

MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO E MICORRIZAÇÃO DE
Dendrocalamus asper (Poaceae: Bambusoideae)

FERNANDA DUARTE ARAÚJO HIMMEN

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO E MICORRIZAÇÃO DE
Dendrocalamus asper (Poaceae: Bambusoideae)**

FERNANDA DUARTE ARAÚJO HIMMEN

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira
COORIENTADOR: Dr. Francisco Adriano de Souza

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais, área de concentração: Conservação da natureza.

**BRASÍLIA - DF
JULHO DE 2020**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO E MICORRIZAÇÃO DE
Dendrocalamus asper (Poaceae: Bambusoideae)**

FERNANDA DUARTE ARAÚJO HIMMEN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL, DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

Brasília, Julho de 2020

Ofereço

Aos meus pais, Luzimar e João Pedro,

Aos meus sogros, Aldemira e Guilherme Jr,

As minhas irmãs, Jamara e Bruna,

E ao meu marido Guilherme.

Dedico

*Ao meu Avô materno, Emi Duarte, a pessoa mais incrível que eu conheço e
tenho a honra de ser neta.*

“Que a vida seja leve,
Que seja pura,
E se for dura,
Que seja breve,
Que o tempo cura.
Que a felicidade more em você,
E que ela nunca se mude, e se sair por algum instante,
Que volte no mesmo dia...
Que a gratidão faça parte dos seus dias e permaneça por toda vida.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao senhor, pela vida, e pela família incrível que me deu, minha mãezinha Luzimar Duarte, meu pai João Pedro, e minhas irmãs Jamara e Bruna.

Aos meus sogros, Aldemira e Guilherme, que considero como meus pais, sempre me ampararam e me incentivaram.

Aos meus professores, profissionais que sempre admirei e respeitei.

Ao grupo do Laboratório de Cultura de Tecidos II - LCT 2, Marcos, Elias, Giuliano, Didi, Jessica, André, Fernanda, Renan, Caio, Inaê, Paulinha e Lorrane por terem me acolhido, e pelas risadas, brincadeiras, e pela ajuda nos momentos difíceis.

Ao meu Orientador, Jonny Everson Scherwinski-Pereira, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa.

Ao meu Coorientador Francisco Adriano, por me ensinar desde o início, e por ter me recebido em seu laboratório de pesquisa em Sete Lagoas-MG.

À Capes pela concessão da bolsa de pesquisa de mestrado.

À Universidade de Brasília, e à Embrapa por oferecer todo suporte para desenvolver meu trabalho.

À Mariana, minha psicóloga, por ter me ajudado a superar muitos obstáculos.

À minha Psiquiatra Fabiane por ser sempre tão tranquila e uma ótima profissional.

À Lisa, minha cadela sapeca, que desde que chegou em minha vida, enche meu coração de amor.

Ao meu marido Guilherme, o amor e o homem da minha vida!

Agradeço a todos que colaboraram para que esse trabalho fosse concluído.

INDICE DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1.** Representação esquemática do bambu e suas partes vegetativas, com rizoma do tipo paquimorfo. 23
- Figura 2.** Representação esquemática da folha de bambu em corte transversal. 24
- Figura 3.** Representação esquemática da folha de bambu em corte paradérmico e aproximação do estômato 25
- Figura 4.** Distribuição geográfica de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) no território brasileiro. Fonte: Flora do Brasil 2020, acesso em outubro de 2019 26
- Figura 5.** Métodos de propagação do bambu via sexuada e assexuada (adaptado de (AHLAWAT; HARIDASAN; HEGDE, 2002). 27
- Figura 6.** Raiz com estruturas do fungo micorrízico arbuscular. 32

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO DURANTE A MULTIPLICAÇÃO E MICORRIZAÇÃO IN VITRO DE *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*)

- Figura 1.** Placa de ELISA pronta para leitura (método colorimétrico). Poços delimitados pelo pontilhado se referem as amostras de DNA de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) 60
- Figura 2.** Etapas do experimento de micropropagação de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*). **A.** Plantas no ambiente *in vitro*, mantidas em sala de crescimento; **B e C.** Plantas micropropagadas em câmara de crescimento (B.O.D.) à 25±1 °C durante a etapa de pré-aclimatização; **D.** Plantas micropropagadas prontas para a transferência para a casa de vegetação 61
- Figura 3.** Raiz de cenoura transformada micorrizada com *Rhizoglyphus clarum*. **A:** Placa de petri com raízes de cenoura micorrizadas após 3 meses de incubação; **B e D:** Esporos do fungo *R. clarum*; **C:** Hifas extrarradiculares. **Es:** esporos; **Hf:** hifas; **Rz:** raiz. Escalas: **B:** 200 µm; **C e D:** 500 µm. 63
- Figura 4.** Plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* em diferentes concentrações de citocininas apresentando meio oxidado e não oxidado. **A e B:** meio de cultivo oxidado apresentando coloração escura e elevado nível de brotações; **C:** Meio de cultivo sem oxidação, recentemente renovado. 69

Figura 5. Metilação de DNA (% 5-mC – 5 metilcitosina) durante a micropropagação de *Dendrocalamus asper*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barras representam o desvio padrão. 71

Figura 6. Aspecto de raízes de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) durante a micorrização *in vitro*. **A.** Processo de formação do apressório para penetração na raiz. **B.** Raiz não submetida ao processo de diafanização e coloração, mostrando a presença de pelos radiculares. **C-E.** Raiz colonizada com *Rhizoglyphus clarum*, mostrando as estruturas de colonização do fungo. **D.** Raiz sem inoculação de fungo (controle). **F.** Emaranhado de hifas em volta da raiz. Ap: Apressório; Es: esporos; Hf: hifa; Vs: vesícula. Barras: A, C, D, E: 200 µm; B: 500 µm. 74

Figura 7. Aspecto de raízes de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) durante a micorrização *in vitro*. **A.** Amostra de raiz de planta proveniente do meio de MS com metade dos sais e 25% de sacarose, apresentando hifas e esporos intrarradiculares; **B.** Amostra de raiz com hifas enroladas; **C.** Raiz apresentando hifas e esporos no exterior; **D.** Raiz de plantas proveniente do meio de MS com metade dos sais e 0,4% de fósforo, apresentando aglomerado de hifas e esporos intrarradiculares. **Es:** esporos; **Hf:** hifas. Escala: A-D: 500µm. 76

CAPITULO II
EFEITO DE SUBSTRATOS, CAPACIDADE DE MICORRIZAÇÃO E
PLASTICIDADE ANATÔMICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE
***Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) DURANTE A**
ACLIMATIZAÇÃO

Figura 1. Plantas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) micropropagadas usadas no experimento. **A.** Plantas em fase de aclimatização, provenientes de casa de vegetação; **B.** Muda evidenciando comprimento da parte aérea e sistema radicular; **C.** Sistema radicular de *D. asper* separado da parte aérea para realização da pesagem; **D.** Pesagem da parte aérea de *D. asper*. 100

Figura 2. Raízes de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) coradas com azul de tripan para identificação de micorrização. **A e B:** Raízes sem indícios de colonização; **C:** Raízes com esporos em seu interior; **D:** Vesículas; **E e F:** Estruturas características da simbiose micorrízica, apresentando hifas intrarradiculares e esporos. 106

Figura 3. Folhas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*). **A.** Folhas proveniente do ambiente *in vitro*. **B.** Folhas provenientes da câmara de crescimento (B.O.D.). **C.** Folhas provenientes da casa de vegetação. Escalas: A-C = 1 cm. 107

Figura 4. Área foliar de *Dendrocalamus asper*, em três ambientes distintos: (1) *in vitro*, (2) câmara de crescimento (B.O.D.), (3) casa de vegetação. 108

Figura 5. Estômato de *Dendrocalamus asper*. **A e B:** Corante safranina 0,1%; Corte paradérmico. **A:** Epiderme face adaxial, evidenciando os estômatos; **B:** Epiderme, face adaxial evidenciando tricomas. Escalas: **A:** 50µm; **B:** 500µm. 111

Figura 6. Folha de *Dendrocalamus asper*. cultivada *in vitro* **A-D:** corante azul de Toluidina, corte transversal; **A:** Visão geral da folha, com quilha; **B:** Visão geral da nervura central da folha; **C** Folha evidenciando os feixes vasculares de primeira e segunda ordens; **D:** corte evidenciando epiderme adaxial e abaxial. **Epad:** epiderme adaxial; **Epab:** epiderme abaxial **F:** floema; **X:** xilema; **CF:** célula fusóide; **Pc:** periciclo; **FV1:** feixe vascular de primeira ordem; **FV2:** feixe vascular e segunda ordem; **En:** endoderme; **CB:** célula buliforme; **ESC:** esclerênquima; **NC:** Nervura central. Escalas: **A-C:** 200µm; **D:** 50µm. A sequência segue a ordem das figuras. 112

Figura 7. Folha de *Dendrocalamus asper*. cultivada *ex vitro* (casa de vegetação). **A-C:** corante azul de Toluidina, corte transversal; **A:** Visão da nervura central da folha; **B:** Visão geral da nervura central da folha; **C** Folha evidenciando os feixes vasculares de primeira e segunda ordens; **D:** corte evidenciando epiderme adaxial e abaxial. **Epad:** epiderme adaxial; **Epab:** epiderme abaxial **F:** floema; **X:** xilema; **CF:** célula fusóide; **Pc:** periciclo; **FV1:** feixe vascular de primeira ordem; **FV2:** feixe vascular e segunda ordem; **En:** endoderme; **CB:** célula buliforme; **ESC:** esclerênquima; **NC:** Nervura central. Escalas: **A e C:** 200µm; **B:** 50µm. 113

Figura 8. Raíz de *Dendrocalamus asper*. **A.1-B.3:** corante azul de Toluidina, corte transversal de raíz; **A.1, A.2, A.3:** raízes provenientes da casa de vegetação; **B.1, B.2 e B.3:** raízes provenientes do ambiente *in vitro*; **A.1:** visão geral da raíz em casa de vegetação; **B.1:** visão geral da raíz *in vitro* com detalhe para uma raíz lateral; **A.2** Detalhe do cilindro vascular, evidenciando xilema e floema); **B.2:** cilindro vascular, evidenciando endoderme e periciclo; **A.3:** corte evidenciando epiderme e exoderme com células organizadas; **B.3:** corte de raíz *in vitro* evidenciando as células com tamanhos e formatos diferentes, heterogêneas. **Ep:** epiderme; **En:** endoderme; **F:** floema; **P:** periciclo; **CV:** cilindro vascular; **Pc:** parênquima cortical; **Rl:** raiz lateral; **X:** xilema. Escalas: **A.1 a B.3:** 200µ. 114

INDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO DURANTE A MULTIPLICAÇÃO E MICORRIZAÇÃO IN VITRO DE *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae)

- Tabela 1.** Número de brotos, gemas, hastes e altura de plantas de *Dendrocalamus asper* multiplicadas *in vitro* em meio de MS suplementado com variadas concentrações de diferentes citocininas (metatopolina, cinetina e 6-benzilaminopurina) durante três subcultivos. 67
- Tabela 2.** Parâmetros de crescimento de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae) submetidas a tratamentos de micorrização. 79
- Tabela 3.** Teores de Clorofilas *a*, *b* e carotenoides em mL/cm³ nas fases *in vitro*, pré-aclimatização (B.O.D.) e aclimatização de mudas de *Dendrocalamus asper* submetidas à redução do fósforo (P) em meios de MS e MSR. 82

CAPITULO II

EFEITO DE SUBSTRATOS, CAPACIDADE DE MICORRIZAÇÃO E PLASTICIDADE ANATÔMICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

- Tabela 1.** Características dos substratos utilizados para o transplante de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae). 98
- Tabela 2.** Sobrevivência de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae) após a transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. 103
- Tabela 3.** Massa fresca (MF) e seca (MS) de mudas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae), com três meses de idade, submetidas a diferentes substratos, com ou sem inoculação micorrízica. 104
- Tabela 4.** Medidas das estruturas anatômicas de raízes e folhas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae) em diferentes ambientes. 109

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| BAP | 6-benzilaminopurina |
| CK | Citocininas |
| FMA | Fungos micorrízicos arbusculares |
| g | Gramas |
| NaOCl | Hipoclorito de sódio |
| mT | metatopolina |
| MA | Micorrizas arbusculares |
| % | Por cento |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ANOVA | Análise de variância |
| cm | Centímetro |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| Kn | Cinetina |
| g.L ⁻¹ | Gramas por Litro |
| °C | Grau Celsius |
| L | Litro |
| MSR | Medium Strullu-Romand(1986, 1987) |
| MS | Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962) |
| µm | Micrômetro |
| µM | Micromolar |
| mg | Miligramas |
| mL | Mililitro |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| v/v | volume/volume |

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO E MICORRIZAÇÃO DE <i>Dendrocalamus asper</i> (Poaceae: Bambusoideae)..... | Erro! |
| Indicador não definido. | |
| INTRODUÇÃO GERAL | 18 |
| REFERENCIAS | 20 |
| 1.1.1 Família Poaceae..... | 22 |
| 1.1.2 Subfamília Bambusoideae..... | 22 |
| 1.1.3 Morfologia dos bambus..... | 23 |
| 1.1.4 Caracterização anatômica dos bambus..... | 24 |
| 1.1.5 Gênero <i>Dendrocalamus</i> Nees..... | 25 |
| 1.1.6 <i>Dendrocalamus asper</i> (Schult.) Backer ex Hayne | 25 |
| 1.2.1 Métodos de Propagação do bambu..... | 26 |
| 1.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> | 27 |
| 1.2.3 Problemas associados ao cultivo <i>in vitro</i> de bambu..... | 28 |
| 1.2.4 Multiplicação <i>in vitro</i> a partir do uso de Citocininas | 29 |
| 1.2.4.1 Hormônios e Reguladores de Crescimento | 29 |
| 1.2.4.2 Citocininas e Auxinas..... | 29 |
| 1.2.4.3 Citocininas em Bambu | 30 |
| 1.2.4.4 Metilação do DNA | 30 |
| 1.3.1 Fungos Micorrízicos arbusculares(FMA) | 31 |
| 1.3.2 O Fósforo(P) e sua relação com as micorrizas | 33 |
| 1.3.3 Produção de inóculos micorrizicos | 33 |
| 1.3.3.1 Método de produção de inóculos com substratos..... | 34 |
| 1.3.3.2 Método de produção de inóculos sem substratos | 34 |
| 1.3.3.4 Método de produção de inóculos <i>in vitro</i> | 35 |
| 1.3.4 Micorrizas em Plantas Micropropagadas | 35 |

| | |
|---|----|
| 1.3.4.1 Micorrizas em Plantas Micropropagadas de Bambu..... | 36 |
| 1.3.4.2 Micorrização <i>in vitro</i> de Plantas Micropropagadas..... | 38 |
| 1.3.5 Substratos e Micorrizas | 39 |
| 1.3.5.1 Substratos e Micorrizas em Bambu..... | 39 |
| 1.3.6 Aclimatização..... | 40 |
| 2 REFERENCIAS | 42 |
| MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO DURANTE A MULTIPLICAÇÃO E MICORRIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Dendrocalamus asper</i> (<i>Poaceae</i> : <i>Bambusoideae</i>)..... | 53 |
| 1. INTRODUÇÃO | 54 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 57 |
| 2.1 MICROPROPAGAÇÃO..... | 57 |
| 2.1.1 Obtenção do material vegetal..... | 57 |
| 2.1.2 Efeito de diferentes citocinina e concentrações na multiplicação de <i>Dendrocalamus asper</i> | 58 |
| 2.1.3 Dinâmica da metilação de DNA durante ciclos de multiplicação de <i>Dendrocalamus asper</i> | 58 |
| 2.1.3.1 Extração do DNA genômico | 59 |
| 2.1.3.2 Análise da metilação do DNA..... | 60 |
| 2.1.4 Aclimatização das mudas | 60 |
| 2.2 MICORRIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> | 62 |
| 2.2.1 Obtenção do inóculo micorrízico | 62 |
| 2.2.2 Efeito da redução do fósforo do meio de cultivo sobre a micorrização | 62 |
| 2.2.2.1 Determinação dos teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides | 64 |
| 2.2.2.2 Coloração das raízes..... | 64 |
| 2.2.3 Ajuste do protocolo de micorrização <i>in vitro</i> | 64 |
| 2.2.4 Pré-aclimatização e aclimatização das plantas..... | 65 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 66 |

| | |
|---|-----|
| 3.1 Efeito de diferentes citocininas e concentrações na multiplicação de <i>Dendrocalamus asper</i> | 66 |
| 3.1.2 Dinâmica da metilação de DNA durante ciclos de multiplicação de <i>Dendrocalamus asper</i> | 70 |
| 3.2 MICORRIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> | 73 |
| 3.2.1 Efeito da redução do fósforo do meio de cultivo sobre a micorrização e desenvolvimento das plantas | 73 |
| 3.2.2 Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenóides | 80 |
| 4 CONCLUSÕES | 83 |
| 5 REFERENCIAS | 86 |
| EFEITO DE SUBSTRATOS, CAPACIDADE DE MICORRIZAÇÃO E PLASTICIDADE ANATÔMICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE <i>Dendrocalamus asper</i> (Schult. & Schult.f.) Baker ex. K. Heyne DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO | 94 |
| 1.INTRODUÇÃO | 95 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 97 |
| 2.1. Material vegetal | 97 |
| 2.1.2 Multiplicação do material | 97 |
| 2.1.3 Efeito dos substratos na aclimatização e na micorrização | 98 |
| 2.1.4 Inóculo micorrízico | 98 |
| 2.1.5 Variáveis analisadas | 99 |
| 2.1.6 Identificação da simbiose micorrízica | 101 |
| 2.1.7 Análises estatísticas | 101 |
| 2.2 Comportamento morfológico e anatômico durante a aclimatização | 101 |
| 2.2.1 Área foliar | 101 |
| 2.2.2 Anatomia foliar e radicular | 102 |
| 2.2.3 Análises estatísticas | 102 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 103 |
| 3.1.1 Substratos e micorrização | 103 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.2 Colonização radicular..... | 105 |
| 3.2 Comportamento morfológico e anatômico durante a aclimatização de plantas de <i>Dendrocalamus asper</i> (Schult. & Schult.f.) Baker ex. K. Heyne | 107 |
| 3.2.1 Área foliar | 107 |
| 3.2.2 Anatomia foliar e radicular | 108 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 115 |
| 5 REFERENCIAS | 116 |

MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO E MICORRIZAÇÃO DE *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae)

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação, analisar a dinâmica de metilação do DNA durante a multiplicação das plantas, bem como a capacidade de micorrização *in vitro* e *ex vitro* das plantas, verificando o efeito de substratos e a adaptação anatômicas durante a aclimatização de mudas micropropagadas de *Dendrocalamus asper*. No primeiro capítulo foi realizada a micropropagação, onde testou-se as citocininas (CK) 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (Kn) e meta-Topolina (mT) em diferentes concentrações. Em cada um dos três subcultivos, realizou-se o acompanhamento da metilação do DNA do material em cultivo. Após a etapa de multiplicação *in vitro*, as plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação e, para a micorrização *in vitro*, inicialmente a concentração de fósforo (KH₂PO₄) do meio de MS (Murashige & Skoog) foi reduzida à 0%, 25%, 50%, 75% e 100% da sua concentração original. Além disso, também se comparou a micorrização utilizando-se o meio MSR (Medium Strullu-Romand) em sua concentração original de fósforo do referido meio. Neste experimento foram considerados dois tratamentos controle sem inoculação: (1) o meio de MS original, suplementado com 1,5 mg/L de Metatopolina e; (2) o meio MSR original. Num segundo experimento, com o intuito de aumentar a taxa de colonização das raízes, o experimento da micorrização *in vitro* foi realizado nas mesmas condições do anterior. No entanto, foi modificados os tratamentos de micorrização, sendo testado o (1) meio MSR completo, (2) o MSR com metade dos sais, (3) o MSR com metade dos sais, adicionados de 1,5 mg/L de carvão ativado, (4) o MS com metade dos sais e com apenas 0,4 % da concentração original de fósforo, (5) o MS com metade dos sais e 25% da quantidade total de sacarose, além do MS com metade dos sais adicionados de 1,5 mg/L de carvão ativado (6). Em ambos experimentos se utilizou o fungo micorrízico *Rhizoglyphus clarum* como fonte de inóculo, o qual foi produzido em cultivo asséptico em sistema monoxênico em raízes Ri T-DNA de cenoura. Já num segundo capítulo, avaliou-se a micorrização *ex vitro* de mudas micropropagadas, a partir do uso de três substratos: 1) Bioplant® + areia (1:1 v/v); 2) Carolina Soil® + areia (1:1 v/v), e; 3) terra de subsolo. Aos substratos foram ainda combinados ou não o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Rhizoglyphus clarum*, totalizando seis tratamentos. Antes do transplante das mudas para o ambiente *ex vitro*, elas foram mantidas em sala de cultura, em meio de MS suplementado com 1,5 mg/L de Metatopolina. Para verificar as adaptações anatômicas das mudas nos diferentes ambientes, amostras de folhas e raízes foram coletadas de plantas dos ambientes *in vitro* e *ex*

vitro. Adicionalmente, mensurou-se a área foliar das plantas antes e durante a aclimatização. No capítulo de micropropagação, verificou-se que a citocinina mais eficiente para a multiplicação de *D. asper* foi a mT na concentração 13,3 μM , que proporcionou as maiores médias nos parâmetros avaliados (número de brotos, hastes, gemas, altura e taxa de multiplicação). De forma geral foi observado redução do número de brotos no terceiro subcultivo. A análise da metilação de DNA mostrou que o pico de metilação de DNA ocorreu no primeiro subcultivo, seguido de decréscimo gradual no segundo e terceiro ciclos de multiplicação, coincidindo com os resultados da metilação avaliados. No experimento de micorrização *in vitro*, constatou-se taxas de colonização de 16% das plantas em meio MSR. Nos demais tratamentos, não houve colonização. Apesar disso, não foram observados danos no desenvolvimento das plantas devido a redução do fósforo no meio de cultivo. Já no experimento de otimização, verificou-se taxas de colonização de até 25% das plantas nos tratamentos onde se utilizou o meio de MS com metade dos sais e com apenas 0,4 % da concentração original de fósforo, e naquele com MS na metade dos sais e 25% da quantidade total de sacarose. Os resultados indicam que a micorrização *in vitro* da espécie é possível, embora ajustes ainda devam ser realizados para garantir colonização mais ampla nas taxas de micorrização das mudas. Já nos experimentos do capítulo 2, a micorrização *ex vitro* e a colonização do fungo foi observada em 10% das plantas no substrato Bioplant®+Areia. Nos demais substratos não foram verificados indícios de colonização. Apesar disso, o substrato Carolina Soil®+Areia foi o que proporcionou a maior sobrevivência das mudas, com taxa de 100%, além de promover as maiores médias de altura das plantas em casa de vegetação. Com relação às análises anatômicas, verificou-se especialmente o incremento da espessura e área foliar e radicular das plantas em ambiente *ex vitro* em relação ao *in vitro*, indicando plasticidade adaptativa das plantas às novas condições ambientais.

Palavras-chave: Poaceae, Bambusoideae, propagação *in vitro*, metilação do DNA, fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), aclimatização.

INTRODUÇÃO GERAL

O bambu é grupo de plantas fascinantes e versátil conhecido pela humanidade. Ele faz parte da subfamília Bambusoideae e da família Poaceae. O gênero *Dendrocalamus* é um dos mais representativos da família, devido a seus inúmeros usos comerciais (MONTIEL; SÁNCHEZ, 2006; SINGH *et al.*, 2012).

A propagação vegetativa dos bambus é feita por divisão de touceiras, parte de rizomas, secções do colmo, e a sexualmente por semente (MEDINA; CIARAMELLO; CASTRO, 1962; STAPLETON, 1985; THAPA *et al.*, 2008). Entretanto, os métodos convencionais de propagação apresentam restrições, devido ou a inconsistente produção de sementes pelas espécies, ou devido à baixa eficiência dos processos vegetativos (ARYA; SATSANGI; ARYA, 2002).

Nesse contexto, a micropropagação apresenta muitas vantagens sobre a propagação vegetativa convencional. Com ela é possível a produção de material homogêneo, em grande quantidade e em pequeno espaço físico, podendo ser realizada em qualquer época do ano (KOZAI, 1991; BANERJEE; GANTAIT; PRAMANIK, 2011). De maneira geral, a técnica é constituída por cinco etapas distintas e dependentes, sendo elas: (1) seleção de plantas matrizes; (2) estabelecimento *in vitro* de propágulos; (3) multiplicação/proliferação de brotos; (4) enraizamento e; (5) aclimatização (NOGUEIRA, 2018a).

Após o estabelecimento *in vitro*, a fim de acelerar o processo de multiplicação, são adicionadas ao meio de cultivo citocininas, reguladores do crescimento vegetal responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento dos propágulos (BRAULT; MALDINEY, 1999; AREMU *et al.*, 2012). Em bambus são relatados o uso de diversos tipos de citocininas em diferentes concentrações. Nogueira (2018) utilizou BAP, Kn e metatopolina (mT) nas concentrações entre 6,66 e 26,64 μM . Arya *et al.* (1999) multiplicaram *Dendrocalamus asper* em meio de MS suplementado com BAP em concentrações entre 4,44 e 44,44 μM , enquanto Banerjee, Gantait, e Pramanik (2011) usaram 5 mg/L de BAP.

No entanto, os efeitos das citocininas podem variar nas respostas, de acordo com as condições de cultura, o tipo de explante e o genótipo, sendo necessário testes para definir a citocinina e a concentração mais efetiva para cada situação e objetivo do trabalho (GASPAR *et al.*, 1996). Não se pode esquecer-se que, com a multiplicação das plantas micropropagadas, podem ocorrer modificações no grau de metilação de DNA, um evento epigenético que regula de forma dinâmica a expressão gênica e a estabilidade do genoma e se altera durante a proliferação e diferenciação celular (KARIM *et al.*, 2018; SOLÍS; CANO; RISUEÑO, 2015; ZHU *et al.*, 2020), podendo ser a causa das variações observadas nos cultivos. Estudos nesse

sentido, podem favorecer o entendimento da variação nas taxas de multiplicação ao longo dos subcultivos.

Na micropropagação, após a multiplicação e enraizamento, as plantas são aclimatizadas, ou seja, transferidas do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*. Essa etapa é uma das mais importantes do processo, pois deve ser realizada de forma progressiva, uma vez que plantas cultivadas *in vitro* são mantidas sob altos níveis de sacarose e umidade, em condições controladas e constantes, resultando em estruturas anatômicas frágeis, com plantas apresentando baixas taxas de fotossíntese e raízes não plenamente funcionais (ASAYESH; VAHDATI; ALINIAEIFARD, 2017).

Portanto, na transferência de ambiente devem ser definidas estratégias para potencializar a sobrevivência e o crescimento das plantas micropropagadas. O uso do substrato adequado, bem como a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode facilitar a aclimatização de mudas micropropagadas (SALAMANCA; HERRERA; BAREA, 1992; DA SILVA; PEIXOTO; JUNQUEIRA, 2001). De acordo com Locatelli e Lovato (2002), a micropropagação, concomitante à micorrização, pode produzir mudas de alta qualidade, mais adaptadas e tolerantes ao estresse, em curtos períodos. No entanto, é condição fundamental se conhecer a interação entre fungos e plantas, substratos e técnicas de aclimatização e inoculação (FOLLI-PEREIRA *et al.*, 2012). De maneira geral, existem duas técnicas de micorrização. A micorrização *in vitro* refere-se à inoculação de FMAs nas raízes de plantas micropropagadas que crescem em meio de cultura. Já a *ex vitro* ou micorrização *in vivo* é aquela realizada por meio da adição de inóculos ao substrato (Pons *et al.* 1983; KAPOOR; SHARMA; BHATNAGAR, 2008).

De acordo com o exposto, este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação, analisar a dinâmica de metilação do DNA, bem como avaliar a capacidade de micorrização das plantas *in vitro* e *ex vitro*, verificando o efeito de substratos e as adaptações anatômicas das plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* durante a aclimatização.

REFERENCIAS

- AREMU, Adeyemi O. *et al.* Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Scottsville, v. 108, n. 1, p. 1–16, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>
- ARYA, Inder Dev; SATSANGI, Richa; ARYA, Sarita. Rapid Micropropagation of Edible Bamboo *Dendrocalamus asper* Rapid Micropropagation of Edible Bamboo *Dendrocalamus asper*. **Journal of Sustainable Forestry**, Dehradun, v. 14, n. January 2002, p. 103–114, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1300/J091v14n02>
- ARYA, S. *et al.* Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, Dehra Dun-India, v. 18, p. 879–882, 1999.
- ASAYESH, Zeinab Maleki; VAHDATI, Kourosh; ALINIAEIFARD, Sasan. Investigation of physiological components involved in low water conservation capacity of in vitro walnut plants. **Scientia Horticulturae**, Tehran, v. 224, n. October, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.023>
- BANERJEE, Maitreyi; GANTAIT, Saikat; PRAMANIK, Binay Ray. A two step method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Kolkata, v. 17, n. 4, p. 387–393, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0088-0>
- BRAULT, Mathias; MALDINEY, Régis. Mechanisms of cytokinin action. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 37, n. 5, p. 403–412, 1999.
- DA SILVA, Rogerio Pereira; PEIXOTO, José Ricardo; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela. INFLUÊNCIA DE DIVERSOS SUBSTRATOS NO DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa DEG*) 1 THE SUBSTRATE INFLUENCE ON THE DEVELOPMENT OF SEEDLINGS OF YELLOW PASSION. [S. l.], p. 377–381, 2001.
- FOLLI-PEREIRA, Muriel Silva *et al.* MICORRIZA ARBUSCULAR E A TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO ESTRÉSSE. [S. l.], n. 1, p. 1663–1679, 2012.
- GASPAR, Thomas *et al.* Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, United States, v. 32, n. 4, p. 272–289, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- KAPOOR, Rupam; SHARMA, Deepika; BHATNAGAR, A. K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. **Science Horticulturae**, Netherlands, v. 116, p. 227–239, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.02.002>
- KARIM, Rezaul *et al.* Expression and DNA methylation of SERK , BBM , LEC2 and WUS genes in in vitro cultures of *Boesenbergia rotunda* (L .) Mansf . **Physiol Mol Biol Plants**, India, 2018.
- KOZAI, Toyoki. Invited Review PHOTOAUTOTROPHIC MICROPROPAGATION TOYOKI. [S. l.], n. April, p. 47–51, 1991.
- LOCATELLI, Lucir Maria; LOVATO, Paulo Emílio. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. [S. l.], n. 1, p. 177–184, 2002.

MEDINA, Julio Cesar; CIARAMELLO, Dirceu; CASTRO, Guilherme Augustode Paivá. Propagação vegetativa do bambu imperial (*Bambusa vulgaris* Schrad. var. *vittata* A. et C. Riv.). **Bragantia Boletim tecnico do Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo**, [S. l.], v. 21, p. 13, 1962.

MONTIEL, Mayra; SÁNCHEZ, Ethel. (Poaceae : Bambusoideae) cultivados en Costa Rica IV : *Dendrocalamus asper* , clones Taiwán y Tailandia. **Revista Biologia Tropical**, San José, Costa Rica, v. 54, n. December, p. 65–75, 2006.

NOGUEIRA, Jênifer Silva. **ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO EX SITU DE *Dendrocalamus asper* E MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guadua* (BAMBUSOIDEAE, POACEAE)**. 2018a. - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2018.

NOGUEIRA, Jênifer Silva. **ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO EX SITU DE *Dendrocalamus asper* E MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guadua* (BAMBUSOIDEAE, POACEAE) Orientador**: 2018b. - Brasília, [s. l.], 2018.

PONS, F. *et al.* Studies of V A mycorrhizae in vitro : mycorrhizal synthesis of axenically propagated wild cherry (*Prunus avium* L .) plants. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 221, p. 217–221, 1983.

SALAMANCA, C. P.; HERRERA, M. A.; BAREA, J. M. Mycorrhizal inoculation of micropropagated woody legumes used in revegetation programmes for desertified Mediterranean ecosystems. **Agronomie**, Dijon,France, v. 12, n. 10, p. 869–872, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/agro:19921023>

SINGH, Sharbati R. *et al.* Micropropagation of *Dendrocalamus asper* { Schult . & Schult . [S. l.], v. 21, n. 2, p. 220–228, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0095-9>

SOLÍS, María-teresa; CANO, Vanesa; RISUEÑO, María C. 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation , but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. **Plant Science**, Madrid,Spain, v. 6, n. June, p. 1–17, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00472>

STAPLETON, C. M. A. Studies on Vegetative Propagation of *Bambusa* and *Dendrocalamus* Species by Culm Cuttings. In: A.N. RAO, G. DHANARAJAN, C. B. Sastry (org.). Kathmandu: [s. n.], 1985. *E-book*.

THAPA, Pooja *et al.* Biotechnology of Bamboos. In: [S. l.: s. n.]. p. 147–186. *E-book*.

ZHU, Tingting *et al.* Target of Rapamycin Regulates Genome Methylation Reprogramming to Control Plant Growth in Arabidopsis. **Frontiers in Genetics**, United States, v. 11, n. March, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00186>

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Família Poaceae

Das milhares de espécies vegetais existentes, apenas algumas foram domesticadas e cerca de 40% destas pertencem a quatro grandes famílias: *Poaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae* e *Solanaceae*.

A família *Poaceae* é a quarta maior família de plantas com flores do mundo (Angiospermas). Atualmente é composta por 12 subfamílias, apresentando classificação filogenética mundial de 12.074 espécies em 771 gêneros (BARKER et al., 2001; TERRELL; PETERSON, 2015; SORENG et al., 2015, 2017; ALBALÁ, 2018). De acordo com Terrell e Peterson (2015), o grupo apresenta especializações para habitat aberto, como a estrutura floral reduzida e polinização pelo vento, que permitiram a colonização em todo o planeta.

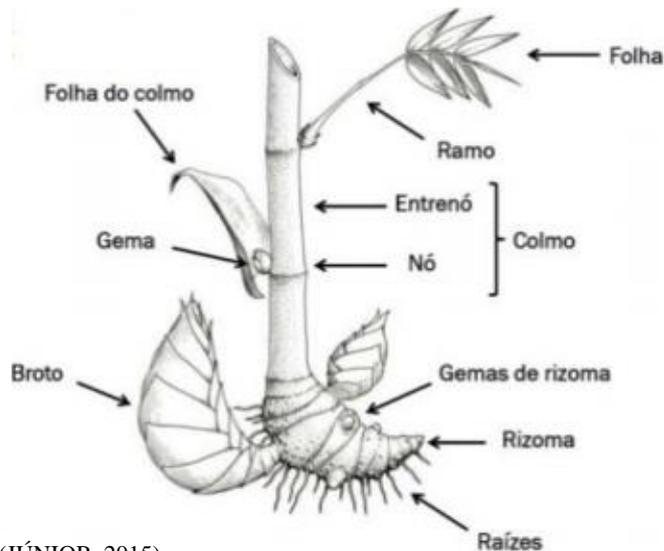
Aproximadamente um terço da terra seca do mundo é coberta por alguma espécie de *Poaceae*, e a maioria da população humana do mundo depende fortemente delas para seu sustento diário (MATHEWS; TSAI; KELLOGG, 2000). Em termos de produção mundial, a produção agrícola mais importante no mundo baseia-se em grãos da família *Poaceae*, (principalmente arroz, trigo, milho, centeio, sorgo, cevada, milho e triticale), ocupando extensas áreas de cultivos e sendo responsável por 66% da alimentação mundial, desde os tempos mais remotos (SCOLARI, 2005).

1.1.2 Subfamília *Bambusoideae*

A subfamília *Bambusoideae* é uma das 12 representantes da família *Poaceae*. Ela apresenta 120 gêneros em 3 tribos distribuídos em todos os continentes, exceto o europeu e antártico (SORENG *et al.*, 2015) e pode ser distinguida de outras subfamílias por caracteres morfológicos, anatômicos e ecológicos (GPWG, 2001; SORENG *et al.*, 2015).

A subfamília é representada por três clados, que correspondem às tribos Olyreae (bambus herbáceos), Bambuseae (bambus lignificados) e Arundinarieae (bambus lignificados de clima temperado), apresentando 122; 784 e 533 espécies, respectivamente (SUNGKAEW et al., 2009; BGP, 2012).

A tribo Bambuseae apresenta o maior número de gêneros e espécies descritas. A tribo caracteriza-se por apresentar rizoma paquimorfo (simpodial ou entouceirante), raramente leptomorfo (monopodial ou alastrante). Os colmos são lignificados e ocos e com menor frequência sólidos, e ramos com desenvolvimento acrópeto ou bidirecional (que se desenvolve da base para o ápice, sendo esta uma característica considerada uma aparente sinapomorfia morfológica) (BGP, 2012; RUSCH; HILLIG; CEOLIN, 2018) (Figura 1).



Fonte:(JÚNIOR, 2015)

Figura 1. Representação esquemática do bambu e suas partes vegetativas, com rizoma do tipo paquimorfo.

1.1.3 Morfologia dos bambus

O bambu pode ser dividido em raiz, caule, folhas e inflorescências (DRUMOND; WIEDMAN, 2017). A raiz do bambu é o rizoma e é considerado de grande importância tanto para armazenamento e distribuição de nutrientes para as diversas partes da planta, quanto para sobrevivência do bambu que assexuadamente, quando é feito por ramificação (MERCEDDES, 2006).

O colmo é a parte superior do bambu que contém a maior parte do material lenhoso, complementado por um sistema de ramificação, bainha, folhas de folhagem, floração. Diferentemente das árvores, os bambus não têm espessamento secundário (RUSCH; HILLIG; CEOLIN, 2018).

As folhas dos bambus são altamente variáveis em tamanho e forma. Na primeira etapa elas são ovais, lanceoladas e oblongas-lanceoladas, podendo serem lisas ou quase lisas na superior. Elas apresentam diferenças das gramíneas quanto a presença de um pseudopecíolo que une a bainha à lamina sendo esta uma característica do grupo (MERCEDDES, 2006).

O florescimento do bambu é uma característica particular, pois a maioria deles florescem periodicamente e, algumas vezes, morrem pouco depois. Há dois tipos de floração: gregária e esporádica (CHUCHÓN, 2019). A floração gregária ocorre em longos intervalos conhecidos como “ciclos de vida”, variando entre 3 e 120 anos. Ela ocorre quando todos os membros de uma determinada geração de origem comum entram no estágio reprodutivo quase

simultaneamente. Neste tipo, todos os colmos florescem e produzem sementes e, em seguida o colmo seca, a planta enfraquece e morre com o rizoma (PACHECO, 2017).

1.1.4 Caracterização anatômica dos bambus

Do ponto de vista anatômico, os bambus em geral são distinguidos por duas características particulares: as células fusóides e o desenvolvimento de células de clorênquima invaginadas. Além disso, apresentam padrão de feixes vasculares de ciclo C3, e nervura intermediária complexa (RENVOIZE, 1985). As células fusóides estão presentes nos dois lados de todos os feixes vasculares e são diferenciadas por paredes finas e aclorofiladas (VIEIRA *et al.*, 2002) (Figura 2).



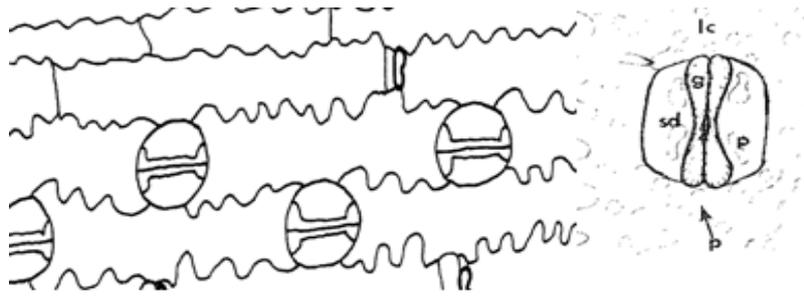
Adaptado de (Renvoize, 1985)

Figura 2. Representação esquemática da folha de bambu em corte transversal.

O mesofilo não é diferenciado em parênquima paliçádico e lacunoso. O clorênquima é tipicamente bambusóide, representado pelas células invaginantes que posicionam-se acima e abaixo das células fusóides (PELEGRIN; LONGHI-WAGNER; OLIVEIRA, 2009).

As células buliformes são células epidérmicas volumosas que ocorrem em fileiras longitudinais nas folhas das gramíneas. Elas são conhecidas também como células motoras, por apresentarem papel no enrolamento e desenrolamento das folhas (APPEZZATO DA GLORIA; CARMELLO CARNEIRO, 2006).

Os estômatos são as principais estruturas que controlam a entrada e saída de gases da folha. Normalmente, as folhas apresentam de 30 a 400 estômatos por mm^2 de superfície e a abertura deles é exercida por mudanças na forma de um par de células, as chamadas células-guardas, circundadas por células diferenciadas das células da epiderme da folha, as células subsidiárias. Nos bambus, as células-guarda são do tipo halteriforme, ou seja, estreitas na região mediana e largas nas extremidades (KERBAUY, 2004; LUIS *et al.*, 2017) (Figura 3).



Adaptado de (Renvoize, 1985) E Paisooksantivana & Pohl

Figura 3. Representação esquemática da folha de bambu em corte paradérmico e aproximação do estômato.

A raiz em crescimento primário é constituída pelos três sistemas de tecidos: revestimento, fundamental e vascular. Anatomicamente, as raízes dos bambus apresentam, em ordem, a epiderme, córtex, cilindro vascular e a medula (RAECHAL; CURTIS, 1990; CORTEZ; SILVA; CHAVES, 2016).

1.1.5 Gênero *Dendrocalamus* Nees

Entre os gêneros da tribo Bambuseae, *Dendrocalamus* é um dos mais relevantes, devido os numerosos usos, que envolvem principalmente a indústria farmacêutica, produção de móveis, indústria de papel e artesanatos (MONTIEL; SÁNCHEZ, 2006). Apesar do gênero não ser endêmico do Brasil, apresenta ocorrência confirmada em vários estados brasileiros (Filgueiras et al., 2015).

O gênero *Dendrocalamus* apresenta cerca de 27 espécies no subcontinente indiano e mais duas espécies no sudeste da Ásia e na península da Malásia. Ele está localizado em altitudes entre 0 e 1500 metros e se adapta a solos secos e úmidos, crescendo melhor em solos ricos, além de tolerar baixas temperaturas (MONTIEL; SÁNCHEZ, 2006).

1.1.6 *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae)

Dendrocalamus asper (Poaceae: Bambusoideae) é uma das espécie de bambu mais representativas do gênero. Ele apresenta porte gigante, atingindo até 20 m de altura, com 18 cm de diâmetro, além de paredes espessas e internódios de 20 a 50 cm. A espécie é nativa da China, e comumente plantada na Tailândia, Vietnã, Malásia (Peninsular e Leste), Indonésia e Filipinas. É relevante devido seu emprego para fins agrícolas e para a indústria de papel, e produz brotos de ótima qualidade que servem como alimento (AZZINI; CIARAMELLO, 1971; ARYA et al., 1999).

A espécie é plantada no Brasil e, devido ao seu porte alto, comumente é identificada de forma incorreta como *Dendrocalamus giganteus* (FELISBERTO *et al.*, 2017). Apresenta ocorrência confirmada no Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), e no Sul (Paraná e Santa Catarina) (Filgueiras *et al.*, 2015) (Figura 4). Conhecido como Bambu Doce, é um bambu tropical de múltiplos propósitos de valor econômico (BANERJEE; GANTAIT; PRAMANIK, 2011).



Figura 4. Distribuição geográfica de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) no território brasileiro. Fonte: Flora do Brasil 2020, acesso em outubro de 2019.

No Brasil, em 2011 foi criada a Lei n. ° 12.484 que incentiva o cultivo do bambu, e institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB). Ela tem por objetivo fomentar o desenvolvimento da cultura do bambu no Brasil com ações governamentais e empreendimentos privados. Adicionalmente a lei, o país apresenta clima favorável e grande extensão de áreas degradadas, propícias para o plantio de bambus (NOGUEIRA *et al.*, 2017a).

1.2.1 Métodos de Propagação do bambu

A propagação convencional do bambu é baseada nas sementes e em métodos vegetativos (Figura 5). A maioria dos bambus florescem uma vez na vida, em intervalos longos que podem atingir até 120 anos. O florescimento é gregário e a maioria das sementes perde-se durante as chuvas, ou são consumidas por pássaros e roedores (AZZINI; ARANHA; PIO, 1981; AHLAWAT; HARIDASAN; HEGDE, 2002).

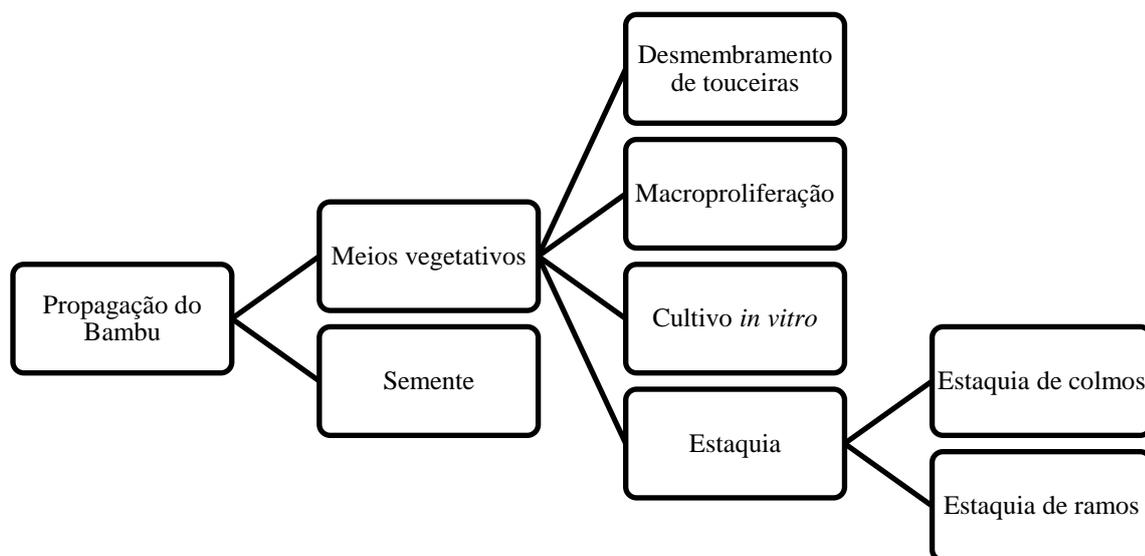


Figura 5. Métodos de propagação do bambu via sexuada e assexuada (adaptado de (AHLAWAT; HARIDASAN; HEGDE, 2002).

A propagação vegetativa dos bambus pode ser feita pelo desmembramento de touceiras, macroproliferação, estaquia de colmos ou ramos e pelo cultivo *in vitro*. Os métodos convencionais pela via sexual apresentam restrições, por isso métodos alternativos de multiplicação são necessários (ARYA; SATSANGI; ARYA, 2002). Assim, a micropropagação ou cultivo *in vitro* constitui uma alternativa viável para propagação em massa neste grupo de plantas (JIMÉNEZ, 2005). Esta técnica apresenta cinco etapas distintas, porém dependentes: 1) seleção de plantas matrizes; 2) estabelecimento *in vitro* de cultivos; 3) multiplicação/proliferação de brotos; 4) enraizamento e, 5) aclimatização (NOGUEIRA *et al.*, 2017a).

1.2.2 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* é uma técnica importante para propagação em larga escala de árvores e outras plantas lenhosas, incluindo bambus (SINGH *et al.*, 2013). Esse processo, apresenta muitas vantagens sobre a demais propagações vegetativas, tendo uso comercial na horticultura, agricultura e silvicultura (BANERJEE; GANTAIT; PRAMANIK, 2011; KOZAI, 1991).

A técnica é uma alternativa que garante rapidez na produção de mudas, além de um material livre de doenças, geneticamente uniforme, e necessidade de espaço limitado, há a possibilidade de produzir clones de plantas de difícil propagação, além da produção ser contínua durante todo o ano, e o material poder ser armazenado por longos períodos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2017a).

Em bambu a primeira tentativa de propagação *in vitro* parece ter sido realizada em 1968 pela germinação de de *Dendrocalamus strictus* (Alexander e Rao 1968 apud SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018). Posteriormente, várias espécies e explantes foram testados. Prutpongse e Gavinlertvatana (1992) propagaram *in vitro* cinquenta e quatro espécies de bambu a partir de gemas axilares de segmentos de nós. Arya *et al.* (1999) por meio de sementes assépticas produziram múltiplos brotos de *Dendrocalamus asper* (1-25) em um período de cinco semanas. Banerjee, Gantait, e Pramanik (2011) também em *Dendrocalamus asper* conseguiram induzir sete brotações axilares *in vitro* a partir de cada nó sensível excisado (15–20 mm de comprimento) contendo um broto. Arya *et al.* (2008) produziu por meio micropropagação 18.000 plantas de *D. asper*, a partir de explantes axilares, e 6.000 plantas através da cultura de sementes.

Como descrito vários explantes podem ser usados para a micropropagação do bambu. Além desses, também são usados embriões maduros, bainha de folhas, folhas e raízes de mudas (GOYAL; SEN, 2016). O tamanho, o estágio de desenvolvimento e o número de explantes em cada recipiente de cultura pode influenciar na obtenção de altas taxas de multiplicação. A maioria dos trabalhos evidencia a vantagem de usar vários rebentos juntos (*clusters*) em vez de apenas um para multiplicar espécies de bambu *in vitro* (SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018).

1.2.3 Problemas associados ao cultivo *in vitro* de bambu

Escurecimento do meio de cultivo é um problema constantemente relatado em cultivo *in vitro* de bambu. De acordo com Mudoj *et al.* (2013) isso ocorre devido a oxidação fenólica do meio de cultivo, como resultado das excisões feitas no explante. O processo de oxidação é a mudança de coloração no explante e do meio de cultura, causado por compostos fenólicos liberados pelo próprio explante (PAIVA; PAIVA, 2001). Os produtos de oxidação dos fenóis podem ser fitotóxicos e causar necrose e, eventualmente, a morte dos explantes (SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018).

1.2.4 Multiplicação *in vitro* a partir do uso de Citocininas

1.2.4.1 Hormônios e Reguladores de Crescimento

Os hormônios ou fitormônios são, substâncias naturais produzidas pelo próprio vegetal, enquanto os termos, regulador de crescimento ou regulador vegetal são empregados para todas as substâncias, naturais (produzidas por fungos, por exemplo) ou artificiais, que possuem efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas (MELO, 2002). Eles são os principais meios de comunicação intercelular, carregando a informação entre células e, desta forma, coordenam o seu crescimento e desenvolvimento (ZUFFO *et al.*, 2020).

Aliado a fatores externos, os hormônios vegetais iniciam processos de crescimento e diferenciação, além de sincronizar o desenvolvimento da planta com as mudanças estacionais do ambiente. Adicionalmente, eles regulam também a direção do crescimento, atividade metabólica, transporte, armazenamento e mobilização de substâncias nutritivas (CARVALHO *et al.*, 2009).

As principais classe de hormônios vegetais de ocorrência natural são: Auxinas, ácido abscísico, citocininas, etileno e giberelinas, sendo as interações de auxinas, citocininas e auxinas-citocininas consideradas as mais importantes para regular o crescimento e desenvolvimento em culturas de tecidos e órgãos de plantas (GASPAR *et al.*, 1996).

1.2.4.2 Citocininas e Auxinas

As citocininas (CKs) são sintetizadas com maior intensidade na extremidade das raízes e sua translocação se dá via xilema. Movimenta-se das raízes para as folhas e extremidades dos ramos em crescimento. Entre as principais funções fisiológicas estão a divisão celular, o crescimento das células, o aumento da frutificação efetiva, o retardamento da entrada em senescência e a inibição do desenvolvimento de raízes (PETRI *et al.*, 2016).

As auxinas influenciam nos processos de expansão celular, acidificação da parede celular, iniciação da divisão celular e organização de meristemas que dão origem a tecidos ou órgãos como as raízes (GASPAR *et al.*, 1996). Sendo assim, auxinas e citocininas, de acordo com seu nível relativo, podem levar à formação de brotos, alternadamente de raízes e/ou à proliferação de massas (JORDAN; CASARETTO, 2011).

Um dos pontos mais relevantes da multiplicação *in vitro* refere-se ao tipo e a concentração de citocininas usadas (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005). Nessa etapa, as citocininas são usadas para acelerar o processo, e a maioria das espécies de plantas apresentam variação inerente que é traduzida nas variadas respostas às diferentes

citocininas. Como resultado, torna-se pertinente otimizar os protocolos para cada espécie (AREMU *et al.*, 2012).

1.2.4.3 Citocininas em Bambu

Para bambus em geral, pode-se afirmar que o crescimento e a proliferação de brotações axilares são promovidos pelas citocininas (SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018). Estas são usadas em diversas concentrações, sendo mais comum o uso de 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (Kn) e metatopolina (mT). Evidência de vários estudos indicam a crescente popularidade e vantagens (embora não seja universal para todas as espécies) do uso das topolinas em comparação com outras citocininas (AREMU *et al.*, 2012).

Nogueira (2018) para a multiplicação de *Guadua magna* avaliou as citocininas, BAP, Kn, e mT em concentrações entre 0,0 e 26,64 μM , tendo verificado que a mT na concentração de 6,66 μM induz maior quantidade de brotos e melhor desenvolvimento de brotações durante os subcultivos. Nogueira, Gomes e Scherwinski-Pereira (2019) multiplicaram os bambus *Guadua magna* e *G. angustifolia* com 3,0 mg/L de BAP.

Em *D. asper* testou-se de 1,0 - 10,0 mg/L de BAP e a concentração de 3mg/L se mostrou a mais eficiente (ARYA *et al.*, 1999). Banerjee, Gantait e Pramanik (2011) obtiveram maior formação de brotos com 5 mg/L de BAP e 40 mg/L de sulfato de adenina. Ornellas *et al.* (2017) testaram BAP (5, 10, 15, 20 μM) para a indução da cultura e mT (0, 5, 10, 15 e 20 μM) para a proliferação e obtiveram maior número de brotações com as concentrações entre 15 e 20 μM de BAP, enquanto para a mT as concentrações crescentes aumentaram a proliferação.

Para a multiplicação de *Drepanostachyum falcatum*, Saini *et al.* (2016) testaram diferentes concentrações de BAP, Kn e NAA (ácido 1-naftaleno acético) e os melhores resultados foram obtidos com 3,5 mg/L BAP após a 4^a subcultura.

1.2.4.4 Metilação do DNA

Apesar do cultivo *in vitro* de plantas oferecer diversas vantagens, as condições *in vitro* podem induzir variações fenotípicas, devido a fatores genéticos e (ou) alterações epigenéticas (GOYALI; IGAMBERDIEV; DEBNATH, 2018). Epigenética refere-se ao estudo de alterações hereditárias que não mudam a sequência de DNA em nível molecular, uma vez que fenômenos epigenéticos são mediados por marcas reversíveis, como a metilação do DNA (BRÄUTIGAM *et al.*, 2013).

A metilação do DNA atua na modulação e controle da expressão gênica nos organismos sem alterar o código genético. Estudos mostram que o padrão de metilação do

DNA é modificado por características bióticas e abióticas, podendo haver hipermetilação ou hipometilação (SCHULZ; ECKSTEIN; DURKA, 2014).

A variação somaclonal ou fenotípica é frequentemente observada na propagação *in vitro*, podendo haver alterações na forma da folha bem como, mudanças de pigmentação podendo haver variantes albinas (DUARTE-AKÉ *et al.*, 2016). Por exemplo, em culturas de antera de arroz a presença de plantas albinas é causada por uma deleção em larga escala, causando perda de informações relacionadas a genes da fotossíntese (HARADA *et al.*, 1991). Em bambu dois mutantes albinos foram identificados em *Bambusa edulis* devido a proliferação de brotos a longo prazo. As análises revelaram que os plastídios nas células albinas são morfologicamente anormais, apresentam reduzido número de tilacóides, além de mal desenvolvidos (LIU *et al.*, 2007)

Esses mecanismos epigenéticos apresentam a função de modificar o desenvolvimento morfológico e fisiológico de um organismo, podendo ser influenciado por fatores ambientais. O conhecimento dos mecanismos que regulam as respostas epigenéticas, auxilia a identificação da melhor via de multiplicação *in vitro* de plantas (BRÄUTIGAM *et al.*, 2013). Portanto, é importante verificar a adequação de um protocolo de micropropagação específico, desenvolvido para uma espécie em particular, com capacidade de produzir plantas homogêneas e com garantia da manutenção da uniformidade clonal (HEINZE; SCHMIDT, 1995).

1.3.1 Fungos Micorrízicos arbusculares(FMA)

A capacidade que as plantas possuem de estabelecer relações favoráveis com os fungos do filo *Glomeromycota* é um fenômeno popularizado na natureza, conhecido como micorrizas (Siqueira, 1996). A maioria das plantas estabelecidas em solos possui raízes micorrizadas. Cerca de 83% das dicotiledôneas, 79% das monocotiledôneas e todas as Gimnospermas são micorrizadas. Entretanto, solos secos, salinos, inundados, com fertilidade extremamente alta ou baixa, ou destruídos por atividade de extração de minérios, não ocorrem micorrizas (KERBAUY, 2004).

A associação micorrízica se inicia a partir da interface formada entre os propágulos do fungo no solo, esporos, células auxiliares e hifas que crescem de raízes já colonizadas. Desses propágulos formam-se as hifas infectivas que crescem quando estimuladas por fatores bióticos, associando-se às raízes pela aderência à sua superfície (epiderme ou pêlos radiculares), formando um apressório (SOUZA *et al.*, 2006).

Após a formação do apressório, as hifas penetram as células da epiderme invaginando a plasmalema sem a romper, formando arbúsculos, esporos e vesículas exclusivamente dentro das células do córtex radicular. Essas estruturas são os principais pontos de troca de carboidratos e nutrientes minerais. O micélio extra-radicular se espalha pelo solo e auxilia a planta na absorção de nutrientes (SAGGIN JUNIOR; RIBEIRO DA SILVA, 2005).

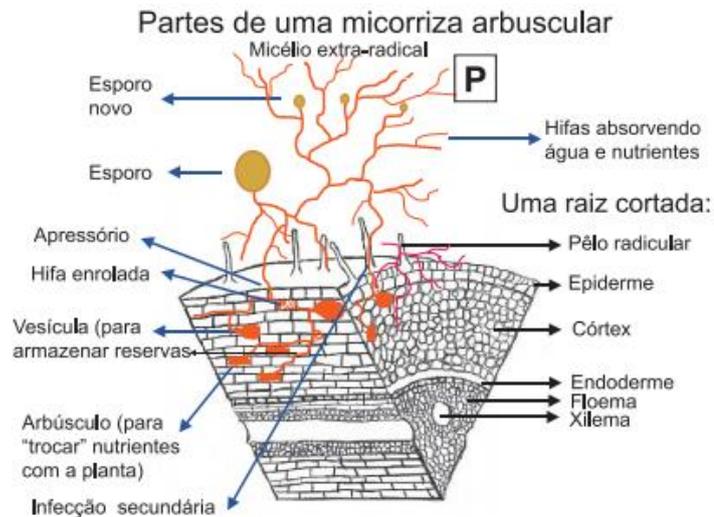


Figura 6. Raiz com estruturas do fungo micorrízico arbuscular. Ilustração: Orivaldo José Saggin Júnior, 2005.

Os efeitos benéficos da simbiose radicular com os FMAs podem ser explicados parcialmente pela maior área efetiva da superfície radicular proporcionada pelas hifas fúngicas, que exploram maior volume de solo e absorvem nutrientes minerais e água das zonas de depleção próximas a superfícies radiculares ativas (CLARK; ZETO, 2000). De acordo com Saggin Junior e Ribeiro da Silva (2005), como as hifas são mais finas que as raízes, a superfície de contato é maior, tornando as hifas mais eficientes, exigindo menor gasto de carbono (energia).

Os benefícios nutricionais das micorrizas resultam de interações dinâmicas e complexas entre as raízes e o micélio fúngico. Eles promovem o aumento da absorção de vários nutrientes, evita ataques por patógenos nocivos do solo, aumentam a capacidade de condução de água, aumentam a sobrevivência de plantas em áreas poluídas e melhora a estrutura do solo (SAGGIN JUNIOR; RIBEIRO DA SILVA, 2005; KAPOOR; SHARMA; BHATNAGAR, 2008).

A simbiose micorrízica comporta-se como uma mistura heterogênea trifásica, solo, planta e fungo, que é influenciada diretamente pela dependência micorrízica da planta, a eficiência simbiótica do fungo e a disponibilidade de fósforo do solo. Para usar os FMAs na agricultura, deve-se selecionar fungos com elevada especificidade simbiótica, adaptado a condições específicas de clima, solo e manejo cultural (SAGGIN JUNIOR; RIBEIRO DA SILVA, 2005).

1.3.2 O Fósforo (P) e sua relação com as micorrizas

O fósforo (P) é um nutriente requerido em grande quantidade para o crescimento das plantas. Esse nutriente estimula a formação e germinação da semente, desenvolvimento de raízes, caule, flor e influenciam no rendimento e qualidade das culturas (MALHOTRA *et al.*, 2018).

Poucos solos não fertilizados liberam P rápido o suficiente para suportar as altas taxas de crescimento das plantas (SCHACHTMAN; REID; AYLING, 1998). De acordo com Malhotra *et al.* (2018), o fósforo compõe cerca de 0,05% a 0,5% do peso seco das plantas e, apesar da concentração de fósforo no solo ser 2000 vezes maior que nas plantas, o fósforo é um dos nutrientes mais difíceis de serem adsorvidos, geralmente estando presente em formas indisponíveis ou disponível apenas fora da rizosfera. Assim, a morfologia das raízes das plantas é importante para maximizar a captação de P. Sistemas radiculares com maior área superficial e volume são mais eficientes em explorar o solo (LYNCH, 1995). A limitação do fósforo estimula a formação de raízes a fim de propiciar maior absorção do nutriente (SCHACHTMAN; REID; AYLING, 1998).

Além do aumento do número de raízes, as plantas desenvolveram outra adaptação para lidar com o baixo teor de fósforo disponível, a simbiose com fungos micorrizicos arbusculares (FMA) do filo *Glomeromycota*. Esses fungos suprem eficientemente a planta com fosfato e outros nutrientes minerais e, em troca, recebem carboidratos de interesse (CARBONNEL; GUTJAHR, 2014). Essa troca de nutrientes torna-se crítica quando a disponibilidade de água e a fertilidade do solo é baixa (KOSUTA *et al.*, 2003).

1.3.3 Produção de inóculos micorrizicos

A exploração comercial de inoculantes micorrízicos está em processo de amadurecimento. De forma geral, a produção em larga escala de inóculos micorrizicos é dificultada devido a natureza biotrófica obrigatória dos fungos micorrizicos. No entanto, há três métodos de produção de inóculos: 1) Método de produção *on farm* “com substratos”; 2)

Método de produção sem substrato “aeroponia” e “hidroponia” e, 3) Método de produção em sistema *in vitro* (PASQUALINI, 2013).

1.3.3.1 Método de produção de inóculos com substratos

O Método de produção *on farm* “com substratos”, consiste na seleção da estirpe do fungo micorrizico, seleção do substrato e da planta hospedeira, além do recipiente. Esses fatores irão depender da finalidade e da disponibilidade de cada um. Evidencia-se que podem ser usados uma única estirpe ou um mix de fungos MA para a produção de inóculos. *Gigaspora* e *Glomus* são os gêneros mais cultivados e estudados na literatura. O gênero *Glomus* apresenta geralmente todos os propágulos altamente infecciosos e, mesmo sem esporos, eles mantêm um alto potencial infeccioso, além das espécies deste gênero estarem em diferentes tipos de solos (MARTÍN, 2007).

Ressalta-se que, o genótipo do hospedeiro e a quantidade de fósforo é muito importante para a produção de inóculos micorrízicos. Deve-se selecionar uma espécie com dependência micorrízica, de preferência, uma planta de ciclo curto (4-6 meses), com sistema radicial que garanta produção adequada de propágulos micorrízicos. Entre as espécies que provaram ser bons hospedeiros incluem: *Brachiaria decumbens*, *Plantago lanceolata*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Paspalum notatum*, *Fragaria* sp. e *Zea mays* (DOUDS JR *et al.*, 2006; MARTÍN, 2007).

1.3.3.2 Método de produção de inóculos sem substratos

Esse método, apesar de produzir inóculos livres de contaminantes, possui alto custo. É utilizado principalmente para produção de pequenas quantidades de inóculo e para fins de pesquisa, sendo dividido em aeropônico e hidropônico. A diferença está relacionada com o modo de aplicação de nutrientes (PASQUALINI, 2013).

No sistema hidropônico a solução com os nutrientes necessários deve ser disponibilizada por meio de um sistema de bombas de aeração para evitar que as raízes fiquem sem oxigênio. O sistema aeropônico é usado por meio de pulverização de microgotas que aumenta a aeração do meio de cultura e permite uma boa troca gasosa. Entretanto, independente do sistema de disponibilidade de nutrientes para as plantas, é necessário manter uma quantidade mínima para que não ocorra a diminuição da fotossíntese e metabolismo das plantas (IJDO; CRANENBROUCK, 2011; PASQUALINI, 2013).

1.3.3.4 Método de produção de inóculos *in vitro*

O método *in vitro* mais eficaz é o de cultura monoxênica com raízes de cenoura transformada em Ri T-DNA. Isolados de raiz podem ser propagadas continuamente em diferentes meios sólidos e líquidos, com alta reprodutibilidade. Inicialmente, as raízes isoladas requerem pré-germinação de sementes sob condições axênicas. A germinação das sementes ocorre após 48 horas a 28 °C no escuro sobre ágar ou papéis de filtro umedecidos. As raízes emergidas podem ser transferidas para um meio rico, como o meio White modificado (Bécard e Fortin, 1988) ou meio Strullu e Romand (Strullu e Romand, 1987). As raízes com crescimento rápido são clonadas por repetidas subculturas. Para transformar as raízes com o microrganismo *Agrobacterium rhizogenes*, usa-se uma suspensão bacteriana, para inocular seções dos órgãos radiculares. Geneticamente as raízes de cenouras modificadas (*Daucus carota L.*) por *A. rhizogenes* mostram raízes abundantes duas a quatro semanas depois. Então, elas são cultivadas assepticamente em meio rico (Barard e Fortin, 1988). Várias subculturas (3 a 4) são necessários neste meio enriquecido com antibióticos, como carbenicilina ou ampicilina, para obter raízes sem bactérias. Uma cultura clonal derivada de uma raiz única é então estabelecida. Elas apresentam crescimento rápido, vigoroso e homogêneo em substratos relativamente pobres, sem suplementação de substâncias hormonais. O geotropismo negativo de raízes transformadas facilita o contato com as hifas dos fungos (BECARD; PICHÉ, 1992; DIOP, 2003).

1.3.4 Micorrizas em Plantas Micropropagadas

Apesar da cultura de tecidos de plantas oferecer condições de alta umidade, nutrição e luz, a técnica priva as plantas da microflora natural benéfica (LINS; TRINDADE; ROCHA, 2003). Essa característica torna-se limitante na fase de aclimatização das plantas, cujos problemas durante a transferência poderiam ser reduzidos por meio da inoculação com fungos micorrizicos arbusculares.

A simbiose micorrízica pode contribuir para o crescimento e proteção de plantas contra vários estresses ambientais (LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016). Na micropropagação, ela pode desempenhar função essencial para a sobrevivência, estabelecimento e crescimento das plantas na aclimatização e, posteriormente, no campo. A inoculação com o FMA *Glomus fasciculatum* aumentou o peso fresco de *Agave grijalvensis* (B. Ullrich), o número de folhas, comprimento das raízes e concentrações de frutano em caules e folhas (SANTIZ-GOMEZ *et al.*, 2020). Plantas de *Etilingera elatior* (Jack) RM, uma planta tropical que pertence à família Zingiberaceae, foram inoculadas com *Gigaspora*

albida e *Claroideoglosum etunicatum* e, aos 60 dias, houve um aumento de até 50% na sobrevivência, além de proporcionar melhor desempenho no crescimento das plantas (DA SILVA; DE MELO; YANO-MELO, 2017).

O efeito da inoculação de micorrizas arbusculares sobre o crescimento e composição química de *Brachiaria brizantha* foi testado com oito espécies e a inoculação aumentou significativamente os rendimentos de massa seca, teores e absorção de fósforo da gramínea (COSTA *et al.*, 2012).

Plantas de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* Fiori “Violet de Provence” foram inoculadas com *Septoglosum viscosum* e a inoculação melhorou o crescimento e desenvolvimento das plantas, reduzindo o estresse do pós-transplante (RUTA *et al.*, 2018). Em plantas de banana micropropagadas da var. Grand Naine foi observado maior incremento no desenvolvimento nas plantas micorrizadas com *Glomus intraradices* (DECLERCK; RISEDE; DELVAUX, 2002).

Como exposto, vários estudos já foram realizados e vem sendo desenvolvidos afim de potencializar a sobrevivência e desenvolvimento de mudas micropropagadas com a inoculação de FMAs. Salienta-se que as micorrizas apresentam variação quanto a eficiência dos benefícios para as plantas devido a especificidade do hospedeiro (FILHO; NOGUEIRA, 2007). No entanto, a maioria das espécies de *Glomus*, incluindo *G. mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. etunicatum*, *G. tenue* e *Gigaspora margarita* são selecionados para inoculação devido à sua fácil disponibilidade e associatividade (RAI, 2001)

1.3.4.1 Micorrizas em Plantas Micropropagadas de Bambu

Mudas de bambu híbrido (*Bambusa pervariabilis* × *B. grandis*) foram inoculadas com quatro cepas de fungos micorrizicos arbusculares (*Glomus intraradices*, BEG Number193 e 141; *G. mosseae*, BEG Number167; *G. etunicatum*, BEG Number168), e os resultados mostraram incremento significativo no crescimento de mudas do bambu (JIANG; GOU; DING, 2013).

Em *Dendrocalamus strictus* testou-se a inoculação de *Glomus agregatum*, *Bacillus polymixa* e *Azospirillum brasilense* na promoção de crescimento de mudas. A inoculação combinada de fungos resultou em respostas máximas de crescimento e ambas as condições fertilizadas e não fertilizadas utilizadas (MUTHUKUMAR; UDAIYAN, 2006).

Em *Bambusa bambos* e *Dendrocalamus strictus* em fase de aclimatização, testaram-se doze espécies, isoladas de bambu e outras árvores comuns em *Bundelkhand*, uma indiana. Em *B. bambos*, o peso seco total e a absorção de fósforo (P) foram significativamente

aumentados por todos os fungos estudados e, o comprimento da parte aérea, foi aumentado em oito inoculantes. Assim, os resultados mostraram que a utilização de FMAs é eficaz e pode melhorar a produtividade dos bambus da região.

1.3.4.2 Micorrização *in vitro* de Plantas Micropropagadas

Plantas micropropagadas de *Castanea sativa* foram micorrizadas *in vitro*. Para isso, testou-se quatro espécies de fungos micorrízicos: *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata*, *Piloderma croceum* e *Pisolithus tinctorius*. Entretanto, apenas *P. tinctorius* foi capaz de estabelecer uma associação estável com a espécie lenhosa. *L. laccata* e *A. muscaria* formaram um manto em, respectivamente, 20% e 10% das raízes secundárias das plantas. Contudo o crescimento apical não foi acompanhado pela associação fúngica em *L. laccata* e *A. muscaria*. A cepa *Piloderma croceum* não estabeleceu micorrização com as raízes de *C. saliva*, apesar de se ter verificado ramificação dicotômica dessas raízes.

Em *Pinus pinaster* a micorrização *in vitro* foi realizada em placas de Petri, contendo plântulas germinadas, cuja raiz apresentava um comprimento médio de 4 cm, em condições de assepsia. Perto da raiz de cada germinante foi colocado um inoculo de fungo *A. muscaria* ou *P. tinctorius*, com 0,8 cm de diâmetro. Em seguida, as placas de Petri foram envoltas em papel de alumínio na zona radicular das plantas e foram postas, em posição vertical, em condições ambientais controladas. Verificou-se que, ambos os fungos promoveram um aumento do crescimento das plantas face às do controle (não inoculadas) (COSTA; BAPTISTA; MARTINS, 2005).

O fungo *Glomus intraradices* produzido em raízes Ri T-DNA-transformadas de cenoura foi usado como uma fonte ativa de inóculo para a colonização *in vitro* de morangos. Após a indução radicular, plantas de morangos micropropagadas foram cultivadas em tampões de celulose (sorbarod) em contato com as micorrizas primárias nas câmaras de crescimento enriquecidas com 5000 ppm de CO₂ e alimentadas com meio mínimo. Após 20 dias de cultura, todas as plantas colocadas em contato com a simbiose primária foram colonizados pelo fungo, e obtiveram sistemas de raízes mais extensos e melhor crescimento de brotações (ELMESKAOUI *et al.*, 1995).

Plantas jovens de cerejeira silvestre de 3 cm de altura e com raízes de 1 a 2 cm de comprimento foram inoculadas com esporos esterilizados pré-germinados de *G. margarita*, colocados próximo às raízes. Placas de Petri foram cobertas na metade inferior com faixas pretas para evitar excesso de iluminação e incubado verticalmente em armário de crescimento (16-19°C; 16 h dia, 12.000 lux). A colonização micorrízica ocorreu apenas no tratamento que continha a presença de solo com ou sem fitato de Ca, tendo sido observados arbúsculos, mas sem vesículas nas raízes, sendo essa característica restrita às raízes laterais jovens (PONS *et al.*, 1983).

Em mudas de bananeiras micropropagadas testou-se os efeitos da micorrização *in vitro* com o FMA *Rhizophagus irregularis*, cultivado em associação com o Ri T-DNA de raiz de cenoura transformada. A inoculação foi feita em uma placa de cultura com dois compartimentos sendo estes preenchidos com Meio MSR (20 e 100 ml), sendo inoculados aproximadamente 100 esporos de *R. irregularis*. As placas de cultura foram seladas e incubadas em uma câmara de crescimento. Verificou-se a colonização intensa da raiz das plantas de bananas, com 5 e 7 semanas após a transferência para substrato arenoso. O sistema radicular permaneceu altamente colonizado e o crescimento e a biomassa foram significativamente maiores do que os das plantas de controle cultivadas em meio sem FMA (KOFFI; DECLERCK, 2015).

1.3.5 Substratos e Micorrizas

Para um substrato ser considerado de boa qualidade, ele deve possuir propriedades físicas, química e biológicas que promovam, respectivamente, a retenção de umidade e disponibilidade de nutrientes, de modo que atendam às necessidades nutricionais das mudas (ARAÚJO *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2017a).

O bambu é uma espécie de rápido crescimento, por isso requer mais nutrientes durante o estágio inicial do estabelecimento *ex vitro* das mudas (JHA; KUMAR, 2012). A inoculação das mudas com fungos micorrízicos ou rizobactérias promotoras de crescimento, individualmente ou em combinações, torna-se uma alternativa viável, pois promove aumento na concentração de nutrientes nos tecidos das mudas de bambu (MUTHUKUMAR; UDAIYAN, 2006).

Estudos mostram resultados que destacam a diversidade na maneira, função e reação dos fungos e na promoção de crescimento de plantas em resposta aos tipos de solo e aplicação de fertilizantes. A fertilização não afeta adversamente o desempenho de bioinoculantes em solos estressados em nutrientes, entretanto, a resposta das plantas pode variar com o tipo de solo. Portanto, para obter mudas de qualidade parece necessário a seleção e a combinação microbiana apropriada, além da dosagem certa de fertilizantes, que não afetem adversamente o desempenho dos bioinoculantes (MUTHUKUMAR; UDAIYAN, 2006).

1.3.5.1 Substratos e Micorrizas em Bambu

Em *Dendrocalamus strictus*, plantas inoculadas com diferentes FMAs foram prontamente infectadas até o vigésimo dia, mas a porcentagem infecção variou de 30% a 60%

em diferentes inóculo. A infecção completa (100%) foi registrada no 90º dia com hifas bem estabelecidas, portando arbúsculos e estágios vesiculares (RAVIKUMAR *et al.*, 1997).

Plantas de *D. asper* inoculadas com FMA foram colonizadas após 2 meses. Elas foram significativamente mais altas do que seus controles e, com a aplicação de estrume orgânico, houve um aumento ainda maior na altura das plantas tratadas com todos os três inóculos testados (VERMA; ARYA, 1998).

1.3.6 Aclimatização

Após o processo de estabelecimento *in vitro* e multiplicação das plantas, estas devem ser transferidas para o ambiente *ex vitro*. Esse processo é conhecido como aclimatização, muitas vezes confundido com aclimatação. De acordo com Preece e Sutter (1991), a palavra aclimatação se refere ao processo que plantas ou outros organismos necessitam acostumar a um novo clima ou situação, devido processos naturais. Já a aclimatização significa que os seres humanos interferiram, guiando o processo de ajuste do desmame das plantas das condições *in vitro* para o estabelecimento em casa de vegetação ou em campo.

A etapa pode ser definida como um processo em que as plantas cultivadas *in vitro* são submetidas ao ambiente *ex vitro* (SKREBSKY; NICOLOSO, 2004). A etapa é considerada uma das etapas mais importantes do processo da micropropagação (COUTO; WAGNER JUNIOR; QUEZADA, 2003). Um dos obstáculos para a aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas das condições *in vitro* para o solo em razão da diferença entre as duas condições (READ & FELLMAN, 1985).

A fase de aclimatização pode chegar a ser um fator limitante (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), pois em algumas espécies, ocorre elevada porcentagem de perda de plantas (CARVALHO *et al.*, 1999). Isso porque pode ocorrer alta mortalidade de plantas, pois a estufa e o campo possuem umidades relativas mais baixas, níveis de luz mais altos e ambientes sépticos que são estressantes para as plantas micropropagadas em comparação com as condições *in vitro*. A maioria das espécies cultivadas *in vitro* requer um processo de aclimatização para garantir que um número suficiente de plantas sobreviva e cresça vigorosamente quando transferido para o solo (PREECE; SUTTER, 1991).

Durante o processo de aclimatização, as novas condições devem ser passadas as plantas progressivamente de forma que elas não sofram estresses. Nessa fase o crescimento torna-se sensível e pode haver desequilíbrio no mecanismo estomático, podendo apresentar déficit hídrico nas células das regiões mais tenras (DA SILVA *et al.*, 1994). Por se tratar de

uma das etapas mais importantes do processo, deve ser feita com cuidado para evitar perdas significativas (NOGUEIRA *et al.*, 2017b).

Para o bambu, o processo de aclimatização é relativamente pouco estudado e consiste na remoção das plantas dos frascos de cultivo, seguido da lavagem das raízes em água corrente para remover resíduos de meio de cultivo, individualização das plantas, poda do excesso de raízes e transplântio para recipientes (tubetes ou bandejas coletivas) contendo substrato adequado. Uma vez realizado, as plantas são transferidas para casa de vegetação ou telado (NOGUEIRA *et al.*, 2017a).

2 REFERENCIAS

- AHLAWAT, S. P.; HARIDASAN, K.; HEGDE, S. N. Field Manual for Propagation of bamboo in North East India. **Instituto Estadual de Pesquisa Florestal, Itanagar, Arunachal Praedesh**, India, v. 1, p. 18, 2002.
- ALBALÁ, Paloma Rodríguez-ponga. **Trabajo fin de grado el origen botánico de las plantas cultivadas que se utilizan en la alimentación**. 2018. - UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, [s. l.], 2018.
- APPEZZATO DA GLORIA, Beatriz; CARMELLO CARNEIRO, Sandra Maria. **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. *E-book*.
- ARAÚJO, Afrânio César de *et al.* Utilização de substratos orgânicos na produção de mudas de mamoeiro Formosa Use of organic substrates on the production of ‘ Formosa ’ papaya seedlings. [S. l.], v. 8, n. 1, p. 210–216, 2013.
- AREMU, Adeyemi O. *et al.* Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Scottsville, v. 108, n. 1, p. 1–16, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>
- ARYA, Inder Dev; SATSANGI, Richa; ARYA, Sarita. Rapid Micropropagation of Edible Bamboo *Dendrocalamus asper* Rapid Micropropagation of Edible Bamboo *Dendrocalamus asper*. **Journal of Sustainable Forestry**, Dehradun, v. 14, n. January 2002, p. 103–114, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1300/J091v14n02>
- ARYA, S. *et al.* Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, Dehra Dun-India, v. 18, p. 879–882, 1999.
- AZZINI, Anísio; ARANHA, Condorcet; PIO, Rose Mary. FLORESCIMENTO E FRUTIFICAÇÃO EM BAMBU. [S. l.], v. 41, p. 175–180, 1981.
- AZZINI, Anísio; CIARAMELLO, Dirceu. BAMBU COMO MATÉRIA-PRIMA PARA PAPEL. IV — ESTUDOS SÔBRE O EMPRÊGO DE CINCO ESPÉCIES DE BAMBUS A, NA PRODUÇÃO DE CELULOSE. [S. l.], v. 1, 1971.
- BANERJEE, Maitreyi; GANTAIT, Saikat; PRAMANIK, Binay Ray. A two step method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Kolkata, v. 17, n. 4, p. 387–393, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0088-0>
- BECARD, Guillaume; PICHÉ, Yves. Establishment of Vesicular-arbuscular Mycorrhiza in Root Organ Culture : Review and Proposed Methodology. *In*: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. W. (org.). **Methods in microbiology**. U.S. ed. London: Academic Press INC., 1992. v. 24p. 89–108. *E-book*.

BGP. The Journal of the American Bamboo Society Volume 25 BAmBoo Science. [S. l.], v. 25, 2012.

BRÄUTIGAM, Katharina *et al.* Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. **Ecology and Evolution**, Nueremberg, v. 3, n. 2, p. 399–415, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ece3.461>

CARBONNEL, Samy; GUTJAHR, Caroline. Control of arbuscular mycorrhiza development by nutrient signals. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 5, n. SEP, p. 1–5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00462>

CARVALHO, CARLOS ALFREDO L. DANTAS, Ana Cristina V. .. *et al.* **Tópicos em Ciências Agrárias**. 1. ed. Cruz das Almas,BA: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2009. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/978-85-7042-103-6>

CARVALHO, Gladyston Rodrigues *et al.* ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.) PROPAGADAS “ IN VITRO ” ACCLIMATIZATION OF COFFEE PLANTLETS (*Coffea arabica* L .) POPAGATED “ IN VITRO ”. Lavras, v. 23, p. 483–490, 1999.

CHAVES, Anderson da Costa; SCHUCH, Márcia Wulff; ERIG, Alan Cristiano. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1281–1287, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-70542005000600024>

CHUCHÓN, JORGE ENRIQUE CATPO. **ETNOBOTÁNICA, CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DISTRIBUCIÓN ECOLÓGICA DE ESPECIES DE BAMBÚ EN LA REGIÓN SELVA CENTRAL DEL PERÚ**. 2019. - UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA, Lima,Perú, 2019.

CLARK, R. B.; ZETO, S. K. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. **Journal of Plant Nutrition**, London, v. 23, n. 7, p. 867–902, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01904160009382068>

CORTEZ, Priscila Andressa; SILVA, Delmira da Costa; CHAVES, Alba Lucilvânia Fonseca. **Manual prático de morfologia e anatomia vegetal**. 1. ed. Ilhéus,BA: Editus, 2016. *E-book*. Disponível em: http://www.uesc.br/editora/livrosdigitais2017/morfologia_anatomia_vegetal.pdf

COSTA, A.; BAPTISTA, P.; MARTINS, A. Micorrização “in vitro” de Germinantes de *Pinus pinaster*. **Instituto Politécnico de Bragança**, Bragança,Portugal, 2005.

COSTA, LUCENA NEWTON DE *et al.* EFEITO DE MICORRIZAS ARBUSCULARES

SOBRE O CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO MINERAL DE *Brachiaria brizantha*. [S. l.], p. 406–411, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/cab.v13i4.8665>

COUTO, Marcelo; WAGNER JUNIOR, Américo; QUEZADA, Alberto C. EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO MIRABOLANO 29C (*Prunus cerasifera* EHRH .) EM CASA DE VEGETAÇÃO EFFECT OF THE DIFFERENT SUBSTRATES ON THE ACCLIMATIZATION OF in vitro PROPAGATED. [S. l.], p. 125–128, 2003.

DA SILVA, A. R.; DE MELO, N. F.; YANO-MELO, A. M. Acclimatization of micropropagated plants of *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm. inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **South African Journal of Botany**, Netherlands, v. 113, p. 164–169, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.08.014>

DA SILVA, Antonio Tadeu *et al.* Aclimação de plantas proveniente da cultura in vitro. Brasília-DF, 1994.

DECLERCK, Â.; RISEDE, Jean-michel; DELVAUX, Bruno. Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with in vitro monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 93, p. 301–309, 2002.

DIOP, Tahir Abdoulaye. In vitro culture of arbuscular mycorrhizal fungi: Advances and future prospects. **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v. 2, n. 12, p. 692–697, 2003.

DOUDS JR, D. D. *et al.* On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite q. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 97, p. 809–818, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.015>

DRUMOND, PATRÍCIA MARIA; WIEDMAN, Guilherme. **Bambus no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: ICH - Instituto Ciência Hoje, 2017. *E-book*.

DUARTE-AKÉ, Fátima *et al.* Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in agave *angustifolia* haw. Albino variant somaclones during the micropropagation process. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 35, n. 12, p. 2489–2502, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2049-0>

ELMESKAOUI, Abdelmalek *et al.* A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets in vitro. **Mycorrhiza**, Germany, v. 5, n. 5, p. 313–319, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00207403>

FELISBERTO, Ferrari *et al.* LWT - Food Science and Technology Young bamboo culm flour of *Dendrocalamus asper*: Technological properties for food applications. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 76, p. 230–235, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.015>

FILHO, Arnaldo Colozzi; NOGUEIRA, Marco Antonio. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. 1. ed. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2007. *E-book*.

GASPAR, Thomas *et al.* Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, United States, v. 32, n. 4, p. 272–289, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02822700>

GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; KLERK, Geert-Jan de. Chapter 2 Micropropagation : Uses and Methods. *In: [S. l.: s. n.]*. p. 29–30. *E-book*.

GOYAL, Arvind Kumar; SEN, Arnab. In vitro regeneration of bamboos, the “Green Gold”: An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, India, v. 15, n. 1, p. 9–16, 2016.

GOYALI, Juran C.; IGAMBERDIEV, Abir U.; DEBNATH, Samir C. DNA methylation in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) propagated by softwood cutting and tissue culture. **Canadian Journal of Plant Science**, Canada, v. 98, n. 5, p. 1035–1044, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjps-2017-0297>

GPWG. Volume 88 Annals Number 3 of the 2001 Missouri Botanical Garden. *[S. l.]*, v. 88, p. 373–457, 2001.

HARADA, T. *et al.* Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. **Theoretical and Applied Genetics**, Germany, p. 157–161, 1991.

HEINZE, Berthold; SCHMIDT, Josef. Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. **Euphytica: International Journal of Plant Breeding**, Netherlands, v. 85, n. 1, p. 341–345, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00023965>

IJDO, Marleen; CRANENBROUCK, Sylvie. Methods for large-scale production of AM fungi : past , present , and future. *[S. l.]*, p. 1–16, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0337-z>

JHA, Anuradha; KUMAR, Anil. Effect of Arbuscular Mycorrhizal Inoculations on Seedling Growth and Biomass Productivity of Two Bamboo Species. *[S. l.]*, v. 52, n. June, p. 281–285, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0213-3>

JIANG, W. E. Í. X. Í. N.; GOU, Guangq Í. A. N.; DING, Yulong. INFLUENCES OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON GROWTH AND MINERAL ELEMENT ABSORPTION OF CHENGLU HYBRID BAMBOO SEEDLINGS. **Pakistan Journal Botany**, Pakistan, v. 45, n. 1, p. 303–310, 2013.

JIMÉNEZ, Víctor M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Holanda, v. 47, n. 2–3, p. 91–110, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x>

JORDAN, Miguel; CASARETTO, José. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *In: Physical Review A - Atomic, Molecular, and Optical Physics*. [S. l.: s. n.]. v. 84p. 1–28. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.84.042335>

JÚNIOR, Mário Lino ARANDA. **Cartilha para montagem de cobertura em bambu para moradias rurais**. Mato Grosso do Sul: [s. n.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

KAPOOR, Rupam; SHARMA, Deepika; BHATNAGAR, A. K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Science Horticulturae*, Netherlands, v. 116, p. 227–239, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.02.002>

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A, 2004. *E-book*.

KOFFI, Marie Chantal; DECLERCK, Stéphane. In vitro mycorrhization of banana (*Musa acuminata*) plantlets improves their growth during acclimatization. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*, United States, p. 265–273, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9666-0>

KOSUTA, Sonja *et al.* A Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induces Symbiosis-Specific. *Plant Physiology*, United States, v. 131, n. March, p. 952–962, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.011882.logically>

KOZAI, Toyoki. Invited Review PHOTOAUTOTROPHIC MICROPROPAGATION TOYOKI. [S. l.], n. April, p. 47–51, 1991.

LENOIR, Ingrid; FONTAINE, Joël; SAHRAOUI, Anissa Lounès-hadj. Phytochemistry Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses : A review. *Phytochemistry*, [S. l.], v. 123, p. 4–15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.002>

LINS, GÊLVA MARIA DE LIMA; TRINDADE, ALDO VILAR; ROCHA, HERMÍNIO SOUZA. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de babaneira em diferentes estádios de enraizamento. *Revista Brasileira de fruticultura*, Jaboticabal - SP, p. 143–147, 2003.

LIU, Nien-Tsu *et al.* Chloroplast genome aberration in micropropagation- derived albino *Bambusa edulis* mutants , ab1 and ab2. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, [S. l.], p. 147–156, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9182-3>

LUIS, Zanderluce Gomes *et al.* Caracterização anatômica dos órgãos vegetativos de bambu (*Poaceae* , *Bambusoideae*). *In: Bambus no Brasil: da biologia a tecnologia*. 1. ed. Rio de

Janeiro: ICH - Instituto Ciência Hoje, 2017. p. 42–59. *E-book*.

LYNCH, J. Root architecture and plant productivity. **Plant Physiology**, United States, v. 109, n. 1, p. 7–13, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.109.1.7>

MALHOTRA, Hina *et al.* Plant nutrients and abiotic stress tolerance. **Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance**, New Delhi, India, p. 1–590, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8>

MARTÍN, Fernandez Félix. Informe Científico Final . Factibilidad biológica de la micorrización. [S. l.], n. August, 2007.

MATHEWS, Sarah; TSAI, Rocky C.; KELLOGG, ELizabeth A. (P OACEAE): EVIDENCE FROM THE NUCLEAR GENE PHYTOCHROME B 1. [S. l.], v. 87, n. 1, p. 96–107, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/2656688>

MELO, Nataniel FrankJin de. **Hormônios e Reguladores Vegetal de Crescimento**. Petrolina,PE: Embrapa Semi -Árido, 2002.

MERCEDES, José Ramón. **Guía Técnica Cultivo del Bambú**. 1. ed. Santo Domingo, República Dominicana: Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF, 2006. *E-book*.

MONTIEL, Mayra; SÁNCHEZ, Ethel. (Poaceae : Bambusoideae) cultivados en Costa Rica IV : Dendrocalamus asper , clones Taiwán y Tailandia. **Revista Biología Tropical**, San José, Costa Rica, v. 54, n. December, p. 65–75, 2006.

MUDOI, Kalpataru Dutta *et al.* Micropropagation of important bamboos : A review. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 12, n. 20, p. 2770–2785, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJB12.2122>

MUTHUKUMAR, T.; UDAIYAN, K. Growth of nursery-grown bamboo inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria in two tropical soil types with and without fertilizer application. [S. l.], p. 469–485, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11056-005-1380-z>

NEGI, Divya; SAXENA, Sanjay. Micropropagation of Bambusa balcooa Roxb . through axillary shoot proliferation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, United States, v. 47, p. 604–610, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9403-2>

NOGUEIRA, Jênifer Silva *et al.* Micropropagação de bambu em larga- escala: princípios, estratégias e desafios. In: FERNANDES, Thaís (org.). **Bambus no Brasil da biologia à tecnologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: ICH - Instituto Ciência Hoje, 2017 a. p. 103–129. *E-book*.

NOGUEIRA, Jênifer Silva *et al.* escala : princípios , estratégias e desafios. In: [S. l.: s. n.]. p. 103–129. *E-book*.

NOGUEIRA, Jênifer Silva. **ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO EX SITU DE *Dendrocalamus asper* E MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guadua* (BAMBUSOIDEAE, POACEAE)** Orientador: 2018. - Brasília, [s. l.], 2018.

NOGUEIRA, Jênifer Silva; GOMES, Hugo Teixeira; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *guadua magna* and *G. angustifolia*1. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, Goiânia, v. 49, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4953743>.

ORNELLAS, T. S. *et al.* Effects of Vitrofur, BAP and meta-Topolin in the in vitro culture of *Dendrocalamus asper*. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 1155, p. 285–292, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.41>

PACHECO, Kris Stéphanie Ortíz. **Caracterización y clave de identificación de los bambúes en la región nor-oriental(San Martín, Amazonas y Cajamarca)**. 2017. - Universidade Nacional Agraria La Molina, Lima,Perú, 2017.

PAIVA, Renato; PAIVA, Patricia Duarte de Oliveira. **Cultura de tecidos**. 2001. - Centro de Editoração/FAEPE, Lavras, 2001.

PASQUALINI, Diego. **ARBUSCULARES E BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO COMO ALTERNATIVAS PARA AGRICULTURA FAMILIAR E RECOMPOSIÇÃO** Universidade do Estado de Santa LAGES , SC. 2013. - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages,SC, 2013.

PELEGRIN, Carla Maria Garlet de; LONGHI-WAGNER, Hilda Maria; OLIVEIRA, Paulo Luiz de. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de espécies do Complexo *Briza L.* (Poaceae: Pooideae: Poaeae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 666–680, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-33062009000300006>

PETRI, José Luiz *et al.* **Reguladores de crescimento para frutíferas de clima temperado**. 1. ed. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), 2016. *E-book*.

PONS, F. *et al.* Studies of V A mycorrhizae in vitro : mycorrhizal synthesis of axenically propagated wild cherry (*Prunus avium L.*) plants. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 221, p. 217–221, 1983.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. **Micropropagation**, Dordrecht, p. 71–93, 1991. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_5

PRUTPONGSE, P.; GAVINLERTVATANA, P. In Vitro Micropropagation of 54 Species

from 15 Genera of Bamboo. **HORTSCIENCE**, United States, v. 27, n. 5, p. 453–454, 1992.

RAECHAL, Luther J.; CURTIS, John D. Root Anatomy of the Bambusoideae (Poaceae). **American Journal of Botany**, United States, v. 77, n. 4, p. 475, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/2444381>

RAI, M. K. Current advances in mycorrhization in micropropagation. **In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant**, United States, n. April, p. 158–167, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/IVP2000163>

RAO, I. V. Ramanuja; GNANAHARAN, R.; SASTRY, Cherla B. **Bamboos Current Research**. 1. ed. Cochin, India: The Kerala Forest Research Institute, India and, 1988. *E-book*.

RAVIKUMAR, R. *et al.* Effect of endomycorrhizae (VAM) on bamboo seedling growth and biomass productivity. [*S. l.*], v. 98, p. 205–208, 1997.

RENVOIZE, Author S. A. A survey of leaf-blade anatomy in grasses V. The bamboo allies. **Springer on behalf of Royal Botanic Gardens**, New York, U.S, v. 40, n. 3, p. 509–535, 1985.

RUSCH, Fernando; HILLIG, Éverton; CEOLIN, Guilherme Bordignon. Anatomia de hastas adultas de bambu : uma revisão. **Pesquisa Florestal Brasileira Brazilian**, Colombo, v. 38, p. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4336/2018.pfb.38e201701530>

RUTA, Claudia *et al.* Field performance of micropropagated and mycorrhizal early globe artichoke plants. **European Journal of Agronomy**, [*S. l.*], v. 99, n. February 2017, p. 13–20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.06.003>

SAGGIN JUNIOR, Orivaldo José; RIBEIRO DA SILVA, Eliane Maria. Micorriza Arbuscular – Papel , Funcionamento e Aplicação da Simbiose. *In*: AQUINO, AM DE; ASSIS, RL de. (org.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável**. 1. ed. Brasília-DF: Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 101–150. *E-book*.

SAINI, Himanshu *et al.* In Vitro Micropropagation of Himalayan Weeping Bamboo, *Drepanostachyum falcatum*. **American Journal of Plant Sciences**, United States, v. 07, n. 09, p. 1317–1324, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.79126>

SANDHU, Manpreet; WANI, Shabir H.; JIMÉNEZ, Víctor M. In vitro propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation : a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 132, n. 1, p. 27–53, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1325-1>

SANTIZ-GOMEZ, Jose A. *et al.* Influence of Mycorrhization on the Growth and Fructan Production in Micropropagated *Agave grijalvensis* (B . Ullrich) Plantlets. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, [S. l.], v. 90, n. June, p. 375–380, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01109-6>

SCHACHTMAN, Daniel P.; REID, Robert J.; AYLING, S. M. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. **Plant Physiology**, United States, v. 116, n. 2, p. 447–453, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.447>

SCHULZ, Benjamin; ECKSTEIN, Rolf Lutz; DURKA, Walter. Epigenetic variation reflects dynamic habitat conditions in a rare floodplain herb. **Molecular Ecology**, [S. l.], v. 23, n. 14, p. 3523–3537, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mec.12835>

SCOLARI, Dante D. G. Produção agrícola mundial : o potencial do Brasil. [S. l.], p. 1–42, 2005.

SINGH, Sharbati R. *et al.* Evaluation of genetic fidelity of in vitro raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult . & Schult . F). [S. l.], p. 419–430, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1084-x>

SIQUEIRA, J. O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: [s. n.], 1996. *E-book*.

SKREBSKY, Etiane Caldeira; NICOLOSO, Fernando Teixeira. Sacarose e período de cultivo in vitro na aclimatização ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng . Pedersen). [S. l.], p. 1471–1477, 2004.

SORENG, Robert J. *et al.* A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jse.12150>

SORENG, Robert J. *et al.* Review A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jse.12262>

SOUZA, Vênia C. de *et al.* Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 612–618, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-43662006000300011>

SUNGKAEW, Sarawood *et al.* Non-monophyly of the woody bamboos (Bambuseae ; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s . s . [S. l.], p. 95–108, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10265-008-0192-6>

TERRELL, Edward E.; PETERSON, Paul M. Annotated list of Maryland grasses (POACEAE) ANNOTATED LIST OF MARYLAND GRASSES (POACEAE). [S. l.], n. May, 2015.

VERMA, R. ..; ARYA, I. D. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates and organic manure on growth and mycorrhization of micropropagated *Dendrocalamus asper* plantlets and

on spore production in their rhizosphere. [*S. l.*], p. 113–116, 1998.

VIEIRA, R. .. *et al.* LEAF ANATOMY OF THREE HERBACEOUS BAMBOO SPECIES. **Brazilian Journal of Biology**, Brazil, v. 62, p. 907–922, 2002.

ZUFFO, Alan Mario *et al.* **Manejo da adubação nitrogenada para o algodoeiro no sistema de Integração Lavoura–Pecuária**. 1. ed. Nova Xavantina,MT: Pantanal Editora, 2020. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.46420/9786599064159cap1>

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO DURANTE A MULTIPLICAÇÃO E MICORRIZAÇÃO *IN VITRO* DE *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*)

MICROPROPAGAÇÃO, DINÂMICA DA METILAÇÃO DURANTE A MULTIPLICAÇÃO E MICORRIZAÇÃO *IN VITRO* DE *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*)

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação, e micorrização *in vitro*, além de analisar a dinâmica de metilação de DNA durante a etapa de multiplicação das plantas. Na micropropagação foram testadas as citocininas (CK) 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (Kn) e meta-Topolina (mT) nas concentrações: 0; 3,3; 6,6 e 13,3 μM . Após três subcultivos de 30 dias cada, realizou-se a análise da metilação do DNA. Uma vez multiplicados *in vitro*, as plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação. Para a micorrização *in vitro*, inicialmente a concentração de fósforo (KH_2PO_4) do meio de MS (Murashige & Skoog) foi reduzida à 0%, 25%, 50%, 75% e 100% da sua concentração original. Além disso, também se comparou a micorrização utilizando-se o meio MSR (Medium Strullu-Romand) em sua concentração original de fósforo do referido meio. Neste experimento foram considerados dois tratamentos controle sem inoculação: (1) o meio de MS original, suplementado com 1,5 mg/L de Metatopolina e; (2) o meio MSR original. Num segundo experimento, com o intuito de aumentar a taxa de colonização das raízes, o experimento da micorrização *in vitro* foi realizado nas mesmas condições do anterior, mas modificando os tratamentos de micorrização, sendo testado o (1) meio MSR completo, (2) o MSR com metade dos sais, (3) o MSR com metade dos sais, adicionados de 1,5 mg/L de carvão ativado, (4) o MS com metade dos sais e com apenas 0,4 % da concentração original de fósforo, (5) o MS com metade dos sais e 25% da quantidade total de sacarose, além do MS com metade dos sais adicionados de 1,5 mg/L de carvão ativado (6). Em ambos experimentos se utilizou o fungo micorrízico *Rhizoglyphus clarum* como fonte de inóculo, o qual foi produzido em cultivo asséptico em sistema monoxênico em raízes Ri T-DNA de cenoura. A inoculação foi realizada utilizando-se frascos de 250 mL de capacidade contendo meio líquido com plantas de bambu. Na média foram inoculados cerca de 55,8 esporos por mL de meio, num total de 10 mL de meio com o inóculo por repetição. Verificou-se que a citocinina mais eficiente para a multiplicação de *D. asper* foi a mT na concentração 13,3 μM , que proporcionou as maiores médias nos parâmetros avaliados (número de brotos, hastes, gemas, altura e taxa de multiplicação). De forma geral foi observado redução do número de brotos no terceiro subcultivo. A análise da metilação de DNA mostrou que o pico de metilação de DNA ocorreu no primeiro subcultivo, seguido de decréscimo gradual no segundo e terceiro ciclos de multiplicação, coincidindo com os resultados da metilação avaliados. No experimento de

micorrização, constatou-se taxas de colonização de 16% das plantas em meio MSR. Nos demais tratamentos, não houve colonização. Apesar disso, não foram observados danos no desenvolvimento das plantas devido a redução do fósforo no meio de cultivo. Já no experimento de otimização, verificou-se taxas de colonização de até 25% das plantas nos tratamentos onde se utilizou o meio de MS com metade dos sais e com apenas 0,4 % da concentração original de fósforo, e naquele com MS na metade dos sais e 25% da quantidade total de sacarose. Os resultados indicam que a micorrização *in vitro* da espécie é possível, embora ajustes ainda devam ser realizados para garantir colonização mais ampla nas taxas de micorrização das mudas.

Palavras chave: Bambusoideae, bambu, propagação *in vitro*, fungo micorrízico arbuscular, metilação no cultivo *in vitro*, aclimatização.

1. INTRODUÇÃO

Dendrocalamus asper (Poaceae: Bambusoideae) é um bambu lenhoso e perene, pertencente à família Poaceae e à subfamília Bambusoideae (ARYA et al., 1999; CLARK; LONDOÑO; RUIZ-SANCHEZ, 2015). A espécie é amplamente cultivada ao redor do mundo e apresenta múltiplos usos (BANERJEE; GANTAIT; PRAMANIK, 2011), que incluem desde o fornecimento de alimentos e madeira até o uso em artesanatos (SINGH *et al.*, 2012).

Tendo em vista os diversos usos do *D. asper* e o crescente aumento da demanda por produtos derivados desta espécie é fundamental o desenvolvimento de métodos avançados de propagação, uma vez que a produção de sementes é inconstante e os métodos de propagação vegetativa convencionais são de baixa eficiência (ARYA; SATSANGI; ARYA, 2002; ARYA et al., 1999). Nesse contexto, a cultura de tecidos de plantas apresenta-se como uma importante ferramenta para superar esses problemas, pois, uma vez ajustado o protocolo para a espécie, pode propiciar contínuo fornecimento de mudas para o plantio, em curto espaço de tempo e espaço físico reduzido, independentemente da época do ano (MUDOI *et al.*, 2013).

A cultura de tecidos, também conhecida como micropropagação, é constituída basicamente por cinco etapas distintas e dependentes: seleção das plantas matrizes, estabelecimento *in vitro* dos propágulos, multiplicação, enraizamento e aclimatização. Apesar de todas as etapas serem importantes, é na etapa de multiplicação que os materiais são obtidos na quantidade necessária (NOGUEIRA *et al.*, 2017). E para tanto, nessa etapa geralmente são usados reguladores de crescimento, pois eles aceleram o processo da multiplicação. Dentre os

diversos grupos de reguladores de crescimento, as citocininas são as recomendadas na multiplicação por estimularem a divisão celular e promoverem a quebra da dominância apical e, com isso, a emissão de novos brotos (BRAULT; MALDINEY, 1999).

Para a multiplicação de bambus são relatados o uso de diversos tipos de citocininas em diferentes concentrações. Em *Bambusa tulda* e *Melocanna baccifera*, Waikhom e Louis (2014) usaram 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (Kn) isoladamente e em combinação. Já em *Guadua magna*, Nogueira (2018) utilizou BAP, Kn e metatopolina (mT) nas concentrações entre 6,66 e 26,64 μM em meio de MS líquido e verificou que a citocinina mT na concentração de 6,66 μM foi a que possibilitou as melhores taxas de multiplicação para a espécie. Prutpongse e Gavinlertvatana (1992) por sua vez, trabalhando com 54 espécies de 15 gêneros de bambu, obtiveram sucesso na micropropagação delas testando o ácido naftalenoacético (ANA) em concentrações entre 2,7 e 10,8 μM e BAP entre 2,2 e 44 μM , sendo observado a concentração mais eficiente a de 22 μM de BAP para a maioria das espécies. Arya et al. (1999) multiplicaram *Dendrocalamus asper* em meio de MS suplementado com BAP em concentrações entre 4,44 e 44,44 μM e verificaram que a concentração de 13,3 μM foi a mais eficiente para multiplicação das brotações. Singh et al. (2012) utilizando explantes de 2,5 a 3 cm de comprimento, cada um com um único nó, multiplicaram o *D. asper* em meio de MS suplementado com BAP ou Kn em concentrações entre 5 e 20 μM , sendo o BAP na concentração 15 μM o mais eficiente na multiplicação de brotos.

Assim, verifica-se que na literatura diversos tipos de citocininas e concentrações podem ser usadas para multiplicar as diferentes espécies de bambu, com grande variação de respostas, sendo a escolha determinada por sua eficiência cumulativa na indução de multiplicação (AREMU et al., 2012; BAIRU et al., 2007). No entanto, até o momento, nada é descrito na literatura utilizando-se a metatopolina (mT) na micropropagação de *D. asper*. De fato, a mT demonstrou ser superior em muitos casos, melhorando a proliferação de brotações e reduzindo ou até diminuindo alguns problemas fisiológicos encontrados com o uso de BAP durante a micropropagação de algumas espécies de plantas (Bairu et al., 2007; Malá et al., 2009; Aremu et al. 2012a, b; Amoo et al., 2014).

Enfatiza-se que o cultivo *in vitro* pode provocar alterações epigenéticas, como modificações no grau de metilação de DNA (KARIM et al., 2018). Esse evento epigenético regula de forma dinâmica a expressão gênica e a estabilidade do genoma (ZHU et al., 2020) e se altera durante a proliferação e diferenciação celular (SOLÍS; CANO; RISUEÑO, 2015). A metilação de DNA tem sido associada com o potencial de regeneração *in vitro* (KARIM et al.,

2018; SUN et al., 2020) e com a ocorrência de variação somaclonal (DUARTE-AKÉ et al., 2016).

Nesse sentido, é pertinente a realização de estudos sobre a dinâmica de eventos epigenéticos durante as diferentes etapas de cultivo *in vitro*. Esse tipo de análise pode favorecer a compreensão, por exemplo, das mudanças nas taxas de multiplicação após determinados períodos de cultivo *in vitro*. Contudo, salienta-se que maioria dos estudos disponíveis analisam a dinâmica da metilação de DNA durante o desenvolvimento das rotas organogênica e embriogênica, com poucos estudos voltados para o acompanhamento desse evento epigenético durante as etapas de micropropagação por proliferação de gemas.

De maneira geral, a propagação *in vitro* ou micropropagação de bambus não foge dos procedimentos básicos realizados para outras espécies. Ela consiste basicamente em multiplicar propágulos vegetativos em laboratório, sob condições de total assepsia, em meio nutritivo específico e em condições artificiais de luminosidade e temperatura (SINGH et al., 2013). Assim, o meio de cultivo usado na micropropagação é desprovido de microorganismos (KOFFI; DECLERCK, 2015), uma característica benéfica na fase *in vitro* por evitar a contaminação, mas muito possivelmente limitante na fase *ex vitro* por limitar as associações microbianas benéficas com as plantas. Assim, uma forma de mitigar essa condição axênica das plantas em cultivo poderia ser a introdução de microorganismos benéficos por inoculação (Novak, 1998; Thomas et al. 2010).

A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em plantas micropropagadas não só pode proteger e rustificar as plantas na mudança ambiental durante a última fase da micropropagação, que é a aclimatização, como também podem melhorar a qualidade da biomassa das plantas durante o crescimento inicial (KAPOOR; SHARMA; BHATNAGAR, 2008). Os FMAs são conhecidos por estimular o crescimento das plantas aumentando substancialmente a absorção de nutrientes, principalmente o fósforo (ANTONIOLLI; KAMINSKI, 1992). Além disso, podem proteger as plantas hospedeiras de patógenos radiculares e aumentar a tolerância das plantas ao estresse, reduzindo os efeitos de variações extremas de temperatura, pH e estresse hídrico que ocorre nessa etapa (SIQUEIRA, 1994; CAVALCANTE et al., 2001; FOLLI-PEREIRA et al., 2012).

Nesse contexto, o trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo para a micropropagação e a micorrização de *Dendrocalamus asper*, bem como analisar a dinâmica de metilação de DNA das plantas micropropagadas durante a etapa de multiplicação da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

2.1 MICROPROPAGAÇÃO

2.1.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal usado no experimento pertencia à coleção de bambus da Embrapa Recursos Genética e Biotecnologia, Brasília-DF. A espécie *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) foi formada a partir de sementes coletadas de touceiras adultas de plantas matrizes que floresceram em outubro de 2015, no município de Pardinho-SP.

Após a coleta, as sementes passaram pelo processo de desinfestação, no qual foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas em água corrente. Em seguida, em capela de fluxo laminar, foram imersas em álcool 70% (v/v) por 3 min, seguido por imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl_2) com 2,5% de cloro ativo por 20 minutos, seguida de tríplice lavagem com água destilada e autoclavada. Após o processo de desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em meio de MS (Murashige; Skoog, 1962). As plantas originadas foram mantidas em meio de MS, suplementado com 20 g.L^{-1} de sacarose, com subcultivos realizados a cada 2 meses. Nesta e todas as demais etapas, os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ e sob intensidade luminosa de $100 \mu\text{m.m}^{-2}.\text{s}$.

Uma vez estabelecidas *in vitro*, os propágulos livres de contaminação obtidos foram transferidos para meio de multiplicação líquido, contendo sais de MS suplementado com 20 g L^{-1} de sacarose e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de metatopolina (mT) (Nogueira, 2018), até se obter um número de propágulos suficientes para o início dos experimentos. As plantas foram mantidas em frascos com capacidade de 250 ml, contendo 40 ml de meio, sendo este renovado a cada 30 dias. Quando as plantas se desenvolveram em forma de touceiras, estas eram separadas formando novos propágulos. Antes da montagem dos experimentos, as mudas foram mantidas por uma semana em meio de cultivo de MS sem adição de citocinina, a fim de reduzir o efeito residual deste fitorregulador.

2.1.2 Efeito de diferentes citocinina e concentrações na multiplicação de *Dendrocalamus asper*

Neste experimento, propágulos formados por três hastes, com pelo menos uma delas apresentando aproximadamente 8 cm foram utilizados como fonte de explante e cultivados em meio líquido contendo sais de MS, acrescido de 20 g.L⁻¹ de sacarose e as citocininas (CK) 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (Kn) e metatopolina (mT) nas concentrações de 0; 3,3; 6,6 e 13,3 µM. Estas concentrações foram adaptadas do trabalho de Nogueira (2018) que trabalhou com espécies do gênero *Guadua*. Os explantes foram cultivados em 40 mL de meio, distribuídos em frascos com capacidade de 250 mL.

As avaliações referentes à altura (cm), número de brotos, gemas e de novas hastes formadas foram realizadas a cada 30 dias, num total de três subcultivos sucessivos. A altura das hastes foi feita com auxílio de régua milimetrada. Para padronizar a avaliação e deixar mais compreensível as respostas obtidas nos diferentes tratamentos, as novas formações (rebentos) com até 4,0 cm de altura foram consideradas brotos. Já aquelas com alturas superiores foram consideradas hastes. Para definir a taxa de multiplicação, contabilizou-se a quantidade de frascos ao fim do terceiro subcultivo, considerando que inicialmente haviam 3 frascos por tratamento.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4 (três tipos de citocininas BAP, Kn, mT e quatro concentrações 0,0; 3,3; 6,6; 13,3), totalizando 12 tratamentos. Cada tratamento foi formado por três repetições, sendo cada repetição formada por um frasco, contendo entre duas a três hastes, com pelo menos uma delas com aproximadamente 8 cm de altura. Para análise estatística, realizou-se análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

2.1.3 Dinâmica da metilação de DNA durante ciclos de multiplicação de *Dendrocalamus asper*

Para a quantificação de metilação do DNA foram coletadas amostras foliares de plantas de *Dendrocalamus asper* fornecedoras dos brotos para iniciação da multiplicação, previamente estabelecidas *in vitro*, e de brotos oriundos em cada um dos três ciclos de multiplicação subsequentes. Uma vez coletadas, todas as amostras foram imediatamente congeladas, por imersão em nitrogênio líquido, sendo em seguida armazenadas à -20°C até a utilização.

2.1.3.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada conforme metodologia de Doyle e Doyle (1990) modificada. Para tal, o material vegetal foi inoculado em microtubos de 2 mL de capacidade contendo 12 *beads* de aço e 700 µL da solução CTBA + 2-mercaptoetanol. Logo em seguida, as amostras foram trituradas por 30 segundos em *TissueLyser* (Qiagen, Hilden, Germany) e então incubadas por uma hora em banho-maria à 65°C sob agitação 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. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos e a fase sobrenadante resultante transferida para novos microtubos de 1,5 ml, onde 400 µL de isopropanol frio foram adicionados para precipitação do DNA. Logo após esses microtubos foram incubados à -20°C por 1 hora sob agitação ocasional a cada 15 minutos. Após a incubação, o isopropanol foi descartado 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 passou por um processo de secagem em temperatura ambiente por 12 horas e foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE com RNase (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA e 10 mg ML21 RNase A).

Antes do armazenamento, a qualidade e a concentração do DNA foram determinadas através da leitura das amostras em comprimento de onda de 260 nm (para ácidos nucleicos) e 280 nm (para proteínas), em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop Technologies, Delaware, EUA). Posteriormente, uma alíquota (1 µl) de cada amostra de DNA foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, em cuba horizontal, corado com 10 µl de brometo de etídio, para visualização do padrão de qualidade e quantidade de cada amostra extraída. A imagem do gel foi visualizada e digitalizada, sob luz ultravioleta, em transiluminador (AlphaImager HP, Cell Biosciences, Santa Clara). Em seguida, as amostras foram armazenadas à temperatura de -20 °C até o momento da sua utilização.

2.1.3.2 Análise da metilação do DNA

O status de metilação do DNA foi determinado pelo teste ELISA usando o 5-mC Kit DNA ELISA (Zymo Research), conforme instruções do fabricante (Figura 1). A metilação de DNA (% 5-mC – 5 metilcitosina) foi quantificado pelo método colorimétrico, através da leitura da absorbância no comprimento de onda de 405 nm em um espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax). Foram utilizadas três réplicas técnicas (aproximadamente 100 ng) de cada amostra de DNA (planta mãe e plantas dos subcultivos 1, 2 e 3).

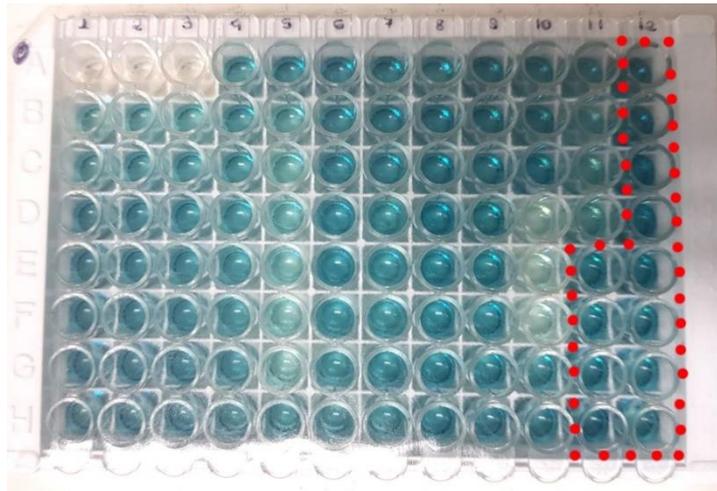


Figura 1. Placa de ELISA pronta para leitura (método colorimétrico). Poços delimitados pelo pontilhado se referem as amostras de DNA de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae).

2.1.4 Aclimatização das mudas

Após o terceiro subcultivo de multiplicação realizou-se a aclimatização das plantas. Para tanto, antes da transferência para o substrato, elas foram retiradas dos frascos tendo suas raízes lavadas com água corrente afim de retirar o excesso de meio de cultivo. Para a aclimatização foram utilizados copos plásticos de 200 ml de capacidade, com furos de 0,5 mm na parte inferior, preenchidos com 200 cm³ de substrato Carolina Soil + areia lavada na proporção 1:1 (v/v). Após o transplante, as mudas foram irrigadas com aproximadamente 50 ml de água e cobertas com saco plástico, afim de garantir maior umidade no ambiente. Para evitar perdas por morte, inicialmente o material foi pré-aclimatizado em câmara de crescimento tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) (Percival modelo I-30NL) à 25°±2°C e sob intensidade luminosa de 20 μm.m⁻².s (Figura 2). Nestas condições, as plantas foram

mantidas por aproximadamente duas semanas, sendo então os sacos plásticos retirados. Após mais duas semanas, as plantas então foram transferidas para casa de vegetação.

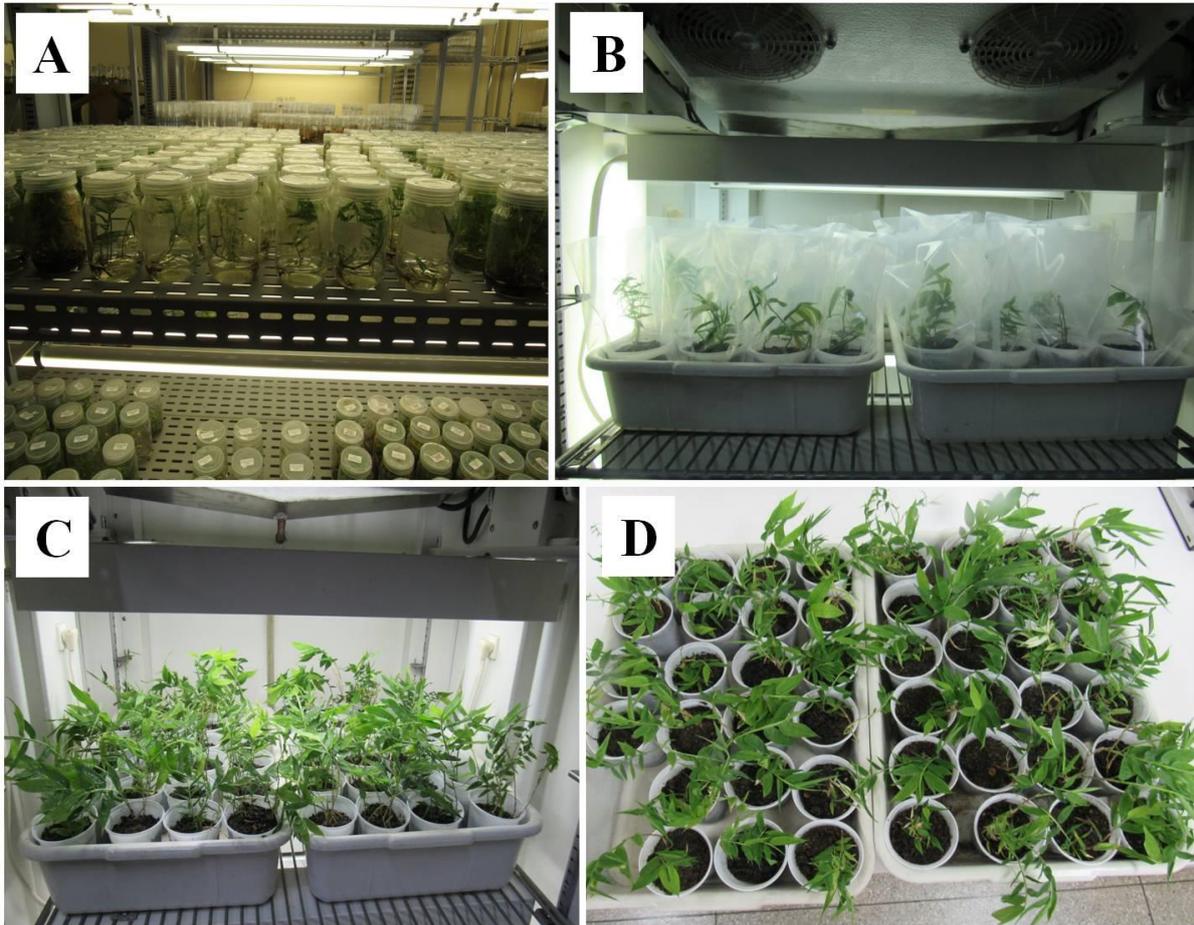


Figura 2. Etapas do experimento de micropropagação de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*). **A.** Plantas no ambiente *in vitro*, mantidas em sala de crescimento; **B e C.** Plantas micropropagadas em câmara de crescimento (B.O.D.) à 25 ± 1 °C durante a etapa de pré-aclimatização; **D.** Plantas micropropagadas prontas para a transferência para a casa de vegetação.

2.2 MICORRIZAÇÃO *IN VITRO*

2.2.1 Obtenção do inóculo micorrízico

O inóculo de *Rhizoglyphus clarum* CNPMS05 foi obtido a partir da coleção de microorganismos multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete lagoas - MG. Os inóculos foram produzidos em cultivo asséptico, em sistema monoxênico com raízes Ri T-DNA de cenoura, clone C264 inoculadas com *R. clarum* de acordo com Souza & Berbara (1999) (Figura 3A). O fungo micorrízico foi multiplicado em segmentos de raízes Ri T-DNA de cenoura (1 a 2 cm) colocados em placas de Petri (25 x 150 mm) contendo 40 mL de meio MSR (Medium Strullu-Romand 1986, 1987), pH $5,8 \pm 0,1$ e solidificado com 0,4% Phytigel (Bécard e Fortin 1988).

As placas foram incubadas no escuro à 28° C e monitoradas periodicamente quanto a formação das estruturas fúngicas. Após aproximadamente 3 meses incubadas, as placas apresentando esporos e hifas (Figura 3 B-D) em quantidade propícia foram selecionadas para uso na inoculação. Em média 55,8 esporos por mL da solução contendo raízes com inóculo e resíduos do meio de cultivo sólido foram utilizados para serem inoculados em meio de cultivo líquido contendo a planta a ser micorrizada. No total, cerca de 10 mL dessa solução foi adicionada ao meio de cultura.

2.2.2 Efeito da redução do fósforo do meio de cultivo sobre a micorrização

Para o estabelecimento do experimento inicialmente foram testados cinco tratamentos, quatro deles baseados na redução da concentração original de fósforo (KH_2PO_4) do meio de MS (Murashige; Skoog, 1962) (Anexo 1), além de um tratamento controle utilizando o meio de MSR (Medium Strullu-Romand 1986, 1987) (Anexo 2), meio no qual o fungo micorrízico foi multiplicado. Assim, os tratamentos em meio de MS continham 0%, 25%, 50%, 75% e 100% da concentração de fósforo original (KH_2PO_4). Já o tratamento onde se utilizou o meio MSR apresentou a concentração completa de fósforo, que representa 2,41% da concentração de fósforo estabelecida na formulação do meio de MS. No total foram considerados dois tratamentos controle, ou seja, sem inoculação: (1) o meio de MS completo suplementado com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Metatopolina (mT) e; (2) o meio MSR completo. Os tratamentos em meio de MS, estabelecidos com diferentes concentrações de fósforo, foram suplementados com 20 g.L^{-1} de sacarose, enquanto que os tratamentos em meio MSR foram suplementados com 10 g.L^{-1} de sacarose. Em todos os tratamentos utilizou-se meio líquido. Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem à 121°C por 20 minutos sob 1,5 atm de pressão, após aferição do pH para $5,8 \pm 0,1$.

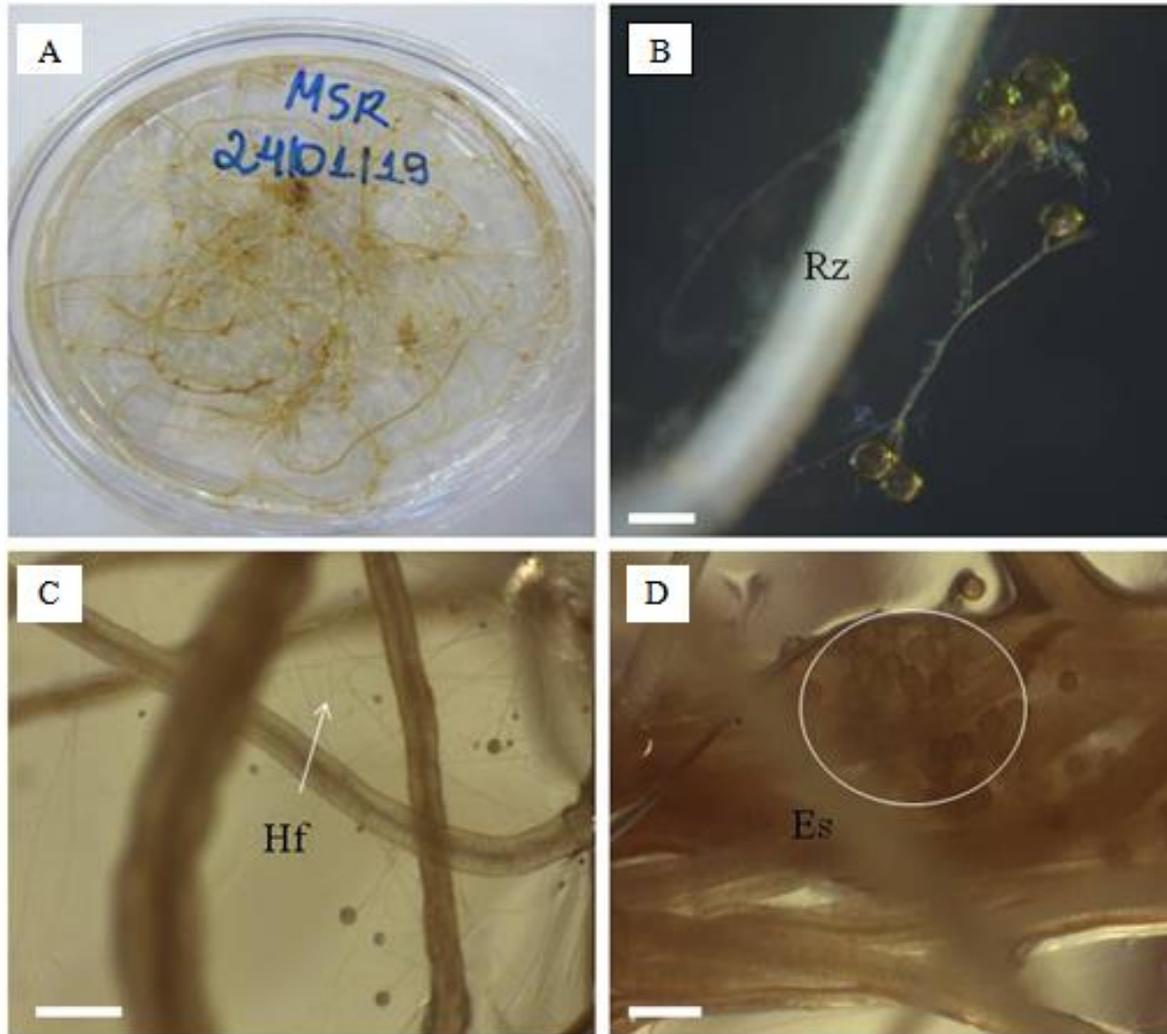


Figura 3. Raiz de cenoura transformada micorrizada com *Rhizoglyphus clarum*. **A:** Placa de petri com raízes de cenoura micorrizadas após 3 meses de incubação; **B e D:** Esporos do fungo *R. clarum*; **C:** Hifas extrarradiculares. **Es:** esporos; **Hf:** hifas; **Rz:** raiz. Escalas: **B:** 200 µm; **C e D:** 500 µm.

Após 30 dias de cultivo, as plantas dos tratamentos foram avaliadas quanto à altura (cm) e número de raízes formadas, as quais foram quantificadas por contagem visual. No caso das medições, as mesmas foram realizadas com auxílio de régua milimetrada. Além das avaliações de crescimento, a possível influência da micorrização sobre o desenvolvimento das plantas também foi analisada a partir da determinação dos teores de clorofila *a* e *b*, além dos carotenóides das plantas durante três fases e épocas de desenvolvimento: (1) durante o cultivo *in vitro*; (2) logo após a etapa de pré-aclimatização (em câmara de crescimento) e; (3) um mês após a transferência para a casa de vegetação, durante a acclimatização.

2.2.2.1 Determinação dos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides

Para a determinação dos teores de clorofila *a*, *b* e dos carotenoides, seguiu-se a metodologia conforme Moran e Porath (1980). Assim, cerca de 24 horas antes da coleta do material, adicionou-se 2 mL de dimetilformamida (DMF) em tubo Falcon de 15 mL, armazenando-os em geladeira. Posteriormente, os tubos foram envolvidos com papel alumínio para evitar a degradação pela luz. Durante a coleta, foi retirado o segundo par de folhas de uma das hastes da parte aérea de cada planta, que foi seccionada em tamanhos de área conhecida utilizando-se um cortador cilíndrico de 7 mm de diâmetro. Imediatamente após a realização dos cortes, os materiais foram colocados nos tubos contendo DMF, onde permaneceram por cerca de 48 horas em refrigerador, até a extração total da clorofila das folhas. Em seguida, a solução foi transferida para uma cubeta de quartzo e realizada leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) nas faixas de absorbância (*Ab*) de ondas de 663,8 nm, 646,8 nm e 480 nm, para determinar as concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente.

2.2.2.2 Coloração das raízes

Para verificar a colonização das raízes, a cada trinta dias foram coletadas amostras de raízes dos indivíduos inoculados, sendo estas lavadas e armazenadas em álcool 50%. Em seguida, as raízes foram lavadas e armazenadas em solução de KOH 2,5 % durante a noite e lavadas com água destilada no dia seguinte. Posteriormente, as raízes passaram por solução de HCl a 1 %, onde permaneceram por aproximadamente 3 horas. A solução foi então drenada, sem lavar as raízes, adicionando-se solução de azul de tripano 0,05% (m/v). Em seguida, o corante foi drenado e as raízes lavadas em água corrente. As raízes coradas foram então armazenadas em tubos Falcon de 15 ml de capacidade e observadas em microscópio Leica (DM 750) com sistema de captura de imagem (Leica Application Suite - LAS EZ). Durante a visualização foi avaliada a presença ou ausência de indícios de colonização das raízes (esporos, hifas ou vesículas).

2.2.3 Ajuste do protocolo de micorrização *in vitro*

Com intuito de aperfeiçoar o protocolo, o experimento de micorrização foi repetido com algumas mudanças nos tratamentos, mas usando-se as mesmas condições de cultivo, inóculo e material vegetal. Para tanto, neste experimento, os tratamentos utilizados foram: 1)

o meio de MSR completo; 2) o MSR com metade dos sais; 3) o MSR com metade dos sais, adicionados de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de carvão ativado (para simular condições de escuro); 4) o meio de MS com metade dos sais e com apenas 0,4 % da concentração original de fósforo; 5) o meio de MS com metade dos sais e 25% da quantidade total de sacarose, além do meio de MS com metade dos sais, adicionado de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de carvão ativado (6).

Inicialmente, as plantas ficaram aproximadamente uma semana em meio MSR líquido com 50% de fósforo, sendo em seguida transferidas para os respectivos tratamentos (meios de cultivo), com a adição de aproximadamente 10 mL do inóculo do fungo micorrízico por repetição (em média 100 esporos por mL). Após a inoculação, as plantas foram acondicionadas em sala de crescimento, onde permaneceram por aproximadamente 90 dias. A cada 20 dias foram retiradas amostras de raízes para avaliar a colonização micorrízica, de acordo com testes de coloração e observações em microscópio já descritos anteriormente. Enfatiza-se que as plantas oriundas desse experimento não foram aclimatizadas. Como avaliação foi considerado apenas a micorrização ou não das raízes dessas plantas.

2.2.4 Pré-aclimatização e aclimatização das plantas

Ao passar pelos meios com adição do inóculo, todas as plantas foram transferidas para o meio MSR, sem adição do inóculo, onde permaneceram por mais 20 dias em sala de crescimento. Em seguida, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento tipo B.O.D. (Percival) para a pré-aclimatização. Para isso, elas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente e transplantadas para copos de plástico de 200 ml com substrato Bioplant e areia lavada na proporção de 3:1 (v/v). Em seguida, as plantas foram irrigadas com aproximadamente 50 ml de água, permanecendo acondicionadas por aproximadamente 4 semanas. Nestas condições, as plantas foram irrigadas a cada 2 dias e, durante as duas primeiras semanas, as plantas foram recobertas com saco plástico transparente afim de proporcionar alta umidade e reduzir a perda de água (Figura 2B). Após esse período, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação, sendo transferidas para sacos de polietileno (10x15x0,010 cm) contendo terra de subsolo e areia lavada (3:1 v/v) umedecido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de diferentes citocininas e concentrações na multiplicação de *Dendrocalamus asper*

Em todas as concentrações das citocininas testadas verificou-se aumento significativo no número de novos brotos formados em relação ao tratamento controle (Tabela 1). A suplementação do meio com metatopolina (mT) se mostrou o mais eficaz, seguido pelo BAP, para a proliferação de brotos em *D. asper*. No primeiro subcultivo, o maior número de brotos foi observado nas concentrações 3,3 μM de mT e 13,2 μM de BAP com 8,7 brotos. A maior média do número de brotos foi observada no segundo subcultivo, na concentração mais alta dos reguladores (13,3 μM) sendo 13,8 brotos com a mT e 10,7 com BAP.

No terceiro subcultivo, verificou-se uma queda no número de novos brotos formados, independentemente do tipo de citocinina e das concentrações testadas. Nesta etapa, o meio com cinetina (Kn) na concentração de 3,3 μM foi o que proporcionou o maior valor de novos brotos formados (0,6/touceira). Dentro das citocininas não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações para mT e BAP, apenas para Kn.

Banerjee et al. (2011) obtiveram a formação máxima de brotos (14) em *D. asper* quando as brotações axilares geradas foram transferidas para meio de MS líquido contendo 22 μM de BAP e 40 mg L^{-1} de sulfato de adenina. Em *Bambusa vulgaris* “wamin”, a concentração ideal para a máxima multiplicação de brotos (12,5) e crescimento e desenvolvimento da parte aérea foi de 8,8 μM de BAP e 3,72 μM de Kn (ARSHAD; KUMAR; BHATNAGAR, 2005). Nogueira (2018) trabalhando com *Guadua magna* no decorrer de cinco subcultivos, nas concentrações de 6,66 e 13,32 μM de mT chegaram a produzir 20,3 e 21,1 brotos respectivamente.

Tabela 1. Número de brotos, gemas, hastes e altura de plantas de *Dendrocalamus asper* multiplicadas *in vitro* em meio de MS suplementado com variadas concentrações de diferentes citocininas (metatopolina, cinetina e 6-benzilaminopurina) durante três subcultivos.

| Concentração da citocinina (µM) | 1° Subcultivo | | | 2° Subcultivo | | | 3° Subcultivo | | |
|---------------------------------|---------------|-------------|-------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| | mT | Cin | BAP | mT | Cin | BAP | mT | Cin | BAP |
| Número de Brotos | | | | | | | | | |
| 0 | 0,6±0,3 bA | 0,6±0,3 aA | 0,6±0,3 bA | 0±0 cA | 0±0 bA | 0±0 bA | 0±0 aA | 0±0 bA | 0±0 aA |
| 3,3 | 8,7±1,8 aA | 2,6±1,4 aA | 2,6±1,8 abA | 5,4±2,3 bcA | 1,0±0,4 abA | 5,3±5,3 abA | 0,03±0,03 aB | 0,6±0,3 aA | 0±0 aB |
| 6,6 | 5,7±1,2 abA | 2,3±1,2 aA | 3,3±0,9 abA | 6,5±0,6 abA | 5,2±1,5 aA | 3,3±3,3 abA | 0,02±0,02 aB | 0,1±0,1 bAB | 0,26±0,2 aA |
| 13,2 | 6,6±3,3 abA | 3,0±2,0 aA | 8,7±0,9 aA | 13,8±2,3 aA | 6,3±4,9 aB | 10,6±10,6 aAB | 0±0 aA | 0±0 bA | 0,04±0,04 aA |
| Número de Gemas | | | | | | | | | |
| 0 | 38±3,3 aA | 38,0±3,3 aA | 38±3,3 aA | 20,6±1,9 bA | 20,6±1,9 bA | 20,6±1,9 bA | 24,3±1,3 aA | 24,3±1,3 abA | 24,3±1,3 aA |
| 3,3 | 52,6±1,7 aA | 42,7±6,4 aA | 36,6±0,9 aA | 50,2±13 abA | 27,3±4,1 abA | 40±12,3 abA | 15,2±1 bB | 34,7±3,7 aA | 18,2±0,9 abB |
| 6,6 | 41,0±5,0 aA | 43,3±8,0 aA | 35,3±5,9 aA | 41,2±6,5 abA | 36,0±4,7 abA | 54,3±0,3 aA | 11,4±1,5 bC | 24,0±2,1 bA | 15,5±0,7 bB |
| 13,3 | 56,3±2,1 aA | 44,3±6,6 aA | 45±5,5 aA | 63,6±8,1 aA | 51,3±15,5 aA | 68,3±6,6 aA | 17,1±0,7 bA | 13,4±0,9 cB | 13,3±0,7 bAB |
| Número de Hastes | | | | | | | | | |
| 0 | 4,3±0,6 aA | 4,3±0,6 aA | 4,3±0,6 aA | 2,0±0,3 bA | 2,0±0,3 bA | 2,0±0,3 bA | 2,3±0,16 bA | 2,3±0,2 bA | 2,3±0,2 aA |
| 3,3 | 13,0±5,1 aA | 7,0±1,5 aA | 5,6±1,3 aA | 17,6±6,1 aA | 3,5±0,5 abAB | 14,3±6,5 abB | 3,2±0,18 abA | 4,2±0,7 aA | 3,6±0,2 aA |
| 6,6 | 5,3±0,6 aA | 6,3±2,0 aA | 5,0±0,6 aA | 12,0±3,3 abA | 8,6±3,6 abA | 13,3±2,3 abA | 3,2±0,16 abAB | 3,6±0,5 abA | 2,6±0,3 aB |
| 13,3 | 12,0±4,9 aA | 6,3±1,2 aA | 6,6±1,2 aA | 25,4±4,4 aA | 17,3±7,3 aA | 23±3,6 aA | 3,9±0,13 aA | 2,5±0,2 abC | 3,2±0,1 aB |
| Altura (cm) | | | | | | | | | |
| 0 | 10,9±1,1 aA | 10,9±1,1 aA | 10,9±1,1 aA | 11,8±0,6 aA | 11,8±0,6 aA | 11,8±0,6 aA | 12,2±0,71 aA | 12,2±0,7 aA | 12,2±0,7 aA |
| 3,3 | 5,0±0,3 bB | 7,7±0,9 aA | 6,0±1,9 bAB | 4,9±0,3 bB | 8,3±0,8 bA | 4,5±0,2 bB | 5,0±0,06 bB | 8,5±0,8 bA | 5,1±0,2 bB |
| 6,6 | 7,4±0,8 abA | 7,4±0,9 aA | 6,3±0,7 bA | 5,4±0,5 bA | 6,1±0,7 bcA | 5,3±0,6 bA | 4,0±0,16 bC | 7,2±0,3 bcA | 6,2±0,4 bB |
| 13,3 | 5,3±0,5 bA | 6,8±0,9 aA | 6,0±0,2 bA | 5,7±0,4 bA | 4,8±0,8 cA | 5,0±0,2 bA | 4,5±0,14 bB | 6,0±0,5 cA | 5,0±0,2 bB |

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

mT = metatopolina, Cin = cinetina e BAP = 6-benzilaminopurina.

Nesse estudo, o uso da mT na concentração de 13,3 μM garantiu média de 6,8 brotos por touceira a cada 30 dias. Em *Guadua chacoensis* (Rojas), o uso de BAP na concentração de 15 μM resultou em índice de multiplicação de brotos de 1,73 por touceira a cada 30 dias de cultivo (ORNELLAS, 2017).

Com a maior concentração de mT (13,2 μM) foi possível obter uma taxa de multiplicação, ao fim do terceiro subcultivo, de 21 vezes e com a mesma concentração de BAP a taxa de 16 vezes. Resultados semelhantes para o BAP foram observados por Arya et al. (1999) onde observaram multiplicação de 15 a 16 vezes em meio de MS acrescido de 13,2 μM de BAP

Banerjee et al. (2011) trabalhando com *D. asper* verificaram que quanto maior a concentração de BAP menor foi o número de gemas formadas, contrariamente ao observado em nosso trabalho, onde nas concentrações de 3,3 e 13,3 μM obtiveram-se 5,6 e 16 de taxa de multiplicação, respectivamente.

Ao fim do terceiro subcultivo, com a concentração de 13,3 μM de mT obteve-se a formação acumulada de 64 novas hastes, com BAP 48, enquanto que com a cinetina valor máximo foi de 21 hastes. Considerando um número inicial de 3 hastes, a metatopolina, BAP e cinetina apresentaram as seguintes taxas de multiplicação, 21, 16 e 7 vezes, respectivamente

No geral, a mT apresentou os melhores resultados para a multiplicação de *D. asper*. De acordo com Aremu et al. (2012), nos últimos anos as topolinas, especialmente a metatopolina e seus derivados, têm sido empregados para iniciação de cultura e otimização de protocolos, com crescente popularidade e vantagens das topolinas em comparação com outras citocinina, embora os resultados positivos não sejam universais para todas as espécies.

O maior número de hastes no primeiro subcultivo foi observado na concentração 3,3 μM de mT. Apesar disso, não houve diferenças estatísticas significativas entre as concentrações e entre as citocininas. No segundo subcultivo, o número de hastes foi maior na concentração mais alta do regulador (13,2 μM) para as três citocininas e, apesar de não haver diferenças estatísticas significativas entre as concentrações, a mT apresentou maior número de hastes (25,4), enquanto que o tratamento controle apresentou apenas 2 hastes. O terceiro subcultivo apresentou redução geral do número de hastes, sendo a concentração 3,3 μM de Kn a que apresentou maior número 4,14 hastes (Tabela 1).

Para o número de gemas, no primeiro e segundo subcultivo as maiores médias (56,3 mT e 68,3 BAP) foram observadas na maior concentração para as três citocininas (13,2 μM), não havendo diferenças estatísticas significativas entre as citocininas e dentro das concentrações. No terceiro subcultivo o maior número de gemas foi observado na concentração 3,3 μM de Kn com 34,7 gemas, enquanto que para a mT e BAP o maior número foi observado na ausência de regulador com 24,3 gemas.

É importante ressaltar que, assim como observado por Saxena (1990), foi observado que brotos individuais não sobreviveram em meio de cultivo líquido, que oxidaram e morreram. Durante os subcultivos foi observado o escurecimento do meio de cultivo em todas as repetições dos tratamentos, alguns apresentavam tonalidade mais escura e outras mais claras, como pode ser observado na Figura 4A-C.



Figura 4. Plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* em diferentes concentrações de citocininas apresentando meio oxidado e não oxidado. **A e B:** meio de cultivo oxidado apresentando coloração escura e elevado nível de brotações; **C:** Meio de cultivo sem oxidação, recentemente renovado.

De acordo com Mudoí et al. (2013), o escurecimento do meio de cultivo é um problema associado durante cultura *in vitro* de bambu devido à exsudação fenólica, relacionada aos vários subcultivos do material. A renovação do meio de cultivo é essencial para manter o crescimento e vigor da planta, visto que o atraso na subcultura resulta em depleção de nutrientes, bem como acúmulo de compostos tóxicos, mudança de pH, fato que pode resultar na necrose e morte das plantas (SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018).

Em *Bambusa tulda* e *Melocanna baccifera*, regularmente, os rebentos foram transferidos em intervalos de 10 dias, em condições estéreis, para um novo meio de cultivo, a fim de evitar a oxidação fenólica que pode fazer com que os rebentos fiquem amarelados (WAIKHOM; LOUIS, 2014). Em *Bambusa wamin* Arshad, Kumar e Bhatnagar (2005) observaram que intervalos de subcultura de quatro semanas foram adequados e favoreceram melhores resultados produzindo brotos vigorosos, enquanto que intervalos maiores resultaram em necrose dos rebentos.

No cultivo *in vitro* de bambu, parece necessário que o meio de cultivo seja renovado constantemente principalmente na etapa de multiplicação, afim de reduzir a oxidação fenólica, pois o envelhecimento do meio pode ocasionar morte do explante (MUDOÍ et al., 2013; NEGI; SAXENA, 2011). Nas condições avaliadas deste estudo, o meio de cultivo foi renovado a cada 30 dias e, apesar de ocorrer a oxidação fenólica, não foram observados efeitos negativos sobre os brotos.

3.1.2 Dinâmica da metilação de DNA durante ciclos de multiplicação de *Dendrocalamus asper*

Para melhor compreensão da “memória” epigenética dos clones de *Dendrocalamus asper*, realizou-se uma análise da dinâmica de metilação de DNA (% 5-mC – 5 metilcitosina). A metilação do DNA foi analisada ao longo dos subcultivos, comparando-se a planta mãe fornecedora dos brotos iniciais, já estabelecida *in vitro*, e os novos brotos oriundos de três ciclos subsequentes de multiplicação. Conforme a análise verificou-se um pico de metilação de DNA no primeiro subcultivo, seguido de decréscimo gradual nos dois respectivos ciclos de multiplicação (Figura 5).

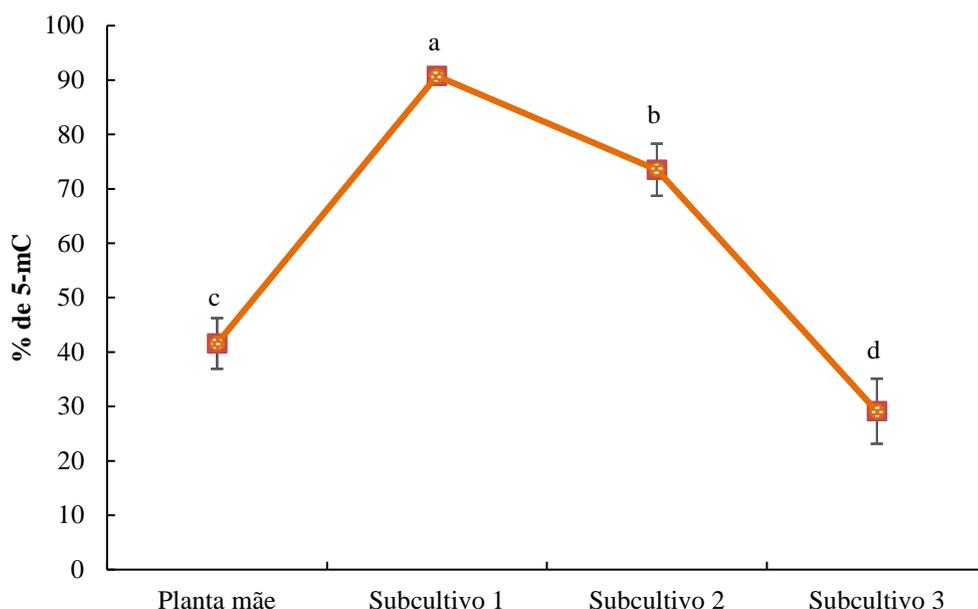


Figura 5. Metilação de DNA (% 5-mC – 5 metilcitosina) durante a micropropagação de *Dendrocalamus asper*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barras representam o desvio padrão.

A metilação de DNA é considerada o evento epigenético mais importante em eucariotos e afeta populações de células meristemáticas e órgãos em desenvolvimento, por meio de processos estáveis e dinâmicos que regulam a expressão gênica (VALLEDOR *et al.*, 2007). Na literatura há relatos referentes às mudanças nos níveis de metilação global de DNA associados não só com as diferentes fases do desenvolvimento da planta e seus respectivos gradientes de maturação (MANKESSI *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012), mas também com eventos relacionados ao cultivo *in vitro* (DUARTE-AKÉ *et al.*, 2016), como rejuvenescimento, habituação (SMULDERS; KLERK, 2011) e mais comumente com a ocorrência de variações somaclonais (VINING *et al.*, 2013).

Ao analisar a dinâmica de metilação de DNA durante a realização de cinco subcultivos de *Araucaria angustifolia*, Duarte-Aké *et al.* (2016) verificaram um padrão de metilação ao longo dos três primeiros subcultivos semelhante ao observado aqui. Contudo, o incremento do nível de metilação de DNA e subsequente decréscimo gradual coincidiu com o surgimento de variação fenotípica em *A. angustifolia*. Tais autores, então, sugeriram que essa mudança no % de 5-mC possa estar relacionada com a ocorrência de variação somaclonal na espécie. Em *D. asper*, por outro lado, não se verificou, nem durante e nem após a realização dos três subcultivos subsequentes, variações fenotípicas que pudessem ser correlacionadas com a dinâmica de metilação de DNA observada. Nesse contexto, Jekayinoluwa *et al.* (2019) enfatizam que nem todo evento epigenético leva a modificações fenotípicas.

Já Parra *et al.* (2001), ao avaliarem os níveis de metilação em subcultivos subsequentes de *Myrtus communis*, diferente do observado aqui, não verificaram diferenças significativas entre os subcultivos, assim como nenhuma relação entre alterações nas taxas de multiplicação e a metilação global de DNA. Nesse trabalho, verificou-se que a queda expressiva na metilação de 5 metilcitosinas coincidiu com a redução no número de brotos obtidos no terceiro subcultivo, como reportando anteriormente (tópico 3.1). A metilação de DNA é caracterizada como uma modificação epigenética responsável pela conformação transcriptional inativa da cromatina (SOLÍS *et al.*, 2012), ou seja, está relacionada com o silenciamento de genes (TARIQ; PASZKOWSKI, 2004). Logo, a hipometilação está relacionada com o maior acesso de fatores de transcrição à fibra da cromatina e, conseqüentemente, com a expressão de um maior número de genes. Nesse sentido, os eventos de hipometilação observados nesse trabalho podem estar relacionados com a expressão de genes negativamente envolvidos com a proliferação e diferenciação celular necessária à formação de novas brotações. Diferentemente do verificado aqui, HardingBenson, Roubelakis-Angelakis (1996) reportaram um incremento expressivo na metilação de DNA ao longo de subcultivos sucessivos de *Vitis vinifera*.

De modo geral, embora haja um consenso do envolvimento da hipometilação com a redução do grau de diferenciação celular (DUARTE-AKÉ *et al.*, 2016) e com a ocorrência de variação somaclonal e da hipermetilação com a diferenciação celular (VALLEDOR *et al.*, 2007), as direções das modificações dos níveis de metilação de DNA (incremento/decréscimo) variam muito entre as espécies e rotas de desenvolvimento avaliadas. Nesse contexto de variabilidade de resultados, é importante mencionar que vários fatores podem alterar o nível de metilação de DNA, tais como presença/ausência reguladores de crescimento, componentes do meio de cultura, idade das linhas celulares, condições

fisiológicas do explante, moléculas secretadas pelos explantes, dentre outros (DUARTE-AKÉ *et al.*, 2016).

3.2 MICORRIZAÇÃO *IN VITRO*

3.2.1 Efeito da redução do fósforo do meio de cultivo sobre a micorrização e desenvolvimento das plantas

De acordo com Choi Summers e Paszkowski (2018), o desenvolvimento da simbiose micorrízica é um processo altamente dinâmico que pode ser dividido em cinco estágios distintos. Elas ocorrem consecutivamente, sendo um processo marcado pela presença concomitante de todas as etapas seguintes: inicialmente ocorre a comunicação pré-simbiótica, seguida pelo contato e penetração, invasão do córtex externo, formação de arbúsculos e formação de vesículas e esporos

Estruturas típicas dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), hifas, esporos e vesículas foram observadas em 16,6% das plantas, apenas nas raízes daquelas cultivadas em meio MSR, (Figura 6). Nos demais tratamentos, a simbiose não se desenvolveu, havendo apenas o início da fase simbiótica, com a formação de apressório, enrolamento das hifas e a presença de esporos próximos à raiz da planta, não havendo, entretanto, penetração do micélio fúngico na região cortical.

O meio MSR apresenta menor quantidade de sais que o meio de MS e isso pode ter afetado a colonização das raízes. De acordo com Becard e Piché (1992), ajustar o meio apropriado para co-cultivar os dois organismos, raízes e fungos, é o fator mais importante para o sucesso da colonização das micorrizas arbusculares. O meio deve ser capaz de permitir um eficiente crescimento das raízes, que necessitam de um meio complexo e rico, e dos FMAs que se desenvolvem em um meio relativamente pobre em nutrientes.

A redução dos níveis de sacarose e fósforo no meio de cultivo também é um fator determinante na conquista de uma colonização bem-sucedida. De maneira geral, o alto nível de fósforo e alta concentração de sacarose no meio é prejudicial aos esporos dos FMAs (BECARD; FORTIN, 1987). Neste trabalho, verificou-se que a redução da sacarose foi eficiente para o processo, propiciando a micorrização de 25% das plantas do tratamento, que apresentaram hifas e esporos intrarradiculares (Figura 7). Além desse tratamento, o com metade dos sais do meio de MS e com a concentração de fósforo reduzida a 0,4% também apresentou indícios de colonização, com hifas e esporos (Figura 7).

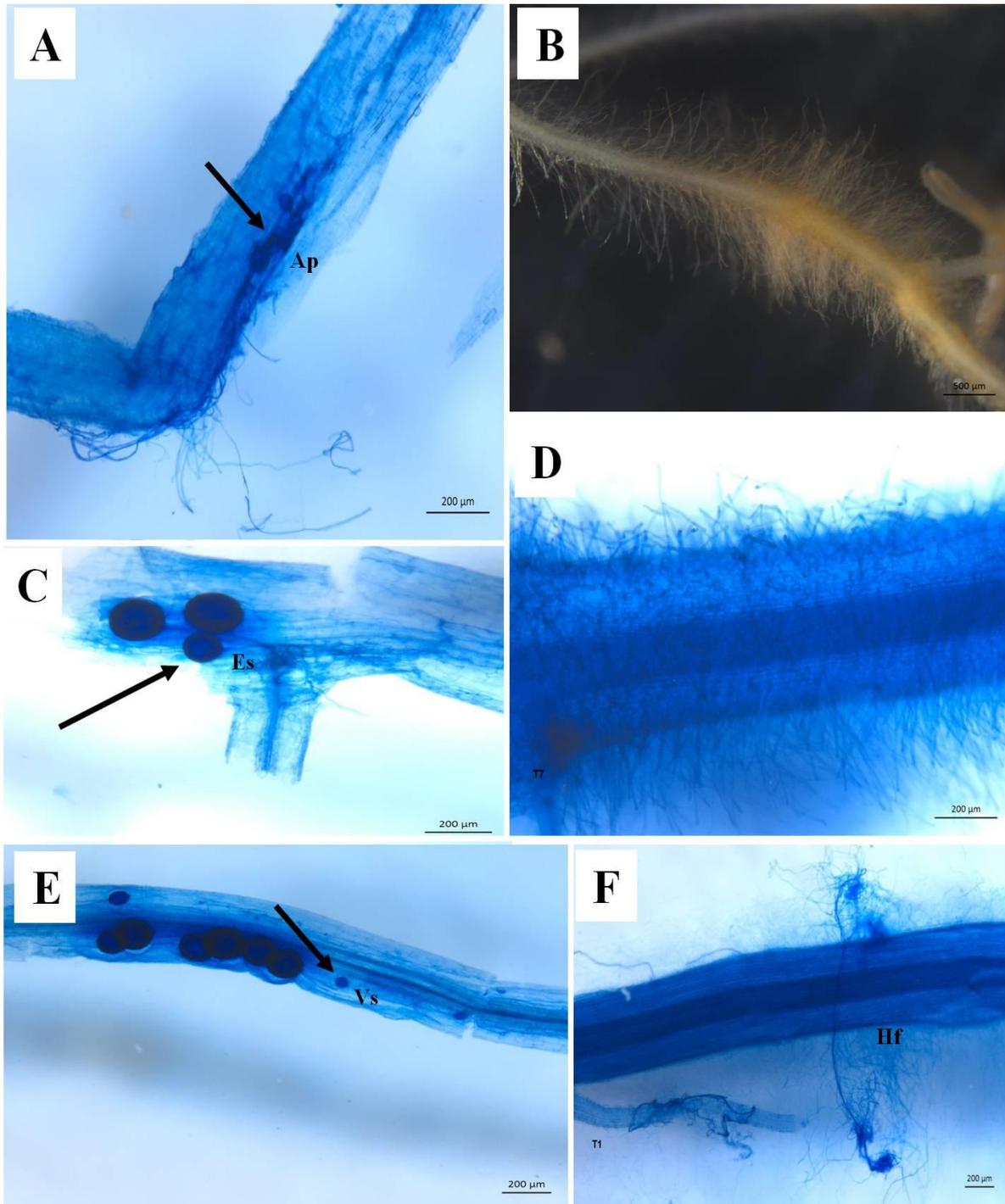


Figura 6. Aspecto de raízes de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) durante a micorrização *in vitro* **A.** Processo de formação do apressório para penetração na raiz. **B.** Raiz não submetida ao processo de diafanização e coloração, mostrando a presença de pelos radiculares. **C-E.** Raiz colonizada com *Rhizoglyphus clarum*, mostrando as estruturas de colonização do fungo. **D.** Raiz sem inoculação de fungo (controle). **F.** Emaranhado de hifas em volta da raiz. Ap: Apressório; Es: esporos; Hf: hifa; Vs: vesícula. Barras: A, C, D, E: 200 µm; B: 500 µm.

Os resultados mostram que a micorrização *in vitro* de *D. asper* é possível, embora apresente algumas dificuldades, pois a micorrização não ocorreu de forma ampla. Estudos mostram que algumas espécies de plantas são mais aptas a micorrização do que outras, pois espécies responsivas tendem a ter raízes mais engrossadas e menos pêlos radiculares. Além disso, os inóculos de FMAs diferem em sua capacidade de beneficiar as plantas e, tanto as espécies de plantas, quanto as condições ambientais podem modificar essa situação (HAZARIKA, 2006).

Arya e Verma (1998), ao realizarem a inoculação de FMAs em plantas micropropagadas de *D. asper* na fase de aclimatização, usaram isolados de várias espécies provenientes da rizosfera do solo de bambu e teca e verificaram que os resultados mais eficazes foram com os fungos provenientes da rizosfera de bambu. Estes autores supõem que pode haver alguma preferência ou especificidade fisiológica do hospedeiro com os FMAs. Pouyu-Rojas et al. (2006) encontraram resultados do comportamento das diferentes combinações fungo-hospedeiro e indicaram a existência de certa seletividade entre estes organismos, havendo relações preferenciais ou discriminatórias em certas combinações.

De acordo com Vestberg *et al.* (2002), vários fatores podem afetar o sucesso da inoculação de FMA em micropropagações, como tempo e método de inoculação, eficiência da cepa de FMA, receptividade micorrízica da espécie vegetal, além de fatores ambientais como luz e umidade.

Assim, sugere-se o teste com outras estirpes de FMAs para definir a estirpe do fungo micorrízico que garanta a colonização ampla das plantas, bem como melhor desenvolvimento e adaptação a mudança do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. Ressalte-se que o resultado da simbiose parece ser determinado por interações entre plantas, os FMAs e as condições ambientais (SMITH *et al.*, 2011).

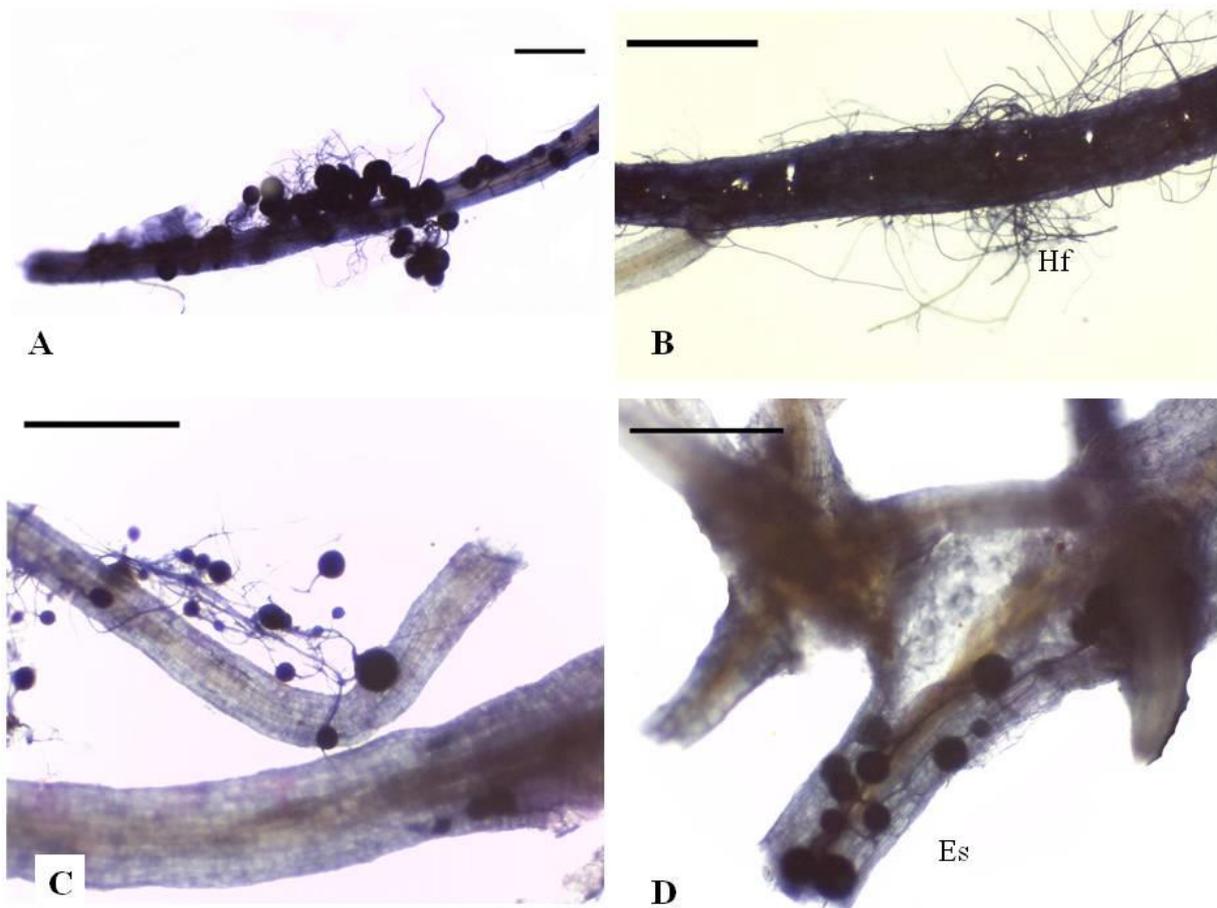


Figura7. Aspecto de raízes de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) durante a micorrização *in vitro*. **A.** Amostra de raiz de planta proveniente do meio de MS com metade dos sais e 25% de sacarose, apresentando hifas e esporos intrarradiculares; **B.** Amostra de raiz com hifas enroladas; **C.** Raiz apresentando hifas e esporos no exterior; **D.** Raiz de plantas proveniente do meio de MS com metade dos sais e 0,4% de fósforo, apresentando aglomerado de hifas e esporos intrarradiculares. **Es:** esporos; **Hf:** hifas. Escala: A-D: 500 μ m.

Quanto ao desenvolvimento das plantas, pode-se observar na Tabela 2 que, de acordo com os parâmetros avaliadas, a redução do fósforo do meio de cultivo não o afetou de forma negativa. Os números de hastes foram semelhantes em todos os tratamentos, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre eles e a mudança de ambiente também não influenciou o número de hastes.

A altura caulinar de forma geral não foi influenciada pelos tratamentos e pela mudança de ambiente, apenas o tratamento MSR+ inóculo do ambiente *in vitro*, apresentou altura inferior estatisticamente significativa dos demais ambientes.

Em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro*, Russowski e Nicoloso (2003) obtiveram crescimento máximo em altura das plantas com a concentração de 60% de KH_2PO_4 no meio de cultivo MS. Kurita (2011) trabalhando com bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, reduziu o fósforo (KH_2PO_4) do meio de cultivo de MS, obtendo resultados que mostraram que nas menores concentrações de P as plantas cresceram menos. Já a partir da concentração de 0,60 mM de P, que corresponde aos 50% de P no nosso estudo, elas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso

Em relação ao número de raízes formadas observa-se na Tabela 2 que, na ausência de fósforo, houve redução do número de raízes com a transição de ambiente, e as médias foram diferentemente significativas estatisticamente. Para as demais concentrações não foram observadas diferenças estatísticas significativas com a transição de ambiente.

In vitro, as plantas apresentaram maior número de raízes com a ausência de fósforo, e menor número no meio MSR sem adição do inóculo. Apesar disso, não houve diferenças estatísticas significativas do meio de cultivo ausente de fósforo com os meios nas concentrações (50%, 75%, 100%) de KH_2PO_4 , MS+mT e MSR sem inóculo. Já o meio MSR sem inóculo não diferiu estatisticamente dos meios com as concentrações de 25% e 75% de KH_2PO_4 . Com a transferência de ambiente, as maiores médias foram observadas no tratamento do meio MS+mT que não diferiu estatisticamente dos meios com 0%, 25%, 50%, 75% de KH_2PO_4 . As menores médias foram observadas no meio MSR sem inóculo, que não diferiu estatisticamente dos meios 0%, 75% e 100% de KH_2PO_4 , além do MSR com inóculo.

O aumento do número de raízes pode ser explicado pela mobilidade do fósforo no solo. De acordo com Da Silva & Delatorre (2009), o fósforo possui mobilidade muito baixa no solo. A redução desse elemento causa aumento na densidade de raízes laterais e de pêlos radiculares, promovendo aumento da área superficial de absorção da raiz permitindo que esta explore um volume maior do solo (MA *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2011;ALMARIO *et al.*, 2017).

No experimento, o fósforo na forma de KH_2PO_4 no meio de cultivo foi reduzido, visando habilitar a formação da simbiose, pois o teor de *P* interno nas plantas controla a formação simbiose micorrízica, seu desenvolvimento e extensão (JAVOT, PENMETSA *et al.*, 2007; GUTJAHR, PARNISKE, 2017; CHOI, SUMMERS, *et al.*, 2018,). Com a simbiose, os FMAs recebem fotoassimilados e fornecem fósforo à planta (JAVOT, PENMETSA *et al.*, 2007; KIERS, DUHAMEL *et al.*, 2011). Altos níveis de fósforo inibem a simbiose devido o pleno acesso da planta ao nutriente (CHOI; SUMMERS; PASZKOWSKI, 2018).

Tabela 2. Parâmetros de crescimento de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) submetidas a tratamentos de micorrização.

| Tratamentos | Ambientes | | | | | | | | |
|--|------------------|------------|-------------------|-----------------|-------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------------|
| | <i>In vitro</i> | B.O.D. | Casa de Vegetação | <i>In vitro</i> | B.O.D. | Casa de Vegetação | <i>In vitro</i> | B.O.D. | Casa de vegetação |
| | Número de hastes | | | Altura (cm) | | | Número de Raízes* | | |
| MS + 0% de KH ₂ PO ₄ | 4,3±1,5 aA | 4,0±1,8 aA | 5,3±1,5 aA | 9,6±2,5 aA | 10±1,4 aA | 11,5±3,5 aA | 24,0±7,2 aA | 11,0±3,6 abcB | n/a |
| MS + 25% de KH ₂ PO ₄ | 3,6±1,1 aA | 3,6±2,0 aA | 5,0±1,0 aA | 9,6±2,7 aA | 13±2,7 aA | 13,5±3,0 aA | 17,7±2,5 abA | 21,0±1,7 abA | n/a |
| MS + 50% de KH ₂ PO ₄ | 5,3±1,5 aA | 4,0±2,0 aA | 6,0±1,7 aA | 8,5±0,6 aA | 10,5±1,2 aA | 10,0±2,5 aA | 23,6±3,0 aA | 21,0±4,6 abA | n/a |
| MS + 75% de KH ₂ PO ₄ | 3,0±0,0 aA | 3,3±0,6 aA | 5,3±1,5 aA | 9,2±1 aA | 11,7±0,5 aA | 9,3±1,5 aA | 15±4,6 abA | 14,6±4,5 abcA | n/a |
| MS + 100% de KH ₂ PO ₄ | 3,6±0,6 aA | 4,3±0,6 aA | 4,3±0,6 aA | 8,5±1,8 aA | 9,4±0,9 aA | 12,3±3,3 aA | 19,0±1,0 aA | 10,3±0,6 bcA | n/a |
| MS + mT | 5,0±1,0 aA | 5,0±1,0 aA | 5,0±2,0 aA | 8,2±0,7 aA | 9,2±1,8 aA | 11,4±4,8 aA | 20,3±3,2 aA | 22,3±6,7 aA | n/a |
| MSR inóculo (-) | 2,3±0,6 aA | 3,3±0,6 aA | 3,3±0,6 aA | 9,2±3,1 aA | 12±0,9 aA | 13,4±2,8 aA | 7,3±1,5 bA | 8,7±4,2 cA | n/a |
| MSR inóculo (+) | 6,3±1,5 aA | 4,3±1,1 aA | 3,6±0,6 aA | 5,3±1,0 aB | 9,0±2,0 aAB | 11,6±1,8 aA | 19±5,6 aA | 9,0±3,6 cA | n/a |

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

* n/a: não avaliado. A variável número de raízes em casa de vegetação não foi avaliada em razão do alto número de raízes formadas neste ambiente que originaram emaranhados de raízes, dificultando a contagem.

MS: Meio de Murashige e Skoog (1962); MSR: meio Strullu-Romand (1986; 1987); mT: metatopolina.

B.O.D.:

Biochemical

Oxygen

Demand

3.2.2 Teores de clorofila *a*, *b* e carotenóides

Os dados de clorofila e carotenoides são apresentados na Tabela 3. Na fase *in vitro*, os teores de clorofila *a* foram menores para os tratamentos MSR com inóculo, MS sem fósforo e MS com mT, apresentando médias significativamente diferentes e inferiores aos demais tratamentos. O tratamento MSR sem inóculo, apresentou a maior média, no entanto, não diferiu estatisticamente dos tratamentos (25%, 50%, 75% e 100%) de fósforo. Com a transição para o ambiente *ex vitro* na etapa de pré aclimatização em B.O.D, a menor concentração dos teores de clorofila *a* foram observados nos tratamentos com (0%, 50%) de Fósforo e MSR sem inóculo, e os maiores teores foram observados nos tratamentos com 25% e 75% de fósforo. Em casa de vegetação, a maior média do teor de clorofila *a* foi observada no tratamento com 75% de fósforo. Apesar disso, não houve diferenças estatísticas significativas entre os demais tratamentos.

A clorofila *b* apresentou maiores teores *in vitro* nos tratamentos com 50% e MSR sem inóculo, e os menores foram observados no tratamento com 0%, 25% de fósforo e MS+mT. Em câmara de crescimento tipo B.O.D., a maior média foi observada no tratamento com 25% de fósforo, e a menor no meio MSR sem inóculo. Entre esses dois tratamentos houve diferenças estatísticas significativas, enquanto os demais foram considerados iguais estatisticamente aos dois tratamentos. Em casa de vegetação o maior teor foi observado no tratamento com 75% de fósforo e o menor no meio MS+mT, com diferenças estatísticas significativas entre eles. Os demais foram considerados iguais aos dois tratamentos estatisticamente.

Os teores de carotenoides *in vitro* foram maiores no meio MSR sem inóculo, e menor no meio MS+mT, esses dois foram considerados estatisticamente diferentes, no entanto foram considerados iguais aos demais tratamentos. Ao transferir para BOD, as maiores médias foram observadas nos meios com 25% e 75% de fósforo, sendo estes considerados iguais estatisticamente aos tratamentos com 100% de fósforo, MS+mT e MSR+inóculo. Os menores teores foram observados nos tratamentos com 0% ,50% de fósforo e MSR sem inóculo. Em casa de vegetação os maiores teores foram observados no tratamento com 75% de fósforo e os menores nos tratamentos com 0% de fósforo e MSR +inóculo.

Em relação ao ambiente, destaca-se que os teores de clorofila e carotenoides aumentaram com a transição de ambiente e foram estatisticamente inferiores no ambiente *in vitro*, e superiores em BOD e casa de vegetação. Ressalta-se que *in vitro* os tratamentos com menores teores de clorofilas e carotenoides foram os tratamentos com 0% de fósforo e

MS+mT. Com a transferência para a B.O.D., os tratamentos com 50% de fósforo e MSR sem inóculo apresentaram os menores teores. Em casa de vegetação o tratamento com 75% de fósforo destacou-se com os maiores teores de clorofilas e carotenoides.

Pigmentos fotossintéticos, como clorofilas *a*, *b* e carotenoides desempenham um papel central na reação à luz do processo fotossintético capturando energia solar a ser usada para fixação de CO₂ (SINGH et al., 2019). KURITA (2011) reduziu o fósforo do meio de cultivo MS para cultivar Bromélias e com a análise dos resultados foi possível verificar que a alteração na concentração de P nos meios de cultura não afetou a quantidade dos pigmentos fotossintéticos. Já Silva *et al.* (2010), em cafeeiros ao reduzir o fósforo do solo verificaram que o tratamento com redução de P influenciou negativamente a fotossíntese e levou à restrição do crescimento das plantas.

Neste trabalho, a redução do fósforo do meio de cultura não provocou reduções drásticas nos teores de clorofilas e carotenoides das plantas nas etapas analisadas, não provocando quedas expressivas nos valores dessas variáveis e, conseqüentemente, não alterou o desenvolvimento das plantas. Isso é sustentado pela sobrevivência de 100% delas. Portanto, as alterações nos pigmentos analisados em função da redução de fósforo, provavelmente, não comprometeram a qualidade fisiológica das mudas.

Tabela3. Teores de Clorofilas *a*, *b* e carotenoides em mL/cm³ nas fases *in vitro*, pré-aclimatização (B.O.D.) e aclimatização de mudas de *Dendrocalamus asper* submetidas à redução do fósforo (P) em meios de MS e MSR.

| Tratamentos | <i>In vitro</i> | B.O.D. | Casa de vegetação |
|--|------------------|------------------|-------------------|
| Clorofila a | | | |
| MS + 0% de KH ₂ PO ₄ | 0,15±0,03 cdB | 0,26±0,02 bA | 0,28±0,03 aA |
| MS + 25% de KH ₂ PO ₄ | 0,21±0,02 abcB | 0,33±0,01 aA | 0,31±0,02 aA |
| MS + 50% de KH ₂ PO ₄ | 0,22±0,02 abB | 0,25±0,01 bAB | 0,30±0,01 aA |
| MS + 75% de KH ₂ PO ₄ | 0,24±0,02 abB | 0,33±0,02 aA | 0,34±0,11 aA |
| MS + 100% de KH ₂ PO ₄ | 0,23±0,02 abB | 0,29±0,03 abA | 0,31±0,02 aA |
| MS + mT | 0,14±0,01 dB | 0,28±0,02 abA | 0,30±0,03 aA |
| MSR inóculo (-) | 0,26±0,07 aAB | 0,25±0,02 bB | 0,31±0,01 aA |
| MSR inóculo (+) | 0,19±0,01 bcdB | 0,27±0,01 abA | 0,29±0,01 aA |
| Clorofila b | | | |
| MS + 0% de KH ₂ PO ₄ | 0,03±0,01 bcB | 0,07±0,005 abA | 0,08±0,005 abA |
| MS + 25% de KH ₂ PO ₄ | 0,06±0,01 abB | 0,09±0,01 abA | 0,1±0,01 abA |
| MS + 50% de KH ₂ PO ₄ | 0,05±0,01 abcB | 0,1±0,01 abA | 0,09±0,01 abA |
| MS + 75% de KH ₂ PO ₄ | 0,06±0,01 aA | 0,07±0,01 abA | 0,08±0,01 abA |
| MS + 100% de KH ₂ PO ₄ | 0,06±0,005 abB | 0,09±0,005 abA | 0,11±0,0 aA |
| MS + mT | 0,03±0,01 cB | 0,08±0,005 abA | 0,08±0,00 bA |
| MSR inóculo (-) | 0,06±0,03 aA | 0,07±0,01 bA | 0,08±0,01 abA |
| MSR inóculo (+) | 0,03±0,005 bcB | 0,07±0,005 abAB | 0,08±0,01 abA |
| Carotenoides | | | |
| MS + 0% de KH ₂ PO ₄ | 0,007±0,002 abB | 0,025±0,0027 bA | 0,0277±0,0029 bA |
| MS + 25% de KH ₂ PO ₄ | 0,01±0,0009 abB | 0,028±0,0026 abA | 0,0295±0,0021 abA |
| MS + 50% de KH ₂ PO ₄ | 0,009±0,001 abB | 0,032±0,0016 aA | 0,0294±0,0016 abA |
| MS + 75% de KH ₂ PO ₄ | 0,009±0,0004 abC | 0,024±0,0016 bB | 0,0286±0,0016 abA |
| MS + 100% de KH ₂ PO ₄ | 0,01±0,0008 abB | 0,032±0,0015 aA | 0,033±0,001 aA |
| MS + mT | 0,006±0,0007 bB | 0,027±0,0026 abA | 0,03±0,0036 abA |
| MSR inóculo (-) | 0,01±0,003 aC | 0,025±0,0023 bB | 0,03±0,0011 abA |
| MSR inóculo (+) | 0,008±0,0007 abB | 0,027±0,0015 abA | 0,027±0,0015 bA |

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

MS: Meio de Murashige e Skoog (1962); MSR: meio Strullu-Romand (1986; 1987); mT: metatopolina.

B.O.D.:

Biochemical

Oxygen

Demand.

4 CONCLUSÕES

- Este estudo desenvolveu um protocolo de micropropagação de *Dendrocalamus asper* com uso de citocininas, sendo recomendado o uso de 13,32 μM de metatopolina para a multiplicação da espécie;
- A dinâmica de metilação de DNA (% 5-mC – 5 metilcitosina) durante a realização dos subcultivos revelou uma possível relação da ocorrência de hipometilação com o decréscimo na taxa de multiplicação após três subcultivos;
- A redução do fósforo do meio de cultivo não interfere de forma negativa no desenvolvimento de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper*. No entanto, não propicia de forma ampla a colonização micorrízica das raízes nesta espécie. Enfatiza-se que a micorrização *in vitro* de *D. asper* parece ser possível, pois até 25% das plantas foram micorrizadas. No entanto, ainda são necessários ajustes, tanto no meio de cultivo como na estirpe do fungo micorrízico arbuscular para que se alcance taxas mais expressivas de micorrização.

ANEXO 1

Composição do Meio MS

| Macronutrientes | | |
|---------------------------------------|---|-----------------------------------|
| Composto | <i>stock x10</i> (mg l ⁻¹) | Conc. final (mg l ⁻¹) |
| NH ₄ NO ₃ | 16500 | 1650 |
| KNO ₃ | 19000 | 1900 |
| Ca Cl ₂ .2H ₂ O | 4400 | 440 |
| KH ₂ PO ₄ | 1700 | 170 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 3700 | 370 |
| Micronutrientes | | |
| Composto | <i>stock x100</i> (mg l ⁻¹) | Conc. final (mg l ⁻¹) |
| Mn SO ₄ .7H ₂ O | 2230 | 22.3 |
| H ₃ BO ₃ | 620 | 6.2 |
| CuSO ₄ . 5H ₂ O | 2.5 | 0.025 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 2.5 | 0.025 |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 25 | 0.25 |
| KI | 83 | 0.83 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 860 | 8.6 |
| Vitaminas | | |
| Composto | <i>stock x500</i> (mg l ⁻¹) | Conc. final (mg l ⁻¹) |
| Tiamina -HCl | 0.02 | 0.1 |
| Ac. Nicotínico | 0.10 | 0.5 |
| Piridoxina-HCl | 0.10 | 0.5 |
| Glicina | 0.40 | 2.0 |
| Mio-inositol | 20 | 100 |

Fonte: (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

Para cada litro de meio para obter a concentração final desejada usa-se 10ml da solução stock de macronutrientes, 1ml de micronutrientes e 5ml de vitaminas.

ANEXO 2

Composição MSR

| COMPOSTOS | Concentração mg.L-1 |
|--|---------------------|
| MgSO ₄ ..7 H ₂ O | 739 |
| KNO ₃ | 76 |
| KCl | 65 |
| KH ₂ PO ₄ | 4.1 |
| Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O | 359 |
| Sucrose | 10000 |
| NaFeEDTA | 8 |
| MnSO ₄ .4 H ₂ O | 2.45 |
| ZnSO ₄ . 7 H ₂ O | 0.29 |
| H ₃ BO ₃ | 1.86 |
| CuSO ₄ . 5 H ₂ O | 0.24 |
| Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O | 0.0024 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O | 0.035 |
| Thiamine hydrochloride | 1 |
| Pyridoxine hydrochloride | 0.9 |
| Nicotinic acid | 1 |
| Calcium pantothenate | 0.9 |
| Biotine | 1 10 ⁻³ |
| Cyanocobalamine | 0.4 |
| Phytigel | 2000 |

Fonte: (STRULLU & ROMAND 1987)

5 REFERENCIAS

- ALMARIO, Juliana *et al.* Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabis alpina* and its contribution to plant phosphorus nutrition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Cologne, v. 114, n. 44, p. E9403–E9412, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1710455114>
- ANTONIOLLI, Zaida Ines; KAMINSKI, João. **Micorrizas**. Santa Maria, p. 441–455, 1992.
- AREMU, Adeyemi O. *et al.* Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Scottsville, v. 108, n. 1, p. 1–16, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>
- ARSHAD, Sheeba M.; KUMAR, A.; BHATNAGAR, Subodh K. Micropropagation of *Bambusa wamin* through shoot proliferation of mature nodal explants. **Journal of Biological Research**, Kanpur, v. 3, n. 1962, p. 59–66, 2005.
- ARYA, Inder Dev; SATSANGI, Richa; ARYA, Sarita. Rapid Micropropagation of Edible Bamboo *Dendrocalamus asper* Rapid Micropropagation of Edible Bamboo *Dendrocalamus asper*. **Journal of Sustainable Forestry**, Dehradun, v. 14, n. January 2002, p. 103–114, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1300/J091v14n02>
- ARYA, S. *et al.* Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, Dehra Dun-India, v. 18, p. 879–882, 1999.
- BAIRU, Michael W. *et al.* Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: Can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Scottsville, v. 90, n. 1, p. 15–23, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9233-4>
- BANERJEE, Maitreyi; GANTAIT, Saikat; PRAMANIK, Binay Ray. A two step method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Kolkata, v. 17, n. 4, p. 387–393, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0088-0>
- BECARD, Guillaume; FORTIN, J. .. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytol**, Quebec, v. 108, p. 211–218, 1987.

BECARD, Guillaume; PICHÉ, Yves. Establishment of Vesicular-arbuscular Mycorrhiza in Root Organ Culture : Review and Proposed Methodology. *In*: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. W. (org.). **Methods in microbiology**. U.S. ed. London: Academic Press INC., 1992. v. 24p. 89–108. *E-book*.

BRAULT, Mathias; MALDINEY, Régis. Mechanisms of cytokinin action. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 37, n. 5, p. 403–412, 1999.

CAVALCANTE, Uided Maaze *et al.* RESPOSTAS FISIOLÓGICAS EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO (*PASSIFLORA EDULIS SIMS. F. FLAVICARPA DEG.*) INOCULADAS COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO. [*S. l.*], v. 15, n. 3, p. 379–390, 2001.

CHENG, Lingyun *et al.* Update on white lupin cluster root acclimation to phosphorus deficiency. **Plant Physiology**, Minnesota, v. 156, n. 3, p. 1025–1032, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175174>

CHOI, Jeongmin; SUMMERS, William; PASZKOWSKI, Uta. Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. **Annual Review of Phytopathology**, [*S. l.*], v. 56, n. 1, p. 135–160, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035521>

CLARK, L. ...; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. Bamboo Taxonomy and Habitat. *In*: LIESE, W.; KOHL, M. (org.). **Bamboo**. 1. ed. Switzerland: Tropical Forestry, 2015. v. 10p. 91. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14133-6>

DA SILVA, Adriano Alves; DELATORRE, Carla Andréa. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. [*S. l.*], p. 152–163, 2009.

DUARTE-AKÉ, Fátima *et al.* Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in agave angustifolia haw. Albino variant somaclones during the micropropagation process. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 35, n. 12, p. 2489–2502, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2049-0>

FOLLI-PEREIRA, Muriel Silva *et al.* Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de ciências do solo**, Viçosa-MG, v. 36, n. 6, p. 1663–1679, 2012.

GUTJAHR, Caroline; PARNISKE, Martin. Cell Biology: Control of Partner Lifetime in a Plant–Fungus Relationship. **Current Biology**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. R420–R423, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.020>

HARDING, K.; BENSON, Erica E.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, Kalliope A. Methylated DNA changes associated with the initiation and maintenance of *Vitis vinifera* in vitro shoot and callus cultures: A possible mechanism for age-related changes. **Vitis**, Germany, v. 35, n. 2, p. 79–85, 1996.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Holanda, v. 108, p. 105–120, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>

HUANG, Huang *et al.* Variations in leaf morphology and DNA methylation following in vitro culture of *Malus xiaojinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Holanda, v. 111, n. 2, p. 153–161, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0179-9>

JAVOT, Hélène *et al.* A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 1720–1725, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0608136104>

JEKAYINOLUWA, Temitope *et al.* Agromorphologic, genetic and methylation profiling of *Dioscorea* and *Musa* species multiplied under three micropropagation systems. **PLOS ONE**, United States, v. 14, n. 5, p. 1–17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216717>

KAPOOR, Rupam; SHARMA, Deepika; BHATNAGAR, A. K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. **Science Horticulturae**, Netherlands, v. 116, p. 227–239, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.02.002>

KARIM, Rezaul *et al.* Expression and DNA methylation of SERK , BBM , LEC2 and WUS genes in in vitro cultures of *Boesenbergia rotunda* (L .) Mansf . **Physiol Mol Biol Plants**, India, 2018.

KIERS, E. Toby *et al.* Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. **Science**, [S. l.], v. 333, n. 6044, p. 880–882, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1208473>

KOFFI, Marie Chantal; DECLERCK, Stéphane. In vitro mycorrhization of banana (*Musa acuminata*) plantlets improves their growth during acclimatization. **In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant**, United States, p. 265–273, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9666-0>

KURITA, FLÁVIA MARIA KAZUE. **Crescimento in vitro da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio , fósforo , potássio e cálcio Crescimento in vitro da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de ni.** 2011. - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

MA, Z. *et al.* Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, Reino Unido, v. 24, p. 459–467, 2001.

MANKESSI, François *et al.* Variations of DNA methylation in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot tips and apical meristems of different physiological ages. **Physiologia Plantarum**, United Kingdom, p. 178–187, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01491.x>

MORAN, Rami; PORATH, Dan. Chlorophyll Determination in Intact Tissues Using N , N-Dimethylformamide. [S. l.], p. 478–479, 1980.

MUDOI, Kalpataru Dutta *et al.* Micropropagation of important bamboos : A review. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 12, n. 20, p. 2770–2785, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJB12.2122>

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. **PHYSIOLOGIA PLANTARUM**, United Kingdom, v. 15, p. 473–497, 1962.

NEGI, Divya; SAXENA, Sanjay. Micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb . through axillary shoot proliferation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, United States, v. 47, p. 604–610, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9403-2>

NOGUEIRA, Jênifer Silva *et al.* Micropropagação de bambu em larga- escala: princípios, estratégias e desafios. *In:* FERNANDES, Thaís (org.). **Bambus no Brasil da biologia à tecnologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: ICH - Instituto Ciência Hoje, 2017. p. 103–129. *E-book*.

NOGUEIRA, Jênifer Silva. **ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO EX SITU DE *Dendrocalamus asper* E MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guadua* (BAMBUSOIDEAE, POACEAE)** Orientador: 2018. - Brasília, [s. l.], 2018.

ORNELLAS, Thiago Sanches. **Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson**. 2017. - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

PARRA, R. *et al.* Effect of in vitro shoot multiplication and somatic embryogenesis on 5-methylcytosine content in DNA of *Myrtus communis* L. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 33, n. 2, p. 131–136, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1017571911028>

POUYU-ROJAS, Enrique; SIQUEIRA, José Oswaldo; DONIZETTI SANTOS, José Geraldo. COMPATIBILIDADE SIMBIÓTICA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES COM ESPÉCIES ARBÓREAS TROPICAIS. **Revista Brasileira de ciências do solo**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 413–424, 2006.

PRUTPONGSE, P.; GAVINLERTVATANA, P. In Vitro Micropropagation of 54 Species from 15 Genera of Bamboo. **HORTSCIENCE**, United States, v. 27, n. 5, p. 453–454, 1992.

RUSSOWSKI, Denise; NICOLOSO, Fernando Teixeira. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata*(Spreng.) Pedersen] cultivadas in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 57–63, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0103-84782003000100009>

SANDHU, Manpreet; WANI, Shabir H.; JIMÉNEZ, Víctor M. In vitro propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation : a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 132, n. 1, p. 27–53, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1325-1>

SAXENA, Sanjay. In vitro propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, Germany, p. 431–434, 1990.

SILVA, Leandro *et al.* Fotossíntese , relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília-DF, v. 45, n. 1, p. 965–972, 2010.

SINGH, S. K. *et al.* photosynthesis , chlorophyll fluorescence , and nutrient efficiency Interactive effects of temperature and phosphorus nutrition on soybean : leaf photosynthesis , chlorophyll fluorescence , and nutrient efficiency. **Photosynthetica**, Czech Republic, v. 57, n. 1, p. 248–257, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.32615/ps.2019.036>

SINGH, Sharbati R. *et al.* Micropropagation of *Dendrocalamus asper* { Schult . & Schult . /*S. l.*}, v. 21, n. 2, p. 220–228, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0095-9>

SINGH, Sharbati R. *et al.* Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo-a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Haryana, India, v. 19, n. 1, p. 21–41, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0147-1>

SIQUEIRA, José Osvaldo. **MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA AGRICOLA**. Brasília-DF: [s. n.], 1994. *E-book*.

SMITH, Sally E. *et al.* Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition : Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition 1. **Plant Physiology**, United States, v. 156, n. July, p. 1050–1057, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>

SMULDERS, M. J. ..; KLERK, G. J. d. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regul**, Wageningen,Netherlands, v. 63, p. 137–146, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9531-4>

SOLÍS, María-teresa; CANO, Vanesa; RISUEÑO, María C. 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation , but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. **Plant Science**, Madrid,Spain, v. 6, n. June, p. 1–17, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00472>

SOLÍS, Maria Teresa *et al.* DNA methylation dynamics gene expression In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA changes during pollen reprogramming to methylation and stress-induced chromatin patterning embryogenesis. **Experimental Botany**, United Kingdom, v. 63, n. 18, p. 6431–6444, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/err313>

SUN, Run-ze *et al.* A role of age-dependent DNA methylation reprogramming in regulating the regeneration capacity of *Boea hygrometrica* leaves. **Functional & Integrative Genomics**, Germany, p. 133–149, 2020.

TARIQ, Muhammad; PASZKOWSKI, Jerzy. DNA and histone methylation in plants. **TRENDS in Genetics**, Netherlands, v. 20, n. 6, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.04.005>

VALLEDOR, Luis *et al.* Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 91, n. 2, p. 75–86, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9262-z>

VERMA, Rishabh Kumar; ARYA, Inder Dev. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates and organic manure on growth and mycorrhization of micropropagated *Dendrocalamus asper* plantlets and on spore production in their rhizosphere. **Mycorrhiza**, Jabalpur, p. 113–116, 1998.

VESTBERG, M. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and micropropagation of high value crops. **Mycorrhizal Technology in Agriculture**, Verlag,Switzerland, p. 223–233, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8117-3_18

VINING, Kelly *et al.* Methylome reorganization during in vitro dedifferentiation and regeneration of *Populus trichocarpa*. **BMC Plant Biology**, United Kingdom, v. 13, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-92>

WAIKHOM, Sayanika Devi; LOUIS, Bengyella. An Effective Protocol for Micropropagation of Edible Bamboo Species (*Bambusa tulda* and *Melocanna baccifera*) through Nodal Culture. [*S. l.*], v. 2014, 2014.

ZHU, Tingting *et al.* Target of Rapamycin Regulates Genome Methylation Reprogramming to Control Plant Growth in *Arabidopsis*. **Frontiers in Genetics**, United States, v. 11, n. March, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00186>

CAPITULO II

EFEITO DE SUBSTRATOS, CAPACIDADE DE MICORRIZAÇÃO E PLASTICIDADE ANATÔMICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

EFEITO DE SUBSTRATOS, CAPACIDADE DE MICORRIZAÇÃO E PLASTICIDADE ANATÔMICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de substratos e a capacidade de micorrização das plantas, bem como adaptação anatômica na aclimatização de mudas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae). Como tratamentos foram utilizados três substratos: 1) Bioplant® + areia (1:1 v/v); 2) Carolina Soil® + areia (1:1 v/v), e; 3) terra de subsolo. Aos substratos foram ainda combinados ou não o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Rhizoglyphus clarum*, totalizando seis tratamentos. Para a micorrização, cerca de 20 gramas do FMA foi inoculado por planta na aclimatização. Antes do transplante das mudas para o ambiente *ex vitro*, estas foram mantidas em sala de cultura, em meio de MS suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de Metatopolina, sob fotoperíodo de 16 horas, luminosidade de 100 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25±2°C. As avaliações foram realizadas a cada 30 dias, num total 90 dias. As variáveis avaliadas foram altura (cm), número de hastes, além da avaliação de raízes das plantas quanto a colonização com o FMA. Para verificar as adaptações anatômicas das mudas nos diferentes ambientes, amostras de folhas e raízes foram coletadas de plantas em ambiente *in vitro* e *ex vitro*. Adicionalmente, mensurou-se a área foliar das plantas antes e durante a aclimatização. Verificou-se a colonização do fungo em 10% das plantas micropropagadas de *D. asper* durante a aclimatização em substrato Bioplant®+Areia. Nos demais substratos não foram verificados indícios de colonização. Apesar disso, o substrato Carolina Soil®+Areia foi o que proporcionou a maior sobrevivência das mudas, com taxa de 100%, além de promover as maiores médias de altura das plantas em casa de vegetação. Com relação às análises anatômicas, verificou-se especialmente o incremento da espessura e área foliar e radicular das plantas em ambiente *ex vitro* em relação ao *in vitro*, indicando plasticidade adaptativa às novas condições ambientais.

Palavras chave: Bambusoideae, bambu, substrato, pré-aclimatização, anatomia foliar, fungos micorrízicos arbusculares.

1. INTRODUÇÃO

O bambu é um dos vegetais mais fascinantes e versáteis conhecidos pela humanidade. Ele pertence à família *Poaceae* e a subfamília *Bambusoideae*. *Dendrocalamus* é um gênero tropical de bambus gigantes, com cerca de 83 espécies que crescem naturalmente no subcontinente indiano e em todo o Sudeste Asiático (DAS *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2012a). A espécie *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) é talvez a mais importante do gênero, estando presente em praticamente todos os continentes, sendo utilizada em diversos segmentos da sociedade (SINGH *et al.*, 2013a).

Tradicionalmente, os bambus são propagados por meio de sementes e estacas de colmo (FONSECA, 2007). No entanto, a propagação por sementes é uma prática de difícil realização, devido ao longo ciclo de floração e indisponibilidade de sementes (SINGH *et al.*, 2012a). Sendo assim, a micropropagação funciona como um instrumento de grande importância para a propagação do bambu, oferecendo vantagens sobre as formas de propagação vegetativas convencionais, como a alta capacidade de disponibilizar propágulos e a possibilidade de ser realizada em qualquer época do ano. Assim, uma vez dominada, é capaz de prover mudas da espécie desejada em grandes quantidades, mesmo em espaço físico reduzido (GARCÍA-RAMÍREZ *et al.*, 2016; NOGUEIRA *et al.*, 2017).

A etapa final da micropropagação é denominada de aclimatização. Essa etapa é caracterizada pelo momento em que as plantas cultivadas *in vitro* são transferidas para o ambiente *ex vitro*, sendo considerada crucial para a micropropagação (SINGH *et al.*, 2013b). Isso porque grande quantidade das plantas podem não sobreviver à transferência de condições *in vitro* para ambientes de estufa ou de casa de vegetação, pois esses ambientes possuem umidades relativas substancialmente mais baixas, níveis de luz mais elevados e ambientes sépticos que são estressantes para as plantas micropropagadas, se comparados com as condições *in vitro* (PREECE; SUTTER, 1991). Nessas condições, é relativamente comum haver anormalidades anatômicas e fisiológicas nos diferentes órgãos das plantas, provocando redução na sobrevivência delas durante a transferência de ambiente (HAZARIKA, 2006).

Em bambu, as informações disponíveis sobre a aclimatização de plantas cultivadas *in vitro* são escassas, principalmente sobre o comportamento anatômico nessa fase (HURTADO *et al.*, 2012). Essa informação pode subsidiar o estabelecimento do processo mais adequado para a aclimatização de plantas micropropagadas (DONNELLY; TISDALL, 2015).

Nesse contexto, estudos estratégicos são necessários para minimizar os efeitos adversos da aclimatização. Uma das alternativas é a micropropagação seguida da micorrização das plantas, como forma de melhorar a qualidade das mudas, já que a simbiose

micorrízica pode promover maior absorção de nutrientes e resistência a uma variedade de estresses (KAPOOR; SHARMA; BHATNAGAR, 2008). Entretanto, é essencial o conhecimento da interação entre o fungo e a planta, os substratos, bem como as técnicas de aclimatização e de inoculação (LOCATELLI; LOVATO, 2002). Assim, o uso de substratos adequados, associados ao emprego de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode contribuir para a formação de mudas de qualidade superior àquelas de sistemas convencionais (DA SILVA; PEIXOTO; JUNQUEIRA, 2001).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de substratos e a capacidade de micorrização das plantas, bem como a adaptação anatômica de mudas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) durante a aclimatização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O material vegetal usado no experimento pertencia a coleção de bambus da Embrapa Recursos Genética e Biotecnologia, Brasília, DF. A coleção da espécie *Dendrocalamus asper* foi formada a partir de sementes coletadas de touceiras adultas de plantas matrizes que floresceram em outubro de 2015, no município de Pardinho, SP.

Após a coleta, as sementes passaram pelo processo de assepsia, as quais foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas em água corrente. Em seguida, em capela de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70% (v/v) por 3 min, seguido por imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2,5% de cloro ativo por 20 minutos, seguido de tríplice lavagem com água destilada e autoclavada, conforme Nogueira (2018). Após o processo de desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, com subcultivos realizados a cada 60 dias.

2.1.2 Multiplicação do material

Para a multiplicação *in vitro* do material e obtenção de mudas para realização dos experimentos, utilizou-se o meio de MS com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 1,5 mg.L⁻¹ de Metatopolina (mT). As mudas foram multiplicadas em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, preenchidos com 40 mL de meio. O material foi renovado a cada 30 dias e mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 100 $\mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$ e temperatura de 25 \pm 2 °C.

Após a multiplicação e obtenção das mudas na quantidade desejada, estas foram transferidas para meio de cultivo de MS, sem adição de mT, onde permaneceram por cerca de uma semana a fim de reduzir o efeito residual da citocinina. Em seguida foram lavadas e transplantadas para os respectivos substratos. Apesar de não ser ter sido contabilizado número e porcentagem de raízes, durante os subcultivos foi possível observar o enraizamento espontâneo das plantas.

2.1.3 Efeito dos substratos na aclimatização e na micorrização

No total foram realizados seis tratamentos, nos quais foram usados três substratos: 1) Bioplant® + areia lavada (1:1 v/v), 2) Carolina Soil® + areia lavada (1:1 v/v) e; 3) terra de subsolo (Tabela 1). Em cada um dos tratamentos, as plantas ainda foram avaliadas quanto presença ou ausência do fungo micorrizico arbuscular (FMA) *Rhizoglosum clarum* como inoculante.

Cada tratamento foi composto por 10 repetições e cada repetição foi constituída por um copo plástico de 200 cm³ de capacidade preenchido com substrato e contendo uma planta.

Tabela 1. Características dos substratos utilizados para o transplante de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae).

| Substratos | Composição | Potencial Hidrogeniônico (pH) | Condutividade elétrica (mS/cm) | Densidade (Kg/m ³) | Capacidade de retenção de água (%) |
|----------------|--|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Bioplant® | Turfa de sphagnum, fibra de coco, casca de arroz, casca de pinus e vermiculita | 6,2 | 0,7 | 150 | 100% |
| Carolina Soil® | Turfa sphagnum, vermiculita expandida, Calcário dolomítico, Gesso agrícola e Fertilizante NPK (traços) | 5,5 ± 0,5 | 0,7 ± 0,3 | 145 | 55% |
| Subsolo | Terra de subsolo (latossolo) | _* | _* | _* | _* |

* a ser determinado.

2.1.4 Inóculo micorrízico

Para a micorrização, utilizou-se o inóculo contendo o FMA *Rhizoglosum clarum* CNPMS005, pertencente à coleção da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG), o qual foi produzido no sistema de vasos de cultivo em substrato autoclavado, tendo o milho BRS Caimbé como planta hospedeira. O período de cultivo do inóculo foi de quatro meses. Em seguida, cessou-se a irrigação e, após dessecação completa, o substrato foi destorroado e

peneirado em peneira de malha 2 mm. Então, o substrato foi acondicionado em câmara fria até seu uso. O inóculo assim obtido foi composto por esporos, solo e raízes colonizadas.

O experimento de micorrização apresentou duas fases: (1) aclimatização – em câmara de crescimento do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand* - marca Percival, modelo I-30NL) por 30 dias e; (2) desenvolvimento em casa de vegetação por 60 dias. Após distribuição do substrato nos recipientes (copos) de 200 mL, no centro de cada recipiente foi feito uma pequena cova para dispor 20 gramas do inóculo, conteúdo solo, esporos e raízes colonizadas.

As plantas a serem micorrizadas foram retiradas dos frascos de cultivo e seu sistema radicular lavado em água corrente para eliminar o meio de cultura. Em seguida, elas foram dispostas sobre o inóculo micorrízico. Antes de serem acondicionadas em câmara de crescimento, as plantas foram cobertas com saco plástico transparente e envolvidas com um elástico, a fim de proporcionar maior umidade e reduzir o efeito da transferência de ambiente.

Na câmara de crescimento, a temperatura foi mantida entre $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a umidade entre 70% a 80%, com fotoperíodo de 12 horas. A irrigação foi realizada manualmente a cada dois dias. Após quatro semanas na B.O.D., as plantas foram transplantadas para tubetes de 280 cm^3 (Figura 1A), preenchidos com o mesmo substrato inicial sendo, em seguida, transferidas para casa de vegetação. As avaliações referentes à micorrização foi realizada aos 90 dias.

2.1.5 Variáveis analisadas

A cada 30 dias de cultivo, por um período de até 3 meses, as plantas foram avaliadas quanto a sobrevivência, altura (cm), número de hastes formadas e taxa de colonização, a partir da retirada de amostras de raízes (Figura 1B). Ao fim do experimento (90 dias), foram retiradas amostras da parte aérea e raiz para cálculo do peso seco e fresco das plantas (Figura 1C e 1D). Além disso, foram coletadas amostras de raízes para a diafanização e processo de coloração com azul de tripan, a fim de avaliar a dinâmica do processo de micorrização, verificando o tempo necessário para a colonização das raízes, bem como a determinação das taxas de colonização.



Figura 1. Plantas de *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult.f.) Baker ex. K. Heyne micropropagadas usadas no experimento. **A.** Plantas em fase de aclimatização em casa de vegetação; **B.** Aspecto de uma planta evidenciando o comprimento da parte aérea e do sistema radicular; **C.** Aspecto do sistema radicular de *D. asper* separado da parte aérea para realização de pesagem e determinação de peso fresco e seco; **D.** Aspecto da realização da pesagem da parte aérea de *D. asper*.

2.1.6 Identificação da simbiose micorrízica

Para identificar as estruturas características da simbiose micorrízica, as raízes das plantas foram coradas de acordo com protocolo estabelecido por Philips e Hayman (1970), e adaptado por Koske e Gemma (1989) e Grace e Stribley (1991). O procedimento consistiu no esvaziamento celular para obter a transparência das raízes, sendo usado, em seguida, corante com reação ácida para colorir as paredes do FMA e permitir a visualização dele no interior das raízes.

A cada trinta dias foram coletadas amostras de raízes dos indivíduos inoculados em casa de vegetação, sendo estas lavadas e armazenadas em álcool 50%. Em seguida, as raízes foram lavadas e armazenadas em solução de hidróxido de potássio (KOH) a 2,5 %, durante a noite, e lavadas com água no dia seguinte. Posteriormente, as raízes passaram por solução de ácido clorídrico (HCl) a 1 %, onde permaneceram por aproximadamente 3 horas. A solução foi então drenada, sem lavar as raízes, adicionando-se solução de azul de tripano 0,05% (m/v). Em seguida, o corante foi drenado e as raízes lavadas em água corrente. As raízes coradas foram então armazenadas em tubos Falcon de 10 mL e observadas em microscópio Leica (DM 750) com sistema de captura de imagem, utilizando-se o software Leica Application Suite (LAS EZ).

2.1.7 Análises estatísticas

Para análise do efeito dos diferentes substratos associado ou não com a inoculação do FMA, adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 10 repetições. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico Rstudio.

2.2 Comportamento morfológico e anatômico durante a aclimatização

2.2.1 Área foliar

Determinou-se a área foliar de plantas oriundas dos diferentes ambientes: *in vitro* (no momento de serem retiradas dos frascos para a aclimatização) e *ex vitro* (em casa de vegetação) após 45 dias da aclimatização. Para tal, retirou-se uma amostra foliar do segundo par de folhas do ápice para a base da planta, de quatro plantas selecionadas de forma aleatória, oriundas de cada fase citada acima. As folhas foram escaneadas e a área foliar foi calculada

utilizando-se o software Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.2.2 Anatomia foliar e radicular

Para anatomia foliar e radicular, de três plantas selecionadas ao acaso e oriundas do cultivo *in vitro* e *ex vitro*, retiraram-se folhas totalmente expandida e amostras radiculares de aproximadamente 1,0 centímetro. As folhas foram seccionadas na parte mediana das plantas.

As amostras foram então submetidas aos processos de fixação, desidratação e emblocamento, conforme o seguinte protocolo: fixação em solução de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), por um período de 24 horas (sob vácuo durante a primeira hora), seguida de três lavagens em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo). Logo após, o material passou por desidratação em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70% - 100%), por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

Posteriormente, cortes transversais (3-7 μm) foram realizados em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), que foram distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. As secções obtidas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural (O'BRIEN; FEDER; MCCYLLY, 1964). Os cortes paradérmicos foram realizados manualmente e corados com safranina 1%. O número de estômatos por mm^2 foi determinado na região mediana da folha com auxílio do software Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.2.3 Análises estatísticas

Para análise estatística utilizou-se a porção mediana de folhas totalmente expandida de três plantas escolhidas de forma aleatória em cada um dos ambientes *in vitro* e *ex vitro* analisados. Foram contabilizados os estômatos, espessura foliar e radicular, tomando como base a análise de pelo menos 10 imagens de cada planta em cada ambiente. As médias foram submetidas a análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas no programa Rstudio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.1 Substratos e micorrização

Os diferentes substratos afetaram positivamente o desenvolvimento das plantas, visto que a taxa de sobrevivência foi alta até os 30 dias, período em que as plantas permaneceram em condições de B.O.D. (Tabela 2). Após a transferência para casa de vegetação, aos 60 e 90 dias foram verificadas perdas por morte de plantas variando entre 10% e 50%. O substrato subsolo foi o que proporcionou a maior taxa de mortalidade das plantas (50%), enquanto o substrato Carolina Soil®+Areia o que garantiu a maior taxa de sobrevivência (100% de plantas vivas).

Em mudas micropropagadas de *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl, aclimatizadas com substrato orgânico comercial à base de casca de pinus e vermiculita (1:1, v/v) obteve-se 76,38% de sobrevivência (RIBEIRO *et al.*, 2020). Já em *Guadua angustifolia* Kunth, com uma mistura de cascas de arroz, solo e areia (1:1:1 v/v) verificou-se 85% de sobrevivência (JIMÉNEZ *et al.*, 2006). *Guadua magna* e *G. angustifolia* apresentaram sobrevivência entre 80% e 100% em substrato comercial Bioplant® (NOGUEIRA; GOMES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2019).

Visto que na aclimatização de mudas micropropagadas de Bambu são utilizados diversos tipos de substratos em diferentes composições, de acordo com Sandhu,Wani e Jiménez (2018), frequentemente essas plantas são mantidas sob alta umidade, após a transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, com intuito de garantir que a transferência para o ambiente *ex vitro* seja menos traumática às plantas e promova maior sobrevivência das mudas.

Além de diferentes substratos, de acordo com Sandhu,Wani e Jiménez (2018), a aplicação de sais de meio de cultivo de MS para alguns casos, assim como descrito por Mishra *et al.* (2008) e Singh *et al.*(2012b) em *Bambusa tulda* Roxb e *Dendrocalamus asper*, respectivamente, pode melhorar a aclimatação das mudas oriundas da micropropagação.

Tabela 2. Sobrevivência de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae) após a transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*.

| Substrato* | 30 dias | 60 dias | 90 dias |
|------------|---------------|---------------------|---------------------|
| | (B.O.D.)** | (casa de vegetação) | (casa de vegetação) |
| | Sobrevivência | | |
| B+A+FMA | 100% | 90% | 90% |
| B+A | 100% | 100% | 90% |
| C+A+FMA | 100% | 80% | 90% |
| C+A | 100% | 100% | 100% |
| S+FMA | 100% | 70% | 50% |

S
100%
60%
60%

*Composição dos substratos: B+A+FMA: Bioplant® + Areia + Fungo micorrízico arbuscular (FMA); B + A: Bioplant® + Areia; C + A + FMA: Carolina Soil® + Areia + Fungo micorrízico arbuscular; C + A: Carolina Soil® + Areia; S + FMA: Subsolo + Fungo micorrízico arbuscular; S: subsolo (latossolo).

**B.O.D.: *Biochemical Oxygen Demand*.

Os substratos promoveram diferenças no desenvolvimento das mudas (Tabela 3). As maiores alturas de plantas foram observadas no tratamento com substrato Carolina Soil®+Areia, apresentando diferenças estatisticamente significativas dos demais tratamentos. No entanto, os substratos não influenciaram o número de hastes, já que não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre elas.

A avaliação das variáveis morfológicas destrutivas (Tabela 3), mostrou que plantas cultivadas no substrato Carolina Soil®+Areia foram as que apresentaram maior incremento em massa, tanto da parte aérea quanto a radicular, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os demais substratos. O tratamento Carolina Soil®+Areia+FMA apresentou média de incremento estatisticamente superior aos demais tratamentos.

Dentre os substratos avaliados, o substrato Carolina Soil®+Areia propiciou o melhor desenvolvimento das plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper*. Resultados positivos com uso desse substrato também foram reportados para outras espécies como eucalipto (SPERANDIO *et al.*, 2011), pimenta e pimentão (DA SILVA *et al.*, 2019), tomate (SALLES *et al.*, 2018), maracujá (CANESIN; BARBOSA, 2017) e Araçazeiro vermelho (HENZ *et al.*, 2018).

De acordo com Sousa (2018), a composição do substrato exerce influência decisiva no crescimento e estabelecimento de mudas de *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne). Esse mesmo autor definiu que a composição de terra de subsolo + substrato comercial Bioplant® proporcionou os melhores resultados na propagação seminal e clonal de *Dendrocalamus asper* e propagação clonal de *Bambusa vulgaris* var *vittata*, comparativamente aos outros substratos analisados.

Tabela 3. Massa fresca (MF) e seca (MS) de mudas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*), com três meses de idade, submetidas a diferentes substratos, com ou sem inoculação micorrízica.

| *Substrato | Parte Aérea (g) | | Raiz (g) | | Número de hastes | Altura (cm) |
|------------|-----------------|------------|-----------|------------|------------------|-------------|
| | MF | MS | MF | MS | | |
| B+A+FMA | 2,4±0,1 a | 1,42±0,1 a | 2,6±0,1 b | 1,87±0,2 b | 5,1±0,2 a | 9,9±0,3 b |
| B+A | 2,6±0,1 a | 2,0±0,1 a | 3,3±0,4 b | 2,8±0,2 b | 4,9±0,3 a | 8,7±0,3 b |
| C+A+FMA | 3,5±0,1 a | 2,8±0,2 a | 7,7±0,3 a | 7,9±0,4 ab | 6,4±0,2 a | 9,7±0,2 b |
| C+A | 2,6±0,1 a | 2,1±0,2 a | 5,6±0,3 a | 5,2±0,2 a | 6,4±0,3 a | 13,6±0,4 a |
| S+FMA | 3,1±0,2 a | 3,1±0,3 a | 3,6±0,1 b | 3,3±0,1 b | 4,6±0,3 a | 7,7±0,4 b |

| | | | | | | |
|---|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| S | 2,7±0,1 a | 1,15±0,1 a | 2,8±0,1 b | 1,6±0,1 b | 5,5±0,5 a | 9,5±0,3 b |
|---|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|

*Composição dos substratos: B+A+FMA: Bioplant® + Areia + Fungo micorrízico arbuscular (FMA); B + A: Bioplant® + Areia; C + A + FMA: Carolina Soil® + Areia + Fungo micorrízico arbuscular; C + A: Carolina Soil® + Areia; S + FMA: Subsolo + Fungo micorrízico arbuscular; S: subsolo (latossolo).

3.1.2 Colonização radicular

Em relação à colonização das raízes pelos FMA, nas duas primeiras avaliações não foram observadas estruturas que evidenciassem a presença da micorrização das raízes. No entanto, após três meses de avaliação, verificou-se que 10% das plantas cultivadas no substrato comercial Bioplant®+Areia+FMA foram micorrizadas, sendo observadas estruturas que indicam a presença do fungo, como hifas e esporos no interior das raízes (Figura 2). Nas plantas dos demais substratos não foram observados indícios de colonização.

Em relação a colonização das mudas pelo FMA, verificou-se baixa taxa de colonização. Aparentemente, as baixas taxas de colonização das raízes refletem uma possível incompatibilidade entre o fungo e as raízes de *D. asper*. Os resultados mostraram que a colonização não foi bem estabelecida nas raízes, embora tenha sido verificado que, entre os substratos testados, o Bioplant® foi o único que proporcionou a colonização micorrízica.

Em *Dendrocalamus strictus* a porcentagem de colonização radicular aumentou significativamente após 12 meses, com contagem máxima de esporos observada em plantas duplamente inoculadas em comparação com os outros tratamentos (BABU; REDDY, 2011). Nesse sentido, acredita-se que uma inoculação adicional, após determinado período de tempo, em relação à primeira inoculação, seria uma alternativa para melhorar a colonização das mudas de *D. asper* oriundas da micropropagação.

Em uma espécie de bambu híbrido *Chenglu* (*Bambusa pervariabilis* × *B. grandis*), a colonização das raízes por FMAs foi avaliada a cada dois meses e uma avaliação final foi registrada após 6 meses de tratamento. Neste trabalho, os autores verificaram que após 60 dias de inoculação foram observados hifas externas e pontos de entradas das FMAs. Arbúsculos foram observados após 90 dias e, após 120 dias, observaram-se vesículas (JIANG; GOU; DING, 2013). Por sua vez, Verma e Arya (1998), trabalhando com *D. asper*, verificaram que plantas inoculadas com FMAs foram colonizadas após dois meses, enquanto que as plantas do tratamento controle não mostraram colonização por até 6 meses. Apesar da ocorrência de colonização, no final do experimento, os autores verificaram baixo nível de colonização radicular por FMAs, corroborando com os resultados obtidos em neste trabalho.

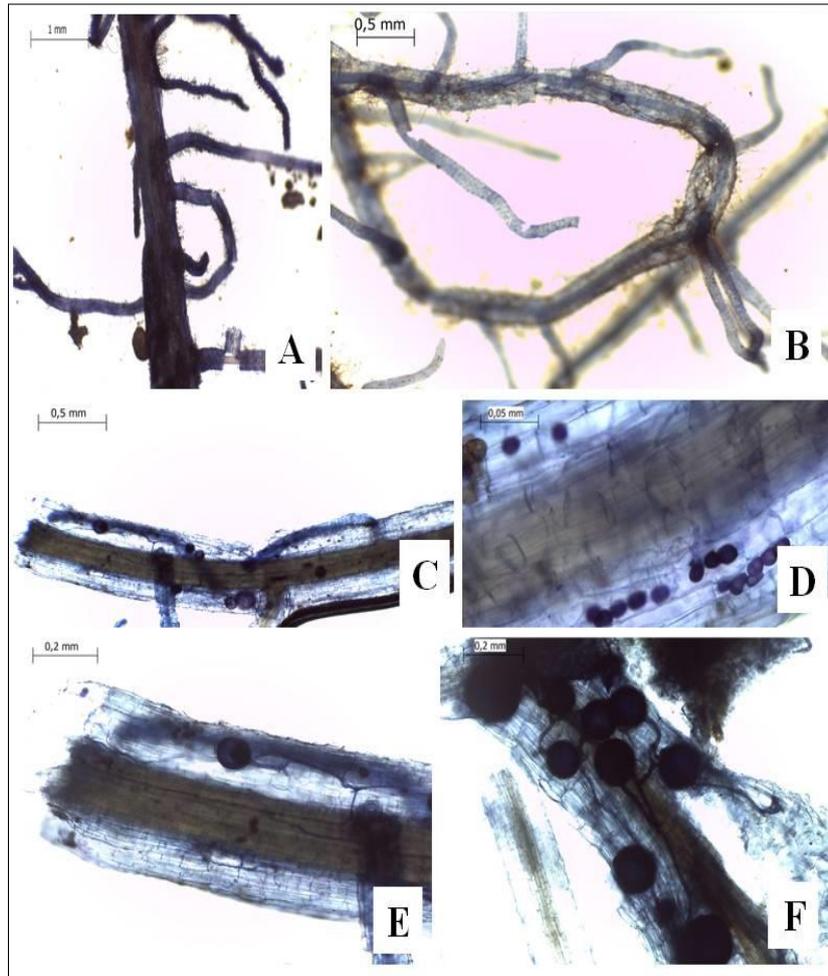


Figura 2. Raízes de *Dendrocalamus asper* coradas com azul de tripan para identificação de micorrização. A e B: Raízes sem indícios de colonização; C: Raízes com esporos em seu interior; D: Vesículas; E e F: Estruturas características da simbiose micorrízica, apresentando hifas intrarradiculares e esporos.

Em *Dendrocalamus strictus*, plantas foram inoculadas com diferentes espécies de FMAs (*Glomus mosseae*, *G. aggregatum* e *G. fusciculatum*). Os autores verificaram que as plantas foram colonizadas até o vigésimo dia, com porcentagens de infecção variando entre 30% e 60%, a depender do inóculo. A micorrização completa das plantas (100%) foi registrada no 90º dia do experimento, com hifas bem estabelecidas, portando arbúsculos e estágios vesiculares (RAVIKUMAR *et al.*, 1997).

Baseado na literatura verifica-se que há uma grande variação dos resultados relacionados à micorrização e uso de substratos em bambu. A colonização pode ocorrer, entre 20 e 90 dias, ou mesmo não ocorrer por falta de compatibilidade do fungo com a raiz ou/e com o substrato. Por isso, sugere-se que novos estudos sejam realizados a fim de garantir

taxas mais elevadas de colonização das raízes de plantas de bambus micropropagados, como por exemplo, a realização de estudos que avaliem outros substratos, combinados ou não outras espécies de FMAs.

3.2 Comportamento morfológico e anatômico durante a aclimatização de plantas de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae)

3.2.1 Área foliar

De maneira complementar, analisou-se a área foliar e radicular e o comportamento anatômico de plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação para se verificar o efeito da aclimatização sobre o desenvolvimento das plantas. Com relação à área foliar e radicular, pode-se observar incremento de ambas durante a transição do ambiente *in vitro* para *ex vitro* (Figuras 3, 4 e Tabela 4), o que indica uma boa adaptação das plantas a mudança de ambiente, aliada à alta sobrevivência obtida (100%). Enfatiza-se que área foliar é considerada uma importante variável para entender a relação entre o crescimento foliar e acúmulo de biomassa (WERADUWAGE *et al.*, 2015).

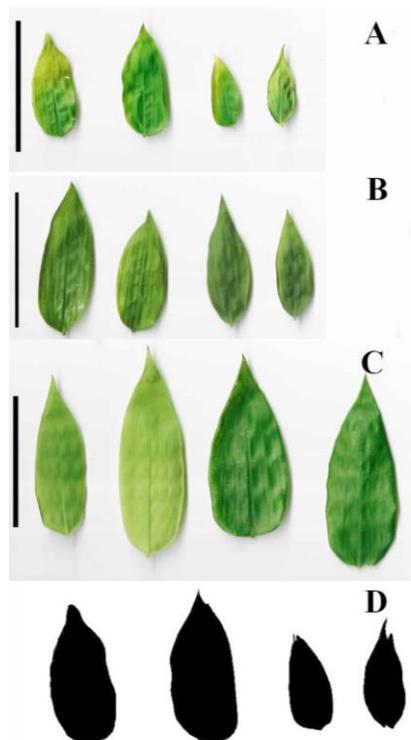


Figura 3. Folhas de *Dendrocalamus asper*. **A.** Folhas proveniente do ambiente *in vitro*. **B.** Folhas provenientes da câmara de crescimento (B.O.D.). **C.** Folhas provenientes da casa de vegetação. Escalas: A-C = 1 cm.

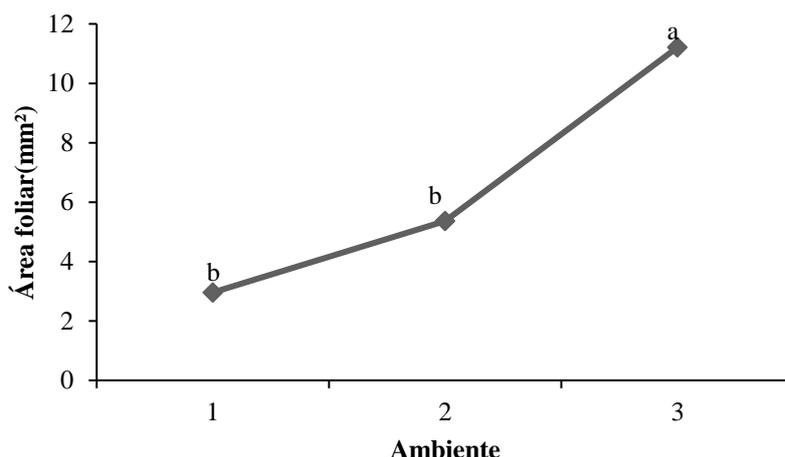


Figura 4. Área foliar de *Dendrocalamus asper* em três ambientes distintos: (1) *in vitro*, (2) câmara de crescimento (B.O.D.) e, (3) casa de vegetação.

3.2.2 Anatomia foliar e radicular

Durante a aclimatização, as plantas cultivadas *in vitro* apresentaram características semelhantes após a transferência para casa de vegetação (*ex vitro*). Apesar disso, foram verificadas determinadas diferenças nas amostras dos tecidos foliares e radiculares.

Verificou-se que a transferência de ambiente ocasionou aumento no número de estômatos, padrão também observado por Hurtado *et al.* (2012) em *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl. Entretanto, não houve diferenças estatísticas significativas no número de estômatos entre os dois ambientes. Contudo, verificaram-se diferenças na espessura foliar e na área radicular, havendo incremento com a transferência para a condição *ex vitro* (Tabela 4).

Assim como o verificado nesse trabalho, maior área foliar e espessura em plantas aclimatizadas comparativamente ao observado em plantas cultivadas *in vitro* (Figura 4), também foi reportado por Rodrigues, Rocha e Marcela (2020) em *Azadirachta indica*. Segundo esses autores, modificações na radiação e na composição de gases inerentes à condição *ex vitro* estão relacionadas com incremento da espessura do mesofilo. Bag *et al.* (2000), semelhante ao observado nesse trabalho, relataram para a espécie de bambu *Thamnocalamus spathiflorus* poucas diferenças anatômicas entre as plantas *in vitro* e mudas *ex vitro*. Esses autores verificaram apenas que plantas *in vitro* exibiam menor espessura foliar (57 μm) do que as mudas estabelecidas *ex vitro* (82 μm), além de menor densidade estomática.

De acordo com Preece e Sutter (1991), folhas de plantas cultivadas *in vitro* são mais finas e apresentam camada do mesofilo mal desenvolvidas se comparada com plantas cultivadas em estufa. Lando *et al.* (2016) e Asayesh, Vahdati e Aliniaiefard (2017), durante a aclimatização de *Cattleya*

xanthina e *Juglans regia*, respectivamente, também verificaram o incremento da espessura foliar durante a transição *in vitro* para *ex vitro*. Essa maior espessura proporciona, provavelmente, uma maior resistência e utilização da radiação incidente e, conseqüentemente, maior atividade fotossintética e crescimento. De acordo com Niinemets (1999), há uma relação positiva entre a taxa de fotossíntese com a espessura foliar.

Em corte paradérmico observou-se que as células da epiderme estão organizadas em fileiras paralelas, padrão observado *in vitro* e *ex vitro* (Figuras 5A e 5B). Na Figura 5B é possível observar tricomas tectores, sendo estes unicelulares, longos, retos, com paredes espessas e extremidades afiladas. Os estômatos são formados por um par de células-guarda com um ostíolo entre elas. As células-guarda são do tipo halteriforme, ou seja, estreitas na região mediana e largas nas extremidades. Os estômatos estão organizados em fileiras paralelas (Figura 5A).

Tabela 4. Medidas das estruturas anatômicas de raízes e folhas de *Dendrocalamus asper* (*Poaceae: Bambusoideae*) em diferentes ambientes.

| Ambiente | N.º de estômatos | Espessura foliar (mm) | Área radicular (mm ²) |
|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| <i>In vitro</i> | 300,0±24,7 a | 0,061±0,005 b | 0,14±0,08 b |
| Casa de vegetação | 378,0±12,7 a | 0,066±0,006 a | 0,87±0,02 a |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Do ponto de vista anatômico das folhas em corte transversal, os bambus, em geral, são distinguidos por duas características únicas: as células fusóides e o desenvolvimento de células de clorênquima invaginadas (RENVOIZE, 1985). As células fusóides são largas, apresentam paredes finas e são desprovidas de cloroplastos (Figura 6D e 7B), tratam-se de células comumente reportadas em espécies de bambu (MONTIEL *et al.*, 2006; HURTADO *et al.*, 2012).

O mesofilo, que corresponde a estrutura entre a epiderme e os feixes vasculares, de folhas de plantas *in vitro* apresentou estruturas do colênquima invaginadas, contínuas, organizadas e homogêneas (Figura 7). A transição para o ambiente *ex vitro*, provocou mudanças na estrutura tornando heterogênea, descontínua e “quebradiça” (Figura 7). Apesar disso, nos dois ambientes foi observado que na face abaxial havia duas fileiras de células, e na abaxial apenas uma, essa disposição também foi observada por Oliveira *et al.* (2008).

Nas células de clorênquima há presença de cloroplastos, que converte energia luminosa em energia química (APPEZZATO DA GLORIA; CARMELLO CARNEIRO, 2006). Supõe-se que a mudança de ambiente, juntamente com aumento de umidade e temperatura, tenha causado as mudanças nas células do mesofilo, evidenciando-se que a espécie estudada apresenta problemas de aclimatização, tendo mortalidade com a mudança de ambiente. Apesar de nesse experimento não ter havido mortalidade, evidencia-se com a mudança das estruturas a necessidade de transição lenta de ambientes para a espécie. Hurtado *et al.* (2012) em *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl aos 90 dias de aclimatização verificou boa adaptabilidade da espécie, verificando que as estruturas anatômicas eram mais desenvolvidas e organizadas, tornando-as aptas para ir para o campo. Em *D. asper* a avaliação anatômica foi realizada aos 45 dias de aclimatização e o fator tempo pode ter sido o influenciador nas mudanças estruturais.

A nervura central da folha em corte transversal, exibia feixe vascular colateral de primeira ordem e continha dois vasos de metaxilema lateral ao protoxilema, e o floema circundado por fibras (Figura 6B). A região do limbo foliar apresentou intercalação entre feixe vascular de primeira e segunda ordem com as células fusóides. Os feixes vasculares apresentaram bainha dupla, sendo a externa, endoderme e a interna o periciclo (Figura 6D), assim como observado por Vieira *et al.* (2002).

As células buliformes apresentaram com a transição de ambiente, mudanças na forma geral, sendo mais organizada no ambiente *in vitro*, com células mais arredondadas, inteiras, enquanto as originárias da condição *ex vitro* apresentaram deformação (Figura 6B e 6D). Essas são encontradas somente na face adaxial das folhas do bambu, o que permite a distinção da face adaxial da abaxial (LUIS *et al.*, 2017). Elas são maiores que as demais células epidérmicas e possuem parede celular fina e grande vacúolo, tendo como função a relacionada ao mecanismo de enrolamento e desenrolamento das folhas, além de reduzir a superfície da folha exposta, reduzindo com isso as taxas de transpiração e absorção de luz, quando sob estresse hídrico (APPEZZATO DA GLORIA; CARMELLO CARNEIRO, 2006; BANAN *et al.*, 2019).

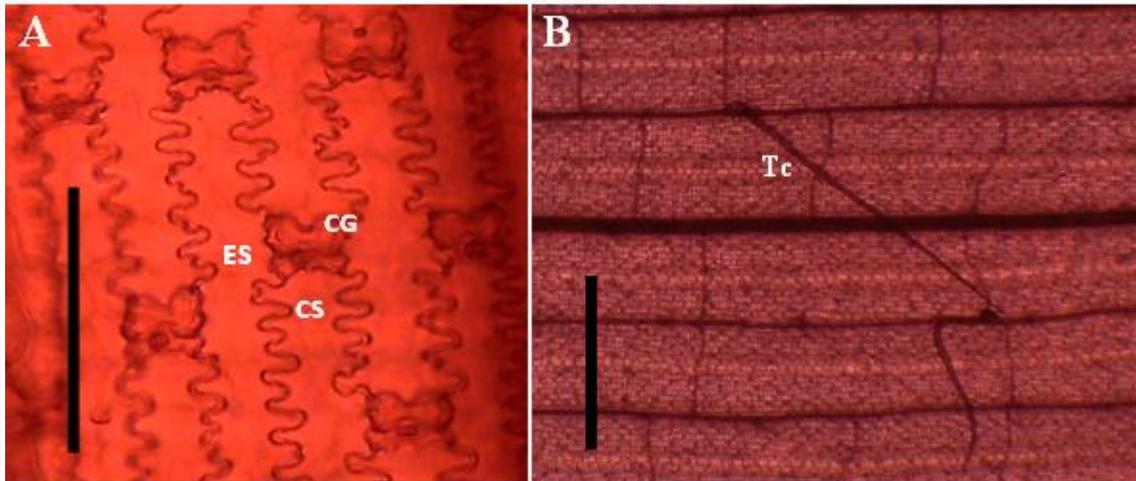


Figura 5. Estômato de *Dendrocalamus asper*. **A** e **B**: Corante safranina 0,1%; Corte paradérmico. **A**: Epiderme face adaxial, evidenciando os estômatos; **B**: Epiderme, face adaxial evidenciando tricomas. Escalas: **A**: 50 μ m; **B**: 500 μ m. ES: estômatos; CG: Células guarda; CS: Célula subsidiárias; Tc: tricoma.

A anatomia radicular em corte transversal de *D. asper in vitro* apresentou características que demonstram sistema radicular pouco desenvolvido, espessura das raízes finas e frágeis, como observado também por Mayer *et al.* (2008). Anatomicamente apresentou menor área circular, além de menor número de feixes do xilema e células desorganizadas. A transferência para o ambiente *ex vitro*, promoveu incremento da área radicular, bem como, células maiores mais arredondadas e organizadas. Em *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl, Hurtado *et al.* (2012) verificaram que o sistema radicular da espécie não era funcional no ambiente *in vitro*.

A raiz de bambu apresenta sequencia característica da estrutura anatômica, iniciando externamente com a epiderme, córtex, cilindro vascular e medula (LUIS *et al.*, 2017). A epiderme das raízes provenientes dos dois ambientes apresentava camada única, com células de tamanho e forma variadas. Abaixo da epiderme evidencia-se a exoderme (Figura 8A.3), presente apenas nas raízes provenientes do ambiente *ex vitro*.

As raízes provenientes do ambiente *in vitro* apresentavam de 3 a 4 camadas de células no parênquima cortical e àquelas da *ex vitro* apresentavam de 6 a 7 camadas. A endoderme radicular *in vitro* e *ex vitro* era unisseriada com células espessadas em O. Evidencia-se que o cilindro vascular era composto por 5 (*in vitro*) e 7 (*ex vitro*) pólos do xilema. Essa menor quantidade de células de raízes *in vitro* está provavelmente associada ao ambiente protegido e a alta umidade relativa (MAYER *et al.*, 2008).

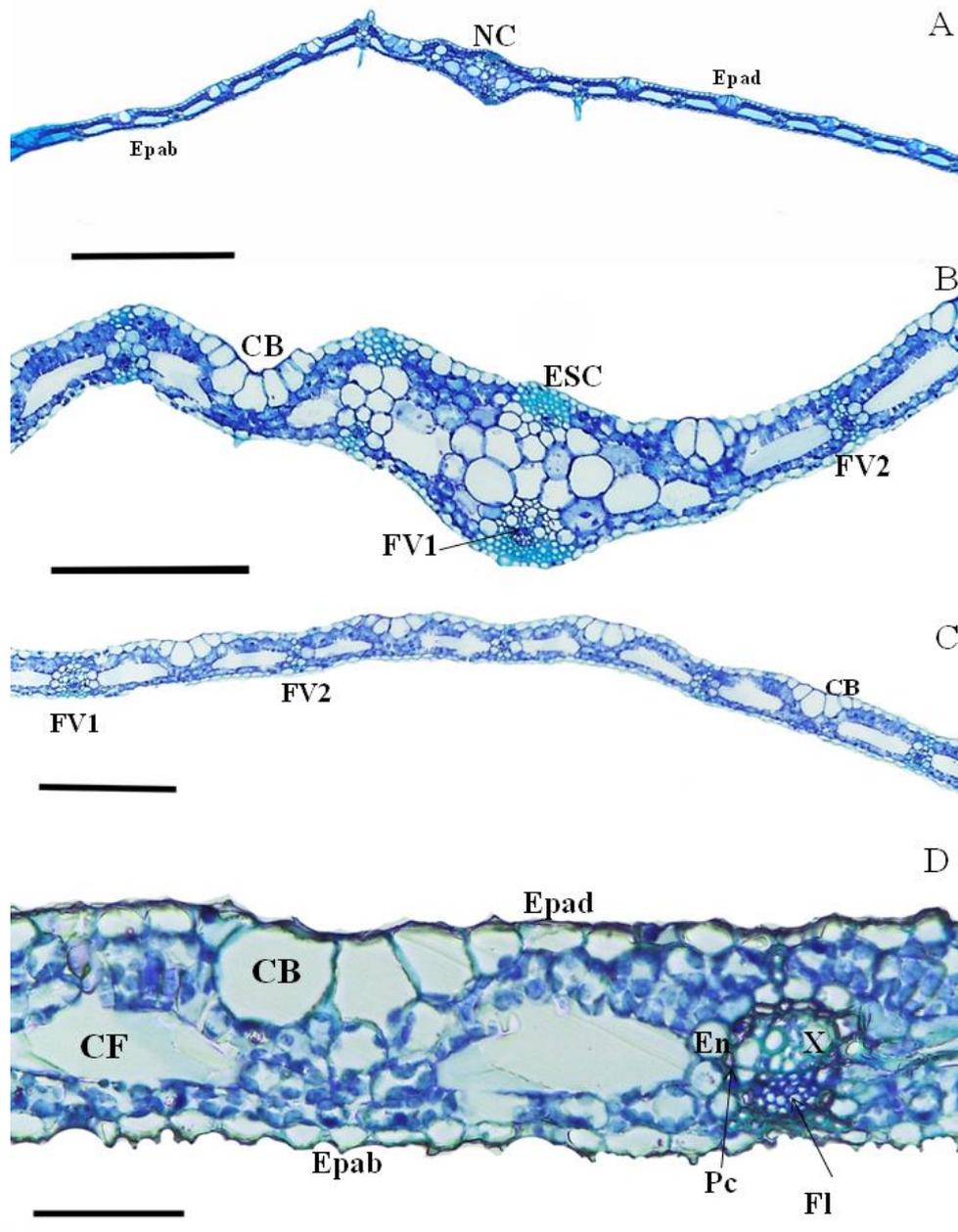


Figura 6. Folha de *Dendrocalamus asper* cultivada *in vitro* **A-D**: corante azul de Toluidina, corte transversal; **A**: Visão geral da folha, com quilha; **B**: Visão geral da nervura central da folha; **C**: Folha evidenciando os feixes vasculares de primeira e segunda ordens; **D**: corte evidenciando epiderme adaxial e abaxial. **Epad**: epiderme adaxial; **Epab**: epiderme abaxial; **F**: floema; **X**: xilema; **CF**: célula fusóide; **Pc**: periciclo; **FV1**: feixe vascular de primeira ordem; **FV2**: feixe vascular de segunda ordem; **En**: endoderme; **CB**: célula buliforme; **ESC**: esclerênquima; **NC**: Nervura central. Escalas: **A-C**: 200 μ m; **D**: 50 μ m. A sequência segue a ordem das figuras.

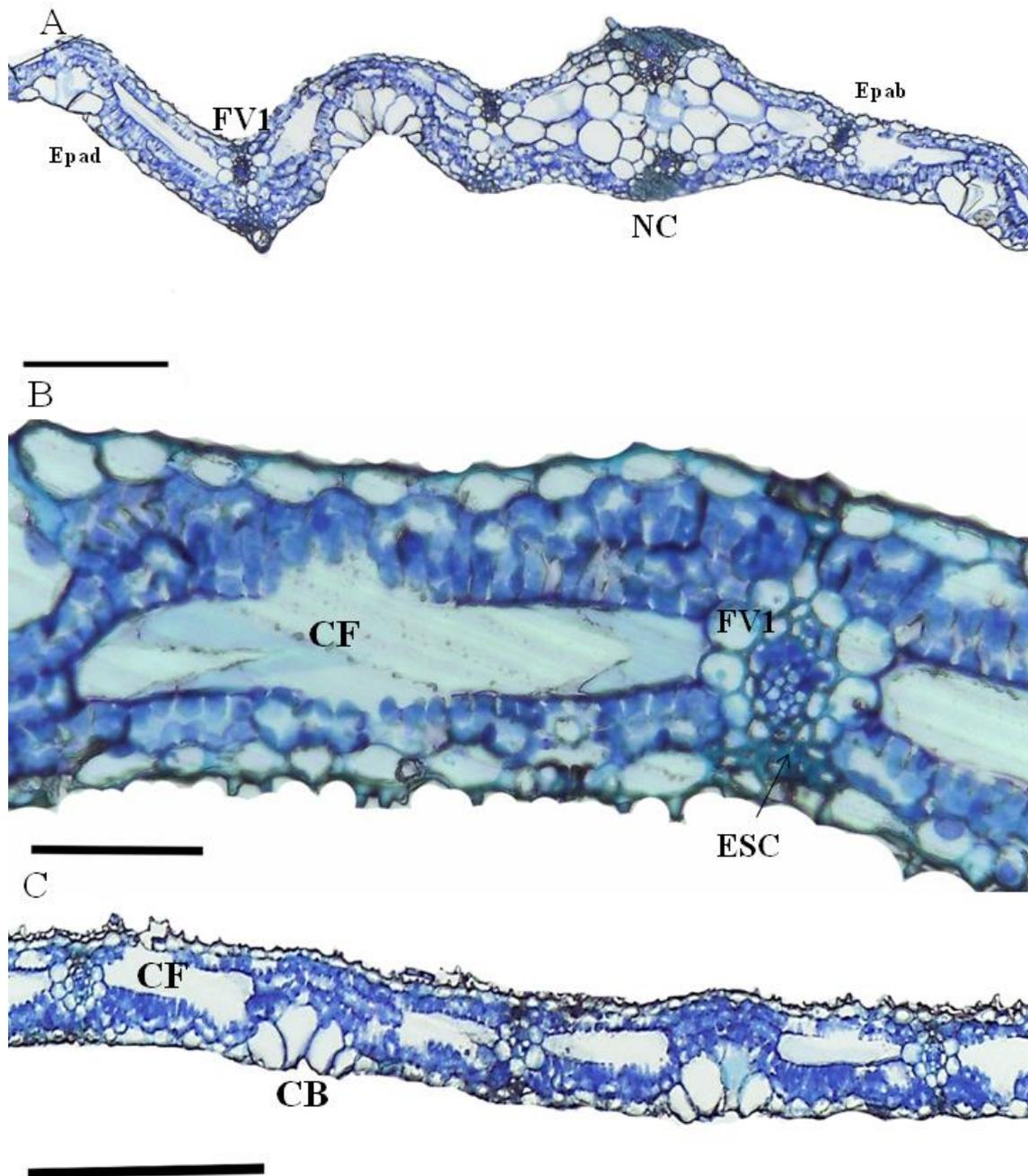


Figura 7. Folha de *Dendrocalamus asper* cultivada *ex vitro* (casa de vegetação). **A-C:** corante azul de Toluidina, corte transversal; **A:** Visão da nervura central da folha; **B:** Visão geral da nervura central da folha; **C:** Folha evidenciando os feixes vasculares de primeira e segunda ordens; **D:** corte evidenciando epiderme adaxial e abaxial. **Epad:** epiderme adaxial; **Epab:** epiderme abaxial; **F:** floema; **X:** xilema; **CF:** célula fusóide; **Pc:** periciclo; **FV1:** feixe vascular de primeira ordem; **FV2:** feixe vascular de segunda ordem; **En:** endoderme; **CB:** célula buliforme; **ESC:** esclerênquima; **NC:** Nervura central. Escalas: **A** e **C:** 200 μ m; **B:** 50 μ m.

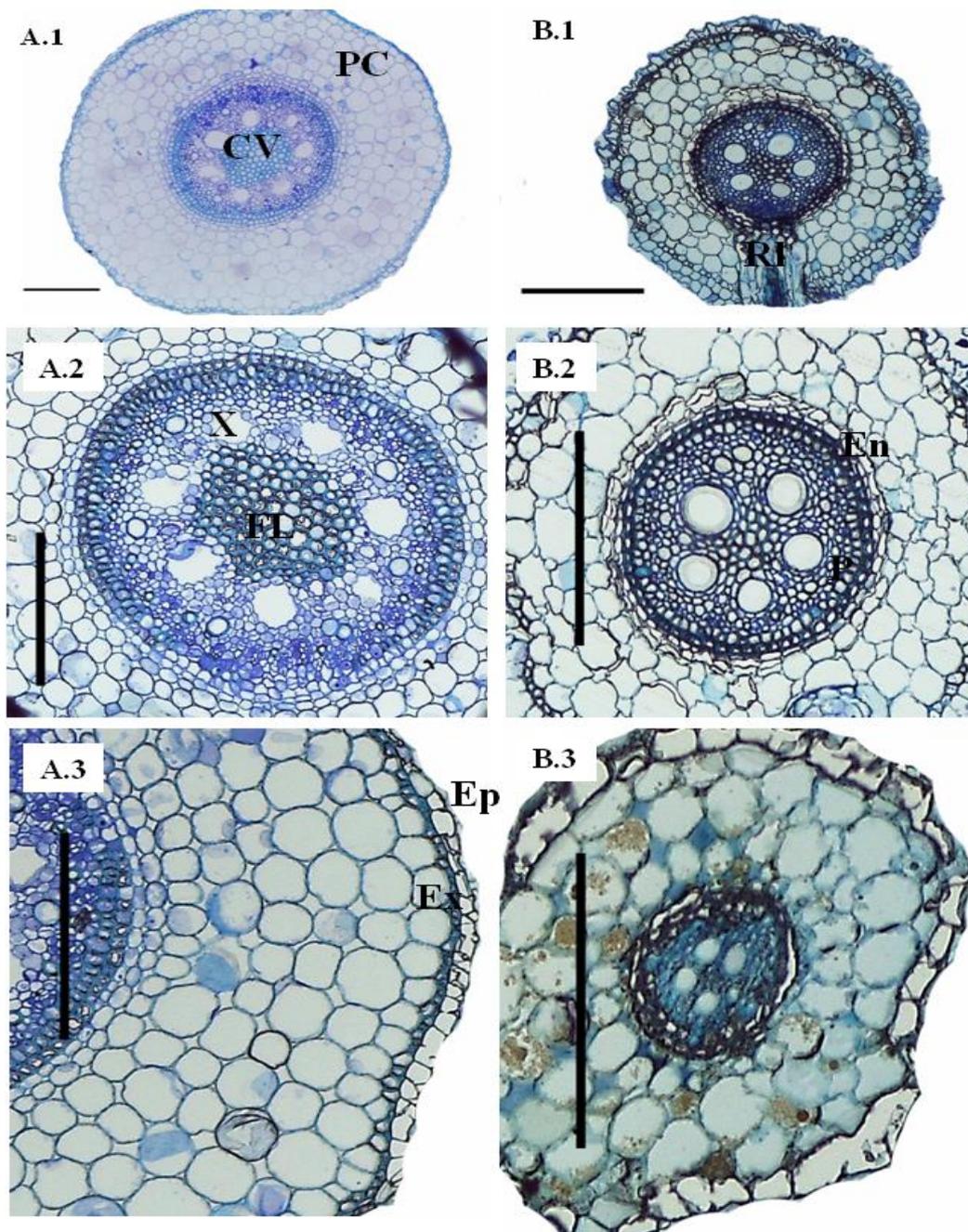


Figura 8. Raíz de *Dendrocalamus asper*. **A.1-B.3:** corante azul de Toluidina, corte transversal de raiz; **A.1, A.2, A.3:** raízes provenientes da casa de vegetação; **B.1, B.2 e B.3:** raízes provenientes do ambiente *in vitro*; **A.1:** visão geral da raiz em casa de vegetação; **B.1:** visão geral da raiz *in vitro* com detalhe para uma raiz lateral; **A.2:** Detalhe do cilindro vascular, evidenciando xilema e floema; **B.2:** cilindro vascular, evidenciando endoderme e periciclo; **A.3:** corte evidenciando epiderme e exoderme com células organizadas; **B.3:** corte de raiz *in vitro* evidenciando as células com tamanhos e formatos diferentes, heterogêneas. **Ep:** epiderme; **En:** endoderme; **F:** floema; **P:** periciclo; **CV:** cilindro vascular; **Pc:** parênquima cortical; **Rl:** raiz lateral; **X:** xilema. Escalas: **A.1 a B.3:** 200 μm .

4 CONCLUSÕES

- Plantas de *Dendrocamus asper* micropropagadas e aclimatizadas com o substrato Carolina Soil® + Areia (1:1 v/v) proporcionam altos índices de sobrevivência e incrementos em biomassa fresca e seca, apesar do substrato não propiciar a micorrização das raízes das plantas;
- O substrato Bioplant® + Areia (1:1 v/v) + FMA propicia a micorrização das raízes de plantas micropropagadas de *D. asper*, apesar dos índices serem considerados insuficientes já que induziram apenas 10% de micorrização;
- Anatomicamente, plantas micropropagadas de *D. asper* apresentam plasticidade adaptativa a transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*.

5 REFERENCIAS

APPEZZATO DA GLORIA, Beatriz; CARMELLO CARNEIRO, Sandra Maria. **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. *E-book*.

ASAYESH, Zeinab Maleki; VAHDATI, Kouros; ALINIAEIFARD, Sasan. Investigation of physiological components involved in low water conservation capacity of in vitro walnut plants. **Scientia Horticulturae**, Tehran, v. 224, n. October, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.023>

BABU, A. Giridhar; REDDY, M. Sudhakara. Dual Inoculation of Arbuscular Mycorrhizal and Phosphate Solubilizing Fungi Contributes in Sustainable Maintenance of Plant Health in Fly Ash Ponds. **Water Air Soil Pollut**, Punjab, p. 3–10, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0679-3>

BANAN, Shamah A. *et al.* Anatomical adaptations in species of Poaceae growing in Al-Ha' ir region of Riyadh , Saudi Arabia. **African Journal of Plant Science Full**, Saudi Arabia, v. 13, n. 7, p. 201–208, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJPS2019.1809>

CANESIN, Fernando Milam; BARBOSA, Rogério Zanarde. Efeito de diferentes substratos na germinação de sementes de maracujá azedo. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça-SP, v. 31, p. 1–8, 2017.

DA SILVA, Lucely Pereira *et al.* Uso de substratos alternativos na produção de mudas de pimenta e pimentão. **Colloquium Agrariae**, Viçosa-MG, v. 15, p. 104–115, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5747/ca.2019.v15.n3.a303>

DA SILVA, Rogerio Pereira; PEIXOTO, José Ricardo; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela. INFLUÊNCIA DE DIVERSOS SUBSTRATOS NO DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa DEG*) 1 THE SUBSTRATE INFLUENCE ON THE DEVELOPMENT OF SEEDLINGS OF YELLOW PASSION. [*S. l.*], p. 377–381, 2001.

DONNELLY, Danielle J.; TISDALL, Laurence. Acclimatization strategies for micropropagated plants. *In*: AHUJA, M. R. (org.). **Micropropagation of Woody Plants**. 1. ed. Grosshansdorf, Germany: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 153–166. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-94-015-8116-5>

FONSECA, Fernanda Karina Pereira da. **PRODUÇÃO DE MUDAS DE BAMBU *Guadua angustifolia Kunth (POACEAE)* POR PROPAGAÇÃO VEGETATIVA**. 2007. - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2007.

GARCÍA-RAMÍREZ, Yudith *et al.* Establecimiento in vitro de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var *Vittata*. [*S. l.*], n. October, 2016.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Holanda, v. 108, p. 105–120, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>

HENZ, Thiago Augusto *et al.* Percentual de germinação do araçazeiro vermelho sob influência do frio e de diferentes substratos. **Revista da jornada da pós-graduação e pesquisa-Congrega**, Campinas, v. 15, p. 1354–1364, 2018.

HURTADO, Ortelio *et al.* Caracterización morfológica y anatomía foliar de *Bambusa*

vulgaris en fase de aclimatización. **Biotecnología Vegetal**, Santa Clara, Cuba, v. 12, n. 3, p. 165–171, 2012. Disponível em: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/170/html>

JIANG, W. E. Í. X. Í. N.; GOU, Guangq Í. A. N.; DING, Yulong. INFLUENCES OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON GROWTH AND MINERAL ELEMENT ABSORPTION OF CHENGLU HYBRID BAMBOO SEEDLINGS. **Pakistan Journal Botany**, Pakistan, v. 45, n. 1, p. 303–310, 2013.

JIMÉNEZ, Víctor M. *et al.* In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Holanda, v. 86, n. 3, p. 389–395, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9120-4>

KAPOOR, Rupam; SHARMA, Deepika; BHATNAGAR, A. K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. **Science Horticulturae**, Netherlands, v. 116, p. 227–239, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.02.002>

LANDO, A. P. *et al.* Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated in vitro and acclimatized ex vitro. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v. 60, n. 2, p. 219–225, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0589-3>

LOCATELLI, Lucir Maria; LOVATO, Paulo Emílio. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. [*S. l.*], n. 1, p. 177–184, 2002.

LUDUVICO DE SOUSA, José Raimundo. **Propagação de bambu em viveiro em diferentes substratos, doses de hidrogel e variabilidade genética de uma coleção ex-situ**. 2018. - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2018.

LUIS, Zanderluce Gomes *et al.* Caracterização anatômica dos órgãos vegetativos de bambu (Poaceae, Bambusoideae). In: **Bambus no Brasil: da biologia a tecnologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: ICH - Instituto Ciência Hoje, 2017. p. 42–59. *E-book*.

MALAY *et al.* Bamboo Taxonomy and Distribution. [*S. l.*], v. 47, n. 08, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00005-0)

MAYER, Juliana Lischka Sampaio *et al.* Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium Hort.* (Orchidaceae) cultivadas ex vitro e in vitro. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 323–332, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000200003>

MISHRA, Yogeshwar *et al.* A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 115, p. 315–318, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.10.002>

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **PHYSIOLOGIA PLANTARUM**, United Kingdom, v. 15, p. 473–497, 1962.

NOGUEIRA, Jênifer Silva. **ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO EX SITU DE *Dendrocalamus asper* E MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guadua* (BAMBUSOIDEAE, POACEAE)** Orientador: 2018. - Brasília, [*s. l.*], 2018.

NOGUEIRA, Jênifer Silva; GOMES, Hugo Teixeira; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny

Everson. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *guadua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, Goiânia, v. 49, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4953743>.

OLIVEIRA, Reyjane Patrícia De *et al.* A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia de *Raddia Bertol.* (Poaceae : Bambusoideae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 1–19, 2008.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. **Micropropagation**, Dordrecht, p. 71–93, 1991. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_5

RAVIKUMAR, R. *et al.* Effect of endomycorrhizae (VAM) on bamboo seedling growth and biomass productivity. [*S. l.*], v. 98, p. 205–208, 1997.

RENVOIZE, Author S. A. A survey of leaf-blade anatomy in grasses V. The bamboo allies. **Springer on behalf of Royal Botanic Gardens**, New York, U.S, v. 40, n. 3, p. 509–535, 1985.

RIBEIRO, Anatólya dos Santos *et al.* CLONAL BAMBOO PRODUCTION BASED ON in vitro CULTURE. **Bioscience**, Uberlândia, v. 36, n. 4, p. 1261–1273, 2020.

RODRIGUES, Marcelo *et al.* Leaf anatomy micromorphometry plasticity and histochemistry of *Azadirachta indica* during acclimatization. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 10, 2020.

SALLES, Josiane Souza *et al.* Formação de Mudanças de Tomate em Substratos de Baixo Custo de Aquisição em Produção Agroecológica. **Cadernos de agroecologia**, Mato Grosso do Sul, v. 13, p. 1–9, 2018.

SANDHU, Manpreet; WANI, Shabir H.; JIMÉNEZ, Víctor M. In vitro propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation : a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 132, n. 1, p. 27–53, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1325-1>

SINGH, Sharbati R. *et al.* Micropropagation of *Dendrocalamus asper* { Schult . & Schult . [*S. l.*], v. 21, n. 2, p. 220–228, 2012 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0095-9>

SINGH, Sharbati R. *et al.* Micropropagation of *Dendrocalamus asper* {Schult. & Schult. F.} Backer ex k. Heyne): An exotic edible bamboo. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Karnal, Índia, v. 21, n. 2, p. 220–228, 2012 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0095-9>

SINGH, Sharbati R. *et al.* Evaluation of genetic fidelity of in vitro raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult . & Schult . F .). [*S. l.*], p. 419–430, 2013 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1084-x>

SINGH, Sharbati R. *et al.* Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo—a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Haryana, Índia, v. 19, n. 1, p. 21–41, 2013 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0147-1>

SPERANDIO, Huezer Vigano *et al.* QUALIDADE DE MUDAS DE *Eucalyptus urophylla* X

Eucalyptus grandis PRODUZIDAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS. [S. l.], p. 214–221, 2011.

VERMA, Rishabh Kumar; ARYA, Inder Dev. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates and organic manure on growth and mycorrhization of micropropagated Dendrocalamus asper plantlets and on spore production in their rhizosphere. **Mycorrhiza**, Jabalpur, p. 113–116, 1998.

VIEIRA, R. .. *et al.* LEAF ANATOMY OF THREE HERBACEOUS BAMBOO SPECIES. **Brazilian Journal of Biology**, Brazil, v. 62, p. 907–922, 2002.

WERADUWAGE, Sarathi M. *et al.* The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in Arabidopsis thaliana. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 6, n. April, p. 1–21, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00167>