



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-graduação em Botânica

FERNANDA FURLAN QUEIROZ

ESTABELECIMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO E USO DE
BIORREATORES COMO ESTRATÉGIAS DE PROPAGAÇÃO DE BAMBUS DO
GÊNERO *GUADUA*

Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Brasília-DF
Julho de 2020

Fernanda Furlan Queiroz

ESTABELECIMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO E USO DE
BIORREATORES COMO ESTRATÉGIAS DE PROPAGAÇÃO DE BAMBUS DO
GÊNERO *GUADUA*

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Botânica, do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade de
Brasília, para a obtenção do título de Doutora
em Botânica.

Brasília-DF, julho de 2020.

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado apresentada por Fernanda Furlan Queiroz, com o título: Estabelecimento e cultivo de células em suspensão e uso de biorreatores como estratégias de propagação de bambus do gênero *Guadua*, 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 2020.

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. Leandro Silva de Oliveira (Membro externo)
Instituto de Ciências Agrárias, UFMG

Dra. Inaê Mariê de Araújo Silva Cardoso (Membro externo)
Embrpa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Natália Helena Gavilan (Membro suplente externo)
Departamento de Produção Vegetal, Unesp/Botucatu

“Ser ruim em alguma coisa, é o primeiro passo para se tornar bom em alguma coisa”.

Hora da Aventura.

“O Bambu é uma planta que tem fortes raízes, muita flexibilidade, enverga, mas não parte, vive em comunidade e demora muitos anos para florescer.

Que a nossa vida seja como o Bambu: Que tempestade nenhuma nos derrube, que tenhamos a flexibilidade de nos adaptarmos às situações, que vivamos sempre rodeados de nossos amigos e familiares, aqueles que tal como nós querem ser como o Bambu. Demore o tempo que demorar, lutemos sempre pelos nossos sonhos”.

Autor desconhecido.

DEDICATÓRIA

À meu filho Raul e meu marido André, os grandes amores da minha vida.

À minha família de sangue, pai Angelo Rubens, mãe Suely, irmã Suelen e sobrinha Laura, minhas razões de viver.

À minha família de coração Nildo, Maristela, Fabíola, Júnior, Victor e Magda, meus presentes divinos.

Dedico.

Agradecimentos

Grata pela luz imensurável, ao qual me refugio todos os dias. Que o sagrado seja sempre meu guia.

Ao meu filho amado Raul, que chegou no meio do doutorado de forma inesperada, reestruturou todo o cronograma da tese, me deu forças para lutar por essa conquista, minha maior fonte de aprendizado diário. Foi por você meu filho, que cheguei até aqui.

Ao meu marido André, meu parceiro e confidente. Sem você nada disso seria conquistado. Obrigada por existir na minha vida, por ser meu porto seguro, por acreditar em mim e ter paciência comigo rsrs. Te amo!!!

Aos meus pais, Rubens e Suely, pela dádiva da vida, por sempre me apoiarem e por representarem meu porto seguro. Obrigada pelas horas ao telefone, quando devido a distância não podíamos nos abraçar. Amo vocês!

À minha irmã, Suelen, por sempre me incentivar e me apoiar, pela admiração e carinho. Você e Laurinha tem meu coração.

Aos meus pais agregados, Nildo e Maristela, por todo apoio e motivação, por sempre me ouvirem e me ajudarem nas tomadas de decisões mais sábias, exemplos para mim. E todos os membros dessa família que vieram no pacote e fazem minha vida mais feliz, Fabíola, Júnior, Victor e Magda.

Ao meu orientador, professor Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira, pela acolhida, pela paciência e dedicação. Obrigada por abrir portas e pelas valiosas contribuições para meu crescimento profissional.

À professora e coordenadora do programa, professora Dra. Sueli Maria Gomes, um ser humano sensível que, principalmente na reta final do doutorado, conquistou minha admiração. Obrigada professora, por me ouvir, principalmente. Nunca me esquecerei do quanto você significa.

À todos meus amigos de jornada do laboratório LCT-II, vocês são incríveis!!! Em especial, ao Rennan pelas confidências durante horas noturnas no laboratório e que às vezes chegavam até a madrugada; à Lorrane que deixava meus dias mais leves e me fazia dar pausas. Sem vocês dois eu teria surtado garotos! E ao André Xavier de Souza, por todo zelo e paciência comigo, por estar sempre disponível para me ajudar ao longo desses anos de trabalho, inclusive nos fins de semana.

Aos amigos que conquistei em Brasília Luciana, Thiago e Fernando, vou levar vocês para toda vida. Passamos ótimos momentos juntos que serão eternizados em minha memória e em meu coração!

À EMBRAPA e à UnB (Instituto de Ciências Biológicas), instituições parcerias que permitem que trabalhos como este possam ser realizados.

À FAP-DF e à CAPES pela concessão da bolsa de estudo, e ao CNPq pelo custeio financeiro do trabalho de pesquisa.

E por fim, gostaria de poder mencionar aqui todas as pessoas que indireta ou diretamente contribuíram para minha formação pessoal e meu crescimento profissional durante o doutorado, mas faltariam páginas. Então, muito obrigada a todos amigos e familiares que me ajudaram nessa empreitada e acreditaram em mim, muito obrigada pelas palavras de apoio, motivação e carinho. Parte do que sou, é porque vocês existem na minha vida. Meu coração é imensamente grato!

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo aperfeiçoar técnicas de multiplicação clonal *in vitro* de *Guadua magna* e *Guadua* aff. *chaparensis*, desenvolvendo estudos relacionados à calogênese, embriogênese somática e cultura de células em suspensão, além de avaliar a aplicação de biorreatores em etapas do processo. Investigações anatômicas e histoquímicas, além de análises moleculares, também foram realizadas para melhor caracterizar as diferentes etapas envolvidas nos processos estudados. Para tanto, inicialmente foi realizada a indução da calogênese em explantes formados por segmentos nodais, segmentos internodais e bainhas foliares de plantas estabelecidas *in vitro* de *G. magna*. Os explantes foram submetidos à meio de cultura de MS suplementado com dicamba, 2,4-D e picloram nas concentrações de 0; 6,77; 13,54; 20,31 e 27,08 μM . Aos 60 dias de cultivo, verificou-se que todos os tratamentos apresentaram formação de calos de coloração branco-amarelada e de aspecto mucilaginoso. A análise histológica revelou zonas meristemáticas com células em intensa divisão e formação de primórdios radiculares. As maiores percentagens de formação de calos foram obtidas nas concentrações 20,31 μM (88,0 %), 13,54 μM (85,3 %) e 27,08 μM (74,7 %). O maior incremento de massa fresca de calo foi verificado em 13,54 μM de picloram (402,5 mg). Os calos formados foram inoculados em Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de meio de MS líquido, suplementado de 4,44 μM de dicamba, 2,4-D ou picloram, onde foram avaliadas quatro diferentes origens de calos da etapa de indução de calos para o estabelecimento: 13,54 μM de dicamba (T1), 13,54 μM de 2,4-D (T2), 13,54 μM de picloram (T3) ou 20,31 μM de picloram (T4). Após seis subculturas de 30 dias cada, T3 e T4 apresentaram melhores índices de estabelecimento (100 % e 83,3 %, respectivamente), incremento da massa fresca e massa seca dos cultivos celulares em suspensão. A partir de análise citoquímica, os cultivos em T3 e T4 apresentaram aglomerados de células avermelhadas, o que as qualifica como positivas quanto à viabilidade embriogênica, conferindo à esses tratamentos as melhores condições de cultivo para tal finalidade. Num segundo capítulo, segmentos nodais de plantas cultivadas *in vitro* da espécie *Guadua* aff. *chaparensis* foram inoculados em meio de cultura de MS com 2,4-D e picloram, nas concentrações 11,1 μM ou 22,2 μM para indução da embriogênese somática. Após 120 dias de cultivo, foram observados quatro calos morfologicamente distintos: (1) gelatinosos em 11,1 μM de 2,4-D, (2) compactos em 22,2 μM de 2,4-D, (3) friáveis em 11,1 μM de picloram e (4) compactos nodulares em 22,2 μM de picloram. Nos calos friáveis foi observado a formação de pró-embriões, uma característica decisiva para a progressão de embriões somáticos, e também a presença de grãos de amido. Os calos friáveis foram submetidos a cultura líquida sob agitação para a obtenção de cultivos celulares em suspensão nos tratamentos T1- controle, T2- 4,44 μM de 2,4-D, T3- 4,44 μM de picloram ou T4- combinação das auxinas. Todos os tratamentos proporcionaram células com viabilidade embriogênica verificadas com a análise citoquímica, exceto T1- controle. Após o estabelecimento e a multiplicação das culturas celulares, foi realizado o restabelecimento de calos, a partir de alíquotas de 20 μL dos cultivos ressuspensas em meio de MS nos tratamentos com 2,4-D e picloram, nas concentrações de 0; 6,77; 13,54; 20,31 e 27,08 μM . Tais calos apresentaram aspecto friável e, a partir da análise anatômica, foram observados pró-embriões somáticos. Por fim, num terceiro capítulo, realizou-se a multiplicação de propágulos vegetativos de *G. magna* em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*: T1 MLC- Meio Líquido Convencional; T2 MLA- Meio sob Agitação, T3 BIPER- Biorreatores de Imersão Permanente e T4 BIT- Biorreator de Imersão Temporária. Após 90 dias de cultivo, BIPER e BIT apresentaram maiores médias de sobrevivência dos propágulos em cultivo, número de brotações, altura de brotações e massa fresca, bem como conteúdo de clorofila *a*, *b* e carotenóides. A partir da análise de extravasamento de eletrólitos, foi possível verificar que em todos os tratamentos os danos à membrana foram relativamente baixos nos sistemas de

cultura ($\leq 33,5$), exceto no T2-MLA (60,4). Na análise dos componentes bioquímicos (AST/Amido), as mudas de *G. magna* cultivadas em T3-BIPER e T4-BIT, consumiram em maior quantidade suas reservas de carboidratos (AST). A análise anatômica revelou a presença de regiões meristemáticas, células de primórdios foliares e radiculares, e meristema apical de caule, ou seja, que as mudas propagadas continham a estrutura celular básica necessária para o desenvolvimento de novos brotos e raízes. Também foi possível visualizar a conexão entre o sistema vascular do caule e as folhas, onde um ou mais feixes vasculares são orientados para as folhas. Quanto à aclimatização, as melhores taxas de sobrevivência foram obtidas das plantas de *G. magna* advindas dos tratamentos T3-BIPER e T4-BIT, com ocorrência de enraizamento adventício espontâneo. Para análise da fidelidade genética, a partir de marcadores moleculares ISSR's, os indivíduos analisados apresentaram entre si 100 % de similaridade em todos tratamentos, e os somaclones diferiram em média menos de 0,2 %. Conclui-se que, as informações inéditas geradas neste trabalho podem ser úteis para contribuir no entendimento dos aspectos biológicos, fisiológicos e bioquímicos durante o processo de cultivo *in vitro* de *G. magna* e *G. aff. chaparensis* e assim também para o aperfeiçoamento da multiplicação clonal em sistemas de cultivo *in vitro*, inclusive para outras espécies de bambu.

Palavras-chave: *Poaceae*, *Bambusoideae*, *Guadua*, morfogênese, sistemas de cultivo, análises bioquímicas, marcadores moleculares.

ABSTRACT

This work aimed to improve *in vitro* clonal multiplication techniques of *Guadua magna* and *Guadua* aff. *chaparensis*, developing studies related to callogenesis, somatic embryogenesis and cells suspension culture, in addition to evaluating the application of bioreactors in stages of the process. Anatomical and histochemical investigations, in addition to molecular analyzes, were also carried out to better characterize the different steps involved in the processes studied. Therefore, initially, induction was performed the callogenesis in explants that consisted of nodal segments, internodal segments and leaf sheaths of plants established *in vitro* of *G. magna*. The explants were submitted to MS medium culture supplemented with dicamba, 2,4-D or picloram in concentrations of 0; 6.77; 13.54; 20.31 and 27.08 μM . At 60 days of cultivation, it was found that all treatments showed yellowish-white calli and mucilaginous appearance. The histological analysis revealed meristematic zones with cells in intense division and formation of adventitious roots. The highest average percentages of calli formation were obtained in the concentrations 20.31 μM (88.0 %), 13.54 μM (85.3 %) and 27.08 μM (74.7%). The highest increment of fresh mass of calli was verified in 13.54 μM of picloram (402.5 mg). The calli formed were inoculated into Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 20 mL of liquid MS medium, supplemented with 4.44 μM dicamba, 2,4-D or picloram, which were evaluated four different calli origins to induction calli step to establishment: 13.54 μM dicamba (T1), 13.54 μM 2,4-D (T2), 13.54 μM picloram or 20.31 μM picloram (T4). After six subcultures of 30 days each, T3 and T4 showed better rates of establishment (100 % and 83.3 %), increase in fresh mass and dry mass of the cell suspension cultures. From cytochemical analysis, cultures in T3 and T4 showed a greater cluster of reddish cells, which qualifies them as positive in terms of embryogenic viability, giving these treatments the best culture conditions for this purpose. In a second chapter, nodal segments of the species of *G. aff. chaparensis* were inoculated into MS medium with 2,4-D and picloram, in concentrations of 11.1 μM or 22.2 μM to induce somatic embryogenesis. After 120 days of cultivation, four morphologically distinct calli were observed: (1) gelatinous in 11.1 μM of 2,4-D, (2) compact in 22,2 μM of 2,4-D, (3) friable in 11.1 μM picloram and (4) nodular compacts in 22.2 μM picloram. In friable calli, the formation of pro-embryos was observed, a decisive characteristic for the progression of somatic embryos, and also the presence of starch grains. The friable calli were subjected to liquid culture under agitation to obtain cell suspension cultures in the treatments T1- control, T2- 4.44 μM of 2,4-D, T3- 4.44 μM of picloram or T4- in combination with auxins. All treatments provided cells with embryogenic viability verified with cytochemical analysis, except T1- control. After the multiplication of cultures, calli recovery was performed, using aliquots of 20 μL of the cultures resuspended in MS medium in the treatments with 2,4-D and picloram, in the concentrations of 0; 6.77; 13.54; 20.31 and 27.08 μM . Such calli showed a friable aspect and, from the anatomical analysis, somatic pro-embryos were observed. Finally, in a third chapter, it was realized the multiplication of vegetative propagules of *G. magna* in different *in vitro* culture systems: T1 CLM- Conventional Liquid Medium, T2 LMA- Medium under Agitation, T3 PERIB- Permanent Immersion Bioreactors and T4 TIB- Temporary Immersion Bioreactor. After 90 days of cultivation, PERIB and TIB showed higher means of the vegetatives propagules survival, number of shoots, size of shoots and mass fresh, as well as chlorophyll content *a*, *b* and carotenoids. Through the analysis of electrolyte leakage, it was possible to verify that in all treatments the damage to the membrane was relatively low in the culture systems (≤ 33.5), except T2-LMA (60.4). In the analysis of the biochemical components (AST / Starch), the *G. magna* seedlings grown in T3-PERIB and T4-TIB, consumed their carbohydrate reserves (AST) in greater quantity. The anatomical analysis revealed that the propagated seedlings contained the basic cellular structure necessary for the development of new shoots and roots,

and also evidenced the presence of meristematic regions, cells of leaf and root pimerdial, and stem apical meristem. It was also possible to visualize the connection between the vascular system of the stem and the leaves, where one or more vascular bundles are oriented towards the leaves. As for acclimatization, the optimal survival rates were obtained from the *G. magna* plants from T3-PERIB and T4-TIB, with the occurrence of spontaneous adventitious rooting. For genetic fidelity analysis, using ISSR's molecular markers, the individuals analyzed showed 100 % similarity in all treatments, and the somaclones differed on average less than 0.2 %. It is concluded that the new information generated in this study can be useful to contribute to the understanding of the biological, physiological and biochemical aspects during the *in vitro* cultivation process of *G. magna* and *G. aff. chaparensis*, as well as the improvement of *in vitro* clonal multiplication in cultivation systems, including other bamboo species.

Key-words: *Poaceae*, *Bambusoideae*, *Guadua*, morphogenesis, culture systems, biochemical analyses, molecular markers.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial do bambu. (a) Bambu netropicais, (b) bambus temperados, (c) bambus palotropicas, (d) bambus herbáceos (Yeasmim et al., 2015)	5
Figura 2. Representação esquemática das partes vegetativas do bambu (Adaptado de Hidalgo-López, 2003)	7
Figura 3. Sistema de desenvolvimento do rizoma de um bambu do grupo paquimorfo (simpodial/entoucerante (Adaptado de Hidalgo-López, 2003)	9
Figura 4. Sistema de desenvolvimento do rizoma de um bambu do grupo leptomorfo (monopodial/alastrante (Adaptado de Hidalgo-López, 2003)	9
Figura 5. Distribuição geográfica do gênero <i>Guadua</i> (Kunth pelo território brasileiro. Estados em branco não tem representantes do gênero (Adaptado de Shirasuna, 2015)	11
Figura 6. Ilustração simplificada de Biorreator de imersão permanente (BIPER) agitado por fluxo de ar por meio de tubos de silicone (Adaptado de Ribeiro e Bastos, 2008)	23
Figura 7. Esquema ilustrativo simplificado do Biorreator de Imersão Temporária (BIT) composto de frascos dispostos lado a lado (Adaptado de Ribeiro e Bastos, 2008)	24

CAPÍTULO 1

Figura 1. Explantes utilizados para a calogênese de <i>Guadua magna</i> . (A) segmento nodal, (B) segmento internodal, (C) bainha foliar	50
Figura 2. Diagrama da indução, multiplicação e regeneração dos calos de <i>Guadua magna</i> , bem como o estabelecimento de suspensão celulares	53
Figura 3. Esquema ilustrativo das etapas de indução da calogênese para o estabelecimento e multiplicação de cultivos celulares em suspensão	54
Figura 4. Caracterização morfoanatômica dos explantes na etapa de indução da calogênese de <i>Guadua magna</i> . Formação de calos (A) na bainha foliar e (B) no segmento nodal; (C-D) setas indicando rompimento de tecidos para crescimento de calo; (E-F) setas indicam divisões celulares. Abreviações: (FV) feixe vascular, (CM) células meristemáticas, (CV) células vacuoladas, (DP) conjuntos de células em divisão periclinal	61
Figura 5. Caracterização histoquímica de calos oriundos de bainhas foliares de <i>Guadua magna</i> após 60 dias de cultivo em meio de indução da calogênese. (A-B) Grãos de amido identificados com corante <i>Periodic Acid Schiff</i> - PAS, (C) seta indicando no detalhe, (D-E) e confirmados com corante Lugol (F) seta indicando no detalhe, (G-F) reservas proteicas identificadas com o corante <i>Xylidine Ponceau</i> - XP (I) seta indicando no detalhe. Abreviações: (FV) feixe vascular, (CM) células meristemáticas, (CV) células vacuoladas ..	63
Figura 6. Caracterização histoquímica de calos oriundos do segmento nodal de <i>Guadua magna</i> após 60 dias de cultivo em meio de indução da calogênese. Grãos de amido identificados com corante <i>Periodic Acid Schiff</i> - PAS (A-C) e confirmados com corante Lugol (D-F); reservas proteicas identificadas com o corante <i>Xylidine Ponceau</i> - XP (G-I)	64
Figura 7. Efeito de diferentes auxinas no incremento de massa fresca (mg) de calos durante a fase de multiplicação da calogênese de <i>Gudua magna</i> . Médias com erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância	66

Figura 8. Caracterização morfoanatômica e histoquímica da formação de calos aos 60 dias da fase de multiplicação durante o processo da calogênese em *Guadua magna*. (A) Formação de calos com coloração branco-amarelada, de aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa e brilhosa; (B) secção anatômica do calo; seta indicanto divisões periclinais de células meristemáticas; (C-D) detalhe da secção mencionada na letra B, que evidencia células com citoplasmas densos e núcleos grandes, e ainda agrupamentos de duas ou mais células com espaços intercelulares; (E e H) Análise com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS, seta indicando grãos de amido, (F e I) confirmação de presença de grãos de amido com corante Lugol; (G e J) conspícuos corpos protéicos identificados com o corante *Xylidine Ponceau* - XP. Abreviações: (CM) células meristemáticas, (CV) células vacuoladas 68

Figura 9. Caracterização morfoanatômica e histoquímica da formação de calos aos 30 dias da fase de regeneração durante o processo da calogênese em *Guadua magna*. (A) Formação de calos esbranquiçados, com aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa, brilhosa e irregular; (B) secção anatômica do calo, seta indicando centros meristemáticos bem definidos; (C) detalhe dos agrupamentos celulares; (D) grãos de amido identificados com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS e (E) confirmados com corante Lugol; (F) reservas proteicas não foram observadas com corante *Xylidine Ponceau* - XP 69

Figura 10. Caracterização morfoanatômica e histoquímica da formação de calos aos 60 dias da fase de regeneração durante o processo da calogênese em *Guadua magna*. (A) Formação de calos com coloração esbranquiçada, com aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa, brilhosa e irregular, apresentando evaginações verdes; (B) secção anatômica do calo, seta amarela indicando agrupamento de células em divisão, seta preta indicando provável formação de primórdio radicular; (C) possível primórdio radicular; (D) agrupamento de células em divisão mencionado na letra B; (E) detalhe das células mencionadas na letra D; (F) detalhe de centro meristemático para formação do eixo radicular; (G-H) grãos de amido identificados com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS; (I) reservas proteicas não foram observadas com o corante *Xylidine Ponceau* - XP; (J-L) confirmação com corante Lugol da presença de grãos de amido 70

Figura 11. Caracterização morfoanatômica da fase de regeneração durante o processo da calogênese em *Guadua magna*. (A) Aos 90 dias formação de calos com coloração esbranquiçada, com aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície brilhosa, lisa e irregular, apresentando evaginações verdes; (B) Secção anatômica do calo; (C) Detalhe da secção mencionada na letra B, seta indicando centros meristemáticos bem definidos; (D) Aos 120 dias formação de calos com aspecto amarelo e de superfície esponjosa, apresentando evaginações verdes; (E) Secção anatômica do calo que evidencia coifa, columela e procâmbio; (F) Detalhe da columela mencionada na letra E; (G) Aos 180 dias formação de calos com aspecto amarelo e de superfície esponjosa, apresentando evaginações verdes e oxidação (escurecimento) na base; (H) Secção anatômica do calo; (I) possível primórdio radicular (coifa, columela e procâmbio), nota-se elementos de vasos em diferenciação, seta indicando compostos fenólicos; (J) Aos 30 dias formação de calos oxidados (totalmente escurecidos); (K) Secção anatômica do calo; (L) Detalhe da secção mencionada na lera K, nota-se presença de compostos fenólicos e células em possível processo de apoptose. Abreviações: (c) coifa, (col) columela, (pc) procâmbio 73

Figura 12. Estabelecimento de cultivos celulares em suspensão de *Guadua magna* ao longo do tempo 75

Figura 13. Efeito da auxina no incremento de massa fresca (mg) dos cultivos celulares em suspensão de *Gudua magna*. Médias com erro padrão de letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância 76

Figura 14. Efeito da auxina no incremento de massa seca (mg) dos cultivos celulares em suspensão de *Guadua magna*. Médias com erro padrão de letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância 77

Figura 15. Análise citoquímica com Carmim acético e azul de Evans para verificação da viabilidade embriogênica de cultura de células em suspensão em *Guadua magna*. (A-B) T1 - 13,54 μM de dicamba; (C-D) T2 - 13,54 μM de 2,4-D; (E-F) T3 - 13,54 μM de picloram; e (G-H) 20,31 μM de picloram 78

CAPÍTULO 2

Figura 1. Esquema ilustrativo das etapas de indução da embriogênese somática, do estabelecimento de cultivos celulares em suspensão e do reestabelecimento de calos com competência embriogênica 99

Figura 2. Aspectos morfológicos e anatômicos dos tipos de calos obtidos de segmentos nodais de *Guadua* aff. *chaparensis* aos 120 dias de cultivo em meio de indução para embriogênese somática. (A) Calo primário obtido em 11,1 μM de 2,4-D (T1) e (B) seu aspecto anatômico, apresentando predominantemente células vacuoladas. (C) Calo primário obtido em 22,2 μM de 2,4-D (T2) e (D) seu aspecto anatômico, evidenciando as zonas meristemáticas entre as células vacuoladas (detalhe das células da zona meristemática). (E) Calo primário obtido em 11,1 μM de picloram (T3) e (F) seu aspecto anatômico apresentando formação de pró-embriões somáticos entre as células vacuoladas. (G) Calo nodular obtido em 22,2 μM de picloram (T4) e (H) seu aspecto anatômico, evidenciando zonas meristemáticas nas estruturas nodulares do calo (detalhe das células da zona meristemática). Legenda: (cp) calo primário, (cv) células vacuoladas, (en) estruturas nodulares, (pe) pró-embriões, (zm) zona meristemática 100

Figura 3. Análise histoquímica dos tipos de calos obtidos a partir de segmentos nodais de *Guadua* aff. *chaparensis* aos 120 dias de cultivo em meio de indução para embriogênese somática. Grãos de amido (amiloplastos) identificados com corante *Periodic Acid Schiff* – PAS e confirmados com corante Lugol em (A) 22,2 μM de 2,4-D (T2), em (C) 11,1 μM de Picloram (T3) e em (E) 22,2 μM de picloram (T4). E confirmados com corante Lugol em (B) 22,2 μM de 2,4-D (T2), em (D) 11,1 μM de picloram (T3) e em (F) 22,2 μM de picloram (T4) 103

Figura 4. Cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis* em (A) bandeja rotativa (B) Detalhe da cultura de consistência densa, com coloração branca amarelada, de aspecto homogêneo e leitoso 105

Figura 5. Porcentagem média do estabelecimento de cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis* ao longo do tempo de cultivo 106

Figura 6. Crescimento dos cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis* por SCV (volume celular sedimentado) ao longo do tempo (subcultivos). Valores do gráfico representados pelas médias com erro padrão 107

Figura 7. Análise citoquímica com Carmim Acético e Azul de Evans para verificação da viabilidade embriogênica dos cultivos de celulares em suspensão em *Guadua* aff. *chaparensis* 108

Figura 8. Taxa média do crescimento (% TCM) de calos restabelecidos com competência embriogênica a partir de cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis* ao longo dos 360 dias de incubação 111

Figura 9. Aspectos morfológicos do crescimento dos calos restabelecidos a partir de cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis* ao longo do tempo. (A) Notáveis calos microscópicos. (B) Micro-calos em abundância. (C-F) Calos friáveis, de coloração branco-amarelada e superfície brilhosa 113

Figura 10. Análise anatômica e histoquímica dos calos restabelecidos a partir de cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis*. (A) Células apresentando alta competência embriogênica coradas com azul de Toluidina, e asterisco (*) indicando formação de pró-embrião, (B) Grãos de amido identificados com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS, seta indicando no detalhe seta indicando no detalhe, (C) e confirmados com corante Lugol, seta indicando no detalhe, (D) não foram identificados corpos proteicos com o corante *Xylidine Ponceau* – XP 114

CAPÍTULO 3

Figura 1. Aspecto do tipo de propágulo de *Guadua magna* contendo duas hastes (colmos) utilizado na multiplicação *in vitro*. Barra=1 cm 131

Figura 2. Esquema ilustrativo simplificado dos Sistemas de Cultivo *in vitro* para propágulos de bambu. A - (T1-MLC) Sistema de Cultivo Convencional de Micropropagação, B - T2-MLA- Sistema de Cultivo sob Agitação, C - T3-BIPER- Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente e D - T4-BIT- Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária. (Adaptado de Ribeiro e Bastos, 2008) 132

Figura 3. Propágulos de *Guadua magna* obtidos nos sistemas de cultivo *in vitro*. B - Etapa de aclimatização em sistema de mini-estufa para plantas propagadas *in vitro* 135

Figura 4. A- Tecido foliar de *Guadua magna*, tarja indicando porção do terço mediano da folha. B - Condutivímetro. Barra = 1 cm 136

Figura 5. Curva de sobrevivência pelo método Kaplan-Meier (KM) dos dados da sobrevivência dos propágulos de *Guadua magna* cultivados em diferentes sistemas *in vitro*: Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT) 144

Figura 6. Curvas de sobrevivência pelo o método Kaplan-Meier (KM) sobrepostas dos dados da sobrevivência dos propágulos de *G. magna* cultivados em diferentes sistemas *in vitro*: Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT) 145

Figura 7. Gráficos da dispersão dos valores do número de brotos dentro de 30 x 60, 30 x 90 e 60 x 90 dias (subcultivos) 147

Figura 8. Propágulos de *Guadua magna* apresentando brotações durante a propagação *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo. A - 0 dias de subcultivo (explante), B - 30 dias de subcultivo, C - 60 dias de subcultivo, D - 90 dias de subcultivo. Barra = 2 cm 149

Figura 9. Altura média dos brotos (cm) dos propágulos de *Guadua magna* aos 90 dias de cultivo em função dos tratamentos: Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT). Médias \pm erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância 150

- Figura 10. Massa fresca (g) dos propágulos de *Guadua magna* aos 90 dias de cultivo *in vitro* em função dos tratamentos: Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT). Médias \pm erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância 151
- Figura 11. Aspectos morfológicos do desenvolvimento *in vitro* de *Guadua magna* nos sistemas de cultivo. A - Sistema de cultivo Sob Agitação (T2-MLA), B - Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT). Barra = 1 cm 152
- Figura 12. Quantificação de Clorofila *a*, Clorofila *b* e Carotenóides ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em folhas de *Guadua magna* após 90 dias de propagação *in vitro* nos diferentes sistemas de cultivo (tratamentos): Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIT) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIPER). Os valores representam a média das repetições \pm o erro padrão. Médias \pm erro padrão com letras iguais representando a comparação entre os tratamentos não diferem entre si estatisticamente pelo teste de F ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância 153
- Figura 13. Aspectos morfológicos do desenvolvimento *in vitro* dos propágulos de *Guadua magna* nos sistemas de cultivo. A - Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER), B - Sistema de cultivo Sob Agitação (T2-MLA). Barra = 2 cm 153
- Figura 14. Açúcares solúveis totais (AST) e amido em relação à massa seca de *Guadua magna* aos 90 dias de propagação *in vitro* dentro dos diferentes sistemas de cultivo (tratamentos): Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT). Médias \pm erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de F ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância 154
- Figura 15. Cortes histológicos de *Guadua magna* propagada *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo (corados com azul de toluidina) para caracterização anatômica. A- Segmento nodal em T4-BIT, B- Conexão entre o sistema vascular do caule e as folhas em T4-BIT, seta preta indicando xilema, seta vermelha indicando floema (feixes vasculares), seta verde indicando epiderme, C- Detalhe da gema axilar dormente do segmento nodal em T4-BIT, notar região meristemática (retângulo na lateral esquerda inferior correspondente ao quadrado com borda cinza), (*) indicando primórdio foliar. D- Segmento internodal em T3-BIPER, seta laranja indicando tricoma, E- Base do propágulo vegetativo em T3-BIPER, círculo com borda preta mostrando a conexão entre colmo, primórdio foliar e primórdio radicular, F- Detalhe da organização da estrutura anatômica da raiz adventícia conectada ao segmento nodal (retângulo na lateral esquerda inferior correspondente ao quadrado com borda cinza), seta amarela indicando tecido vascular, seta ermelha indicando córtex. Abreviações: (ba) botão foliar axilar, (cc) células compactadas, (ep) epiderme, (fi) fibra, (mc) meristema caulinar, (me) medula, (mr) meristema radicular, (cv) conexão vascular 156
- Figura 16. Secções longitudinais da propagação *in vitro* de *Guadua magna* em diferentes sistemas de cultivo para análise histoquímica, corados com *Xylidine Ponceau* - XP para visualização de corpos proteicos. A- Segmento nodal em T1-MLC, notar círculo que detalha a região de conexão da gema axilar e o colmo, B- Detalhe da gema axilar dormente do segmento nodal, (*) primórdio foliar, região de parede celular corada, C- Detalhe de resquílios proteicos na região de conexão da gema axilar com o colmo, seta indicando corpo proteico, D- Segmento internodal de T3-BIPER, apresentando abundantes corpos proteicos apontados pela seta, E- Base do propágulo vegetativo, quadrado detalhando a conexão de colmo, primórdio foliar e primórdio radicular, F- Detalhe da conexão entre os tecidos descritos

na letra E com seta apontando para resquílios corpos proteicos. Abreviações: (cv) célula vacuolada, (ev) elemento de vaso 158

Figura 17. Secções longitudinais de *Guadua magna* da propagação *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo para análise histoquímica com *Periodic Acid Schiff* – PAS para visualização de amiloplastos (polissacarídeos neutros). A- Segmento nodal em T3-BIPER, círculo de borda preta demonstrando a conexão entre gema axilar e a região do colmo, (*) indicando gema axilar, B- Detalhe da gema axilar dormente do segmento nodal com aparente amiloplastos (grãos de amido) apontados pela seta preta, na região em volta do elemento de vaso, C- Segmento internodal em T3-BIPER, seta preta apontando aglomeração de amiloplastos, D- Detalhe do segmento internodal, seta amarela apontando notável presença de amiloplastos em células estruturais; E- Base do propágulo vegetativo, círculo demonstrando a conexão de colmo, primórdio foliar e primórdio radicular adivindo de T4-BIT, F- Detalhe da região envolta do primórdio radicular com seta preta apontando amiloplastos em abundância. Abreviações: (ev) elemento de vaso, (pr) primórdio radicular 160

Figura 18. Secções longitudinais de *Guadua magna* da propagação *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo para análise histoquímica com Lugol para visualização de grãos de amido. A- Segmento nodal em T1-MLC, círculo de borda preta demonstrando a região de conexão do nó do colmo, B- Detalhe da região de conexão do nó apresentando abundância em grãos de amido, seta amarela apontando aglomerado de grãos de amido, C- Segmento internodal em T3-BIPER, D- Detalhe do segmento internodal com seta verde apontando notável presença de grãos de amido; E- Base do propágulo vegetativo adivindo do T4-BIT, (*) primórdio radicular, seta preta apontando aglomeração de grãos de amidos, F- Detalhe da região envolta do primórdio radicular, seta preta apontando grãos de amido em abundância. Abreviações: (ev) elemento de vaso, (pm) primórdio radicular 161

Figura 19. Aclimatização *ex vitro* dos propágulos vegetativos oriundas dos diferentes sistemas de cultivo. A- Planta após 90 dias de cultivo *in vitro* (barra = 1 cm), B- Plantas na fase de pré-aclimatização em mini-estufa incubadas em câmara de crescimento (barra = 15 cm), C- Plantas recém transportadas para casa de vegetação (barra = 10 cm), D- Plantas após 60 dias em casa de vegetação (barra = 1 cm) 163

Figura 20. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA da relação entre os clones de *Guadua magna* oriundos da propagação *in vitro* dentro dos diferentes tratamentos: A- Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC); B- Sistema de cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER); C- Sistema de cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT) 166

Figura 21. Análise da fidelidade genética de plantas de *Guadua magna* aclimatizadas após cultivo *in vitro* dentro dos diferentes sistemas de cultivo (tratamentos): Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT), A-B - *Primer 55* zm na amplificação do DNA de 75 amostras obtidas aleatoriamente dos tratamentos 167

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento na indução de calos a partir de explantes de <i>Guadua magna</i> , após 60 dias de cultivo	57
Tabela 2. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na indução de calos a partir de <i>Guadua magna</i> , após 60 dias de cultivo	57
Tabela 3. Percentagem (%) média da oxidação de calos (> 4 mm) no processo de indução da calogênese em <i>Guadua magna</i> em função de diferentes auxinas, concentrações e explantes utilizados	58
Tabela 4. Média da massa fresca (mg) dos calos (> 4 mm) aos 60 dias de indução da calogênese em <i>Guadua magna</i> , em função de diferentes auxinas, concentrações e explantes utilizados	59
Tabela 5. Oxidação de calos aos 60 dias no processo de multiplicação a partir de calos oriundos da etapa de indução da calogênese em <i>Guadua magna</i>	65
Tabela 6. Massa fresca média (mg) dos calos aos 60 dias na fase de multiplicação do processo de calogênese em <i>Guadua magna</i> , desdobrando explante dentro de concentração	67

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Crescimento da massa fresca (mg) de calos com competência embriogênica restabelecidos a partir de cultivos celulares em <i>Guadua aff. chaparensis</i>	109
--	-----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. <i>Primers</i> ISSR testados para a verificação da fidelidade genética de plantas de <i>Guadua magna</i> propagados <i>in vitro</i> em diferentes sistemas de cultivo	141
Tabela 2. Sobrevivência dos propágulos vegetativos aos 90 dias de propagação nos diferentes sistemas de cultivo	146
Tabela 3. Comparação dos modelos por QIC (<i>Quasi-likelihood Information Criterion</i>) para representação do número de brotos na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Guadua magna</i> em diferentes sistemas de cultivo	147
Tabela 4. Comparações múltiplas do número médio de brotos considerando-se as combinações dos sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Guadua magna</i>	148
Tabela 5. Dados da porcentagem média do extravasamento de eletrólitos (EE%) dos propágulos de <i>Guadua magna</i> aos 90 dias de propagação nos diferentes sistemas de cultivo	151
Tabela 6. Porcentagem média da sobrevivência na fase de aclimatização <i>ex vitro</i> das plantas de <i>Guadua magna</i> em casa de vegetação advindas de diferentes sistemas de cultivo	164
Tabela 7. Dados numéricos obtidos da amplificação por PCR de 17 <i>primers</i> ISSR utilizados para a análise da fidelidade genética de clones de <i>Guadua magna</i> propagados <i>in vitro</i> em diferentes sistemas de cultivo	164

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
2,4-D	cido 2,4-diclorofenaxiactico
μL	Microlitros (unidade de medida de volume)
μm	Micrmetro
μM	Micromolar (unidade de medida de moles por volume)
μS	Microsegundo
AIA	cido indolacético
ANA	cido naftaleno acético
ANOVA	Análise de variância
AST	Aucares solúveis totais
Atm	Atmosfera
BAP	6-benzilaminopurina
BIPER	Biorreator de imersão permanente
BIT	Biorreator de imersão temporária
cm	Centímetro
Dicamba	cido 2-metóxi-3,6-diclorobenzico
DNA	Deoxyribonucleic acid
et al.	E colaboradores
FAA	Formaldeído, cido acético e álcool etílico
g	O grama (unidade de medida de massa).
h	Hora
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
Kn	Cinetina
L	Litro
mg	Miligramas (unidade de medida de massa)
mL	Mililitro (unidade de medida de volume)
MLA	Meio líquido sob agitao
MLC	Meio líquido convencional
mm	Milímetro (unidade de medida de comprimento)
MS	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
mT	Meta-topolina
ng	Nanogramas (unidade de medida de volume)
nm	Nanmetro (unidade de medida de comprimento)
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotao por minuto
SCV	Sedimented cell volume
PCR	Polymerase Chain Reaction
Picloran	cido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
TCM	Taxa média de crescimento
TDZ	Thidiazuron
v/v	Volume por volume

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Subfamília <i>Bambusoideae</i>	4
2.2. Distribuição geográfica dos bambus	5
2.3. Aspectos botânicos dos bambus (<i>Bambusoideae</i>)	6
2.4. Gênero <i>Guadua</i> Kunth	10
2.4.1. <i>Guadua magna</i>	12
2.4.2. <i>Guadua</i> aff. <i>chaparensis</i>	12
2.5. Aspectos socioambientais e econômicos do bambu	13
2.6. Propagação convencional das espécies de bambu	15
2.7. Utilização da cultura de tecidos para a produção de mudas de bambu	16
2.7.1. <i>Micropropagação convencional</i>	16
2.7.2. <i>Organogênese</i>	17
2.7.3. <i>Embriogênese somática</i>	19
2.7.4. <i>Cultivos celulares em suspensão</i>	21
2.8. Biorreatores para produção em larga escala de bambus	22
2.9. Uso de marcadores moleculares para avaliar a fidelidade clonal das mudas	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
Capítulo 1	45
Calogênese e estabelecimento de cultivos celulares em suspensão de <i>Guadua magna</i> (Londoño & Filg.)	45
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Local de realização dos experimentos	50
2.3.1 <i>Indução da calogênese</i>	51
2.3.2 <i>Multiplificação dos calos</i>	51
2.3.3 <i>Regeneração</i>	52
2.4 Caracterização anatômica e histoquímica dos calos	52
2.5 Cultivos celulares em suspensão	53
2.5.1 <i>Estabelecimento da suspensão celular</i>	53
2.5.2 <i>Análise citoquímica</i>	56
2.6 Condições de cultivo	56

2.7	Análise dos dados	57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1	Indução da calogênese.....	58
3.2	Multiplicação dos calos	66
3.3	Regeneração dos calos.....	70
3.4	Cultura de células em suspensão.....	75
4	CONCLUSÃO	81
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	Capítulo 2	89
	Caracterização morfo-anatômica da indução da embriogênese somática em <i>Guadua</i> aff. <i>chaparensis</i> (Londoño e Zurita) e o restabelecimento de calos obtidos de cultivos celulares em suspensão.	89
1.	INTRODUÇÃO	92
2	MATERIAL E MÉTODOS	95
3.1.	Local de realização do experimento.....	95
3.2.	Material vegetal.....	95
3.3.	Indução da embriogênese somática	95
3.4.	Cultivos celulares em suspensão	96
3.4.1.	Estabelecimento da suspensão celular.....	96
3.4.2.	Multiplicação da suspensão celular.....	96
3.4.3.	Análise citoquímica	97
3.5.	Restabelecimento de calos com competência embriogênica	97
3.6.	Caracterização anatômica e histoquímica	98
3.8.	Análise dos dados.....	100
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
3.1.	Indução da embriogênese somática.....	101
3.2.	Estabelecimento e multiplicação de cultivos celulares em suspensão	105
3.3.	Restabelecimento de calos com competência embriogênica.....	110
4	CONCLUSÃO	117
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
	Capítulo 3	125
	Propagação <i>in vitro</i> de <i>Guadua magna</i> Londoño & Filg. em diferentes tipos de biorreatores e avaliação da fidelidade clonal por marcadores moleculares ISSR.	125
1.	INTRODUÇÃO	128

2. MATERIAL E MÉTODOS	131
2.1 Local de realização do experimento	131
2.2 Material vegetal	131
2.3 Aplicação dos tratamentos nos sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	132
2.4 Condições do cultivo <i>in vitro</i>	133
2.5 Delineamento do experimento e análise estatística	134
2.5.1 <i>Avaliação da sobrevivência de propágulos</i>	134
2.5.2 <i>Avaliação da multiplicação dos brotos</i>	134
2.5.3 <i>Análise da altura e da massa fresca das plantas</i>	135
2.5.4 <i>Aclimatização das mudas</i>	135
2.6 Determinação do extravasamento de eletrólitos (%EE)	136
2.7 Quantificação de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> e carotenóides	137
2.8 Quantificação de compostos bioquímicos por método colorimétrico	138
2.8.1 <i>Quantificação de Açúcares solúveis totais - AST</i>	139
2.8.2 <i>Extração e quantificação de Amido por método enzimático</i>	139
2.9 Caracterização anatômica e histoquímica	140
2.10 Análise da fidelidade genética - ISSR	141
2.10.1 <i>Extração do DNA genômico</i>	141
2.10.2 <i>Amplificação por PCR</i>	142
2.10.3 <i>Análise dos marcadores de ISSR</i>	143
3. RESULTADOS	145
3.1 Influência dos sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	145
3.2 Efeito dos sistemas de cultivo <i>in vitro</i> na integridade da membrana celular	152
3.3 Dosagem de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> mais carotenóides	153
3.4 Quantificação de compostos bioquímicos	155
3.5 Caracterização anatômica e histoquímica dos propágulos vegetativos	156
3.6 Aclimatização das plantas propagadas nos diferentes sistemas de cultivo	163
3.7 Análise da fidelidade genética dos clones aclimatizados	165
4. DISCUSSÃO	169
5. CONCLUSÃO	174
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175

1. INTRODUÇÃO GERAL

As florestas nativas brasileiras possuem vasta diversidade de bambus. Entre as várias espécies, destacam-se a *Guadua magna* e *Guadua* aff. *chaparensis*, endêmicas do Bioma Cerrado e Amazônico, respectivamente. Ambas espécies, além da importância ecológica, também são utilizadas como matérias primas por comunidades tradicionais na fabricação de artesanato e na construção de casas, celeiros e cercas, conferindo importância econômica regional (Filgueiras e Londoño, 2006; Londoño e Zurita, 2008; Arruda et al.; Filgueiras e Londoño, 2011; Lizarazu et al., 2013; Filgueiras e Viana, 2017).

Os bambus são plantas monocárpicas, podendo ocorrer o perecimento do colmo após o florescimento e frutificação. O ciclo reprodutivo da maioria das espécies ocorre em períodos raros e curtos e, em muitas vezes, acontece de forma imprevisível (Mizuki et al., 2014; Filgueiras e Viana; Guo et al., 2017). Esse fenômeno torna inviável a produção de mudas de bambu via seminal.

Devido a essas características, diferentes técnicas de propagação vegetativa vêm sendo empregadas para reproduzir vegetativamente espécies de bambu, entre as quais estão o desmembramento de touceiras e a estaquia (Gielis et al., 2001; Gallardo et al., 2008; Islan et al., 2011). Contudo, essas técnicas se caracterizam por serem onerosas e de baixo rendimento, além de necessitarem muita mão de obra e alocação de espaço para produção, não sendo uma estratégia adequada para escala comercial (Singh et al., 2013).

Com os avanços na área da biotecnologia, novas técnicas foram sendo desenvolvidas para mitigar os problemas encontrados pelos métodos convencionais de propagação. A cultura de tecidos de plantas utiliza pequenas porções de tecidos vegetais para a propagação de plantas sob condições de laboratório, podendo proporcionar a produção de mudas em larga escala, em curto período de tempo e sem interferência sazonal (George, 2008; Hartman et al. 2011; Reed et al., 2011; Nogueira et al., 2019).

Dentre as metodologias de cultura de tecidos *in vitro* para bambus, a proliferação de brotos a partir de gemas axilares dormentes em meios semi-sólidos e líquidos, incluindo biorreatores de imersão temporária, vem sendo estudada por vários pesquisadores (Saxena e Bhojwani, 1993; Bakshi et al., 2015; Gutiérrez et al., 2016; Ribeiro et al., 2016; Sandhu et al., 2017; Furlan et al., 2018; Nogueira et al., 2019; Ornellas et al., 2019; Vale et al., 2019). A técnica apresenta vantagens, pois os tecidos organizados são geralmente geneticamente mais estáveis e, portanto, menos propensos à variações somaclonais, se comparados com aqueles originários de calogênese (Mudoj et al., 2013; Sandhu et al., 2017).

A embriogênese somática (Rao et al., 1985; Wei et al., 2015; Guo et al., 2017; Liu et al., 2018; Somashekar et al., 2018), assim como a cultura de células (Ogita, 2005; Liu et al., 2006; Ogita et al., 2012; Wong et al., 2013; Akker et al., 2015), também são métodos estudados para propagação de bambus. Esta técnica apresenta vantagens em relação às demais, a medida que possibilita um estudo refinado sobre os mecanismos da totipotência celular dos tecidos das plantas, e ainda permite explorar o seu potencial morfogênico (Fehér 2015; Silva-Cardoso et al., 2019). No entanto, a regeneração de embriões somáticos e o desempenho pós-embriônico, além da diferenciação das células em propágulos embriogênicos, como embriões somáticos, ainda não são considerados satisfatórios para a maioria dos trabalhos (Mundo et al., 2013; Singh et al., 2013).

Adicionalmente, o método de cultivo de células em suspensão, uma vez dominado, favorece maior taxa de divisão celular. Tal resposta permite um crescimento acelerado e exponencial das células, favorecidas pelo maior e melhor contato dos nutrientes do meio de cultura com os explantes em cultivo, fato que pode possibilitar a propagação clonal em larga escala das espécies (Litz e Gray, 1995; Cid, 1998; Teixeira et al.; Vanisree et al., 2004).

De maneira geral, são raros os trabalhos que envolvem a produção de mudas de bambus por cultura de células (Ogita et al., 2012; Mundo et al., 2013). Até o presente momento, nada é descrito na literatura sobre o uso dessa metodologia para as espécies *G. magna* e *G. aff. chaparensis*, objetos de estudo nesse trabalho.

Outra ferramenta a ser investigada para produção de mudas de bambu são os biorreatores, equipamentos destinados para o cultivo em larga escala de propágulos vegetais (células, embriões, gemas, raízes, caules, dentre outros tipos) oriundos da micropropagação (Paek et al., 2005). A utilização desse tipo de sistema pode permitir a otimização e redução dos custos de operação (Cid et al., 2002; Nogueira et al., 2017), sendo que diversos tipos de protótipos e sistemas de biorreatores estão sendo utilizados para propagar plantas com interesse agrônomico e de elevado valor agregado (Scheidt et al., 2009).

De fato, a cultura de tecidos é uma ferramenta potencial para a rápida multiplicação de plantas e demonstra ser promissora para a produção em larga escala. A técnica tem como vantagem adicional a produção de mudas com a mesma identidade genética das plantas as quais tiveram origem. Para tanto, ferramentas moleculares podem ser utilizadas para certificar os materiais e evidenciar a fidelidade genética dos clones produzidos em laboratório (Singh et al., 2013; Goyal et al., 2015).

Entre as técnicas baseadas em reação em cadeia de polimerase (PCR), o ISSR - *Inter-Simple Sequence Repeat* (Zietkiewicz et al. 1994; Pradeep Reddy et al. 2002) é uma das mais utilizadas. Ela é considerada uma técnica simples, rápida, altamente discriminativa e confiável para a detecção de fidelidade clonal de plantas micropropagadas (Negi e Saxena 2010; Singh et al., 2012b; Singh et al., 2013; Brar et al., 2014; Goyal et al., 2015; Nogueira et al., 2019).

Ainda assim, apesar de promissora, a técnica de multiplicar bambus em condições de laboratório ainda não é amplamente utilizada, principalmente em razão da falta de protocolos desenvolvidos para a grande maioria das espécies. Portanto, é relevante a geração de informações que envolvem a multiplicação *in vitro* das espécies de bambu (Singh et al., 2013; Mudoj et al., 2014; Sandhu et al., 2017), além de análises envolvendo as respostas fisiológicas no desenvolvimento dos propágulos vegetativos, bem como a estudos histológicos, histoquímicos e bioquímicos durante as diferentes etapas do processo. Essas análises podem gerar uma grande quantidade de informação, auxiliando a otimização destas metodologias.

Neste contexto, este trabalho teve o propósito de contribuir para o aperfeiçoamento da técnica de multiplicação clonal *in vitro* de *Guadua magna* e *Guadua aff. chaparensis*, desenvolvendo estudos relacionados à calogênese, embriogênese somática e cultura de células em suspensão, além de avaliar a aplicação de biorreatores em etapas do processo. Investigações anatômicas, histoquímicas e bioquímicas, além de análises moleculares, também foram utilizadas para melhor caracterizar as diferentes etapas envolvidas nos processos estudados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Subfamília *Bambusoideae*

A família *Poaceae* é uma das maiores e mais diversas famílias entre as Angiospermas, compreendendo 771 gêneros e mais de 11.000 espécies (Chase e Reveal, 2009; GPWG II, 2012; Soreng et al., 2015).

Alguns representantes desta família são reconhecidos mundialmente por sua grande importância econômica e ecológica, incluindo as principais culturas alimentícias como arroz, milho e trigo, além de outras significantes como sorgo, cana-de-açúcar, aveia e diversas gramíneas forrageiras (Bennetzen, 2007; Sungkaew et al., 2009).

Com distribuição cosmopolita e ocorrência numa enorme variedade de habitats, a Família *Poaceae* é formada por 12 subfamílias: *Anomochlooideae*, *Aristidoideae*, *Arundinoideae*, *Bambusoideae*, *Bhloridoideae*, *Danthonioideae*, *Micraioideae*, *Oryzoideae*, *Panicoideae*, *Pharoideae*, *Puelioideae* e *Pooideae* (GPWG II, 2012; Soreng et al. 2015). A subfamília *Bambusoideae* é constituída pelos bambus e abrange cerca de 120 gêneros distribuídos em 1.641 espécies (Soreng et al., 2015). Atualmente, os bambus são classificados em bambus herbáceos (tribo *Olyreae*) que abrange 17 gêneros e 93 espécies; bambus lenhosos temperados (tribo *Arundinarieae*) e bambus lenhosos tropicais (tribo *Bambuseae*) que apresenta 18 gêneros e 165 espécies (Sungkaew et al., 2009; Kelchner; BPG, 2013; Filgueiras et al., 2015; Filgueiras e Viana, 2017).

De acordo com a Lista do Projeto Flora do Brasil (2017), ocorrem pelo território nacional 35 gêneros e 258 espécies de bambus nativos. O Brasil é um dos principais centros de diversidade e de grau de endemismo de espécies de bambus nas Américas (Bystriakova et al., 2004). As mais variadas espécies ocorrem principalmente nos domínios da Mata Atlântica e Amazônia (Bystriakova et al.; Filgueiras e Santos-Gonçalvez, 2004; Greco et al., 2015).

Fundamentais para a manutenção dos sistemas ecológicos nos quais estão inseridos e no desenvolvimento sócioeconômico, os bambus lenhosos são de grande importância para o desenvolvimento de comunidades rurais de vários países. Eles são rotineiramente utilizados em construções civis, alimentação, bioenergia, e ainda como matéria-prima para artesanatos. (Bystriakova et al., 2004; Mudoj et al.; Singh et al., 2013; Sandhu et al., 2017).

2.2. Distribuição geográfica dos bambus

As espécies de bambus distribuem-se naturalmente dos trópicos até as regiões temperadas, apresentando maior ocorrência nas zonas quentes e com chuvas abundantes nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América do Sul (Figura 1). Na zona de ocorrência natural (46° N a 47° S de latitude e de 0 a 4.000 metros de altitude), cerca de 62 % das espécies são nativas da Ásia, 34 % das Américas do Norte, Central e do Sul, e apenas 4 % da África e Oceania (Beraldo e Azzini, 2004; Pereira e Beraldo, 2008), totalizando cerca de 120 gêneros e 1.641 espécies catalogadas (Soreng et al., 2015).

Estima-se que a área de florestas de bambus alcança cerca de 32 milhões de hectares em ecossistemas florestais mundiais, representando 1 % da área total de toda a floresta plantada no mundo (FAO, 2007).

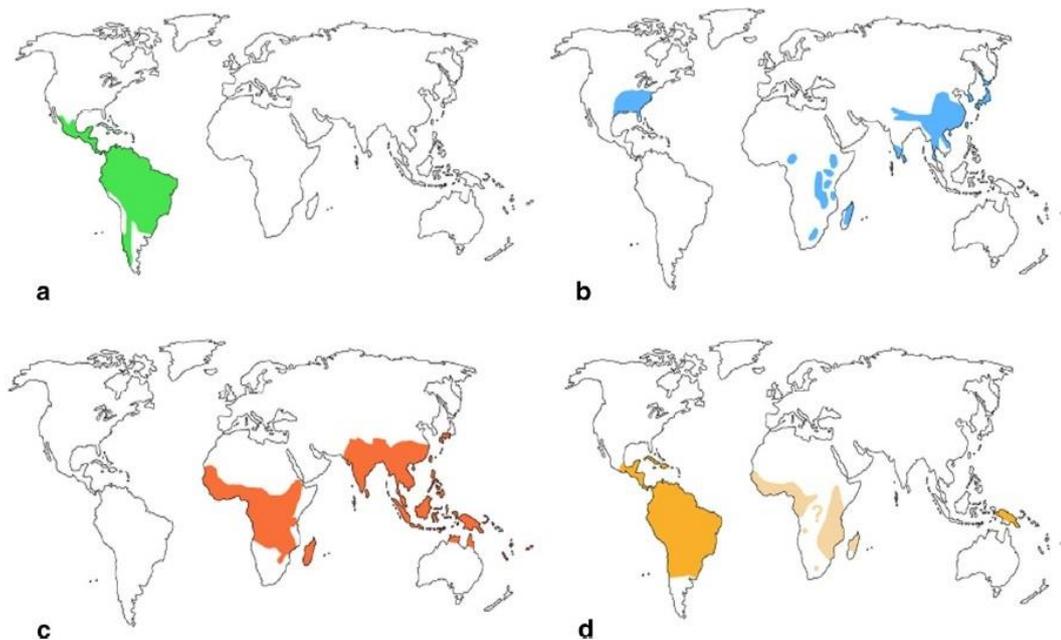


Figura 1. Distribuição mundial do bambu. (a) bambus neotropicais; (b) bambus temperados; (c) bambus palotropicalis; (d) bambus herbáceos (Yeasmin et al., 2015).

Do total de espécies distribuídas pelo mundo, a América Latina possui 31 % dos gêneros e 39 % das espécies (BPG, 2012). No Brasil, ocorrem 35 gêneros e 266 espécies nativas, o que representa 18 % de toda população mundial de bambus (Longhi-Wagner, 2012; Filgueiras et al., 2013). No total, 12 gêneros e 175 dessas espécies são endêmicas (Filgueiras et al., 2013; Filgueiras e Viana, 2017), tornando o Brasil o país com a maior diversidade de bambu do continente Americano (Grombone-Guaratini et al., 2011).

A distribuição das espécies de bambus no Brasil ocorre principalmente nos biomas da Mata Atlântica, com 65 % das espécies, da Amazônia, com 26 %, e do Cerrado, com 9 % das espécies (Filgueiras e Santos-Gonçalves, 2004). Estudos realizados por meio de imagens de satélites, demonstraram a existência de aproximadamente 7 milhões de hectares de bambus nativos no estado do Acre (Beraldo e Pereira, 2007), que também cobrem áreas da Bolívia e Peru (Filgueiras e Santos-Gonçalves, 2004).

No Nordeste brasileiro, especialmente em Pernambuco, Maranhão e Paraíba, as florestas comerciais de diversas espécies de bambus ocupam áreas estimadas de cerca de 40 mil hectares, sendo utilizado como matéria prima para produção de celulose e papel de alta resistência (Lima Neto et al.; Mendes et al., 2010; Famasul, 2014).

2.3. Aspectos botânicos dos bambus (*Bambusoideae*)

O bambu é uma planta que pertence à família *Poaceae* (*Gramineae*) representante da subfamília *Bambusoideae*. A subfamília é caracterizada por apresentar espécies que apresentam florescimento cíclico, com intervalos geralmente longos de tempo. Os ramos contêm bainhas foliares protegendo gemas axilares, colmos lignificados e rizomas subterrâneos compostos de nós e entrenós (Zhao-Hua e Kakayashi, 2004). Embora classificados como gramíneas, os bambus possuem hábito arborescente, com parte aérea composta pelo colmo, folhas e ramificações. A parte subterrânea é constituída pelo rizoma e raiz (Figura 2) (Ghavami e Marinho, 2005; Silva, 2005).

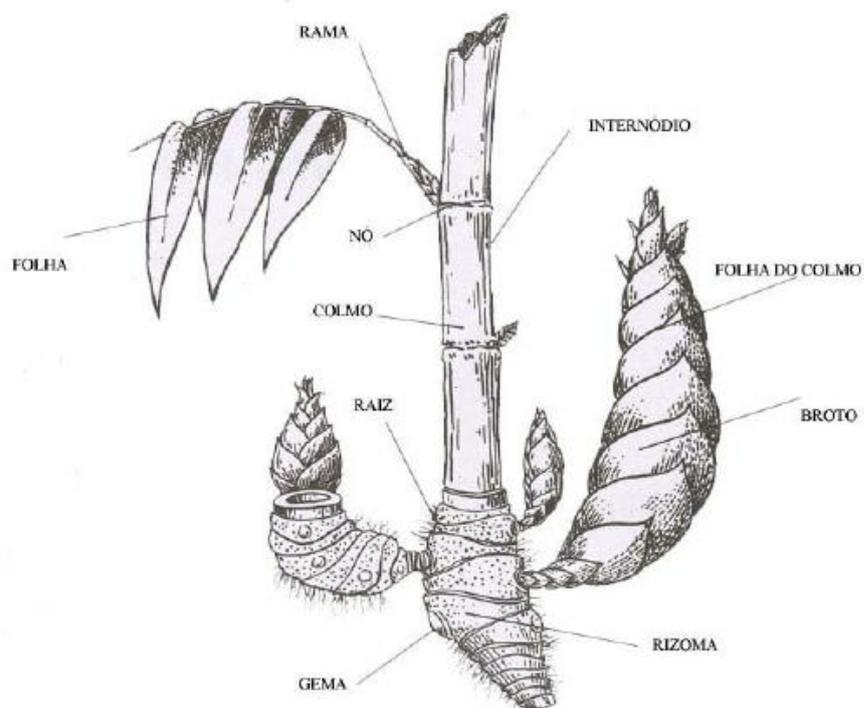


Figura 2. Representação esquemática das partes vegetativas do bambu (Adaptado de Hidalgo-López, 2003).

O caule do bambu é aéreo e cilíndrico (colmo) com nós distintos e entrenós ocos, constituídos por fibras e vasos condutores de seiva, que estão desuniformemente distribuídos na seção transversal, envolvidos pelo parênquima (Qisheng et al., 2001; Londoño, 2002; Ghavami e Marinho, 2005).

A emergência do colmo dos bambus acontece com maior frequência na estação chuvosa do ano, embora cada espécie apresente a sua peculiaridade no desenvolvimento dessas estruturas (Banik, 1993; Londoño, 2002; Stapleton, 2014).

Na posição superior de cada segmento nodal do colmo, protegidas por uma bainha foliar, estão as estruturas de meristemas secundários que apresentam capacidade para produzir novas ramificações, as quais são denominadas de gemas axilares. Estas gemas axilares permanecem em estado de dormência até que a bainha foliar se desprenda do colmo (Londoño, 2002; Hidalgo-Lopez, 2003; Stapleton, 2014).

As folhas dos bambus são bastante semelhantes morfológicamente, embora algumas espécies apresentem folhas grandes e outras pequenas (Londoño, 2002). É característico a presença de pseudopécíolo, uma constrição na base da lâmina foliar que lhe confere certa mobilidade, potencialmente útil na busca por luz (Filgueiras e Viana, 2017). O tamanho da

folha depende do habitat em que a planta se desenvolve, geralmente espécies de áreas úmidas têm a folha maior do que as espécies de área seca (Hidalgo-Lopez, 2003).

Os bambus não costumam florescer anualmente e passam a maior parte da vida na forma vegetativa (Ramanayake et al., 2006). Em muitas espécies de bambus, o florescimento é um fenômeno raro, que pode acontecer em intervalos de até 120 anos (Ramanayake et al., 2001; Vengala et al., 2008; BPG, 2012). Além do mais, os bambus são plantas monocárpicas, ou seja, sua forma vegetativa floresce e frutifica apenas uma vez (Mizuki et al., 2014). Durante o ciclo reprodutivo há o consumo de reservas energéticas provenientes das porções vegetativas, sendo que em alguns casos, pode ocorrer o perecimento do colmo (Arya et al., 1999; Ramanayake et al., 2006; BPG, 2012).

O fruto dos bambus, chamado de cariopse, na maioria das vezes é seco e de tamanho reduzido, e podem sofrer predação por aves, roedores e outros animais silvestres (Singh et al., 2013). No campo, as sementes de bambu costumam germinar logo após as primeiras chuvas (Ramanayake et al., 2006), embora apresentem período de viabilidade bastante curto (Mudoi et al., 2013; Singh et al., 2013).

As espécies de bambu possuem rizomas subterrâneos com diversas ramificações que servem de sustentação para a planta e desempenham 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).

Quanto ao desenvolvimento do rizoma, os bambus são classificados em dois grupos distintos: os paquimorfos (simpodiais) e os leptomorfos (monopodiais); a ocorrência de um terceiro grupo chamado anfimórfico (anfipodial) é proposto por alguns pesquisadores, que caracterizam o grupo por apresentar ambas as características mencionadas (Judziewicz, 1999; Londoño, 2002; Silva, 2005; Filgueiras e Viana 2017).

Os bambus paquimorfos são popularmente conhecidos como bambus entouceirantes e apresentam rizomas em forma de bulbo, com entrenós curtos e grossos, e raízes na parte inferior (Londoño, 2002; Hidalgo-López, 2003; Silva, 2005; Stapleton, 2014; Filgueiras e Viana 2017) (Figura 3). Geralmente, eles ocorrem em regiões de clima tropical e são representados principalmente pelos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Guadua*, cujas espécies têm desenvolvimento superior em climas tropicais e formam touceiras densas (Banik, 1993; Londoño, 2002; Silva, 2005; Stapleton, 2014).

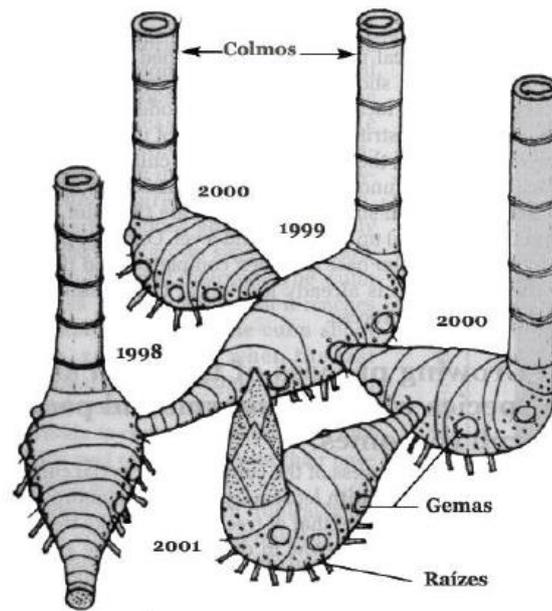


Figura 3. Sistema de desenvolvimento do rizoma de um bambu do grupo paquimorfo (simpodial/entouceirante) (Adaptado de Hidalgo-López, 2003).

Os bambus com rizoma do tipo leptomorfo apresentam rizomas alongados, duros, finos, de forma cilíndrica e normalmente de diâmetro menor que os colmos eretos que irão originar (Londoño, 2002; Hidalgo-López, 2003; Silva, 2005; Stapleton, 2014) (Figura 4).

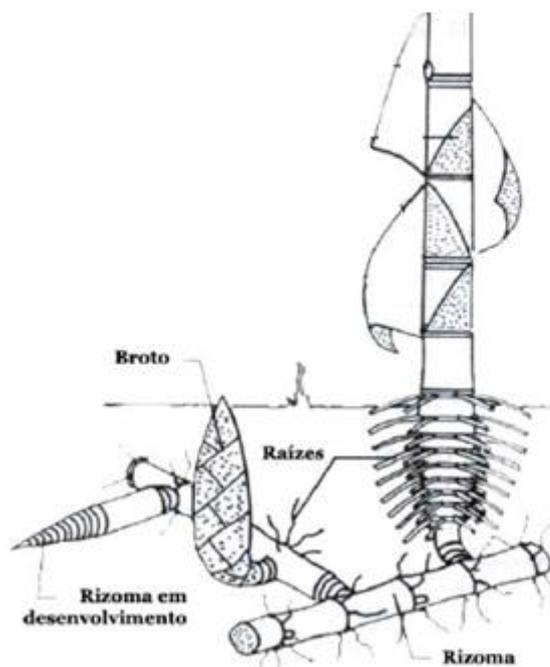


Figura 4. Sistema de desenvolvimento do rizoma de um bambu do grupo leptomorfo (monopidial/alastrante) (Adaptado de Hidalgo-López, 2003).

Os rizomas são caracterizados por gemas laterais solitárias que se transformam diretamente em colmos, sendo poucas as que podem se transformar em um novo rizoma (Londoño, 2002; Silva, 2005; Stapleton, 2014). Todos os nós do rizoma possuem raízes e são bem espaçados, fazendo com que o colmo se desenvolva “afastando-se” da matriz, permitindo, assim, a colonização de novos territórios (Fisher et al., 2009).

As espécies desse grupo de bambus são consideradas de hábito invasivo e comumente chamadas de bambus alastrantes e encontram-se geralmente distribuídos em regiões temperadas. Um importante representante desse grupo de bambu é o gênero *Phyllostachys*, que apesar de ter origem em regiões de clima temperado, é bastante difundido em todo território brasileiro (Londoño, 2002; Silva, 2005; Stapleton, 2014).

2.4. Gênero *Guadua* Kunth

Os bambus do gênero *Guadua* são endêmicos das Américas e reúnem aproximadamente 30 espécies que se distribuem do norte do México ao sul da Argentina (Londoño, 2002). Eles são apontados como componentes importantes da mais extensa floresta natural de bambus encontrada na bacia Amazônia (Judziewicz et al., 1999; Clark et al., 2015), com mais de 600 mil hectares de tabocais localizados no estado do Acre e regiões vizinhas da Bolívia e Peru (Carvalho et al., 2013).

Considerado como protagonista da evolução cultural, social e econômica da América Latina (Londoño, 2002), *Guadua* é tido como o terceiro maior gênero de bambus do Brasil. Nele são reconhecidas 19 espécies nativas e cinco endêmicas distribuídas por todo território nacional (Figura 5), dos quais esse número pode aumentar já que há relatos de várias espécies não descritas em praticamente todas as regiões (Filgueiras e Viana, 2017).



Figura 5. Distribuição geográfica do gênero *Guadua* Kunth pelo território brasileiro. Estados em branco não têm representantes do gênero (Adaptado de Shirasuna, 2015).

As espécies representantes desse gênero possuem características peculiares às outras. As principais características do gênero incluem rizomas paquimorfos (entouceirantes), presença de folhas do colmo triangulares e eretas, margens e lâminas das bainhas foliares contínuas, colmos verdes com entrenós lisos, ocos e espinhosos, geralmente eretos na base a ramificados no ápice, apresentando uma distinta banda de tricomas brancos na linha nodal (Londoño e Peterson, 1992; Schmidt e Longhi-Wagner, 2009; Greco, 2013).

O gênero *Guadua* inclui os bambus de maior estatura, com espécies que podem atingir 30 m de altura e 20 cm de diâmetro de colmo (Londoño, 1996). Eles se dividem em dois grupos, um cujos colmos são eretos, e outro cujos colmos tem hábito escandente (Ruiz et al., 2004).

Os colmos desse gênero são muito versáteis e resistentes, além de apresentarem alta taxa de crescimento e qualidade como material de construção (Londoño, 2002; Clark et al., 2015). Os colmos são bastante utilizados como matéria-prima para artesanato, móveis e utensílios cotidianos, principalmente por populações rurais e indígenas de países como Brasil, Bolívia, Colômbia e Equador (Filgueiras e Londoño, 2006; Arruda et al.; Hernandez e Marín, 2011; Greco, 2013).

2.4.1. *Guadua magna*

A *Guadua magna* Londoño & Filg. é uma espécie simpodial que ocorre em margens de rios, ao longo de matas ciliares ou de galeria do Brasil Central (Filgueiras e Londoño, 2011). Conhecida popularmente como “superbambu brasileiro” ou “taquaruçu”, é uma espécie de Cerrado, endêmica do estado de Goiás (Filgueiras e Londoño, 2006; Shirasuna, 2013) e consta na lista de espécies ameaçadas de extinção (Filgueiras e Viana, 2017).

A espécie forma touceiras densas e possui colmos lignificados, de coloração verde, com manchas brancas nos nós, e que podem atingir de 12-24 m de comprimento e 10-12 cm de diâmetro (Filgueiras e Londoño, 2006). A espécie tem valor sócio-cultural elevado por se tratar de uma planta utilizada tradicionalmente pelas comunidades locais na fabricação de artesanatos e na construção de casas rústicas, celeiros e cercas (Arruda et al., 2011). Além disso, possui potenciais para diversos usos, tais como, produção energética (Filgueiras e Londoño, 2011), construção civil, móveis, laminado, entre outros (Filgueiras e Londoño, 2006; Teixeira et al., 2015).

2.4.2. *Guadua* aff. *chaparensis*

Espécie de floresta tropical de mata de terra firme e muito úmida, *Guadua chaparensis* Londoño e Zurita distribui-se na região da Amazônia Central, principalmente na Bolívia (Londoño e Zurita, 2008). Trata-se de uma espécie com grande afinidade morfológica com *G. chacoensis* e *G. weberbaueri* (Londoño e Zurita, 2008; Lizarazu et al., 2013)

Peculiarmente, a espécie apresenta entrenós ocos que acumulam água. Ainda não se tem certeza sobre o motivo, mas tal fenômeno parece estar associado à bioindicação de umidade atmosférica relativamente alta e presença de lençol freático na região onde as plantas crescem (Londoño e Zurita, 2008).

O mecanismo de acúmulo de água nos entrenós ocos de *G. chaparensis* ocorre logo após mudanças de temperaturas da atmosfera no habitat, que quebram os tecidos permitindo que a água esorra e se acumule na região do lúmen (Londoño e Zurita, 2008).

Nessa espécie, o tamanho do colmo pode atingir 18-25 m de comprimento e 7-12 cm de diâmetro; a região do entrenó pode atingir entre 22 e 70 cm de comprimento e 1-1,5 cm de espessura da parede (Londoño e Zurita, 2008; Lizarazu et al., 2013). Os colmos são utilizados pelas comunidades locais como material condutor de água, na confecção de cercas, paredes de

casas, utensílios e em construções rurais, conferindo grande importância na economia regional (Londoño e Zurita, 2008).

2.5. Aspectos socioambientais e econômicos do bambu

A população mundial cresce exponencialmente ao longo do tempo, o que aumenta a demanda por recursos naturais e renováveis. E, apesar de ainda existirem grandes populações naturais de bambus, há preocupação com a intensa exploração em áreas nativas e a preservação das espécies (Mudoj et al., 2013). Nesse sentido, os plantios florestais de bambu vêm se tornando progressivamente uma importante fonte energética, principalmente devido ao seu valor ecológico e sustentável (Mudoj et al., 2013; Guerra et al., 2017; Sandhu et al., 2017).

Considerado entre as mais importantes plantas agrícolas do mundo, os bambus são o grupo mais original, fascinante e versátil de plantas conhecidas pela humanidade (Singh et al., 2012), sendo comumente chamados de "Ouro Verde" ou "Madeira do Homem Pobre" (Singh et al., 2013). Os bambus destacam-se como excelente matéria-prima de alto impacto socioambiental, que podem ser utilizados como eficientes sequestradores de carbono (Brias e Hunde, 2009; Afonso, 2011). Adicionalmente, podem ser utilizados para a produção de biomassa para energia, aplicações ecológicas para a restauração de matas ciliares, composição de florestamento e para a redução do risco de erosão (Brito et al., 1987; Bag et al., 2000; Suzaki e Nakatsubo, 2001; Sood et al., 2002; Lin et al. 2004; Komatsu et al., 2011; Guerra et al., 2017).

Como principais aplicações, os bambus são utilizados para a produção e obtenção de celulose e papel (Duarte et al., 2007), álcool etílico e amido (Tombolato et al., 2012), na construção civil (Ghavami e Marinho, 2005), na fabricação de móveis (Mishra, 2009), artesanatos (Souza, 2004; Ostapiv e Fagundes, 2007; Arruda et al., 2011; Singh et al., 2013), na indústria alimentícia (Arya et al., 1999; Arya et al., 2008; Singh et al., 2012), produção de fármacos e aplicações medicinais (Zhang et al., 2010; Singh et al., 2013).

Consideradas de grande potencial agrícola e poder competitivo em relação a outros tipos de matérias-primas (Mudoj et al., 2013; Sandhu et al., 2017), as espécies de bambu se destacam devido ao rápido crescimento, além de se reproduzirem em campo sem a necessidade de replantios (Pereira e Beraldo, 2008; Komatsu et al., 2011; Singh et al., 2013).

As plantas são pouco exigentes em termos nutricionais de solo e podem resistir a longos períodos de estiagem (Beraldo, 2004).

Devido a sua ampla diversidade de aplicações e versatilidade agrícola, diferentes espécies de bambus são cultivadas pelo mundo, como na China, Japão, Tailândia, Vietnã, Malásia, Indonésia, Filipinas, Senegal, Europa, Rússia, Estados Unidos, Chile, Colômbia, Brasil, dentre outros países (Carnegie, 1997; Arya et al., 1999; Singh et al., 2013).

No Brasil florestas nativas de bambus arborescentes do gênero *Guadua* ocupam extensas áreas praticamente inexploradas, principalmente na região Amazônica (Afonso, 2011; Singh et al., 2013). A investigação acerca do potencial botânico, ecológico, genético e social dessas áreas pode fundamentar a consolidação de uma cadeia produtiva de bambus no Brasil.

Embora a “cultura do uso do bambu” seja bem consolidada nos países Asiáticos, o uso dessas plantas não alcançou a mesma expansão e popularidade comercial nas Américas. A exploração de bambus nativos na América do Sul se restringe ao desenvolvimento da economia local, como na Colômbia, Equador e Brasil, e alguns poucos plantios comerciais de espécies exóticas, como *Bambusa vulgaris* (Londoño, 2001; Bystriakova et al., 2004; Guerra et al., 2017).

Presume-se que a produção de bambu represente uma alternativa inovadora e interessante para o agronegócio brasileiro (Fialho et al., 2005; Guerra et al., 2017). O país dispõe de condições edafoclimáticas favoráveis (relativas ao solo e ao clima), ampla expansão territorial, e ainda áreas degradadas inaptas para outros cultivos, mas apropriadas para plantios das diversas espécies de bambu, fato que mitigaria o impacto da exploração florestal em áreas nativas (Guerra et al., 2017).

Em 2011, foi criada a lei nº 12.484 de 08 de setembro de 2011, denominada “Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB)”, para regulamentação da produção de espécies nativas para uso comercial dos bambus no Brasil. A criação da lei foi viabilizada com a percepção do vasto potencial de utilização da planta e o pouco conhecimento existente no País acerca de suas características agrônômicas, e do entendimento em ciência e tecnologia na área de desenvolvimento em bambu.

Desde então, o interesse continua crescente no Brasil e a cadeia produtiva nacional do bambu vem sendo fortalecida, tanto que o Senado Federal aprovou em 24 de agosto de 2016 um acordo que garante a participação do País na Rede Internacional do Bambu e Rattan (*Inbar*, na sigla em inglês). Criada pela ONU, essa iniciativa reúne 41 países para

implementar uma agenda global de desenvolvimento sustentável por meio do bambu e do rattan (uma espécie de cipó).

Sendo assim, torna-se fundamental a geração de conhecimento científico que assegurem a inovação tecnológica e sustentável, a fim de proporcionar desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu, de modo a expandir os benefícios socioeconômicos e ambientais dessa matéria-prima.

2.6. Propagação convencional das espécies de bambu

A produção de mudas das espécies de bambus via seminal é muito limitada, principalmente pelas sementes serem raras devido ao imprevisível e subsequente longo ciclo de florescimento que acontece em intervalos de até 120 anos (Ramanayake et al., 2001; Vengala et al., 2008; BPG, 2012). Tal acontecimento geralmente leva a morte da planta (Arya et al., 1999; Ramanayake et al., 2001).

Devido à escassez desse material, torna-se inviável a propagação das espécies via seminal. Convencionalmente, a propagação de bambus é feita vegetativamente usando-se diferentes partes da planta (Mudoi et al., 2013; Sandhu et al., 2017). O método mais comum é o desmembramento de aglomerados (touceiras), que utiliza propágulos vegetativos que devem conter o eixo estrutural das folhas, rizoma e raiz para garantir a eficiência da produção de mudas (Gielis et al., 2001).

Outros métodos de propagação vegetativa de bambus são praticados, como por exemplo, o perfilhamento, onde os colmos com 3-4 segmentos nodais contendo parte do rizoma subterrâneo são coletados de uma matriz (Azzini e Salgado, 1993; Islan et al., 2011). Também é realizado o método de propagação vegetativa por estaquia, onde parte do colmo contendo de 2-3 segmentos nodais e gemas axilares sem dormência é propagada (Gallardo et al., 2008), além do replantio de plantas jovens de 7-10 cm retiradas do campo (Kumar, 2012).

Apesar de muitas vezes eficientes, a literatura reconhece que esses métodos de propagação convencional de bambus são considerados limitantes para atender a demanda por grandes quantidades de mudas, principalmente devido ao trabalho oneroso que estas técnicas podem proporcionar. Adicionalmente, nem todos os genótipos respondem eficientemente, com certa recalcitrância para o enraizamento, dependência sazonal e baixa taxa de sobrevivência no campo (Singh et al., 2013).

2.7. Utilização da cultura de tecidos para a produção de mudas de bambus

Com o advento da Biotecnologia, novas práticas fundamentadas no desenvolvimento de processos e produtos que subsidiem o emprego de estratégias voltadas para a multiplicação, conservação e manejo sustentável são indispensáveis para reduzir os riscos de erosão genética em espécies de importância ecológica e econômica, já que essas constituem num reservatório natural de genes. Um desses grandes avanços biotecnológicos foi o desenvolvimento da técnica de cultura de tecidos (George, 2008; Reed et al., 2011).

De modo geral, a cultura de tecidos, mais especificamente a micropropagação, constitui um conjunto de metodologias nas quais um explante (pequena quantidade de material propagativo) é isolado e cultivado sob condições assépticas, em um meio nutritivo artificial. A escolha do explante é baseado no princípio da plasticidade que uma célula sob condições fisiológicas, genéticas e moleculares adequadas, possa adquirir capacidade em se tornar totipotente e se desenvolver autonomamente em uma planta inteira, uma vez que ela contém a informação genética necessária para tal (Féher, 2019).

A cultura de tecidos surge como uma alternativa para espécies que normalmente têm baixa disponibilidade de sementes e material propagativo, a fim de maximizar a produção de mudas com fidelidade genética ao material de origem e com qualidade fitossanitária, dada as condições de cultivo altamente assépticas (Hartmman et al., 2011).

Uma vez compreendida, essa ferramenta alternativa e importante, pode proporcionar avanços na produção em larga escala de bambus e possibilitar a obtenção *in vitro* de plantas saudáveis, a qual pode ser feita sem intervenções sazonais (Grattapaglia e Machado, 1998; Jiménez et al., 2006; García-Ramírez et al., 2010; Menezes et al., 2012; Mudoi et al., 2013; Singh et al., 2013; Sandhu et al., 2017).

Sendo assim, a cultura de tecidos oferece uma vantagem substancial em relação a técnicas convencionais consideradas insuficientes e ineficientes não apenas para obtenção de mudas de bambus, mas também na manipulação de processos de regeneração, que podem ocorrer a partir de três padrões distintos (1) micropropagação convencional, (2) organogênese e (3) embriogênese somática (Singh et al., 2013).

2.7.1. Micropropagação convencional

Em bambus, a micropropagação convencional ocorre basicamente na multiplicação de propágulos vegetativos em laboratório. A técnica baseia-se no cultivo *in vitro* de explantes, que geralmente constituem-se de segmentos de 1-2 cm de colmo, com pelo menos uma gema axilar dormente (explante), ou seja, coberto pela bainha foliar, sob condições assépticas, em meio nutritivo específico e condições de luminosidade e temperatura controladas (Singh et al., 2013).

A micropropagação convencional de bambu está razoavelmente bem estudada para a obtenção de indivíduos com semelhante composição genética da planta-matriz (clone). Isso inclui estudos em espécies como *Bambusa tulda* (Saxena, 1990; Mishra et al., 2008; Waikham e Louis, 2014), *Dendrocalamus longispathus* (Saxena e Bhojwani, 1993), *Dendrocalamus giganteus* (Ramanayake e Yakandawala, 1997; Sood et al., 2002; Agnihotriet al., 2009), *Dendrocalamus asper* (Arya et al., 1999; Singh et al., 2011), *Thamnocalamus spathiflorus* (Bag et al., 2000), *Bambusa vulgaris* (Ramanayake et al., 2006; Furlan et al., 2018), *Bambusa nutans* (Yashoda et al., 2008; Negi e Saxena 2011), *Bambusa oldamii* (Lin et al., 2007; Pasqualini et al., 2019), *Guadua angustifolia* (Jiménez et al., 2006; Nogueira et al., 2019), *Bambusa balcooa* (Mudoi e Borthakur 2009; Brar et al., 2014), *Bambusa pallida* (Beena e Rathore, 2012), *Dendrocalamus hamiltonni* (Agnihotri e Nandi, 2009; Singh et al., 2012a), *Melocanna baccifera* (Waikham e Louis, 2014), *Thamnocalamus falconeri* (Bakshi et al., 2015), *G. chacoensis* (Ornellas et al., 2019) e *G. magna* (Nogueira et al., 2019).

Os autores relatam a realização de diversos subcultivos em meios nutritivos suplementados com diferentes fontes de carboidratos e fitoreguladores em diversas concentrações, até atingir o número desejado de plantas multiplicadas vegetativamente. No entanto, a metodologia pode apresentar alguns problemas, como elevada contaminação microbiana no início do cultivo, oxidação, ocorrência de variações somaclonais e ainda, baixa percentagem de enraizamento e de sobrevivência durante a fase de aclimatização (Ramanayake et al., 2006; Negi e Saxena, 2011; Singh et al., 2013; Sandhu et al., 2017).

2.7.2. Organogênese

Compreende-se como organogênese o padrão de desenvolvimento onde ocorre o processo de formação de estruturas a partir da proliferação de tecidos meristemáticos formados por células indiferenciadas e morfogeneticamente responsivas (Hartmann et al., 2011).

A organogênese é dividida em dois estádios, podendo ocorrer diretamente, por meio da regeneração de plantas sem passar pela fase de calo e, indiretamente que advém de tecidos com a proliferação de calos (grupo ou massa de células em crescimento que não se organiza em forma de tecido ou órgão) (Cid e Teixeira, 2010).

Durante a propagação *in vitro*, a utilização exógena de reguladores de crescimento vegetal do grupo das auxinas e citocininas influencia diretamente na competência dos tecidos vegetais, podendo favorecer o crescimento de calos na superfície dos explantes (calogênese). Apesar de não ser uma rota preferencial, a calogênese tem subsidiado estudos relacionados à embriogênese somática (George, 2008; Féher, 2019).

Além do mais, a calogênese é assumidamente viável quando levado em consideração as informações acerca do potencial regenerativo que cada genótipo apresenta, e das respostas morfogênicas que diferentes explantes podem ocasionar (George, 2008; Féher, 2019). Em bambus, os estudos envolvendo a organogênese são pouco realizados e podem ocorrer de forma direta ou indireta (calogênese) (Singh et al., 2013).

A organogênese direta já foi eventualmente observada a partir de segmentos nodais em *Dendrocalamus giganteus* (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003), *Bambusa nutans* (Kalia et al., 2004), *Phyllostachys nigra* (Ogita et al., 2005) e *Dendrocalamus farinosus* (Hu et al., 2011), além de inflorescência de *D. latiflorus* (Lin et al., 2007b).

Adicionalmente, os primeiros trabalhos envolvendo a organogênese indireta constaram em *Bambusa oldhamii*, *Bambusa multiplex*, *Phyllostachys aurea*, *Sasa pygmaea* (Huang et al., 1989) e *Sinocalamu slatiflorus* (Tsay et al., 1990). Mais recentemente, também foram observados em *Bambusa edulis* (Lin et al., 2004), *Phyllostachys nigra* (Ogita, 2005), *Phyllostachys bambusoides* (Komatsu et al., 2011), *Dendrocalamus latiflorus* (Qiao et al., 2013), *Bambusa ventricosa* (Wei et al., 2015) e em *Thyrsostachys siamensis* (Obsewan et al., 2019).

Os principais gargalos apontados pela organogênese direta e indireta em bambus envolvem a competência da diferenciação dos tecidos para formação de órgãos vegetais e a regeneração *in vitro* das plantas (raízes e parte aérea). Estudos mais detalhados sobre as respostas fisiológicas quanto à escolha do explante, os estímulos entre a combinação de reguladores de crescimento e condições de cultivo, além da seleção de genótipos responsivos, podem mitigar esses problemas (Komatsu et al., 2011; Mudoj et al., 2013; Singh et al., 2013; Wei et al. 2015).

2.7.3. Embriogênese somática

A embriogênese somática é o processo pelo qual as células somáticas com totipotência (haploides e diploides) são induzidas a se diferenciarem em embriões, sem que ocorra a fusão de gametas. Isso implica na regeneração de uma planta inteira sob condições experimentais favoráveis (Litz e Gray et al., 1995; Namasivayam et al., 2007; Verdeil et al., 2007; Mudoj et al., 2013; Guan et al., 2016). A primeira descrição sobre embriogênese somática foi relatada em cultivo de células isoladas de raiz de cenoura (*Daucus carota*) (Reinert, 1958; Steward et al., 1958). Desde então, muitas investigações vêm sendo realizadas com diversos grupos de plantas, ajustando os protocolos conforme as particularidades de cada espécie (Guan et al., 2016).

A formação de embriões somáticos e zigóticos apresentam padrões de desenvolvimento semelhantes: uma estrutura bipolar constituída de ápice caulinar e radícula, que passam pelos estádios pró-embriônico e embriônico, ou seja, no caso das dicotiledôneas, em formatos globulares, codiformes, torpedos e cotiledonares (Litz e Gray et al., 1995; Mordhorst et al., 2010; Silva et al., 2012). Embriões somáticos apresentam um sistema vascular fechado sem conexão com o tecido de origem (Litz e Gray et al., 1995; Lin et al., 2004; Gillis et al., 2007; Mehta et al., 2011).

A embriogênese somática pode ocorrer de forma direta ou indireta, através da modulação das condições *in vitro* e da composição do meio de cultura (Namasivayam et al., 2007; Singh et al., 2013). Na embriogênese somática direta, os embriões se desenvolvem diretamente sobre a superfície organizada do tecido: folha, segmento do caule, embrião zigótico, inflorescência jovem, a partir de protoplastos e de micrósporos (Williams e Maheswaran, 1986).

Alternativamente, durante o processo de embriogênese somática indireta ocorre uma etapa intermediária de calos para a formação dos embriões. Neste caso, fatores que envolvem os padrões de expressão gênica se fazem necessários para induzir a desdiferenciação do tecido e a ativação da divisão celular no explante, antes que eles possam expressar competência embriogênica (Williams e Maheswaran 1986; Guan et al., 2016).

Trabalhos iniciais sobre regeneração de plantas de bambus a partir da cultura de embriões apareceram somente nos últimos anos da década de 1960 (Alexander e Rao, 1968),

sendo que os primeiros avanços sobre a metodologia começaram a serem realizados mais tardiamente, na década de 1980 (Mehta et al., 1982; Rao et al., 1985; Yeh e Chang et al., 1986; Hassam e Debergh et al., 1987). A partir de então, vêm surgindo várias investigações com o intuito de melhorar a prática acerca da embriogênese somática dos bambus e o surgimento de protocolos para atender as diversas espécies desse grupo de plantas.

A indução da embriogênese somática pode ocorrer por meio da exposição do explante aos fitorreguladores do grupo das auxinas (Fehér et al., 2002; Namasivayam et al., 2007; Mudoj et al., 2013; Singh et al., 2013; Guan et al., 2016). Para as diversas espécies de bambu, a maior parte dos trabalhos envolve a utilização da auxina ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), mencionada para *Dendrocalamus strictus* (Rao et al., 1985; Saxena e Dhawan, 1999) *B. beecheyana* (Yeh e Chang, 1986), *P. viridis* (Hassam e Debergh, 1987), *S. latiflora* (Tsay et al., 1990), *Otatea acuminata aztecorum* (Woods et al., 1992), *D. hamiltonii* (Godbole et al.; Sood et al., 2002; Bag et al., 2012; Zang et al., 2016a; Guo et al., 2017), *B. edulis* (Lin et al., 2004), *B. balcooa* (Gillis et al., 2007), *D. asper* (Arya et al., 2008; Ojha et al., 2009) e *Bambusa nutans* (Mehta et al., 2011), *Phyllostachys heterocycla* (Yuan et al., 2013), *Mniochloa abersend* (Zang et al., 2016b), *Drepanostachyum luodianense* (Lin et al., 2018) e *Dendrocalamus stocksii* (Somashakar et al., 2018).

Outras auxinas também são relatadas em trabalhos envolvendo a embriogênese somática em bambu, entre elas o ácido indolacético (AIA) em *D. asper* (Arya et al., 2008), picloram em *Phyllostachys bambusoides* (Komatsu et al., 2011) e o ácido naftalenoacético (ANA) em *D. hamiltonii* (Godbole et al., 2002) e *B. ventricosa* (Wei et al., 2015).

Também foi relatada a ocorrência de embriogênese somática utilizando a citocinina Cinetina (Kn) em *B. edulis* (Lin et al., 2004); a 6-benzilaminopurina (BAP) em *B. balcooa* (Gillis et al., 2007), *D. hamiltonii* (Arya et al., 2008; Bag et al., 2012) e em *B. ventricosa* (Wei et al., 2015), e o thidiazuron (TDZ) em *B. edulis* (Lin et al., 2004).

Para obtenção de calos com competência embrionária em bambus, a seleção do explante também é fator crucial (Mudoj et al., 2013). Alguns explantes já foram relatados como responsivos para bambus, tais como: tecidos maduros da região nodal e internodal de *B. edulis* (Lin et al., 2004), segmentos nodais de *D. hamiltonii* (Godbole et al., 2002), segmentos basais de *D. hamiltonii* (Sood et al., 2002), brotações axilares de *B. balcooa* (Gillis et al., 2007) e anteras de *S. latiflorus* (Tsay et al., 1990).

A embriogênese somática pode ser considerada uma alternativa conveniente e confiável para obtenção de plantas de bambu (Mudoj et al., 2013). No entanto, a regeneração,

o desenvolvimento morfológico dos embriões somáticos e o desempenho pós-embriônico das espécies não foram considerados satisfatórios em vários dos estudos, o que evidencia a necessidade de maiores investigações acerca dos mecanismos que envolvem o processo da embriogênese somática em bambus (Komatsu et al., 2011; Mudoji et al., 2013; Singh et al., 2013; Wei et al., 2015).

2.7.4. Cultivos celulares em suspensão

Os cultivos celulares em suspensão, ou suspensão celular, é o método que permite a indução, propagação e manutenção de células em meio líquido, ou seja, sem adição de um agente gelificante (Matsumoto, 2006).

Geralmente para a cultura de células em suspensão, calos friáveis que foram induzidos *in vitro* são selecionados e inoculados em meio de cultura líquido suplementado com auxinas. Nestas condições, os materiais são geralmente mantidos sob agitação e no escuro, a fim de formarem um conteúdo em suspensão no qual as células adquiram competência para se desenvolverem e formarem agregados celulares (Mazareia et al., 2011; Kshirsagar et al., 2015).

Devido a esse contato direto das células com os nutrientes do meio de cultura, os cultivos celulares em suspensão podem favorecer uma maior taxa de divisão celular, permitindo um crescimento acelerado e exponencial das células (Cid, 1998; Vanisree et al., 2004; Mohd et al., 2012). As condições de crescimento podem ser rigorosamente controladas, evitando, deste modo, que os experimentos sejam afetados por processos de diferenciação (Liu et al., 2006).

A otimização dos protocolos dos cultivos celulares em suspensão é uma abordagem útil e importante para a compreensão dos processos biológicos que envolvem as diversas espécies de bambu (Ogita et al., 2012). Alguns trabalhos já foram relatados para obtenção de cultivos celulares em bambus, relacionados principalmente à extração de metabólitos secundários, a exemplo de *Phyllostachys nigra* (Ogita, 2005; Ogita et al., 2011; Ogita et al., 2012), *B. edulis* (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003; Liu et al., 2006), *B. oldhammi* e *D. giganteus* (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003). Adicionalmente, também foram descritos trabalhos envolvendo cultivos celulares em suspensão para bambus, especificamente para isolamento de protoplastos em *B. multiplex* e *B. oldhammi* (Huang et al., 1989).

Até o presente momento, cultivos celulares para fins de multiplicação *in vitro* foi mencionado em *D. giganteus* e, apesar de constatado o potencial embriogênico da cultura, os autores atentam que o grau de organização das células foi transitório (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003).

Para obtenção de cultivos celulares em suspensão de qualidade, é necessário o acompanhamento do seu crescimento por meio de métodos quantitativos, tais como, contagem do número celular, massa fresca e massa seca, centrifugação e volume da sedimentação (Matsumoto, 2006; Khanpour-Ardestani et al., 2015). Também é possível a identificação de células embriogênicas dos cultivos celulares mediante dupla coloração através de análises citoquímicas (Khanpour-Ardestani et al., 2015).

Conforme apresentado, os cultivos celulares em suspensão configuram uma importante alternativa de cultivo *in vitro* para bambus (Liu et al., 2006). Uma vez dominada, a técnica pode possibilitar a propagação clonal em larga escala das espécies, livres de patógenos e em espaço-tempo reduzidos (Cid, 1998; Vanisree et al., 2004; Mohd et al., 2012).

2.8. Biorreatores para produção em larga escala de bambus

O sistema tradicional de micropropagação em meio de cultura semi-solidificado envolve algumas limitações, como por exemplo, a utilização de recipientes de tamanho reduzido, número limitado de explantes, intensa manipulação da cultura e alta demanda de mão-de-obra. Estes fatores acabam por aumentar os custos da propagação (Silva et al., 2007; Nogueira et al., 2017).

Com o aumento substancial da demanda comercial por mudas de diversas espécies de bambu nos últimos anos (Singh et al., 2013; Sandhu et al., 2017), uma alternativa economicamente viável para otimizar a produção em escala comercial e reduzir os custos de operação é a utilização dos biorreatores (Teixeira, 2006; Teixeira e Cid, 2015; Nogueira et al., 2017).

Os biorreatores são equipamentos especializados para o cultivo em larga escala de propágulos vegetais, tais como células, embriões, gemas, raízes, caules, dentre outros tipos, utilizando meio de cultura líquido (Etienne e Berthouly; Teixeira, 2002; Paek et al., 2005; Teixeira, 2006; Ribeiro et al., 2013).

Os biorreatores são classificados em relação ao tipo de agitação e construção do frasco e podem ser de imersão permanente em meio líquido (BIPER) (Cid et al., 2002; Penchel et al., 2007) ou de imersão temporária (BIT) (Teixeira, 2002; Ribeiro e Bastos, 2008).

Os biorreatores tipo BIPER são geralmente compostos por frascos de 500 a 5.000 mL com as tampas adaptadas para entrada e saída de ar, acoplados em filtros ligados a um micro-compressor de ar por meio de tubos de silicone até o fundo do frasco, onde produzirão bolhas que permitirão aeração no meio de cultivo líquido (Figura 6). No sistema BIPER os explantes permanecem em contato contínuo com o meio de cultura até o desenvolvimento das plantas (Teixeira, 2002).

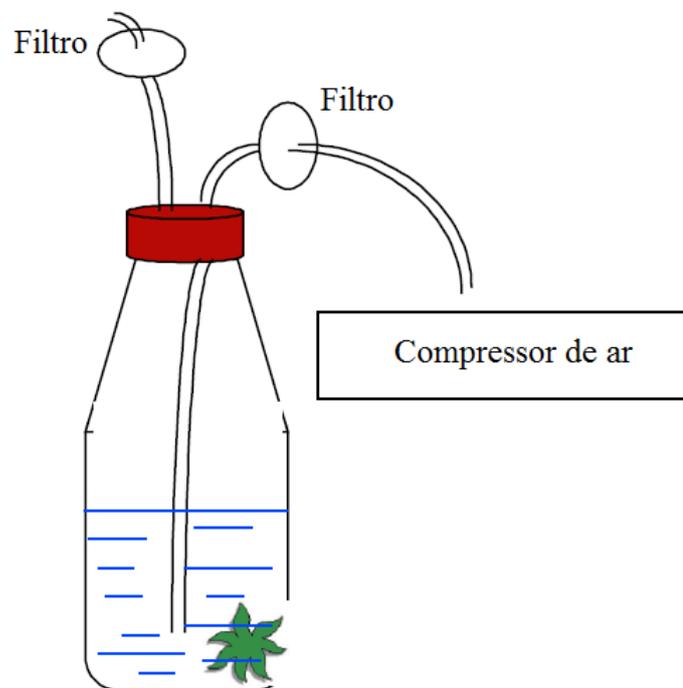


Figura 6. Ilustração simplificada de Biorreator de imersão permanente (BIPER) agitado por fluxo de ar por meio de tubos de silicone (Adaptado de Ribeiro e Bastos, 2008).

Em relação aos biorreatores tipo BIT (Figura 7) existem vários protótipos, os quais podem variar quanto ao tamanho, formato, constituição, tipo de tampa e transparência. Neste tipo, os explantes a serem multiplicados ficam expostos ao meio de cultura temporariamente, permitindo ciclos de renovação do ar e do meio nutritivo durante o cultivo (Cid et al., 2002; Teixeira, 2002; Ribeiro e Bastos, 2008).

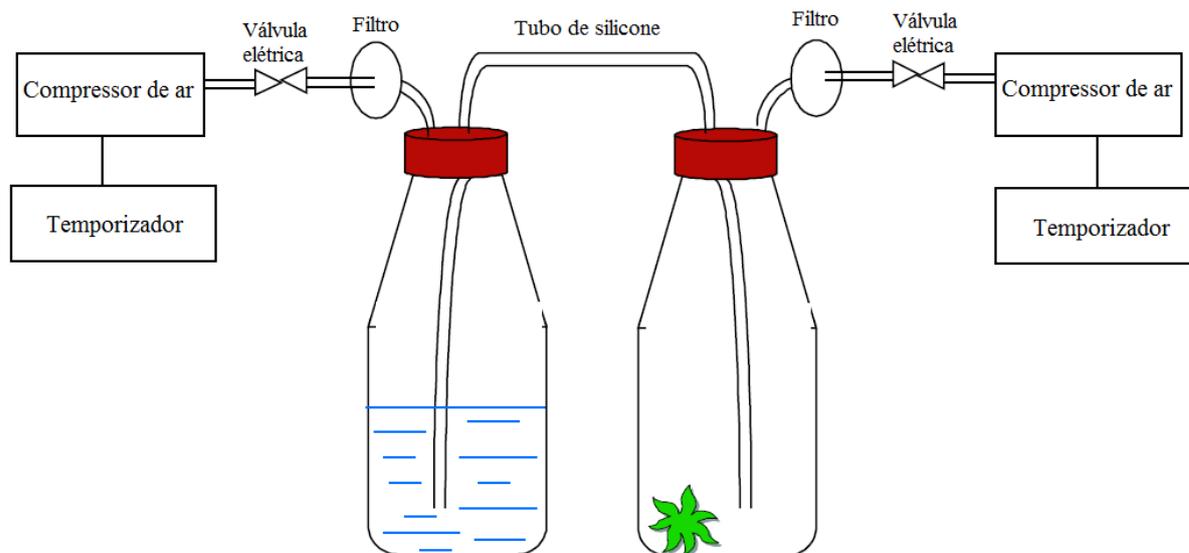


Figura 7. Esquema ilustrativo simplificado do Biorreator de Imersão Temporária (BIT) composto de frascos dispostos lado a lado (Adaptado de Ribeiro e Bastos, 2008).

Devido a diferentes composições dos meios nutritivos e aspectos relacionados à funcionalidade do manejo, as alterações morfofisiológicas das plantas cultivadas em sistemas de biorreatores (padrão da folha, caule, acúmulo de carboidratos e nutrientes, bem como, densidade de plantas por frasco e o tempo de cultivo) configuram-se importantes informações a serem observadas e mensuradas durante a fase de experimentação. Elas podem servir como indicadores da viabilidade do emprego da técnica (Etienne e Berthouly; Teixeira, 2002; Paek et al., 2005; Teixeira, 2006; Penchel et al., 2007; Ribeiro e Bastos, 2008; Scheidt et al., 2009).

Alguns trabalhos envolvendo biorreatores para diversas espécies vegetais demonstram eficiência no aumento dos rendimentos na fase de multiplicação (Etienne e Berthouly, 2002), maior controle do desenvolvimento do material vegetal (Teixeira, 2006) e redução de tempo e custos na propagação (Silva et al., 2007), como relatado para *Hevea brasiliensis* (Martre et al., 2001), *Musa* spp. (Kosky et al., 2006), *Ananas* sp. (Silva et al., 2007), *Saccharums* pp. (Mordocco et al., 2009), *Edremi tyaglik* (Kaya et al., 2011), *Panax quinquefolius* (Uchendu et al., 2011), *Eucalyptus grandis* x *E. uruphylla* (Oliveira et al., 2011a, 2011b), *Arachis hypogea* (Kaya e Ozzudogu, 2012), *Tectona grandis* (Quiala et al., 2012), *Cattleya walkeriana* (Moreira et al., 2013) e *Catharanthus roseus* (Mujib et al., 2014).

Recentemente, verificou-se que a multiplicação clonal em sistemas de biorreatores apresenta vantagens quando comparada ao tradicional sistema de micropropagação em meio

semi-sólido para as espécies de bambu *Guadua angustifolia* (Gutiérrez et al., 2016) e *Bambusa vulgaris* (Ribeiro et al., 2016).

De maneira geral, o número de brotos gerados pelas plantas de bambu difere dependendo da espécie, do meio nutritivo ofertado, da suplementação de fitorreguladores e dos explantes inoculados (Singh et al., 2013; Vale et al., 2019). No entanto, o aprimoramento dos efeitos benéficos dos biorreatores sobre o desenvolvimento *in vitro* das plantas, além da diminuição das perdas de água das plantas após sua transferência para condições *ex vitro*, se fazem necessários para que o uso de biorreatores seja viabilizado como alternativa para produção em larga escala das espécies de bambus (Gutiérrez et al., 2016).

2.9. Uso de marcadores moleculares para avaliar a fidelidade clonal das mudas

A cultura de tecidos emergiu como uma alternativa viável para a propagação em larga escala de plantas. No entanto, as condições do meio de cultura, a fonte de explante, o nível de ploidia e o tempo de cultivo podem induzir variações somaclonais durante os processos de cultivo *in vitro* e resultar em distúrbios morfofisiológicos nas plantas geradas (Singh et al., 2013). Desta maneira, a utilização de marcadores moleculares pode proporcionar resultados satisfatórios para verificação da fidelidade clonal das plantas cultivadas *in vitro* (Singh et al., 2012b).

Por isso, com o advento da tecnologia do DNA recombinante e a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Mullis e Faloona 1987), trabalhos envolvendo uso dos marcadores moleculares vêm contribuindo para avaliar a fidelidade clonal de plantas cultivadas *in vitro*, que garantam a confiabilidade do protocolo desenvolvido para produção em massa de material de plantio comercial (Williams et al., 1990; Singh et al., 2013).

Os marcadores moleculares são segmentos representativos específicos do DNA ao nível do genoma, que podem ou não estar correlacionados com a expressão fenotípica (Agarwal et al., 2008). Eles são considerados estáveis e detectáveis em todos os tecidos, não são afetados pelo crescimento, diferenciação, desenvolvimento ou estado de defesa celular, ou por interferências ambientais e pleiotrópicas, e efeitos epistáticos (Agarwal et al., 2008; Mondini et al., 2009).

De maneira geral, os marcadores moleculares podem ser classificados em duas categorias: (I) com base na análise de proteínas, tais como as isoenzimas, e (II) com base na análise de DNA. Os marcadores moleculares se diferenciam basicamente quanto a capacidade

de amplitude genômica, nível de polimorfismo detectado, especificidade de lócus, reprodutibilidade, requisitos técnicos, facilidade de uso e desembolso financeiro (Mondini et al., 2009).

Uma técnica ideal de marcadores moleculares deve ter os seguintes critérios: (1) ser polimórfico e distribuído uniformemente por todo o genoma, (2) fornecer resolução de diferenças genéticas, (3) gerarem marcadores múltiplos, independentes e confiáveis, (4) ser simples, rápidos e barato, (5) precisar de pequenas quantidades de tecido e amostras DNA, (6) ter ligação com fenótipos distintos e (7) não requerem informação prévia sobre o genoma de um organismo (Argawall et al., 2008).

Diversos marcadores têm sido utilizados em estudos sobre variação genética, classificação sistemática e relações filogenéticas entre bambus, como marcadores do tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SCARs (*Sequence-Characterized Amplified Regions*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), EST-SSRs (*Expressed Sequence Tag – Simple Sequence Repeat*) (Das et al., 2008). Entre estes, pela simplicidade e eficiência o RAPD e, especialmente, o ISSR são descritos como mais indicados para a verificação da fidelidade clonal (Singh et al., 2013; Yeasmin et al., 2015).

Os marcadores moleculares do tipo ISSRs são considerados marcadores semi-arbitrários, baseado no princípio da técnica de PCR, que envolve amplificações de segmentos de DNA, em presença de *primers* complementares (Souza et al., 2005). Os ISSRs foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites, sem a necessidade do conhecimento prévio do sequenciamento do DNA da espécie (Joshi et al., 2000). Tais marcadores possuem bom 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).

O ISSR foi utilizado para identificar fidelidade genética das plantas de bambus clonadas *in vitro* em *B. balcooa* (Negi e Saxena 2010; Brar et al., 2014), *B. nutans* (Negi e Saxena 2011), *G. asgustifolia* (Nadtha et al., 2011; Nogueira et al., 2019), *D. asper* (Singh et al., 2012b), *B. bambos* (Anand et al., 2013), *D. strictus* (Goyal et al., 2015) e *G. magna* (Nogueira et al., 2019).

A desvantagem da utilização do ISSR se dá por se tratar de um marcador molecular dominante (Yeasmin et al., 2014). No entanto, o método é considerado de aplicação simples, rápida e eficiente, possui alta reprodutibilidade e pode gerar altos índices de polimorfismo (Pradeep Reddy et al., 2002). Além do mais, é facilmente detectado usando poucos equipamentos e fornece grande número de dados por um custo razoavelmente baixo (Wolfe, 2005).

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**, v. 27, p. 617-631, 2008.
- AGNIHOTRI, R. K., NANDI, S. K.; *In vitro* shoot cut: a high frequency multiplication and rooting method in bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. **Biotechnology**, v. 8, p. 259-263, 2009.
- AGNIHOTRI, R. K.; MISHRA, J.; NANDI, S. K.; Improved in vitro shoot multiplication and rooting of *Dendrocalamus shamiltonii* Nees et Arn. ex Munro: production of genetically uniform plants and field evaluation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 961-967, 2009.
- AKKER, S. V.; BORMANS, P.; PEETERS, H.; PRINSEN, E.; GIELIS, J. Cytokinin dynamics in cell suspension cultures of *Bambusa balcooa* Roxburgh using UPLC-ESI/MS/MS. In: **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v. 28, n. 1, p. 32-39, 2015.
- ALEXANDER, M. P.; RAO, T. C. *In vitro* culture of bamboo embryos. **Current Science**, v. 37, p. 415, 1968.
- 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**, v. 2, n. 4, 2013.
- ARRUDA, L. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; TEIXEIRA, D. E.; ARAÚJO, P. C.; Lignocellulosic composites from brazilian giant bamboo (*Guadua magna*) part 1: properties of resin bonded particleboards. **Maderas, Ciencia y Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 49-58, 2011.
- ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; ARYA, I.D. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 10, p. 879-882, 1999.
- ARYA S.; SATSANGI, R.; ARYA, I. D. Large scale production of edible bamboo *Dendrocalamus asper* through somatic embryogenesis. **Journal American Bamboo Society**, v. 21, p. 13-23, 2008.
- AZZINI, A.; SALGADO, A. L. B. Enraizamento de propágulos de bambu em diferentes substratos. **Bragantia**, Campinas, v. 52, n. 2, p. 113-118, 1993.
- BAG, N.; CHANDRA, S.; PALNI, L. S. M.; NANDI, S. K. Micropropagation of Devringal [*Thamnochalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] - a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. **Plant Science**, v. 156, n. 2, p. 125-135, 2000.
- BAG, N.; PALNI, L. M. S.; CHANDRA, S.; NANDI, S. K. Somatic embryogenesis in 'Maggar' bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii*) and Field performance of regenerated plants. **Current Science**, v. 102, p. 1279-1287, 2012.

- BAKSHI, M.; TIWARI, C.; RAZVI, S. Conservation of an important montane bamboo *Thamnocalamus falconeri*, Hook.f. ex Munro through axillary bud proliferation. **Journal of Forest Research**, v.26, n. 1, p.179-185, 2015.
- BANIK, R. L. Periodicity of culm emergence in different bamboo species of Bangladesh. **Annals Forestry**, v. 1, n. 1, p. 13-17, 1993
- BANIK, R. L. A manual of vegetative propagation of bamboos. **INBAR technical report**, New Delhi, Índia, v. 6, p. 1-66, 1995.
- BEENA, D. B.; RATHORE, T. S.; *In vitro* cloning *Bambusa pallida* Munro through axillary shoot proliferation and evolution of genetic fidelity by random amplified polymorphic DNA markers. **International Journal of Plant Biology**, v. 3, n. 6, p. 27-33, 2012.
- BENNETZEN, J. L. Patterns in grass genome evolution. **Current opinion in plant biology**, v. 10, n. 2, p. 176-181, 2007.
- BERALDO, A. L.; AZZINI, A. **Bambu: características e aplicações**. Guaíba: Livraria Editora Agropecuária, 2004. 180p.
- BERALDO, A.L.; PEREIRA, M. A. R. *Bambu de corpo e alma*. Bauru, São Paulo. 2007. 23p.
- BPG - BAMBOO PHYLOGENY GROUP. An update tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v.24, n.1, p.1-10, 2012.
- BRAR, J.; SHAFI, A.; SOOD, P.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* propagation, biochemical studies and assessment of clonal fidelity through molecular markers in *Bambusa balcooa*. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 26, n. 1, p. 115-124, 2014.
- BRIAS, V.; HUNDE, T. **Bamboo Cultivation Manual**. Guidelines for cultivating Ethiopian highland bamboo. United Nations Industrial Development Organization. 2009. 58p.
- BRITO, J.O.; CINTRA, T. C. Madeira para energia no Brasil: Realidade, visão estratégica e demandas de ações. **Biomassa & Energia**, v. 1, p. 157-163, 2004.
- BRITO, J.O.; TOMAZELLO FILHO, M.; SALGADO, A.L.B. Produção e caracterização do carvão vegetal de espécies e variedades de bambu. **Revista IPEF**, v. 36, p. 13-17, 1987.
- BYSTRIAKOVA, N.; KAPOS, V.; LYSENKO, I. **Bamboo Biodiversity**. UNEP-WCMC/INBAR. 2004.
- CARNEGIE, A. J. M. Sugarcane and bamboo. In: BEN-DOV, Y.; HODGSON, C.J. (Ed.) **Soft scale insects – their biology, natural enemies and control**. Elsevier Science B. p. 333–341, 1997.
- CARVALHO, A. L.; 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**, v. 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**, v.161, p.122-127. 2009.
- CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 331-353.
- CID, L. P. B.; Cruz, A. R. R.; Teixeira, J. M. Biorreatores de imersão permanente. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 25, p. 50-53, 2002.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 51-66, 2010.
- CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. Bamboo taxonomy and habitat. In: Liese, W.; Kohl, M. (eds) **Bamboo, tropical forestry**, p. 1-30, 2015.
- 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**, v.47, p.226-260, 2008.
- DUARTE, J.; MORAES, R.; PERECIN, L. Bamboo - a fiber to be discovered by the industry. **O Papel**, p.46-48, 2007.
- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69 n. 3 p. 215–231, 2002.
- FAMASUL – **Federação da Agricultura e Pecuária do Mato Grosso do Sul**. Disponível em: <<http://famasul.com.br/>> 2014.
- FAO - Food and agriculture organization of the United Nations. World Bamboo Resources. **Non-Wood Forest Products** v. 18, 2007. Disponível em <<http://www.fao.org/forestry/fma/83159/en/>>
- FAO - Food and agriculture organization of the United Nations. **Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture**. Rome, 2014. 182 p. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i3704e.pdf>
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; OTVOS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v. 57, p. 5-12, 2002.
- FEHÉR, A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00536.
- FIALHO, E. D.; DA SILVA, A. L. P.; TONHOLO, J. Desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu: uma oportunidade para empreender. In: **XI Seminário Ibero-Latinoamericano de Gestão Tecnológica**, Salvador, Bahia, p.1-10, 2005.

FILGUEIRAS, T. S.; LONDOÑO, X. A. Giant new *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) from Central Brazil. In: **Proceedings of 1st National Seminar on Development of the Brazilian Bamboo Research Network**, Brasília, Brazil, p. 27- 33, 2006.

FILGUEIRAS, T. S.; LONDOÑO, X. A. 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 dezembro 2016.

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.; OLIVEIRA, R. P.; SFAIR, J. C.; MONTEIRO, N. P.; BORGES, R. A. X. Poaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Ed.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 858-881, 2013.

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.

FISHER A.; TRIPLETT J. K.; HO C-S.; SCHILLER A.; OLTROGGE K.; SCHRODER E.; KELCHNER S. A.; CLARK L. G.; Paraphyly in the Bamboo Subtribe Chusqueinae (Poaceae: Bambusoideae) and a Revised Infrageneric Classification for *Chusquea*. **Systematic Botany**, v. 34, p. 673-683, 2009.

FURLAN, F. C.; GAVILAN, N. H.; ZORZ, A. Z.; OLIVEIRA, L. S.; KONZEN, E. R.; BRONDANI, G. E. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, v. 39, n. 1, p. 61-70, 2018.

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**, v. 10, n. 3, p. 151-156, 2010.

GALLARDO, J.; FREIRE, M.; LEÓN, J.; GARCÍA, Y.; PÉREZ, S.; GONZÁLEZ, M. Comportamiento em labrotación de las yemas de estacas de *Guadua angustifolia* Kunth empleadas en la propagación. **Cultivos tropicales**, v. 29, n. 1, p. 17- 22, 2008.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. In: MERRIOTT, E. F. G.; HALL, M. A.; KLERK, G-J. (Eds). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer Science+Business Media, p.1-28, 2008.

- 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**, v. 9, n. 1, p. 107-114, 2005.
- GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K.; OPRINS, J.; DEBERGH, P.C. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v. 552, p. 195-203, 2001.
- GILLIS, K.; GIELIS, J.; PEETERS, H.; DHOOGHE, E.; OPRINS, J.; Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxb as basis for mass production of elite forestry bamboos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, p. 115-123, 2007.
- GODBOLE, S.; SOOD, A.; THAKUR, R.; SHARMA, M.; AHUJA, P. S. Somatic embryogenesis and its conservation into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. **Currunt Science**, v. 83, p. 885-889, 2002.
- 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. **Biotech**, v. 5, p. 473-482, 2015.
- GPWG II (Grass Phylogeny Working Group II) New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C4 origins. **New Phytologist**, v. 193, n.2, p. 304-312, 2012.
- 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. Diversidade de bambus (Poaceae: Bambusoideae) na ilha de Santa Catarina, Brasil. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, CCB, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Florianópolis, Brasil, 2013.
- GRECO, T.M.; PINTO, M.M.; TOMBOLATO, F.C.; XIA, N. Diversity of bamboo in Brazil. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**, v. 23, p. 1-16, 2015.
- 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 de Botânica**, v. 34, n. 1, p. 135-140, 2011.
- GUAN, Y.; LI, S. G.; FAN, X. F.; SU, Z. H. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 938, p. 1-12, 2016.
- GUERRA, S. P. S.; SILVA, M. A.; GARCIA, L. A.; MELO, R. X.; TICELLI, M.; MENDES, C. R. L. G.; BRITO, C. M. Estudo de caso de plantio adensado de *Bambusa vulgaris*. In: DRUMOND, P.M.; WIEDEMAN, G. (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH, 2017. p. 281-289.
- GUO, X.; JI, L.; ZHU, L.; SONG, L.; LIU, S.; ZANG, Q.; LIN, X. Bamboo *NiR* gene is associated with regeneration capacity. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 2017. DOI: 10.1080/14620316.2017.1353894.

GUTIÉRREZ, L. G.; LÓPEZ-FRANCO, R.; MORALES-PINZÓN, T. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA®. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 28, p. 1503-1510, 2016.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8ª ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915p.

HASSAM, A. A.; DEBERGH, P. Embryogenesis and plantlet development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (Young) McClure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 10, p. 73-77, 1987.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J. P., HARTOG, M. V. SCHIMIDT, E. D. L.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S. C. The Arabidopsis *somatic embryogenesis receptor kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, v. 127, p. 803-816, 2011.

HERNANDEZ, L. M.; MARÍN, D. Propagación y crecimiento de *Guadua amplexifolia* Presl., *Guadua angustifolia* Kunth y *Elytostachystypica* McClure, em três tipos de substratos. **Bioagro**, v. 23, n. 3, p. 191-198, 2011.

HIDALGO-LOPEZ, O. **Bamboo the gift of the gods**. ISBN 958-33-33-4298-X. Bogotá, 2003. 570 p.

HU, S.; ZHOU, J.; CAO, Y.; LU, X.; DUAN, N.; REN, P.; CHEN, K. *In vitro* callus induction and plant regeneration from mature seed embryo and young shoots in a giant sympodial bamboo, *Dendrocalamus farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et H.L. Fung. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 16, p. 3210-3215, 2011.

HUANG, L. C.; HUANG, B. L.; CHEN, W. L. Tissue culture investigations of bamboo – IV. Organogenesis leading to adventitious shoots and plants in excised shoot apices. **Environmental and Experimental Botany**, v. 29, n. 3, p. 307-315, 1989.

HUANG, L.; CHEN, W.; HUANG, B. Tissue culture investigations of bamboo. III. A method for viable protoplast isolation from Bambusa cells of liquid suspension culture. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v.30, p. 49-57, 1989.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e Silvicultura** – 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2015/default.shtm> Acesso: fev/2017.

ISLAM, M.S.; BHUIYAN, M.K.; HOSSAIN, M.M.; HOSSAIN, M.A. Clonal propagation of *Bambusa vulgaris* by leafy branch cuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 22, n. 3, p. 387-392, 2011.

JIMÉNEZ, V. M.; CASTILHO, 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**, v. 86, n. 3, 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**, v. 100, p. 1311-1320, 2000.

JUDZIEWICZ, E. J.; CLARK, L. G.; LONDOÑO, X.; STERN, M. **American bamboos**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution, 1999. 392p.

KALIA, S.; KALIA, R. K.; SHARMA, S. K. *In vitro* regeneration of an indigenous bamboo (*Bambusa nutans*) from internode and leaf explant. **Journal Bamboo Rattan**, v. 3, p. 217-228, 2004.

KAYA, E.; OZUDOGRU, E. A. *In Vitro* Propagation of Peanut (*Arachis hypogea* L.) via Temporary Immersion Bioreactor Systems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 48, p. 65-65, 2012.

KELCHNER, S.A.; BPG (Bamboo Phylogeny Group) Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 67, p. 404-413, 2013.

KENG, P. C. A revision on the genera of bamboos from the world. **Journal Bamboo Research**, v. 1, n. 1, p. 1-19, 1982.

KHANPOUR-ARDESTANI, N.; SHARIFI, M.; BEHMANESH, M. Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: an *in vitro* approach for acteoside production. **Cytotechnology**, v. 67, p. 475-485, 2015.

KOMATSU, Y. H.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; BRONDANI, G. E.; GONCLAVES, A. N.; ALMEIDA, M. D. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forest Research**, v. 22, p. 209-215, 2011.

KOSKY, R. G.; BARRANCO, L. A.; PÉREZ, B. C.; DANIELS, D.; VEJA, M. R.; SILVA, M. F. Trueness-to-type and yield components of the banana hybrid cultivar FHIA-18 plants regenerated via somatic embryogenesis in a bioreactor. **Euphytica**, v. 150, n.1/2, p.63-68, 2006.

KSHIRSAGAR, P. R.; CHAVAN, J. J.; UMDALE, S. D.; NIMBALKAR, M. S.; DIXIT, G. B.; GAIKWAD, N. B. Highly efficient *in vitro* regeneration, establishment of callus and cell suspension cultures and RAPD analysis of regenerants of *Swertia lawii* Burkill. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 79-84, 2015.

KUMAR, A. Macroproliferation technology for raising large scale plantations of sympodial bamboos. In: 9th World Bamboo Congress, **Proceedings...** University of Antwerp, Belgium, p.163-176, 10-15 April, 2012.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v.3, n.2, p. 87-92, 2002.

LEMO, E. E. P.; FONSECA, F. K. P.; OLIVEIRA, J. F.; LEÃO, I. B. REZENDE, L. de P.; SOUZA, C. D.; FILGUEIRAS, T. S.; FERREIRA, M. O. Inovações tecnológicas para a

propagação de bambu. **Anais**. In: I Seminário Nacional do Bambu: Estruturação da Rede de Pesquisa e Desenvolvimento. 2. ed. Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, p. 56-61, 2011.

LIMA NETO, M. C.; BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P.; SILVA, J. A. A. Exportação de macronutrientes em cultivos comerciais de bambu no tabuleiro costeiro do estado da Paraíba. **Revista Árvore**, v. 34, n. 2, p. 251–257, 2010.

LIN, C. S.; LIN, C. C.; CHANG, W. C. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p. 75–82, 2004.

LIN, C. S.; KALPANA, K.; CHANG, W. C.; LIN, N. S.; Improving multiple shoot proliferation in bamboo mosaic virus-free *Bambusa oldhamii* Munro propagation by liquid culture. **Scientia Horticulturae**, v. 42, n. 5, p. 1243-1256, 2007a.

LIN, C. S.; LIANG, C. J.; HSAIO, H. W.; LIN, M. J.; CHANG, W. C. *In vitro* flowering of green and albino *Dendrocalamus latiflorus*. **New Forest**, v. 34 p. 177-186, 2007b.

LISTA DO PROJETO FLORA DO BRASIL (2017) Poaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB102232>>. Acesso em 17 de fevereiro de 2017.

LITZ, R. E. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 416-425, 1995.

LIZARAZU, M. A.; AGRASAR, Z. E. R.; VEGA, A. S. A New Species of *Guadua* (Poaceae, Bambusoideae, Bambuseae) and Synopsis of Genis in Argentina and Neighboring Regions. **Systematic Botany**, v.38, n.4, p. 1062-1075, 2013.

LONDOÑO, X. **Evaluation of bamboo resources in LatinAmerica**. A summary of the final report of the project 96-8300-01-4. International Network for Bamboo and Rattan, Beijing, China, 2001.

LONDOÑO, X. **Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los Bambú es del nuevo mundo**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2002. Disponível em: <<http://www.hof-landlust.de/scb/taller.html>>. Acesso em 15 de dezembro 2016.

LONDOÑO, X.; PETERSON, P. M. *Guadua chacoensis* (Poaceae: Bambuseae), its taxonomic identity, morphology, and affinities. **Novon** 2: 41–47, 1992.

LONDOÑO, X.; ZURITA L. E. Two new species of *Guadua* (Bambusoideae: Guaduinae) from Colombia and Bolivia. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v. 2, p. 25-34, 2008.

LONGHI-WAGNER, H. M. Poaceae: an overview with reference to Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 89-100, 2012.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, 1989. 201p.

MARTRE, P.; LACAN, D.; JUST, D.; TEISSON, C. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 25-35, 2001.

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão: focalizando a bananeira**. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa 126. 24p. Brasília 2006.

MAZAREIA, M.; AL-AHMADA, H.; RUDIS, M. R.; JOYCE, B. L.; C. STEWART JR, C. N. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cell suspension cultures: Establishment, characterization, and application. **Plant Science**, v. 181, p.712-715, 2011.

MENDES, S. C.; MOLICA, S. G.; FERREIRA, R. L. C.; CÉSPEDES, G. H. G. Absorção e distribuição de nutrientes em plantios comerciais de bambu (*Bambusa vulgaris*) no Nordeste do Brasil. **Revista Árvore**, v. 34 n. 6 p. 991-999, 2010.

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. **Journal of Forestry Research**, v. 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**, v. 28, n. 6, p. 868-876, 2012.

METZGER, J. P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, Essex, v. 142, n. 6, p. 1138-1140, 2009.

MISHRA, D. Experience with livelihood development projects – a case study of Chhattisgarh, India. **Annals: VIII World Bamboo Congress, 2009**. Vol. 07, Bamboo for Community and Economic Development. Tailândia, 2009. p.71-80.

MISHRA, Y.; PATEL, P. K.; YADAV, S.; SHIRIN, F.; ANSARI, S. A. A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. **Scientia Horticulturae**, v. 115, p. 315-318, 2008.

MIZUKI, I.; SATO, A.; MATSUO, A.; SUYANA, Y.; SUZUKI, J. I.; MAKITA, A. Clonal structure, seed set, and self-pollination rate in mass-flowering bamboo species during off-year flowering events. **PLoS ONE**, V. 9, N. 8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0105051.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BRAGWATA, T. G.; YANO, M.; BHATIA, C. R.; SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted in crop plants. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 87-103, 2004.

MOHD.; RIZVI, Z.; KUKREJA, A. K.; BISHT, N. S. Plant regeneration in *Chorophytum borivilianum* Sant. et Fernand. from embryogenic callus and cell suspension culture and

assessment of genetic fidelity of plants derived through somatic embryogenesis. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 18, n. 3, p. 253-263, 2012.

MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity**, v. 1, p. 19-35, 2009.

MORDHORST, A. P.; TOONEN, M. A. DEVRIES, S. C.; MEINKE, D. Plant embryogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, p. 535-576, 2010.

MORDOCCO, A. M.; BRUMBLEY, J. A.; LAKSHMANAN, P. Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 45, n. 4, p.450-457, 2009.

MOREIRA, A. L.; SILVA, A. B.; SANTOS, A.; REIS, C. L.; LANDGRAF, P. R. C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.10, p.1804-1810, 2013.

MUDOI, K. D.; BORTHAKUR, M. *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from fieldgrown culms and scope for upscaling. **Current Science**, v. 96, p. 962-966, 2009.

MUDOI, K.D.; SAIKIA, S.P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal Biotechnology**, n. 12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.

MUJIB, A.; ALI, M.; TASIU ISAH, DIPTI. Somatic embryo mediated mass production of *Catharanthus roseus* in culture vessel (bioreactor) – A comparative study. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 442-449, 2014.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 350-355, 1987.

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 Med Plants Research**, v. 5, p. 5636-5641, 2011.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 90, p. 1-8, 2007.

NEGI, D.; SAXENA, S. Ascertaining clonal fidelity of tissue cultureraised plants of *Bambusa balcooa* Roxb. using inter simple sequence repeat markers. **New Forest**, v. 40, p. 1-8, 2010.

NEGI, D.; SAXENA, S.; *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. **Plant Biotechnol Reports**, v. 5, p. 35-43, 2011.

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

NOGUEIRA, J. S.; GOMES, H. T.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Gudua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.49, 2019.

OBSUWAN, K.; DUANGMANEE, A.; THEPSITHAR, C. *In vitro* propagation of a useful tropical bamboo, *Thyrsostachys siamensis* Gamble, through shoot-derived callus. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, 2019. DOI: 10.1007/s13580-018-00119-z.

OGITA, S. Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. **Plant Biotechnoly**, v. 22, p. 119-125, 2005.

OGITA, S.; KIKUCHI, N.; NOMURA, T.; KATO, Y. A practical protocol for particle bombardment-mediated transformation of *Phyllostachys* bamboo suspension cells. **Plant Biotechnoly**, v. 28, p. 43-50, 2011.

OGITA, S.; NOMATU, T.; KISHIMOTO, T.; KATO, Y. A novel xylogenic suspension culture model for exploring lignification in *Phyllostachys* bamboo. **Plant Methods**, n. 8, v. 40, p. 1-9, 2012.

OJHA, A.; VERMA, N.; KUMAR, A. *In vitro* micropropagation of economically important edible bamboo (*Dendrocalamus asper*) through somatic embryos from root, leaves and nodal segments explants. **Research on Crops**, v. 10, p. 430-436, 2009.

OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R. M.; OTONI, W. C.; TEIXEIRA, J. B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011a.

OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL, R. M.; SANTOS, A. F. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semi-sólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 39, n. 91, p. 309-315, 2011b.

ORNELLAS, T. S.; MARCHETTI, C. K.; OLIVEIRA, G. H.; FRITSCHÉ, Y.; GUERRA, M. P. Micropropagation of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, e55450, 2019.

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**, v. 10, n. 10, jan./jun. 2008.

PAEK, K. Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, n. 3, p. 287–300, 2005.

PASQUALINI, A. P. A.; SCHNEIDER, G. X.; FRAGA, H. P. F.; BIASI, L. A.; QUOIRIN, M. *In vitro* establishment of *Bambusa oldhamii* Munro from field-grown matrices and molecular identification of endophytic bacteria. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019. DOI: 0.1590/1983-40632019v4953673.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal**, Viçosa: [s.n.], p. 75–92, 2007.

PEREIRA, M. A.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru: Canal 6 Editora, 2008. 240p

Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu – PNMCB. Casa Civil - LEI Nº12.484, DE 8 DE SETEMBRO DE 2011. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2011/lei/112484.htm> acesso em 17 de janeiro de 2017.

PRADEEP REDDY, M.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A.; Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.

QIAO, G.; LI, H.; LIU, M.; JIANG, J.; YIN, Y.; ZHANG, L.; ZHUO, R. Callus induction and plant regeneration from anthers of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, DOI 10.1007/s11627-013-9498-8. 2013.

QISHENG, Z.; SHENXUE, J.; YONGYU, T. **Industrial utilization on bamboo**. INBAR: Technical Report, n.26, 2006.

QUIALA, E.; CANĀL, M.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, R.; CHÁVEZ, M.; VALLEDOR, L.; FERIA, M.; BARBÓN, R. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p.223–234, 2012.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; YAKANDAWALA, K. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. **Plant Science**, v. 129, n. 2, p. 213-223, 1997.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; WANNIARACHCHI, W. A. V. R.; TENNAKOON, T.M.A. Axillary shoot proliferation and in vitro flowering in an adult giant bamboo *Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 5, p. 667–671, 2001.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; WANNIARACHCHI, W. A. V. R. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 195-200, 2003.

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**, v. 110, p. 109-113, 2006.

RAO, I. V.; RAO, I. V. R.; NARANG, V. somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. **Plant Cell Reports**, v. 4, p. 191-194, 1985.

RATHORE, T. S.; KABADE, U.; JAGADISH, M. R.; SOMASHEKAR, P. V.; VISWANATH, S. Micropropagation and evaluation of growth performance of the selected

industrially important bamboo species in southern India. In: **Proc 8th World Bamboo Cong Lucas S** (ed) Bangkok, Thailand, p. 41-55, 2009.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, v. 1, p. 1-4, 2011.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores**: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais. Embrapa Semi-Árido. Petrolina, 26 p., 2008.

RIBEIRO, J. M.; PINTO, M. S. T.; TEIXEIRA, S. L. Alternativas para redução de custos na produção de mudas *in vitro*. **Embrapa Seminário**, Documentos, 256, 24 p. 2013.

RIBEIRO, A. S.; BRONDANI, G. E.; TORMEM, G. C. R.; FIGUEIREDO, A. J. R. Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação. **Nativa**, Sinop, v. 4, n. 1, p. 15-18, 2016.

ROUT, G. R.; DAS, P. Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of 3 species of bamboo. **Plant cell reports**, v. 13, n. 12, p. 683-686, 1994.

SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 2017.

SAXENA, S. *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 431-434, 1990.

SAXENA, S.; BHOJWANI, S. S. *In vitro* clonal multiplication of 4-year old plants of the bamboo, *Dendrocalamus longispatus* Kurz. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 29, p. 135–142, 1993.

SAXENA, S.; DHAWAN, V. Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 438-443, 1999.

SCHEIDT, G. N.; ARAKAKI, A. H.; CHIMILOVSKI, J. S.; PORTELLA, A. C. F.; SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; BIASI, L. A.; SOCCOL, C. R. Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merril. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n.esp, p. 37–43, 2009.

SHIRASUNA, R. T. Guadua. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB106301>> Acesso em: Set/2016.

SILVA, R. M. C. 2005. **O bambu no Brasil e no mundo**. Disponível <http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo.pdf> Acesso: Jan/2017.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G.; Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

SILVA R. C.; LUIS, Z. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineenses* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 11, p. 59-67, 2012.

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**. v. 21, p. 220-228, 2011.

SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Seasonal influences on *in vitro* bud break in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale shoot multiplication and plantlet regeneration. **Indian Journal Plant Physiology**, v. 17, p. 9-21, 2012a.

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**, v. 21, n. 2, p. 220-228, 2012b.

SINGH, S. R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo – a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 2013.

SOMASHEKAR, P. V.; RATHORE, T. S.; FATIMA, T. *In vitro* plant regeneration of *dendrocalamus stocksii* (Munro) M. Kumar, Remesh & Unnikrisnan, through somatic embryogenesis. **American Journal of Plant Sciences**. v. 9, p. 2429-2445, 2018. DOI: 10.4236/ajps.2018.912176.

SOOD, A.; AHUJA, P. S.; SHARMA, M.; SHARMA, O. P.; GODBOLE, S. *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 71, p. 55-63, 2002.

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**, v. 53, p. 117-137, 2015.

SOUZA, A.P.C.C. **Bambu na habitação de interesse social no Brasil. Cadernos de Arquitetura e Urbanismo**, v. 11, n. 12, p. 217-245, 2004.

SOUZA, V. Q.; PEREIRA, A. S.; KOPP, M. M.; COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F.; LUZ, V. K.; OLIDEIRA, A. C. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantina**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 569-575, 2005.

STAPLETON, C. **Bamboo Identification**. 2014. Disponível em: <<http://bambooidentification.com.uk/index.html>>. Acesso em dezembro 2016.

STEWART, F. C.; MAPES M. O.; MEARS K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in culture grown freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.

SUNGKAEW S.; STAPLETON C. M. A.; SALAMIN N.; HODKINSON T. R. N. On monophyly of the Woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-generegion phylogenetic analysis of Bambusoideaes. **Journal Plant Research**, v. 122, p. 95-108, 2009.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotechnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, p. 36-41, 2002.

TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. C.; MELO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 39 p., 2004. (Documentos, 121).

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

TEIXEIRA, J. B.; CID, L. P. B. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. edição, Embrapa Informação Tecnológica: Brasília – DF, p. 159-178, 2014.

TEIXEIRA, D. E.; BASTOS, R. P.; ALMEIDA, S. A. O. Characterization of glued laminated panels produced with strips of bamboo (*Guadua magna*) native from the Brazilian Cerrado. **CERNE**, v. 21, n. 4, p. 595-600, 2015.

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**, v. 18, v. 2, p. 105-114, 2012.

TSAY, H. S.; YEH, C. C.; HSU, J. Y. Embryogenesis and plant regeneration from another culture of bamboo (*Sinocalamus latiflora* (Munro) McClure). **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 349–351, 1990.

UCHENDU, E. E.; PALIYATH, G.; BROWN, D. C. W.; SAXENA, P. K. *In vitro* propagation of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 710-718, 2011.

VALE, P. A. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. B.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Height and number of shoots on the survival and development of micropropagated bamboo plantlets during pre-acclimatization. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.

VANISREE, M.; LEE, C. Y.; LO, S. F.; NALAWADE, S. M.; LIN, C. Y.; TSAY, H. S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v. 45, p. 1-22, 2004.

VENGALA, J.; JAGADEESH, H. N.; PANDEY, C. N. Development of bamboo structure in Índia. In: Xiao, Y.; Inoue, M.; Paudel, S.K. (Eds.) **Modern bamboo structures**. London: Taylor & Francis Group, p. 51-63, 2008.

VERDEIL, J. L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plants temcells: dependence versus autonomy? **Plant Science Conferences**, v. 12, p. 245-252, 2007. DOI:10.1016/j.tplants.2007.04.002

WAIKHOM, S. D.; LOUIS, B. An effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melacanna baccifera*) through nodal culture. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p.1-8, 2014.

WEI, Q.; CAO, J.; QIAN, W.; XU, M.; LI, Z.; DING, Y. Establishment of an efficient micropropagation and callus regeneration system from the axillary buds of *Bambusa ventricosa*. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, DOI: 10.1007/s11240-015-0743-1, 2015.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

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**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzymology**, v.395, p. 134-44, 2005.

WOODS, S. H.; PHILLIPS, G. C.; WOODS, J. E.; COLLINS, G. B. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo explants in Mexican weeping bamboo, *Otatea acuminata aztecorum*. **Plant Cell Reports**. v. 11, p. 257-261.

YASHODA, R.; KAMALA, S.; KUMAR, A. S. P.; KUMAR, P. D.; KALAIARASI, K. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 109-113, 2008.

YEASMIN, L.; NASIM, Md.; GANTAIT, S.; CHAKRABORTY, S. Bamboo: An overview on its genetic diversity and characterization. **Journal Biotechnology**, v. 5, p. 1-11, 2015.

YUAN, J. L.; YUE, J. J.; WU, X. L.; GU, X. P. Protocol for callus induction and somatic embryogenesis in Moso Bamboo. **PLoS ONE**. v. 8, n. 12, e81954, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0081954.

ZANG, Q.; ZHOU, L.; ZHUGE, F.; YANG, H.; WANG, X.; LIN, X. Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. **Springer Plus**. v. 5, e1799, 2016a. DOI 10.1186/s40064-016-3520-7.

ZANG, Q.; JIAO, Y.; GUO, X.; ZHUGE, F.; YEH, K.; LIN, X.; Callus induction and plant regeneration from lateral shoots of herbaceous bamboo *Mniochloa abersend*. **Horticultural, Science & Biotechnology**. e14620316, 2016b. DOI: 10.1080/14620316.2016.1232610.

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**, v. 9, n. 45, p. 7710-7717, 2010.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183, 1994.

ZHAO-HUA, L.; KABAYASHI, M. Plantation future of bamboo in China. **Journal of Forestry Research**, v. 15, n. 3, p. 233-242, 2004.

Capítulo 1

Calogênese e estabelecimento de cultivos celulares em suspensão de *Guadua magna* (Londoño & Filg.)

RESUMO

Bambus são plantas monocárpicas, de florescimento imprevisível e baixa viabilidade de sementes, o que dificulta a proliferação de populações em ambientes naturais e a propagação convencional. Adicionalmente, a propagação vegetativa é difícil em razão do volume dos propágulos e dos baixos índices de enraizamento. Nesse sentido, técnicas da cultura de tecidos de plantas podem suprir a demanda crescente de mudas em razão das vantagens que apresentam. O objetivo deste trabalho foi induzir a calogênese e o estabelecimento de cultivos celulares em suspensão de *Guadua magna*, espécie nativa do Centro-Oeste brasileiro. Para tanto, segmentos nodais, internodais e bainhas foliares de plantas estabelecidas *in vitro* foram cultivados em meio de cultura de MS, suplementado com caseína hidrolisada (500 mg.L⁻¹), glutamina e cisteína (100 mg.L⁻¹), além de dicamba, 2,4-D e picloram nas concentrações de 0; 6,77; 13,54; 20,31 e 27,08 µM. Após 60 dias de cultivo, 200 mg.L⁻¹ de massa fresca dos calos formados foram inoculadas em Erlenmeyer (125 mL de capacidade) contendo 20 mL de meio de MS líquido, suplementado com caseína hidrolisada, glutamina, prolina e cisteína (100 mg.L⁻¹) e 4,44 µM de dicamba, 2,4-D e picloram, onde foram avaliadas quatro diferentes origens de indução de calos: 13,54 µM de dicamba (T1); 13,54 µM de 2,4-D (T2); 13,54 µM de picloram, e 20,31 µM de picloram (T4). Verificou-se que todos os tratamentos apresentaram formação de calos de coloração branco-amarelada e de aspecto mucilaginoso. As maiores percentagens médias de formação de calos foram obtidas nas concentrações 20,31 µM (88,0 %), 13,54 µM (85,3 %) e 27,08 µM (74,7 %). As concentrações de 6,77 µM e 20,31 µM foram as que exibiram as menores percentagens de oxidação (4 %) e ainda o maior incremento de massa fresca de calo foi verificado em 13,54 µM de picloram (402,5 mg). Quanto aos cultivos celulares em suspensão, após seis subculturas de 30 dias cada, o incremento da massa fresca (2.723,1 mg e 2.108,4 mg) e massa seca (378,5 mg e 296,5 mg) foram estatisticamente superiores nos tratamentos T3 e T4, respectivamente; e apresentaram ainda índices de estabelecimento substancialmente melhores já na primeira subcultura (100 % e 83,3 %, respectivamente). A partir de análise citoquímica, os cultivos em T3 e T4 apresentaram maior aglomerado de células avermelhadas, o que as qualifica como positivas quanto à viabilidade embriogênica, conferindo a esses tratamentos as melhores condições de cultivo para tal finalidade.

Palavras-chave: *Poaceae*, *Bambusoidae*, bambu, morfogênese, cultura de suspensão celular, viabilidade embriogênica.

ABSTRACT

Bamboos are monocarpous plants, with unpredictable flowering and low seed viability, which hinders the proliferation of populations in natural environments and conventional propagation. Additionally, vegetative propagation is difficult due to the volume of the propagules and the low rates of rooting. In this sense, plant tissue culture techniques can meet the growing demand for seedlings due to the advantages they present. The objective of this work was to induce callogenesis and the establishment of suspension cell cultures of *Guadua magna*, a native specie of economic and socio-environmental importance from the Midwest Region of Brazil. For this purpose, nodal segments, internodal segments and leaves sheaths of plants *in vitro* established were grown in MS medium, supplemented with hydrolyzed casein (500 mg.L⁻¹), glutamine and cysteine (100 mg.L⁻¹), and dicamba, 2,4-D and picloram at concentrations of 0; 6.77; 13.54; 20.31 and 27.08 µM. After 60 days of cultivation, 200 mg.L⁻¹ of fresh mass of the calli formed were inoculated into Erlenmeyer (125 mL) containing 20 mL of liquid MS medium, supplemented with hydrolyzed casein, glutamine, proline and cysteine (100 mg.L⁻¹) and 4.44 µM of dicamba, 2,4-D and picloram, in which four different calli induction origins were evaluated: 13.54 µM of dicamba (T1), 13.54 µM of 2,4-D (T2), 13.54 µM of picloram, and 20.31 µM of picloram (T4). It was found that treatments showed yellowish-white calli and mucilaginous appearance. The highest average percentages of calli formation were obtained at concentrations of 20.31 µM (88.0 %), 13.54 µM (85.3 %) and 27.08 µM (74.7 %). The concentrations of 6.77 µM and 20.31 µM were the ones that exhibited the lowest percentages of oxidation (4 %) and the largest increase in fresh mass of calli was found in 13.54 µM of picloram (402.5 mg). As for suspension cell cultures, after six subcultures of 30 days each, the increase of fresh mass (2,723.1 mg and 2,108.4 mg) and dry mass (378.5 mg and 296.5 mg) were statistically higher in treatments T3 and T4, respectively; and they also showed substantially better rates of establishment in the first subculture (100 % and 83.3 %, respectively). From cytochemical analysis, the cultures in T3 and T4 showed a greater cluster of reddish cells, which qualifies them as positive in terms of embryogenic viability, giving to these treatments the best culture conditions for this purpose.

Keywords: *Poaceae*, *Bambusoidae*, bamboo, morphogenesis, suspension cell cultures, embryogenic viability.

1. INTRODUÇÃO

O bambu é uma planta de hábito arborescente que pertence à família *Poaceae* (*Gramineae*), subfamília *Bambusoideae*. Plantas de bambu caracterizam-se por apresentarem florescimento em intervalos geralmente longos de tempo, além de conterem bainha foliar protegendo as gemas axilares, colmos lignificados e rizomas subterrâneos compostos de nós e entrenós (Zhao-Hua e Kakayashi, 2004; Ghavamie Marinho; Silva, 2005).

O Brasil é um dos principais centros de biodiversidade e de grau de endemismo de espécies de bambus nas Américas (Bystriakova et al., 2004). A maioria das espécies ocorrem principalmente nos biomas Mata Atlântica e Amazônia (Bystriakova et al. 2004; Filgueiras e Santos Gonçalves, 2004; Greco et al., 2015). Dentre as espécies encontradas no território brasileiro, a *Guadua magna* (Londoño e Filg.), endêmica do Cerrado, apresenta hábito simpodial formando touceiras densas, com importância econômica e socioambiental para a região (Filgueiras e Londoño, 2006; Arruda et al.; Filgueiras e Londoño, 2011; Shirasuna, 2013).

Devido a desordenada exploração, aliada à fragmentação e perda de ambientes naturais do bioma Cerrado, tem sido observado iminente declínio de populações dessa espécie, o que coloca em risco sua existência (Filgueiras e Londoño, 2011). Além do mais, assim como para a maioria das outras, essa espécie apresenta florescimento imprevisível e baixa viabilidade de sementes, o que dificulta a proliferação de populações em ambientes naturais e torna inviável a produção de mudas via seminal (Mizuki et al., 2014; Guo et al., 2017; Nogueira, 2018).

A propagação vegetativa a partir de diferentes técnicas convencionais, entre as quais desmembramento de touceiras e a estaquia (Gielis et al., 2001; Gallardo et al., 2008; Islan et al., 2011), são práticas que se caracterizam por serem dispendiosas e exigentes em mão de obra em razão principalmente do volume dos propágulos e dos baixos índices de enraizamento e pegamento (Sood et al., 2002; Ramanayake et al., 2006; Singh et al., 2013).

Com os avanços na área da biotecnologia, a cultura de tecidos de plantas tem sido relatada como uma ferramenta alternativa aos métodos convencionais de propagação. A técnica pode maximizar a qualidade e o rendimento de cultivos de espécies, especialmente as de propagação vegetativa, além de permitir a conservação de recursos genéticos vegetais em bancos de germoplasma *in vitro* (Reed et al., 2011; Singh et al., 2013; Nogueira et al., 2018).

Em bambu, a cultura de tecidos a partir da micropropagação convencional já está bem referenciada na literatura para um bom número de espécies (Singh et al., 2012a; Waikham e Louis, 2014; Bakshi et al., 2015; Bhadrawale et al., 2017; Furlan et al., 2018; Nauhayani et al., 2018; Nogueira et al., 2019; Ornellas et al., 2019; Pasqualini et al., 2019; Vale et al., 2019). No entanto, trabalhos referentes à calogênese e cultura de células, técnicas capazes de proporcionar aumentos consideráveis na produção racional de mudas, são praticamente inexistentes ou raros na literatura.

Os poucos trabalhos relatados para a obtenção de suspensões celulares em bambus são relacionados principalmente ao isolamento de protoplastos (Huang et al., 1989; Hisamoto e Kobayashi 2010) e extração de metabólitos secundários (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003; Ogita, 2005; Liu et al., 2006; Kuo et al., 2009; Nomura et al., 2013). Outros estudos envolvem a determinação de hormônios endógenos (Akker et al., 2015), multiplicação *in vitro* (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003) e transformação genética (Douglas et al., 1985; Ogita et al., 2011; Ogita et al., 2012). É certo, no entanto, que pouca informação e aprofundamento está disponível até o momento sobre cultivos celulares em bambu.

Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi induzir a calogênese e estabelecer cultivos celulares em suspensão de *Guadua magna* (Londoño & Filg.). Adicionalmente, análises morfoanatômicas, histoquímicas e citoquímicas foram realizadas para compreender o comportamento celular durante as diferentes etapas do processo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

2.2. Material vegetal

As plantas de *Guadua magna* utilizadas para instalação dos experimentos 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. Deste material, segmentos nodais foram estabelecidos *in vitro*, conforme protocolo de desinfestação de Nogueira (2018).

Inicialmente, as plantas de *G. magna* foram multiplicadas *in vitro* em frascos de vidro transparente de 650 mL, contendo 70 mL de meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 3,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e sem adição de agente gelificante, ao longo de até cinco subcultivos de 60 dias cada, ou até que se obtivesse material suficiente para instalação dos experimentos. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas com luminosidade de 100 μmol m⁻² s⁻¹. Depois de multiplicadas, as plantas foram transferidas para novo meio de cultura, sem adição de fitorregulares (meio padrão), havendo três renovações do meio a cada 30 dias.

Para realização dos experimentos foram submetidos à calogênese explantes formados por segmentos nodais contendo gema axilar dormente (Figura 1 A), segmentos internodais (Figura 1 B) e bainhas foliares (Figura 1 C) das plantas de *G. magna* cultivadas *in vitro* em meio padrão.



Figura 1. Explantes utilizados para a calogênese de *Guadua magna*. (A) Segmento nodal, (B) segmento internodal e (C) bainha foliar.

2.3. Calogênese

2.3.1 Indução da calogênese

Os explantes foram inoculadas em meio de cultura de MS suplementado com sacarose (30 mg.L^{-1}), caseína hidrolisada (500 mg.L^{-1}), glutamina e cisteína (100 mg.L^{-1}) e phytigel ($2,2 \text{ g.L}^{-1}$). A este meio foram acrescentadas três auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5,5-tricloropicolínico (picloram) e o ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico (dicamba) nas concentrações de 0; 6,77; 13,54; 20,31 e $27,08 \mu\text{M}$.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial ($3 \times 3 \times 5$), onde foram avaliados os três explantes, nas três auxinas em cinco concentrações distintas. Para tanto, foram utilizadas cinco repetições compostas por cinco explantes por parcela. Cada repetição foi composta por uma placa de Petri ($15 \times 90 \text{ mm}$), contendo 20 mL do meio de cultura semi-sólido. Após 60 dias de cultivo foram avaliadas as taxas de formação de calos ($\geq 4 \text{ mm}$) e de oxidação (escurecimento total do material), bem como a massa fresca (mg).

2.3.2 Multiplicação dos calos

Os calos obtidos ($\geq 4 \text{ mm}$) de cada tratamento da fase de indução da calogênese foram isolados e multiplicados em meio de cultura de MS de igual composição dos meios de indução de calos, mas suplementados com BAP ($0,44 \mu\text{M}$).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial ($3 \times 3 \times 5$), onde foram avaliados os três explantes, nas três auxinas em cinco concentrações distintas, mas suplementados com BAP ($0,44 \mu\text{M}$). Para tanto, foram utilizadas cinco repetições compostas por cinco explantes por repetição. Cada repetição foi composta

por uma placa de Petri (15 x 90 mm), contendo 20 mL do meio de cultura e cinco explantes por parcela. Aos 60 dias de cultivo foram avaliadas a taxa de oxidação e a massa fresca de calos.

2.3.3 *Regeneração*

Após 60 dias, os calos oriundos da multiplicação (≥ 4 mm) foram submetidos à fase de regeneração testando-se dois tratamentos, T1- metade dos sais de MS, mas vitaminas na sua concentração completa; e T2- MS suplementado de 2,68 μ M de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 12,32 μ M de BAP. Os meios de cultura de ambos tratamentos foram suplementados de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 2,2 g de phytigel.

Em cada placa de Petri (15 x 90 mm) contendo 20 mL do meio de cultura semi-sólido, foram cultivados cinco calos, que permaneceram sob essas condições até os 180 dias, com a finalidade de uma possível descrição das alterações morfogênicas do material em regeneração.

2.4 **Caracterização anatômica e histoquímica dos calos**

Para análises anatômicas, foram coletadas amostras dos explantes segmentos nodais e bainhas foliares aos 60 dias de indução da calogênese. Posteriormente, amostras também foram coletadas das fases de multiplicação dos calos aos 60 dias e de regeneração aos 30, 60, 90, 120 e 180 dias. Os segmentos internodais não foram analisados por insuficiência de material.

As amostras foram fixadas em solução de formaldeído e glutaraldeído (Karnovsky, 1965) modificado (glutaraldeído 1 %; paraformaldeído 4 % em tampão fostato de sódio - NaH₂PO₄.H₂O e tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2) e submetidas a vácuo (-400 mmHg) por 60 minutos, onde permaneceram por 24 h na solução.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas por meio de série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 e 100 %, v/v) e submetidas a vácuo (-400 mmHg) por 60 minutos cada. Em seguida, as amostras foram imersas em meio de infiltração Historesina (Leica®), segundo as especificações do fabricante. As amostras foram então emblocadas em Historesina (hidroxietil metacrilato) com endurecedor, conforme

recomendação do fabricante, e permaneceram por no mínimo 48 horas em estufa à temperatura de 60 °C.

Os blocos contendo as amostras foram seccionados à 5-7 µm de espessura com o uso de micrótomo rotativo manual (Leica[®], RM212RT) e posteriormente, as secções obtidas foram distendidas e aderidas às lâminas microscópicas em placa aquecedora à 40 °C.

Para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos, as secções obtidas foram coradas com azul de Toluidina (0,5 %, v/v) em tampão fostato de sódio e ácido cítrico (Sakai, 1973) durante seis minutos.

As secções também foram submetidas aos testes histoquímicos com *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para visualização de proteínas (Vidal, 1970), com *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'Brien e McCully, 1981) para identificar polissacarídeos neutros e com Lugol (Johansen, 1940) para detecção de grãos de amido. As lâminas histológicas foram montadas com lamínulas e preservadas em resina sintética (Entelan[®]), posteriormente foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz Leica (DM 750) e programa Leica Application Suite (LAS EZ), sendo as imagens capturadas em escala micrométrica.

2.5 Cultivos celulares em suspensão

2.5.1 Estabelecimento da suspensão celular

Para os cultivos celulares em suspensão, nova indução da calogênese foi realizada a partir de segmentos nodais, conforme ilustrado na Figura 2. Após 60 dias de indução, foram selecionados aproximadamente 200 mg.L⁻¹ de massa fresca de calos dos tratamentos: (1) 13,54 µM de dicamba, (2) 13,54 µM de 2,4-D, (3) 13,54 µM de picloram e (4) 20,31 µM de picloram, ou seja, os tratamentos que deram origem aos calos na fase de indução da calogênese em *G. magna*.

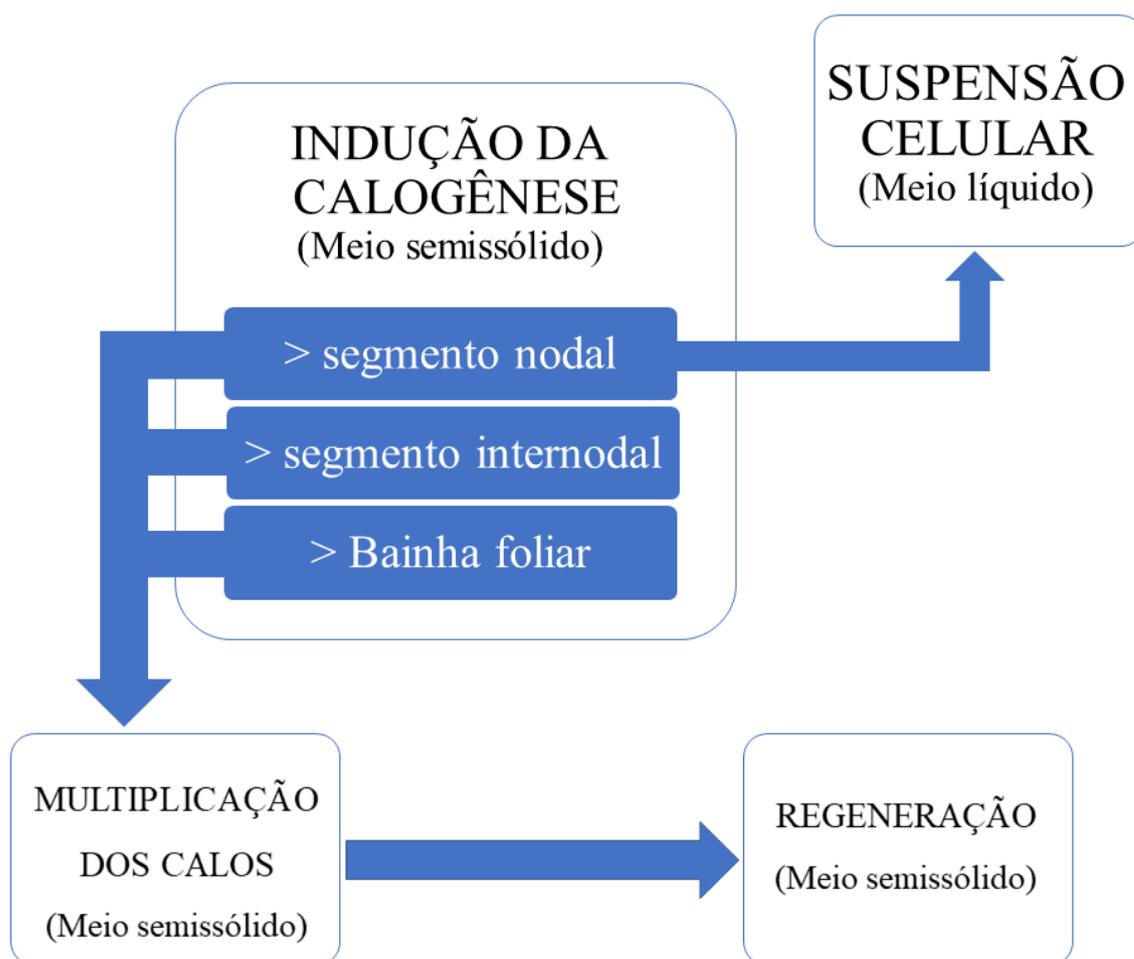


Figura 2. Diagrama da indução, multiplicação e regeneração de *Guadua magna*, bem como o estabelecimento de suspensão celulares.

Os calos formados foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL), contendo 20 mL de meio de MS líquido, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, além dos aminoácidos caseína hidrolisada, glutamina, prolina e cisteína (100 mg.L⁻¹) (adaptado de Ogita et al., 2005).

Após 30 dias de cultivo, o material foi filtrado em peneira de metal de 100 µm para eliminar as formações maiores e, com auxílio de uma micropipeta graduada automática 10 mL da cultura celular foi ressuspensa em frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo novo meio nutritivo suplementado de 4,44 µM das auxinas de origem (dicamba, 2,4-D ou picloram), completando o volume para 20 mL.

Então, as quatro diferentes origens de formação de calos (13,54 µM de dicamba, 13,54 µM de 2,4-D, 13,54 µM de picloram ou 20,31 µM de picloram) foram avaliadas para estabelecimento e multiplicação da suspensão celular (Figura 3).

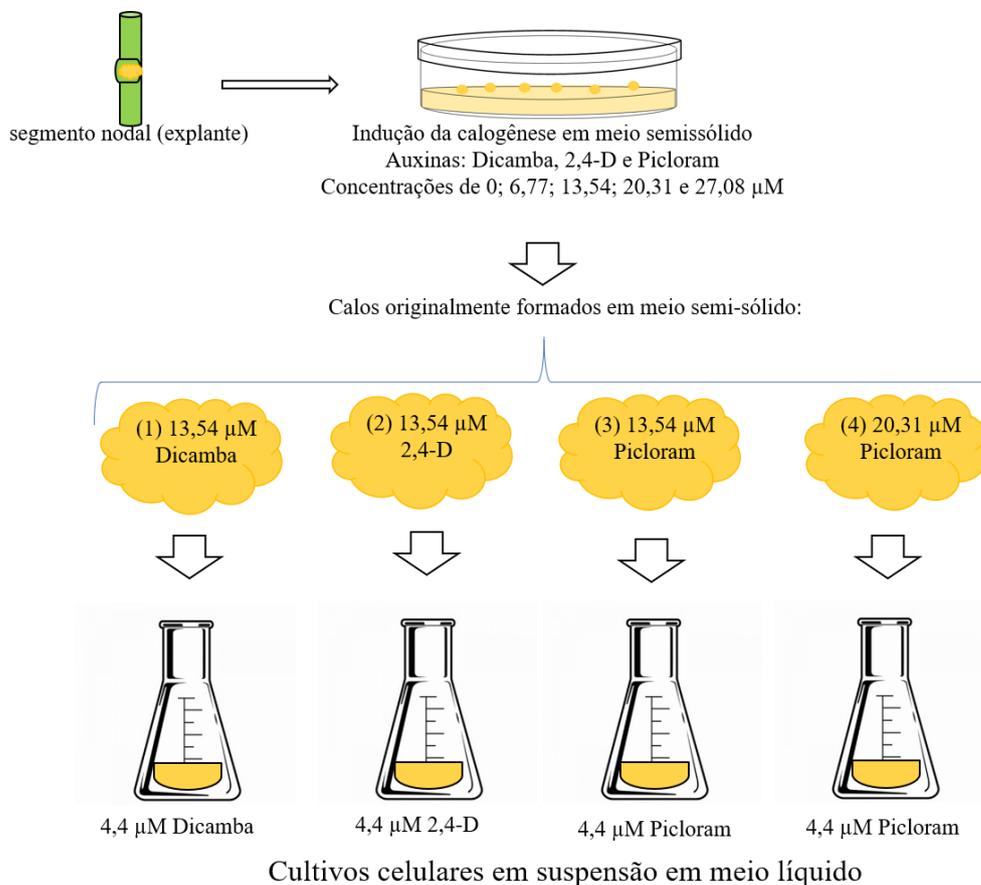


Figura 3. Esquema ilustrativo das etapas de indução da calogênese para o estabelecimento e multiplicação de cultivos celulares em suspensão.

O material foi mantido em agitador orbital a 100 rpm ao longo de seis meses, havendo renovação do meio nutritivo a cada 30 dias mantendo-se a mesma composição. Foram consideradas suspensões celulares estabelecidas, quando essas atingiam ao menos 20 mg.L^{-1} de massa fresca por frasco.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (6×4), onde foram testadas seis tempos de cultivo (seis meses) e quatro origens de indução de calos. Cada tratamento foi composto de doze unidades experimentais compostas por um Erlenmeyer contendo 200 mg.L^{-1} de massa fresca de calo.

Quanto à determinação da curva de crescimento dos cultivos, foram averiguadas a massa fresca e seca a cada 30 dias de cultivo, período de renovação do meio nutritivo, durante as seis subculturas, da seguinte forma:

(1) Massa fresca: cada frasco foi homogeneizado manualmente. Em seguida, foram retirados 2 mL dos cultivos celulares em suspensão com o auxílio de uma pipeta automática, que foram transferidos para microtubos de 2 mL de capacidade. Esses microtubos foram submetidos à centrifugação à 14.000 rpm por 20 minutos, quando então coletou-se cuidadosamente 1 mL do sobrenadante líquido. Em seguida, os microtubos foram novamente submetidos à centrifugação e, depois, retirados cuidadosamente os sobrenadantes da fase líquida, deixando um *pellet* de massa fresca (mg) que foi mensurado por balança analítica de precisão.

(2) Massa seca: os microtubos contendo a massa fresca dos cultivos celulares em suspensão foram armazenados em estufa à 50 °C até a obtenção da massa. Após esse período, a massa seca (mg) foi mensurada com o auxílio de uma balança analítica de precisão.

2.5.2 *Análise citoquímica*

A análise citoquímica dos cultivos celulares em suspensão foi realizada com o auxílio de Carmim acético e azul de Evans para confirmação da presença de células embriogênicas nos cultivos celulares em suspensão. Para tanto, alíquotas de 5 µL da fase líquida da suspensão celular foram coletadas dos frascos de cultivo, sendo adicionadas de uma a três gotas de corante azul de Evans (0,1 %) (peso/volume) por dois a três minutos em uma lâmina (Durzan, 1988).

Após esse período, foi retirado o excesso do azul de Evans e adicionado de uma a três gotas de corante Carmim acético (2 %) (peso/volume) pelo mesmo período de tempo. Logo depois, o excesso do corante foi retirado, adicionando-se, em seguida, de uma a duas gotas de glicina. As amostras foram, então, cobertas por lamínula, submetendo as lâminas prontas à leves batidas com um bastão de vidro para espalhamento do material. A seguir, as amostras foram visualizadas e fotografadas em microscópio de luz.

2.6 Condições de cultivo

Para todas as etapas de cultivo *in vitro* descritas anteriormente, o meio de cultura de MS teve pH ajustado para $5,8 \pm 0,5$ com HCl (0,1 M) e/ou NaOH (0,1 M) e autoclavado a temperatura de 121 °C ($\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$) durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em condições de sala de crescimento sem luminosidade e com a temperatura mantida em $25 \text{ °C} \pm$

2 °C, exceção feita para o experimento de regeneração (item 2.3.3) que foi conduzido com fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.7 Análise dos dados

Os dados dos experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Shapiro-Wilk ($P < 0,05$), a fim de verificar a homogeneidade de variância entre os tratamentos e a distribuição normal dos dados, respectivamente. Em seguida, foram realizadas análises de variância (ANOVA) e, de acordo com a significância, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os pacotes do programa R (R Development Core Team, 2012) foram utilizados para a análise estatística dos dados. As análises histológicas, histoquímicas e citoquímicas foram caracterizadas por análise descritiva.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução da calogênese

Ao final de 60 dias verificou-se que todos os tratamentos apresentaram formação de calos. No entanto, os segmentos nodais foram os explantes mais responsivos, independentemente da auxina testada. Em contrapartida, os explantes internodais foram os que apresentaram menores taxas de formação de calos (< 16 %), independentemente do tipo de auxina e concentrações testadas (Tabelas 1 e 2).

As maiores taxas médias de formação de calos, quando se utilizou segmentos nodais, foram verificadas nas concentrações de 20,31 μM (88,0 %), 13,54 μM (85,3 %) e 27,08 μM (74,7 %), independentemente da auxina testada (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento na indução de calos a partir de explantes de *Guadua magna*, após 60 dias de cultivo.

Concentração μM	Explante		
	Segmento nodal	Segmento internodal	Bainha foliar
	Formação de calos (%)		
0	0,0 \pm 0,0 cA	0,0 \pm 0,0 aA	1,3 \pm 1,3 cA
6,77	57,3 \pm 11,2 bA	5,3 \pm 2,4 aB	10,7 \pm 6,1 bcB
13,54	85,3 \pm 8,2 aA	10,7 \pm 3,6 aC	32,0 \pm 10,3 aB
20,31	88,0 \pm 5,8 aA	13,3 \pm 3,7 aC	46,7 \pm 9,5 aB
27,08	74,7 \pm 9,2 abA	16,0 \pm 4,9 aC	37,3 \pm 8,3 aB

Médias \pm erro padrão com letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Ao observar os resultados referentes às auxinas testadas, verificou-se que o picloram proporcionou as maiores percentagens de formação de calo para segmento nodal (74,4 %), seguido de bainha foliar (43,2 %) e segmento internodal (15,2 %) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na indução de calos a partir de *Guadua magna*, após 60 dias de cultivo.

Auxinas	Explante		
	Segmento nodal	Segmento internodal	Bainha foliar
Dicamba	66,4 \pm 9,1 aA	7,2 \pm 2,3 aB	16,8 \pm 6,0 bB
2,4-D	42,4 \pm 9,0 bA	4,8 \pm 1,8 aB	16,8 \pm 5,1 bB
Picloram	74,4 \pm 8,0 aA	15,2 \pm 4,0 aC	43,2 \pm 8,1 aB

Médias \pm erro padrão com letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

O incremento na produção de calos proporcionada pelo uso da auxina picloram pode ser atribuída à efetividade na sua absorção e mobilização, bem como o efeito da interação de

sinais em sítios específicos pela ação dessa auxina, que facilitam o transporte de componentes durante as reações do metabolismo celular (Karun et al., 2004; Cardoso, 2018). Estudos iniciais sobre organogênese em bambus também demonstraram a superioridade da auxina picloram para indução da calogênese em *Bambusa multiplex* e *Phyllostachys aurea* (Huang et al., 1989), corroborando os resultados encontrados neste trabalho. Adicionalmente, Ogita (2005) encontrou formação abundante de calos organogênicos em *Phyllostachys nigra* a partir de meios contendo 2,4-D ou picloram.

A avaliação quanto à percentagem média de explantes oxidados (totalmente escurecidos) foi realizada aos 60 dias após a inoculação em meio de indução. Exibiu menores percentagens de oxidação, o explante segmento nodal nas concentrações com 6,77 μM e 20,31 μM (4 %) de picloram (Tabela 3).

Alguns tratamentos parecem não serem recomendados para a indução da calogênese em *G. magna*, pois exibiram elevada oxidação dos explantes, como por exemplo, quando se usou segmentos internodais com 27,08 μM de dicamba que atingiu 80 % (Tabela 3).

Para a indução da calogênese em segmentos nodais de *G. magna*, os tratamentos 2,4-D na concentração 27,08 μM e/ou picloram na concentração 20,31 μM , apresentaram menores taxas de oxidação, 8 % e 4 % respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Percentagem (%) média da oxidação de calos (> 4 mm) no processo de indução da calogênese em *Guadua magna* em função de diferentes auxinas, concentrações e explantes utilizados.

Explante	Concentração μM	Auxinas		
		Dicamba	2,4-D	Picloram
<i>Segmento nodal</i>	0	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA
	6,77	60,0 \pm 19,4 aA	6,67 \pm 6,7 aB	4,0 \pm 4,0 aB
	13,54	6,7 \pm 6,7 aB	56,0 \pm 17,2 aA	39,0 \pm 16,1 aAB
	20,31	26,0 \pm 16,6 aA	25,0 \pm 14,7 aA	4,0 \pm 4,0 aA
	27,08	18,0 \pm 11,1bA	8,0 \pm 4,9 aA	29,67 \pm 8,5 aA
<i>Segmento internodal</i>	0	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA
	6,77	0,0 \pm 0,0 bA	20,0 \pm 20,0 aB	20,0 \pm 8,9 bcB
	13,54	10,0 \pm 10,0 aA	20,0 \pm 20,0 aC	50,0 \pm 10,0 aB
	20,31	40,0 \pm 24,5 aA	20,0 \pm 20,0 aC	40,0 \pm 8,4 aB
	27,08	80,0 \pm 20,0 aA	0,0 \pm 0,0 aC	23,0 \pm 6,1 aB
<i>Bainha foliar</i>	0	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA
	6,77	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	23,0 \pm 13,7 bcB
	13,54	12,0 \pm 8,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	44,0 \pm 16,9 aB
	20,31	43,0 \pm 20,0 aA	15,67 \pm 6,7 aC	35,0 \pm 15,0 aB
	27,08	28,0 \pm 19,6 abA	30,67 \pm 18,4 aC	43,0 \pm 15,3 aB

Médias \pm erro padrão com letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Ao analisar o comportamento de todos os tratamentos, especialmente quanto às auxinas testadas, observamos que alguns reguladores de crescimento, principalmente em altas concentrações, podem promover a produção de compostos fenólicos que ocasionam modificações no meio de cultivo (Andrade et al., 2000).

Não exclusivamente, os explantes também apresentaram respostas distintas sobre a oxidação, indicando que devido ao processo de excisão dos tecidos inoculados *in vitro* para a fase de indução da calogênese, possivelmente liberam compostos fenólicos que podem ocasionar o escurecimento dos explantes (oxidação) e do meio nutritivo e, conseqüentemente, refletir na inibição do crescimento celular (Jones e Saxena, 2013; Ahmad et al., 2013).

Notoriamente, independentemente da auxina testada, calos oriundos de segmentos nodais apresentaram o maior incremento da massa fresca. Estatisticamente, os outros tratamentos não apresentaram padrão de crescimento da massa fresca de calos satisfatório (Tabela 4).

Ainda testando segmentos nodais, outras concentrações apresentaram resultados satisfatórios, tais como 20,31 μM e 27,08 μM para as auxinas dicamba (233,9 mg e 375,8 mg, respectivamente), 2,4-D (342,3 mg e 243,5 mg, respectivamente) e picloram (280,6 mg nas duas concentrações). Além do mais, as concentrações 6,77 μM de dicamba (235,9 mg) e de picloram (295,4 mg), também apresentaram bons resultados para a indução da calogênese em segmentos nodais (Tabela 4).

Tabela 4. Média da massa fresca (mg) dos calos (> 4 mm) aos 60 dias de indução da calogênese em *Guadua magna*, em função de diferentes auxinas, concentrações e explantes utilizados.

Explante	Concentração μM	Auxinas		
		Dicamba	2,4-D	Picloram
<i>Segmento nodal</i>	0	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA
	6,77	235,9 \pm 81,7 aA	16,8 \pm 16,8 aB	295,4 \pm 96,1 aA
	13,54	107,1 \pm 22,7 aB	221,8 \pm 92,4 aB	402,4 \pm 82,0 aA
	20,31	233,9 \pm 95,4 aA	342,3 \pm 52,1 aA	280,6 \pm 62,6 aA
	27,08	375,8 \pm 146,9 aA	243,5 \pm 101,4 aA	280,6 \pm 59,6 aA
<i>Segmento internodal</i>	0	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA
	6,77	0,0 \pm 0,0 bA	11,7 \pm 7,3 aA	12,3 \pm 7,5 bA
	13,54	21,0 \pm 21,0 aA	6,3 \pm 6,3 bA	41,3 \pm 18,1 bA
	20,31	18,1 \pm 11,1 bA	25,5 \pm 11,4 bA	41,6 \pm 18,2 bA
	27,08	36,4 \pm 4,8 bA	0,0 \pm 0,0 bA	116,3 \pm 64,5 bA
<i>Bainha foliar</i>	0	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA
	6,77	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA	29,7 \pm 15,6 bA
	13,54	23,1 \pm 20,4 aA	10,8 \pm 10,8 bA	32,5 \pm 19,5 bA
	20,31	55,1 \pm 22,8 bA	58,1 \pm 27,4 bA	61,5 \pm 22,5 bA
	27,08	101,8 \pm 63,1 bA	60,6 \pm 19,8 bA	87,2 \pm 25,4 bA

Médias \pm erro padrão com letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

No geral, o maior incremento de massa fresca de calo foi verificado na concentração 13,54 μM de picloram em segmentos nodais de *G. magna* (402,5 mg), comparando estatisticamente com as outras auxinas testadas dentro da mesma concentração.

Vale ressaltar que para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal vivo pode ser utilizado como explante. No entanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a pluripotência, o que permite, posteriormente, a diferenciação de tecidos organizados, a exemplo de órgãos completos como folhas e raízes (Grattapaglia e Machado, 1998; Mudoj et al., 2013; Singh et al., 2013; Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo, 2018).

Dessa maneira, as gemas axilares dos segmentos nodais de *G. magna* contêm tecido foliar imaturo e não lignificados, portanto, são mais competentes à formação de calos em função do grau de diferenciação desses tecidos (Mudoj et al., 2013; Singh et al., 2013).

Apesar de segmentos nodais não serem os explantes mais frequentemente utilizados para a calogênese em espécies de bambu, há uma considerável melhora nos índices de multiplicação, assim como reportado por Sood et al. (1994) para *Dendrocalamus hamiltonii*.

Adicionalmente, Obsuwan et al. (2019), verificaram valores ótimos de formação de calos em segmentos nodais *Thyrsostachys siamensis*, alcançando médias superiores a 90 %, tais calos apresentaram ainda, aspectos morfológicos nodulares e compactos.

Em termos morfológicos, verificou-se na fase de indução que todos os tratamentos apresentaram formação de calos com coloração branco-amarelada, de consistência mucilagínosa, de aspecto granular, de superfície rugosa e brilhosa (Figuras 4 A-B); exceto no tratamento controle (0 μM) e explante segmento internodal, onde a formação de calos foi praticamente nula.

Aos 60 dias de cultivo, os cortes anatômicos mostram uma predominância de células vacuoladas, pouco citoplasmáticas, com espaços intercelulares visíveis, características típicas de calo mucilaginoso. Porém, nas proximidades de alguns feixes vasculares, verificam-se algumas células com perfil meristemático, tanto do explante bainha foliar, quanto do segmento nodal (Figuras 4 C-F). Esses conjuntos celulares meristemáticos foram tipificados por apresentarem menor diâmetro, formato isodiamétrico, algumas células com núcleos volumosos evidentes, citoplasma denso, e em alguns pontos foram observados vacúolos fragmentados. Mais detalhadamente, também foram observadas proliferação celular em divisões periclinais, levando ao enfileiramento das células contíguas (Figura 4 F).

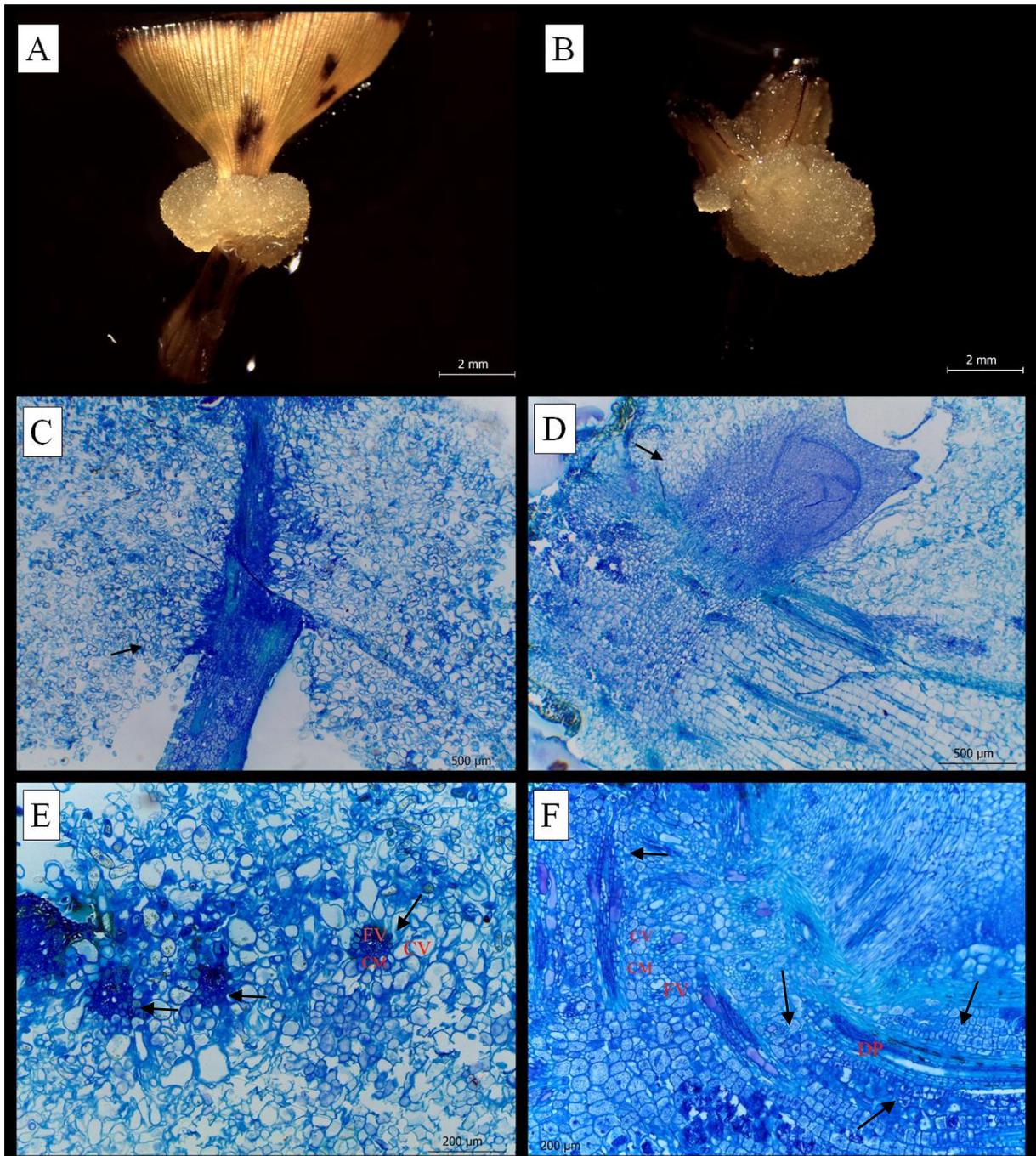


Figura 4. Caracterização morfoanatômica dos explantes na etapa de indução da calogênese de *Guadua magna*. Formação de calos (A) na bainha foliar e (B) no segmento nodal; (C-D) setas indicando rompimento de tecidos para crescimento de calo; (E-F) setas indicam divisões celulares. Abreviações: (FV) feixe vascular, (CM) células meristemáticas, (CV) células vacuoladas, (DP) conjuntos de células em divisão periclinal.

As divisões observadas na zona perivascular e a formação de calos nos explantes podem estar associadas, provavelmente, às altas concentrações dos reguladores de crescimento utilizados e a outros estresses inerentes ao cultivo *in vitro*, como por exemplo, o

próprio seccionamento dos explantes, os quais induzem a desdiferenciação celular e consequente, formação de calos (Steward, 1961; Bonga et al., 2016). Essa exposição, de acordo com Fehér et al. (2003), pode ser considerada como um fator favorável para o aumento da capacidade morfogênica.

Mais especificamente, foram observados alguns calos em crescimento em camadas superficiais de células do primórdio foliar da gema axilar no explante segmento nodal, resultando num inchamento irregular e rompimento dos tecidos nesta região (Figuras 4 C-D). Essas mesmas observações foram mencionadas por Huang *et al.* (1989) em *B. multiplex* e *P. aurea*.

A análise histoquímica durante o processo de indução da calogênese em *G. magna* evidenciou quantidades significativas de amiloplastos (grãos de amido) nos calos em crescimento a partir da bainha foliar (Figuras 5 A-F) e do segmento nodal (Figuras 6 A-F), principalmente no conjunto de células perivasculares e próximas aos centros em proliferação celular. Segundo Silva-Cardoso et al. (2018), a presença desses amiloplastos nos calos em crescimento, sugere a participação desse composto nos mecanismos de divisões celulares.

Foram observados presença de conspícuas reservas proteicas nas bainhas foliares (Figuras 5 G-I) e segmentos nodais (Figuras 6 G-I). Em ambos os explantes, tais conteúdos se aglomeravam em volta dos feixes vasculares ou em células adjacentes vacuoladas. As análises anatômicas e histoquímicas não foram realizadas nos segmentos internodais por indisponibilidade em quantidade suficiente de material.

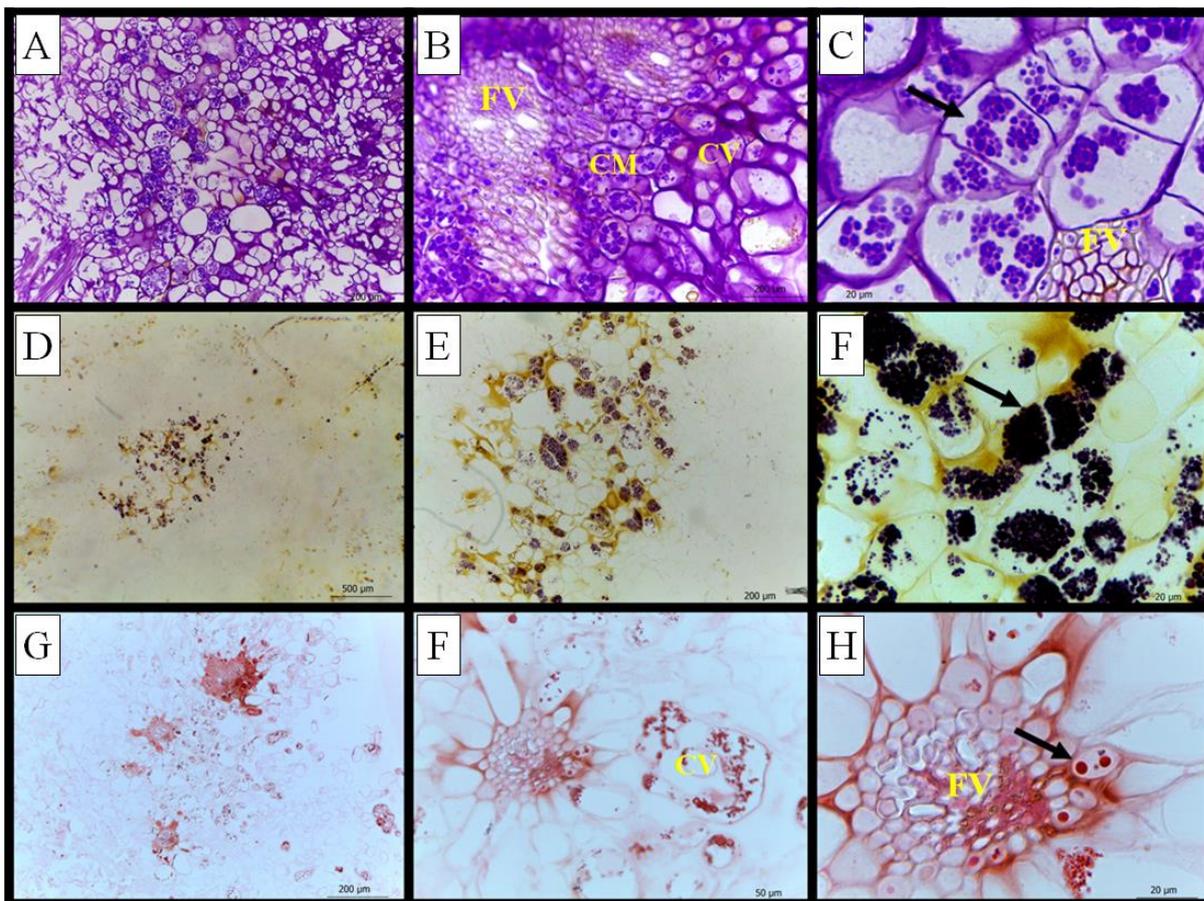


Figura 5. Caracterização histoquímica de calos oriundos de bainhas foliares de *Guadua magna* após 60 dias de cultivo em meio de indução da calogênese. (A-B) Grãos de amido identificados com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS, (C) seta indicando no detalhe, (D-E) e confirmados com corante Lugol (F) seta indicando no detalhe, (G-F) reservas proteicas identificadas com o corante *Xylidine Ponceau* - XP (I) seta indicando no detalhe. Abreviações: (FV) feixe vascular, (CM) células meristemáticas, (CV) células vacuoladas.

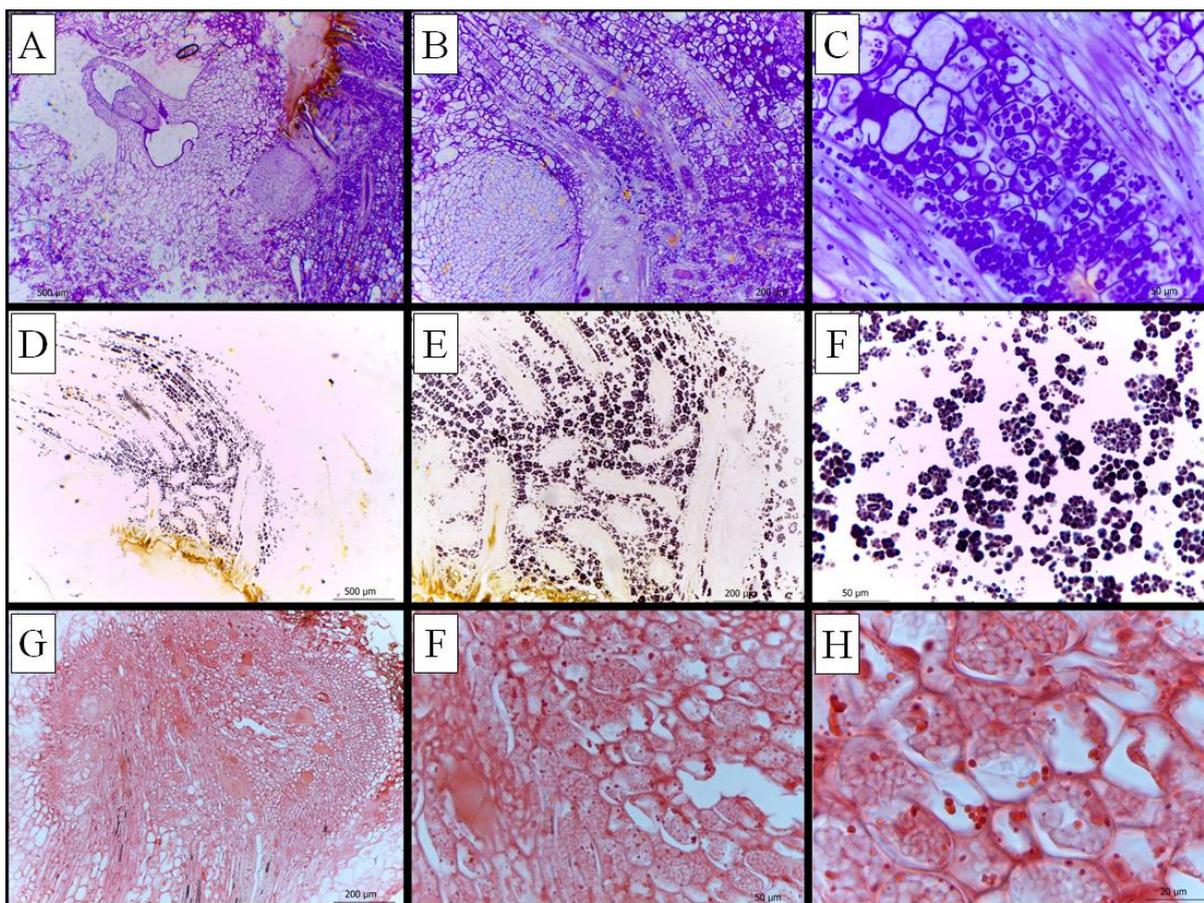


Figura 6. Caracterização histoquímica de calos oriundos do segmento nodal de *Guadua magna* após 60 dias de cultivo em meio de indução da calogênese. Grãos de amido identificados com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS (A-C) e confirmados com corante Lugol (D-F); reservas proteicas identificadas com o corante *Xylidine Ponceau* - XP (G-I).

Com base nos estudos anatômicos e histoquímicos realizados durante a indução da calogênese de *G. magna*, é perceptível o potencial morfogênico dos calos devido às características relacionadas às células em divisão envoltas dos feixes vasculares com perfil meristemático, e a presença de grãos de amido associada à essas células em particular.

Esse conjunto de divisões celulares nas adjacências do xilema e floema pertencentes ao cilindro vascular principal, provavelmente, retornam a um estado transitório de células (estado *stem cell-like*), as quais podem seguir, dependendo do estímulo aplicado, diferentes vias, inclusive, a rota de divisão celular (Yang et al., 2010; Sugimoto et al., 2011).

Como *stem cell* meristemáticas que naturalmente recrutam as células vasculares e na presença de reguladores de crescimento elas tendem a se multiplicar e formar calos. Ou seja, não ocorre desdiferenciação celular e sim multiplicação de *stem cell* pré-existentes que podem posteriormente formar órgãos ou embriões somáticos (Rose, 2016), confirmando o potencial morfogênicos dos calos.

3.2 Multiplicação dos calos

De forma geral, os segmentos nodais apresentaram as menores taxas de oxidação durante o processo de multiplicação de calos, considerando as concentrações dentro das auxinas testadas; exceto no tratamento controle que apresentou 100 % de oxidação (Tabela 5).

Tabela 5. Oxidação de calos aos 60 dias no processo de multiplicação a partir de calos oriundos da etapa de indução da calogênese em *Guadua magna*.

Explante	Concentração μM	Auxinas		
		Dicamba	2,4-D	Picloram
<i>Segmento nodal</i>	0	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
	6,77	60,0 ± 11,0 a	88,0 ± 12,0 a	20,0 ± 8,9 b
	13,54	32,0 ± 13,6 b	64,0 ± 11,7 a	28,0 ± 10,2 b
	20,31	40,0 ± 14,1 b	24,0 ± 7,5 b	12,0 ± 4,9 b
	27,08	48,0 ± 18,5 b	8,0 ± 4,9 b	20,0 ± 6,3 b
<i>Segmento internodal</i>	0	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
	6,77	100,0 ± 0,0 a	88,0 ± 20,0 a	80,0 ± 12,6 ab
	13,54	92,0 ± 8,0 ab	88,0 ± 20,0 a	56,0 ± 18,3 b
	20,31	92,0 ± 4,9 ab	76,0 ± 20,0 a	52,0 ± 19,6 b
	27,08	60,0 ± 6,3 b	100,0 ± 0,0 a	64,0 ± 16,0 ab
<i>Bainha foliar</i>	0	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
	6,77	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	80,0 ± 8,9 ab
	13,54	84,0 ± 9,8 ab	96,0 ± 4,0 a	76,0 ± 11,7 ab
	20,31	56,0 ± 11,7 b	68,0 ± 10,2 ab	44,0 ± 14,7 b
	27,08	68,0 ± 19,6 ab	44,0 ± 14,7 b	48,0 ± 10,2 b

Médias ± erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Considerando ainda segmento nodal, quanto maior a concentração testada da auxina 2,4-D menor foi a percentagem de oxidação observada (27,08 μM = 8 %). Já as concentrações de picloram apresentaram baixas taxas de oxidação (< 28 %). Em dicamba as menores taxas de oxidação foram observadas nas concentrações de 13,54 μM e 20,31 μM (32 % e 40 %, respectivamente).

Para o explante bainha foliar, concentrações mais altas das auxinas testadas apresentaram menores taxas de oxidação, como observado em 20,31 μM de picloram (44 %), dicamba (56 %) e 2,4-D (68 %), e em 27,08 μM de 2,4-D (44 %), picloram (48 %) e dicamba (68 %).

Quanto ao explante segmento internodal, todas as concentrações de auxinas apresentaram taxas elevadas de oxidação que variaram entre 60 e 100 % em dicamba, de 76 e

100 % em 2,4-D e de 52 e 100 % em picloram, inviabilizando o uso deste explante para a multiplicação dos calos.

Aos 60 dias da fase de multiplicação, também foi verificado o incremento médio da massa fresca de calos durante o processo de calogênese de *G. magna*, onde foi possível observar que a auxina picloram foi estatisticamente superior comparada a dicamba e 2,4-D (Figura 7).

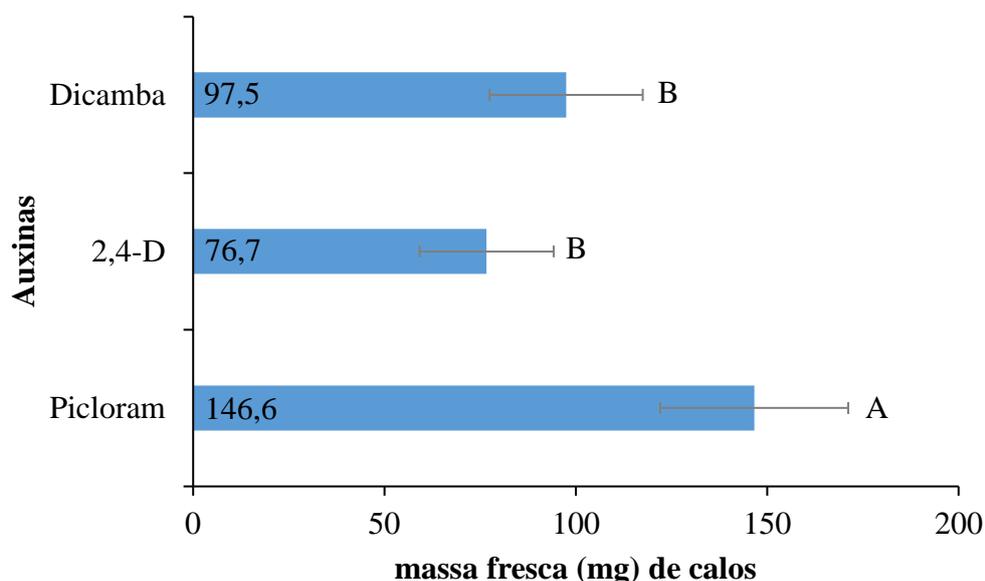


Figura 7. Efeito de diferentes auxinas no incremento de massa fresca (mg) de calos durante a fase de multiplicação da calogênese de *Gudua magna*. Médias com erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

A desdiferenciação e rediferenciação das células vegetais são reguladas principalmente pelos fitorreguladores fornecidos de forma exógena durante o cultivo *in vitro*. Além do mais, eles são reconhecidos por desempenhar papel importante no processo da organogênese (Zhang et al., 2010).

Existem ainda, muitas discussões sobre as efetividades dos fitorreguladores para bambus, devido principalmente à quantidade de espécies que envolvem os estudos e as diferenças no potencial morfogênico de genótipos (Mudoi et al., 2013; Singh et al., 2013).

No entanto, alguns estudos reportam que, assim como apresentado neste trabalho, o uso da combinação entre citocininas e auxinas contribuem para a multiplicação de calos para algumas espécies de bambus. Esse fato foi observado por Huang et al. (1989) em *B. multiplex*

e *P. aurea*, por Zhang et al. (2010) em *D. hamiltonii*, por Wei et al. (2015) em *Bambusa ventricosa* e por Obsuwan et al. (2019) em *T. siamensis*.

Adicionalmente, a avaliação quanto ao incremento da massa fresca na fase de multiplicação dos calos durante o processo de calogênese foi realizada aos 60 dias de incubação do material. Na avaliação foi possível determinar o segmento nodal como explante mais responsivo, comparado ao segmento internodal e a bainha foliar (Tabela 6).

Tabela 6. Massa fresca média (mg) dos calos de *Guadua magna* aos 60 dias na fase de multiplicação oriundos de diferentes concentrações de reguladores de crescimento e diferentes fontes de explantes.

Concentração μM	EXPLANTE		
	<i>Segmento nodal</i>	<i>Segmento internodal</i>	<i>Bainha foliar</i>
0	0,0 \pm 0,0 cA	0,0 \pm 0,0 aA	0,0 \pm 0,0 aA
6,77	219,7 \pm 58,0 bA	8,3 \pm 3,7 aB	10,8 \pm 6,4 aB
13,54	295,7 \pm 55,8 abA	24,7 \pm 10,4 aB	27,1 \pm 11,4 aB
20,31	399,9 \pm 57,7 aA	30,4 \pm 8,1 aB	67,1 \pm 14,8 aB
27,08	363,6 \pm 66,1 aA	53,9 \pm 24,4 aB	102,5 \pm 23,8 aB

Médias \pm er erro padrão com letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha=5\%$ de significância.

Também foi possível observar que, independentemente da auxina testada, as concentrações a partir de 13,54 μM proporcionaram maiores incrementos de massa fresca de calos para segmento nodal, qualificando esses tratamentos como factíveis para uso na multiplicação de calos durante o processo de calogênese.

Em termos morfológicos, verificou-se na fase de multiplicação que todos os tratamentos apresentaram formação de calos com coloração branco-amarelada, aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa e brilhosa (Figura 8 A). Tais aspectos são considerados favoráveis para possível regeneração de brotações (Obsuwan et al., 2019).

A partir da análise anatômica dos calos, foi possível verificar três regiões distintas de crescimento celular. Na região central do calo foram observadas células isodiamétricas meristemáticas de tamanho reduzido, agrupamentos celulares com citoplasmas densos e núcleos volumosos (Figura 8 B). Em contrapartida, a região em torno desse centro meristemático, exibiu células vacuoladas.

Na região periférica do calo, visualizou-se basicamente proliferação de divisões periclinais de células meristemáticas (Figura 8 B), além de agrupamentos de duas ou mais células vacuoladas, com espaços intercelulares nítidos (Figuras 8 C-D). Tal efeito pode ter ocorrido devido ao suprimento exógeno de fitoreguladores, principalmente da combinação

entre auxinas e citocininas, que normalmente estimula a proliferação celular (George, et al., 2008; Singh et al., 2013).

Com a análise histoquímica foi possível observar acúmulo de amiloplastos (grãos de amido) localizados, sobretudo, próximos aos centros de proliferação celular e em algumas células em divisões periclinais (Figuras 8 E, F, H e I), e ainda conspícuos corpos proteicos (Figuras 8 G e J).

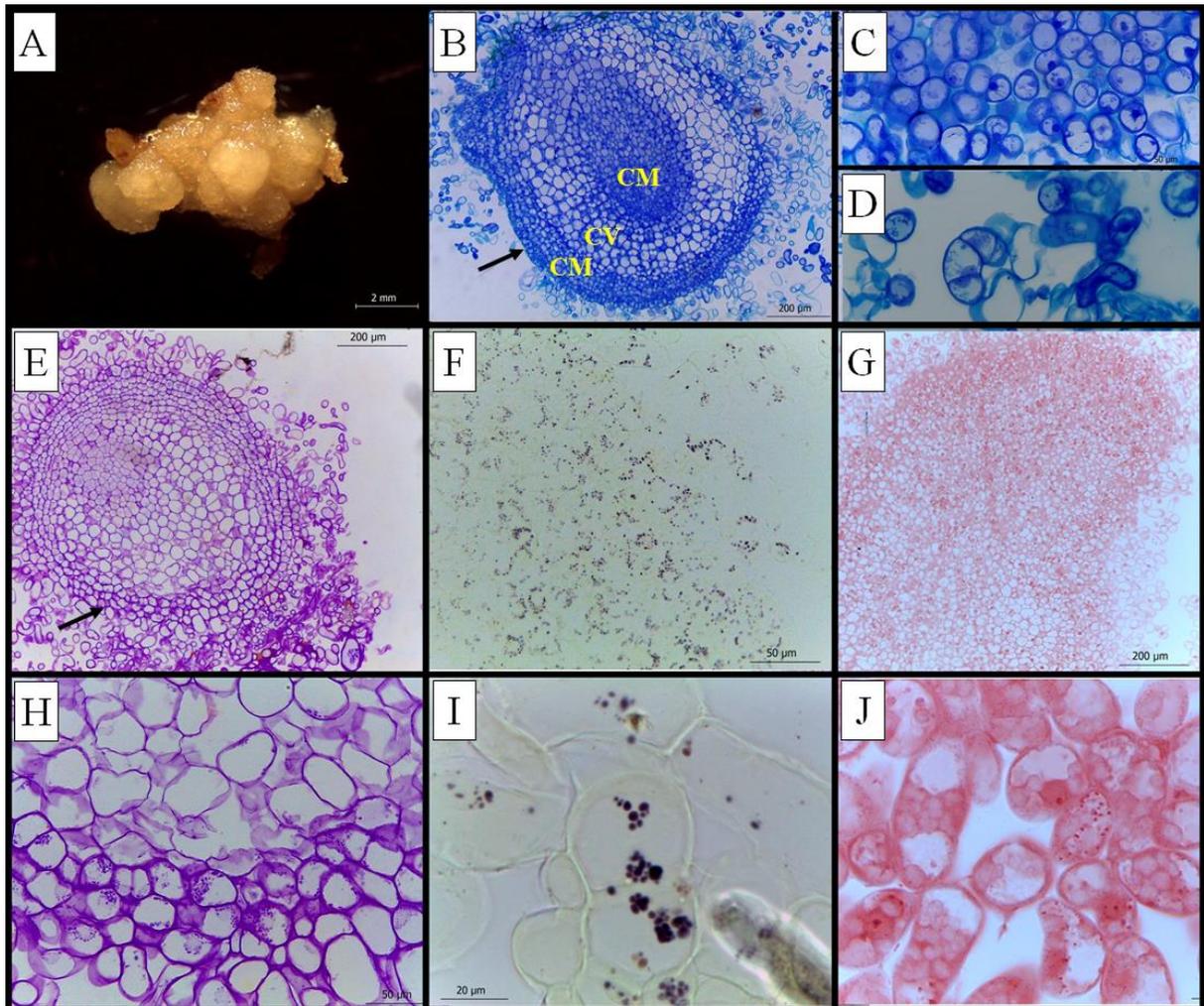


Figura 8. Caracterização morfoanatômica e histoquímica da formação de calos aos 60 dias da fase de multiplicação durante o processo da calogênese em *Guadua magna*. (A) Formação de calos com coloração branco-amarelada, de aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa e brilhosa; (B) secção anatômica do calo; seta indicando divisões periclinais de células meristemáticas; (C-D) detalhe da secção mencionada na letra B, que evidencia células com citoplasmas densos e núcleos grandes, e ainda agrupamentos de duas ou mais células com espaços intercelulares; (E e H) Análise com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS, seta indicando grãos de amido, (F e I) confirmação de presença de grãos de amido com corante Lugol; (G e J) conspícuos corpos protéicos identificados com o corante *Xylidine Ponceau* - XP. Abreviações: (CM) células meristemáticas, (CV) células vacuoladas.

Os grãos de amido observados possivelmente podem estar funcionando como uma fonte de energia às células meristemáticas nas adjacências, que se encontram em intensa divisão celular (Cardoso, 2018), conferindo potencial morfogênico a esse conjunto celular.

3.3 Regeneração

Após 30 dias de regeneração em T1- metade dos sais de MS e vitaminas na sua concentração completa, verificou-se o desenvolvimento de calos de coloração esbranquiçada, com as aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa, brilhosa e irregular (Figura 9 A). Com a análise anatômica foram observados centros meristemáticos bem definidos, com a formação de agrupamentos celulares (Figuras 9 B-C).

A partir da análise histoquímica, foram identificados amiloplastos (grãos de amido) na parte periférica do calo (Figura 9 D-E) e não foram observados corpos proteicos (Figura 9 F).

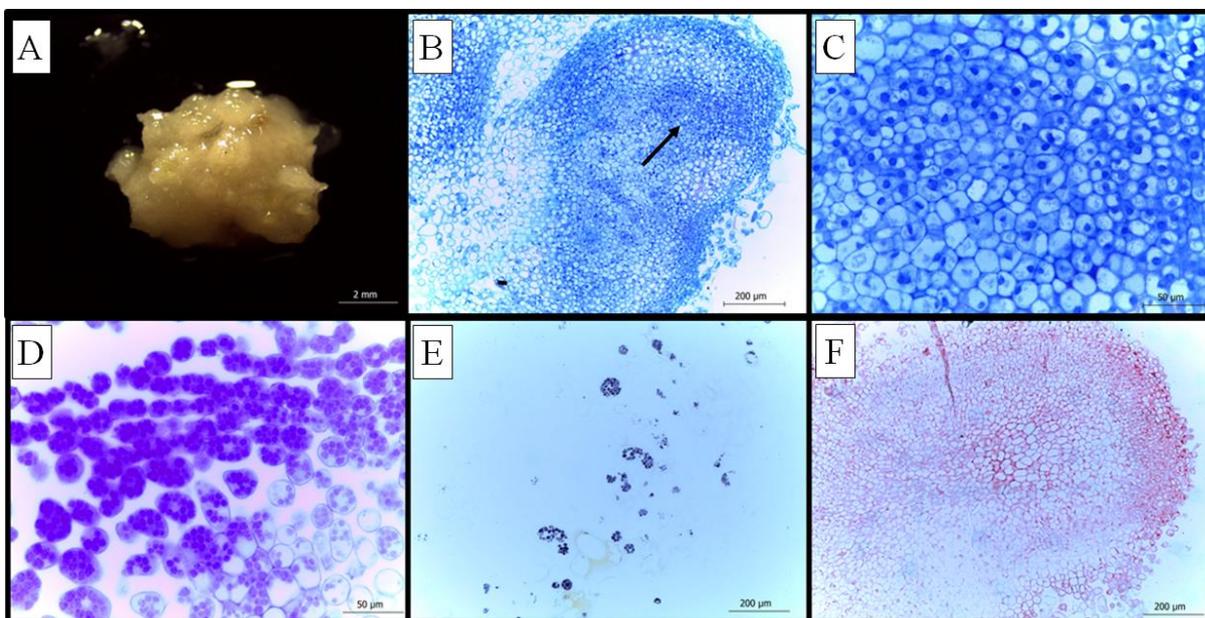


Figura 9. Caracterização morfoanatômica e histoquímica da formação de calos aos 30 dias da fase de regeneração em *Guadua magna*. (A) Formação de calos esbranquiçados, com aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa, brilhosa e irregular; (B) secção anatômica do calo, seta indicando centros meristemáticos bem definidos; (C) detalhe dos agrupamentos celulares; (D) grãos de amido identificados com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS e (E) confirmados com corante Lugol; (F) reservas proteicas não foram observadas com corante *Xylidine Ponceau* - XP.

Aos 60 dias de regeneração em T1- metade dos sais de MS e vitaminas na concentração completa, os calos mantiveram a morfologia com coloração esbranquiçada, de aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa, brilhosa e irregular, além de apresentarem novas protuberâncias verdes (Figura 10 A).

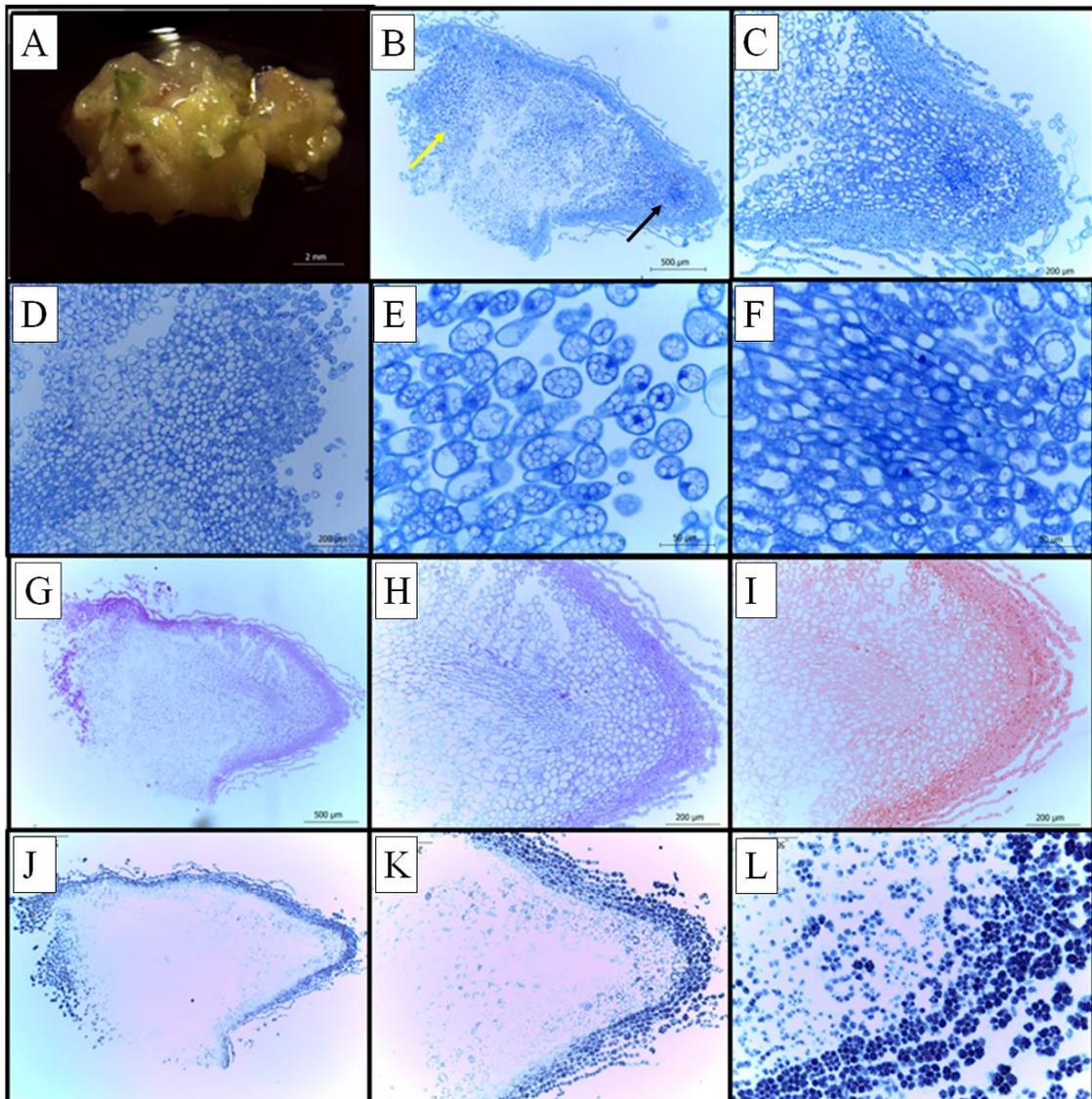


Figura 10. Caracterização morfoanatômica e histoquímica da formação de calos aos 60 dias da fase de regeneração durante o processo da calogênese em *Guadua magna*. (A) Formação de calos com coloração esbranquiçada, com aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície lisa, brilhosa e irregular, apresentando evaginações verdes; (B) secção anatômica do calo, seta amarela indicando agrupamento de células em divisão, seta preta indicando provável formação de primórdio radicular; (C) possível primórdio radicular; (D) agrupamento de células em divisão mencionado na letra B; (E) detalhe das células mencionadas na letra D; (F) detalhe de centro meristemático para formação do eixo radicular; (G-H) grãos de amido identificados com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS; (I) reservas proteicas não foram observadas com o corante *Xylidine Ponceau* - XP; (J-L) confirmação com corante Lugol da presença de grãos de amido.

A análise anatômica dos calos de *G. magna* apresentou indícios de diferenciação de zonas estruturais típicas de raízes, onde foi possível observar centros meristemáticos bem definidos, indicando formação de primórdio radicular (Figuras 10 B-C, e F). Em bambus, podem ocorrer a formação de primórdios radiculares em calos com aspecto compacto e mucilaginoso, e em seguida ocorre o surgimento de primórdios foliares, que são tecidos e órgãos determinantes para a etapa de regeneração das espécies desse grupo de plantas (Jullien e Van 1994).

Ademais, as secções revelaram divisões celulares na parte oposta da possível formação do primórdio radicular (Figuras 10 D-E). Tais observações são corroboradas por Yasodha et al. (2010), que observaram formação de primórdios radiculares estendidos em direção à região epidérmica em plantas de *Dendrocalamus giganteus* cultivadas *in vitro*. Esses autores ressaltam ainda, que a suplementação exógena de fitorreguladores do grupo de auxinas, constituem um papel importante para a diferenciação de tecidos e, conseqüentemente, de órgãos como as raízes.

Vale ressaltar, que o processo de organogênese *in vitro* pode ser dividido em seis etapas: (1) desdiferenciação celular, (2) aquisição de competências celular, seguidas da (3) indução, (4) determinação, (5) diferenciação e (6) formação de órgãos (Komatsu et al., 2004). Ou seja, aos 60 dias de cultivo, os calos de *G. magna* submetidos à regeneração, adquiriram competência morfogênica (etapa 2 do processo de organogênese) para a possível diferenciação de raízes, como observado nas secções anatômicas apresentadas.

Em termos histoquímicos, especificamente com relação a análise para detectar a presença de polissacarídeos, os reagentes *Periodic Acid Schiff* – PAS e Lugol revelaram concentrações relativamente altas de amiloplastos (grãos de amido) nas camadas periféricas dos calos (Figuras 10 G-H, J-L). Grãos de amidos são compostos presentes em raízes de bambu, com maior intensidade em tecidos jovens com células em divisão (Ito et al., 2015).

Essa presença de amido identificada nas células de *G. magna*, assemelham-se à estatócitos que contêm em seu interior plastídeos especializados na percepção da gravidade, chamados de estatólitos. Neste sentido, é possível que a ação estatólito-amido ocorra devido à alta atividade metabólica para formação das estruturas verdes e/ou possíveis primórdios radiculares. Adicionalmente, não foram observados corpos proteicos com corante *Xylidine Ponceau* - XP (Figura 10 I).

Aos 90 dias de regeneração em T1- metade dos sais de MS e vitaminas com concentração completa, os calos mantiveram a morfologia com coloração esbranquiçada e evaginações verdes, de aspecto compacto e multicilaginoso, de superfície lisa, brilhosa e irregular (Figura 11 A). A análise anatômica apresentou centros meristemáticos bem definidos (Figuras 11 B-C).

Aos 120 dias, os calos tornaram-se esponjosos, com coloração variando entre branca e amarela, além das evaginações verdes (Figura 11 D). A análise anatômica revelou centros de diferenciação de estruturas típicas de raízes, como coifa, columela e procâmbio (Figuras 11 E-F).

Aos 180 dias, os calos esponjosos apresentaram estruturas amarelas e verdes, com base oxidada (Figura 11 G). A análise anatômica evidenciou centros meristemáticos bem definidos indicando formação de primórdio radicular (coifa, columela e procâmbio), com elementos de vasos em diferenciação, e ainda a presença de compostos fenólicos nas adjacências (Figuras 11 H-I).

Em meio de regeneração T2- MS suplementado de 2,68 μM de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 12,32 μM de BAP, os calos tornaram-se oxidados (totalmente escurecidos) logo aos 30 dias, sem mudanças posteriores ao longo do tempo (Figura 11 J). A partir da análise anatômica, foi possível observar quantidade elevada de células vacuoladas sem indícios de divisão celular, além de compostos fenólicos nas adjacências e células apresentando possível processo de apoptose (desintegração das organelas celulares) (Figuras 11 K-L).

A partir da análise histoquímica dos calos, não foram observados amiloplastos (grãos de amido), nem mesmo corpos proteicos, durante a fase de regeneração em T1- metade dos sais de MS e vitaminas com concentração completa no período de 90 até 180 dias, ou em T2- MS suplementado de 2,68 μM de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 12,32 μM de BAP já aos 30 dias de cultivo.

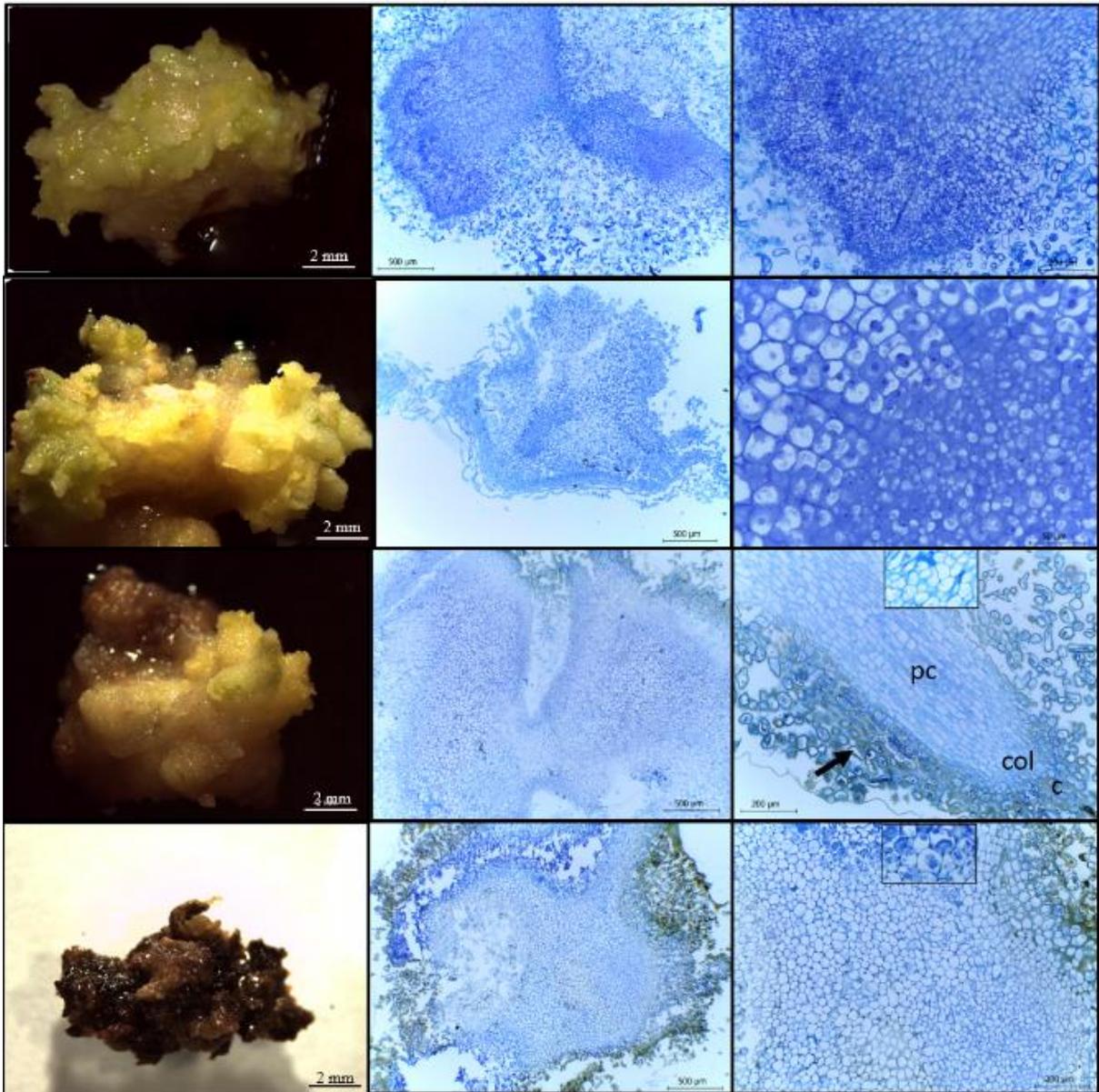


Figura 11. Caracterização morfoanatômica da fase de regeneração durante o processo da calogênese em *Guadua magna*. (A) Aos 90 dias formação de calos com coloração esbranquiçada, com aspecto compacto e mucilaginoso, de superfície brilhosa, lisa e irregular, apresentando evaginações verdes; (B) Secção anatômica do calo; (C) Detalhe da secção mencionada na letra B, seta indicando centros meristemáticos bem definidos; (D) Aos 120 dias formação de calos com aspecto amarelo e de superfície esponjosa, apresentando evaginações verdes; (E) Secção anatômica do calo que evidencia coifa, columela e procâmbio; (F) Detalhe da columela mencionada na letra E; (G) Aos 180 dias formação de calos com aspecto amarelo e de superfície esponjosa, apresentando evaginações verdes e oxidação (escurecimento) na base; (H) Secção anatômica do calo; (I) possível primórdio radicular (coifa, columela e procâmbio), nota-se elementos de vasos em diferenciação, seta indicando compostos fenólicos; (J) Aos 30 dias formação de calos oxidados (totalmente escurecidos); (K) Secção anatômica do calo; (L) Detalhe da secção mencionada na lera K, nota-se presença de compostos fenólicos e células em possível processo de apoptose. Abreviações: (c) coifa, (col) columela, (pc) procâmbio.

Apesar dos calos de *G. magna* não apresentarem potencial morfogênico após 180 dias de cultivo, foi possível angariar informações inéditas acerca do processo de divisão e desdiferenciação celular da calogênese em *G. magna*. Vale ressaltar que a falha de competência de diferenciação de um tecido pode refletir na falta de receptores para o fitorregulador que induziu a organogênese (Komatsu et al., 2011). Portanto, o acompanhamento do desenvolvimento de calos auxilia na determinação das melhores condições de cultivo e pode ainda, subsidiar estudos relacionados à embriogênese somática (Zhang et al., 2010) e cultivos celulares em suspensão (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003).

3.4 Cultura de células em suspensão

A partir dos calos induzidos com o uso do explante segmento nodal, foi possível estabelecer um crescimento de cultivos celulares em suspensão, onde o material original cultivado em meio contendo 13,54 μM de picloram (T3) foi substancialmente melhor, já que apresentou 100 % de êxito logo no primeiro subcultivo, seguido de 20,31 μM da auxina picloram (T4) com 83,3 %.

O tratamento 13,54 μM de dicamba (T1) apresentou estabelecimento estatisticamente tardio, do qual foram precisos cinco subcultivos para atingir os 100 %. Logo, o tratamento 13,54 μM de 2,4-D (T2) não atingiu índices estatisticamente satisfatórios de estabelecimento de cultivos celulares em suspensão, não ultrapassando o resultado de 30 % (Figura 12).

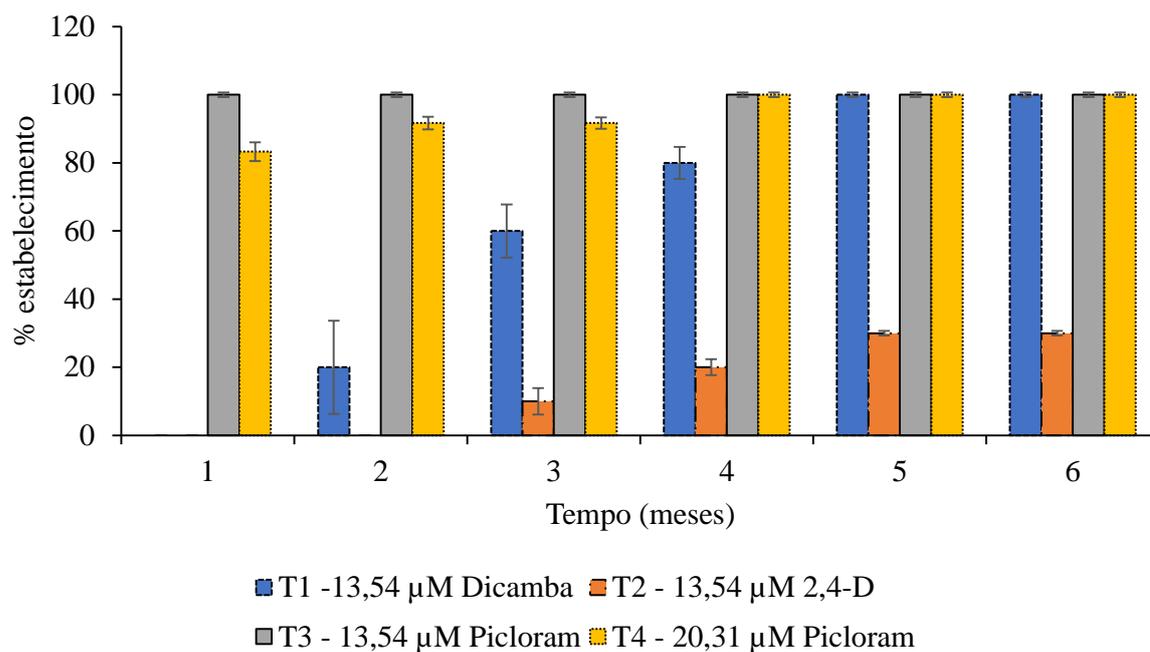


Figura 12. Estabelecimento de cultivos celulares em suspensão de *Guadua magna* ao longo do tempo.

O presente estudo apresentou resultados interessantes quanto ao estabelecimento e crescimento da suspensão celular em *G. magna*, que podem contribuir para investigações avançadas sobre a biotecnologia para diversas espécies de bambu, principalmente quanto ao uso na auxina picloram para tal finalidade.

Ademais, os estudos relacionados aos cultivos celulares em suspensão de espécies de bambu são incipientes e, na sua maioria, abordam principalmente metodologias de extração de compostos secundários (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003; Ogita, 2005; Liu et al., 2006; Kuo et al., 2009; Nomura et al., 2013).

No geral, a auxina 2,4-D é mencionada na maioria desses trabalhos e em estudos iniciais realizados por Huang et al. (1989) para as espécies *B. multiplex* e *Bambusa oldhami*. Posteriormente, Nomura et al. (2013), para a espécie *P. nigra*, foi verificada a utilização da auxina picloram. Assim como demonstrado no presente estudo, tais autores relatam o efeito positivo da auxina picloram no crescimento dos cultivos celulares em suspensão.

Após seis subcultivos de 30 dias foi possível, primeiramente, analisar o efeito da origem do tratamento sobre a massa fresca. Observou-se que os tratamentos 13,54 µM de picloram (T3) e 20,31 µM de picloram (T4) foram estatisticamente superiores (2.723,1 mg e 2.108,4 mg; respectivamente), quando comparadas a 13,54 µM dicamba (T1) (624 mg) e 13,54 µM 2,4-D (T2) (327,83 mg) (Figura 13).

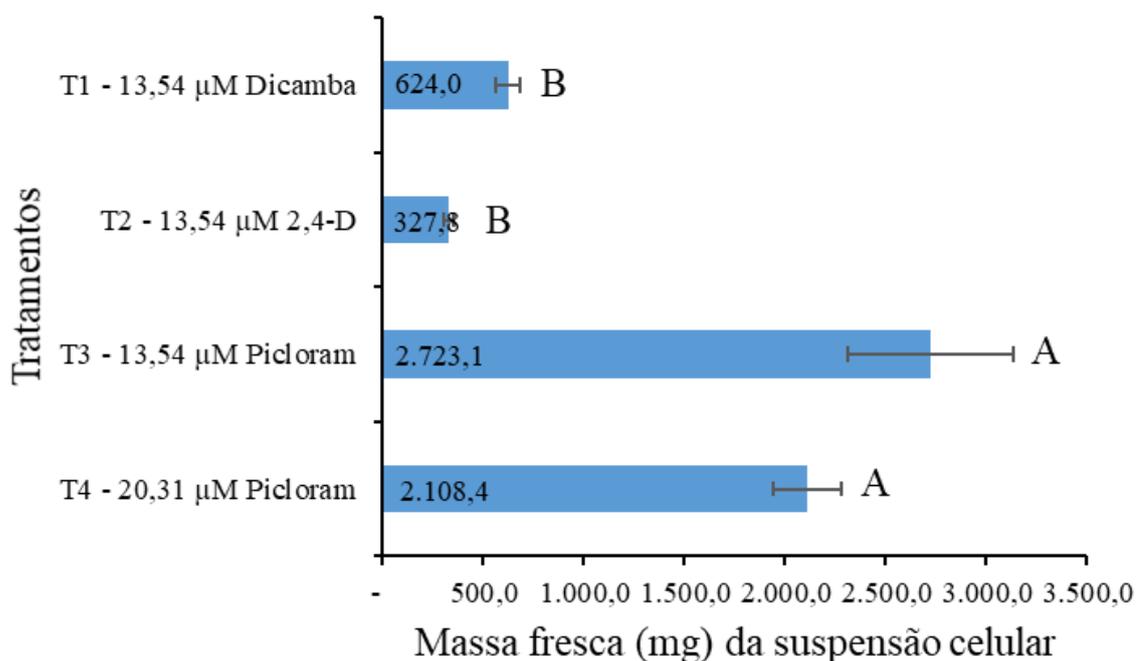


Figura 13. Efeito da auxina no incremento de massa fresca (mg) dos cultivos celulares em suspensão de *Guduua magna*. Médias com erro padrão de letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Ao analisar o efeito da origem do tratamento sobre a massa seca dos cultivos celulares em suspensão, verificou-se que novamente 13,53 µM de picloram (T3) e 20,31 µM picloram (T4), ou seja, as duas origens com auxina picloram, foram estatisticamente superiores (378,5 mg e 296,5 mg, respectivamente), quando comparadas ao 13,54 µM de dicamba (T1) (93,3 mg) e 13,54 µM de 2,4-D (T2) (104,7 mg) (Figura 14).

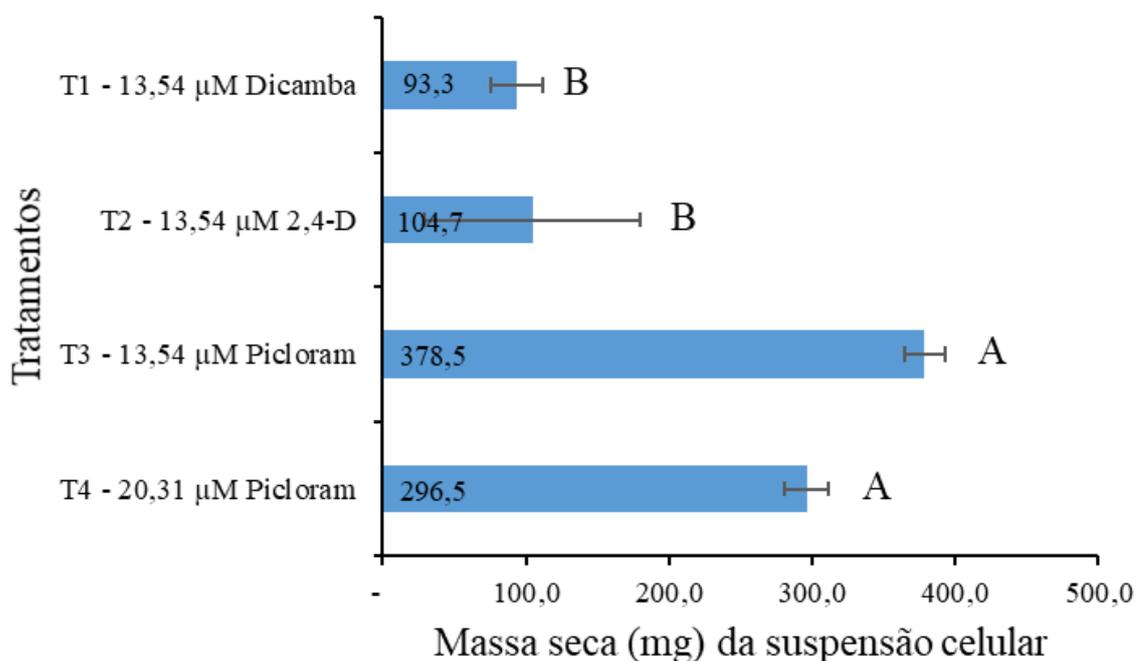


Figura 14. Efeito da auxina no incremento de massa seca (mg) dos cultivos celulares em suspensão de *Guadua magna*. Médias com erro padrão de letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Vale ressaltar que para um eficiente protocolo de cultivos celulares, se faz necessário investigações acerca dos aspectos morfológicos e fisiológicos das células cultivadas em espécies de bambu (Ogita 2005), inclusive sobre o potencial uso dessa ferramenta para identificação de células com competência embriogênica.

A partir da análise citoquímica com Carmim acético e azul de Evans, foi possível confirmar que todos os cultivos celulares em suspensão de *G. magna* apresentaram células com viabilidade embriogênica (Figura 15) (Gupta e Holmstrom, 2005). No entanto, aquelas cultivadas em picloram, destacaram-se por apresentarem maior aglomerado de células vermelhas, que qualifica como positiva a viabilidade embriogênica, indicando que esses tratamentos (T3- 13,54 μ M de picloram e T4- 20,31 μ M de picloram) provêm as melhores condições de cultivo para tal finalidade (Figuras 15 E-H).

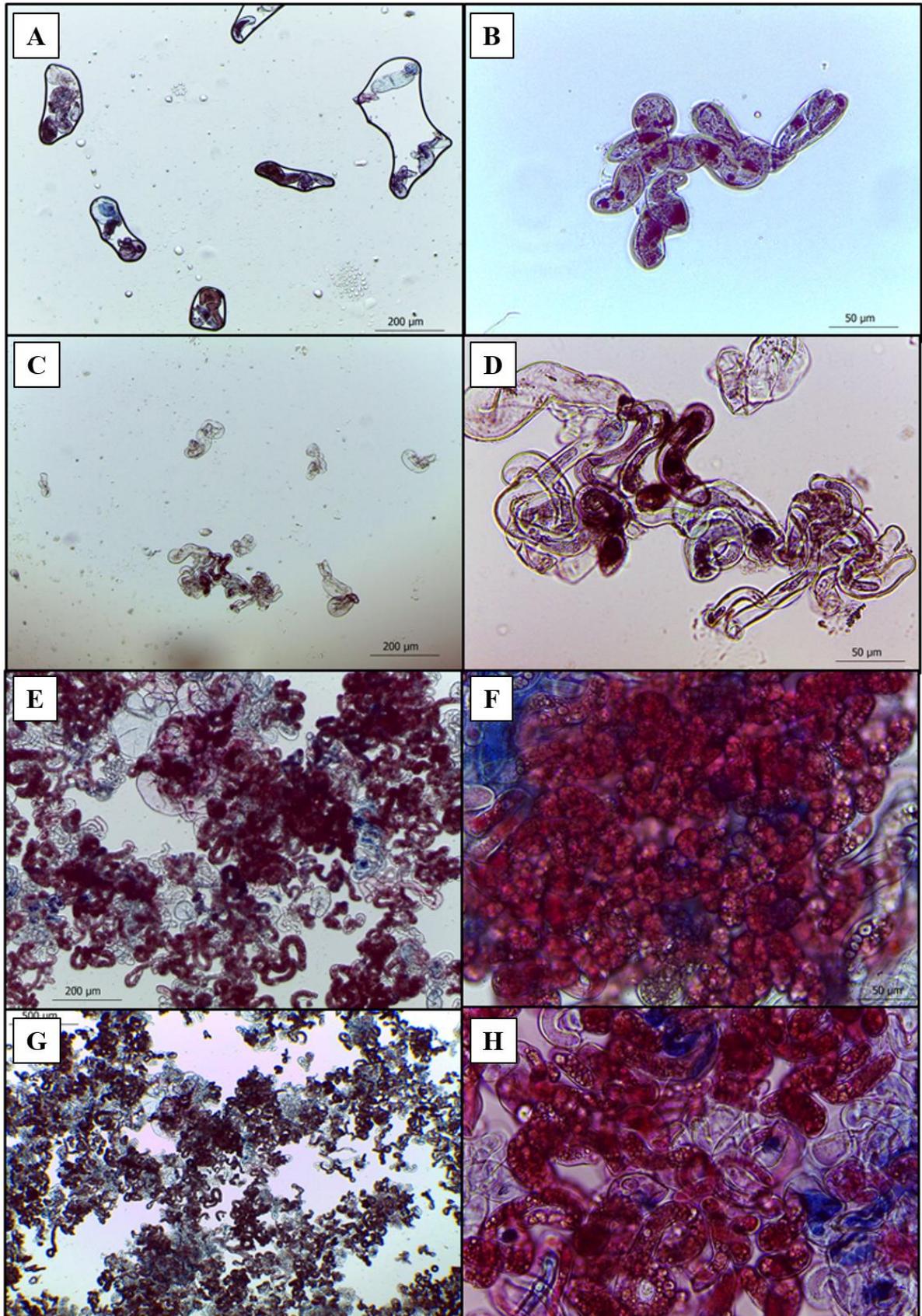


Figura 15. Análise citoquímica com Carmim acético e azul de Evans para verificação da viabilidade embriogênica de cultura de células em suspensão em *Guadua magna*. (A-B) T1 - 13,54 μ M de dicamba; (C-D) T2 - 13,54 μ M de 2,4-D; (E-F) T3 - 13,54 μ M de picloram; e (G-H) 20,31 μ M de picloram.

Até o presente momento, cultivos celulares para fins de multiplicação *in vitro* foram mencionados apenas para *D. giganteus* (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003) e para *P. nigra* (Ogita, 2005). Apesar de constatado o potencial embriogênico da cultura de *D. giganteus*, os autores atentam que o grau de organização das células foi transitório (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003). No entanto, estes mesmos autores conseguiram manter os cultivos celulares em suspensão por um período de até dois anos.

Conforme apresentado, os cultivos celulares em suspensão configuram-se como importante alternativa de cultivo *in vitro* para as espécies de bambu (Liu et al., 2006). Ademais, o sistema de cultura por células oferece inúmeras vantagens para investigações futuras sobre o papel metabólico dos nutrientes e sua utilização em células vegetais de interesse (Ogita, 2005), inclusive para transformação genética (Ogita et al., 2011; Ogita et al., 2012; Mudoj et al., 2013).

4 CONCLUSÃO

As maiores taxas médias de formação e multiplicação de calos em *Guadua magna* foram verificadas no explante segmento nodal com o uso da auxina picloram, independentemente da concentração testada.

Com a análise anatômica, observou-se a formação de primórdio radicular já aos 60 dias de cultivo em meio de regeneração e, apesar dos calos não apresentarem potencial morfogênico até 180 dias de cultivo, foi possível angariar informações inéditas acerca do processo de divisão e desdiferenciação celular da calogênese em *G. magna*.

A partir dos calos induzidos com o uso do explante segmento nodal foi possível estabelecer um crescimento de cultivos celulares em suspensão. Com a análise citoquímica verificou-se que todos cultivos apresentaram células com viabilidade embriogênica nos diferentes tratamentos.

Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho sobre a calogênese e o estabelecimento de cultivos celulares em suspensão em *G. magna* podem contribuir em estudos futuros sobre a propagação em larga escala, conservação de germoplasma *in vitro*, embriogênese somática, transformação genética de plantas e na produção de compostos secundários, inclusive para outras espécies de bambu.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNIHOTRI, R. K., NANDI, S. K.; *In vitro* shoot cut: a high frequency multiplication and rooting method in bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. **Biotechnology**, v. 8, p. 259-263, 2009.
- AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I; NAFEES, M.; MARYAM; RAFAY, M.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013.
- AKKER, S. V.; BORMANS, P.; PEETERS, H.; PRINSEN, E.; GIELIS, J. Cytokinin dynamics in cell suspension cultures of *Bambusa balcooa* Roxburgh using UPLC-ESI/MS/MS. In: **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v. 28, n. 1, p. 32-39, 2015.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; ARYA, I.D. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 10, p. 879-882, 1999.
- ARRUDA, L. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; TEIXEIRA, D. E.; ARAÚJO, P. C.; Lignocellulosic composites from brazilian giant bamboo (*Guadua magna*) part 1: properties of resin bonded particleboards. **Maderas, Ciencia y Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 49-58, 2011.
- BAG, N.; CHANDRA, S.; PALNI, L. S. M.; NANDI, S. K. Micropropagation of Devringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] - a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. **Plant Science**, v. 156, n. 2, p. 125-135, 2000.
- BAKSHI, M.; TIWARI, C.; RAZVI, S. Conservation of an important montane bamboo *Thamnocalamus falconeri*, Hook.f. ex Munro through axillary bud proliferation. **Journal of Forest Research**, v. 26, n. 1, p. 179-185, 2015.
- BEENA, D. B.; RATHORE, T. S.; *In vitro* cloning *Bambusa pallida* Munro through axillary shoot proliferation and evolution of genetic fidelity by random amplified polymorphic DNA markers. **International Journal of Plant Biology**, v. 3, n. 6, p. 27-33, 2012.
- BONGA, J. M. Can explant choice help resolve recalcitrance problems *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? **Trees**, p. 1-9, 2016.
- BYSTRIAKOVA, N.; KAPOV, V.; LYSENKO, I. **Bamboo Biodiversity**. UNEP-WCMC/INBAR. 2004.
- CARDOSO, I. M. A. S. **Embriogênese somática de gueroaba [*Syagrus olearacea* (Mart.) Becc.] com ênfase em aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais**. Tese de doutorado em Ciências Florestais – Universidade de Brasília, 359 p., 2018.
- CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998, p. 331-353

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 51-66, 2010.

DURZAN, D. J. Applications of cell and tissue culture in tree improvement. **In: Applications of Plant Cell and Tissue Culture**. Ciba Foundation Symposium 137. Wiley, Chichester, p. 36-58, 1988.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; OTVOS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v. 57, p. 5-12, 2002.

FILGUEIRAS, T. S.; LONDOÑO, X. A. Giant new *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) from Central Brazil. **In: Proceedings of 1st National Seminar on Development of the Brazilian Bamboo Research Network**, Brasília, Brazil, p. 27-33, 2006.

FILGUEIRAS, T. S.; LONDOÑO, X. A. 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., SANTOS-GONÇALVES, A. P. A Checklist of the Basal Grasses and Bamboos in Brazil (POACEAE). **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 18, n. 1, p. 7-18, 2004.

FURLAN, F. C.; GAVILAN, N. H.; ZORZ, A. Z.; OLIVEIRA, L. S.; KONZEN, E. R.; BRONDANI, G. E. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, v. 39, n. 1, p. 61-70, 2018.

GALLARDO, J.; FREIRE, M.; LEÓN, J.; GARCÍA, Y.; PÉREZ, S.; GONZÁLEZ, M. Comportamiento en labrotación de las yemas de estacas de *Guadua angustifolia* Kunth empleadas en la propagación. **Cultivos tropicales**, v. 29, n. 1, p. 17-22, 2008.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. In: MERRIOTT, E. F. G.; HALL, M. A.; KLERK, G-J. (Eds). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer Science+Business Media, p. 1-28, 2008.

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**, v.9, n.1, p. 107-114, 2005.

GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K.; OPRINS, J.; DEBERGH, P.C. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v. 552, p. 195-203, 2001.

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, F.C.; XIA, N. Diversity of bamboo in Brazil. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**, v. 23, p. 1-16, 2015.

GUO, X.; JI, L.; ZHU, L.; SONG, L.; LIU, S.; ZANG, Q.; LIN, X. Bamboo *NiR* gene is associated with regeneration capacity. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 2017. DOI: 10.1080/14620316.2017.1353894.

GUPTA, P. K.; HOLMSTROM, D. Double staining technology for distinguishing embryogenic cultures. **In:** JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (eds), Protocol for somatic embryogenesis in woody plants, p. 573-575, 2005. DOI: 10.1007/1-4020-2985-3_45.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8^a ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915p.

HU, S.; ZHOU, J.; CAO, Y.; LU, X.; DUAN, N.; REN, P.; CHEN, K. *In vitro* callus induction and plant regeneration from mature seed embryo and young shoots in a giant sympodial bamboo, *Dendrocalamus farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et H.L. Fung. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 16, p. 3210-3215, 2011.

HUANG, L. C.; HUANG, B. L.; CHEN, W. L. Tissue culture investigations of bamboo – IV. Organogenesis leading to adventitious shoots and plants in excised shoot apices. **Environmental and Experimental Botany**, v. 29, n. 3, p. 307-315, 1989.

ISLAM, M.S.; BHUIYAN, M.K.; HOSSAIN, M.M.; HOSSAIN, M.A. Clonal propagation of *Bambusa vulgaris* by leafy branch cuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 22, n. 3, p. 387-392, 2011.

ITO, R.; MIYAFUJI, H.; KASUYA, N. Rhizome and root anatomy of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) observed with scanning electron microscopy. **Journal Wood Science**, v. 61, p. 431-437, 2015. DOI: 10.1007/s10086-015-1482-y.

JIMÉNEZ, V. M.; CASTILHO, 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**, v. 86, n. 3, p. 389-395, 2006.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, n. 523 p. 1940.

JONES, A. M. P.; SAXENA, P. K. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.

KALIA, S.; KALIA, R. K.; SHARMA, S. K. *In vitro* regeneration of an indigenous bamboo (*Bambusa nutans*) from internode and leaf explant. **Journal Bamboo Rattan**, v. 3, p. 217-228, 2004.

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v. 86, p. 1623-1628, 2004.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KOMATSU, Y. H.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; BRONDANI, G. E.; GONCLAVES, A. N.; ALMEIDA, M. D. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forest Research**, v. 22, p. 209-215, 2011.

JULLIEN, F.; VAN, K. T. T. Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* 'Golden goddess'. **Plant Science**, v. 98, p. 199-207, 1994.

LIN, C. S.; LIN, C. C.; CHANG, W. C. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p.75-82, 2004.

LIN, C. S.; KALPANA, K.; CHANG, W. C.; LIN, N. S.; Improving multiple shoot proliferation in bamboo mosaic virus-free *Bambusaoldhamii* Munro propagation by liquid culture. **Scientia Horticulturae**, v. 42, n. 5, p. 1243-1256, 2007a.

LIN, C. S.; LIANG, C. J.; HSAIO, H. W.; LIN, M. J.; CHANG, W. C. *In vitro* flowering of green and albino *Dendrocalamus latiflorus*. **New Forest**, v. 34 p. 177-186, 2007b.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. An Introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. **In: Plant Cell Culture Protocols**. 4^a ed. Humana Press, 507 p. 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão: focalizando a bananeira**. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa 126. 24p. Brasília 2006.

MISHRA, Y.; PATEL, P. K.; YADAV, S.; SHIRIN, F.; ANSARI, S. A. A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. **Scientia Horticulturae**, v. 115, p. 315-318, 2008.

MIZUKI, I.; SATO, A.; MATSUO, A.; SUYANA, Y.; SUZUKI, J. I.; MAKITA, A. Clonal structure, seed set, and self-pollination rate in mass-flowering bamboo species during off-year flowering events. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014. DOI: 10,1371/journal.pone,0105051.

MOHD.; RIZVI, Z.; KUKREJA, A. K.; BISHT, N. S. Plant regeneration in *Chorophytum borivilianum* Sant. et Fernand. from embryogenic callus and cell suspension culture and assessment of genetic fidelity of plants derived through somatic embryogenesis. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 18, n. 3, p. 253-263, 2012.

MUDOI, K. D.; BORTHAKUR, M. *In vitro* micropropagation of *Bambus abalcooa* Roxb. through nodal explants from fieldgrown culms and scope for upscaling. **Current Science**, v. 96, p. 962-966, 2009.

MUDOI, K. D.; SAIKIA, S. P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal Biotechnology**, n. 12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962.

NEGI, D.; SAXENA, S.; *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. **Plant Biotechnol Reports**, v. 5, p. 35-43, 2011.

NOGUEIRA, J. S.; GOMES, H. T.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Gudua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 49, 2019.

O'BRIEN T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.

OBSUWAN, K.; DUANGMANEE, A.; THEPSITHAR, C. *In vitro* propagation of a useful tropical bamboo, *Thyrsostachys siamensis* Gamble, through shoot-derived callus. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, 2019. DOI: 10.1007/s13580-018-00119-z.

OGITA, S. Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. **Plant Biotechnol**, v. 22, p. 119-125, 2005.

OGITA, S.; KIKUCHI, N.; NOMURA, T.; KATO, Y. A practical protocol for particle bombardment-mediated transformation of *Phyllostachys* bamboo suspension cells. **Plant Biotechnol**, v. 28, p. 43-50, 2011.

OGITA, S.; NOMATU, T.; KISHIMOTO, T.; KATO, Y. A novel xylogenic suspension culture model for exploring lignification in *Phyllostachys* bamboo. **Plant Methods**, n. 8, v. 40, p. 1-9, 2012.

QIAO, G.; LI, H.; LIU, M.; JIANG, J.; YIN, Y.; ZHANG, L.; ZHUO, R. Callus induction and plant regeneration from anthers of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, DOI 10.1007/s11627-013-9498-8. 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **Na introduction to R. Notes on R: a programming environment for data analysis and graphics**. Version 2.15.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-12-7, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em 18 de outubro de 2012.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; YAKANDAWALA, K. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. **Plant Science**, v. 129, n. 2, p. 213-223, 1997.

RAMANAYAKE, S. M. S. D; WANNIARACHCHI, W. A. V. R. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 195-200, 2003.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; MEEMADUMA, V. N.; WEERAWARDENE, T. E. *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the largescale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* ‘Striata’). **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 109-113, 2006.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, v. 1, p. 1-4, 2011.

ROSE, R. J. Genetic reprogramming of plant cells *in vitro* via dedifferentiation or pre-existing stem cells. In: ROSE, R. J. (Ed.). Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 2017.

SAXENA, S. *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 431-434, 1990.

SAXENA, S.; BHOJWANI, S. S. *In vitro* clonal multiplication of 4-year old plants of the bamboo, *Dendrocalamus slongispatus* Kurz. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 29, p. 135-142, 1993.

SHIRASUNA, R. T. Guadua. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB106301>>. Acesso em 30 de setembro de 2016.

SILVA, R. M. C. 2005. **O bambu no Brasil e no mundo**. Disponível <http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo.pdf> Acesso em janeiro de 2017.

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**, v. 21, p. 220-228, 2011.

SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Seasonal influences on *in vitro* bud break in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale shoot multiplication and plantlet regeneration. **Indian Journal Plant Physiology**, v. 17, p. 9-21, 2012a.

SINGH, S. R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo – a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 2013.

SOOD, A.; AHUJA, P. S.; SHARMA, M.; SHARMA, O. P.; GODBOLE, S. *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 71, p. 55-63, 2002.

STEWART, F. C.; MAPES M. O.; MEARS K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in culture grown freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.

YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S. P.; MEYEROWITZ, E. M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends Cell Biology**, v. 21, p. 212-218, 2011.

TSAY, H. S.; YEH, C. C.; HSU, J. Y. Embryogenesis and plant regeneration from another culture of bamboo (*Sinocalamus latiflora* (Munro) McClure). **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 349-351, 1990.

VALE, P. A. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. B.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Height and number of shoots on the survival and development of micropropagated bamboo plantlets during pre-acclimatization. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.

VANISREE, M.; LEE, C. Y.; LO, S. F.; NALAWADE, S. M.; LIN, C. Y.; TSAY, H. S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 1-22, 2004.

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.

WAIKHOM, S. D.; LOUIS, B. An effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melacanna baccifera*) through nodal culture. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

WEI, Q.; CAO, J.; QIAN, W.; XU, M.; LI, Z.; DING, Y. Establishment of an efficient micropropagation and callus regeneration system from the axillary buds of *Bambusa ventricosa*. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, DOI: 10.1007/s11240-015-0743-1, 2015.

YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.

YASHODA, R.; KAMALA, S.; KUMAR, A. S. P.; KUMAR, P. D.; KALAIARASI, K. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 109-113, 2008.

ZHAO-HUA, L.; KABAYASHI, M. Plantation future of bamboo in China. **Journal of Forestry Research**, v. 15, n. 3, p. 233-242, 2004.

Capítulo 2

Caracterização morfo-anatômica da indução da embriogênese somática em *Guadua* aff. *chaparensis* (Londoño e Zurita) e o restabelecimento de calos obtidos de cultivos celulares em suspensão.

RESUMO

Apresentando vasta diversidade de espécies e importância sócioeconômica para múltiplos usos, os bambus são encontrados em florestas tropicais e subtropicais de praticamente todo mundo. Os bambus do gênero *Guadua* são endêmicos das Américas e distribuem-se em uma faixa relativamente longa que se estende desde o México até o sul da Argentina, sendo considerados como protagonistas da evolução cultural, social e econômica da América Latina. No entanto, a falta de manejo adequado e a exploração não racional desse recurso tem levado redução de populações nos diferentes habitats. Neste sentido, o desenvolvimento de metodologias tecnológicas de propagação parece ser essencial, como por exemplo, a micropropagação, mais especificamente a embriogênese somática. Essa técnica possibilita a regeneração *in vitro* de plantas a partir de células somáticas totipotentes, que são induzidas a se diferenciarem em embriões, sem que ocorra a fusão de gametas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar morfoanatomicamente calos obtidos durante a indução da embriogênese somática em *Guadua* aff. *chaparensis*, bem como o estabelecimento de cultivos celulares em suspensão e o reestabelecimento de calos com potencial embriogênico. Para a obtenção de calos foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais com cerca de 1 cm de comprimento de plantas sob condições *in vitro*, que foram inoculados em meio de MS combinado com as auxinas ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e Ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (picloram) nas concentrações de 11,1 μM e 22,2 μM cada. Após, os calos foram submetidos a cultura líquida sob agitação para a obtenção de cultivos celulares em suspensão, nos seguintes tratamentos: T1- controle, T2- 4,44 μM de 2,4-D, T3- 4,44 μM de picloram, ou a T4- combinação das auxinas. Após a multiplicação das culturas, foi realizado o reestabelecimento de calos, a partir de alíquotas de 20 μL dos cultivos celulares, ressuspendidos em meio de MS nos tratamentos com as auxinas 2,4-D e picloram, em cinco concentrações distintas: 0; 6,77; 13,54; 20,31 e 27,08 μM cada. Para as análises histológicas e histoquímicas foram retiradas amostras dos diferentes calos formados nas etapas de indução e restabelecimento. Também foi realizada análise citoquímica dos cultivos celulares. De maneira geral, morfológicamente quatro tipos de calos foram observados na indução da embriogênese somática: (1) gelatinoso, (2) compacto, (3) friável e (4) compacto nodular. Nos calos friáveis foi observado a formação de proembriões, uma característica decisiva para a progressão de embriões somáticos, e também a presença de grãos de amido. A partir dos calos friáveis foi possível o estabelecimento e a multiplicação de cultivos celulares em suspensão, que apresentaram células com viabilidade embriogênica verificadas com a análise citoquímica. Foi possível realizar o reestabelecimento de calos com potencial embriogênico oriundos dos cultivos celulares em suspensão. Tais calos apresentaram aspecto friável e, a partir da análise anatômica, foram observados pró-embrões somáticos.

Palavras-chave: *Poaceae*, *Bambusoideae*, morfogênese, segmento nodal, análise histológica, análise citoquímica.

ABSTRACT

With vast species diversity and socio-economic importance for multiple uses, bamboos are found in almost every tropical and subtropical forests. The bamboos of the genera *Guadua* are endemic to the Americas and are distributed over a relatively long strip that extends from Mexico to southern Argentina, being considered as protagonists of the cultural, social and economic evolution of Latin America. However, the management and the non-rational exploitation of this resource has led to a reduction in populations in different habitats. In this sense, the development of technological propagation methodologies seems to be essential, such as, for example, micropropagation, more specifically somatic embryogenesis. This technique makes it possible to regenerate plants *in vitro* from totipotent somatic cells, which are induced to differentiate into embryos, without the gamete fusion occurring. Therefore, the objective of this work was to characterize morphoanatomically calli obtained during the induction of somatic embryogenesis in *Guadua* aff. *chaparensis*, as well as the establishment of suspension cell cultures and the calli recovery with embryogenic potential. In order to obtain calli, about 1 cm long nodal segments of plants were used as source of explants under *in vitro* conditions, which were inoculated in MS medium combined with auxins 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 4-amino-3, 5, 6-trichloropicolinic acid (picloram) in concentrations of 11.1 μM and 22.2 μM each. Then, the calli were subjected to liquid culture under agitation to obtain suspension cell cultures in the treatments T1- control, T2- 4.44 μM 2,4-D, T3- 4.44 μM picloram or T4- combination of auxins. After the multiplication of cultures, calli recovery was performed, using aliquots of 20 μL of the cultures resuspended in MS medium in the treatments: auxins 2,4-D and picloram, in five different concentrations of 0; 6.77; 13.54; 20.31 and 27.08 μM each. For histological and histochemical analysis samples were taken from the different calli formed during the induction and recovery steps. Cytochemical analysis of cell cultures were also performed. In general, morphologically four types of calluses were observed in the induction of somatic embryogenesis: (1) gelatinous, (2) compact, (3) friable and (4) nodular compact. In friable calli the formation of pro-embryos was observed, a decisive characteristic for the progression of somatic embryos, and also the presence of starch grains. From the friable calli, it was possible to establish and multiply suspension cell cultures, which showed cells with embryogenic viability verified with cytochemical analysis. It was possible to perform the recovery calli with embryogenic potential from suspension cell cultures. Such calli showed a friable aspect and, from the anatomical analysis, somatic pro-embryos were observed.

Key-words: *Poaceae*, *Bambusoideae*, morphogenesis, nodal segment, histological analysis, cytochemical analysis.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país com maior biodiversidade em espécies de bambu nas Américas, com 35 gêneros e 266 espécies descritas, das quais, 75 % são endêmicas (Longhi-Wagner, 2012; Filgueiras et al., 2013; Filgueiras e Viana, 2017). Dos gêneros encontrados no país, o *Guadua* representa o terceiro maior do território nacional (Filgueiras e Viana, 2017).

Os bambus do gênero *Guadua* são endêmicos das Américas e distribuem-se em uma faixa relativamente longa que se estende desde o México até o sul da Argentina, sendo considerados como protagonistas da evolução cultural, social e econômica da América Latina (Londoño, 2002). Representantes do gênero *Guadua*, assim como outros bambus lenhosos, destacam-se em função do seu rápido crescimento, resistência, flexibilidade, adaptabilidade às diferentes condições edafoclimáticas, fácil manejo e alto rendimento em volume por área (Londoño, 2002; Peng e She, 2014; Clark et al., 2015).

Dentre as espécies representantes deste gênero, *Guadua* aff. *chaparensis* tem ampla distribuição na região da Amazônia Central, apresentando grande importância ecológica e econômica na região (Londoño e Zurita, 2008; Lizarazu et al., 2013). Apesar de sua importância econômica e da existência de vastas áreas nativas de bambu na região Amazônica, tornam-se necessários esforços para sua conservação e uso racional, pois são vulneráveis ao desmatamento (Bystriakova et al., 2003).

Ademais, o desenvolvimento de metodologias eficientes de propagação parece ser essencial, dadas as dificuldades de propagação por métodos convencionais, em razão da baixa viabilidade de sementes, difícil armazenamento de propágulos e inconstância de produção de sementes (Arya et al., 1999; Ramanayake et al., 2001; Vengala et al., 2008; BPG, 2012). De fato, a propagação vegetativa do gênero é difícil em razão do volume necessário de propágulos e dos baixos índices de enraizamento (Azzini e Salgado, 1993; Gallardo et al., 2008; Gielis et al., 2001; Islam et al., 2011; Kumar, 2012). Nesse contexto, a micropropagação se constitui como uma importante ferramenta para superar alguns entraves da cultura, como os citados previamente.

A micropropagação ou propagação *in vitro* é uma técnica em que partes de plantas são cultivadas de forma asséptica, em meio nutritivo e condições controladas e específicas, capazes de formar uma nova planta (George 2008; Reed et al., 2011). Dentre as técnicas de micropropagação, a embriogênese somática é de grande importância, pois uma vez dominada, pode permitir a produção de um elevado número de plantas em pequeno espaço físico (Litz e Gray, 1995).

A embriogênese somática é definida como o processo onde é possível a regeneração *in vitro* de plantas a partir de estruturas denominadas de embriões somáticos, semelhantes aos embriões zigóticos, mas que não são produtos da fusão de gametas (Litz e Gray, 1995; Namasivayam; Verdeil et al., 2007; Mudoj et al., 2013; Guan et al., 2016).

Os primeiros trabalhos sobre regeneração de plantas de bambus a partir da cultura de embriões somáticos são citados há pelo menos 50 anos (Alexander e Rao, 1968), embora a técnica tenha sido mais rotineiramente estudada a partir da década de 1980 (Mehta et al., 1982; Rao et al., 1985; Yeh e Chang et al 1986; Hassam e Debergh et al., 1987).

Desde então, várias investigações surgiram com o intuito de melhorar a metodologia, relacionados principalmente aos protocolos de produção para atender as diversas espécies desse grupo de plantas (Komatsu et al. 2011; Mehta et al., 2011; Bag et al., 2012; Yuan et al., 2013; Wei et al., 2015; Zang et al., 2016a; 2016b; Guo et al., 2017; Lin et al., 2018; Somashekar et al., 2018). No entanto, ainda que exista uma série de trabalhos, a maioria deles relata dificuldades quanto à regeneração dos embriões somáticos e o desempenho morfogênico pós-embriônico (Komatsu et al., 2011; Mudoj et al., 2013; Singh et al., 2013).

Até o presente momento, nada é descrito na literatura sobre o uso dessa metodologia, bem como o estabelecimento de cultivos celulares em suspensão para a espécie *G. aff. chaparensis*, objeto de estudos desse trabalho. Assim como a embriogênese somática, cultivos celulares em suspensão, podem permitir a indução, propagação e manutenção de células em meio líquido, favorecendo a maior taxa de divisão celular e, conseqüentemente, a capacidade de possibilitar a propagação clonal em escala exponencial das espécies (Litz e Gray, 1995; Cid, 1998; Teixeira et al., 2004; Vanisree et al., 2004; Matsumoto, 2006).

Assim, o desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática e o estabelecimento de cultivos celulares em suspensão configuram metodologias que podem contribuir para a propagação em larga-escala, bem como para a compreensão dos processos biológicos que envolvem as diversas espécies de bambu (Ogita et al., 2012; Mudoj et al.; Singh et al., 2013).

Nesse sentido, o estudo anatômico dos processos parece ser de fundamental importância, uma vez que o emprego desta técnica permite detalhar os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento da indução da embriogênese somática no material vegetal, fato que melhora o entendimento das alterações histológicas, além de se poder utilizar tais informações como marcadores morfológicos e anatômicos das etapas (Rodrigues et al., 2004; Gueye et al., 2009; Silva-Cardoso et al., 2019).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar os aspectos morfoanatômicos durante a fase de indução da embriogênese somática de *Guadua* aff. *chaparensis*, além do estabelecimento de cultivos celulares em suspensão e o reestabelecimento de calos com potencial embriogênico para a espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento

Os experimentos foram instalados e conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

3.2. Material vegetal

Para a obtenção dos calos, foram utilizados como materiais vegetais plantas de *Guadua* aff. *chaparensis*, introduzidas *in vitro* a partir de material de plantas matrizes coletadas às margens do Rio Purus, Estado do Acre, Brasil (Vale et al., 2019).

As plantas foram propagadas por micropropagação ao longo de sucessivos subcultivos de multiplicação, e mantidas como coleção *in vitro* em frascos de vidro transparente de 650 mL, contendo 70 mL de meio de MS líquido (Murashige e Skoog, 1962), suplementado de 20 g.L⁻¹ de sacarose. Os materiais foram cultivados em sala de crescimento com temperatura mantida em 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas e 100 μmol m⁻² s⁻¹ de luminosidade.

3.3. Indução da embriogênese somática

Para a obtenção de calos, foram utilizados como explantes segmentos nodais com cerca de 1,0 cm de comprimento contendo pelo menos uma gema. Os explantes foram inoculados em placa de Petri (15 x 90 mm) contendo 20 mL do meio de MS, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 500 mg.L⁻¹ de glutamina, 100 mg.L⁻¹ de cisteína e 2,5 g.L⁻¹ de phytigel.

A partir desta composição de meio foram estabelecidos os tratamentos. O tratamento controle foi livre de auxinas e os demais tratamentos suplementados com as auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (picloram) nas concentrações 11,1 μM e 22,2 μM cada. Em cada placa de Petri foram inoculados cinco explantes, que permaneceram sob essas condições até os 120 dias.

3.4. Cultivos celulares em suspensão

3.4.1. Estabelecimento da suspensão celular

Para os cultivos celulares em suspensão, aproximadamente 200 mg.L⁻¹ de calos friáveis obtidos na fase de indução da embriogênese somática foram inoculados em frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de meio MS líquido suplementado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, além dos aminoácidos caseína hidrolisada, glutamina, prolina e cisteína (100 mg.L⁻¹ cada) (adaptado de Ogita et al., 2005).

A partir desta composição de meio foram estabelecidos os tratamentos, sendo (T1) o controle livre de auxinas, e os demais tratamentos suplementados com auxinas (T2) 4,4 µM de picloram (T3) 4,44 µM de 2,4-D, ou (T4) a combinação dessas duas auxinas na concentração de 4,44 µM cada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 x 4), onde foram testadas quatro tempos de cultivo (0, 10, 20 e 30 dias) e os quatro tratamentos. Cada unidade experimental foi composta por um Erlenmeyer contendo 200 mg.L⁻¹ de massa fresca de calo friável.

As culturas foram mantidas em agitador orbital a 100 rpm na ausência de luz à temperatura de 25 ± 2 °C. Após 30 dias foi realizada uma análise qualitativa, onde os frascos que apresentaram visualmente grau de qualidade de suspensão, ou seja, volume de célula perceptível sem apresentar escurecimento no meio de cultura (oxidação), foram considerados estabelecidos.

3.4.2. Multiplicação da suspensão celular

Após estabelecimento da suspensão celular, o material foi filtrado em peneira de metal de 100 µm e alíquotas de 10 mL do material filtrado foi coletado com auxílio de uma pipeta graduada automática, sendo ressuspensionado em frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de novo meio nutritivo de mesma composição.

A partir desta composição de meio foram estabelecidos os tratamentos, sendo (T1) 4,44 µM de picloram, (T2) 4,44 µM de 2,4-D e (T3) a combinação dessas duas auxinas na concentração de 4,44 µM cada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (6 x 3), onde foram testadas seis tempos de cultivo de 30 dias cada e as três composições de meio. Cada unidade experimental foi composta por um Erlenmeyer contendo 10 mL do material filtrado, acrescido de 20 mL de meio nutritivo.

As culturas foram mantidas em agitador orbital a 100 rpm na ausência de luz à temperatura de 25 ± 2 °C. A cada 30 dias, durante 180 dias, o material celular dos frascos foi transferido para tubos Falcon graduados onde as suspensões foram deixadas em repouso por 30 minutos. Após esse período, os volumes celulares sedimentados foram anotados. O procedimento foi repetido após 30 minutos para a tomada da segunda leitura de volume. Esse volume das células obtido é conhecido como volume celular sedimentado (SCV) (Teixeira, 2004; Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006).

3.4.3. *Análise citoquímica*

Para a avaliação da presença de células embriogênicas dos cultivos celulares em suspensão foi realizada análise citoquímica por dupla colocação com Carmim acético e azul de Evans. Para tanto, foram coletadas, em microtubos (2 mL), alíquotas de 1 mL da fase líquida da suspensão celular selecionadas de cada frasco de Erlenmeyer e, após a decantação (1 h aproximadamente), o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta e então adicionados 100 µL do corante azul de Evans (0,1 %), o qual permaneceu em contato com as formações celulares por dois minutos. Após esse período, foi retirado o excesso do azul de Evans e adicionados 100 µL corante Carmim acético (2 %) pelo mesmo período de tempo (Durzan, 1988).

Por fim, foram adicionados em cada microtubo 200 µL de água glicerinada (50 %), dos quais foram distribuídas alíquotas de 20 µL em lâmina histológica. As amostras foram, então, cobertas por lamínula, submetendo as lâminas prontas à leves batidas com um bastão de vidro, para espalhamento do material. A seguir, as amostras foram fotografadas em microscópio de luz.

3.5. **Restabelecimento de calos com competência embriogênica**

Após uma série de subcultivos das suspensões celulares, foi realizada uma tentativa de restabelecimento de calos com potencial embriogênico. Para tanto, alíquotas de 20 µL do

cultivo foram selecionadas aleatoriamente dos frascos e ressuspensas em meio de MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 500 mg.L⁻¹ de glutamina, 100 mg.L⁻¹ de cisteína e 2,5 g.L⁻¹ de phytagel.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 5), onde foram avaliadas as duas auxinas: (ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 4-amino-3,5,5-tricloropicolínico (picloram), em cinco concentrações distintas de 0; 6,77; 13,54; 20,31 e 27,08 µM cada. Para tanto, foram utilizadas cinco repetições compostas por cinco unidades experimentais para cada repetição. Cada unidade experimental foi composta por uma placa de Petri (15 x 90 mm), contendo 20 mL do meio de cultura e seis alíquotas de 20 µL da suspensão celular.

O material foi mantido em sala de incubação na ausência de luz e à temperatura de 25 ± 2 °C. A cada 90 dias, foi mensurada a massa fresca de calos embriogênicos restabelecidos durante 360 dias de incubação, e no final do período foi calculada a TCM (taxa média de crescimento) conforme a seguinte fórmula:

$$TCM (\%) = [(\sum X)/t] \times 100$$

Onde, $\sum X$ é a somatória da média da massa fresca de calos ao longo do tempo e t é o tempo de cultivo.

3.6. Caracterização anatômica e histoquímica

Para as análises anatômicas, foram coletadas amostras dos diferentes calos formados nos tratamentos dos itens 2.3 e 2.5 dessa sessão, que foram fixadas em solução de formaldeído e glutaraldeído (Karnovsky, 1965) modificado (glutaraldeído 1 %; paraformaldeído 4 % em tampão fostato de sódio - NaH₂PO₄.H₂O e tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2) submetidas a vácuo (-400 mmHg) por 60 minutos, onde as amostras permaneceram por 24 h na solução.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas por meio de série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 e 100%, v/v) submetidas a vácuo (-400 mmHg) por 60 minutos cada. Em seguida, as amostras foram imersas em meio de infiltração Histo-resina (Leica®), segundo as especificações do fabricante. As amostras foram então emblocadas em Histo-resina (hidroxietil metacrilato) com endurecedor, conforme

recomendação do fabricante, e permaneceram por no mínimo 48 horas em estufa à temperatura de 60 °C.

Os blocos contendo as amostras foram seccionados à 5-7 µm de espessura com o uso de micrótomo rotativo manual (Leica[®], RM212RT). Posteriormente, as secções anatômicas obtidas foram aderidas às lâminas microscópicas sob uma placa aquecedora à 40 °C.

As secções foram coradas com azul de Toluidina (0,5 %, v/v) em tampão fosfato de sódio e ácido cítrico (Sakai, 1973) durante seis minutos, a fim de obter a caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos.

As secções também foram submetidas aos testes histoquímicos com *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para visualização de proteínas (Vidal, 1970), com *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'Brien e McCully, 1981) para identificar polissacarídeos neutros e com Lugol (Johansen, 1940) para detecção de grãos de amido. As lâminas foram montadas com lamínulas e preservadas em resina sintética (Entelan[®]), e posteriormente foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de Luz (Leica[®] DM750), com programa Leica Application Suite (LAS EZ), sendo as imagens capturadas em escala micrométrica.

3.7. Condições de cultivo

Para todas as etapas de cultivo *in vitro* descritas anteriormente (Figura 1), o meio de cultura de MS teve o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ com HCl (0,1M) e/ou NaOH (0,1M) e autoclavado a temperatura de 121 °C ($\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$) durante 20 minutos. Os materiais foram cultivados em condições de sala de crescimento com a temperatura mantida em $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ na ausência de luminosidade.

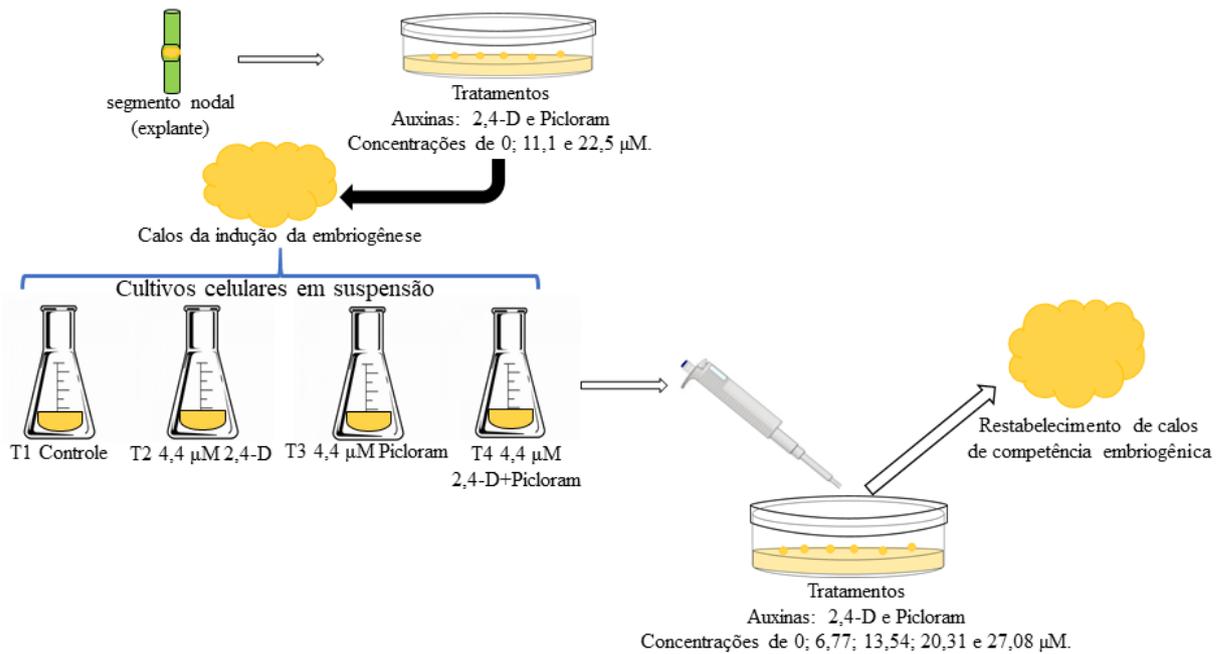


Figura 1. Esquema ilustrativo das etapas de indução da embriogênese somática, do estabelecimento de cultivos celulares em suspensão e do reestabelecimento de calos com competência embriogênica.

3.8. Análise dos dados

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Shapiro-Wilk ($P < 0,05$), a fim de verificar a homogeneidade de variância entre os tratamentos e a distribuição normal dos dados, respectivamente. Em seguida, foram realizadas análises de variância (ANOVA) e, de acordo com a significância, os dados foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os pacotes do programa R (R Development Core Team, 2012) foram utilizados para a análise estatística dos dados. As análises histológicas, hisoquímicas e citoquímicas foram caracterizadas por análise descritiva.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução da embriogênese somática

Durante o período de indução da embriogênese somática em *G. aff. chaparensis* foi observada a formação de calos em todo o explante. Ao fim de 120 dias, os calos foram caracterizados segundo seu aspecto morfológico e anatômico (Figura 2).

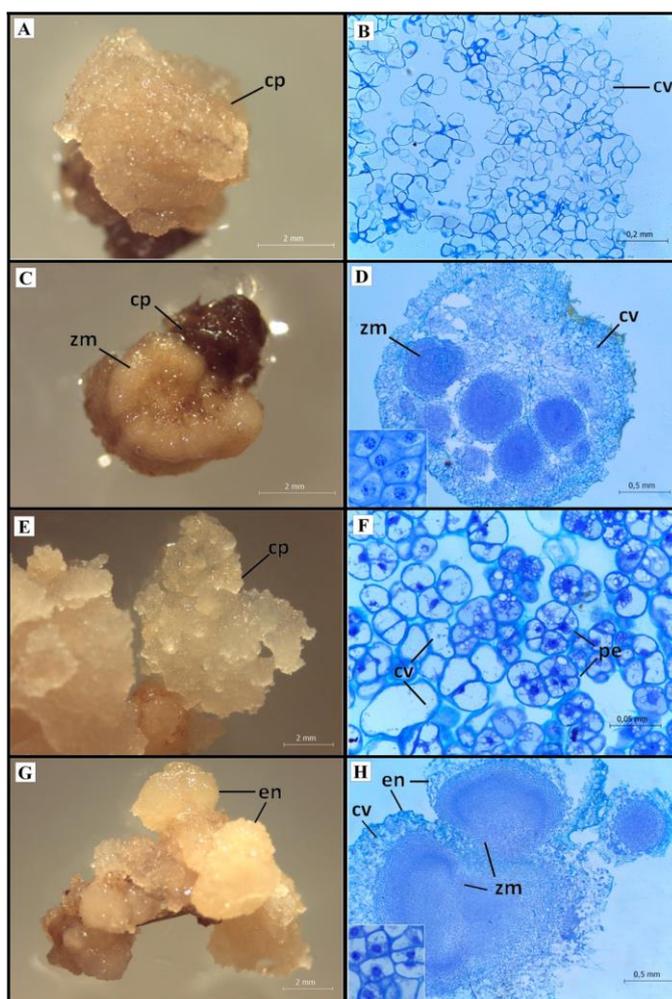


Figura 2. Aspectos morfológicos e anatômicos dos tipos de calos obtidos de segmentos nodais de *Guadua* aff. *chaparensis* aos 120 dias de cultivo em meio de indução para embriogênese somática. (A) Calo primário obtido em 11,1 μ M de 2,4-D (T1) e (B) seu aspecto anatômico, apresentando predominantemente células vacuoladas. (C) Calo primário obtido em 22,2 μ M de 2,4-D (T2) e (D) seu aspecto anatômico, evidenciando as zonas meristemáticas entre as células vacuoladas (detalhe das células da zona meristemática). (E) Calo primário obtido em 11,1 μ M de picloram (T3) e (F) seu aspecto anatômico apresentando formação de pró-embriões somáticos entre as células vacuoladas. (G) Calo nodular obtido em 22,2 μ M de picloram (T4) e (H) seu aspecto anatômico, evidenciando zonas meristemáticas nas estruturas nodulares do calo (detalhe das células da zona meristemática). Legenda: (cp) calo primário, (cv) células vacuoladas, (en) estruturas nodulares, (pe) pró-embriões, (zm) zona meristemática.

Inicialmente, a formação de calos primários foi observada nos explantes cultivados em meio de MS suplementado com 11,1 μM de 2,4-D (T1) que, em termos morfológicos, apresentaram coloração amarelada, de aspecto gelatinoso e superfície translúcida (Figura 2 A). Anatomicamente, este tipo de calo apresentou o predomínio de células vacuoladas (Figura 2 B).

Os calos primários formados na concentração de 22,2 μM de 2,4-D (T2) eram morfológicamente de consistência compacta e crescimento lento (Figura 2 C). Esses calos apresentaram anatomicamente células com características tipicamente meristemáticas (células de menor diâmetro, de formato isodiamétrico, algumas com núcleos volumosos evidentes e citoplasma denso). Neles foi possível observar o surgimento de zonas meristemáticas entre as células vacuoladas do calo primário (Figuras 2 D).

O meio de MS suplementado com 11,1 μM de picloram (T3) também induziu a formação de calos primários, que morfológicamente, apresentavam coloração amarelo-esbranquiçada, com aspecto friável e superfície brilhosa (Figura 2 E). Além do mais, anatomicamente, esses calos apresentaram a formação de células consideradas potencialmente embriogênicas, com as seguintes características: formato isodiamétrico, alta relação núcleo/citoplasma, núcleos volumosos, intensa coloração do citoplasma com o reagente azul de toluidina e presença de espaços intercelulares (Figura 2 F) (Rao et al., 1985; Yeh et al., 1986a; Ho e Chang, 1998; Zhang et al., 2010; Qiao et al., 2013). Ainda de acordo com as análises anatômicas desses calos, foram observados pró-embriões somáticos entre as células vacuoladas.

Já na concentração de 22,2 μM de picloram (T4), houve a formação de estruturas nodulares, onde anatomicamente ficou evidente o surgimento de zonas meristemáticas na região central e células vacuoladas nas adjacências do calo (Figuras 2 G-H).

Durante a indução da embriogênese somática indireta de bambu (fase primária com formação de calos), calos com potencial embriogênico e não embriogênico foram distinguíveis pelos aspectos relacionados especialmente à morfologia e coloração, que podem inclusive variar entre as espécies. Geralmente, calos compactos e de coloração variando entre bege a amarelo foram considerados embriogênicos pela maioria dos trabalhos em diferentes espécies de bambu (Rao et al., 1985; Woods et al., 1992; Sood et al., 2002; Gillis et al., 2007; Zhang et al., 2010; Komatsu et al.; Mehta et al., 2011; Godbole et al.; Lin et al., 2012; Yuan et al., 2013; Wei et al., 2015; Zang et al., 2016a; Zang et al., 2016b; Guo et al., 2017;

Somashekar et al., 2018). Alguns autores reportam ainda observações de centros meristemáticos formados por células isodiamétricas pequenas e com alta relação núcleo citoplasma dos calos embriogênicos (Zhang et al 2010, Komatsu et al., 2011; Mehta et al., 2011).

Usualmente, células com competência embriogênica em monocotiledôneas apresentam características específicas de origem embrionária ou meristemática (Fehér, 2006). Nesse contexto, Zhang et al. (2010) e Lin et al. (2012) sugerem que as plantas regeneradas seguiram tanto via organogênica quanto embriogênica nos calos nodulares, compactos e de coloração variando entre bege e amarelo. Qiao et al. (2013) confirmam que essas mesmas características foram observadas em calos com potencial organogênico.

No presente trabalho, pró-embriões foram observados apenas em calos friáveis, como apresentado na Figura 2 F, e os calos nodulares, compactos e branco-amarelados apresentaram centros meristemáticos evidentes na análise histológica. Além do mais, considera-se geralmente que os embriões somáticos são derivados de células únicas ou de células únicas dentro de uma massa pró-embriônica (origem unicelular), e centros meristemáticos também diferenciam embriões somáticos de origem multicelular (Litz e Gray, 1995; Gillis et al., 2007; Komatsu et al., 2011; Mehta et al., 2011).

A partir da análise histoquímica foram identificados amiloplastos (grãos de amido) nos tratamentos onde se utilizou 22,2 μ M de 2,4-D (T2), 11,1 μ M de picloram (T3) e 22,2 μ M de picloram (T4) (Figuras 3 A-F). Não foram observados corpos proteicos. Adicionalmente, não foram observados resultados histoquímicos no tratamento 11,1 μ M de 2,4-D (T1) para nenhum dos reagentes testados.

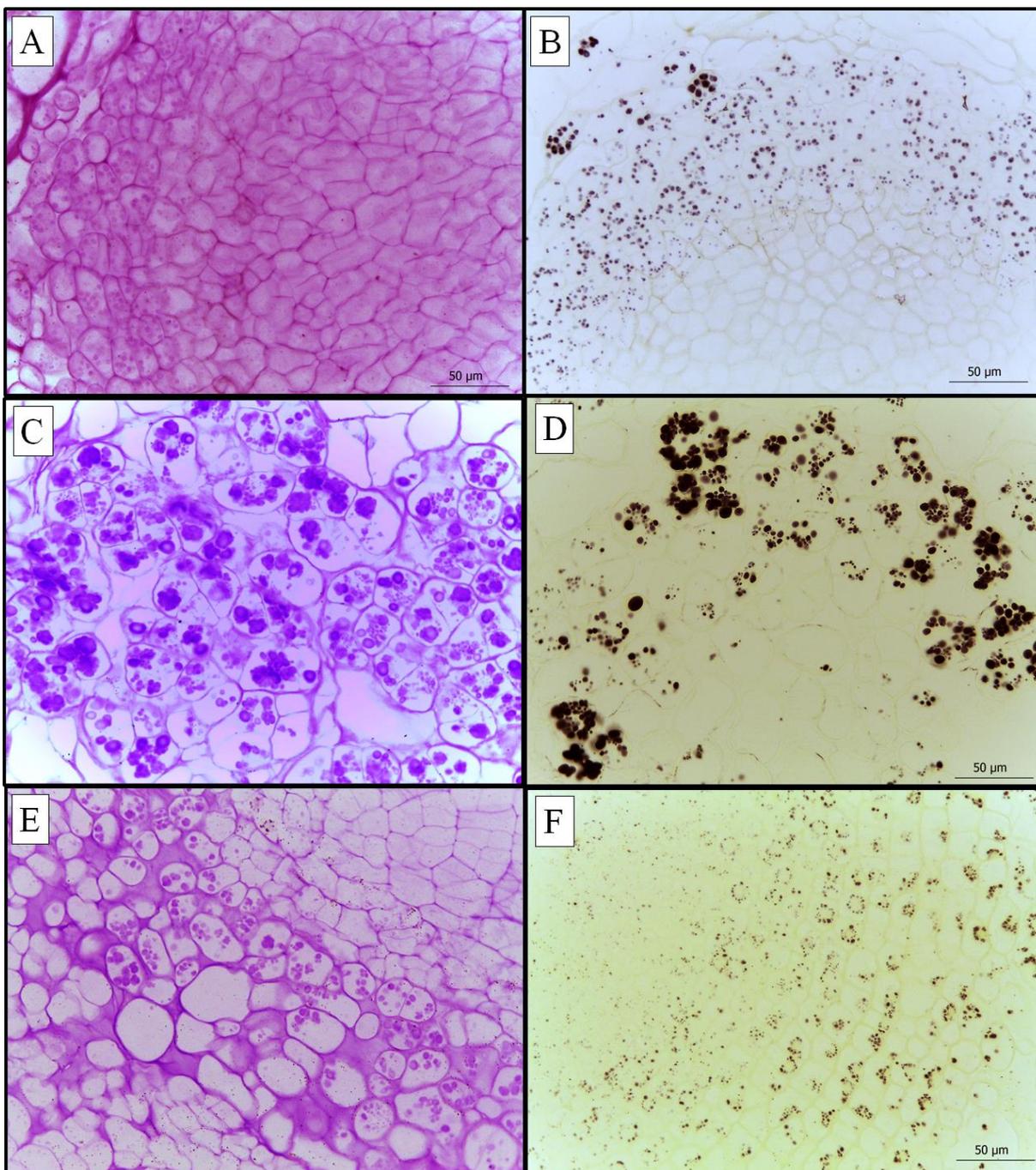


Figura 3. Análise histoquímica dos tipos de calos obtidos a partir de segmentos nodais de *Guadua* aff. *chaparensis* aos 120 dias de cultivo em meio de indução para embriogênese somática. Grãos de amido (amiloplastos) identificados com corante *Periodic Acid Schiff* – PAS e confirmados com corante Lugol em (A) 22,2 μ M de 2,4-D (T2), em (C) 11,1 μ M de picloram (T3) e em (E) 22,2 μ M de picloram (T4). E confirmados com corante Lugol em (B) 22,2 μ M de 2,4-D (T2), em (D) 11,1 μ M de picloram (T3) e em (F) 22,2 μ M de picloram (T4).

Como apresentado neste trabalho, polissacarídeos foram observados tanto em células com características meristemáticas, quanto em células com potencial embriogênico (calo com formação de pró-embrião) dos calos de *G. aff. chaparensis*. Isso supõe que grãos de amido

não podem ser considerados necessariamente marcadores histoquímicos para embriogênese somática em espécies de bambu.

Os grãos de amido observados possivelmente podem estar funcionando como uma fonte de energia às células que se encontram em intensa divisão celular (Silva-Cardoso et al., 2019). Isso deve-se ao fato de tecidos embriogênicos demandarem altos níveis de energia metabólica que são supridas por meio da hidrólise desse amido acumulado, sendo, portanto, de fundamental importância durante o desenvolvimento morfogênico da planta (Merkle et al., 1995; Godbole et al., 2002).

Tal fato foi confirmado por Sood et al. (2004) que observaram deposição de amido nas células dos calos de *Dendrocalamus hamiltonii*, onde a degradação dessa reserva foi iniciada no momento que houve a diferenciação dos embriões somáticos até a completa formação dos mesmos, e posteriormente sua germinação.

Grãos de amido já foram observados em calos de bambu com potencial embriogênico para outras espécies, como descrito para *Dendrocalamus strictus* (Rao et al., 1985), para *Bambusa beecheyana* (Yeh e Chang 1986b), para *D. hamiltonii* (Godbole et al., 2004; Sood et al., 2004) e para *Dendrocalamus latiflorus* (Qiao et al., 2013).

Neste sentido, o amido pode estar favorecendo o processo de divisão celular nos calos de *G. aff. chaparensis*, que podem vir a contribuir para os outros estágios da morfogênese *in vitro*, como por exemplo, a formação de embriões somáticos.

3.2. Estabelecimento e multiplicação de cultivos celulares em suspensão

A partir de calos friáveis obtidos da fase de indução da embriogênese somática de *G. aff. chaparensis*, realizou-se o estabelecimento de cultivos celulares em suspensão. De maneira geral, obteve-se culturas de consistência densa, com coloração branco-amarelada, de aspecto homogêneo e leitoso (Figuras 4 A-B).



Figura 4. Cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis* em (A) bandeja rotativa, (B) detalhe da cultura de consistência densa, com coloração branca amarelada, de aspecto homogêneo e leitoso.

Durante os primeiros 30 dias de cultivo, foi possível analisar o efeito das concentrações das auxinas sobre o estabelecimento dos cultivos celulares em suspensão ao longo do tempo (Figura 5). Primeiramente, observou-se que aos 10 dias de cultivo, os tratamentos T2- 4,44 μM de picloram (30 %), T3- 4,44 μM de 2,4-D (20 %) e T4-combinação de picloram e 2,4-D em 4,44 μM cada (20 %), não diferiram estatisticamente, exceto com relação ao controle (T1 = 0 %).

Já aos 20 dias de cultivo, notou-se um aumento do estabelecimento, apesar de ainda não ocorrer diferenças estatísticas entre os tratamentos T2 = 50 %, T3 = 30 % e T4 = 40 %, exceto controle (T1 = 0 %). No entanto, aos 30 dias de cultivo, foi perceptível que o T2- 4,44 μM de picloram foi substancialmente superior, proporcionando 70 % de estabelecimento, quando comparado aos demais tratamentos que atingiram T1 = 0 %, T4 = 40 % e T3 = 50 %.

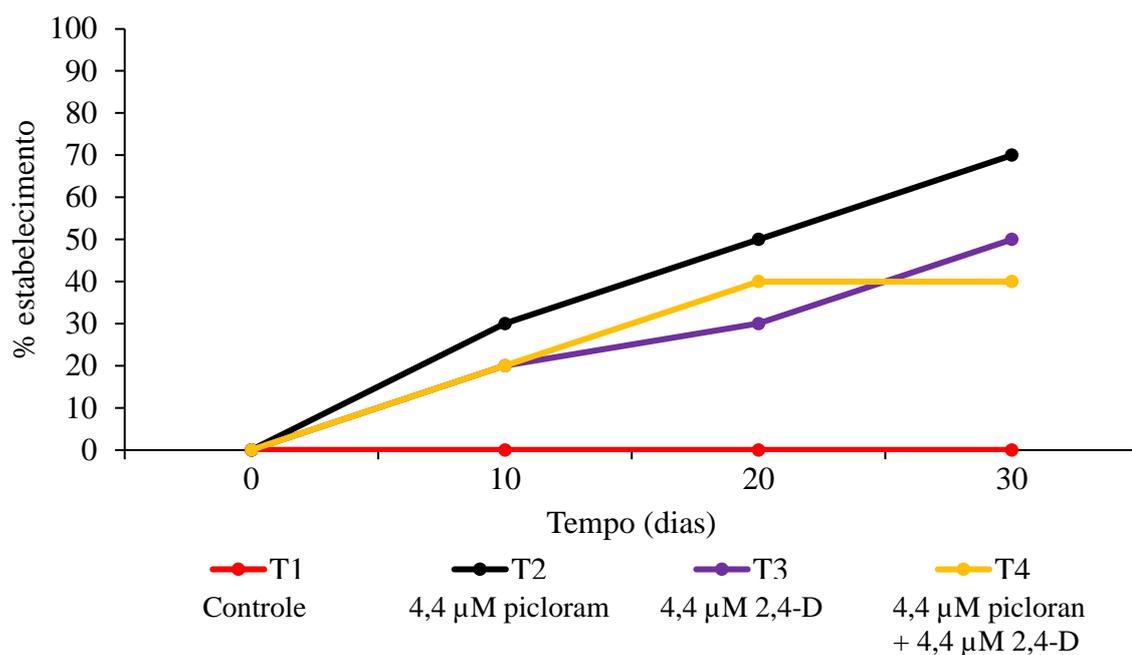


Figura 5. Porcentagem média do estabelecimento de cultivos celulares em suspensão de *Guadua aff. chaparensis* ao longo do tempo de cultivo.

Com o estabelecimento das suspensões celulares, procurou-se avaliar meios de cultura de multiplicação, a partir da verificação do crescimento (mL) por volume celular sedimentado (SCV) em função dos subcultivos. A ANOVA revelou interação positiva entre os fatores tratamento (T1 = 4,44 μM de picloram, T2 = 4,44 μM de 2,4-D e T3 = combinação de picloram e 2,4-D em 4,44 μM cada) e tempo (subcultivos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) (Figura 6).

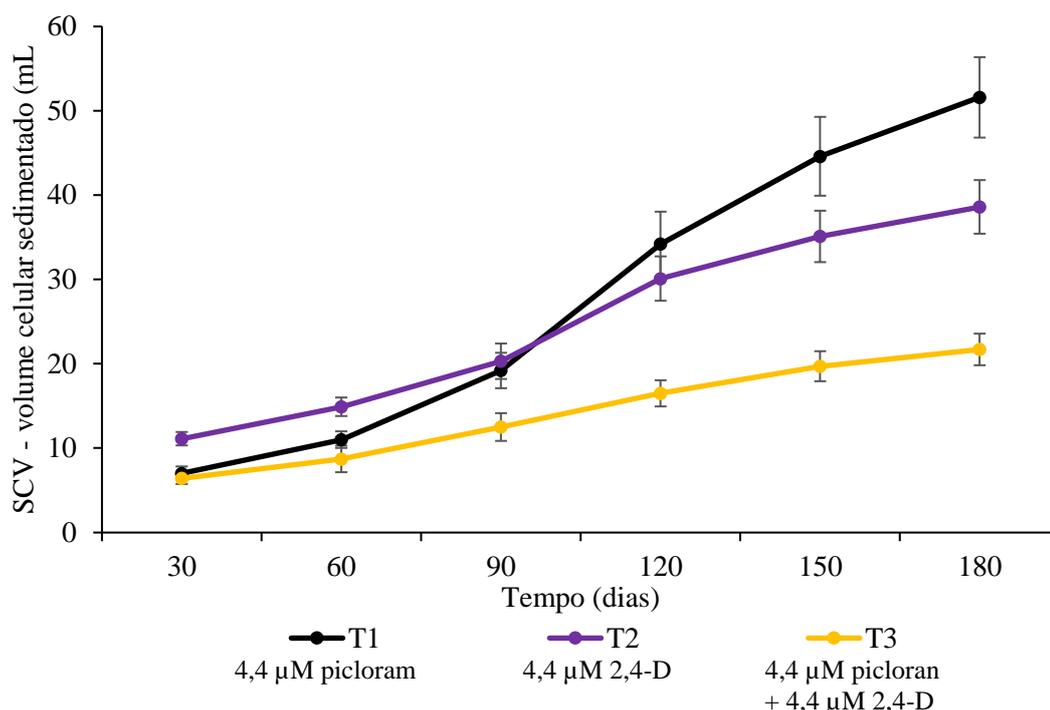


Figura 6. Crescimento dos cultivos celulares em suspensão de *Guadua aff. chaparensis* por SCV (volume celular sedimentado) ao longo do tempo (subcultivos). Valores do gráfico representados pelas médias com erro padrão.

Os subcultivos realizados entre 30, 60 e 90 dias, independentemente do meio de multiplicação utilizado, proporcionaram o mesmo padrão de crescimento para as suspensões celulares de *G. aff. chaparensis*. Já aos 120 dias de cultivo, verificaram-se valores estatisticamente diferentes entre os tratamentos, onde T1- 4,44 µM de picloram e T2- 4,44 µM de 2,4-D apresentaram maior crescimento de SCV (34,2 mL e 30,1 mL, respectivamente), seguido de T3- combinação de picloram e 2,4-D em 4,44 µM cada (16,5 mL). Aos 150 dias, T1 proporcionou o maior crescimento médio dos cultivos celulares atingindo 44,6 mL de SVC, seguido de T2 com 35,7 mL e T3 com 19,7 mL. Novamente, aos 180 dias, o mesmo padrão de crescimento contínuo foi observado nos cultivos celulares em T1, que atingiu 51,6 mL de SCV, indicando o efeito superior desse tratamento em relação aos demais (T2 = 38,6 mL e T3 = 21,7 mL).

Poucos estudos foram realizados em cultivos celulares em suspensão para espécies de bambus (Huang et al., 1989; Ramanayake e Wanniarachchi, 2003; Ogita 2005; Ogita et al., 2012; Akker et al., 2015). Estudo relacionados a essa metodologia podem fornecer uma ferramenta não apenas para entender os eventos biológicos, fisiológicos e moleculares das plantas de bambu, mas também para desenvolver novas utilidades das células de bambu para

aplicações industriais e biotecnológicas, como por exemplo, a transformação genética de plantas e obtenção de metabólitos secundários (Ogita et al., 2012; Mudoj et al., 2013).

Para avaliação da presença de células embriogênicas dos cultivos celulares em suspensão, foi realizada análise citoquímica com dupla coloração com Carmim acético e azul de Evans, a partir da qual foi possível confirmar que os tratamentos apresentaram aglomerado de células vermelhas (Figura 7).

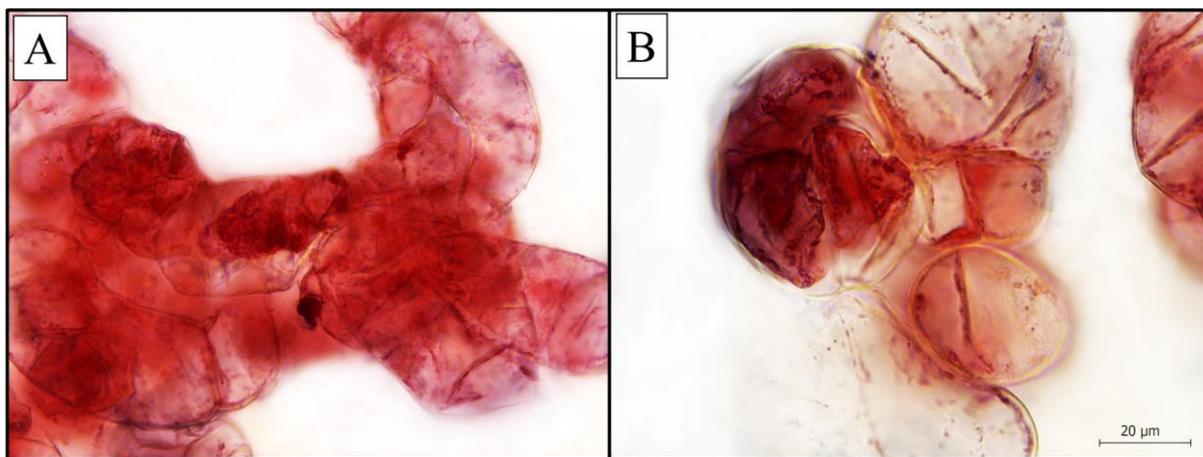


Figura 7. Análise citoquímica com Carmim acético e azul de Evans para verificação da viabilidade embriogênica dos cultivos de celulares em suspensão em *Guadua* aff. *chaparensis*.

Cultivos celulares em suspensão podem apresentar ou não, características embriogênicas, e os testes colorimétricos podem ser utilizados para determinação da viabilidade celular, dos quais os corantes Carmim acético e azul de Evans refletem na integridade das estruturas celulares como o núcleo e membrana plasmática (Báez et al., 2002; Pline et al., 2002). Neste sentido, células potencialmente embriogênicas geralmente caracterizam-se por apresentarem-se isodiamétricas, pequenas e com citoplasma denso, formando agregados que são reativos ao Carmim acético corando-se em vermelho (Steiner et al., 2005).

Até o presente momento, cultivos celulares com viabilidade embriogênica foram relatados para *Dendrocalamus giganteus*, onde foi constatado uma expressão transitória da organização celular para desenvolver estruturas que se assemelhavam à pró-embriões (Ramanayake e Wanniarachchi, 2003). Estes mesmos autores mantiveram as culturas por um período de dois anos.

Adicionalmente, para *Bambusa rotunda*, foi desenvolvido um protocolo otimizado para estabelecimento de uma cultura embriogênica a partir de cultivos celulares em

suspensão, que deram origem à embriões somáticos e, seguidamente, a regeneração das plantas (Wong et al., 2013).

O estabelecimento, a multiplicação e a caracterização da viabilidade embriogênica dos cultivos celulares de *G. aff. chaparensis* apresentadas no presente estudo, podem viabilizar estudos relacionados à fisiologia, preservação de germoplasma, propagação em massa e análises moleculares para transformação genética, inclusive para outras espécies de bambu.

3.3. Restabelecimento de calos com competência embriogênica

Após sucessivos subcultivos das suspensões celulares foi realizada a tentativa de restabelecer calos embriogênicos a partir das mesmas. Para tanto, alíquotas de 20 µL foram selecionadas aleatoriamente dos frascos e colocadas sobre meio semi-sólido, onde foram avaliadas as auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido 4-amino-3,5,5-tricloropicolínico (picloram), nas concentrações de 0; 6,77; 13,54; 20,31 e 27,08 µM cada. Os resultados desse experimento são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Crescimento da massa fresca (mg) de calos com competência embriogênica restabelecidos a partir de cultivos celulares em *Guadua aff. chaparensis*.

AUXINA	Concentração µM	TEMPO DE CULTIVO			
		90 dias	180 dias	270 dias	360 dias
2,4-D	0	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 aA
	6,77	7,8 ± 5,6 aB	0,0 ± 0,0 aB	0,0 ± 0,0 aB	0,0 ± 0,0 aA
	13,54	4,6 ± 4,5 aB	0,0 ± 0,0 aB	0,0 ± 0,0 aB	0,0 ± 0,0 aA
	20,31	4,8 ± 4,8 aA	3,1 ± 3,1,7 aA	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 aA
	27,08	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 bA	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 aA
Picloram	0	0,0 ± 0,0 bA	0,0 ± 0,0 bA	0,0 ± 0,0 bA	0,0 ± 0,0 aA
	6,77	75,3 ± 26,5 bA	27,6 ± 14,6 abA	13,9 ± 7,9 abA	0,0 ± 0,0 aA
	13,54	181,2 ± 45,6 aA	59,4 ± 20,4 aA	26,6 ± 10,0 aA	4,1 ± 4,1 aA
	20,31	60,6 ± 34,1 bA	27,6 ± 3,9 bA	3,7 ± 3,7 bA	0,0 ± 0,0 aA
	27,08	26,5 ± 16,2 bA	7,3 ± 7,2 bA	0,0 ± 0,0 bA	0,0 ± 0,0 aA

Médias com letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Analisando o efeito das concentrações de auxinas na média do crescimento da massa fresca (mg) de calos restabelecidos, observou-se que 2,4-D respondeu melhor aos 90 dias de cultivo, não diferindo estatisticamente entre as concentrações testadas, inclusive com o tratamento controle (0 µM). Ao contrário, picloram apresentou resultados estatisticamente maiores já aos 90 dias de cultivo, onde a concentração 13,54 µM foi considerada como o melhor tratamento por proporcionar 181,2 mg de massa fresca de calo.

Ainda analisando os 90 dias de cultivo, outras concentrações de picloram apresentaram números interessantes, atingindo decrescentemente médias de 75,3 mg (6,77 μM) e 60,57 mg (20,31 μM).

Aos 180 dias de cultivo, foi perceptível o declínio do crescimento médio da massa fresca de calos para as duas auxinas testadas (2,4-D e picloram). Isso foi verificado em razão do 2,4-D não apresentar resultados satisfatórios, e apenas em 20,31 μM foi notado irrisório valor de 3,10 mg. Contudo, em 13,54 μM de picloram obteve-se crescimento médio de massa fresca superior (59,43 mg), seguido de 6,77 μM e 20,31 μM (27,63 mg).

Não foi notado crescimento de massa fresca de calos restabelecidos aos 270 e 360 dias de cultivo nas diferentes concentrações da auxina 2,4-D. Apesar de discretos valores, picloram continuou apresentando crescimento de massa fresca de calos, atingindo 26,63 mg em 13,54 μM , 13,90 mg em 6,77 μM e 3,67 mg em 20,31 μM aos 270 dias. Aos 360 dias, apenas 6,77 μM de picloram exibiu crescimento de massa fresca de calos, alcançando 4,10 mg.

Para um melhor entendimento sobre a dinâmica de crescimento dos calos restabelecidos, foi realizado o cálculo da TCM (taxa média de crescimento) ao longo dos 360 dias de cultivo (Figura 8).

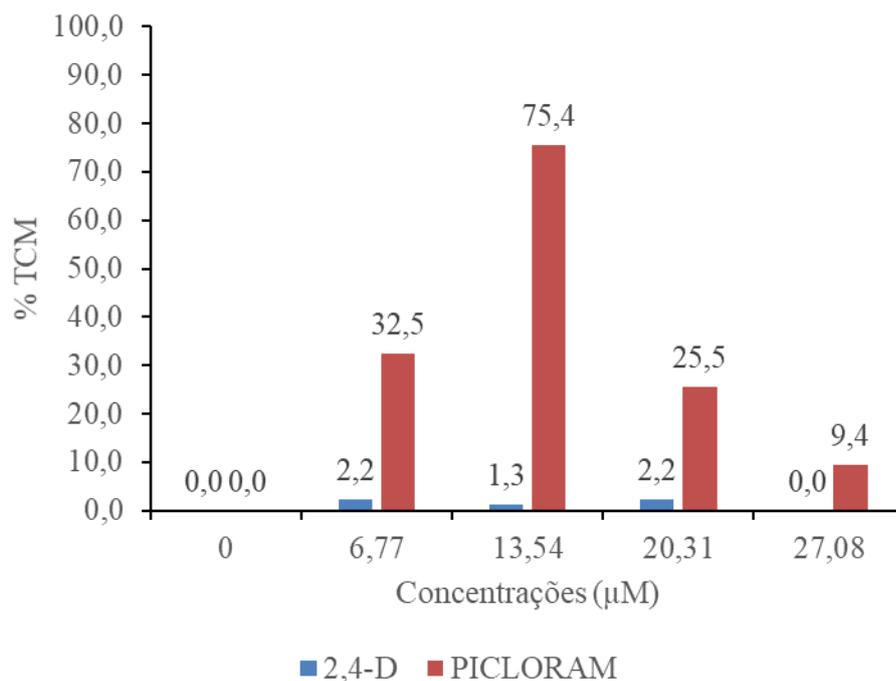


Figura 8. Taxa média do crescimento (% TCM) de calos restabelecidos com competência embriogênica a partir de cultivos celulares em suspensão de *Guadua aff. chaparensis* ao longo de 360 dias de incubação.

De maneira geral, verificou-se evidente superioridade da auxina picloram comparada à 2,4-D ($\leq 2,2$ %), independente da concentração. Em picloram, notou-se ainda que a melhor concentração foi de 13,54 μM , alcançando 75,4 % de TCM de calos. Esse resultado indica que esse tratamento fornece as melhores condições para potencializar o crescimento.

As concentrações 6,77 μM e 20,31 μM apresentaram 32,5 % e 25,5 % respectivamente, e em 27,8 μM apenas 9,4 % de TCM de calos foram restabelecidos, valores considerados baixos quando comparados aos observados no tratamento com 13,54 μM de picloram.

A utilização de 2,4-D na indução de calos embriogênicos em bambu é descrita por diversos autores, sendo que em sua maioria, foi utilizado as concentrações entre 4,51 μM e 13,54 μM (Rao et al., 1985; Hassam e Debergh, 1987; Yeh e Chang, 1986b; Tsay et al., 1990; Woods et al., 1992; Rout e Das, 1994; Godbole et al., 2002; Sood et al., 2002; Gilliis et al., 2007; Mehta et al., 2011; Bag et al.; Lin et al., 2012; Yuan et al., 2013; Zang et al., 2016a; Zang et al. 2016b; Guo et al., 2017; Somashekar et al., 2018).

Contudo, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, a utilização da auxina picloram, principalmente na concentração 13,54 μM , foi considerada factível para o restabelecimento de calos com competência embriogênica, a partir de cultivos celulares em suspensão (Ver figura 8).

Em trabalhos envolvendo embriogênese somática em bambus, até o momento, a auxina picloram foi descrita apenas para a espécie *Phyllostachys bambusoideae*, onde a concentração indicada pelos autores é de aproximadamente 36 μM (Komatsu et al., 2011), e para a espécie *Phyllostachys nigra*, na qual os autores ressaltam que concentrações acima de 30 μM representaram efeito tóxico na cultura (Ogita, 2005). Essas informações sugerem ainda que, concentrações adequadas devem ser testadas, de modo a promover estímulos na capacidade morfogênica do processo.

Em termos morfológicos, verificou-se que aos 7 dias de cultivo as alíquotas dos cultivos celulares começaram a formar aglomerados de calos microscópicos na superfície do meio de cultura (Figura 9 A). Aos 30 dias de cultivo, essas aglomerações já tomaram formas perceptíveis de microcalos ainda sem aspecto definitivo. Aos 60 dias de cultivo, os calos restabelecidos eram mais visíveis (≥ 2 mm) e apresentavam coloração branco-amarelada, de aspecto friável e de superfície brilhosa (Figura 9 B). Aos 90 dias de cultivo, houve evidente crescimento dos calos que mantiveram a mesma morfologia até os 270 dias (Figuras 9 C-F).

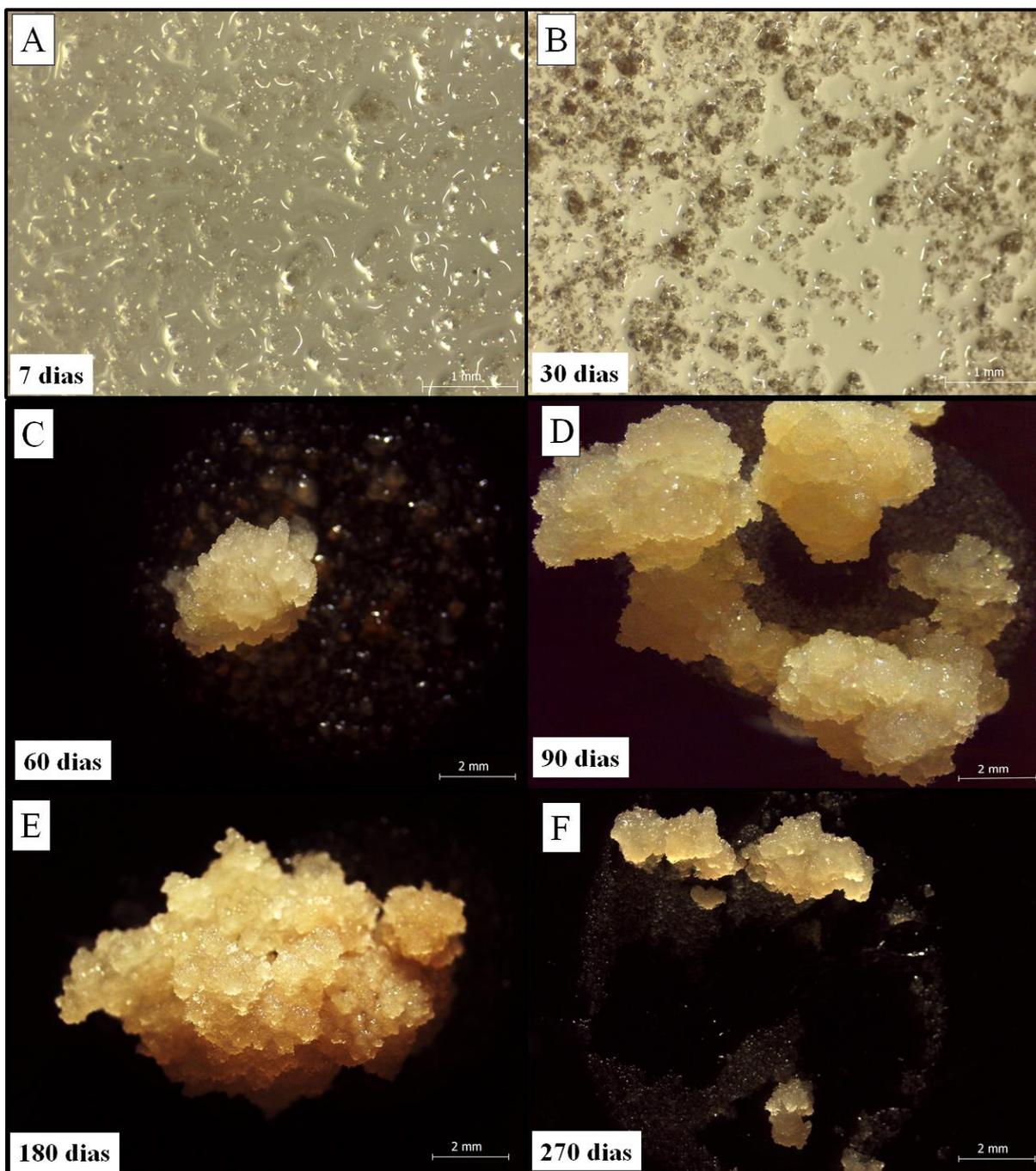


Figura 9. Aspectos morfológicos do crescimento dos calos restabelecidos a partir de cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis* ao longo do tempo. (A) Notáveis calos microscópicos. (B) Microcalos em abundância. (C-F) Calos friáveis, de coloração branco-amarelada e superfície brilhosa.

A análise anatômica dos calos restabelecidos demonstrou conjunto de células com alta competência embriogênica com formato isodiamétrico, alta relação núcleo/citoplasma, núcleos volumosos, espaços intercelulares e intensa coloração do citoplasma (Rao et al., 1985; Yeh et al., 1986a; Ho e Chang, 1998; Zhang et al., 2010; Qiao et al., 2013). Além disso, pró-embrões somáticos foram observados (Figura 10 A).

A partir da análise histoquímica, foi identificada profusão de amiloplastos (grãos de amido) (Figura 10 B), fato confirmado com o corante Lugol (Figura 10 C). Não foram observados corpos proteicos (Figura 10 D).

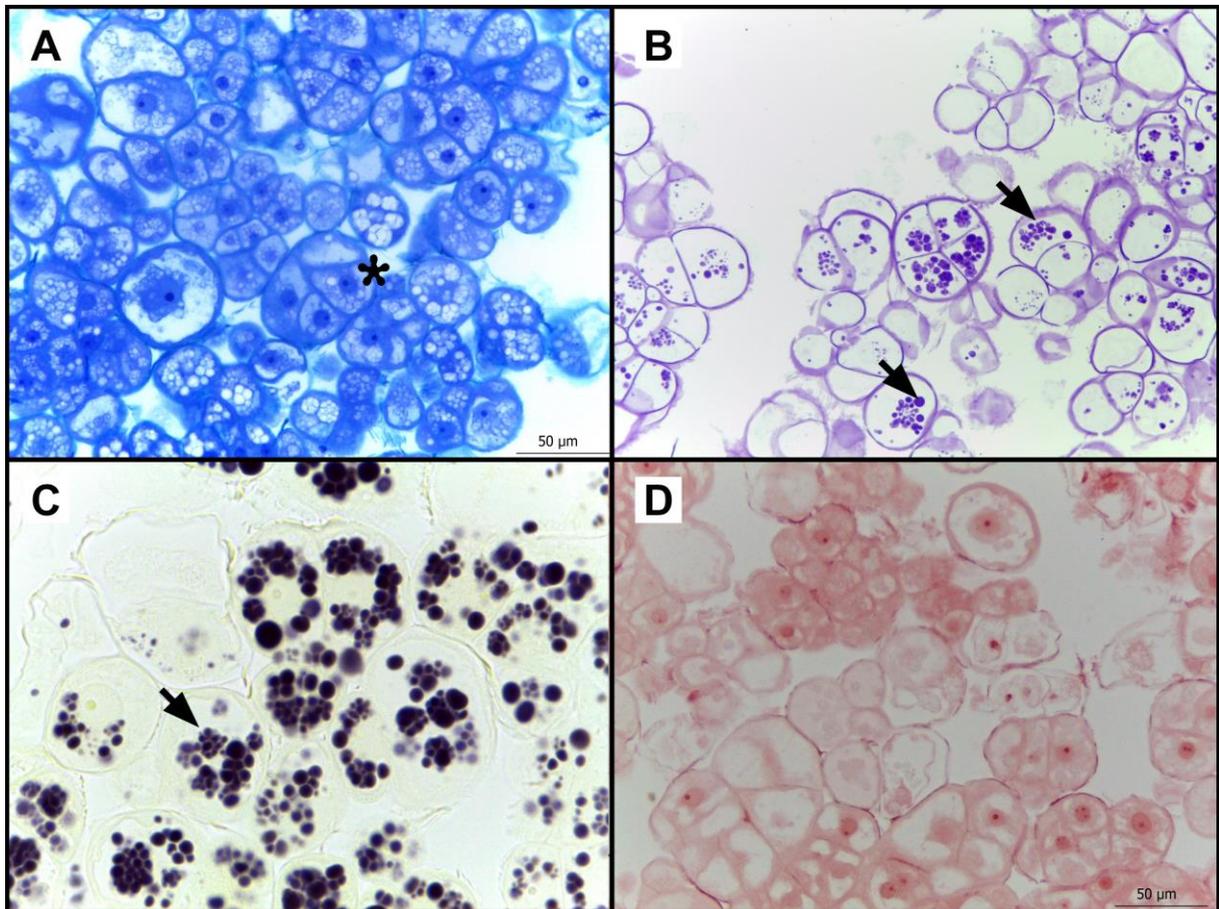


Figura 10. Análise anatômica e histoquímica dos calos restabelecidos a partir de cultivos celulares em suspensão de *Guadua* aff. *chaparensis*. (A) Células apresentando alta competência embriogênica coradas com azul de Toluidina, e asterisco (*) indicando formação de pró-embrião, (B) grãos de amido identificados com corante *Periodic Acid Schiff* - PAS, seta indicando no detalhe, (C) e confirmados com corante Lugol, seta indicando no detalhe, (D) não foram identificados corpos proteicos com o corante *Xylidine Ponceau* - XP.

Grãos de amido já foram observados nos estágios iniciais do processo de embriogênese somática para as espécies de bambu *D. strictus* (Rao et al., 1985) e *D. hamiltonii* (Godbole et al., 2002; Sood et al., 2002). Segundo Silva-Cardoso et al. (2019), a síntese de amido pode estar relacionada à mobilização/uso dos corpos lipídicos como fontes de energia necessárias ao processo embriogênico.

Essa informação pode ser corroborada por Godbole et al. (2002) que, ao analisar deposição de amido e acúmulo de amilase desde a fase da indução da embriogênese somática até a maturação dos embriões somáticos em *D. hamiltonii*, observaram acúmulo de grãos de

amido no novo broto do segmento nodal, na formação inicial de calo, até a proliferação de calos em estágio globulares. Os autores confirmaram ainda, que a deposição de amido foi sendo degradada pela enzima α -amilase concomitantemente ao processo de alongamento celular e desenvolvimento escutelar, ocorrendo o decréscimo adrupto com a germinação dos embriões somáticos.

Portanto, os grãos de amido observados nos calos podem estar atuando como fonte de energia para suprir a demanda de divisões celulares e a sucessiva formação de células com potencial embriogênico e os pró-embriões. Estas observações ressaltam a ideia de que as reservas polissacarídicas nessa fase são fundamentais para os posteriores processos morfogênicos.

4 CONCLUSÃO

O explante segmento nodal responde satisfatoriamente à formação de calos primários em *Guadua* aff. *chaparensis*, e esses calos apresentaram quatro características distintas morfológicamente: (1) gelatinoso translúcido, (2) compacto (3) friável e (4) compacto nodular. Anatomicamente, os calos friáveis oriundos do tratamento 11,1 μM de picloram, apresentaram a formação de pró-embriões somáticos entre as células vacuoladas, conferindo potencial embriogênico para esse tipo de calo.

A partir de calos friáveis é possível estabelecer e multiplicar cultivos celulares em suspensão, dos quais o tratamento 4,4 μM de picloram, apresentaram as maiores taxas médias para esses fins. Com a análise citoquímica foi possível confirmar que todas as culturas apresentaram células com viabilidade embriogênica.

É possível o restabelecimento de calos com potencial embriogênico a partir dos cultivos celulares em suspensão, e para essa finalidade o tratamento 13,54 μM de picloram apresentou maiores taxas de crescimento médio. Tais calos apresentaram coloração branco-amarelada, de aspecto friável e de superfície brilhosa e, a partir da análise anatômica, foram observados pró-embriões somáticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKER, S. V.; BORMANS, P.; PEETERS, H.; PRINSEN, E.; GIELIS, J. Cytokinin dynamics in cell suspension cultures of *Bambusa balcooa* Roxburgh using UPLC-ESI/MS/MS. In: **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v. 28, n. 1, p. 32-39, 2015.
- ALEXANDER, M. P.; RAO, T. C. *In vitro* culture of bamboo embryos. **Current Science**, v. 37, p. 415, 1968.
- ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; ARYA, I.D. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 10, p. 879-882, 1999.
- ARYA S.; SATSANGI, R.; ARYA, I. D. Large scale production of edible bamboo *Dendrocalamus asper* through somatic embryogenesis. **Journal American Bamboo Society**, v. 21, p. 13-23, 2008.
- AZZINI, A.; SALGADO, A. L. B. Enraizamento de propágulos de bambu em diferentes substratos. **Bragantia**, Campinas, v. 52, n. 2, p. 113-118, 1993.
- BAG, N.; PALNI, L. M. S.; CHANDRA, S.; NANDI, S. K. Somatic embryogenesis in 'Maggar' bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii*) and Field performance of regenerated plants. **Current Science**, v. 102, p. 1279-1287, 2012.
- BAMBOO PHYLOGENY GROUP. An update tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v.24, n.1, p.1-10, 2012.
- BÁEZ, P.; RIVEROS, M.; LEHNEBACH, C. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in South Chile. **New Zealand Journal of Botany**, v. 40, n. 4, p. 671-678, 2002.
- BERALDO, A. L.; AZZINI, A. **Bambu: características e aplicações**. Guaíba: Livraria Editora Agropecuária, 2004. 180p.
- BYSTRIAKOVA, N., KAPOV, V., LYSENKO, I. Bamboo Biodiversity: Africa Madagascar and the Americas. UNEP-WCMC/INBAR., 2003.
- CARDOSO, I. M. A. S. **Embriogênese somática de gueroba [*Syagrus olearacea* (Mart.) Becc.] com ênfase em aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais**. Tese de doutorado em Ciências Florestais – Universidade de Brasília, 359 p., 2018.
- CARVALHO, A. L.; 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**, v. 8, n. 1, 2013.
- CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, p. 331-353, 1998.

CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. Bamboo taxonomy and habitat. In: Liese, W.; Kohl, M. (eds) **Bamboo, tropical forestry**, p. 1-30, 2015.

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**, v.47, p.226-260, 2008.

DURZAN, D. J. Applications of cell and tissue culture in tree improvement. In: **Applications of Plant Cell and Tissue Culture**. Ciba Foundation Symposium 137. Wiley, Chichester, p. 36-58, 1988.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; OTVOS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v. 57, p. 5-12, 2002.

FILGUEIRAS, T. S.; OLIVEIRA, R. P.; SFAIR, J. C.; MONTEIRO, N. P.; BORGES, R. A. X. Poaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Ed.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 858-881, 2013.

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.

GALLARDO, J.; FREIRE, M.; LEÓN, J.; GARCÍA, Y.; PÉREZ, S.; GONZÁLEZ, M. Comportamiento em labrotación de las yemas de estacas de *Guadua angustifolia* Kunth empleadas en la propagación. **Cultivos tropicales**, v. 29, n. 1, p. 17- 22, 2008.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. In: MERRIOTT, E. F. G.; HALL, M. A.; KLERK, G-J. (Eds). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer Science+Business Media, p.1-28, 2008.

GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K.; OPRINS, J.; DEBERGH, P.C. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v. 552, p. 195-203, 2001.

GILLIS, K.; GIELIS, J.; PEETERS, H.; DHOOGHE, E.; OPRINS, J.; Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxb as basis formass production of elite forestry bamboos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, p. 115-123, 2007.

GODBOLE, S.; SOOD, A.; THAKUR, R.; SHARMA, M.; AHUJA, P. S. Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. **Current Science-Bangalore**-, v. 83, n. 7, p. 885-888, 2002.

GUAN, Y.; LI, S. G.; FAN, X. F.; SU, Z. H. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 938, p. 1-12, 2016.

GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE. P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; TRANBARGER, T. J.; SANE, D.; TREGGAR, J. W.; BORGEL, A.; VERDEIL, J. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in

response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 1, p. 35-45, 2009.

GUO, X.; JI, L.; ZHU, L.; SONG, L.; LIU, S.; ZANG, Q.; LIN, X. Bamboo *NiR* gene is associated with regeneration capacity. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 2017. DOI: 10.1080/14620316.2017.1353894.

HASSAM, A. A.; DEBERGH, P. Embryogenesis and plantlet development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (Young) McClure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 10, p. 73-77, 1987.

HUANG, L.; CHEN, W.; HUANG, B. Tissue culture investigations of bamboo. III. A method for viable protoplast isolation from *Bambusa* cells of liquid suspension culture. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 30, p. 49-57, 1989.

ISLAM, M.S.; BHUIYAN, M.K.; HOSSAIN, M.M.; HOSSAIN, M.A. Clonal propagation of *Bambusa vulgaris* by leafy branch cuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 22, n. 3, p. 387-392, 2011.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, n. 523 p. 1940.

KOMATSU, Y. H.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; BRONDANI, G. E.; GONCLAVES, A. N.; ALMEIDA, M. D. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forest Research**, v. 22, p. 209-215, 2011.

KUMAR, A. Macroproliferation technology for raising large scale plantations of sympodial bamboos. In: 9th World Bamboo Congress, **Proceedings...** University of Antwerp, Belgium, p.163-176, 10-15 April, 2012.

LIN, C. S.; LIN, C. C.; CHANG, W. C. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p. 75–82, 2004.

LIN, X.; HUANG, L.; FANG, W. Bamboo Regeneration via Embryogenesis and Organogenesis. INTECH Open Access Publisher, 2012.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 416-425, 1995.

LIZARAZU, M. A.; AGRASAR, Z. E. R.; VEGA, A. S. A New Species of *Guadua* (Poaceae, Bambusoideae, Bambuseae) and Synopsis of Genis in Argentina and Neighboring Regions. **Systematic Botany**, v.38, n.4, p. 1062-1075, 2013.

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: agosto, 2018.

LONDOÑO, X.; ZURITA L. E. Two new species of *Guadua* (Bambusoideae: Guaduinae) from Colombia and Bolivia. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v. 2, p. 25-34, 2008.

LONGHI-WAGNER, H. M. Poaceae: an overview with reference to Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 89-100, 2012.

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. 2ed. Totowa: Humana, 2006, 416 p.

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão: focalizando a bananeira**. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa 126. 24p. Brasília 2006.

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. **Journal of Forestry Research**, v. 130, p. 729–736, 2011.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Springer Netherlands, p. 155-203, 1995.

MUDOI, K.D.; SAIKIA, S.P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal Biotechnology**, n. 12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, v. 15, p. 473-479, 1962.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organic Culture**, v. 90, p. 1–8, 2007.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OGITA, S. Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. **Plant Biotechnol**, v. 22, p. 119-125, 2005.

OGITA, S.; NOMATU, T.; KISHIMOTO, T.; KATO, Y. A novel xylogenic suspension culture model for exploring lignification in *Phyllostachys* bamboo. **Plant Methods**, n. 8, v. 40, p. 1-9, 2012.

OJHA, A.; VERMA, N.; KUMAR, A. *In vitro* micropropagation of economically important edible bamboo (*Dendrocalamus asper*) through somatic embryos from root, leaves and nodal segments explants. **Research on Crops**, v. 10, p. 430-436, 2009.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 112, p. 701-720, 2014.

PEREIRA, M. A.; BERBALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru: Canal 6 Editora, 2008. 240p

PLINE, W. A.; EDMISTEN, K. L. OLIVER, T.; WILCUT, J. W.; WELLS, R.; ALLEN, N. S. Use of digital image analyses, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, v. 42, n. 6, p. 2193-2200, 2002.

QIAO, G.; LI, H.; LIU, M.; JIANG, J.; YIN, Y.; ZHANG, L.; ZHUO, R. Callus induction and plant regeneration from anthers of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, DOI 10.1007/s11627-013-9498-8. 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **Na introduction to R. Notes on R: a programming environment for data analysis and graphics**. Version 2.15.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-12-7, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 18 out. 2012.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; WANNIARACHCHI, W. A. V. R.; TENNAKOON, T.M.A. Axillary shoot proliferation and in vitro flowering in an adult giant bamboo *Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 5, p. 667–671, 2001.

RAMANAYAKE, S. M. S. D; WANNIARACHCHI, W. A. V. R. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 195-200, 2003.

RAO, I. U.; RAO, I. R.; NARANG, V. Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. **Plant cell reports**, v. 4, n. 4, p. 191-194, 1985.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, v. 1, p. 1-4, 2011.

ROUT, G. R.; DAS, P. Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of 3 species of bamboo. **Plant cell reports**, v. 13, n. 12, p. 683-686, 1994.

SAXENA, S.; DHAWAN, V. Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 438-443, 1999.

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomy and histochemistry of somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences under low auxin concentration. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, p. 444-450, 2019.

SINGH, S. R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo – a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 2013.

SOMASHEKAR, P. V.; RATHORE, T. S.; FATIMA, T. *In vitro* plant regeneration of *dendrocalamus stocksii* (Munro) M. Kumar, Remesh & Unnikrisnan, through somatic

embryogenesis. **American Journal of Plant Sciences**. v. 9, p. 2429-2445, 2018. DOI: 10.4236/ajps.2018.912176.

SOOD, A.; AHUJA, P. S.; SHARMA, M.; SHARMA, O. P.; GODBOLE, S. *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 71, p. 55-63, 2002.

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**, v. 53, p. 117-137, 2015.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbono source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. C.; MELO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 39 p., 2004. (Documentos, 121).

TSAY, H. S.; YEH, C. C.; HSU, J. Y. Embryogenesis and plant regeneration from another culture of bamboo (*Sinocalamus latiflora* (Munro) McClure). **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 349-351, 1990.

VANISREE, M.; LEE, C. Y.; LO, S. F.; NALAWADE, S. M.; LIN, C. Y.; TSAY, H. S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v. 45, p. 1-22, 2004.

VENGALA, J.; JAGADEESH, H. N.; PANDEY, C. N. Development of bamboo structure in Índia. In: Xiao, Y.; Inoue, M.; Paudel, S.K. (Eds.) **Modern bamboo structures**. London: Taylor & Francis Group, p. 51-63, 2008.

VERDEIL, J. L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plants temcells: dependence versus autonomy? **Plant Science Conferences**, v. 12, p. 245-252, 2007. DOI:10.1016/j.tplants.2007.04.002

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.

WEI, Q.; CAO, J.; QIAN, W.; XU, M.; LI, Z.; DING, Y. Establishment of an efficient micropropagation and callus regeneration system from the axillary buds of *Bambusa ventricosa*. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, DOI: 10.1007/s11240-015-0743-1, 2015.

WOODS, S. H.; PHILLIPS, G. C.; WOODS, J. E.; COLLINS, G. B. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo explants in Mexican weeping bamboo, *Oatea acuminata aztecorum*. **Plant Cell Reports**. v. 11, p. 257-261.

YANG, Q.; DUAN, Z.; WANG, Z.; HE, K.; SUN, Q.; PENG, Z. Bamboo resources, utilization and ex situ conservation in Xishuangbanna, Southeastern China. **Journal of Forestry Research**, v. 19, n. 1, p. 79-83, 2008.

YEH, M.; CHANG, W. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro) **Theory Application Genetic**, v. 73, p. 161-163, 1986a

YEH, M.; CHANG, W. Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescence callus of *Bambusa beecheyana* Munro var. beecheyana. **Plant Cell Reports**. v. 5, p. 409-411, 1986b.

YUAN, J. L.; YUE, J. J.; WU, X. L.; GU, X. P. Protocol for callus induction and somatic embryogenesis in Moso Bamboo. **PLoS ONE**. v. 8, n. 12, e81954, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0081954.

ZANG, Q.; ZHOU, L.; ZHUGE, F.; YANG, H.; WANG, X.; LIN, X. Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. **Springer Plus**. v. 5, e1799, 2016a. DOI 10.1186/s40064-016-3520-7.

ZANG, Q.; JIAO, Y.; GUO, X.; ZHUGE, F.; YEH, K.; LIN, X.; Callus induction and plant regeneration from lateral shoots of herbaceous bamboo *Mniochloa abersend*. **Horticultural, Science & Biotechnology**. e14620316, 2016b. DOI: 10.1080/14620316.2016.1232610.

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**, v. 9, n. 45, p. 7710-7717, 2010.

Capítulo 3

Propagação *in vitro* de *Guadua magna* Londoño & Filg. em diferentes tipos de biorreatores e avaliação da fidelidade clonal por marcadores moleculares ISSR.

RESUMO

Popularmente conhecido como "Bambu Gigante Brasileiro", *Guadua magna* (família *Poaceae*) é uma espécie de bambu simpodial do Centro-Oeste brasileiro, com características agrícolas desejáveis, e de importância ecossociológica e comercial. Para limitar o risco de erosão genética desta espécie, é necessária uma produção racional de mudas. Neste estudo verificou-se o desenvolvimento de mudas produzidas em meio de cultura líquido MS suplementado com 20 g.L⁻¹ sacarose e 6,21 µM meta-Topolina, que foram subcultivadas a cada 30 dias em quatro sistemas de cultura *in vitro*: Meio Líquido Convencional (T1-MLC), Meio sob Agitação (T2-MLA) contendo 100 mL de meio; Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT) contendo 200 mL de meio. Após três subculturas, as mudas foram submetidas a condições de enraizamento *ex vitro* e aclimação em casa de vegetação. Após 90 dias de cultivo *in vitro*, BIPER e BIT apresentaram porcentagens médias satisfatórias de sobrevivência dos propágulos em cultivo (85,7 %), maior número de brotações (33,3 e 29,5), tamanho das brotações (2,6 cm e 3,1 cm) e massa fresca (15,8 g e 11,8 g), bem como conteúdo de clorofila *a* (11,9 µg.cm² e 12,9 µg.cm²), *b* (3,5 µg.cm² e 5,0 µg.cm²) e carotenóides (3,2 µg.cm² e 3,6 µg.cm²). Através da análise de extravasamento de eletrólitos, foi possível verificar que em todos os tratamentos os danos à membrana foram relativamente baixos nos sistemas de cultura ($\leq 33,5$), exceto T2-MLA (60,4). Na análise dos componentes bioquímicos (AST/Amido), as mudas *G. magna* cultivadas em T3-BIPER e T4-BIT consumiram em maior quantidade suas reservas de carboidratos (AST), o que conferiu a esses sistemas ambientes promissores para o favorável desenvolvimento vegetativo em condições *in vitro*. A análise anatômica revelou que as mudas propagadas continham a estrutura celular básica necessária para o desenvolvimento de novos brotos e raízes, e também evidenciaram a presença de regiões meristemáticas, células de primórdios foliares e radiculares, e meristema apical de caule. Também foi possível visualizar a conexão entre o sistema vascular do caule e as folhas, onde um ou mais feixes vasculares são orientados para as folhas, caracterizando que caule e folhas são estruturas contínuas. Quanto à aclimação, as taxas ótimas de sobrevivência das plantas foram em T4-BIT (95,8%), seguido de T3-BIPER (88,2%), T1-MLC (66,7%), T2-MLA (0%), com ocorrência de enraizamento adventício espontâneo. Para análise da fidelidade genética, 17 *primers* permitiram amplificação de 99 *locos*, que apresentaram o total de 11 alelos polimórficos. Da amplificação, a porcentagem total de bandas polimórficas foi 5,2 %, e em 8 *primers* ocorreu polimorfismo relativamente baixo (< 1,62 %). Os indivíduos analisados apresentaram entre si 100 % de similaridade em todos tratamentos, e os somaclones diferiram em média menos de 0,2 %. Conclui-se que o uso de biorreatores promove ganhos no processo de multiplicação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de *G. magna*. Considerando o efeito dos tratamentos, os marcadores ISSR são eficientes para determinar o grau de similaridade clonal dos indivíduos. As informações geradas neste trabalho podem ser úteis para contribuir no aperfeiçoamento da multiplicação clonal em sistemas de cultivo *in vitro* para outras espécies de bambu.

Palavras-chave: *Poaceae*, bambu, biorreatores, clonagem *in vitro*, ISSR, aclimação.

ABSTRACT

Popularly known as "Brazilian Giant Bamboo", *Guadua magna* (family *Poaceae*) is a specie of sympodial bamboo from the Brazilian Midwest Region, with desirable agricultural characteristics, and of ecosystem and commercial importance. To limit the risk of genetic erosion of this species, a rational seedling production would be necessary. In this study, the development of seedlings produced in liquid MS medium supplemented with 20 gL⁻¹ sucrose and 6.21 µM meta-Topolin was verified, which were subcultured every 30 days in four *in vitro* culture systems: Conventional Liquid Medium (T1-CLM), Medium with Agitation (T2-LMA) containing 100 mL of medium; Permanent Immersion Bioreactor (T3-PERIB), Temporary Immersion Bioreactor (T4-TIB) containing 200 mL of medium. After three subcultures, the seedlings were subjected to *ex vitro* rooting conditions and acclimatization in a greenhouse. After 90 days of *in vitro* cultivation, PERIB and TIB showed satisfactory average percentages of survival (85.7 %), number of shoots (33.3 and 29.5), size of shoots (2.6 cm and 3.1 cm) and fresh mass (15.8 g and 11.8 g), as well as the chlorophyll content ideal *a* (11.9 µg.cm² and 12.9 µg.cm²), *b* (3.5 µg.cm² and 5.0 µg.cm²) and carotenoids (3.2 µg.cm² and 3.6 µg.cm²). Through the analysis of electrolyte leakage, it was possible to verify that in all treatments the damage to the membrane was relatively low in the culture systems (≤ 33.5), except T2-LMS (60.4). In the biochemical components analysis (AST / Starch), the *G. magna* seedlings grown in T3-PERIB and T4-TIB, consumed a great quantity of their carbohydrate reserves (AST), which gives to these systems promising environments for the favorable vegetative development under *in vitro* conditions. The anatomical analysis revealed that the seedlings propagated contained the basic cellular structure necessary for the development of new shoots and roots, and also evidenced the presence of meristematic regions, leaf and root primordium cells, and apical meristem of stem. It was also possible to visualize the connection between the vascular system of the stem and the leaves, in which one or more vascular bundles are oriented towards the leaves and, therefore, the stem and leaves are continuous structures. As for acclimatization, the optimum survival rates of acclimatized plants were in T4-TIB (95.8 %), followed by T3-PERIB (88.2 %), T1-CLM (66.7 %) and T2-MLA (0 %), with spontaneous adventitious rooting. For the analysis of genetic fidelity, 17 primers allowed amplification of 99 *loci*, which presented a total of 11 polymorphic alleles. In the amplification, the total percentage of polymorphic bands was 5.2 %, and there was relatively low polymorphism (<1.62 %) in 8 primers. The individuals analyzed showed 100 % similarity in all treatments, and the somaclones differed on average less than 0.2 %. It is concluded that the use of bioreactors promotes gains in the process of multiplication, growth and *in vitro* development of *G. magna*. considering the effect of the evaluated treatments, the ISSR markers are efficient to determine the degree of clonal similarity of the individuals. The information generated in this work can be useful to contribute to the improvement of clonal multiplication *in vitro* culture systems for other bamboo species.

Key-words: *Poaceae*, bamboo, bioreactors, *in vitro* cloning, ISSR, acclimatization.

1. INTRODUÇÃO

A demanda por produtos florestais advindos da silvicultura clonal tem aumentado substancialmente nos últimos anos, fazendo-se necessário o fortalecimento de uma cadeia produtiva sustentável e, portanto, investimentos em novas tecnologias (Gielis et al., 2001; Mudoj et al., 2013; Singh et al., 2013; Sandhu et al., 2017).

Um dos requisitos para o sucesso de novos produtos é a escolha adequada das espécies, que devem apresentar capacidade competitiva, resistência, adaptação e produção adequada. Neste sentido, as espécies de bambu possuem características desejáveis para o mercado, que incluem ampla adaptabilidade à climas e solos, rápido crescimento, forma retilínea do colmo, manejo facilitado, além da resistência a estresses bióticos (Mudoj et al., 2013; Singh et al., 2013; Guerra et al., 2017).

As florestas nativas brasileiras possuem vasta diversidade de bambus, entre as quais a *Guadua magna*, conhecida como “Gigante Bambu Brasileiro”, endêmica do Bioma Cerrado. A espécie tem sido utilizada por comunidades tradicionais na fabricação de artesanato e na construção de casas rústicas, celeiros e cercas, conferindo grande importância ecológica e econômica regional (Filgueiras e Londoño, 2006; Arruda et al., 2011; Filgueiras e Londoño, 2011; Shirasuna, 2013; Filgueiras e Viana, 2017). Além disso, *G. magna* possui potenciais para diversos usos, tais como, produção energética (Filgueiras e Londoño, 2011), construção civil, móveis, laminado, entre outros (Filgueiras e Londoño, 2006; Teixeira et al., 2015).

Consoante a escolha da espécie adequada, é de suma importância o desenvolvimento de técnicas de propagação que viabilizem a produção de mudas que possam atender demandas em larga escala e, assim, contribuir para reduzir os problemas decorrentes da degradação dos ecossistemas naturais. A cultura de tecidos é uma importante ferramenta para multiplicação de espécies de bambu.

A propagação vegetativa *in vitro* utilizada para bambu atualmente é o método que consiste na indução de brotações geralmente a partir de gemas axilares em segmentos nodais com 1-5 cm, ou por separação de agregados de brotações (Jiménez et al., 2006; Singh et al., 2011; Beena e Rathore, 2012; Singh et al., 2012a; Singh et al., 2013; Bakshi et al., 2015; Bhadrawale et al., 2017; Furlan et al., 2018; Nogueira et al., 2019; Pasqualini et al., 2019; Vale et al., 2019). No entanto, há a necessidade de ajustes nos protocolos de multiplicação que possam reduzir os custos operacionais e os altos índices de contaminação microbiana,

oxidação fenólica, hiperhidricidade, enraizamento insatisfatório, e conseqüentemente, os baixos índices de sobrevivência.

Os sistemas de biorreatores podem possibilitar a semi-automatização dos processos convencionais do cultivo *in vitro*, aumentando o número de plantas produzidas, em menor espaço de tempo e reduzindo o uso de mão de obra especializada, o que reflete positivamente nos custos dos processos de produção (Cid et al., 2002; Paek et al., 2005; Scheidt et al., 2009; Teixeira e Cid, 2014).

Vários trabalhos já foram descritos utilizando essa tecnologia para uma ampla diversidade de espécies vegetais (Etienne e Berthouly, 2002; Mcalister et al., 2005; Oliveira et al., 2011a, 2011b; Quiala et al., 2012; Mendonça et al., 2016). No entanto, para o bambu, até o momento, o uso de biorreatores tem sido pouco investigado, com exceção dos trabalhos de Gutiérrez et al. (2016) para *G. angustifolia* e de Ribeiro et al. (2016) para *Bambusa vulgaris*. Este fato evidencia a necessidade de novos experimentos para agregar conhecimento científico e tecnológico ao processo de desenvolvimento de mudas.

Aliado a isso, é importante averiguar as respostas fisiológicas e genótípicas das espécies propagadas *in vitro*, a partir do uso de análises anatômicas, histoquímicas, bioquímicas e de fidelidade genética, que refletem diretamente o crescimento e desenvolvimento adequados das plantas. O emprego de análises anatômicas e histoquímicas permitem a visualização detalhada das alterações celulares e a confirmação do desenvolvimento regular de tecidos relacionada ao processo da indução de novas brotações durante o cultivo *in vitro*.

Além disso, o acompanhamento da fidelidade genética dos materiais multiplicados é de fundamental importância para a certificação das mudas produzidas. Nesse sentido, o uso de técnicas moleculares é recomendado, pois possibilitam detectar polimorfismos em nível de DNA. Entre essas técnicas, a ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) (Zietkiewicz et al. 1994; Pradeep Reddy et al., 2002) é considerada uma metodologia apropriada, por ser simples, rápida, altamente discriminativa e confiável para a detecção de fidelidade clonal de plantas micropropagadas, incluindo as de bambus (Negi e Saxena 2010; Singh et al., 2012b; Singh et al., 2013; Brar et al., 2014; Goyal et al., 2015; Nogueira et al., 2019).

Neste contexto, o objetivo desse trabalho consistiu em contribuir para o aperfeiçoamento da técnica de multiplicação clonal em larga escala de *G. magna* (Londoño & Filg.) em diferentes sistemas de cultivo, inclusive biorreatores. Também foram estudados os aspectos anatômicos, histoquímicos e bioquímicos para melhorar o entendimento do

desenvolvimento a nível celular e fisiológico e conseqüentemente, otimizar as etapas durante o cultivo *in vitro*. Adicionalmente, foram realizadas análises moleculares mediante uso de marcadores ISSR para averiguar a qualidade/estabilidade genética dos clones obtidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização do experimento

Os experimentos foram instalados e conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

2.2 Material vegetal

As plantas de *Guadua magna* utilizadas para instalação dos experimentos 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 casa de vegetação. Uma vez em casa de vegetação, elas foram estabelecidas *in vitro* a partir de segmentos nodais seguindo metodologia descrita por Nogueira (2018).

Inicialmente, as plantas foram multiplicadas *in vitro* em frascos de vidro transparente de 650 mL, contendo 70 mL de meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 3,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e sem adição de agente gelificante. A multiplicação do material foi realizada até que se obtivesse material suficiente para instalação dos experimentos. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas com luminosidade de 100 μmol m⁻² s⁻¹. Depois de multiplicadas, as plantas foram transferidas para novo meio de cultura, sem adição de fitorregulares (meio padrão), havendo três renovações do meio a cada 30 dias.

Para realização dos experimentos foram utilizadas como materiais vegetais propágulos de *G. magna* cultivadas em meio padrão, que continham duas hastes com 4-5 gemas axilares dormentes por haste (explante) (Figura 1).



Figura 1. Aspecto do tipo de propágulo de *Guadua magna* contendo duas hastes (colmos) utilizado na multiplicação *in vitro*. Barra = 1 cm.

2.3 Aplicação dos tratamentos nos sistemas de cultivo *in vitro*

Foram testados quatro sistemas de cultivo *in vitro* montados em dois diferentes tipos de recipientes, de modo que cada explante recebesse proporcionalmente 50 mL de meio de cultura por haste (Figura 2):

Em recipientes de frascos de vidro temperado transparente de 650 mL de capacidade, tipo maionese, foram montados o tratamento T1-MLC- Sistema de Cultivo Convencional de Micropropagação contendo 100 mL de meio de cultura padrão líquido, e o T2-MLA- Sistema de Cultivo sob Agitação que constituiu na disposição desses frascos em bandeja de rotação orbital a 100 rpm. Em ambos os tratamentos foi disposto um explante por repetição (Figuras 2 A-B).

Os sistemas em biorreatores foram montados em recipientes de frascos de polipropileno transparentes do tipo frascos gêmeos com capacidade de cinco litros cada, conectados entre si por mangueiras de silicone, onde um dos frascos continha dois explantes e o outro 200 mL de meio de cultura padrão líquido. A cada três horas ocorriam ciclos de renovação do ar fornecido por compressor, o qual era esterilizado por uma membrana de 0,22

μm , que entrava no frasco que continha o meio de cultura fazendo com que o líquido chegasse ao frasco que continha os explantes.

Desta forma, no tratamento T3-BIPER- Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente a mangueira ligada ao compressor foi desconectada para que ocorressem apenas os ciclos de renovação do ar, de modo que os explantes ficaram imersos permanentemente ao meio de cultura durante o cultivo (Figura 2 C). Já em T4-BIT- Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária ocorria a reversão do processo a cada três horas e o meio nutritivo retornava para o frasco de origem, após três minutos de imersão (Figura 2 D).

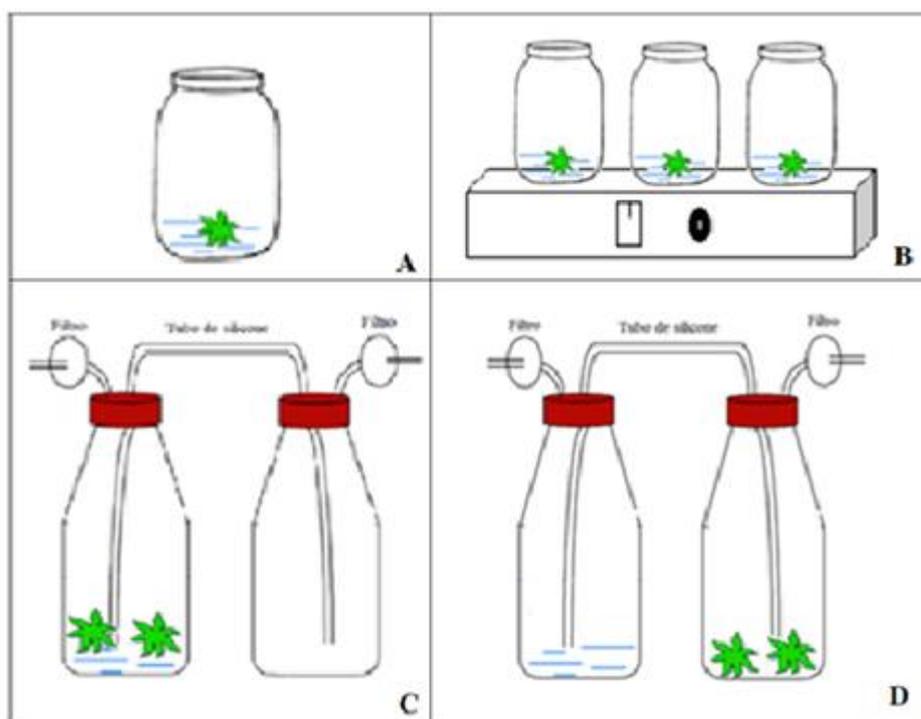


Figura 2. Esquema ilustrativo simplificado dos Sistemas de Cultivo *in vitro* para propágulos de bambu. A - (T1-MLC) Sistema de Cultivo Convencional de Micropropagação, B - T2-MLA- Sistema de Cultivo sob Agitação, C - T3-BIPER- Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente e D - T4-BIT- Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária. (Adaptado de Ribeiro e Bastos, 2008).

2.4 Condições do cultivo *in vitro*

Em cada sistema de cultivo, o meio nutritivo foi composto pelos sais e vitaminas de MS, suplementado com 20 g.L^{-1} de sacarose e 1 mg.L^{-1} de meta-Topolina [6-(3-hidroxi-benzilamino)purina] (mT), sem agente gelificante. O pH dos meios foi ajustado para

$5,8 \pm 0,1$ com HCl (0,1 M) e/ou NaOH (0,1 M) e a esterilização realizada em autoclave sob temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\approx 1,0\text{ kgf cm}^{-2}$) à 1,5 atm, durante 20 minutos.

Os explantes foram cultivados em condições de sala de incubação com fotoperíodo de 16 horas, luminosidade de $100\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os propágulos foram cultivados por 90 dias, havendo subcultivos a cada 30 dias. Em cada um dos subcultivos foram avaliadas as taxas de sobrevivência, o número de brotos, além da altura e a massa fresca dos propágulos em cada sistema de cultivo.

2.5 Delineamento do experimento e análise estatística

Quatro Sistemas de Cultivo foram testados, denominados: T1-MLC: Sistema Convencional de Micropropagação, T2-MLA: Sistema sob Agitação, T3-BIPER: Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente e T4-BIT: Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária. No total foram realizados três subcultivos, aos 30, 60 e 90 dias.

Os quatro tratamentos foram formados por sete repetições cada, adotando-se um delineamento estatístico inteiramente casualizado. Os pacotes do programa R (R Development Core Team, 2012) foram utilizados para auxiliar as análises estatísticas dos dados.

2.5.1 Avaliação da sobrevivência de propágulos

Para a sobrevivência dos propágulos nos sistemas de cultivo foi utilizado o procedimento não paramétrico de construção de curvas de Kaplan-Meier (KM) para avaliar o tempo de sobrevivência das plantas em função do tratamento.

Para identificar o padrão de sobrevivência em função da similaridade das curvas de KM nos tratamentos testados, foi executado o teste Log-Rank. Neste teste, foi possível verificar a similaridade das curvas KM entre si, ou seja, se o padrão de sobrevivência é o mesmo para os quatro tratamentos (H_0), ou se ao menos um par de curvas KM não é similar entre si (H_1).

2.5.2 Avaliação da multiplicação dos brotos

Nos quatro tratamentos referentes aos diferentes sistemas de cultivo foi realizada a análise do número de brotos e dias de contagem aos 30, 60 e 90 dias. Nesta variável foi

construída uma modelagem da estrutura de covariância em relação ao número de brotações pelo tempo de cultivo, enquanto que para verificar eventual correlação linear foram construídos gráficos de dispersão.

Em seguida, foi realizada análise GEE (*Generalized Estimating Equations*) no que se refere à contagem do número de brotos em uma distribuição de probabilidade. Por fim, para comparar os modelos testados, foi realizada a análise de QIC (*Quase likelihood Information Criterion*), que leva em consideração a interação entre as variáveis explicativas (Tratamentos/Subcultivos) para contagem média da indução do número de brotos.

Posteriormente à definição do modelo, foram realizadas as comparações múltiplas de Tukey ao nível $\alpha = 5\%$, da contagem média da indução do número de brotos considerando-se as combinações dos tratamentos (T1-MLC, T2-MLA, T3-BIPER e T4-BIT) com os subcultivos (30, 60 e 90 dias).

2.5.3 *Análise da altura e da massa fresca das plantas*

Aos 90 dias de cultivo foram mensuradas a altura (cm) e a massa fresca das plantas (g) em função dos sistemas de cultivo (T1-MLC, T2-MLA, T3-BIPER ou T4-BIT). Inicialmente foi realizada análise descritiva, seguida do procedimento de análise de variância (ANOVA).

Para melhor interpretação dos modelos da ANOVA aplicados, foi verificada a homocedasticidade e a normalidade dos resíduos do modelo pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Desta forma, considerando o modelo adequado, foram realizados os contrastes múltiplos do teste de Tukey entre os tratamentos ao nível de significância de $\alpha = 5\%$.

2.5.4 *Aclimatização das mudas*

Após os 90 dias de cultivo, os propágulos de *G. magna* obtidos nos diferentes sistemas de cultivo (T1-MLC, T2-MLA, T3-BIPER e T4-BIT) foram transferidos para a etapa de aclimatização. Os propágulos não apresentavam raízes (Figura 3 A) e, portanto, foram inicialmente transplantados para copos plásticos com capacidade de 300 mL contendo substrato Bioplant[®] e areia lavada (1:1, v/v), cobertos com sacos transparentes de polietileno (15,5 x 21 cm) para manter a umidade relativa do ar elevada, formando uma mini-estufa (Figura 3 B).

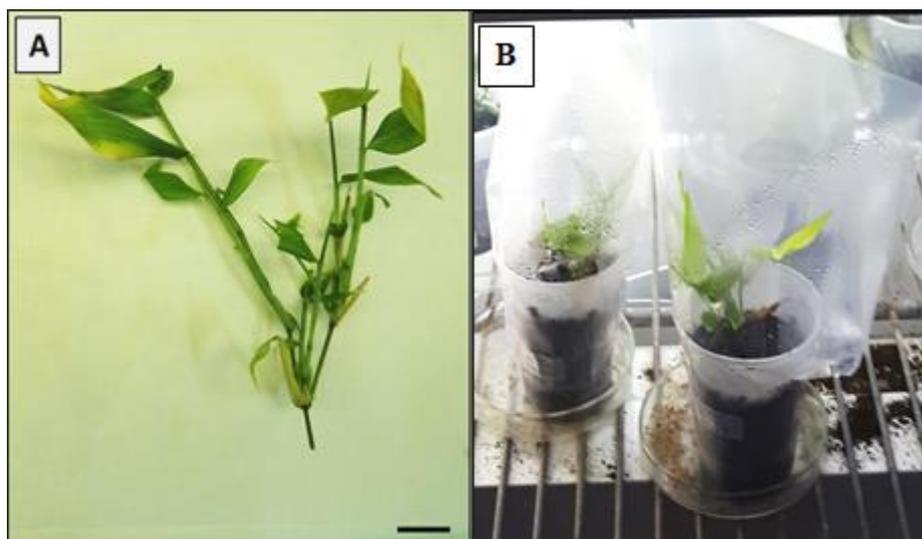


Figura 3. A - Propágulos de *Guadua magna* obtidos nos sistemas de cultivo *in vitro*. B - Etapa de aclimatização em sistema de mini-estufa para plantas propagadas *in vitro*.

As mudas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD (Percival) à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de $25\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Após dez dias, realizou-se a retirada dos sacos plásticos e as mudas foram mantidas por mais dez dias nesse sistema. Em seguida, as mudas foram transferidas para casa de vegetação onde foram irrigadas diariamente segundo a capacidade de campo dos recipientes. As condições de luminosidade não foram controladas em casa de vegetação.

A sobrevivência das mudas foi avaliada após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação. Os valores mensurados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e teste Tukey ao nível de significância de $\alpha = 5\%$. Os pacotes do programa R (R Development Core Team, 2012) foram utilizados para auxiliar as análises estatísticas dos dados.

2.6 Determinação do extravasamento de eletrólitos (%EE)

Aos 90 dias de experimentação, foi realizado a análise da porcentagem de extravasamento de eletrólitos (%) (modificado de Resende et al., 2002). Para tanto, dez amostras de $0,5\text{ cm}^2$ de diâmetro, em formato de disco, de tecido foliar maduro a partir da parte externa do terço mediano dos propágulos de cada repetição por tratamento, foram coletadas e avaliadas (Figura 4 A).

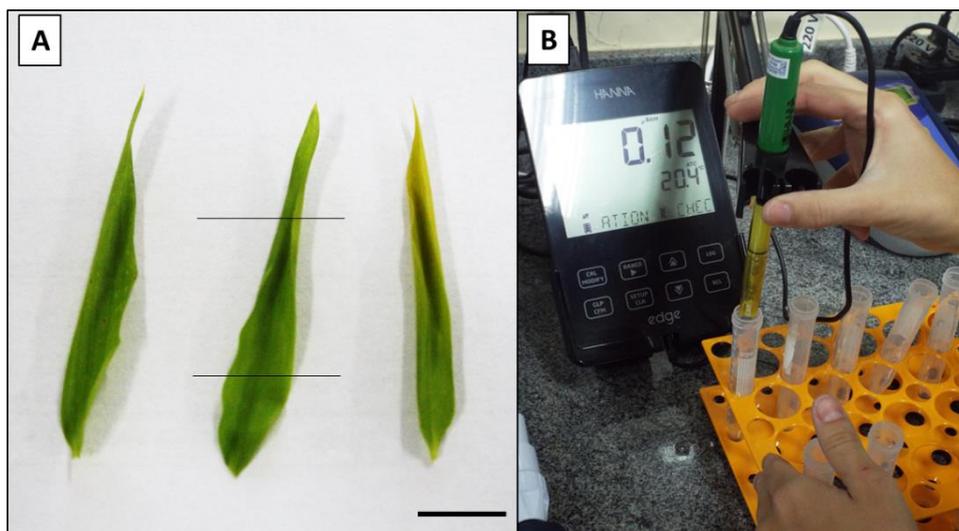


Figura 4. A- Tecido foliar de *Guadua magna*, tarja indicando porção do terço mediano da folha. B - Condutivímetro. Barra = 1 cm.

As amostras obtidas foram incubadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 30 mL de água deionizada e condicionadas ao escuro *overnight*. Passado esse período, foi realizada a leitura do valor (μS) da condutividade elétrica inicial (CnI) com o auxílio de um condutivímetro (HANNA EDGE) (Figura 3 B). Logo em seguida, as amostras foram incubadas em banho maria à 90 °C por 30 minutos. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, foi novamente determinado o valor (μS) da condutividade elétrica final (CnF).

O valor da concentração de extravasamento de eletrólitos foi obtido pela porcentagem de eletrólitos extravasados em relação aos eletrólitos totais conforme a seguinte fórmula:

$$EE (\%) = \text{CnI} / (\text{CnI} + \text{CnF}) \times 100$$

Os valores mensurados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e teste F ao nível de significância de $\alpha = 5\%$.

2.7 Quantificação de clorofilas *a* e *b* e carotenóides

Para receber as amostras para quantificação de clorofilas *a* e *b*, além dos carotenóides, foram preparados microtubos de 2 mL, revestidos com papel alumínio para impedir a influência de luz, os quais foram preenchidos com 1,5 mL de N,N-dimetilformamida- $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ (DMF).

Para dosagem de clorofilas *a* e *b* e os carotenóides, foram retirados dez discos com 0,5 cm² de diâmetro, de tecido foliar maduro fresco a partir da parte externa do terço mediano dos propágulos, de cada repetição por tratamento, com área foliar conhecida de 1,96 cm². A área foliar foi calculada conforme a equação ($\text{Área} = \pi \times r^2$).

As amostras foram acondicionadas nos microtubos respectivamente identificados e mantidos refrigerados à 4 °C, sem interferência da luminosidade por 48 horas para completa extração da clorofila.

Ao término desse período, os sobrenadantes foram coletados e condicionados em cubetas de vidros, quando então procedeu-se com a leitura das absorvâncias (*Ab*) das amostras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) nos comprimentos de onda 663,8; 646,8 e 480 nm, para determinação das concentrações de clorofilas *a* (*Ca*) e *b* (*Cb*), mais os carotenóides (*Cc*), respectivamente. Os valores das concentrações dos pigmentos obtidos foram submetidos à fórmula de Welburn (1994):

$$\begin{aligned}Ca &= 12,0 A_{663,8} - 3,11 A_{646,8} \\Cb &= 20,78 A_{646,8} - 4,88 A_{663,8} \\Cc &= (1000 A_{480} - 1,12 Ca - 34,07 Cb)/245\end{aligned}$$

Os valores mensurados ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e teste F ao nível de significância de $\alpha = 5\%$.

2.8 Quantificação de compostos bioquímicos por método colorimétrico

Foram coletados, aleatoriamente nas repetições, dez propágulos vegetativos de cada um dos tratamentos (T1-MLC, T3-BIPER e T4-BIT) para quantificação de compostos bioquímicos, ao que se refere às análises de Açúcares Solúveis Totais (AST) e Amido. O procedimento não foi realizado para os propágulos do tratamento T2-MLA por insuficiência de material disponível.

Inicialmente, o material fresco foi submetido a lavagens com água destilada (3 vezes) com auxílio de uma piceta na tentativa de retirar o meio de cultura líquido. Em seguida o material foi submetido ao rápido congelamento com nitrogênio líquido e, logo após, condicionado em liofilizador por 72 horas. Posteriormente, o material foi macerado e

pulverizado com cadinho de porcelana (massa seca), sendo acondicionado em microtubos para ser armazenado em ultrafreezer à -80 °C até o momento da utilização.

2.8.1 *Quantificação de Açúcares solúveis totais - AST*

Amostras contendo 10 mg de massa seca do material vegetal foram inoculadas em microtubos de 2 mL de capacidade e submetidas à quatro ciclos de extrações em 0,5 mL de etanol 80 % (v/v) a 80 °C por 20 minutos em banho-maria. A cada ciclo de extração, as amostras foram agitadas em vórtex e, depois, centrifugadas a 10.000 rpm por dez minutos. Os sobrenadantes foram coletados e acondicionados em novos microtubos até completarem o volume de 2 mL. Os *pellets* restantes naqueles primeiros microtubos foram armazenados em ultrafreezer -80 °C para posterior utilização.

Foram preparadas duas sub-repetições de cada amostra para quantificação de açúcares solúveis totais, seguindo o protocolo de Dubois et al. (1956). Para isso, foram pipetados 50 µL das amostras dos sobrenadantes em tubos de ensaio (25 x 150 mm), onde foram adicionados 450 µL de água ultrapura, seguido de 500 µL de Fenol 5 % (v/v) e 2.500 µL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄).

Os tubos permaneceram em repouso até entrarem em equilíbrio com a temperatura ambiente (15 minutos aproximadamente). Então foi realizada a leitura das absorbâncias das amostras em cubetas de vidro em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) com comprimento de onda de 490 nm. Todas as leituras foram realizadas com base na curva padrão de glicose (1 mg/1 mL), com concentrações crescentes de 0, 8, 16, 32, 64, 128 e 258 µg.

2.8.2 *Extração e quantificação de Amido por método enzimático*

Os *pellets* restantes daqueles primeiros microtubos armazenados em ultrafreezer -80 °C advindos da análise de AST (açúcares solúveis totais) foram submetidos à secagem em *speedvac* à 40 °C por duas horas para completa remoção do etanol.

A extração e quantificação do amido das amostras secas foram realizadas de acordo com o método proposto por Amaral et al. (2007). Às amostras foram adicionados 450 µL da enzima α -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (Megazyme[®]) previamente diluída em tampão fosfato de sódio 10 mM com pH ajustado em 6,5. As amostras foram incubadas em banho-maria à 75 °C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas à 50 °C, e

então acrescentado 450 µL da enzima amiloglucosidase de *Aspergillus Níger* (Megazyme®) previamente diluída em tampão acetado de sódio 0,1 M com pH ajustado para 4,5. As amostras foram incubadas em banho-maria à 50 °C por 30 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 100 µL de ácido perclórico 0,8 M para auxiliar na precipitação das enzimas. Logo após, as amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm por dois minutos.

Para realizar a quantificação do amido foram preparadas três sub-repetições de cada amostra, das quais foram pipetadas alíquotas de 20 µL do extrato num poço de uma microplaca de fundo chato, acrescentadas em seguida de 300 µL de GODPOD (Doles, Reagente de Cor). As microplacas permaneceram em repouso em temperatura ambiente por 15 minutos para realização da reação.

Após esse período, o teor de amido foi determinado em leitor de microplacas Elisa em comprimento de onda de 505 nm. Todas as leituras foram realizadas com base na curva padrão de glucose, com quantidades crescentes de 0, 25, 50, 100 e 200 µg.

2.9 Caracterização anatômica e histoquímica

Para análises anatômicas, foram coletadas amostras das regiões do segmento nodal, segmento internodal e da parte basal dos propágulos vegetativos nos sistemas de cultivo. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído e glutaraldeído (Karnovsky, 1965) modificado (glutaraldeído 1 %; paraformaldeído 4 % em tampão fostato de sódio - NaH₂PO₄.H₂O e tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2), sendo submetidas a vácuo (-400 mmHg) por 60 minutos, onde permaneceram por 24 h na solução.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas por meio de série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 e 100%, v/v) e submetidas a vácuo (-400 mmHg) por 60 minutos cada. Em seguida, as amostras foram imersas em meio de infiltração Histoiresina (Leica®), segundo as especificações do fabricante, e permaneceram por no mínimo 48 horas em estufa à temperatura de 60 °C.

Os blocos contendo as amostras foram seccionados à 5-7µm de espessura com o uso de micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), e as secções obtidas foram distendidas e aderidas às lâminas microscópicas em placa aquecedora à 40 °C.

Para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos, as secções obtidas foram coradas com azul de Toluidina (0,5 %, v/v) em tampão fosfato de sódio e ácido cítrico (Sakai, 1973) durante seis minutos.

As secções também foram submetidas aos testes histoquímicos com *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para visualização de proteínas (Vidal, 1970), *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'Brien e McCully, 1981) para identificar polissacarídeos neutros e Lugol (Johansen, 1940) para detecção de grãos de amido.

As lâminas histológicas foram montadas com lamínulas e preservadas em resina sintética (Entelan®). Posteriormente, elas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz Leica (DM 750) e programa Leica Application Suite (LAS EZ), sendo as imagens capturadas em escala micrométrica.

2.10 Análise da fidelidade genética - ISSR

Para a análise da fidelidade genética dos clones de *G. magna* propagadas *in vitro* nos diferentes sistemas de cultivo, pelo menos 25 amostras foliares dentro das repetições de cada tratamento foram coletadas, oriundas do final da etapa de aclimatização, totalizando 75 amostras.

2.10.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído utilizando a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990) modificado. Em torno de 100 mg de tecido foliar de cada amostra foram inoculados em microtubos de 2 mL de capacidade contendo duas *beads* de porcelana e 700 µL da solução CTBA + 2-mercaptoetanol, e triturados por 40 segundos em *Tissue Lyser II* (QIAGEN). Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram incubados por uma hora em banho-maria à 65 °C sob agitação ocasional a cada 10 minutos.

Após a incubação, foram adicionados à mistura 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para auxiliar na purificação do DNA. Após a adição do clorofórmio, os microtubos foram centrifugados a 11.000 rpm por 10 minutos e a fase sobrenadante resultante foi transferida para novos microtubos, onde 400 µL de isopropanol frio foram adicionados para a precipitação do DNA.

Em seguida, os microtubos foram incubados à -20 °C por 1 hora sob agitação a cada 15 min. Após a incubação, o isopropanol foi descartado com o auxílio de uma pipeta, e o *pellet* de DNA lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70 % e uma vez em 500 µL de etanol 100 %. Após as lavagens, o DNA foi mantido em temperatura ambiente por 12 horas para secagem.

Posteriormente, o DNA contido nos microtubos foi diluído em 100 µL de tampão TE com RNase (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA e 10 mg ML21 RNase A). A quantidade e qualidade do DNA isolado foram determinadas pela análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8 % (v/v), corado de brometo de etídio. Em seguida, o material foi diluído em água ultrapura a 50 ng/mL e armazenado a -20 °C até o momento da utilização para amplificação do PCR.

2.10.2 Amplificação por PCR

Os *primers* ISSR foram usados para segmentar uma ampla cobertura do genoma de *G. magna*. Para tanto, foram inicialmente testados 22 *primers* ISSR (Sigma-Aldrich®), sendo selecionados por critério de quantidade de bandas amplificadas e qualidade dos fragmentos gerados, conforme Nogueira et al. (2019) (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* ISSR testados para a verificação da fidelidade genética de plantas de *Guadua magna* propagados *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo.

<i>Primer</i>	Código do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i> (5'-3')
1	11zm	TGTCACACACACACAC
2	12zm	GGTCACACACACACAC
3	15zm	GTGCACACACACACAC
4	16zm	CGGCACACACACACAC
5	17zm	CAGCTCTCTCTCTCTC
6	18zm	GTGCTCTCTCTCTCTC
7	19zm	CCTGCACACACACACAC
8	35zm	AGCAGCAGCAGCG
9	38zm	AGCAGCAGCAGCAT
10	39zm	AGCAGCAGCAGCAC
11	50zm	CCAGCTGCTGCTGCT
12	52zm	GGCACCACACACACACACA
13	53zm	CGCAACACACACACACACA
14	54zm	GGCTACACACACACACACA
15	55zm	CCTCCACACACACACACACA
16	56zm	GCTACCACACACACACACACA
17	57zm	CGTCCACACACACACACACA
18	58zm	CGAACACACACACACACACA
19	59zm	GGCCAGCTGCTGCTGCTGCT
21	9ps	ACACACACACACACACYA
22	10ps	AGAGAGAGAGAGAGAGYT

As reações para ISSR foram realizadas em um volume total de 13 µl contendo 2 µl (20 a 25 ng) de DNA genômico. O tampão de reação constituiu em Taq 2,5 µl, 1 µl de MgCl₂, 0,15 µl de dNTPs (Invitrogen[®]), 1,5 µl de iniciador, 0,17 µl de Taq polimerase (Phoneutria[®]) e completado o volume final com água ultrapura (Mili-Q), seguindo metodologia de Anand et al. (2013).

A amplificação por PCR foi conduzida em termociclador Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems[®]), com aquecimento inicial da solução à 94 °C durante cinco minutos para a desnaturação de toda a fita dupla de DNA, seguido por 44 ciclos de um minuto à 56 °C para anelamento, e um minuto à 72 °C para extensão, e ainda sete minutos à 72 °C para a extensão completa de todas as cadeias complementares.

Os produtos obtidos das amplificações via PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,8 %, submersos em tampão EDTA (TBE) 1 X por 45 minutos sob voltagem constante, corados em solução de brometo de etídeo (Anand et al., 2013) sob uma tensão constante de 90 V e amperagem constante de 45 A.

Como padrão foi utilizado o DNA 1Kb “ladder” (Invitrogen[®]) com fragmentos de tamanho conhecidos, além de uma amostra sem DNA para controle negativo. Os fragmentos, corados em brometo de etídeo, foram observados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de Foto documentação Alphamager – HP (CellBiosciences[®]).

2.10.3 Análise dos marcadores de ISSR

Para visualizar a estruturação molecular dos indivíduos, os marcadores ISSR foram analisados como dados binários, quanto à presença (1) e ausência (0) de fragmentos em cada indivíduo. O cálculo de distância (dissimilaridade - D_{ij}) entre os genótipos foi realizado com base no coeficiente de similaridade de Jaccard utilizando-se a matriz binária, onde i e j são o número de *locus* comuns aos genótipos, enquanto b e c são números de *locus* presentes apenas em cada um dos genótipos:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij} = 1 - a/(a+b+c)$$

Para a determinação do número de mutações, o número de mutações observadas (fragmentos polimórficos) foi dividido pelo número total de fragmentos amplificados, utilizando 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 Influência dos sistemas de cultivo *in vitro*

A sobrevivência dos propágulos nos quatro sistemas de cultivo *in vitro* foi avaliada ao longo de cada um dos subcultivos (30, 60 e 90 dias).

Para o conjunto de dados analisados, o método Kaplan-Meier (KM) estimou que a probabilidade do padrão de sobrevivência é o mesmo para os quatro tratamentos ao longo dos subcultivos (Figura 5). Foi realizada a sobreposição das curvas para o teste de Log-Rank, a fim de comparar a similaridade entre as quatro curvas KM (Figura 6).

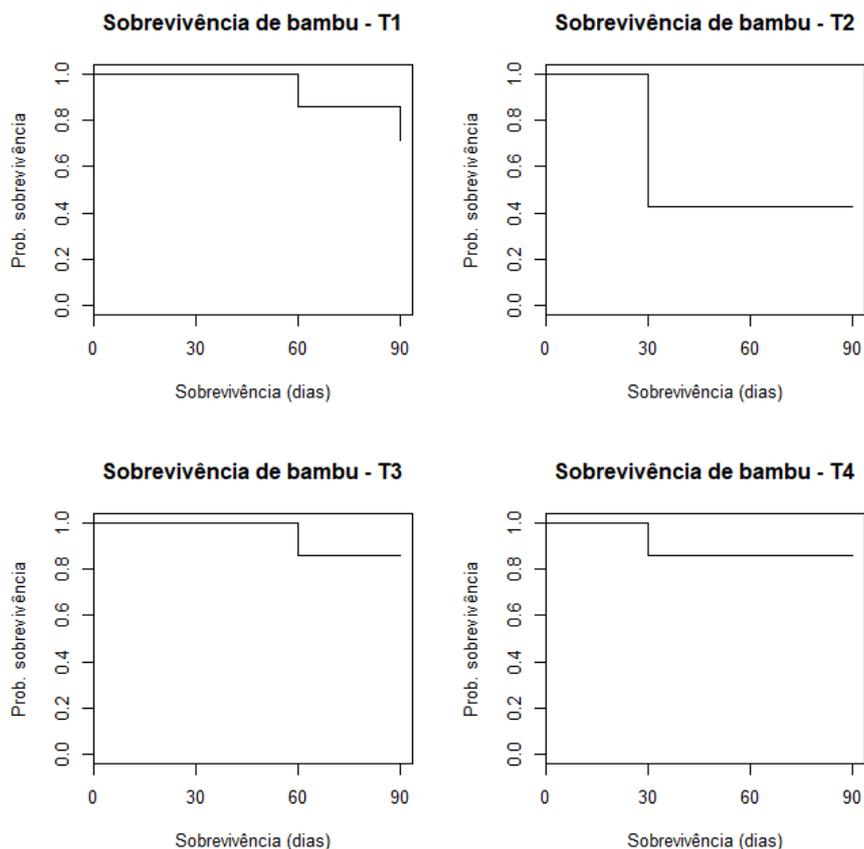


Figura 5. Curva de sobrevivência pelo método Kaplan-Meier (KM) dos dados da sobrevivência dos propágulos de *Guadua magna* cultivados em diferentes sistemas *in vitro*: Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT).

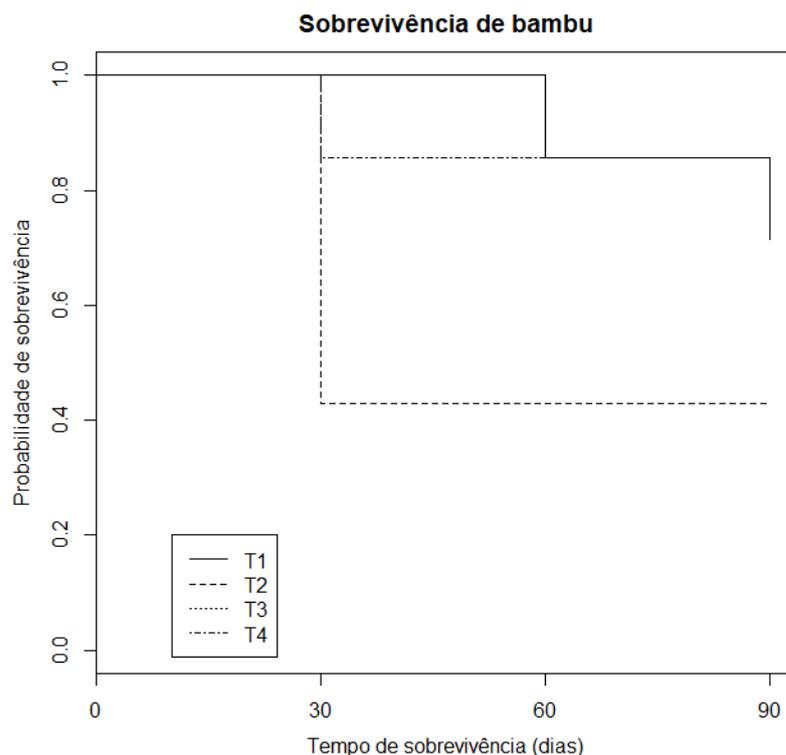


Figura 6. Curvas de sobrevivência pelo o método Kaplan-Meier (KM) sobrepostas dos dados da sobrevivência dos propágulos de *G. magna* cultivados em diferentes sistemas *in vitro*: Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT).

O valor da estatística do teste Log-Rank foi de 5,165 com p-valor = 0,16. Desta forma, o padrão de sobrevivência entre as quatro curvas KM para os diferentes tratamentos não foi significativo ao nível $\alpha = 5\%$ de similaridade, ou seja, o padrão de sobrevivência é o mesmo para todos os sistemas de cultivo.

No entanto, a curva de sobrevivência de T2-MLA apresenta-se “diferente” das demais curvas, onde nota-se que mais da metade dos propágulos cultivados em T2-MLA não chegou aos 90 dias de sobrevivência. Neste caso, a estrutura do teste Log-Rank pode não ter detectado a diferença da curva de T2-MLA em relação aos demais tratamentos e, portanto, o resultado não ser significativo.

Para verificar este fato, foi feita a projeção de probabilidade no teste Log-Rank, que apresentou estatística LR = 32 com p-valor = $5 \times 10^{-7} < 0,05$, indicando que há diferença em ao menos um par de curvas KM. De fato, o teste aplicado a posteriori apontou diferença estatisticamente significativa entre T2 e os demais tratamentos (Tabela 2) aos 90 dias de subcultivo.

Tabela 2. Sobrevivência dos propágulos vegetativos aos 90 dias de propagação nos diferentes sistemas de cultivo.

Tratamento	Descrição do sistema de cultivo	% sobrevivência
T1-MLC	Meio Líquido Convencional	71,4 ± 7,1 a
T2-MLA	Sob agitação	42,8 ± 7,7 b
T3-BIPER	Biorreator de Imersão Permanente	85,7 ± 5,5 a
T4-BIT	Biorreator de Imersão Temporária	85,7 ± 5,5 a

Médias com letras iguais ± erro padrão não diferem entre si estatisticamente pelo teste Log-Rank ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância, p-valor = 5×10^{-7} .

Em suma, apesar de não diferir estatisticamente do meio líquido convencional (T1-MLC), a porcentagem média da sobrevivência dos propágulos vegetativos nos sistemas de biorreatores (T3-BIPER e T4-BIT) foi superior. O sistema de cultivo sob agitação (T2-MLA) não respondeu de forma satisfatória.

Uma vez determinada a sobrevivência, observou-se a multiplicação por meio da contagem do número de brotos, que foram avaliadas quanto ao tempo de subcultivo (30, 60 e 90 dias).

A partir da análise de correlação linear, o número de brotos aos 30 e 60 dias ($r_{30-60} = 0,77$) e aos 60 e 90 dias ($r_{60-90} = 0,89$) pode ser considerada de moderada a forte, e a correlação linear entre 30 e 90 dias pode ser considerada moderada ($r_{30-90} = 0,54$) para os sistemas de cultivo (Figura 7). Ou seja, os quatro tratamentos apresentam padrões distintos de multiplicação de brotos, e o tempo de subcultivo torna-se determinante para escolha de um sistema de cultivo *in vitro* que possa conceder constante número de brotos das plantas.

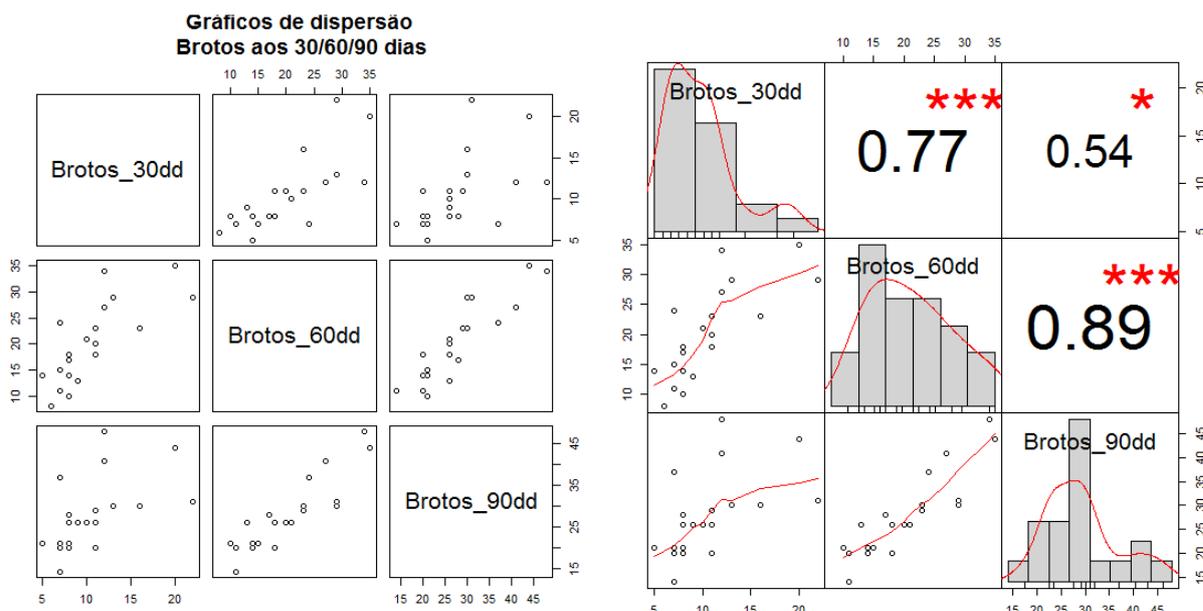


Figura 7. Gráficos da dispersão dos valores do número de brotos dentro de 30 x 60, 30 x 90 e 60 x 90 dias (subcultivos).

Para escolher o modelo mais apropriado para representar a evolução do teste estatístico dos dados, foram aplicados modelos GEE (*Generalized Estimating Equations*) com estrutura de correlação *autogressive-1*, auxiliados pelo QIC (*Quasi-likelihood Information Criterion*) para comparação dos modelos. Quanto menor for o valor do QIC, o modelo é melhor para ser representativo. (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação dos modelos por QIC (*Quasi-likelihood Information Criterion*) para representação do número de brotos na multiplicação *in vitro* de *Guadua magna* em diferentes sistemas de cultivo.

Teste	Modelo _i	QIC _i
(1)	$Y \sim T + D + D*T$	-4847,59
(2)	$Y \sim T + D$	-4838,01
(3)	$Y \sim T$	-4675,34
(4)	$Y \sim D$	-4815,03
(5)	$Y \sim 1$ (sem preditores)	-4652,40

Variáveis: Y – Número de brotos, T – Sistemas de cultivo, D – Tempo de subcultivo

O modelo (1) foi escolhido para melhor representar os dados da amostra, que leva em consideração a interação entre as variáveis explicativas T (sistema de cultivo) e D (tempo de subcultivo).

Em seguida à definição do modelo, foram realizadas as comparações múltiplas de Tukey ao nível $\alpha = 5\%$ dos parâmetros relacionados ao número de brotos, considerando-se as

combinações dos sistemas de cultivo (T1, T2, T3 e T4) com o tempo de subcultivo (30, 60 e 90 dias) (Tabela 4).

Tabela 4. Comparações múltiplas do número médio de brotos considerando-se as combinações dos sistemas de cultivo *in vitro* de *Guadua magna*.

sistema de cultivo	Subcultivos (dias)	nº de brotos	p-valor
T1 MLC - Convencional	30	13,0*	6,37e-
	60	22,8*	5,39e-
	90	27,2*	5,17e-
T2 MLA - Sob Agitação	30	8,1*	3,96e-
	60	14,2*	8,27e-
	90	18,4*	1,69e-
T3 BIPER - Biorreator de Imersão Permanente	30	11,2*	3,89e-
	60	14,2*	8,27e-
	90	33,3*	2,89e-
T4 BIT - Biorreator de Imersão Temporária	30	9,1*	2,50e-
	60	17,5*	3,94e-
	90	29,5*	5,34e-

*não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância

Aos 30 dias de cultivo, o T1-MLC atingiu maior número de brotos comparado aos demais sistemas de cultivo. Aos 60 dias, T1-MLC quase que dobrou a quantidade de número de brotos, no entanto, mostrou estabilização dos valores aos 90 dias de cultivo. As mesmas observações podem ser visualizadas para T2-MLA, apesar desse tratamento ter apresentado números insatisfatórios aos 90 dias de cultivo, quando comparado aos demais tratamentos. Diferentemente, os tratamentos T3-BIPER e T4-BIT indicaram progressão do número de brotos, que praticamente dobraram em cada um dos seus subcultivos (Figura 8).

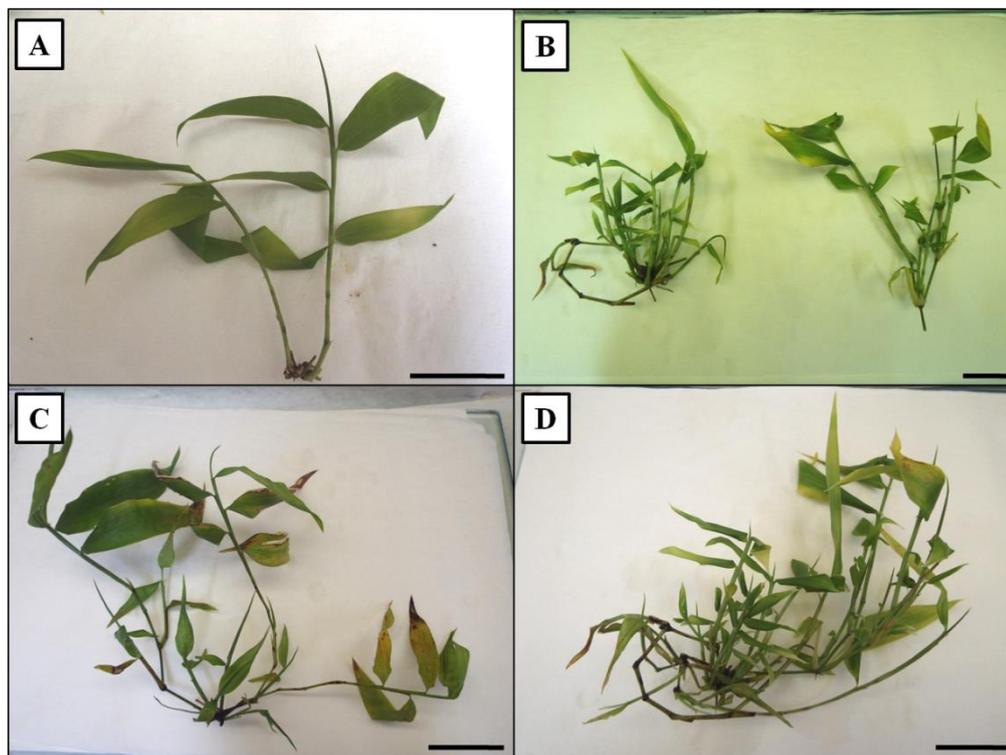


Figura 8. Propágulos de *Guadua magna* apresentando brotações durante a propagação *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo. A - 0 dias de subcultivo (explante), B - 30 dias de subcultivo, C - 60 dias de subcultivo, D - 90 dias de subcultivo. Barra = 2 cm.

De fato, a interação aponta que entre 60 e 90 dias de subcultivo, o padrão de multiplicação altera de acordo com o tipo de tratamento (sistemas de cultivo). As observações com tratamento T4-BIT são as mais representativas, em que apresentam um considerável aumento médio do número de brotos entre 60 e 90 dias se comparadas ao valor médio de aumento de número de brotos das observações dos demais tratamentos.

Aos 90 dias de cultivo foram mensuradas as alturas médias dos brotos (cm) em função dos sistemas de cultivo. Verificou-se que em T4-BIT foi significativamente maior que a dos demais tratamentos, mas não diferiu estatisticamente de T1-MLC e T3-BIPER. Ademais, em T2-MLA a altura dos brotos parece ser significativamente menor, em comparação à T4-BIT (Figura 9).

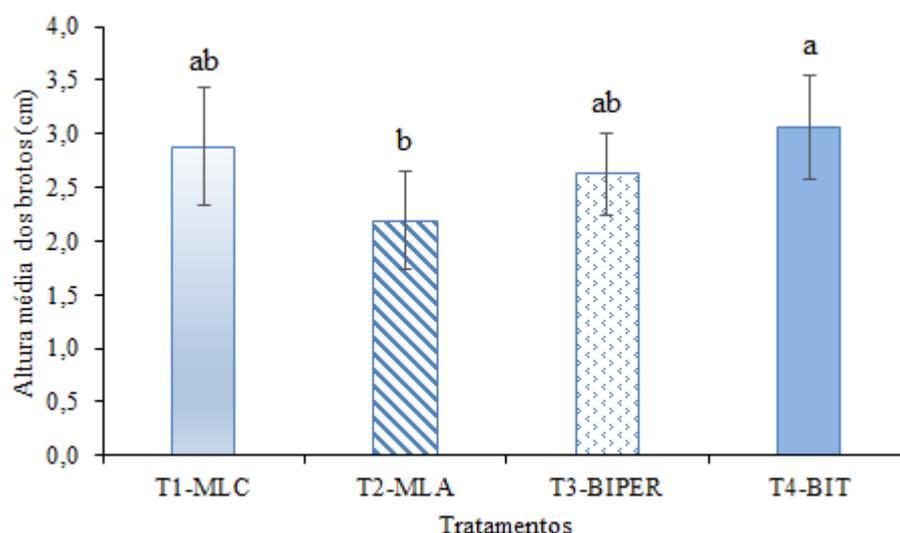


Figura 9. Altura média dos brotos (cm) dos propágulos de *Guadua magna* aos 90 dias de cultivo em função dos tratamentos: Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT). Médias \pm erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Também foram mensurados os valores da massa fresca (g) em função dos sistemas de cultivo. Apesar de nenhum tratamento diferir estatisticamente entre si em termos de massa fresca aos 90 dias nos diferentes sistemas de cultivo, em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) foi obtida a maior média de incremento da massa fresca com 15,8 g, seguido de Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT) com 11,8 g, Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC) com 10,4 g e Sistema sob Agitação (T2-MLA) com 9,2 g (Figura 10).

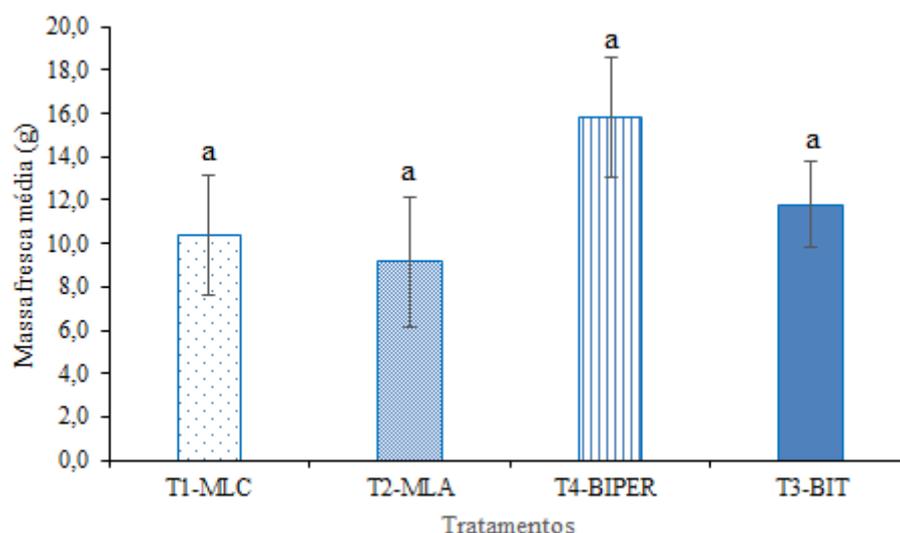


Figura 10. Massa fresca (g) dos propágulos de *Guadua magna* aos 90 dias de cultivo *in vitro* em função dos tratamentos: Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT). Médias \pm erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Considerando o efeito dos tratamentos avaliados, o uso dos sistemas de cultivo *in vitro* em biorreatores se destacam, pois promoveram ganhos no processo de multiplicação, crescimento e desenvolvimento dos propágulos vegetativos de *G. magna*.

3.2 Efeito dos sistemas de cultivo *in vitro* na integridade da membrana celular

Para determinar a estabilidade da membrana celular dos propágulos de *G. magna* propagadas nos diferentes sistemas de cultivo foi realizada a determinação do extravasamento de eletrólitos aos 90 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 4).

Tabela 5. Dados da porcentagem média do extravasamento de eletrólitos (EE%) dos propágulos de *Guadua magna* aos 90 dias de propagação nos diferentes sistemas de cultivo.

Tratamento	Descrição do sistema de cultivo	EE%
T1-MLC	Meio Líquido Convencional	33,4 \pm 1,2 b
T2-MLA	Sob Agitação	60,4 \pm 4,6 c
T3-BIPER	Biorreator de Imersão Permanente	30,5 \pm 1,5 a
T4-BIT	Biorreator de Imersão Temporária	31,2 \pm 1,4 ab

Médias \pm erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de F ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Pela análise de extravasamento de eletrólitos foi possível verificar que, em todos os sistemas de cultivo, o dano da membrana foi relativamente baixo ($\leq 33,5$), exceto em T2-

MLA (60,4) cujo tratamento proporcionou aspectos negativos ao desenvolvimento dos brotos (Figura 11 A), fato demonstrado pela diminuição na integridade da membrana com o vazamento de solutos/eletrólitos.

Os resultados obtidos quanto ao extravasamento de eletrólitos nos tratamentos T1-MLC, T3-BIT e T4-BIPER, nas circunstâncias deste trabalho, mostraram que as condições *in vitro* foram favoráveis para o desenvolvimento de *G. magna* (Figura 11 B).

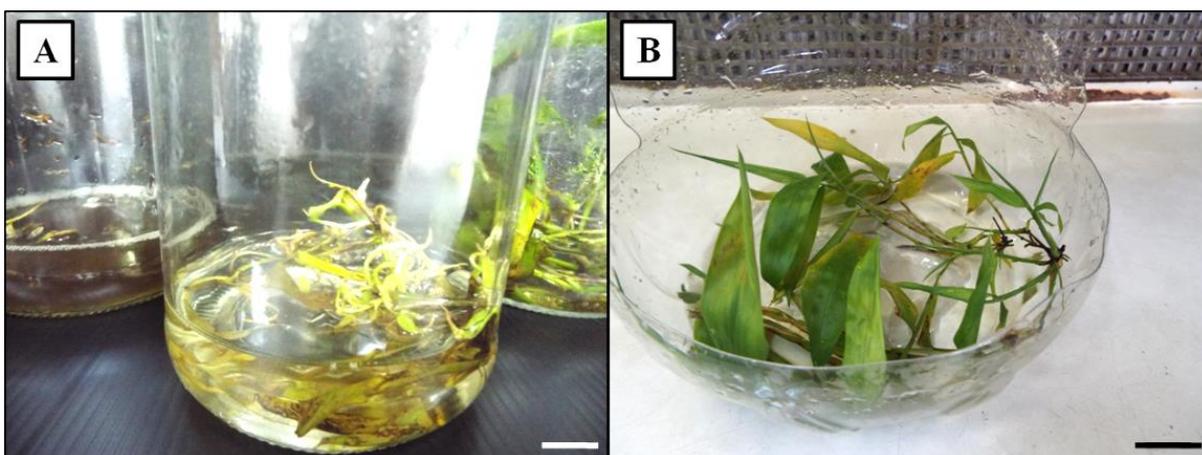


Figura 11. Aspectos morfológicos do desenvolvimento *in vitro* de *Guadua magna* nos sistemas de cultivo. A - Sistema de cultivo Sob Agitação (T2-MLA), B - Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT). Barra = 1 cm.

3.3 Dosagem de clorofilas *a* e *b* mais carotenóides

Aos 90 dias de propagação *in vitro* nos diferentes sistemas de cultivo, foram realizadas as quantificações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides de todos os tratamentos. A análise de clorofila mostrou maior concentração de clorofila *a* do que dos demais pigmentos. Os cultivos em biorreatores (T3-BIT e T4-BIPER) apresentaram maior concentração para os pigmentos clorofila *a* e clorofila *b*, quando comparados ao sistema de cultivo convencional (T1). Já para a concentração de carotenóides, não houve diferença entre os tratamentos, e apesar de não apresentar diferença significativa desse pigmento quanto à T1-MLC, as concentrações de clorofila *a* e clorofila *b* não foram consideradas satisfatórias no sistema de cultivo sob agitação (T2-MLA) (Figura 12).

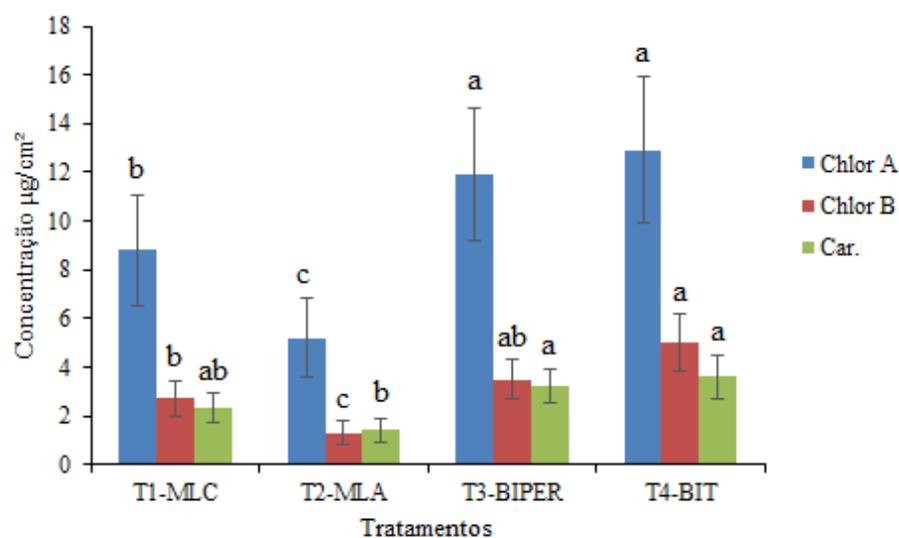


Figura 12. Quantificação de Clorofila *a*, Clorofila *b* e Carotenóides ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em folhas de *Guadua magna* após 90 dias de propagação *in vitro* nos diferentes sistemas de cultivo (tratamentos): Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIPER). Os valores representam a média das repetições \pm o erro padrão. Médias \pm erro padrão com letras iguais representando a comparação entre os tratamentos não diferem entre si estatisticamente pelo teste de F ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Notoriamente, a maior concentração dos três pigmentos foi verificada nos sistemas de biorreatores (T3-BIPER e T4-BIT), refletindo diretamente na morfologia e no desenvolvimento *in vitro* (Figura 13 A). Diferentemente, o sistema de cultivo sob agitação (T2-MLA) afetou o desenvolvimento *in vitro*, promovendo diminuição do conteúdo de clorofila, no qual as folhas se apresentaram mais amareladas (cloróticas) e senescentes do que nos demais tratamentos avaliados (Figura 13 B), caracterizando esse tratamento como um ambiente indutor de estresse para os propágulos vegetativos.

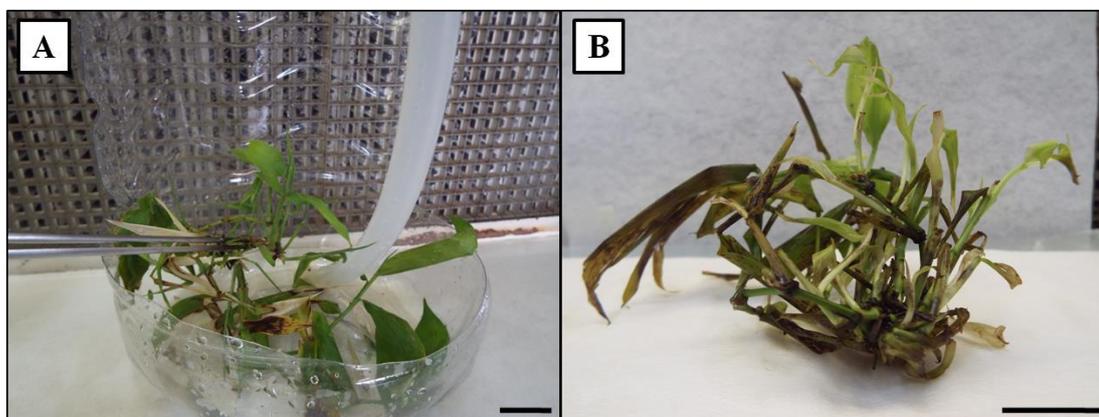


Figura 13. Aspectos morfológicos do desenvolvimento *in vitro* dos propágulos de *Guadua magna* nos sistemas de cultivo. A - Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER), B - Sistema de cultivo Sob Agitação (T2-MLA). Barra = 2 cm.

3.4 Quantificação de compostos bioquímicos

As análises bioquímicas para açúcares solúveis totais (AST) e amido foram realizadas para os propágulos de *G. magna* nos tratamentos T1-MLC (Sistema Convencional de Micropropagação), T3-BIPER (Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente) e T4-BIT (Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária), após 90 dias de propagação *in vitro*. Esses procedimentos não foram realizados com T2-MLA (Sistema sob Agitação) por insuficiência de material vegetal para as análises. Os resultados referentes aos de teores de AST e amido em razão dos sistemas de cultivo são apresentados na Figura 14.

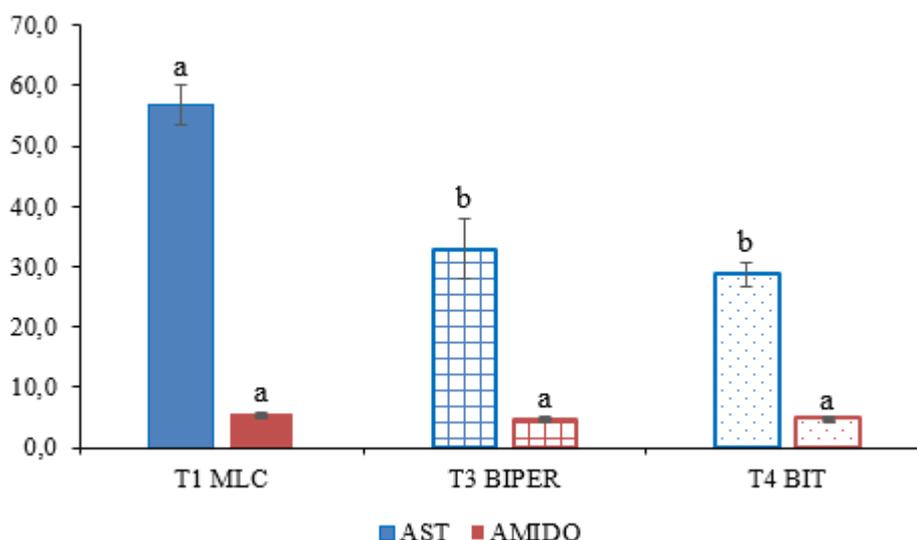


Figura 14. Açúcares solúveis totais (AST) e amido em relação à massa seca de *Guadua magna* aos 90 dias de propagação *in vitro* dentro dos diferentes sistemas de cultivo (tratamentos): Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT). Médias \pm erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de F ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância

Verificou-se que os propágulos de *G. magna* apresentaram as maiores porcentagens de AST em sistema de cultivo convencional (T1-MLC), em média 56,8 % da massa seca, valor significativamente superior ao constatado nos sistemas de biorreatores que apresentam em média 32,9 % (T3-BIPER) e 28,7 % (T4-BIT) de AST da massa seca. Em contrapartida, as porcentagens médias de amido, não diferiram estatisticamente entre si nos diferentes sistemas de cultivo, sendo elas 5,5 %, 5,8 % e 5,3 % para T1-MLC, T3-BIPER e T4-BIT, respectivamente.

3.5 Caracterização anatômica e histoquímica dos propágulos vegetativos

As análises anatômicas para caracterização histológica e histoquímica foram realizadas após 90 dias de propagação *in vitro* de *G. magna* nos tratamentos T1-MLC (Sistema Convencional de Micropropagação), T3-BIPER (Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente) e T4-BIT (Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária). A metodologia não foi realizada com T2-MLA (Sistema sob Agitação) por insuficiência de material vegetal para as análises.

Cortes histológicos dos segmentos nodais dos propágulos vegetativos de *G. magna* propagadas *in vitro* nos diferentes sistemas de cultivo mostraram evidências da presença de regiões meristemáticas, células de primórdios foliares, meristema apical de caule e grupos de células compactadas, como mostradas nas Figuras 15 A-C.

A conexão entre o sistema vascular do caule e as folhas, onde um ou mais feixes vasculares são orientados para as folhas, também foi evidenciada a partir dos cortes histológicos, portanto, caule e folhas são estruturas contínuas (Figura 15 A).

Um elevado número de fibras foi observado na região do segmento nodal e internodal (Figura 15 D). Também foi detectada a presença de tricomas (Figura 15 D) que são estruturas comuns em folhas de bambu.

Foi possível observar a ocorrência de primórdios radiculares nas amostras analisadas, que surgiram a partir da região nodal em associação com os botões axilares (Figura 15 E). Observou-se que a raiz adventícia surge na conexão do segmento nodal (Figura 15 F) e sua estrutura anatômica é sistematicamente organizada, começando com a epiderme, córtex, tecidos vasculares e medula.

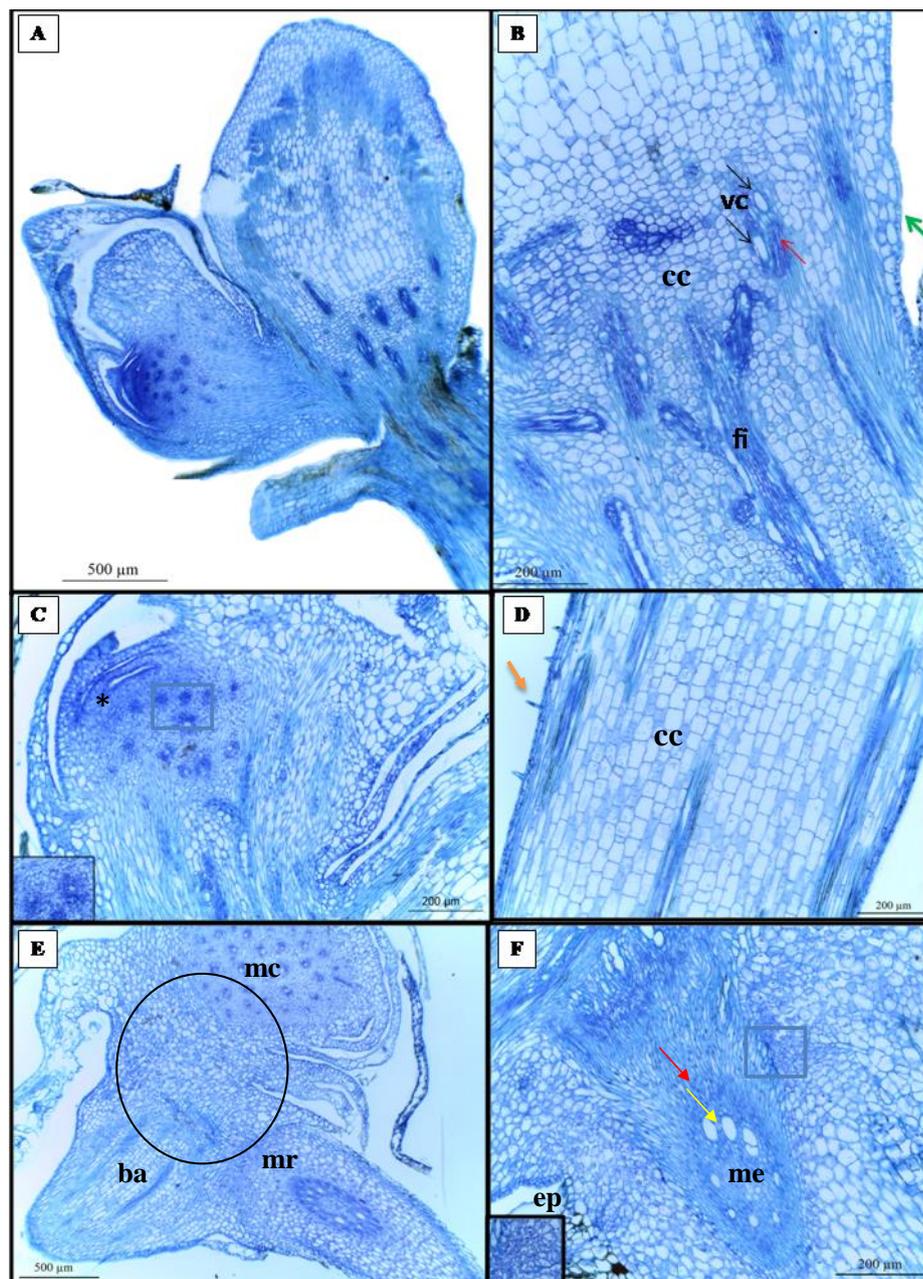


Figura 15. Cortes histológicos de *Guadua magna* propagada *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo (corados com azul de Toluidina) para caracterização anatômica. A- Segmento nodal em T4-BIT, B- conexão entre o sistema vascular do caule e as folhas em T4-BIT, seta preta indicando xilema, seta vermelha indicando floema (feixes vasculares), seta verde indicando epiderme, C- detalhe da gema axilar dormente do segmento nodal em T4-BIT, notar região meristemática (retângulo na lateral esquerda inferior correspondente ao quadrado com borda cinza), (*) indicando primórdio foliar. D- segmento internodal em T3-BIPER, seta laranja indicando tricoma, E- base do propágulo vegetativo em T3-BIPER, círculo com borda preta mostrando a conexão entre colmo, primórdio foliar e primórdio radicular, F- detalhe da organização da estrutura anatômica da raiz adventícia conectada ao segmento nodal (retângulo na lateral esquerda inferior correspondente ao quadrado com borda cinza), seta amarela indicando tecido vascular, seta vermelha indicando córtex. Abreviações: (ba) botão foliar axilar, (cc) células compactadas, (ep) epiderme, (fi) fibra, (mc) meristema caulinar, (me) medula, (mr) meristema radicular, (cv) conexão vascular.

Portanto, a análise anatômica revelou que os explantes continham a estrutura celular básica necessária para o desenvolvimento de novos brotos e raízes (córtex, parênquima, regiões meristemáticas, células de primórdios foliares e feixes vasculares).

Com as análises histoquímicas, as células do segmento nodal contendo gema axilar dormente das plantas propagadas *in vitro* nos diferentes sistemas de cultivo (T1-MLC, T3-BIPER e T4-BIT) apresentam discretos corpos proteicos, sobretudo em células vacuoladas, conforme reação positiva com *Xylidine Ponceau* - XP (Figuras 16 A-C). Em contrapartida, foi observado que no segmento internodal, há abundância de corpos proteicos nas células estruturais que envolvem o feixe vascular (Figura 16 D). Na parte basal dos propágulos vegetativos, notaram-se resquícios proteicos fragmentados em diferentes tamanhos nas células da região de conexão entre os primórdios foliar, caulinar e radicular (Figuras 16 E-F).

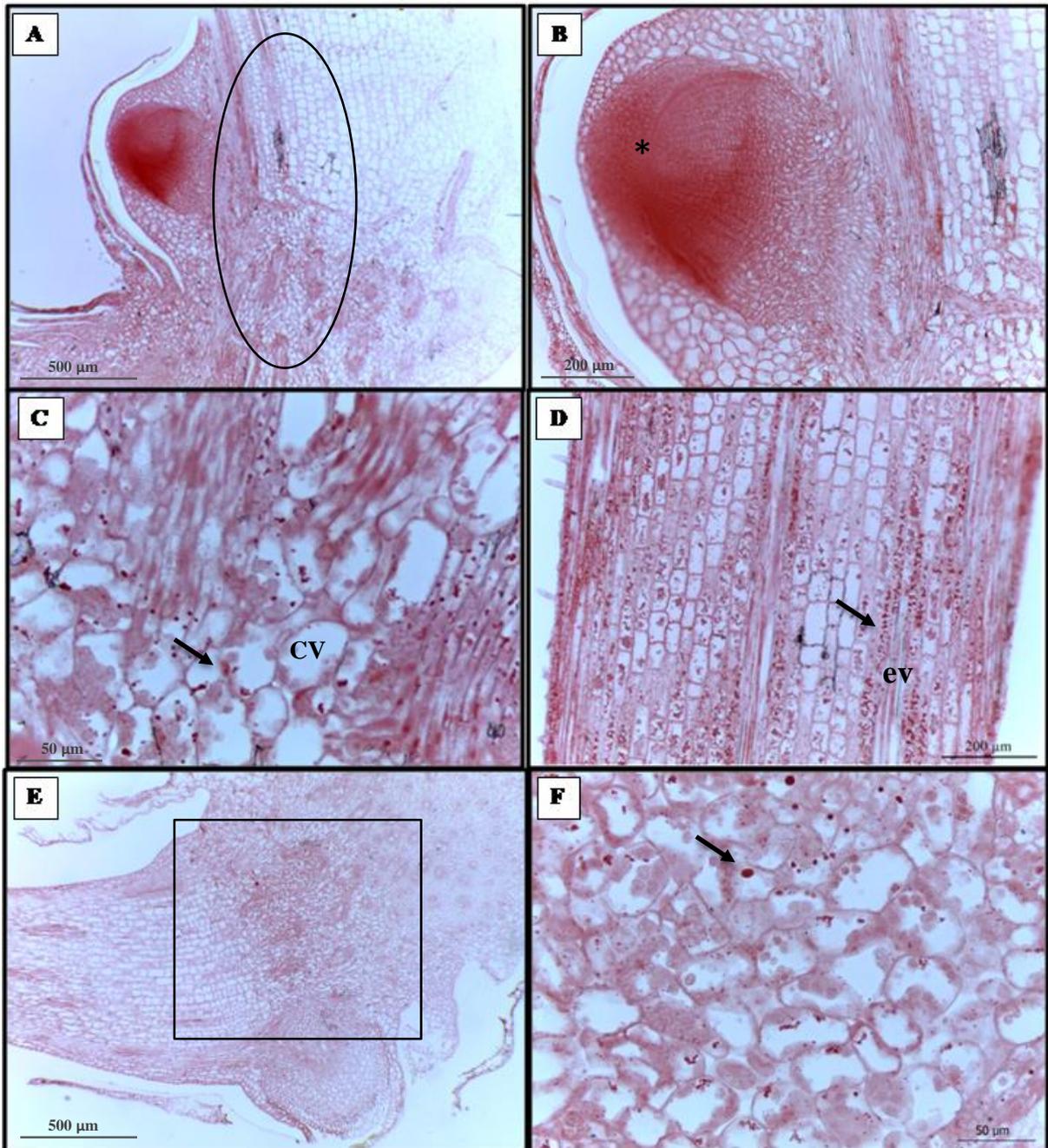


Figura 16. Secções longitudinais da propagação *in vitro* de *Guadua magna* em diferentes sistemas de cultivo para análise histoquímica, corados com *Xylidine Ponceau - XP* para visualização de corpos proteicos. A- Segmento nodal em T1-MLC, notar círculo que detalha a região de conexão da gema axilar e o colmo, B- detalhe da gema axilar dormente do segmento nodal, (*) primórdio foliar, região de parede celular corada, C- detalhe de resquícios proteicos na região de conexão da gema axilar com o colmo, seta indicando corpo proteico, D- segmento internodal de T3-BIPER, apresentando abundantes corpos proteicos apontados pela seta, E- base do propágulo vegetativo, quadrado detalhando a conexão de colmo, primórdio foliar e primórdio radicular, F- detalhe da conexão entre os tecidos descritos na letra E com seta apontando para resquícios corpos proteicos. Abreviações: (cv) célula vacuolada, (ev) elemento de vaso.

Amiloplastos (polissacarídeos neutros) foram observados principalmente nas células em volta do feixe vascular do segmento nodal dos propágulos advindos nos diferentes sistemas de cultivo. Em detalhe nota-se a concentração desses produtos na região de conexão do nó (Figuras 17 A-B). No segmento internodal, observou-se notável presença de amiloplastos nas células estruturais que envolvem o feixe vascular (Figuras 17 C-D).

Na base do propágulo vegetativo conectando colmo, primórdio foliar e primórdio radicular, foi possível detectar abundância de amiloplastos na região envolta do primórdio radicular (Figuras 17 E-F).

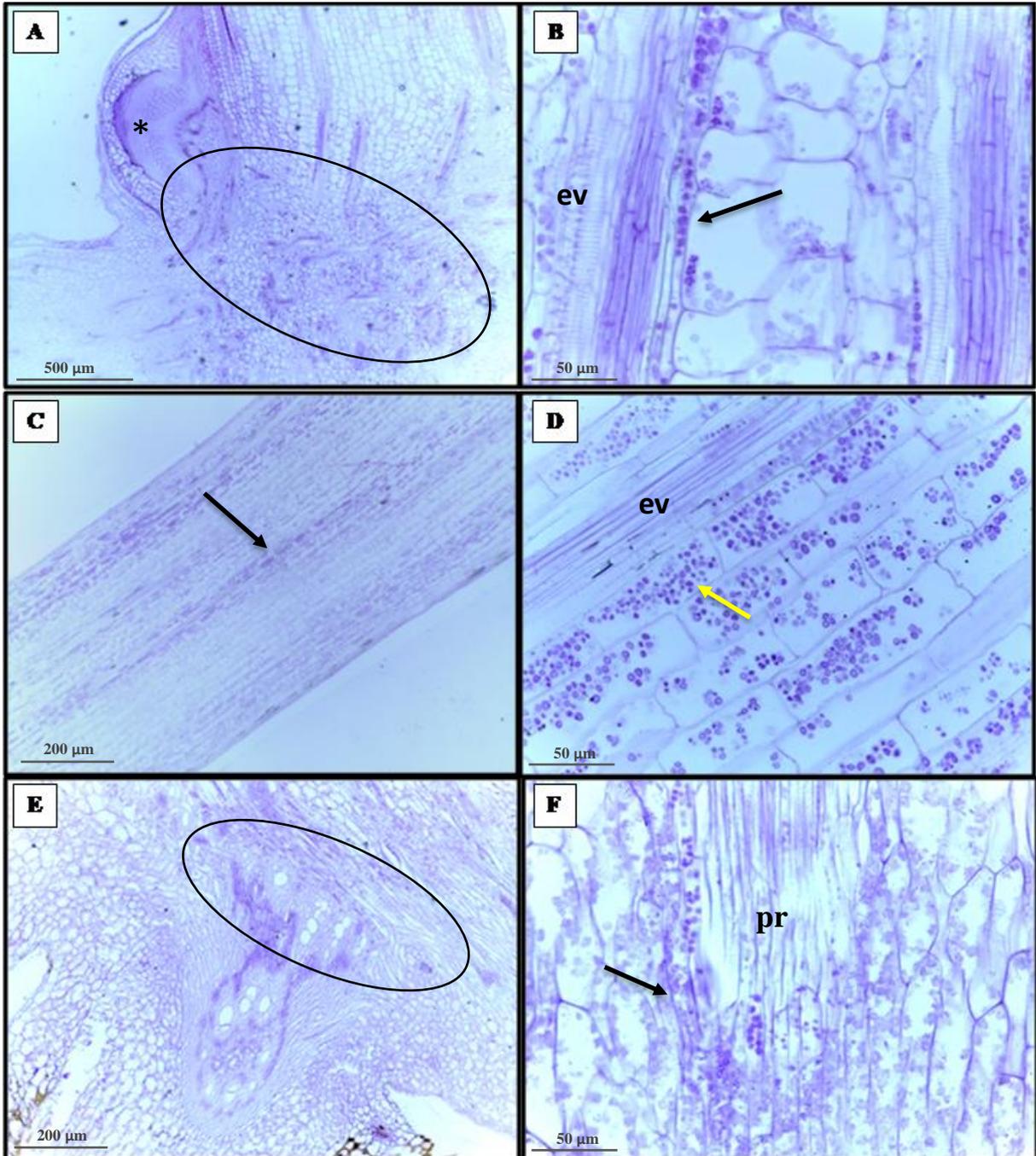


Figura 17. Secções longitudinais de *Guadua magna* da propagação *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo para análise histoquímica com *Periodic Acid Schiff* – PAS para visualização de amiloplastos (polissacarídeos neutros). A- Segmento nodal em T3-BIPER, círculo de borda preta demonstrando a conexão entre gema axilar e a região do colmo, (*) indicando gema axilar, B- detalhe da gema axilar dormente do segmento nodal com aparente amiloplastos (grãos de amido) apontados pela seta preta, na região em volta do elemento de vaso, C- segmento internodal em T3-BIPER, seta preta apontando aglomeração de amiloplastos, D- detalhe do segmento internodal, seta amarela apontando notável presença de amiloplastos em células estruturais; E- base do propágulo vegetativo, círculo demonstrando a conexão de colmo, primórdio foliar e primórdio radicular advindo de T4-BIT, F- detalhe da região envolta do primórdio radicular com seta preta apontando amiloplastos em abundância. Abreviações: (ev) elemento de vaso, (pr) primórdio radicular.

Ainda de acordo com as análises histoquímicas com Lugol, abundante quantidade de amiloplastos ricos em grãos de amido foi observada nas células dos segmentos nodais na região da conexão do nó (Figuras 18 A-B), no segmento internodal (Figuras 18 C-D) e na região envolta do primórdio radicular da base do propágulo vegetativo (Figuras 18 E-F), que conecta colmo, primórdio foliar e primórdio radicular

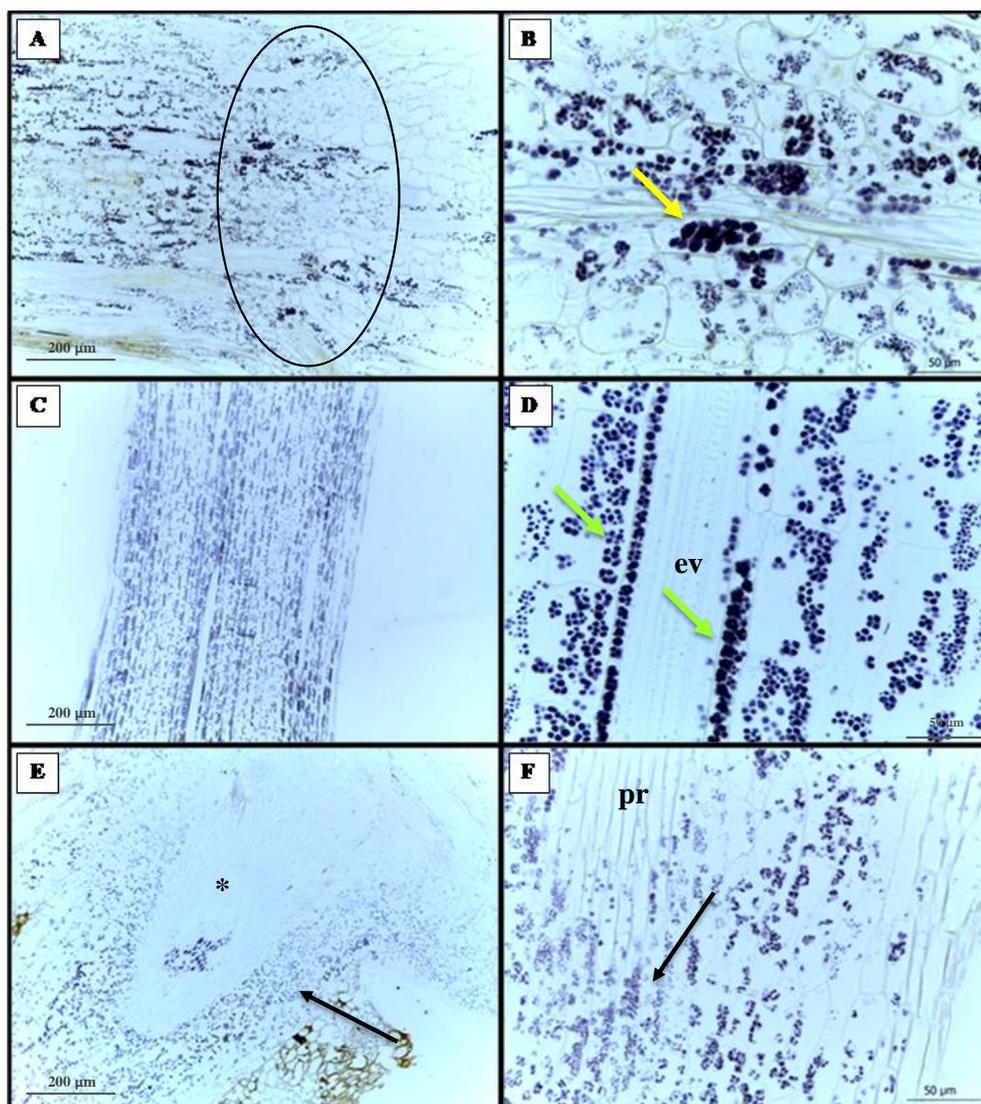


Figura 18. Secções longitudinais de *Guadua magna* da propagação *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo para análise histoquímica com Lugol para visualização de grãos de amido. A- Segmento nodal em T1-MLC, círculo de borda preta demonstrando a região de conexão do nó do colmo, B- detalhe da região de conexão do nó apresentando abundância em grãos de amido, seta amarela apontando aglomerado de grãos de amido, C- segmento internodal em T3-BIPER, D- detalhe do segmento internodal com seta verde apontando notável presença de grãos de amido; E- base do propágulo vegetativo advindo do T4-BIT, (*) primórdio radicular, seta preta apontando aglomeração de grãos de amidos, F- detalhe da região envolta do primórdio radicular, seta preta apontando grãos de amido em abundância. Abreviações: (ev) elemento de vaso, (pm) primórdio radicular.

Portanto, a intensa presença de corpos proteicos e amido nas células estruturais envoltas aos feixes vasculares, pode caracterizar o envolvimento desses compostos na organização dos tecidos vasculares. Além do mais, a abundante presença de grãos de amido nas células das gemas adventícias, dos primórdios caulinares e radiculares sugere a participação desses elementos nos mecanismos de divisão celular.

3.6 Aclimatização das plantas propagadas nos diferentes sistemas de cultivo

Após os 90 dias de cultivo *in vitro*, as plantas de *G. magna* obtidas dos tratamentos Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema sob Agitação (T2-MLA), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT) foram transferidas para a etapa de aclimatização, onde ocorreram enraizamentos adventícios espontâneos (Figura 19).



Figura 19. Aclimatização *ex vitro* dos propágulos vegetativos oriundas dos diferentes sistemas de cultivo. A- Planta após 90 dias de cultivo *in vitro* (barra = 1 cm), B- plantas na fase de pré-aclimatização em mini-estufa incubadas em câmara de crescimento (barra = 15 cm), C- plantas recém transportadas para casa de vegetação (barra = 10 cm), D- plantas após 60 dias em casa de vegetação (barra = 1 cm).

O tratamento T1-MLC apresentou porcentagem de sobrevivência intermediária (66,7 %), entretanto, não houve sobrevivência das plantas oriundas de T2-MLA. Os índices de sobrevivência das plantas aclimatizadas *ex vitro* foram significativamente maiores quando oriundas do tratamento T4-BIT (95,8 %), seguido de T3-BIPER (88,2 %) (Tabela 5).

Tabela 6. Porcentagem média da sobrevivência na fase de aclimatização *ex vitro* das plantas de *Guadua magna* em casa de vegetação advindas de diferentes sistemas de cultivo.

Tratamento	Descrição do sistema de cultivo	%SOB
T1-MLC	Meio Líquido Convencional	66,7 ± 15,0 b
T2-MLA	Sob Agitação	0,00 ± 0,0 c
T3-BIPER	Biorreator de Imersão Permanente	88,2 ± 10,4 ab
T4-BIT	Biorreator de Imersão Temporária	95,8 ± 10,8 a

Médias ± erro padrão com letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de F ao nível de $\alpha = 5\%$ de significância.

Portanto, as melhores percentagens de sobrevivência de plantas aclimatizadas foram verificadas nos sistemas de biorreatores, especialmente em T4-BIT, conferindo a esse tratamento melhores condições de propagação *in vitro* de mudas de *G. magna*.

3.7 Análise da fidelidade genética dos clones aclimatizados

Para análise da fidelidade genética dos clones de *G. magna* obtidos da aclimatização, foram testados inicialmente 22 *primers*, entre os quais, 17 *primers* permitiram a amplificação por PCR de 99 *locos* (alelos), que apresentaram total de 11 alelos polimórficos. Do resultado dessa amplificação, a porcentagem total de bandas polimórficas foi de 5,2 %, e em 8 *primers* ocorreram polimorfismo relativamente baixo (< 1,62 %). Destes, o *primer* 11ZM foi o que proporcionou o maior número de alelos polimórficos (3) para as plantas analisadas (Tabela 7).

Tabela 7. Dados numéricos obtidos da amplificação por PCR de 17 *primers* ISSR utilizados para a análise da fidelidade genética de clones de *Guadua magna* propagados *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo.

Primer	Sequência (5' - 3')	Total de alelos amplificados	Tamanho dos alelos (pb)	Nº de alelos polimórficos	Polimorfismo médio (%)
11 ZM	TGTCACACACACACAC	5	500 - 1500	3	1,62
12 ZM	GGTCACACACACACAC	6	500 - 1500	1	0,45
15 ZM	GTGCACACACACACAC	6	450 - 1500	2	0,46
16 ZM	CGGCACACACACACAC	5	350 - 850	1	0,27
17 ZM	CAGCTCTCTCTCTCTC	5	500 - 1500	0	0,00
19 ZM	CCTGCACACACACACAC	6	350 - 850	0	0,00
38 ZM	AGCAGCAGCAGCAT	6	300 - 1500	1	1,12
39 ZM	AGCAGCAGCAGCAC	6	400 - 700	1	0,45
50 ZM	CCAGCTGCTGCTGCT	6	400 - 1500	1	0,66
52 ZM	GGCACCACACACACACACA	6	500 - 1750	0	0,00
53 ZM	CGCAACACACACACACACA	6	500 - 1750	0	0,00
54 ZM	GGCTACACACACACACACA	6	500 - 1750	0	0,00
55 ZM	CCTCCACACACACACACACA	6	500 - 2000	0	0,00
56 ZM	GCTACCACACACACACACACA	6	250 - 1250	1	0,22
57 ZM	CGTCCACACACACACACACA	6	400 - 1750	0	0,00
58 ZM	CGAACCACACACACACACACA	6	250 - 1000	0	0,00
10 PS	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	6	350 - 1250	0	0,00
<i>Total</i>		99		11	5,25

Os dados indicam que, para a análise da fidelidade genética de *G. magna*, esses *primers* têm níveis semelhantes de probabilidade na determinação do polimorfismo entre os clones selecionados.

Através do dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA (agrupamento aos pares pela média aritmética não ponderada), pode-se observar que no sistema de cultivo convencional (T1-MLC), 21 dos 25 indivíduos analisados apresentaram 100 % de similaridade. Nesse tratamento, quatro plantas apresentaram algum tipo de variação, diferindo em média apenas 0,1 % dos demais clones (Figura 20 A).

Seguidamente em T3-BIPER, 20 dos 25 indivíduos analisados apresentaram 100 % de similaridade entre si, e os cinco somaclones diferiram, em média, apenas 0,2 % dos demais clones (Figura 20 B). Já em T4-BIT, 22 dos 25 indivíduos analisados apresentaram 100 % de similaridade entre si, e os três somaclones diferiram, em média, apenas 0,1 % dos demais clones (Figura 20 C).

Nas ampliações, verificou-se que independentemente da região do DNA analisada e do sistema de cultivo *in vitro* utilizado para a propagação das plantas, a ocorrência de variabilidade foi baixa, conferindo alto grau de similaridade genética entre os clones analisados (Figura 21).

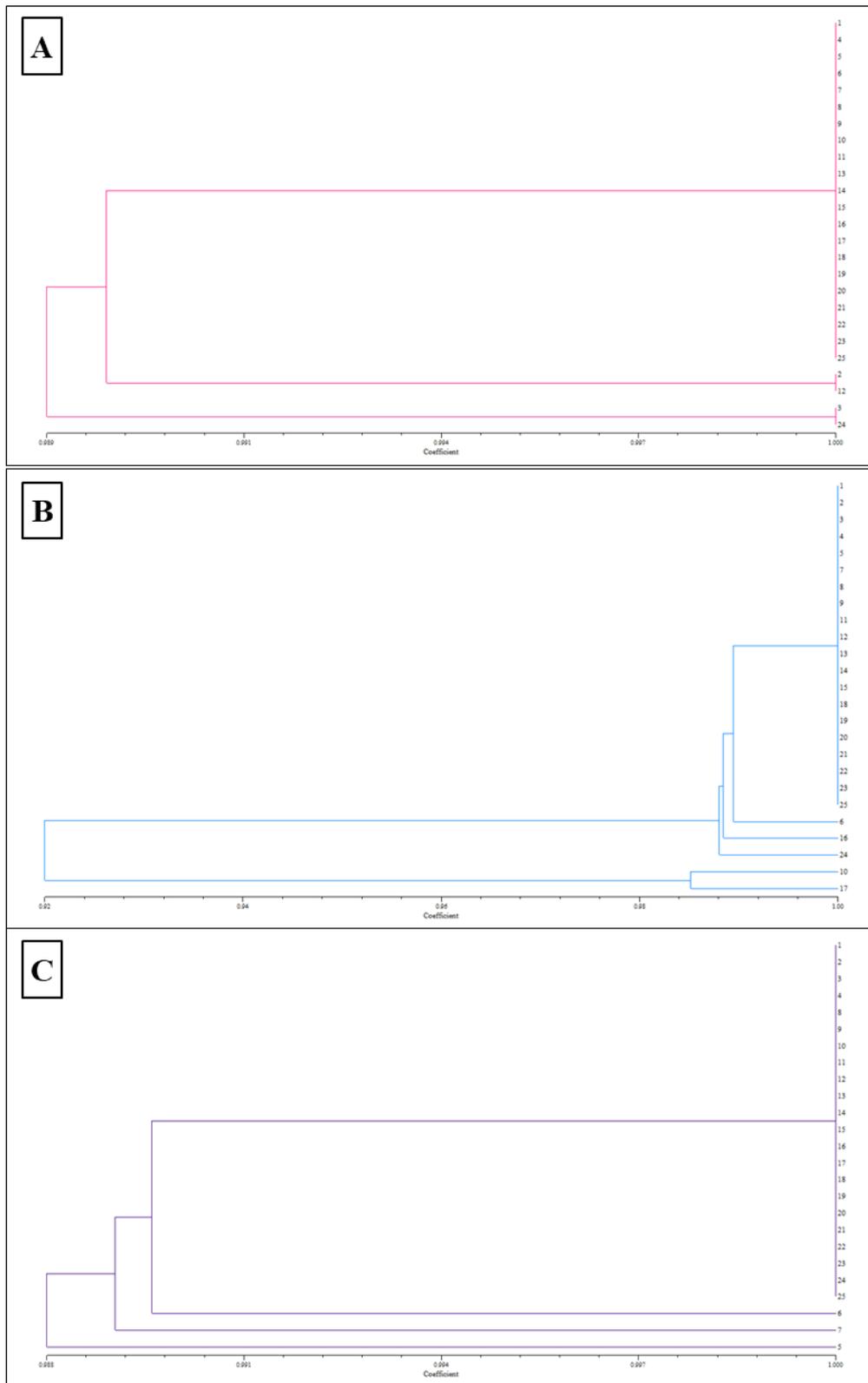


Figura 20. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA da relação entre os clones de *Guadua magna* oriundos da propagação *in vitro* dentro dos diferentes tratamentos: A- Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC); B- Sistema de cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER); C- Sistema de cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT).

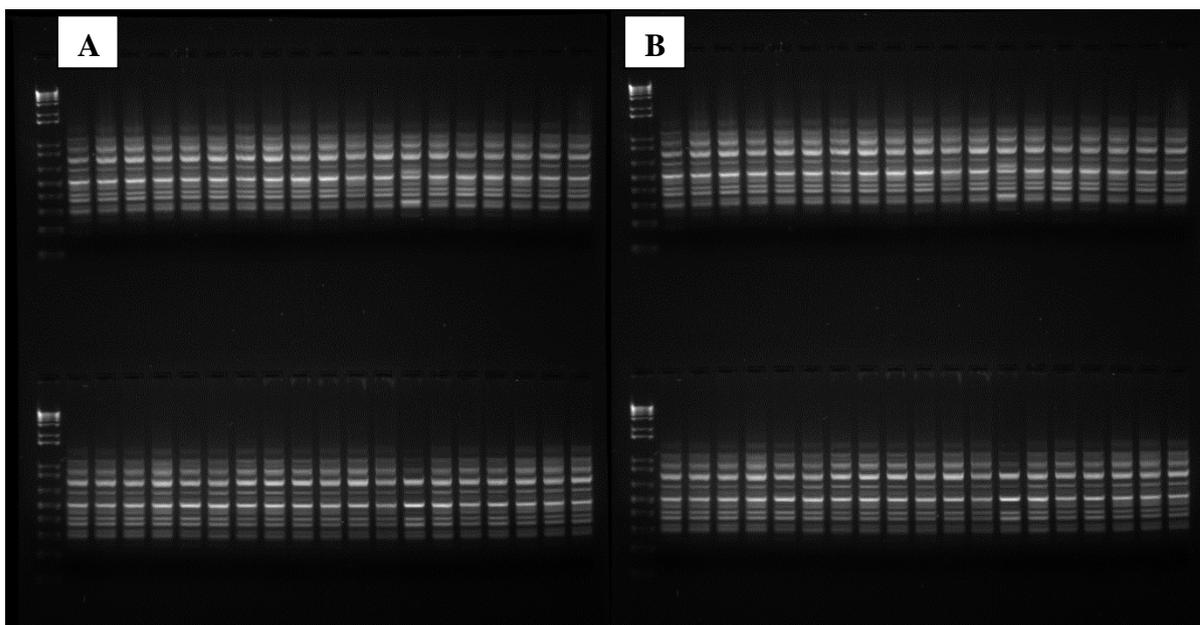


Figura 21. Análise da fidelidade genética de plantas de *Guadua magna* aclimatizadas após cultivo *in vitro* dentro dos diferentes sistemas de cultivo (tratamentos): Sistema Convencional de Micropropagação (T1-MLC), Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (T3-BIPER) e Sistema de Cultivo em Biorreator de Imersão Temporária (T4-BIT), A-B - *Primer 55 zm* na amplificação do DNA de 75 amostras obtidas aleatoriamente dos tratamentos.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo comparou as respostas biométricas e fisiológicas, e também a fidelidade clonal de mudas produzidas em cultura líquida em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. De maneira geral, os resultados apresentados, evidenciam influência positiva em relação a utilização dos biorreatores (T3 BIPER – Biorreator de Imersão Permanente e T4 BIT - Biorreator de Imersão Temporária), pois promoveram ganhos no processo de multiplicação, crescimento e desenvolvimento das plantas de *G. magna*, mesmo que algumas variáveis não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao T2 MLC - Meio Líquido Convencional.

De fato, já é consolidado na literatura para diversas espécies que, dentre as possibilidades de propagação *in vitro*, os sistemas de cultivo em biorreatores propiciam condições para o material vegetal aumentar sua capacidade de sobrevivência *in vitro*, mitigando efeitos geralmente encontrados pela propagação convencional, como por exemplo fatores relacionados a contaminação (Ray et al., 2017; Furlan et al., 2018; Nogueira et al., 2019; Pasqualini et al., 2019) e interferência sazonal (Singh et al., 2012b; Mudoj et al., 2014; Bhadrawale et al., 2017).

Outro fator que influencia positivamente a micropropagação em biorreatores, principalmente durante a multiplicação de brotações, é a transferência da solução nutritiva e concomitante renovação do ar, evitando a liberação de compostos fenólicos produzidos pelo metabolismo das plantas, que podem vir a prejudicar o desenvolvimento sob condições *in vitro* (Lemos et al., 2001; Negi e Saxena, 2011; Quiala e al., 2012; Ribeiro e al., 2013; Mendonça 2016; Mudoj et al., 2013).

Ademais, em sistemas de biorreatores é proporcionada uma maior área de contato dos tecidos dos explantes com o meio de cultura líquido e, conseqüentemente, ocorre um melhor aproveitamento dos nutrientes (Lemos et al., 2011). Um considerável número de estudos confirma que os sistemas de biorreatores, principalmente aqueles de imersão temporária, estimulam a proliferação e o crescimento de brotações em diversas espécies vegetais.

Mcalister et al. (2005) e Oliveira et al. (2011a, 2011b) encontraram resultados promissores para multiplicação de clones de *Eucalyptus*. Quiala et al (2012) desenvolveram um sistema semi-automatizado em biorreatores para melhorar o desenvolvimento de Teca em

condições *ex vitro*, e Mendonça et al. (2016) estabeleceram um protocolo de propagação em biorreatores de *Eucalyptus* adequado para atividades comerciais.

Espécies de bambus também são favorecidas com a utilização do cultivo em sistemas em biorreatores, e apresentaram maior número de brotações por explante, como verificado em *B. vulgaris* (Ribeiro e al., 2016), *G. angustifolia* (Gutiérrez et al., 2016), e também no presente estudo para *G. magna*.

A massiva multiplicação de brotações observada em *G. magna* pode estar relacionada com a quebra da dominância apical possibilitada pelos biorreatores durante o desenvolvimento vegetal. Esse mecanismo ocorre devido o movimento das culturas que estimulam o crescimento das gemas laterais e, em consequência, aumenta a proliferação de brotações (Paek et al., 2001), que pode chegar à ser 2,2 vezes maior do que os sistemas de propagação *in vitro* tradicionais (Lemos et al., 2001). Tal informação se faz importante, pois para uma produção comercial, almeja-se aumentar a taxa de multiplicação e, conseqüentemente, a redução dos custos operacionais (Mendonça et al., 2016).

Neste contexto, vale ressaltar que se faz necessário o acompanhamento dos efeitos dos sistemas de cultivo *in vitro* sobre as respostas fisiológicas das plantas, que podem garantir melhorias de produção e a compreensão dos processos de desenvolvimento das plantas, além da capacidade plástica de adaptação nos diferentes sistemas.

Neste sentido, é possível afirmar que as respostas adaptativas das plantas de *G. magna* em sistemas de biorreatores (T3-BIPER e T4-BIT) favoreceram os processos de desenvolvimento.

As observações apresentadas no presente estudo demonstraram influência positiva do extravasamento de eletrólitos no cultivo *in vitro* das plantas de *G. magna* em sistemas de biorreatores, quando comparadas ao meio líquido convencional. Esse fato representa que as condições de estresse foram controladas quanto a manutenção da estabilidade das biomembranas (Premachandra et al., 1989; Maheswary et al., 1999; Langaro, 2014; Kosmala et al., 2012; Peloso et al., 2017; Custodio et al., 2017).

É de conhecimento que plantas condicionadas aos sistemas de cultivo *in vitro* apresentam capacidade adaptativa limitante para processos heterotróficos, com condições não adequadas de iluminação e de concentração de CO₂ (Nicoloso et al., 2003). Isso pode causar senescência foliar e, conseqüentemente, a morte vegetal inclusive em espécies de bambu (Polesi et al., 2019).

Além disso, durante o cultivo *in vitro*, as plantas permaneceram imersas em meios de cultura necessários à sua sobrevivência, crescimento e desenvolvimento, que foram suplementados de água, nutrientes, vitaminas, aminoácidos, carboidratos e fitorreguladores, condições que também limitam a capacidade heterotrófica vegetal.

Independentemente das condições apresentadas, os parâmetros de crescimento (indução de brotações, altura dos brotos e massa fresca), assim como os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides) e disfunções em processos metabólicos promovidos por alterações das propriedades da membrana, apresentaram valores preferíveis em sistemas de biorreatores.

Tais efeitos podem estar relacionados à síntese de sacarose e a hidrólise do amido. Na análise dos componentes bioquímicos (AST/Amido), verificou-se que as plantas de *G. magna* cultivadas em sistemas de biorreatores (T3-BIPER e T4-BIT) consumiram em maior quantidade suas reservas de carboidratos (AST).

AST's estão relacionados na translocação de sacarose, respiração, geração de espécies reativas de oxigênio e metabolismo de crescimentos (Alonso et al., 2007b). O acúmulo de açúcares solúveis, como a sacarose e seus produtos de hidrólise (glicose e frutose), pode ser resultado da degradação do amido, que constitui a principal reserva temporária de carbono das plantas (Cheug et al., 2014; Moreira et al., 2019).

Tais produtos podem ser utilizados para a manutenção do organismo vegetal (Faust, 1989; Alonso et al., 2007b; Moreira et al., 2019), para o ajuste osmótico (Hare et al., 1998; Bajji et al., 2001) e também durante o fenômeno de expansão celular (Moreira et al., 2019), refletindo diretamente nos processos de crescimento da planta, permitindo um aumento significativo no potencial de produtividade.

Resultados semelhantes foram apresentados por Brar et al. (2014) para a espécie de *B. balcooa*, revelando que o crescimento e metabolismo das plantas foram mais pronunciados em tratamentos onde AST e amido exibiram menor conteúdo.

Essa relação amido/AST comprova a sua utilização como fonte de energia nos processos metabólicos de manutenção da planta (crescimento, proliferação de brotos, biomassa), o que confere aos sistemas de biorreatores ambientes promissores para o favorável desenvolvimento vegetativo nesse sistema de cultivo *in vitro*.

As condições *in vitro* do presente trabalho refletiram positivamente no desenvolvimento das plantas de *G. magna*, como por exemplo, a formação de estruturas celulares básicas necessárias para o desenvolvimento de novos tecidos (Furlan et al., 2018) e

o acúmulo de compostos de reserva para a proliferação de novas células, tecidos e órgãos vegetais (Ye, 2002; Appezzato-da-Glória e Machado 2004), evidências corroboradas pelas análises anatômicas e histoquímicas.

Foi constatada ainda, divisão de células das gemas adventícias, e o desenvolvimento de novas brotações, além da presença de tricomas, estruturas comuns em folhas de bambu (Soderstrom e Ellis, 1988; Filgueiras e Viana, 2017).

Observou-se nos colmos a presença de fibras, que contribuem para suporte estrutural e flexibilidade dos colmos das espécies de bambu (Ray et al. 2004). Tais colmos apresentam apenas crescimento primário em bambus, dividido nas seguintes regiões: córtex, parênquima e feixes vasculares, nos quais o córtex cobre a epiderme e a hipoderme (Ray et al. 2004).

Também foi verificado o desenvolvimento espontâneo de raízes adventícias, estruturas que contribuem positivamente para as adaptações *ex vitro*, e são encontradas em todas as plantas vasculares, embora em bambus, elas geralmente originam-se do caule (Kapoor e Rao, 2006).

Essas raízes contribuíram positivamente para a etapa de aclimatização, que foi conduzida de forma gradual para garantir a sobrevivência das plantas, evitando a brusca antecipação de alterações morfológicas e fisiológicas do material, e minimizando o impacto decorrente da transição para casa de vegetação (Berilli et al., 2011; Patel et al., 2015).

Essas condições ambientais adequadas mantidas no estágio de pré-aclimatização (Nogueira e al., 2019; Vale et al., 2019) podem garantir altas taxas de sobrevivência, mesmo que as plantas não apresentem raízes (Nogueira et al., 2019).

As plantas de *G. magna* do presente estudo, também não receberam tratamento com auxinas para enraizamento nas etapas *in vitro* e/ou *ex vitro*. Elas foram plantadas diretamente no substrato, onde se observou maiores taxas de sobrevivência do material oriundo nos sistemas de biorreatores, especialmente em T4 BIT (Biorreator de Imersão Temporária).

A evidência desse enraizamento *ex vitro* em *G. magna* diretamente no substrato, apresenta como vantagens a formação de um sistema radicular de qualidade, diminuindo, assim, a mortalidade durante a aclimatização. Esse fato reflete diretamente na redução dos custos de produção da micropropagação, quando em relação ao enraizamento *in vitro* (Fermino Júnior et al., 2011; Tronco et al., 2015).

Dessa forma, a micropropagação por meio da utilização de biorreatores, poderá contribuir significativamente para a aceleração do processo de produção de clones e na

redução do custo final da muda, tornando o processo mais econômico, se comparado ao sistema de cultivo *in vitro* convencional.

Notadamente, há sempre a possibilidade de ocorrer variação genética durante a propagação *in vitro* (Negie Saxena, 2011; Goyal et al., 2014). No entanto, as plantas de *G. magna* aclimatizadas não apresentaram diferenças morfológicas, sugerindo alto grau de similaridade genética entre os clones analisados em todos os sistemas de cultivo, apesar das análises moleculares acusarem somaclones diferindo em média 0,1 % à 0,2 %.

Alguns trabalhos corroboram os resultados obtidos neste estudo com análise de ISSR, como para *D. strictus* que mostrou que praticamente não havia variabilidade entre as plantas micropropagadas e a planta matriz (Goyal et al., 2014). Outros trabalhos ainda, não encontraram nenhuma variabilidade entre as plantas de bambu regeneradas *in vitro* utilizando a técnica com ISSR, como observado para *B. nutans* (Negi e Saxena, 2010), *B. balcooa* (Negi e Saxena, 2011; Brar et al., 2014), *G. angustifolia* e *G. magna* (Nogueira et al., 2019).

Sendo assim, os marcadores ISSR parecem ser eficientes para determinar a similaridade das plantas produzidas, e as informações geradas neste trabalho podem ser úteis para a certificação dos clones advindos de sistemas de cultivo *in vitro* também para outras espécies de bambu.

5. CONCLUSÃO

Considerando o efeito dos sistemas de cultivo *in vitro* avaliados (T1-MLC, T2-MLA, T3-BIPER e T4-BIT), o uso de biorreatores se destacou, pois tais sistemas promoveram ganhos no processo de multiplicação, crescimento e desenvolvimento de *G. magna*. Além disso, as plantas apresentaram maior percentagem de aclimatização, fator determinante para multiplicação clonal em larga escala.

Os aspectos bioquímicos, anatômicos e histoquímicos contribuíram para um entendimento do desenvolvimento a nível celular e fisiológico sobre a técnica nos diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, inclusive nos biorreatores.

Além do mais, os marcadores ISSR's são eficientes para verificar a fidelidade clonal, e as informações geradas neste trabalho podem ser úteis para determinar a similaridade de plantas advindas de sistemas de cultivo *in vitro* também para outras espécies de bambu.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, A. L.; GALA, A. A.; MANNINGER, K.; BARNA, B. Inhibition of the development of leaf rust (*Puccinia recondita*) by treatment of wheat with allopurinol and production of a hypersensitive-like reaction in a compatible host. **Plant Pathology**, v. 49, p. 317–323, 2000.
- AGNIHOTRI, R. K., NANDI, S. K.; *In vitro* shoot cut: a high frequency multiplication and rooting method in bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. **Biotechnology**, v. 8, p. 259-263, 2009.
- AGNIHOTRI, R. K.; MISHRA, J.; NANDI, S. K.; Improved *in vitro* shoot multiplication and rooting of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro: production of genetically uniform plants and field evaluation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 961-967, 2009.
- ALONSO, A. P.; RAYMOND, P.; HERNOULD, M.; RONDEAU-MOURO, C.; DE GRAAF, A. A.; CHOUREY, P.; LAHAYE, M.; SHACHAR-HILL, Y.; ROLIN, D.; DIEUAIDE-NOUBHANI, M. A metabolic flux analysis to study the role of sucrose synthase in the regulation of the carbon partitioning in central metabolism in maize root tips. **Metabolic Engineering**, v. 9 p. 419-432, 2007b. DOI: 0.1016/j.ymben.2007.06.002.
- AMARAL, L. I. V.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; GASPAR, M. BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v.34, p.425-431, 2007.
- 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**, v. 2, n. 4, 2013.
- ANTEROLA, A. M.; JEON, J. H.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N.G. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. Factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. **Journal Biology and Chemistry**, v. 277, p. 18272–18280, 2002.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 429-437, 2004.
- ARRUDA, L. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; TEIXEIRA, D. E.; ARAÚJO, P. C.; Lignocellulosic composites from Brazilian giant bamboo (*Guadua magna*) part 1: properties of resin bonded particle boards. **Maderas, Ciencia y Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 49-58, 2011.
- ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; ARYA, I.D. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 10, p. 879-882, 1999.
- ATKINSON, M.M., KEPPLER, L.D., ORLANDI, E.W., BAKER, C. J., MISCHKE, C. F., Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K⁺:H⁺ and hypersensitive response in tobacco. **Plant Physiol**, v. 92, p. 215-221.
- AZEVEDO, I. G.; OLIVIRA, J. G.; SILVA, M. G.; PEREIRA, T.; CORRÊA, S. F.; VARGAS, H.; FAÇANHA, A. R. P-type H⁺-ATPases activity, membrane integrity, and

apoplastic pH during papaya fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 242-247, 2008.

BAG, N.; CHANDRA, S.; PALNI, L. S. M.; NANDI, S. K. Micropropagation of Devringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] - a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. **Plant Science**, v. 156, n. 2, p. 125-135, 2000.

BAJJI, M.; KINET, J.M.; LUTTS, S. The use of electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, v.0, p. 1-10, 2001.

BAKSHI, M.; TIWARI, C.; RAZVI, S. Conservation of an important montane bamboo *Thamnocalamus falconeri*, Hook.f. ex Munro through axillary bud proliferation. **Journal of Forest Research**, v.26, n. 1, p.179-185, 2015.

BEENA, D. B.; RATHORE, T. S.; *In vitro* cloning *Bambusa pallida* Munro through axillary shoot proliferation and evaluation of genetic fidelity by random amplified polymorphic DNA markers. **International Journal of Plant Biology**, v. 3, n. 6, p. 27-33, 2012.

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**, v. 33, n. 1, p. 208-214, 2011.

BLACKBURN, G. A. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n.4, p. 855-867, 2007.

BHADRAWALE, D.; MISHRA, J. P.; MISHRA, Y. An improvised *in vitro* vegetative propagation technique for *Bambusa tulda*: influence of season, sterilization and hormones. **Journal of Forestry Research**, 2017. DOI: 10.1007/s11676-017-0569-2.

BRAR, J.; SHAFI, A.; SOOD, P.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* propagation, biochemical studies and assessment of clonal fidelity through molecular markers in *Bambusa balcooa*. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 26, n. 1, p. 115-124, 2014.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: EMBRAPA-SPI /EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 87-132.

CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, J. O. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 62, n. 1, p. 68-78, 2002.

CHEN, Q.; ZHANG, W.H.; LIU, Y. L.; Effect of NaCl, glutathione and ascorbic acid on function of tonoplast vesicles isolated from barley leaves. **Journal Plant Physiology**, v. 155, p. 685-690, 1999.

CHEUNG, C. Y. M.; POOLMAN, M. G.; FELL, D. A.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J. A diel flux balance model captures interactions between light and dark Metabolism

during day-night cycles in C3 and Crassulacean Acid metabolism leaves. **Plant Physiology**, v. 165, p. 917-929, 2014. DOI: 10.1104/pp.113.234468

CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 331-353.

CID, L. P. B.; Cruz, A. R. R.; Teixeira, J. M. Biorreatores de imersão permanente. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 25, p. 50-53, 2002.

COURSOLLE, C.; BIGRAS, F.J.; MARGOLIS, H.A. Assessment of root freezing damage of two-year-old white spruce, blackspruce and jack pine seedlings. **Journal Forestry Research**, v. 15, p. 343-353, 2000.

CUSTÓDIO, I. C.; FELÍCIO, R.; NASCENTE, A. C. S.; SANTOS, P. G. F.; SILVVEIRA, P. S.; MATOS, F. S. Análise de crescimento de plantas de *Eucalyptus urocan* sob déficit hídrico e doses de silício. **Revista Agrotecnologia**, Ipamere, v. 8, n. 2, p. 28-36, 2017.

DE, B.; MUKHERJEE, A. K. Mercuric chloride induced membrane damage in tomato cultured cells. **Biology Plant**, v. 38, p. 469-473, 1996.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v.3, n.1, p.39-45, 1991.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69 n. 3 p. 215–231, 2002.

FERMINO JÚNIOR, P. C. P. F., RAPOSO, A., SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. **Floresta**, v. 41, n. 1, 2011.

FILGUEIRAS, T. S.; LONDOÑO, X. A. Giant new *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) from Central Brazil. In: **Proceedings of 1st National Seminar on Development of the Brazilian Bamboo Research Network**, Brasília, Brazil, p. 27- 33, 2006.

FILGUEIRAS, T. S.; LONDOÑO, X. A. 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.

FRANCA, M. G. C.; THI, A. T. P.; PIMENTEL, C.; ROSSIELLO, R.O.P.; ZUILYFODIL, Y.; LAFFRA, Y. D.; Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. **Environm. Exp. Bot.**, v. 43, p. 227–237, 2000.

FURLAN, F. C.; GAVILAN, N. H.; ZORZ, A. Z.; OLIVEIRA, L. S.; KONZEN, E. R.; BRONDANI, G. E. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, v. 39, n. 1, p. 61-70, 2018.

GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K.; OPRINS, J.; DEBERGH, P.C. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v. 552, p. 195-203, 2001.

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. **Biotech**, v. 5, p. 473-482, 2015.

GUTIÉRREZ, L. G.; LÓPEZ-FRANCO, R.; MORALES-PINZÓN, T. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA[®]. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 28, p. 1503-1510, 2016.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles osmolytes accumulation during stress. **Plant, Cell & Environment**, Weinheim, v. 21, n. 6, p.535-553, 1998.

HEATON, J. W.; MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Foods Science & Technology**, v. 7, p. 8-15, 1996.

HEATON, J. W.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Kinetic model for chlorophyll degradation in green tissue. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.44, p. 399-402, 1996. DOI:10.1021/jf950448x.

ISMAIL A.M. AND HALL A.E. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. **Crop Science**, v. 39, p. 1762–1768, 1999.

JIMÉNEZ, V. M.; CASTILHO, 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**, v. 86, n. 3, p. 389-395, 2006.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, n. 523 p. 1940.

KAPOOR, P.; RAO, I. U. *In vitro* rhizome induction and plantletformation from multiple shoots in *Bambusa bambos* var. gigantea Bennet and Gaur by using growth regulators and sucrose. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, n. 2, p. 211-217, 2006.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.

KAYA, E.; AKDEMIR, H.; OZUDOGRU, E. A.; OZDEN, Y. In Vitro Propagation of Turkish Olive Cultivar "Edremityaglik" via Temporary Immersion Bioreactor Systems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 64, 2011.

KAYA, E.; OZUDOGRU, E. A. *In Vitro* Propagation of Peanut (*Arachis hypogea* L.) via Temporary Immersion Bioreactor Systems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 48, p. 65, 2012.

KOSKY, R. G.; BARRANCO, L. A.; PÉREZ, B. C.; DANIELS, D.; VEJA, M. R.; SILVA, M. F. Trueness-to-type and yield components of the banana hybrid cultivar FHIA-18 plants regenerated via somatic embryogenesis in a bioreactor. **Euphytica**, v. 150, n. 1/2, p. 63-68, 2006.

KOSMALA, A.; PERLIKOWSKI, D.; PAWŁOWICZ, I.; RAPACZ, M. Changes in the chloroplast proteome following water deficit and subsequent watering in a high- and a low-drought-tolerant genotype of *Festuca arundinacea*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 17, p. 6161–6172, 2012. DOI:10.1093/jxb/ers265.

LANGARO, A. C. Alterações fisiológicas na culturado tomateiro devido à deriva simulada de herbicidas. **Revista Brasileira de Herbicidas, Londrina**, v. 13, n. 1, p. 40-46, 2014.

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**, Jaboticabal, v. 23, p. 482-487, 2001.

LIMA, A. L. S. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Gothenburg, v. 47, n. 3, p. 239-247, 2002.

LIN, C. S.; KALPANA, K.; CHANG, W. C.; LIN, N. S.; Improving multiple shoot proliferation in bamboo mosaic virus-free *Bambusa oldhamii* Munro propagation by liquid culture. **Scientia Horticulturae**, v. 42, n. 5, p. 1243-1256, 2007a.

LIN, T.P.; HUANG, N.H. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 1289-1294, 1994.

MACHADO, M. P.; SILVA, A. L. L.; BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK, J. C. ZANETTEFILHO, F. Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot-tip necrosis of *in vitro* regenerated shoots of *Lavandula angustifolia* Mill. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 636-643, 2014.

MAHESWARY, M.; JOSHI, D. K.; SAHA, R.; NAGARAJAN, S.; GAMBHIR, P.N. Transverse relaxation time of leaf water protons and membrane injury in wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to high temperature. **Annals Botany**, v. 84, v. 741–745, 1999.

MARTRE, P.; LACAN, D.; JUST, D.; TEISSON, C. Physiological effects of temporary immersion on *Heveabrasiliensis* callus. **PlantCell, TissueandOrganCulture**. v. 67, p. 25-35, 2001.

MCALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 3, p. 347-358, 2005. DOI: 10.1007/s11240-004-6658-x

MENDONÇA, E. G.; STEIN, V. C.; CARVALHO, H. H.; SANTOS, B. R.; BEIJO, A.; PAIVA, L. V. The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid

culture médium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 1211-1224, 2016.

MISHRA, Y.; PATEL, P. K.; YADAV, S.; SHIRIN, F.; ANSARI, S. A. A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. **Scientia Horticulturae**, v. 115, p. 315-318, 2008.

MORDOCCO, A. M.; BRUMBLEY, J. A.; LAKSHMANAN, P. Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 45, n. 4, p. 450-457, 2009.

MOREIRA, A. L.; SILVA, A. B.; SANTOS, A.; REIS, C. L.; LANDGRAF, P. R. C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.

MOREIRA, T. B.; LIMA, J. M.; COCA, G. C.; WILLIAMS, T. C. R. Insights into the spatial and temporal organisation of plant metabolism from network flux analysis. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, p. 215-226, 2019.

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**, v. 96, p. 962-966, 2009.

MUDOI, K. D.; SAIKIA, S. P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal Biotechnology**, n. 12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.

MUDOI, K.D.; SAIKIA, S. P.; BORTHAKUR, 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 Biotechnology**, v. 13, p. 1961-1972, 2014.

MUJIB, A.; ALI, M.; TASIU ISAH, DIPTI. Somatic embryo mediated mass production of *Catharanthus roseus* in culture vessel (bioreactor) – A comparative study. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 442-449, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEGI, D.; SAXENA, S. Ascertaining clonal fidelity of tissue cultureraised plants of *Bambusa balcooa* Roxb. using inter simple sequence repeat markers. **New Forest**, v. 40, p. 1-8, 2010.

NEGI, D.; SAXENA, S.; *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. **Plant Biotechnoly Reports**, v. 5, p. 35-43, 2011.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeitos de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

NOGUEIRA, J. S. **Estratégias para germinação e conservação *ex situ* de *Dendrocalamus asper* e micropropagação de espécies do gênero *Guadua* (bambusoideae, poaceae)**. Tese de doutorado em em Botânica da Universidade de Brasília, 189 p. 2018.

NOGUEIRA, J. S.; GOMES, H. T.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Guadua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 49, 2019.

O'BRIEN T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.

OKADA, K.; INOUE, Y.; SATOH, K.; KATOH, S. Effects of light on degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached riceleaves. **Plantcellphysiology**, v. 33, n. 8, p. 1183-1191, 1992.

OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R. M.; OTONI, W. C.; TEIXEIRA, J. B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.6, p.1207-1217, 2011a.

OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL, R. M.; SANTOS, A. F. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semi-sólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 39, n. 91, p.309-315, 2011b.

PAEK, K. Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, n. 3, p. 287–300, 2005.

PASQUALINI, A. P. A.; SCHNEIDER, G. X.; FRAGA, H. P. F.; BIASI, L. A.; QUOIRIN, M. *In vitro* establishment of *Bambusa oldhamii* Munro from field-grown matrices and molecular identification of endophytic bacteria. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019. DOI: 0.1590/1983-40632019v4953673.

PATEL, B.; GAMI, B.; PATEL, N.; BARIA, V. One step pre-hardening micropropagation of *Bambusa balcoa* Roxb. **Journal of Phytology**, v. 7, p. 1-9. 2015.

PELOSO, A. F.; TATAGIBA, S. D.; REIS, E. F.; PESSOPANE, J. E.; AMARALL, J. F. T. Limitações fotossintéticas em folhas de cafeeiro arábica promovidas pelo déficit hídrico. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 3, p. 389-399, 2017.

POLESI, L. G.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; HERINGER, A. S.; ORNELLAS, T. S.; SANTOS, H. P.; GUERRA, M. P.; PESCADOR, R. Chloroplast ultrastructure and hormone endogenous levels are differently affected under light and dark conditions during *in vitro* culture of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 10, p. 2-12, 2019. DOI: 0.1007/s11738-018-2804-7.

PRADEEP REDDY, M.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A.; Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.

PREMACHANDRA, G. S.; SANEOKA, H.; OGATA, S. Nutrio-physiological evaluation of polyethylene glycol test of cell membrane stability in maize. **Crop Science**, v. 29, p. 1287-1292, 1989.

QUIALA, E.; CANÁL, M.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, R.; CHÁVEZ, M.; VALLEDOR, L.; FERIA, M.; BARBÓN, R. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p.223–234, 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **Na introduction to R. Notes on R: a programming environment for data analysis and graphics**. Version 2.15.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-12-7, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 18 out. 2012.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; YAKANDAWALA, K. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. **Plant Science**, v. 129, n. 2, p. 213-223, 1997.

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**, v. 110, p. 109-113, 2006.

RATHORE, T. S.; KABADE, U.; JAGADISH, M. R.; SOMASHEKAR, P. V.; VISWANATH, S. Micropropagation and evaluation of growth performance of the selected industrially important bamboo species in southern India. In: **Proc 8th World Bamboo Cong Lucas S** (ed) Bangkok, Thailand, p. 41-55, 2009.

RAY, A. K.; DAS, S. K.; MONDAL, S.; RAMACHANDRARAO, P. Microstructural characterization of bamboo. **Journal of Materials Science**, v. 39, n. 3, p. 1055-1060, 2004.

RAY, S. S.; ALI, M. N.; MUKHERJEE, S.; CHATTERJEE, G.; BANERJEE, M. Elimination and molecular identification of endophytic bacterial contaminants during *in vitro* propagation of *Bambusa balcooa*. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v. 33, n. 31, 2017. DOI: 10.1007/s11274-016-2196-z.

RIBEIRO, A. S.; BRONDANI, G. E.; TORMEM, G. C. R.; FIGUEIREDO, A. J. R. Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação. **Nativa**, Sinop, v. 4, n. 1, p. 15-18, 2016.

SAELIM, S.; ZWIAZEK, J.J. Preservation of thermal stability of cell membranes and gas exchange in high temperature-acclimated *Xylia xylocarpa* seedlings. **Journal Plant Physiology**, v. 156, p. 380-385, 2000.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 2017.

SAXENA, S. *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 431-434, 1990.

SAXENA, S.; BHOJWANI, S. S. *In vitro* clonal multiplication of 4-year old plants of the bamboo, *Dendrocalamus longispathus* Kurz. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 29, p. 135-142, 1993.

SCHEIDT, G. N.; ARAKAKI, A. H.; CHIMILOVSKI, J. S.; PORTELLA, A. C. F.; SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; BIASI, L. A.; SOCCOL, C. R. Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merril. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 37-43, 2009.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; VALLEDOR, L.; DRIRA, N.; JORRIN-NOVO, J. V. Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. **Proteomics**, v. 9, p. 2543-2554, 2009.

SHIRASUNA, R. T. Guadua. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB106301>>. Acesso em: 30 de setembro de 2016.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G.; Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

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**. v. 21, p. 220-228, 2011.

SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Seasonal influences on *in vitro* bud break in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale shoot multiplication and plantlet regeneration. **Indian Journal Plant Physiology**, v. 17, p. 9-21, 2012b.

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**, v. 21, n. 2, p. 220-228, 2012b.

SINGH, S. R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo – a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 2013.

SOOD A.; AHUJA, P. S.; SHARMA, M.; SHARMA, O. P.; GODBOLE, S. *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 71, p. 55-63, 2002.

SODERSTROM, T. R.; ELLIS, R. P. The position of bamboo genera and allies in a system of grasses classification. In: SODERSTROM, T. R.; HILU, K. H.; CAMPBELL, C. S.; BARKWORTH, M. E. (eds). **Grass systematics and evolution**. Washington DC, USA. Smithsonian Institution Press, p. 225-238, 1998.

SOMASHEKAR, P. V.; RATHORE, T. S.; FATIMA, T. *In vitro* plant regeneration of *dendrocalamus stocksii* (Munro) M. Kumar, Remesh & Unnikrisnan, through somatic embryogenesis. **American Journal of Plant Sciences**. v. 9, p. 2429-2445, 2018. DOI: 10.4236/ajps.2018.912176.

SPENCER, D.F.; KSANDER, G.G. Influence of dilute acetic acid treatments on survival of monoecious Hydrilla tuber in the Oregon House Canal, California. **Journal Aqu. Plant Manag**, v. 37, p. 67-71, 1999.

SREENIVASULU, N.; GRIMM, B.; WOBUS, U.; WESHKE, W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). **Physiology Plant**, v. 109, p. 435-442, 2000.

SRIRAM, S.; RAGUCHANDER, T.; BABU, S.; NANDAKUMAR, R.; SHANMUGAM, V.; VIDHYASEKARAN, P. Inactivation of phytotoxin produced by the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* Can. **Journal Microbiology**, v. 46, p. 520-524, 2000.

STREIT, N. M.; CANTERE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. As clorofias. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 693. (Trad. SANTARÉM E. R. et al.).

TAMURA, A. Evaluation of freezing tolerance of whole plants in komatsuna (*Brassica campestris* L.) and spinach (*Spinacia oleraceae* L.). **Journal Japanese Soc. Horticulture Science**, v. 69, p. 332-338, 2000.

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

TEIXEIRA, D. E.; BASTOS, R. P.; ALMEIDA, S. A. O. Characterization of glued laminated panels produced with strips of bamboo (*Guadua magna*) native from the Brazilian Cerrado. **CERNE**, v. 21, n. 4, p. 595-600, 2015.

TRONCO, K. M. Q., BISOGNIN, D. A., FLEIG, F. D., HORBACH, M. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de microestacas de *Ilex paraguariensis* A. StHil. **Cerne**, v. 21, n. 3, p. 371-378, 2015.

VALE, P. A. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. B.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Height and number of shoots on the survival and development of micropropagated bamboo plantlets during pre-acclimatization. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.

VAINOLA, A.; REPO, T.; Impedance spectroscopy in frosthardiness evaluation of Rhododendron leaves. **Annals Botany**, v. 86, p. 799-805, 2000.

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.

- 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**, v. 100, n. 1, p. 49-58, 2010.
- YASHODA, R.; KAMALA, S.; KUMAR, A. S. P.; KUMAR, P. D.; KALAIARASI, K. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 109-113, 2008.
- YE, Z. H. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. **Annual Review Plant Biology**, v. 53, p. 183-202, 2002.
- YEH, M.; CHANG, W. Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescence callus of *Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana*. **Plant Cell Reports**. v. 5, p. 409-411, 1986.
- WAIKHOM, S. D.; LOUIS, B. An effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melacanna baccifera*) through nodal culture. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-8, 2014.
- 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**, v. 9, n. 45, p. 7710-7717, 2010.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183, 1994.