguido por centrifugação a 12.000 rpm durante 10 min. O isopropanol foi descartado e o pellet de DNA lavado com 500  $\mu$ L de etanol 70%, sendo os tubos centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. Esta etapa foi realizada por duas vezes, seguida pela última lavagem com 500  $\mu$ L de etanol 100%, seguida por centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Os tubos foram mantidos abertos “overnight”, sob papel toalha e temperatura ambiente para secagem do DNA.

Após a secagem do DNA, o pellet foi então ressuspensionado em 100  $\mu$ L de tampão TE contendo RNase (1  $\mu$ l/100 mL de TBE). Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 1 hora, agitados em vortex antes e depois da incubação.

O DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo (13  $\mu$ l/90 mL de TBE 1X). Amostras muito concentradas foram diluídas para 3 ng/ $\mu$ l e permaneceram congeladas até amplificação por PCR.

As reações para amplificação do DNA foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems), onde foram efetuados 35 ciclos de amplificação, constituídos de uma etapa de iniciação de 5 minutos a 94 °C, seguido por uma etapa de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, uma etapa de ligação do primer ISSR ao DNA molde (pareamento) a 56 °C por 45 segundos, seguido por 1 min a 72°C e, ao final, a etapa de extensão a 72°C, por 7 minutos.

O volume total de cada amostra amplificada foi de 13  $\mu$ l: 3  $\mu$ l de DNA adicionados a 10  $\mu$ l de mix de reação PCR [1,3  $\mu$ l de tampão 10X (constituído de 500 mM de Tris-HCl pH 8,0; 200 mM de KCl; 2,5 mg mL<sup>-1</sup> de BSA; 200 mM de Tartazine e 1% de Ficol), 1,3  $\mu$ l de dNTP + 1,3  $\mu$ l de BSA (dNTP a 2,5 mM; BSA 2,5 mg/ml), 0,246  $\mu$ l de Taq polimerase (5  $\mu$ l/ml) e 3  $\mu$ l de primer (1,2 mM) e completado o volume final com água ultrapura. Os produtos da

amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo 15 µl/100ml em solução de TBE (Tris – base 0,1M, ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) 1X, a uma voltagem de 200 volts por 30 min. Posteriormente, os géis foram fotografados em luz UV no qual foi utilizado o marcador de DNA 1 kb “lader” (Invitrogen) para estimar o tamanho molecular dos fragmentos amplificados. Foram testados 57 primers em oito amostras de DNA, selecionadas aleatoriamente do conjunto total de 47 clones. Os onze primers que apresentaram melhor resolução e fragmentos mais polimórficos de DNA foram adotados e estão relacionados na Tabela 2.

Para análise dos marcadores ISSR, cada fragmento visualizado foi considerado um loco de DNA. Estes marcadores foram então avaliados como dados binários, utilizando-se “1” para indicar presença e “0” para indicar ausência do fragmento. Em seguida, os dados binários foram utilizados para estimar níveis de alteração genômica ocasionados em decorrência do cultivo *in vitro*.

Para tanto, foi dividido o número de mutações observadas (fragmentos polimórficos) pelo número total de fragmentos amplificados. Para a determinação do número de mutações, utilizou-se o princípio de que um fragmento é considerado polimórfico se estiver ausente em pelo menos um dos clones e presente nos demais ou presente em pelo menos um clone e ausente nos demais.

**Tabela 2.** *Primers* ISSR utilizados na análise de fidelidade genética de clones de *Guadua magna* produzidos após cinco subcultivos e suas respectivas sequencias

Quantidade	Código do Primer	Sequência do Primer (5' - 3')
1	11zm	<u>TGTCACACACACACACAC</u>
2	12zm	<u>GGTCACACACACACACAC</u>
3	15zm	<u>GTGCACACACACACACAC</u>
4	16zm	<u>CGGCACACACACACACAC</u>
5	51zm	<u>GCACCCACACACACACACACA</u>
6	53zm	<u>CGCAACACACACACACACACA</u>
7	54zm	<u>GGCTACACACACACACACACA</u>
8	57zm	<u>CGTCCACACACACACACACA</u>
9	59zm	<u>GGCCAGCTGCTGCTGCTGCTGCT</u>
10	3pv	GAGAGAGAGAGAGAGARG
11	9ps	ACACACACACACACACYA

Os nucleotídeos Y e R, inseridos nas sequencias dos *primers* 3pv e 9ps, representam a utilização de ambas pirimidinas (T e C) e ambas purinas (G e A), respectivamente. Sequencias sublinhadas representam os nucleotídeos ancorados nas extremidades 5' ou 3'.

## 2.5 Multiplicação de explantes oriundos de diferentes posições do broto em três sistemas de cultivo

Após a definição da melhor citocinina e concentração para indução de brotação dos segmentos nodais de *G. magna*, realizou-se este experimento para verificar qual sistema de

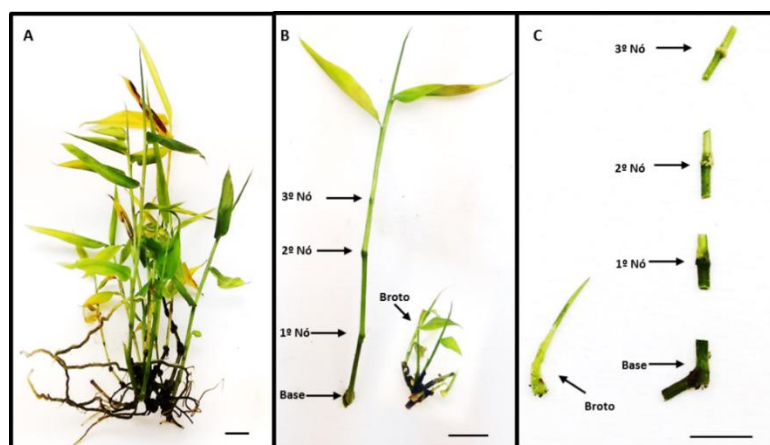
cultivo induz maior quantidade de brotações; e se a posição dos segmentos nodais no broto influencia a indução de brotações.

Segmentos nodais contendo uma gema e com cerca de 1,0 centímetro, obtidos de brotações mantidas em meio de multiplicação estoque, foram utilizados como fonte de explante e cultivados em meio líquido e meio semissólido contendo sais de MS, acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e suplementado com 6,66 µM de mT. Para a solidificação do meio semissólido, foi adicionado 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO).

Os explantes foram cultivados em 30 mL de meio, distribuídos em frascos com capacidade de 250 mL. Nesse experimento foram avaliados os sistemas de cultivo, constituídos pelo meio semissólido (MSS), meio líquido estacionário (MLE) e meio líquido sob agitação (MLA) (Bioblock Scientific, mod. Rotatest 75579). Neste estudo, também foi avaliada a brotação de explantes contendo uma gema, com relação na posição destes explantes no broto desenvolvido: 1º nó, 2º nó, 3º nó, base do colmo e broto inicial como ilustrado na Figura 1.

As avaliações referentes a taxa de brotação, número e altura de brotos, número de nós, além do número de folhas foram realizadas após 30 dias de cultivo.

Nesse experimento, os tratamentos foram compostos por cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo quatro explantes. As repetições foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5, sendo três sistemas de cultivo e cinco posições do explante no broto desenvolvido, totalizando 15 tratamentos. Este mesmo experimento foi realizado por duas vezes e os dados foram obtidos da média das duas repetições biológicas.



**Figura 1.** – Aspecto das brotações de *Guadua magna* utilizadas como fonte de explantes e posicionamento dos explantes no broto desenvolvido durante a multiplicação nos sistemas de cultivo: meio semissólido (MSS), meio líquido estacionário (MLE) e meio líquido agitação (MLA) A – Aspecto das brotações utilizadas como fonte de explantes. B – Aspecto de brotos desenvolvidos e brotos iniciais seccionados das brotações, com indicação da posição dos explantes no broto desenvolvido. C – Posição dos explantes (Broto, base, 1º nó, 2º nó e 3º nó) utilizados durante a multiplicação.



## *2.6 Enraizamento de microestacas utilizando auxinas em diferentes concentrações*

Segmentos nodais contendo uma gema e com cerca de 1,0 centímetro, obtidos de brotações mantidas em meio de multiplicação, foram utilizados como fonte de explante e cultivados em meio semissólido contendo sais de MS, acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO) e suplementado com ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indolacético (AIA) nas concentrações de 0; 1,23; 2,45; 4,90; 9,80; 14,70 µM. Os explantes foram cultivados em frascos com capacidade de 250 mL preenchidos com 30 mL de meio de cultura.

As avaliações referentes a percentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento de raízes foram realizadas após 60 dias em meio de enraizamento.

Os tratamentos foram compostos por cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo quatro explantes. As repetições foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 6, sendo três auxinas em seis concentrações diferentes, totalizando 18 tratamentos. Este mesmo experimento foi realizado por duas vezes e os dados foram obtidos da média das duas repetições biológicas.

## *2.7 Enraizamento de explantes oriundos de diferentes posições no broto em meio com sais de MS em diferentes concentrações*

Após definir a auxina e a concentração que permitiram melhor taxa de enraizamento, realizou-se o experimento para definir a concentração de sais de MS e o melhor tipo de explante, de acordo com a posição no broto.

Segmentos nodais contendo uma gema e com cerca de 1,0 centímetro, obtidos de brotações mantidas em meio de multiplicação, foram utilizados como fonte de explantes e cultivados em meio semissólido contendo sais de MS nas concentrações de MS1/4, MS1/2, MS3/4 e MS. Foi acrescido ao meio 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO) para a solidificação, além de 4,90 µM de ácido 3-indolbutírico (AIB). Neste experimento, também foram avaliados explantes oriundos de diferentes posições do broto desenvolvido: 1º nó, 2º nó, 3º nó, base do colmo e broto inicial, como já mostrado na Figura 1. Os explantes foram cultivados em 30 mL de meio, distribuídos em frascos com capacidade de 250 mL.

As avaliações referentes a percentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento de raízes foram realizadas após 60 dias em meio de enraizamento.

Os tratamentos foram compostos por cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo quatro explantes. As repetições foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5, sendo quatro concentrações de sais de MS

e cinco explantes de diferentes posição no broto, totalizando 20 tratamentos. Este mesmo experimento foi realizado por duas vezes e os dados foram obtidos da média das duas repetições biológicas.

### 2.8 *Condições de cultivo in vitro*

Todos os meios utilizados nos experimentos tiveram o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  a  $1,5\text{ atm}$  por 20 minutos. Em todas as etapas *in vitro*, as condições de cultivo em sala de crescimento foram com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e irradiação de  $50\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas LED.

### 2.9 *Aclimatização de plantas obtidas durante o enraizamento in vitro*

Ao final dos dois experimentos de enraizamento (itens 2.6 e 2.7), as plantas obtidas *in vitro* que apresentavam raízes e parte aérea bem desenvolvidas foram transferidas para a etapa de aclimatização, iniciando com a retirada da vedação de plástico filme que recobria as tampas, 24 horas antes da retirada das plantas dos frascos de cultivo. Em seguida, as plantas foram retiradas do meio cultivo, as raízes lavadas com auxílio de uma pisseta contendo água, removendo resíduos do meio que pudessem permanecer aderidos as raízes.

As plantas oriundas do primeiro experimento de enraizamento (item 2.6) foram transplantadas mantendo a identificação do tratamento inicial (auxina e concentração), para verificar se as auxinas apresentavam alguma influência na sobrevivência durante a aclimatização. O plantio das plantas foi feito em copos plásticos com capacidade de 300 mL, os quais foram preenchidos com substrato comercial Bioplant®.

Os tratamentos foram compostos por oito repetições, sendo cada repetição constituída por uma planta. As repetições foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $3 \times 6$ , sendo três auxinas e seis concentrações, totalizando 18 tratamentos. Os dados foram obtidos da aclimatização de plantas oriundas da segunda repetição biológica do experimento de enraizamento descrito no item 2.6.

As plantas oriundas do segundo experimento de enraizamento (item 2.7), originadas dos brotos ou da base foram transplantadas para copos plásticos com capacidade de 300 mL, contendo dois tipos de substratos: 1) substrato comercial Bioplant® e 2) terra PE (Padrão Embrapa) constituída por terra (Latossolo Vermelho), substrato, adubo químico e calcário (3:1:1:1,5).

Os tratamentos foram compostos por 15 repetições, sendo cada repetição constituída por uma planta. As repetições foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 2$ , sendo dois tipos de explantes e dois tipos de substrato, totalizando quatro

tratamentos. Os dados foram obtidos da aclimatização de plantas, oriundas da segunda repetição biológica do experimento de enraizamento descrito no item 2.7.

As condições gerais para os dois experimentos de aclimatização, foi a manutenção de plantas em câmara de crescimento a temperatura de  $25\pm 1$  °C por 30 dias. Para a formação de um ambiente com alta umidade e melhor adaptação das plantas a este ambiente, os recipientes plásticos contendo o substrato foram cobertos com um saco plástico de polietileno (15,5x21X0,2 cm). Durante a aclimatização, foram feitas aberturas nos sacos plásticos que recobriam as plantas aos sete e 14 dias de aclimatização. Aos 21 dias os sacos plásticos foram removidos, deixando as plantas em contato direto com o ambiente externo até completar os 30 dias de aclimatização.

A sobrevivência das plantas foi avaliada após 30 dias de aclimatização, além de parâmetros morfológicos como número de colmos, comprimento de colmos (cm) e número de folhas.

### *3.0 Análises estatísticas*

Os dados obtidos no experimento de germinação foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para os experimentos de multiplicação, quantificação de clorofila, enraizamento e aclimatização as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Determinação de protocolos para desinfestação de sementes

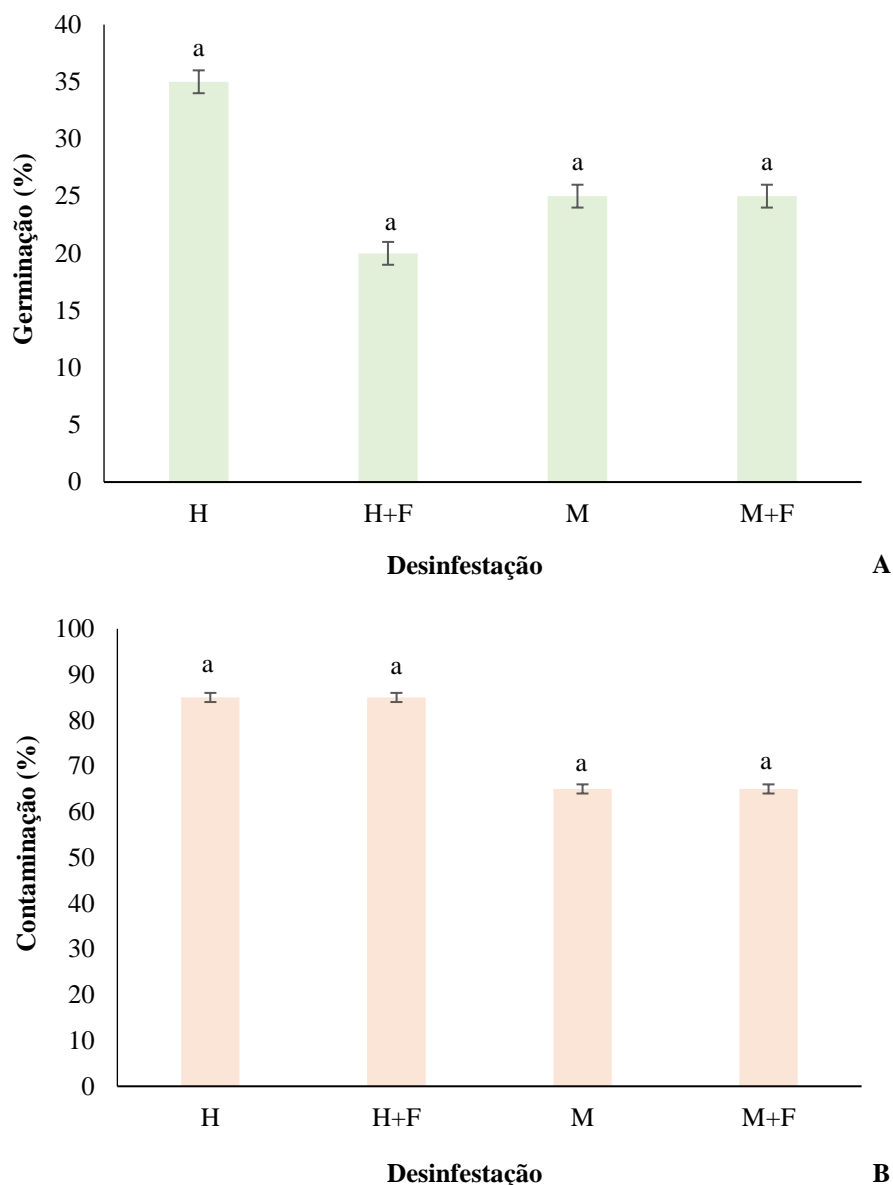
Aos sete dias de cultivo *in vitro*, as sementes de *G. magna* haviam germinado entre 20 e 35% nos diferentes tratamentos e ao término do período de 60 dias não houve aumento da taxa de germinação independentemente dos tratamentos utilizados para a desinfestação (Figura 2A).

Dutta-Mudoï et al. (2014) relataram o início da germinação de *Bambusa nutans* entre o 2º e 3º dias de cultivo, com 55% de germinação quando as sementes foram inoculadas em meio de MS. Já Devi et al. (2012) obtiveram taxa de 85% de germinação de sementes de *Dendrocalamus giganteus* em meio de MS suplementado com AG<sub>3</sub>. Em testes de germinação com sementes de *Fargesia qinlingensis* em substrato vermiculita, Wang et al. (2007) não conseguiram germinação superior a 65%.

Com relação a percentagem de contaminação houve variação de 60 a 85%, não sendo observada diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 2B). Brar et al. (2013) testaram diferentes agentes desinfestantes para o cultivo asséptico de sementes de *Dendrocalamus membranaceus* e obtiveram cerca de 77% de culturas assépticas quando utilizaram o HgCl<sub>2</sub> a 0,1% em combinação com o NaOCl a 15%. Dutta-Mudoï et al. (2014) observaram no 8º dia de cultivo 30% de contaminação fúngica e relacionaram a contaminação a emissão da radícula, sugerindo presença de contaminantes endofíticos nas sementes.

Para o sucesso da técnica de micropropagação é recomendável um protocolo de desinfestação e estabelecimento *in vitro* que garanta maior número de plantas livres de contaminação e com maior sobrevivência destas plantas para as etapas seguintes. Segundo Gratapaglia e Machado (1998), o estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação. O problema de contaminação fúngica e bacteriana não é incomum no estabelecimento de bambus *in vitro*, especialmente quando sementes são usadas como explantes (Brar et al., 2013).

Vários protocolos têm sido descritos para estabelecimento de bambu *in vitro*, no entanto várias dificuldades têm sido relatadas, principalmente devido à grande diversidade de microrganismos presentes nos tecidos. Os agentes desinfestantes comumente utilizados na cultura de tecidos para desinfestação de sementes e segmentos nodais incluem o etanol, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e o cloreto de mercúrio



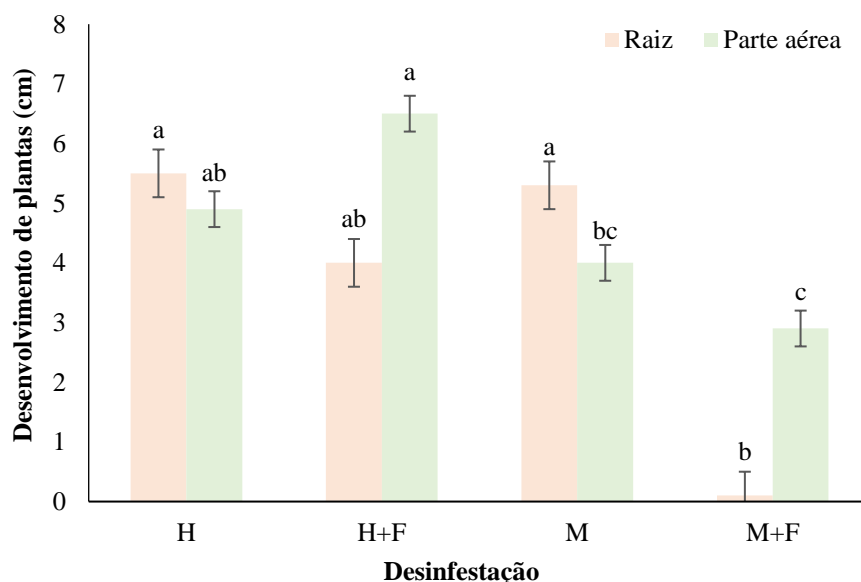
**Figura 2.** Germinação de sementes de *Guadua magna* em meio de cultivo *in vitro*, após 60 dias de cultivo. A – Percentagem de germinação sementes de *G. magna* submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação. B – Percentagem de contaminação de sementes de *G. magna* submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação. Tratamentos de desinfestação: H (NaOCl<sub>2</sub>), H+F (NaOCl<sub>2</sub>+Carbendazin), M (HgCl<sub>2</sub>), M+F (HgCl<sub>2</sub>+Carbendazin). Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

(Fermino-Junior et al., 2009; Brar et al., 2013). Fungicidas e bactericidas também têm sido utilizados em tratamentos de desinfestação adicionados ao meio de cultura (Jiménez et al., 2006; Ornellas et al., 2017).

Devido à alta incidência de contaminação observada nos tratamentos do primeiro experimento de desinfestação, realizou-se o segundo experimento com o objetivo de otimizar o protocolo de desinfestação. No entanto, no segundo experimento não houve germinação em nenhum dos tratamentos avaliados (H+M; H+M+F10'; H+M+F60'; H+M+F16h; H2,5).

No presente estudo, o alto teor de umidade (21%) das sementes de *G. magna* pode ter influenciado tanto a baixa percentagem de germinação, quanto a alta taxa de contaminação, bem como, a perda de viabilidade das sementes que permaneceram acondicionadas sob refrigeração (5 °C) por um período de 30 dias e que foram utilizadas no segundo experimento de desinfestação.

O desenvolvimento das plantas germinadas *in vitro* foi acompanhado por 60 dias (Figura 3). Ao final deste período observou-se que o tratamento NaOCl<sub>2</sub>+Carbendazin possibilitou a formação da parte aérea com maior comprimento (6,5 cm) com relação aos demais tratamentos. Nos tratamentos onde as sementes foram desinfestadas com NaOCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub> as plantas formadas apresentaram raízes com maiores comprimentos 5,5 e 5,3 cm, respectivamente. Com exceção do tratamento que utilizou HgCl<sub>2</sub>+Carbendazin, onde não houve desenvolvimento do sistema radicular e parte aérea, todos os outros possibilitaram a formação de plantas completas com parte aérea e raízes bem desenvolvidas.



**Figura 3.** Desenvolvimento pós-seminal de plantas de *Guadua magna* após 60 dias de cultivo *in vitro*. Comprimento de raiz (cm) e comprimento de parte aérea (cm) de plantas oriundas da germinação de sementes submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação. Tratamentos de desinfestação: H (NaOCl<sub>2</sub>), H+F (NaOCl<sub>2</sub>+Carbendazin), M (HgCl<sub>2</sub>), M+F (HgCl<sub>2</sub>+Carbendazin). Letras iguais dentro dos tratamentos não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As plantas de *G. magna* obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*, após o período de 60 dias foram transferidas para o meio de multiplicação, suplementado com 6,66 µM de BAP, para produzir brotações em quantidades suficientes para serem mantidas em estoque, visando a realização de experimentos posteriores.

### 3.2 Indução de multiplicação de brotações através de citocininas em diferentes concentrações

Ao final do primeiro subcultivo da etapa de multiplicação avaliou-se a taxa de brotação, sendo observada maior percentagem de brotação (87,5%) quando utilizou-se BAP na concentração de 6,66  $\mu\text{M}$ . Enquanto, a utilização de mT na concentração de 19,98  $\mu\text{M}$  induziu a menor percentagem de brotação (40%) (Figura 4A).

No decorrer dos cinco subcultivos a citocinina mT na concentração de 6,66  $\mu\text{M}$  possibilitou a maior produção de brotos (Tabela 3). No quinto subcultivo as concentrações de 6,66 e 13,32  $\mu\text{M}$  chegaram a produzir 20,3 e 21,1 brotos, respectivamente, quantidades de brotos superiores as produzidas por BAP e KN. No entanto, esta mesma citocinina na concentração de 26,64  $\mu\text{M}$  induziu a menor formação de brotos e, quando formados, os brotos apresentavam características anormais, como brotos atrofiados e folhas pouco expandidas. Além de não garantir a sobrevivência destas plantas com características anormais, após o quarto subcultivo (Figura 4B).

De maneira geral, todas as concentrações de Kn utilizadas possibilitaram a obtenção de brotos com as maiores alturas ao longo dos cinco subcultivos (Tabela 3). Este tratamento foi mais eficiente que as demais citocininas para o alongamento dos brotos de *G. magna*. Nos tratamentos com as maiores concentrações de mT (19,98 e 26,64  $\mu\text{M}$ ) foram observadas as menores alturas de brotos (Figura 4C).

A maior formação de nós foi observada no tratamento que utilizou mT na concentração de 6,66  $\mu\text{M}$ , chegando a produzir 78,2 nós ao final do quinto subcultivo. Esta citocinina também induziu a menor formação de nós, na concentração de 26,64  $\mu\text{M}$ , produzindo apenas 4,0 nós por brotação ao final do quarto subcultivo (Figura 4D).

Já ao se analisar o número de folhas das brotações ao longo do cinco subcultivos, a citocinina mT na concentração de 6,66  $\mu\text{M}$  mostrou-se mais eficiente que as demais. Chegando a produzir uma média de 84,7 folhas por brotação ao final do quinto subcultivos (Figura 4E). A concentração de 26,64  $\mu\text{M}$  desta mesma citocinina induziu a menor formação de folhas (4,13) observadas no quarto subcultivo (Tabela 3).

Apesar do objetivo da etapa de multiplicação ser a produção de brotos, observou-se a formação espontânea de raízes no decorrer dos cinco subcultivos. Ao final deste período, a citocinina Kn na concentração de 13,32  $\mu\text{M}$  induziu a maior formação de raízes (56,7%). Também observou-se que no tratamento sem adição de regulador, houve 42,7% de formação de raízes. A citocinina mT na concentração de 26,64  $\mu\text{M}$  foi a única a não induzir a formação espontânea de raízes nos cultivos até o final do quinto subcultivo (Figura 4F).

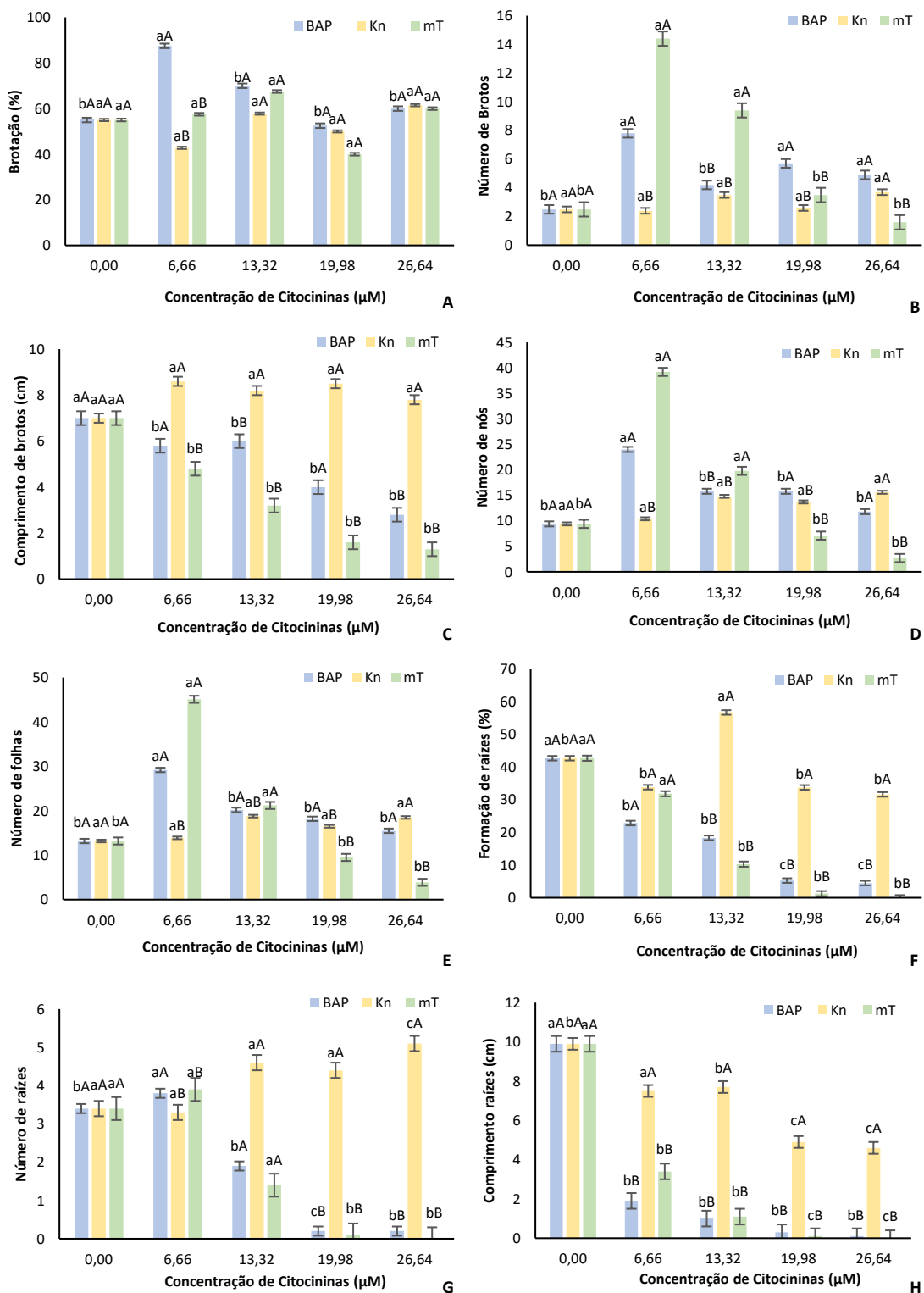
Ao final do quinto subcultivo, a citocinina BAP na concentração de 6,66  $\mu\text{M}$  induziu a formação de maior número de raízes (11,2) por brotação (Figura 4G), enquanto a Kn nesta mesma concentração induziu as raízes com maiores comprimentos (Figura 4H). A citocinina mT induziu pouca formação de raízes e pouco crescimento em comprimento. As concentrações mais elevadas de mT não induziram a formação de raízes.

Dutta-Mudoï et al. (2014), durante a multiplicação *in vitro* de *Bambusa nutans*, descreveram que 1,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP induziu maior número de brotações, com maiores comprimentos, e maior número de folhas em comparação as outras concentrações de BAP utilizadas. Do mesmo modo, a suplementação com Kn (1,0, 2,0, 3,0  $\text{mg.L}^{-1}$ ) não aumentou a capacidade de regeneração dos brotos de *Bambusa nutans*. Já Waikhon e Louis (2014) relataram maior taxa de multiplicação e número de brotos para *Bambusa tulda* e *Melocanna baccifera*, quando suplementaram o meio com 3  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP. Quando aumentaram as concentrações de BAP (acima de 5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) observou-se declínio acentuado na taxa de multiplicação de brotos.

Para se obter uma boa proliferação de brotos, fatores como a espécie e tipo de citocinina utilizada devem ser levados em consideração (Banerjee et al., 2011), já que a presença de reguladores de crescimento de plantas afeta o sucesso de regeneração de plantas (Roy, 2014). Na cultura de tecidos de bambu, o BAP é amplamente utilizado para a proliferação de brotos (Arya 1999, Dutta-Mudoï, 2009; Dutta-Mudoï, 2014, Waikhon; Loius, 2014), enquanto a Kn também é usada para este propósito, sendo geralmente, menos eficiente que o BAP (Arya et al., 2006, Sharma; Sarma, 2013; Singh et al. 2013; Dutta-Mudoï, 2014). A mT é uma citocinina relativamente nova e, que vem sendo utilizada na etapa de multiplicação de algumas espécies (Werbrouck, 1996; Niedz; Evens, 2010; 2011; Wojtania, 2010; Montalbán et al., 2011; Aremu et al., 2012a; 2012b; Gentile et al., 2016), até o momento existe um único trabalho relatando seu uso para a multiplicação de bambus da espécie *Dendrocalamus asper* (Ornellas et al., 2017).

Ornellas et al. (2017) evidenciaram o efeito significativo de mT durante a proliferação de *D. asper*. Enquanto para a taxa de proliferação foi relatada uma resposta linear crescente nas concentrações testadas, para altura do maior colmo e altura média do colmo houve uma tendência decrescente com aumento das concentrações, corroborando com os resultados mostrados neste estudo. Arya et al. (1999) e Singh et al. (2012) também registaram uma redução da altura dos brotos em resposta ao aumento da concentração de BAP no meio de multiplicação. Da mesma forma, Banerjee et al. (2011) observaram redução da taxa de multiplicação de brotos de 7,3 para 2,3 quando elevaram as concentrações de BAP de 5,0 para 10  $\text{mg.L}^{-1}$ .





**Figura 4.** Avaliação da taxa de brotação (A) e número de brotos (B), altura de brotos (C), número de nós (D), número de folhas (E), percentagem de formação de raízes (F), número de raízes (G) e comprimento de raízes (H) da média de cinco subcultivos em meio de multiplicação com BAP, Kn e mT nas concentrações de 0,0; 6,66; 13,32; 19,98 e 26,64 μM após 30 dias de cultivo de brotações de *Guadua magna*. Letras maiúsculas iguais entre as citocininas, dentro de cada concentração e minúsculas iguais entre as concentrações, dentro de cada citocinina, pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 3.** Número de brotos, altura de brotos, número de nós, número de folhas, número de raízes, comprimento de raízes e percentagem de formação de raízes durante a multiplicação de segmentos nodais de *Guadua magna* em meio de MS com BAP, Kn e mT nas concentrações de 0,0; 6,6; 13,32; 19,98 e 26,64 µM durante cinco subcultivos

Concentração Citocininas (µM)	1º Subcultivo			2º Subcultivo			3º Subcultivo			4º Subcultivo			5º Subcultivo		
	BAP	Kn	mT	BAP	Kn	mT	BAP	Kn	mT	BAP	Kn	mT	BAP	Kn	mT
	Número de brotos														
<b>0,00</b>	1,3 aA	1,3 aA	1,3 cA	2,0 bA	2,0 aA	2,0 cA	2,9 aA	2,9 aA	2,9 cA	3,1 bA	3,1 aA	3,1 cA	4,1 bA	4,1 aA	4,1 bA
<b>6,66</b>	2,1 aB	1,3 aB	4,7 aA	4,8 aB	2,4 aC	12,1 aA	7,4 aB	2,7 aC	16,8 aA	10,4 aB	3,3 aC	19,1 aA	19,8 aA	3,6 aB	20,3 aA
<b>13,32</b>	1,6 aB	1,3 aB	2,4 bA	2,5 bB	2,9 aB	6,7 bA	4,2 aB	4,2 aB	10,0 bA	6,0 bB	4,4 aB	13,8 bA	8,5 bB	5,2 aB	21,1 aA
<b>19,98</b>	1,8 aA	1,2 aA	1,2 cA	2,8 bA	1,9 aA	2,1 cA	6,5 aA	2,9 aA	3,9 cA	9,3 aA	3,4 aB	4,8 cB	12,6 aA	4,2 aB	6,7 bB
<b>26,64</b>	1,6 aA	1,1 aA	1,3 cA	2,6 bA	2,4 aA	1,4 cA	5,9 aA	3,4 aA	1,7 cA	10,7 aA	4,8 aB	1,9 cB	13,2 aA	8,2 aA	1,9 bB
	Altura de brotos														
<b>0,00</b>	2,8 aA	2,8 bA	2,8 aA	4,7 aA	4,7 aA	4,7 aA	6,9 aA	6,9 bA	6,9 aA	8,4 aA	8,4 aA	8,4 aA	14,2 aA	14,8 aA	14,8 aA
<b>6,66</b>	3,4 aA	3,9 aA	3,3 aA	5,3 aB	7,0 aA	4,0 aB	6,7 aB	9,7 aA	5,0 aB	6,9 aB	11,8 aA	5,5 aB	7,5 bB	14,9 aA	6,2 bB
<b>13,32</b>	2,9 aB	4,3 aA	2,3 aB	6,4 aA	6,3 aA	3,3 aA	7,4 aA	8,6 bA	3,2 bB	7,3 aB	10,3 aA	3,7 bC	7,0 bB	12,1 aA	4,7 bB
<b>19,98</b>	2,0 bB	4,0 aA	1,3 bB	3,2 bB	6,4 aA	1,3 bC	4,0 aB	10,9 aA	1,5 bC	4,1 bB	10,4 aA	1,9 bB	8,9 bA	12,6 aA	1,8 bB
<b>26,64</b>	1,7 bB	4,4 aA	1,0 bB	2,7 bB	6,9 aA	1,4 bB	3,5 bB	8,3 bA	1,4 bB	3,5 bB	8,9 aA	1,5 bB	5,5 bB	12,1 aA	1,5 bB
	Número de folhas														
<b>0,00</b>	2,9 bA	2,9 aA	2,9 cA	7,5 bA	7,5 bA	7,5 bA	14,9 aA	14,9 aA	14,9 cA	19,9 bA	19,8 aA	19,9 bA	26,9 bA	26,9 aA	26,9 bA
<b>6,66</b>	6,1 aB	4,4 aB	11,3 aA	15,7 aB	12,1 aB	29,6 aA	27,6 aB	17,4 aB	57,8 aA	41,9 aB	18,9 aB	44,7 aA	76,7 aA	24,7 aB	84,7 aA
<b>13,32</b>	5,7 aB	4,6 aB	8,7 bA	12,0 aA	13,1 aA	14,7 aA	21,0 aA	16,8 aA	25,6 bA	26,6 bA	21,2 aA	25,4 bA	45,8 bB	29,6 aB	69,8 aA
<b>19,98</b>	6,3 aA	3,8 aA	4,3 cA	9,5 bA	10,2 bA	5,6 bA	16,8 aA	24,3 aA	7,6 cB	21,8 bA	24,9 aA	13,5 cA	52,7 bA	28,2 aB	21,83 bB
<b>26,64</b>	5,1 aA	4,2 aA	3,5 cA	9,9 bA	12,4 aA	4,2 bB	19,8 aA	17,7 aA	3,8 cB	27,0 bA	19,5 aA	4,1 cB	49,6 bA	47,7 aA	4,1 bB
	Número de Nós														
<b>0,00</b>	2,4 bA	2,4 aA	2,4 cA	5,9 bA	5,9 aA	5,9 cA	11,2 aA	11,2 aA	11,2 cA	11,4 bA	11,4 aA	11,4 cA	20,2 bA	20,21 aA	20,2 bA
<b>6,66</b>	4,2 aB	3,4 aB	7,7 aA	11,0 aB	8,9 aB	23,5 aA	22,3 aB	13,1 aB	50,4 aA	27,4 aB	15,1 aA	68,9 aA	78,4 aA	21,00 aB	78,2 aA
<b>13,32</b>	4,3 aA	3,5 aA	5,2 bA	9,1 aA	10,1 aA	12,1 bA	17,0 aA	20,9 aA	16,5 bA	18,7 bA	21,5 aA	21,6 bA	38,6 bB	25,11 aB	67,5 aA
<b>19,98</b>	4,1 aA	2,9 aB	2,3 cB	8,5 aA	8,0 aA	3,4 cB	15,9 aA	20,4 aA	6,2 cA	18,1 bA	21,1 aA	9,7 cA	47,5 bA	23,73 aB	18,2 bB
<b>26,64</b>	3,1 bA	3,3 aA	1,5 cB	7,2 bA	9,2 aA	3,3 cB	14,1 aA	14,7 aA	3,0 cA	20,7 bA	18,5 aA	2,9 dB	43,2 bA	41,44 aA	2,9 bB

Continuação...

Concentração Citocininas ( $\mu$ M)	1° Subcultivo			2° Subcultivo			3° Subcultivo			4° Subcultivo			5° Subcultivo		
	BAP	Kn	mT	BAP	Kn	mT	BAP	Kn	mT	BAP	Kn	mT	BAP	Kn	mT
Número de raízes															
<b>0,00</b>	1,0 aA	1,0 aA	1,0 aA	2,1 aA	2,1 aA	2,1 aA	3,6 aA	3,6 aA	3,6 aA	4,5 aA	4,5 aA	4,5 aA	5,4 bA	5,4 aA	5,4 aA
<b>6,66</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	2,6 aA	3,0 aA	1,9 aB	5,3 aA	2,6 aB	5,4 aA	5,8 aA	4,3 aA	11,2 aA	5,8 aB	7,7 aB
<b>13,32</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	2,3 aA	0,0 bB	0,5 bB	5,9 aA	0,0 bB	3,2 aB	6,1 aA	1,6 bB	6,7 bA	6,1 aA	8,1 aA
<b>19,98</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	2,9 aA	0,0 bB	0,0 bB	5,8 aA	0,0 bB	0,0 bB	6,4 aA	0,0 bB	1,9 cB	9,0 aA	0,3 bB
<b>26,64</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	2,4 aA	0,0 bB	0,0 bB	5,6 aA	0,0 bB	0,0 bB	5,9 aA	0,0 bB	2,0 cB	9,8 aA	0,0 bB
Comprimento de raízes															
<b>0,00</b>	1,1 aA	1,1 aA	1,1 aA	2,8 aA	2,8 bA	2,8 aA	9,3 aA	9,3 aA	9,3 aA	14,8 aA	14,8 aA	14,8 aA	17,7 aA	17,7 bA	17,7 aA
<b>6,66</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	4,7 aA	0,5 bB	1,9 bB	8,4 aA	2,9 bB	2,9 aB	13,3 aA	3,3 bB	4,8 bB	21,8 aA	7,6 bB
<b>13,32</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	2,8 bA	0,0 bB	0,4 bB	6,7 bA	0,0 cB	1,0 bB	10,3 bA	2,1 bB	3,9 bB	13,9 bA	5,4 bB
<b>19,98</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	2,2 bA	0,0 bB	0,0 bB	5,5 bA	0,0 cB	0,0 bB	10,4 bA	0,0 cB	2,0 bB	8,2 cA	0,3 cB
<b>26,64</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	2,6 bA	0,0 bB	0,0 bB	5,7 bA	0,0 cB	0,0 bB	6,7 cA	0,0 cB	1,4 bB	6,8 cA	0,0 cB
Porcentagem Formação Raízes															
<b>0,00</b>	5,0 aA	5,0 aA	5,0 aA	35,0 aA	35,0 aA	35,0 aA	55,6 aA	55,6 bA	55,6 aA	62,5 aA	62,5 aA	62,5 aA	71,0 aA	71,0 aA	71,0 aA
<b>6,66</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	41,2 aA	4,0 bB	16,7 bA	50,0 bA	39,1 aA	44,4 aA	50,0 aA	47,6 aA	78,9 aA	50,0 aA	71,4 aA
<b>13,32</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	55,6 aA	0,0 bB	14,3 bB	79,0 aA	0,0 bB	33,3 aB	79,0 aA	22,2 bB	61,1 aA	70,0 aA	53,6 aA
<b>19,98</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	33,3 aA	0,0 bB	0,0 bB	46,2 bA	0,0 bB	0,0 bB	53,3 aA	0,0 bB	36,4 aA	54,6 aA	8,3 bB
<b>26,64</b>	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bB	42,9 aA	0,0 bB	0,0 bB	46,8 bA	0,0 bB	0,0 bB	52,6 aA	0,0 bB	40,0 aA	37,5 aA	0,0 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Sott-Knott a 5% de probabilidade.

Segundo Aremu et al. (2012a), a mT e seus derivados têm sido utilizados para iniciação de culturas, otimização de protocolos de micropropagação e para combater vários distúrbios fisiológicos induzidos *in vitro*. Evidências de vários estudos indicam a crescente popularidade desta citocinina e vantagens com relação a propagação de brotos, embora estas vantagens não sejam unânimes para todas as espécies.

Assim como observado no presente estudo já no primeiro subcultivo, Ornellas et al. (2017) também relataram a ocorrência de rizogênese espontânea após cinco subculturas de *D. asper*, e posterior aumento da frequência da formação de raízes. Além disso, Webrouck et al. (1996) relataram a formação de raízes em meio com mT e sem adição de regulador após doze semanas de cultivo de *Spathyfillum floribundum* e mT com 40  $\mu$ M produziu maior quantidade de brotos do que o meio com 20  $\mu$ M de BA.

Durante os subcultivos foi observado o escurecimento do meio de cultivo e alguns casos, da parte basal das brotações, principalmente em meio contendo BAP e mT, não tendo sido observada oxidação nos tratamentos com Kn. Também observou-se que ao final de cada subcultivo, os brotos mais velhos apresentavam-se senescentes e com as folhas amareladas (Figura 5 A–M).

O escurecimento do meio de cultivo tem sido um problema associado à cultura *in vitro* de bambu devido à exsudação fenólica, (Dutta-Mudoi et al., 2013), e em alguns casos pode desencadear o amarelecimento dos brotos (Waikhon; Louis, 2014). De acordo com Sandhu et al. (2017), a transferência regular para meio fresco é a forma mais efetiva de se evitar a oxidação fenólica e essencial para manter o crescimento e o vigor dos brotos. O atraso nos subcultivos pode ocasionar depleção de nutrientes, acúmulo de compostos tóxicos, alteração do pH do meio e até mesmo resultando em necrose e morte dos brotos.

Arshad et al. (2005) observaram que intervalos de subcultivo de quatro semanas foram adequados e favoreceram os melhores resultados, tornando os brotos mais vigorosos, enquanto ciclos de subcultura mais longos resultaram em necrose de brotos em *Bambusa wamin*. Esse mesmo período de subcultivos foi relatado para *Bambusa bambos* (Sharma; Arya; 1998) e *Bambusa glaucescens* (Shirin; Rana 2007). Sendo os subcultivos regulares importantes para evitar a oxidação fenólica do meio de cultivo, bem como para evitar a depleção dos nutrientes. Principalmente, durante a multiplicação de *G. magna* que possui uma taxa de brotação e crescimento elevadas, o que parece consumir esses nutrientes rapidamente.

A multiplicação de *G. magna* pode ser realizada a partir de um único broto ou até mesmo, a partir de segmentos nodais isolados. No entanto, a maioria dos trabalhos tem relatado a utilização de brotações em aglomerados em vez de brotos isolados durante a etapa de multiplicação de diferentes espécies de bambus (Saxena, 1990; Ravikumar et al., 1998; Arya et

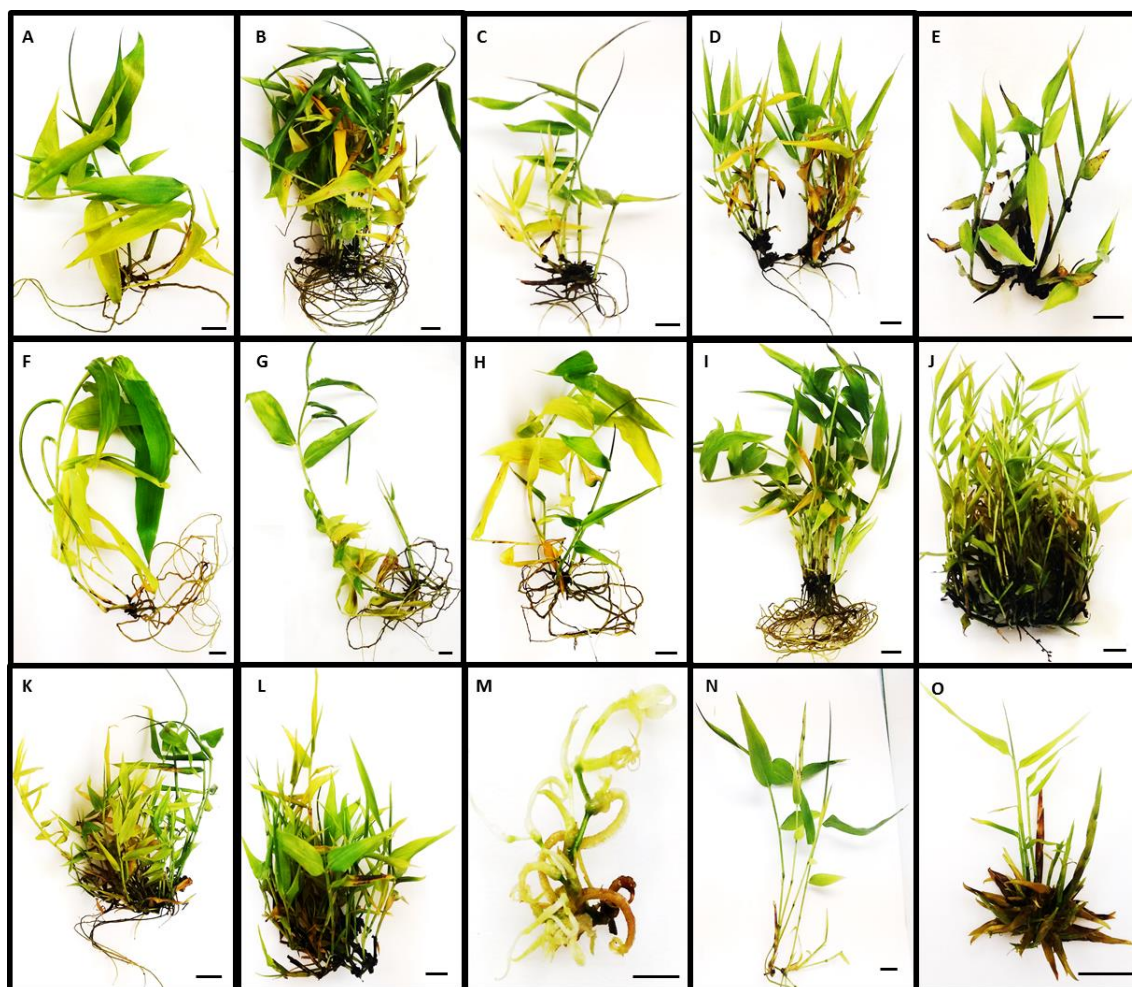
al., 1999; Sood et al., 2002; Jiménez et al., 2006; Shirin; Rana 2007; Bisht et al., 2010; Negi; Saxena 2011; Singh et al., 2012).

No decorrer dos cinco subcultivos utilizando diferentes citocininas observou-se a ocorrência de florescimento *in vitro*. Esse evento foi caracterizado pela presença de flores agrupadas em pseudo espiguetas formando inflorescências no ápice caulinar de alguns brotos e até mesmo como pequenos brotos vegetativos com folhas reduzidas a glumas. O florescimento foi observado a partir do segundo subcultivo em todos os tratamentos avaliados até o último subcultivo. (Figura 5N). A ocorrência de brotações apresentando pseudo espiguetas foi observada em maiores proporções nas concentrações de 19,98 e 26,64  $\mu\text{M}$  de mT (Figura 5O)

De acordo com Giellis et al. (2002) pseudo espiguetas ocorrem somente em bambus, não sendo observadas em outras gramíneas. Estas estruturas possuem duas glumas vazias, mas com gemas dormentes que podem se desenvolver em novas pseudo espiguetas e em condições de cultivo *in vitro* irão se multiplicar indefinidamente, podendo ocorrer a formação de brotos vegetativos (Giellis et al., 2002). Ainda de acordo com estes autores, o cultivo *in vitro* de bambus não leva ao florescimento monocárpico, de forma que as pseudo espiguetas podem ser utilizadas como propágulos para multiplicação, indução do florescimento, armazenamento a longo prazo e até mesmo para transformação genética.

A floração em bambus ainda levanta muitos questionamentos entre os botânicos e não há nenhum método científico desenvolvido para prever a floração. Até agora, o mecanismo fisiológico exato ou fatores ecológicos responsáveis pela floração de bambu não são precisamente conhecidos (Dutta-Mudoi et al., 2013). Assim como o mecanismo molecular que regula esse processo nos bambus, que tem sido instrumento de pesquisa intensa (Sisodia; Rao, 2017). Expressão diferencial de genes relacionados à interação planta-patógeno, transdução de sinal de hormônio vegetal e processamento de proteínas no retículo endoplasmático regula a formação e desenvolvimento de flores em bambus (Ge et al., 2017). A mudança no perfil proteico também acompanha a transição da fase vegetativa para floração (Kaur, et al., 2015). Esses estudos destacam o fato de que os mecanismos básicos que controlam a floração em plantas superiores são conservados (Wysocki et al. 2016). Dessa forma, o mecanismo genético que controla a floração em bambus, ainda precisa ser elucidado com outras experiências (Sisodia; Rao, 2017).

Os longos períodos vegetativos fazem com que seja difícil de ter material reprodutivo, prontamente disponível para estudos sistemáticos em bambus. As técnicas *in vitro* oferecem a possibilidade de encurtar a fase vegetativa e investigar o mecanismo subjacente da floração (Gielis et al., 2002; Sisodia; Rao, 2017), já tendo sido relatados alguns estudos sobre o florescimento *in vitro* (Lin; Chang, 1998; Lin et al., 2004, 2005; Lin, 2007; Dutta-Mudoi;



**Figura 5.** Aspecto visual de brotações de *Guadua magna* formadas após cinco subcultivos, multiplicadas em meio MS com BAP, Kn e mT nas concentrações de 0,0; 6,66; 13,32; 19,98 e 26,64  $\mu\text{M}$ . A – Brotações oriundas do meio de multiplicação sem adição de citocinina. B - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP. C - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP. D - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 19,98  $\mu\text{M}$  de BAP. E - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 26,64  $\mu\text{M}$  de BAP. F - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 6,66  $\mu\text{M}$  de Kn. G - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 13,32  $\mu\text{M}$  de Kn. H - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 19,98  $\mu\text{M}$  de Kn. I - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 26,64  $\mu\text{M}$  de Kn. J - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 6,66  $\mu\text{M}$  de mT. K - - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 13,32 de mT. L - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 19,98  $\mu\text{M}$  de mT. M - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 26,64  $\mu\text{M}$  de mT. M - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 26,64  $\mu\text{M}$  de mT apresentando aspecto anormal. N - Brotações oriundas do meio de multiplicação sem adição de citocinina apresentando inflorescências. O - Brotações oriundas do meio de multiplicação com 19,98  $\mu\text{M}$  de mT apresentando aglomerados de inflorescências. Barra = 1 cm.

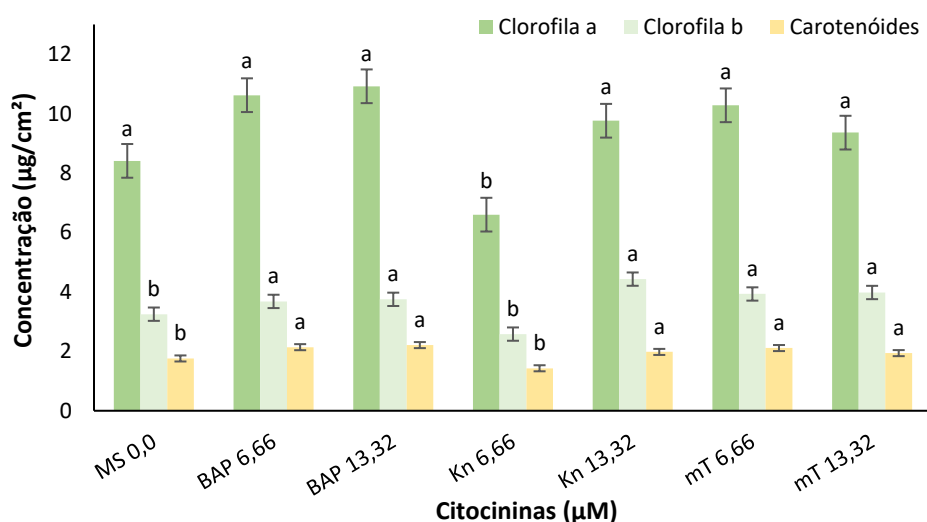
Borthakur, 2012; Sisodia; Rao, 2017). No presente estudo, o florescimento ocorreu de forma espontânea, provavelmente pelo estresse causado pelos subcultivos. Uma vez que florescimentos esporádicos não possuem padrão e parecem ocorrer por influência de fatores relacionados a estresses ambientais e não por fatores genéticos (Thapliyal et al., 2015).

### 3.2.1 Quantificação de clorofila e carotenóides em plantas micropropagadas

A análise de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides foi realizada ao final do quinto subcultivo do experimento de multiplicação (Figura 6). Nesse período, algumas brotações apresentavam características de senescência, como folhas amareladas. No entanto, a análise de clorofila demonstrou maior concentração de clorofila *a* dos que dos demais pigmentos. Para os três pigmentos avaliados, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides apresentaram menor concentração em plantas oriundas do meio de multiplicação com 6,66  $\mu\text{M}$  de Kn.

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. A ocorrência de pigmentos fotossintéticos e a sua abundância variam de acordo com a espécie. A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica e é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (Taiz; Zeiger, 2004).

O conteúdo de clorofilas nas folhas é influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, estando diretamente relacionado com o potencial de atividade fotossintética das plantas (Taiz; Zeiger, 2004) e a abundância dessas moléculas varia de acordo com a espécie vegetal (Barbieri Junior et al., 2010). As clorofilas exercem um controle dominante sobre a quantidade de radiação solar absorvida pelas plantas e por essa via as suas concentrações foliares guardam uma estreita relação com as taxas fotossintéticas e a produtividade primária (Streit et al., 2005; Blackburn, 2007).

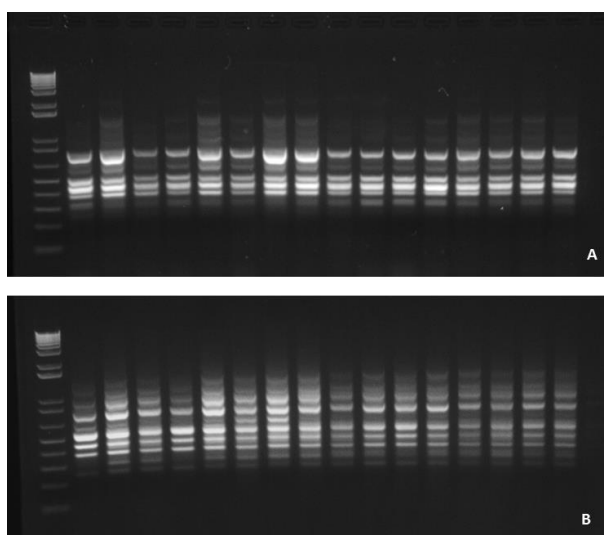


**Figura 6.** Quantificação de Clorofila *a*, Clorofila *b* e Carotenóides ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em folhas de brotações de *Guadua magna* micropropagadas *in vitro* após cinco subcultivos em meio de MS suplementado com BAP, Kn e mT nas concentrações de 0,0; 6,66 e 13,32  $\mu\text{M}$ . Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada variável avaliada, entre as diferentes citocininas e concentrações, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No presente estudo a quantidade de clorofila foi igual em todos os tratamentos avaliados, com exceção do tratamento com 6,66  $\mu\text{M}$  de Kn em que ao final do quinto subcultivo as folhas se apresentavam mais amareladas (cloróticas) e senescentes do que nos demais tratamentos avaliados.

### 3.2.2 Análise da fidelidade genética de clones micropropagados através de marcadores ISSR

A partir da análise dos resultados referentes à fidelidade genética dos clones de *G. magna* obtidos ao final do quinto subcultivo de multiplicação *in vitro*, por meio de marcadores ISSR, observou-se a amplificação de cerca de 81 regiões do genoma dos 47 indivíduos amostrados. Nestas amplificações, verificou-se que independentemente da região do DNA analisada e da concentração de regulador utilizado para multiplicação, não foi constatada a ocorrência de variações somaclonais (Figura 7).



**Figura 7.** Análise da fidelidade genética de clones de *Guadua magna* micropropagados por multiplicação *in vitro* ao longo de cinco subcultivos. A – Primer 59 zm na amplificação do DNA de 16 indivíduos, oriundos dos meios de multiplicação controle, MS+6,66  $\mu\text{M}$  de mT e MS+13,32  $\mu\text{M}$  de mT. B – Primer 54 zm na amplificação do DNA de 16 indivíduos, oriundos dos meios de multiplicação controle, MS+6,66  $\mu\text{M}$  de mT e MS+13,32  $\mu\text{M}$  de mT.

De acordo com Negi e Saxena (2010) a possibilidade de variação genética ocorrer durante a fase *in vitro* não pode ser descartada. No entanto, no presente estudo, mesmo após cinco subcultivos não foi observada a ocorrência de bandas polimórficas, assim como descrito por Singh et al. (2012) que não encontraram nenhuma variação somaclonal em plantas de *Dendrocalamus asper* produzidas *in vitro* usando um conjunto de quatro marcadores moleculares (RAPD, ISSR, SSR e AFLP). Do mesmo modo, o perfil de bandas de marcadores ISSR em plantas micropropagadas foram monomórficas e semelhantes aos das plantas mãe em

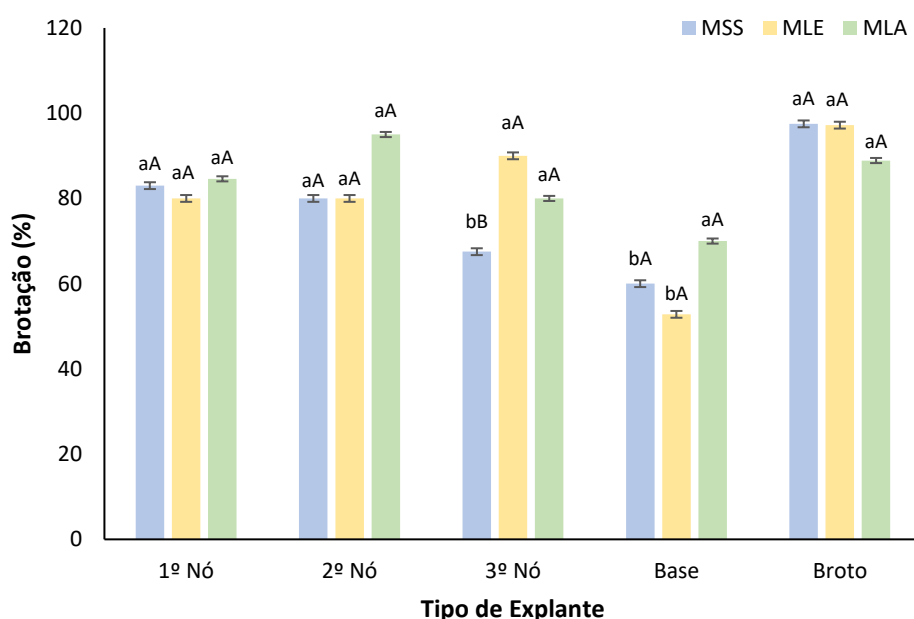


*Bambusa balcooa* (Negi; Saxena 2010), *Bambusa nutans* (Negi; Saxena 2011a) e *Guadua angustifolia* (Nadha et al. 2011).

Alguns estudos foram realizados para verificar a influência dos subcultivos sobre a estabilidade genética e, relataram o mesmo padrão de bandas monomórficas para *Bambusa balcooa* após 33 ciclos de subcultivos (Negi; Saxena, 2010), para *Bambusa nutans* em 27 subcultivos (Negi; Saxena, 2011) e para *Dendrocalamus asper* depois de 30 subcultivos (Singh et al. 2012), produzidos através de brotos axilares.

### 3.3 Multiplicação de explantes oriundos de diferentes posições do broto em três sistemas de cultivo

Os resultados referentes a taxa de brotação de explantes oriundos de diferentes posições do broto propagados em três sistemas de cultivos estão ilustrados na Figura 8. Foram observadas diferenças significativas no meio MSS para os explantes do 3º nó e da base do broto, que apresentaram menores percentagens de brotação de 67,5 e 60%, respectivamente, quando comparados com os demais tipos de explantes. No MLE a menor percentagem de brotação foi de explantes da base do broto (52,8%). Os explantes do 1º nó, 2º nó e brotos iniciais não diferiram entre os sistemas de cultivo MSS, MLE e MLA.



**Figura 8.** Percentagem de brotação após 30 dias em meio de multiplicação com 6,6  $\mu$ M de mT sob diferentes sistemas de cultivo (meio semissólido - MSS, meio líquido estacionário MLE e meio líquido sob agitação MLA) e utilizando diferentes tipos de explantes (1º nó, 2º nó, 3º nó, base e broto). Letras maiúsculas iguais entre os sistemas de cultivo, dentro de cada tipo de explante e minúsculas iguais entre os tipos de explantes, dentro de cada sistema de cultivo, pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

A análise do número de novos brotos, altura de brotos, número de nós e número de folhas, que permitem inferir sobre o desenvolvimento dos explantes ao longo da multiplicação, estão expostos na Tabela 4. O número de brotos não diferiu significativamente entre os sistemas de cultivo. No entanto, os explantes provenientes da base do broto apresentaram a maior formação de brotações no meio MSS (5,7), MLE (7,7) e MLA (6,7), quando comparados com os demais tipos de explantes.

**Tabela 4.** Avaliação do número de brotos, comprimento de brotos, número de nós e número de folhas após 30 dias em meio de multiplicação com 6,66  $\mu$ M de mT nos sistemas de cultivo MSS, MLE e MLA, utilizando explantes de diferentes posições do colmo 1° nó, 2° nó, 3° nó, base e broto

Posição do explante no colmo	MSS	MLE	MLA
	Número de brotos		
1° Nó	4,2±0,4 bA	5,8±0,7 bA	5,1±0,6 bA
2° Nó	3,9±0,4 bA	4,9±0,5 cA	4,61±0,4 bA
3° Nó	3,0±0,4 bA	4,0±0,4 cA	4,4±0,5 bA
Base	5,7±0,7 aA	7,8±1,1 aA	6,7±0,6 aA
Broto	4,4±0,5 bA	6,2±0,6 bA	5,4±0,5 bA
Altura de brotos			
1° Nó	1,8±0,1 aC	2,8±0,2 aB	3,7±0,3 bA
2° Nó	2,2±0,1 aC	2,9±0,2 aB	3,9±0,2 aA
3° Nó	1,8±0,1 aC	2,7±0,2 aB	4,2±0,3 aA
Base	1,6±0,1 aC	2,8±0,2 aB	3,5±0,2 bA
Broto	1,5±0,1 aC	2,9±0,2 aA	3,3±0,2 bA
Número de nós			
1° Nó	6,5±0,6 aB	14,1±1,1 aA	12,9±1,5 bA
2° Nó	6,2±0,5 aB	12,2±1,4 bA	11,1±0,9 bA
3° Nó	4,7±0,5 aB	10,1±1,2 bA	10,4±1,0 bA
Base	8,8±1,1 aB	15,7±1,9 aA	15,9±1,5 aA
Broto	6,6±0,6 aB	14,2±1,2 aA	12,6±1,4 bA
Número folhas			
1° Nó	7,2±0,6 aB	16,9±1,2 aA	15,6±1,7 bA
2° Nó	7,2±0,6 aB	14,8±1,6 bA	13,9±1,1 bA
3° Nó	5,9±0,6 aB	12,5±1,3 bA	12,9±1,2 bA
Base	9,4±1,2 aB	18,1±1,7 aA	19,6±1,5 aA
Broto	7,3±0,7 aB	16,4±1,4 aA	17,1±1,6 bA

Medias seguidas por mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não apresentam diferença significativa pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para altura de novos brotos observou-se diferenças significativas entre os sistemas de cultivo, sendo o MLA o que proporcionou o melhor crescimento das brotações. Quando se

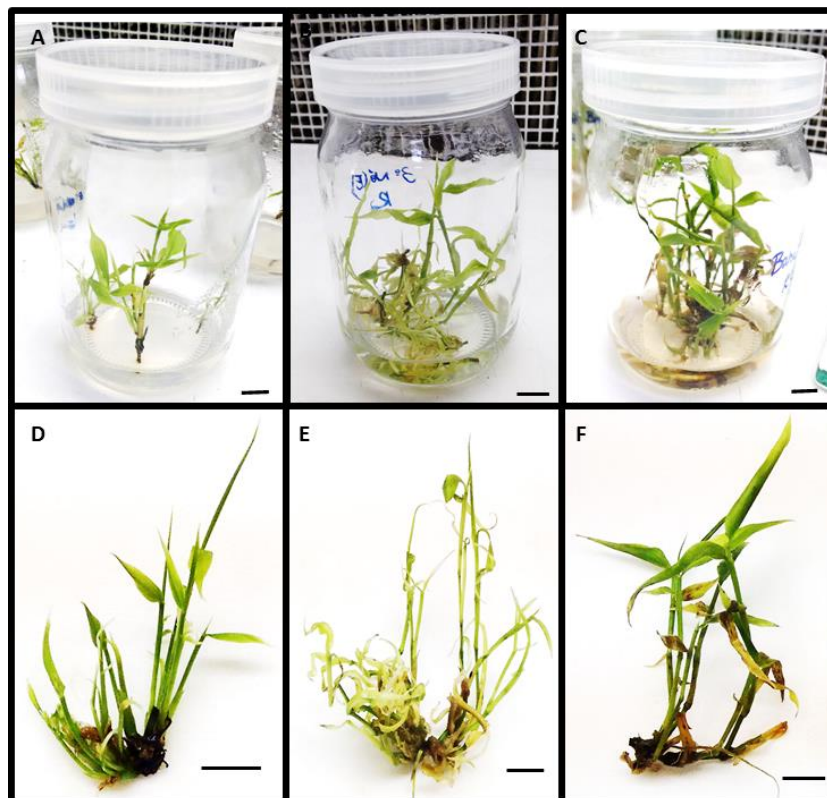
avaliou a posição do explante no broto os 2º e 3º nós apresentaram maior crescimento no MLA 3,9 e 4,2 respectivamente, quando comparados aos demais explantes.

Com relação ao número de nós e número de folhas formados os sistemas de cultivo MLE e MLA foram mais eficientes que o meio MSS. No MLE foram observados a menor formação de nós 12,2 e 10,1 quando os explantes foram provenientes do 2º e 3º nós, respectivamente. A menor formação de folhas 14,8 e 12,5 provenientes do 2º e 3º nós, também foi observada no MLE, enquanto em MLA explantes provenientes da base do broto apresentaram a maior formação de nós (15,9) e de folhas (19,6). Dutta-Mudoi et al. (2014) analisaram a capacidade regenerativa relativa a posição do nó em ramos secundários durante o estabelecimento *in vitro* de *Bambusa nutans* numeraram os nós do ápice para base com maior formação de brotos do 5º ao 7º nós. Os maiores comprimentos de brotos foram observados nos 5º e 6º nós. Estes mesmos autores relataram que a variação no surgimento de novos brotos pode ser devido ao tamanho, idade ou outra condição associada aos explantes. Waikhom e Sharma (2009) relataram que a posição dos segmentos nodais nos ramos laterais afetou a brotação em *Arundinaria callosa*, onde os segmentos nodais retirados da parte distal apresentaram menor período de brotação em relação aos nós basais e médios dos ramos secundários.

O estado físico do meio (líquido ou semissólido) também influencia a brotação e o crescimento dos brotos em diferentes espécies de bambus. Vários trabalhos mencionam taxas mais elevadas de multiplicação de brotos de bambu e crescimento melhorado em meio líquido em comparação com meio semissólido (Arshad et al., 2005; Sanjaya et al., 2005; Arya et al., 2006; Ogita et al., 2008; Singh et al., 2012). Quando as brotações foram oriundas de sementes, as taxas de multiplicação também foram melhores em meio líquido que em meio gelificado com ágar para *Bambusa tulda* (Saxena 1990), *Dendrocalamus hamiltonii* (Sood et al., 2002) e *Phyllostachys stocksii* (Somashekar et al. 2008).

De maneira geral, os explantes multiplicados em MLE e MLA apresentaram as melhores medidas de desenvolvimento durante a multiplicação. No entanto, morfológicamente, em alguns casos as brotações formadas em MLE apresentaram aspectos de hiperhidricidade (Figura 9B e 9E) quando comparadas as brotações produzidas nos sistemas de cultivo MSS e MLA (Figura 9A, 9C, 9D e 9F).

De acordo com Sandhu et al. (2017) a hiperhidricidade é um distúrbio fisiológico que apresenta órgãos e tecidos turgidos, aquosos, hipolignificados, translúcidos e facilmente quebráveis. A ocorrência deste fenômeno tem sido relacionada à cultura contínua dos explantes em meio líquido (estacionário /agitação) (Kevers et al., 2004). Lin e Chang (1998) relataram



**Figura 9.** Aspecto de brotações de *Guadua magna* formadas após 30 dias de cultivo em meio de multiplicação com  $6,6 \mu\text{M}$  de mT em meio semissólido (MSS), meio líquido estacionário (MLE) e meio líquido sob agitação (MLA). A e D - Brotações produzidas em meio de multiplicação MSS. B e E – Brotações produzidas em meio de multiplicação MLE. C e F – Brotações produzidas em meio de multiplicação MLA. Barra = 1 cm.

que uma alta concentração de citocininas causou hiperidricidade considerável durante a multiplicação *in vitro* de brotos de *Bambusa edulis*.

### 3.4 Enraizamento de microestacas utilizando auxinas em diferentes concentrações

A análise dos dados referentes ao experimento que verificou a combinação de três auxinas em seis concentrações diferentes, está ilustrada na Figura 10. A percentagem de enraizamento chegou a 50% quando utilizou-se a auxina AIB na concentração de  $4,90 \mu\text{M}$ , sendo superior as auxinas AIA (20%) e ANA (20%), nesta mesma concentração (figura 10A). No entanto, a percentagem de enraizamento de microestacas na presença da auxina AIB não diferiu significativamente entre as concentrações  $2,45$  (40%),  $4,90$  (50%) e  $9,80 \mu\text{M}$  (40%).

Quanto ao número de raízes produzidas verificou-se que a auxina AIA na concentração de  $14,70 \mu\text{M}$ , induziu a maior formação de raízes, com uma média de 5,0 raízes por explante, diferindo significativamente das demais concentrações de AIA e também das auxinas ANA e AIB. Não houve diferenças entre as concentrações de ANA e para AIB nas concentrações de  $1,23$  (2,3),  $9,80$  (3,4) e  $14,70 \mu\text{M}$  (2,5) (Figura 10B).

Para o comprimento de raízes a auxina AIA nas concentrações 1,23, 2,45 e 4,90  $\mu\text{M}$  proporcionou os maiores comprimentos que as auxinas ANA e AIB e que as demais concentrações de AIA. Utilizando ANA e AIB os maiores comprimentos foram observados nas concentrações de 1,23, 2,45, 4,9 e 9,8  $\mu\text{M}$ .

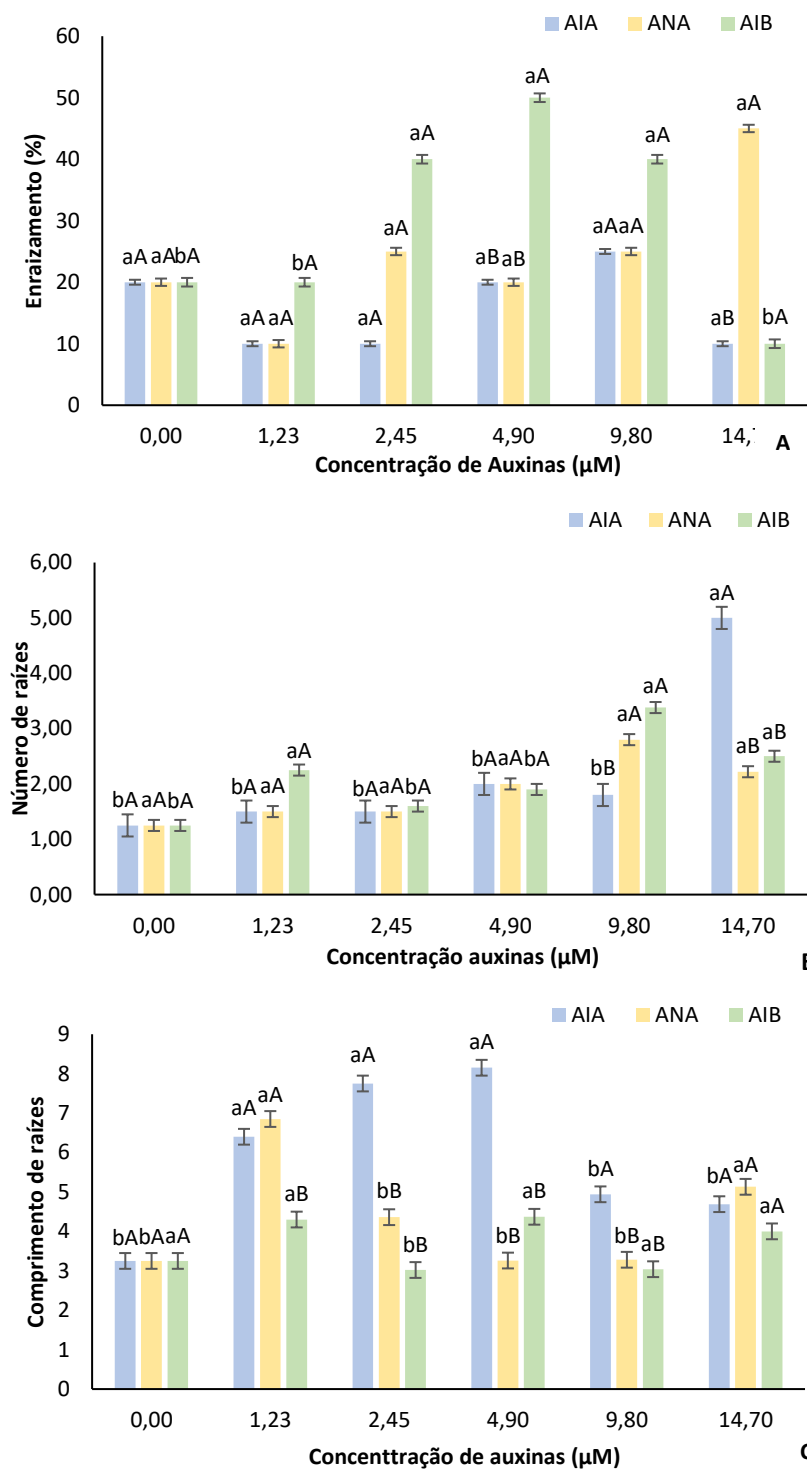
### *3.5 Enraizamento de explantes de diferentes posições no broto em meio com sais de MS em diferentes concentrações*

Os dados referentes ao segundo experimento de enraizamento, onde verificou-se o enraizamento de explantes de diferentes posições no broto em meio com sais de MS em diferentes concentrações estão ilustrados na Figura 11. Não foram verificadas diferenças significativas entre o meio de MS com diferentes concentrações de sais. Em contrapartida, os tipos de explantes apresentaram diferenças significativas nas respostas ao enraizamento. As maiores percentagens de enraizamento 77, 66, 66 e 55% foram observadas quando se utilizaram brotos como explantes inoculados em meio MS1/4, MS1/2, M3/4 e MS, respectivamente (Figura 11A). Quando foram utilizados como explantes os brotos iniciais e a base dos brotos observou-se o mesmo comportamento de enraizamento para ambos, nos meios de MS1/2 e MS.

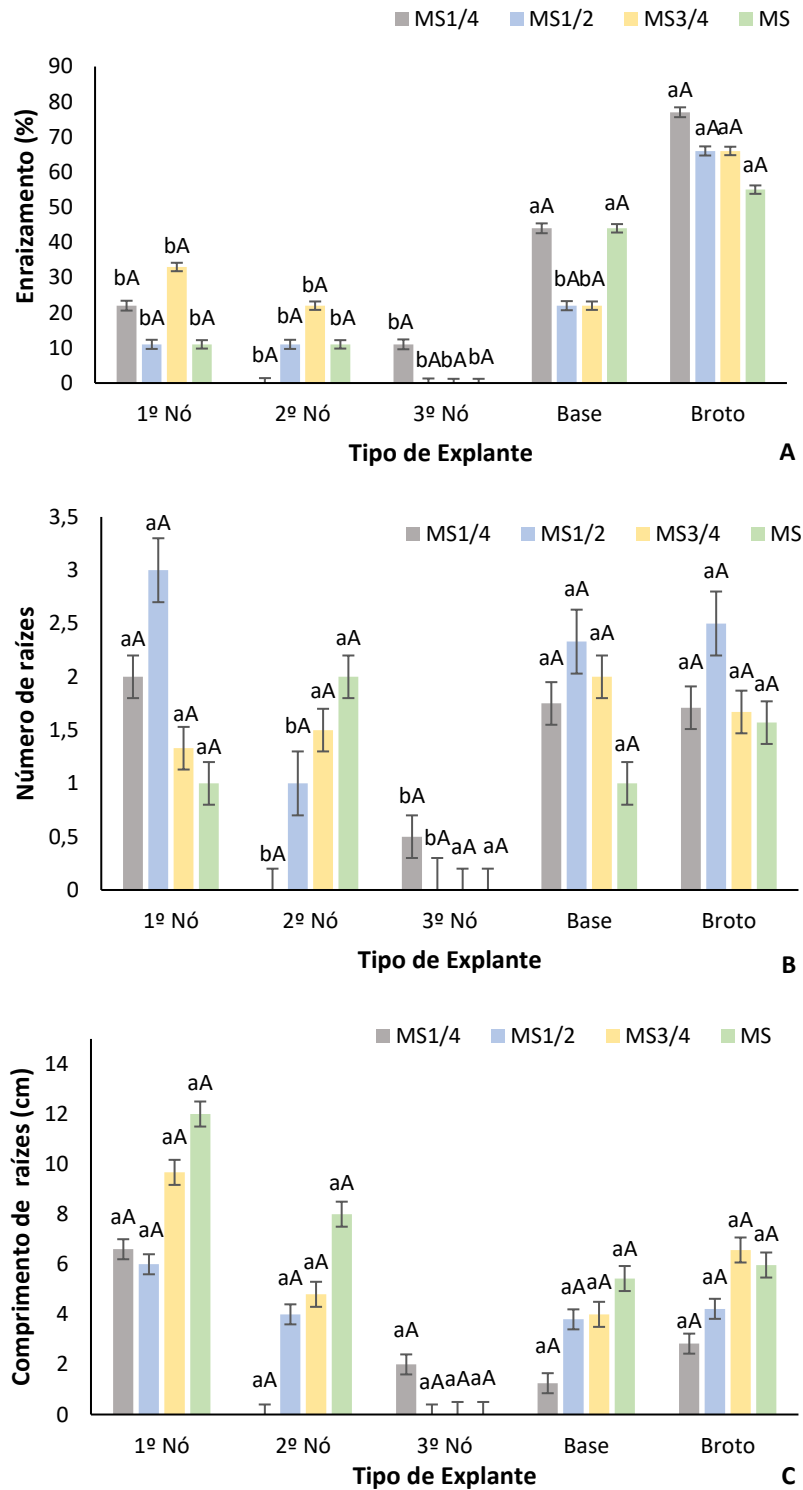
Com relação ao número de raízes formadas, também não houve diferença significativa entre as concentrações de sais do meio de MS (Figura 11B). No meio de MS1/4 e MS1/2 das concentrações de sais as maiores quantidades de raízes foram observadas nos explantes do 1º nó, base e broto inicial, enquanto nos meios MS1/2, MS3/4 e MS não houve formação de raízes quando o tipo de explante foi oriundo do 3º nó. Para o comprimento de raízes não foi observada diferenças significativas entre as concentrações de sais de MS (Figura 11C).

Entre os dois experimentos de enraizamento realizados, não foram observadas a ocorrência de plantas ou estruturas anormais em nenhum dos tratamentos avaliados (Figura 12A e 12B). Como foram utilizados segmentos nodais para indução do enraizamento, observou-se a formação de raízes ocorreu após 30 dias em meio de enraizamento, de forma que, primeiro houve a emissão da parte aérea com desenvolvimento de brotos e folhas e, em seguida ocorreu a formação de raízes.

De acordo com Sandhu et al. (2017) o enraizamento de brotos desenvolvidos *in vitro* é um passo fundamental de qualquer sistema de propagação *in vitro* de bambu. O meio nutritivo desempenha um papel vital na frequência de enraizamento, número de raízes e comprimento da raiz no bambu. Geralmente, meios com baixa concentração de sais auxiliam para que o enraizamento ocorra de forma mais rápida e em maiores proporções.



**Figura 10.** Percentagem de enraizamento (A), número de raízes (B) e comprimentos de raízes (C) de microestacas inoculadas em meio de MS suplementado com as auxinas AIA, ANA e AIB nas concentrações 0,0; 1,23; 2,45; 4,90; 9,80 e 14,70  $\mu\text{M}$  após 60 dias em meio de enraizamento. Letras maiúsculas iguais entre as auxinas, dentro de cada concentração e minúsculas iguais entre as concentrações, dentro de cada auxina, pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 11.** Percentagem de enraizamento (A), número de raízes (B) e comprimentos de raízes (C) de explantes oriundos de diferentes posições do broto (1º nó, 2º nó, 3º nó, base e broto), inoculadas em meio de MS em diferentes concentrações de sais (MS1/4, MS1/2, MS3/4 e MS) suplementado com 4,90  $\mu$ M de AIB, após 60 dias em meio de enraizamento. Letras maiúsculas iguais entre as concentrações do meio de MS, dentro de cada tipo de explante e minúsculas iguais entre os tipos de explantes, dentro de cada concentração de meio MS, pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Segundo Roy et al. (2014) o uso de auxinas como AIB, AIA e ANA são amplamente utilizadas no enraizamento de bambus e podem ser usadas em combinação ou individualmente. A resposta ao tipo e à concentração de auxina exógena adicionada ao meio de enraizamento, pode variar de acordo com as espécies de plantas estudadas e até mesmo entre os genótipos (Sandhu et al., 2017).

Shirin e Rana (2007) relataram 100% de indução radicular com AIB entre várias auxinas (AIA, AIB, ANA e ácido 2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D]) testadas em *Bambusa glaucescens*. Em contrapartida, Sharma e Sarma (2013) obtiveram melhor resposta ao enraizamento de *Bambusa tulda* utilizando ANA. Durante o enraizamento de *Dendrocalamus asper* e *Dendrocalamus strictus* a concentração do meio de MS influenciou maior indução de raízes quando cultivados em meio MS<sup>1/2</sup> quando comparadas as demais forças do meio de MS testadas (MS<sup>1/4</sup>, MS<sup>3/4</sup> e MS) (Singh et al., 2012a, b).

Dutta-Mudoi et al (2014) ao realizarem o enraizamento de *Bambusa nutans* por 35 dias, utilizando AIA, ANA e AIB em diferentes concentrações, relataram 85% de enraizamento e maior formação de raízes quando utilizaram ANA na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto AIB e AIA não induziram a formação de raízes em nenhuma das concentrações avaliadas. Em contrapartida Yasodha et al. (2008) induziram 68% de enraizamento em meio de cultivo suplementado com AIB, também para *Bambusa nutans*. Waikhon e Louis (2014) utilizaram 3 mg.L<sup>-1</sup> de AIB em meio MS<sup>1/2</sup> para o enraizamento de *Bambusa tulda* e *Melocanna baccifera*, atingindo 45 e 55% de enraizamento, em 76 e 40 dias, respectivamente. Quando combinaram AIB com cumarina, aumentaram a percentagem de enraizamento para 77 e 75%, respectivamente.

### 3.6 Aclimatização de plantas obtidas do enraizamento *in vitro*

As plantas oriundas de cada tratamento de enraizamento (item 2.6) foram aclimatizadas em câmara de crescimento do tipo BOD (Percival) em substrato Bioplant, onde permaneceram por 30 dias. Após esse período verificou-se a sobrevivência das plantas (Figura 13A). As plantas enraizadas em meio de cultivo com auxinas AIA com 2,45 µM, ANA com 1,23 µM e AIB com 1,23 e 2,45 µM apresentaram 100% de sobrevivência após a aclimatização. Em contrapartida, para as plantas enraizadas em AIA nas concentrações de 9,8 e 4,7 µM não houve sobrevivência das plantas ao final da aclimatização.

As plantas formadas no segundo experimento de enraizamento (item 2.7), oriundas dos explantes da base e de brotos foram aclimatizadas em substrato Bioplant® e terra PE. A percentagem de sobrevivência variou entre 91 e 100%. No entanto, não houve diferenças



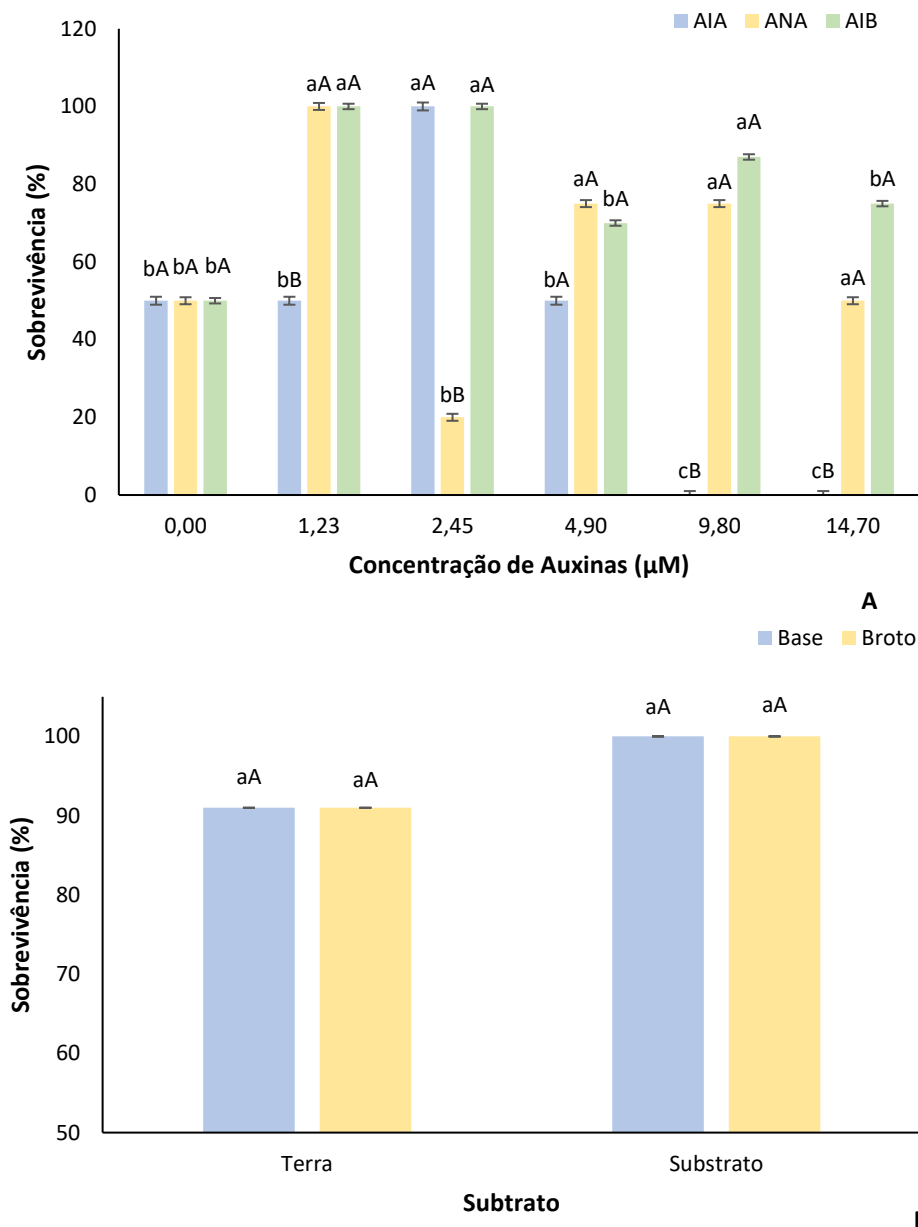
significativas entre os tipos de substratos e os tipos de explantes utilizados neste experimento (Figura 13B).

As plantas oriundas dos experimentos de enraizamento que apresentavam parte aérea e raízes bem desenvolvidas, apresentaram boa adaptação ao novo ambiente desenvolveram-se de forma satisfatória durante a aclimatização (Figura 14A e 14B).

As plântulas cultivadas *in vitro* estão continuamente expostas a um microambiente único com alto nível de umidade, condições assépticas, em meio contendo amplo teor de açúcar e nutrientes. Posteriormente, as plantas produzidas *in vitro* devem ser gradualmente aclimatizadas ao ambiente de casa de vegetação com menor umidade relativa, maior nível de luz, um ambiente estressante para as mudas produzidas *in vitro*. (Dutta-Mudoj et al., 2014). Dessa forma, a transferência bem-sucedida de plântulas oriundas de cultivo *in vitro* para condição de ambiente *ex vitro* pode determinar a eficiência do protocolo de micropropagação.



**Figura 12.** Plantas de *Guadua magna* enraizadas em meio de MS suplementado com 4,90  $\mu\text{M}$  de AIB em frascos com capacidade de 250 mL (A). Planta de *Guadua magna* após 60 dias em meio de enraizamento em meio de MS suplementado com 9,80  $\mu\text{M}$  de AIB (B).



**Figura 13.** Percentagem de sobrevivência de plantas oriundas do enraizamento após 30 dias de aclimatização. A – Percentagem de sobrevivência de microestacas inoculadas em meio de MS suplementado com as auxinas AIA, ANA e AIB nas concentrações 0,0; 1,23; 2,45; 4,90; 9,80 e 14,70 µM após 30 dias de aclimatização em câmara do tipo BOD e substrato Bioplant. Letras maiúsculas iguais entre as auxinas, dentro de cada concentração e minúsculas iguais entre as concentrações, dentro de cada auxina, pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. B - Percentagem de sobrevivência de plantas oriundas do enraizamento de explantes da base e broto inicial inoculados em meio de MS em diferentes concentrações de sais (MS1/4, MS1/2, MS3/4 e MS) suplementado com 4,90 µM de AIB, após 30 dias de aclimatização em Terra PE e substrato Bioplant mantidas em câmara do tipo BOD. Letras maiúsculas iguais entre os substratos, dentro de cada tipo de explante e minúsculas iguais entre os tipos de explantes, dentro de cada substrato pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 14.** Aclimatização de plantas de *Guadua magna* após 30 dias em substrato Bioplant (A) e terra PE (B) e mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização de hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio e fungicida Carbendazin isolados ou em combinação durante a desinfestação de sementes de *Guadua magna* ou no meio de cultivo não prejudicaram o processo germinativo e atuam de forma semelhante na redução da contaminação. Mas, a combinação de cloreto de mercúrio e fungicida Carbendazin interfere no desenvolvimento de plantas após a germinação.

Durante a etapa de multiplicação a mT na concentração de 6,66  $\mu$ M induz maior quantidade de brotos e melhor desenvolvimento de brotações durante os subcultivos e, ocorre uma tendência decrescente do desenvolvimento das brotações com aumento das concentrações desta citocinina.

Durante a etapa de multiplicação ocorre rizogênese espontânea e também ocorre o florescimento com formação de pseudo-espiguetas.

Os explantes oriundos do 1º, 2º e 3º nós, além de explantes da base do broto e brotos iniciais, apresentam boa taxa de brotação no meio MSS, MLE e MLA. Mas os explantes da base do broto possuem melhor desenvolvimento durante a multiplicação em MLE e MLA. Contudo a multiplicação em MLE induz a ocorrência de hiperhidricidade.

O AIB na concentração de 4,90 M induz maior taxa de enraizamento, AIA induz a formação de maior número de raízes e AIA (1,23; 2,45 e 4,90 M) induz raízes com maiores comprimentos. A utilização de brotos iniciais como explantes para o enraizamento, induz a maior taxa de enraizamento em qualquer concentração de sais do meio de MS (MS1/4, MS1/2, MS3/4 e MS).

As plantas produzidas durante o enraizamento alcançam taxas sobrevivência de até 100% durante a aclimatização, desde que apresentem raízes e parte aérea bem desenvolvidas no momento do transplante.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In vitro* propagation of an edible bamboo *Bambusa bamboos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, Vol.2, n.4. 2013.
- AREMU, A. O. et al. The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated “Williams” bananas. **Journal of Plant Physiology**, Vol. 169, n. 15, p. 1530–1541, 2012a.
- AREMU, A.O.; BAIRU, M.W.; DOLEZAL, K. FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Vol. 108, p. 1-16, 2012b. DOI 10.1007/s11240-011-0007-7
- ARSHAD, S.M.; KUMARI, A.; BHATNAGAR, S.K. Micropropagation of *Bambusa wamin* through shoot proliferation of mature nodal explants. **Journal Biology Research**, Vol. 3, p. 59-66, 2005.
- ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; ARYA, I.D. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, Vol. 18, n. 10, p. 879–882, 1999.
- ARYA, S.; RANA, P.K.; SHARMA, R.; ARYA, I.D. Tissue culture technology for rapid multiplication of *Dendrocalamus giganteus* Munro. **Indian Forest**, Vol. 3, p. 345–357, 2006.
- AZZINI, A. CIARAMELLO, D. NAGAI, V. Propagação Vegetativa do Bambu Gigante. **Bragantia**, Vol. 37, n. 2, p. 1–2, 1978.
- BAG, N. et al. Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] — a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. **Plant Science**, Vol. 156, n. 2, p. 125–135, jul. 2000.
- BANERJEE, M.; GANTAIT, S.; PRAMANIK, B. R. A two step method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. **Physiology Molecular Biology of Plants**, Vol. 17, n. 4, p. 387–93, 2011.
- BARBIERI JUNIOR, E.; ROSSIELLO, R.O.P.; MORENZ, M.J.F.; RIBEIRO, R.C. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. **Ciência Rural**, Vol. 40, n.3, 2010.
- BISHT, P.; PANT, M.; KANT, A. *In vitro* propagation of *Gigantochloa atroviolaceae* Widjaja through nodal explants. **Journal America Science**, Vol. 6, p. 1019-1025, 2010. BLACKBURN, G.A. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 58, n.4, p.855867, 2007. Doi:10.1093/jxb/erl123.

BRAR, J.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* seed germination of economically important edible bamboo *Dendrocalamus membranaceus* Munro. **Indian Journal Experimental Biology**, Vol. 51, p. 88–96, 2013.

DAS, M.; PAL, A. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Vol.81, p.109-112. 2005.

DEVI, S.; SINGH, B. A study on the environmental role and economic potential of *Arundinaria callosa*, Munro. VIII World Bamboo Congress, 2009. **Anais...** Vol. 03, Bamboo and Environment. Tailândia, 2009. p. 2-9.

DEVI, W. S.; BENGUELLA, L.; SHARMA, G. J. *In vitro* Seed Germination and Micropropagation of Edible Bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro using Seeds. **Biotechnology**, p.1–7, 2012.

DOYLE, J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Vol.12, p.13-15, 1990.

DUTTA-MUDOI, K.; BORTHAKUR, M. *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field grown culms and scope for upscaling. **Current Science**, Vol.96, n.7, p.962-966. 2009.

DUTTA-MUDOI, K.; BORTHAKUR, M. Factors affecting the frequency of *in vitro* flowering of *Bambusa balcooa* Roxb. **Indian Journal Plant Physiology**, Vol. 17, p. 37-43, 2012.

DUTTA-MUDOI, K.; SAIKIA, S.P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: A review. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 12, n. 20, p. 2770–2785, 2013.

DUTTA-MUDOI, K.D.; SAIKIA, S.P.; BROTHAKUR, M. Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall. ex Munro. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 13, n. 19, p. 1961-1972, 2014. DOI: 10.5897/AJB2014.13659.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Vol.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Vol. 37, n. 84, p. 427–435, 2009.

FILGUEIRAS, T. S., SANTOS-GONÇALVES, A.P. A Checklist of the Basal Grasses and Bamboos in Brazil (POACEAE). **The Journal of the American Bamboo Society**, Vol.18, n.1, p.7-18. 2004.

FILGUEIRAS, T.S.; LONDOÑO, X. A giant new *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) from Central Brazil. **Anais: I Seminário Nacional do Bambu**, 2006. 2 ed. Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, 2011. p.27-32.

FILGUEIRAS, T.S.; LONGHI-WAGNER, H.M.; VIANA, P.L.; ZANIN, A.; GUGLIERI, A.; OLIVEIRA, R.C.; CANTO-DOROW, T.S.; SHIRASUNA, R.T.; VALLS, J.F.M.; OLIVEIRAS, R.P.; RODRIGUES, R.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P.; WELKER, C.A.D. 2015. Poaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000193>>. Acesso em: 16 Nov. 2017.

FILGUEIRAS, T.S.; VIANA, P.L. Bambus brasileiros: morfologia, taxonomia, distribuição e conservação. In: DRUMOND, P.M.; WIEDEMAN, G. (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH, 2017. p.10-27.

GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; FREIRE-SEIJO, M.; PÉREZ, B.R.; HURTADO, O. Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Shrad. ex Wendl. en diferentes épocas del año. **Biotecnología Vegetal**, Vol. 10, n. 3, p. 151-156, 2010.

GE, W., ZHANG, Y.; CHENG, Z.; HOU, D.; LI, X.; GAO, J. Main regulatory pathways, key genes and microRNAs involved in flower formation and development of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Plant Biotechnology Journal**, Vol. 15, p. 82-96, 2017.

GENTILE, A.; FRATTARELLI, A.; NOTA, P.; CONDELLO, E.; CABONI, E. The aromatic cytokinin meta-topolin promotes *in vitro* propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 2016. DOI 10.1007/s11240-016-1150-y

GRADAILLE, M. D.; RODRÍGUEZ, D. P.; MAS, Y. L.; TORRIJO, F. S. Propagación *in vitro* de Bambú Chino (*Dracaena sanderiana* L.). **Ciencia y Tecnología**, Vol.3, n.1, p.7-13. 2010.

GROMBONE-GUARATINI, M. T.; NASCIMENTO, A. A.; SANTOS-GONÇALVES, A. P. Flowering and fruiting of *Aulonemia aristulata*: a gynomonocious woody bamboo species from Atlantic Forest in Brazil. **Revista Brasileira Botânica**, Vol.34, n.1, p.135-140, 2011.

GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. Proceedings of twentieth International Eucarpia Symposium. **Acta Horticulture**, Vol. 552, p. 195-203, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: [s. n.], v. 1, p. 509. 1998.

JIMÉNEZ, V. M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Vol. 86, n. 3, p. 389–395, 2006.

JIMÉNEZ, V. M. GUEVARA, E. Micropropagation of bamboo species through axillary shoot proliferation. In: Protocols for micropropagation of Woody Trees and Fruits, S. M. Jain e H. Häggman, eds. (Springer), p.465-476. 2007. doi:10.1007/978-1-4020-6352-7\_43.

KAUR, D.; DOGRA, V.; THAPA, P.; BHATTACHARYA, A.; SOOD, A.; SREENNIVASULU, Y. *In vitro* flowering associated protein changes in *Dendrocalamus hamiltonii*. **Proteomics Journal**, 2015. ET AL., 2015 DOI: 10.1002/pmic.201400049.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Vol. 77, p. 81–191, 2004.

LONDOÑO, X. La Subtribu Guaduinae de América. **Anais: Simpósio Internacional Guadua**. Pereira, Colômbia, 2004.

LIN, C.S.; CHANG, W.C. Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. **Plant Cell Reports**, Vol. 17, p. 617-620, 1998.

LIN, C.S.; LIN, C.C.; CHANG, W.C. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of *Bambusa edulis*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Vol. 76, p. 75–82, 2004.

LIN, C.S.; CHENG, M.J.; HSIAO, H.W.; HONG, P.I.; JHENG, F.Y.; LIN, C.C.; CHANG, W.C. Stamen-less inflorescence proliferation of *Bambusa edulis*. **Science Horticulture**, Vol. 107, p.76–80, 2005.

LIN, C.S. Improving multiple shoot proliferation in bamboo mosai virus-free *Bambusa oldhamii* Munro propagation by liquid culture. **Horticulture Science**, Vol. 42, n. 5, p. 1243-1246, 2007.

MENEZES, T.P.; GOMES, W.A.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* HAW. **Bioscience Journal**, Vol.28, n.6, p.868-876, 2012.



- MONTALBÁN, I.A.; DIEGO, N.DE.; MONCLEÁN, P. Testing novel cytokinins for improved *in vitro* adventitious shoots formation and subsequent *ex vitro* performance in *Pinus radiata*. **Forestry**, Vol. 84, n. 4, 2011. DOI:10.1093/forestry/cpr022.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Vol.15, p.473-497, 1962.
- NADHA, H.K.; KUMAR, R.; SHARMA, R.K.; ANAND, M.; SOOD, A. Evaluation of clonal fidelity of *in vitro* raised plants of *Guadua angustifolia* Kunth using DNA-based markers. **Journal of Medicinal Plants Research**, Vol. 5, n. 23, p. 5636-5641, 2011.
- NDIAYE, A.; DIALLO, M. S.; NIANG, D.; GASSAMA-DIA, Y. K. *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. **African Journal of Biotechnology**, Vol.5, n.13, p.1245-1248. 2006.
- NEGI, D.; SAXENA, S. Ascertaining clonal fidelity of tissue culture raised plants *Bambusa balcooa* Roxb. using inter simple sequence repeat markers. **New Forests**, Vol. 40, p. 1-8, 2010. DOI 10.1007/s11056-009-9182-3
- NEGI, D.; SAXENA, S. Micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through axillary shoot proliferation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Vol. 47, n. 5, p. 604–610, 2011.
- NIEDZ, R.P.; EVENS, T.J. The effects of benzyladenine and meta-topolin on *in vitro* shoot regeneration of a Citrus Citrandarin Rootstock. **Research Journal of Agricultural and Biological Sciences**, Vol. 6, n. 1, p. 45-53, 2010.
- NIEDZ, R.P.; EVENS, T.J. The effects of benzyladenine and meta-topolin on *in vitro* shoot regeneration of sweet orange. **Research Journal of Agricultural and Biological Science**, Vol. 6, n. 3, p. 64-73, 2011.
- NOGUEIRA, J.S.; COSTA, F.H.S.; VALE, P.A.A.; LUIS, Z.G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P.M.; WIEDEMAN, G. (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH, 2017. p.103-129.
- OGITA, S.; KASHIWAGI, H.; KATO, Y. *In vitro* node culture of seedlings in bamboo plant, *Phyllostachys meyeri* McClure. **Plant Biotechnology**, Vol. 25, p. 381–385, 2008.
- ORNELLAS, T. S.; WERNER, D.; HOLDERBAUM, D. F.; SHERER, R. R. GUERRA, M. P. Effects of vitrofural, BAP and meta-Topolin in the *in vitro* culture of *Dendrocalamus asper*.

Proceedings VI Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants. **Acta Horticulture**, 2017. DOI 10.17660/ActaHortc.2017.1155.41.

RAMANAYAKE, S.M.S.D.; MEEMADUMA, V.N.; WEERAWARDENE, T.E. *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). **Scientia Horticulturae**, Vol. 110, p. 109-113, 2006.

RAMANAYAKE, S.M.S.D.; MADDEGODA, K.M.M.N.; VITHARANA, M.C.; CHATURANI, G.D.C. Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. **Scientia Horticulturae**, Vol.118, p.270-273, 2008.

RAVIKUMAR, R.; ANANTHAKRISHMAN, G.; KATHIRAVAN, K.; GANAPATHI, A. *In vitro* shoot propagation of *Dendrocalamus strictus* nees. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Vol. 52, p. 189–192, 1998.

ROY, S.S.; ALI, M.N.; GANTAIT, S.; CHAKRABORTY, S.; BANERJEE, M. Tissue culture and biochemical characterization of important bamboos. **Research Journal of Agricultural Sciences**, Vol. 5, n. 2, p. 135–146, 2014.

SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2017. DOI 10.1007/s11240-017-1325-1.

SANJAYA, T.; RATHORE, S.; RAVISHANKAR, R. Micropopagation of *Pseudoxynanthera stocksii* Munro. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, Vol. 41, p. 333-337, 2005.

SAXENA, S. *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, Vol. 9, p. 431-434, 1990.

SHARMA, S.; ARYA, I.D. Bamboo propagation and establishment through tissue culture. **INBAR News Magazine**, Vol. 6, p. 26-29, 1998.

SHARMA, P.; SARMA, K. P. *In vitro* propagation of *Bambusa balcooa* for a better environment. **Analls: International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences (ICABPS)**. Bangkok. 2011.

SHIRIN, F.; RANA, P. K. *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. **Plant Biotechnology Reports**, Vol.1, p.141-147. 2007.

SILVA, R.M.C. O bambu no Brasil e no mundo. p. 1–45, 2005.

SINGH, S. R. et al. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex k. Heyne): an exotic edible bamboo. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**,

Vol. 21, n. 2, p. 220–228, 2012.

SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. **Acta Physiologiae Plantarum**, Vol.35, p.419-430. 2013.

SISODIA, R.; RAO, I.U. *In vitro* flowering in *Bambusa bambos* (L.) Voss, an anatomical perspective. **Indian Journal of Experimental Biology**, Vol. 55, p. 171-177, 2017.

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUR, L.H.H. AS clorofilas. **Ciência Rural**, Vol. 35, n.3, p.748-755, 2005.

SIQUEIRA, D.L.; SANTOS, D.; SALOMÃO, L.C.C.; SILVA, F.F.; BARROS, Z.J. Micropropagação de bananeira 'Maça', cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. **Revista Ceres**, Vol.60, n.6, p.745-751, 2013.

SOOD, A.; GODBOLE, S.; THAKUR, R.; SHARMA, M.; AHUJA, S.P. Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltoii* Ness Et Arn.ex Munro. **Current Science**, Vol. 83, p. 885-889, 2002.

THAPLIYAL, M.; JOSHI, G.; BEHERA, F. Bamboo: Flowering, seed germination and storage. In: KAUSHIK, S.; SINGH, Y. P.; KUMAR, D.; THAPLIYAL, M.; BARTH WAL, S. **Bamboos in India**. National Forest Library and information Centre Forest Research Institute. 2015. p. 89-108.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre : Artmed, 2004. p.693. (Trad. SANTARÉM E.R. et al.).

WAIKHOM, S.D.; LOUIS, B. An Effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melocanna baccifera*) through nodal culture. **Scientific World Journal**, Vol. 2014, 8p. 2014. DOI: dx.doi.org/10.1155/2014/345794.

WANG, W.; FRANKLIN, S. B.; CIRTAIN, M. C. Seed germination and seedling growth in the arrow bamboo *Fargesia qinlingensis*. **Ecological Research**, Vol. 22, p. 467–474, 2007.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiology**, Vol. 144, p. 307-313, 1994.

WERBROUCK, S.P.O.; STRNAD, M.; VAN ONCKELEN, H.A.; DEBERGH, P.C. *Meta-topolin*, an alternative to benzyladenine in tissue culture? **Physiologia Plantarum**, Vol. 98, p. 291–297, 1996.

WOJTANIA, A. Effect of *meta*-topolin on *in vitro* propagation of *Pelargonium x Hortorum* and *Pelargonium x Hederaefolium* cultivars. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Vol. 79, n. 2, p. 101-106, 2010.

WYSOCKI, W.P.; RUIZ-SANCHEZ, E.; YIN, Y.; DUVALL, M.R. The floral transcriptomes of four bamboo species (Bambusoideae; Poaceae): support for common ancestry among woody bamboos. **BioMed Central Genomics**, Vol. 17, p. 1-14, 2016. DOI 10.1186/s12864-016-2707-1.

YASODHA, R. et al. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. **Scientia Horticulturae**, Vol. 116, n. 1, p. 113–116, 2008.