



GIOVANNA CARLA TEIXEIRA

**MICROPROPAGAÇÃO E FORMAÇÃO DE MICROJARDIM
CLONAL DE *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.**

**LAVRAS - MG
2019**

GIOVANNA CARLA TEIXEIRA

MICROPROPAGAÇÃO E FORMAÇÃO DE MICROJARDIM CLONAL DE *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal para obter o título de mestre.

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani
Orientador

**LAVRAS – MG
2009**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Teixeira, Giovanna Carla.

Micropropagação e formação de microjardim clonal de
Bambusa vulgaris Schrad. ex J. C. Wendl. / Giovanna Carla
Teixeira. - 2019.

57 p. : il.

Orientador(a): Gilvano Ebling Brondani.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Bambu. 2. Multiplicação Clonal. 3. Cultivo in vitro. I.
Brondani, Gilvano Ebling. II. Título.

GIOVANNA CARLA TEIXEIRA

MICROPROPAGAÇÃO E FORMAÇÃO DE MICROJARDIM CLONAL DE *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.

MICROPROPAGATION AND CLONAL MICROGARDEN FORMATION OF *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal para obter o título de mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2019.

Gilvano Ebling Brondani	UFLA
Dulcinéia de Carvalho	UFLA
Leandro Silva de Oliveira	UFMG

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Florestais pelas oportunidades e experiências vivenciadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro, tornando possível a produção desta dissertação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani pela oportunidade, apoio e por compartilhar seu conhecimento, sempre tentando nos fazer chegar ao nosso melhor.

À Prof. Dra. Dulcinéia de Carvalho por ceder o espaço do Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, pelas contribuições na coleta, análise de dados e, sobretudo, pela paciência e disposição em ensinar.

Ao Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães e ao Laboratório de Anatomia Vegetal por toda ajuda nas análises histológicas.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais por toda ajuda durante a realização deste trabalho, em especial a Douglas, Ana Cláudia e Júlio e pelo convívio diário, tornando mais leves as dificuldades encontradas.

A minha mãe Rita por todo amor e por nunca medir esforços para a minha formação pessoal e profissional.

Ao meu pai Rodrigo pelo apoio, amor e carinho incondicionais.

A minha avó Ladir por ser exemplo de determinação e força de vontade.

À Natália, Louise, Fernanda e Paula pela amizade e suporte durante estes últimos anos.

Ao Cléber por me acompanhar em mais uma etapa.

Obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Bambus são espécies cosmopolitas de grande importância econômica devido ao rápido crescimento, adaptabilidade e ampla variedade de usos. Porém, são espécies que apresentam desafios para a propagação devido à dificuldade de obtenção de sementes, o que torna a propagação vegetativa uma alternativa para a obtenção de mudas. A micropropagação é frequentemente empregada para bambus por permitir a produção de mudas clonais em larga escala, menores variações genéticas e promover o rejuvenescimento/revigoramento dos tecidos. Entretanto, a aplicação da técnica para determinadas espécies apresenta limitações, tal como a contaminação por microrganismos endofíticos que reduzem o estabelecimento *in vitro*, podendo comprometer a sanidade do processo. Técnicas de assepsia, época de coleta dos tecidos e origem das matrizes são fatores que podem reduzir a contaminação. Na tentativa de eliminar contaminantes, alguns procedimentos podem afetar o desenvolvimento dos propágulos e proporcionar variações somaclonais. Assim, esse estudo buscou desenvolver um protocolo de micropropagação de *Bambusa vulgaris* visando a formação de um microjardim clonal. Na fase de introdução *in vitro* foi avaliada a influência das condições climáticas do mês da coleta de propágulos (abril, maio, julho, setembro, outubro, novembro, janeiro, fevereiro e março) e dos locais de origem do material (A₁- campo, A₂- vasos armazenados em casa de vegetação e A₃- casa de sombra) sobre a contaminação e o estabelecimento *in vitro*. Na etapa seguinte os explantes que foram submetidos a um período de alongamento *in vitro* e foram enraizados *ex vitro* em miniestufins, sendo avaliada a influência de três meios de cultivo (M₁- WPM, M₂- MS e M₃- água + ágar) suplementados com reguladores de crescimento e antibiótico (sulfato de estreptomicina). Após essa etapa, os explantes foram submetidos a aclimatização em casa de sombra e transferidos para um sistema semi-hidropônico visando estabelecer um microjardim clonal. Para verificar a eficácia do protocolo de clonagem foram realizadas análises de fidelidade genética por meio de marcadores moleculares ISSR e análises histológicas visando descrever a formação das raízes adventícias. No total foram estabelecidos 21,86% dos explantes e não houve interação entre os fatores origem e coleta de propágulos. A porcentagem de enraizamento foi de 36,6% e não foram observadas interações entre o uso de meios de cultura, bem como a utilização do antibiótico. No entanto, o meio de cultivo MS sem adição de antibiótico resultou em maior enraizamento (80%). Os indivíduos micropropagados apresentaram crescimento adequado e adaptação às condições *ex vitro* em microjardim clonal. As análises moleculares foram feitas utilizando 13 *primers*, dos quais 10 apresentaram adequada amplificação e permitiram a visualização de 39 bandas. As bandas apresentaram comportamento monomórfico indicando a ausência de variações genéticas. Para verificação da formação das raízes adventícias foram feitos cortes transversais que permitiram observar e descrever a formação rizogênica, a qual ocorreu a partir de células meristemáticas e na ausência de células cologênicas, indicando a formação normal de raiz. Ao final do experimento foi possível formar um microjardim clonal de *Bambusa vulgaris* mostrando a viabilidade da técnica testada.

Palavras-chave: Bambu. Multiplicação Clonal. Cultivo *in vitro*. Sazonalidade. Miniestufim. Fidelidade genética. Marcadores ISSR. Enraizamento Adventício.

ABSTRACT

Bamboos are cosmopolitan species of great importance based on its rapid growth, adaptability and wide variety of uses. However, they are challenging species for seed propagation, which makes vegetative propagation an alternative for the supply of plants. Micropropagation is applied to bamboos by allowing the production of large-scale clonal seedlings, small genetic variations and also promoting tissue rejuvenation. However, the technique application to certain species presents limitations, such as the contamination by endophytic microorganisms that may reduce *in vitro* establishment, which may compromise the process sanity. Asepsis techniques, time of tissues collection and matrices origins are factors that can reduce this contamination. However, some procedures may affect the propagules development and provide somaclonal variations. In this sense, this study sought a micropropagation protocol of *Bambusa vulgaris* in order to form a clonal microgarden. In the introduction phase, the influence of the monthly climatic conditions of propagules collection (April, May, July, September, October, November, January, February and March) and sites of material origin (A₁- field, A₂- vessels stored in a greenhouse and A₃- shade house) was evaluated on contamination and establishment. In the next stage the explants that were submitted to a period of elongation were rooted *ex vitro* in mini-incubators, evaluating the influence of three culture media (M₁- WPM, M₂- MS and M₃- water + agar) supplemented with growth regulators and antibiotic. Subsequently the individuals were submitted to acclimatization in the shade house and then transferred to a semi-hydroponic system where they formed a clonal microgarden. To verify the protocol efficacy, genetic fidelity analyzes were carried out using ISSR molecular markers and histological analyzes were made to observe the formation of adventitious roots. About 21.86% of the explants were established and there was no interaction between the origin and collection factors. The rooting percentage observed was 36.6% and no interaction was observed between the use of culture medium and the antibiotic use. However, treatment using MS culture medium in the absence of antibiotic resulted higher rooting than the others (80%). The micropropagated individuals presented adequate growth and adaptation to *ex vitro* conditions. Molecular analyzes were performed using 13 *primers*, however only 10 presented adequate amplification. These *primers* allowed the visualization of 39 discernible bands, all monomorphic bands, indicating the absence of genetic variations. To verify the adventitious roots formation were made cross sections that allowed to observe the direct rhizogenic formation occurring from meristematic cells and in the absence of callogenic cells, which allows inferring in a normal root formation. At the end of the experiment it was possible to form a clonal microgarden of *Bambusa vulgaris*, that show the viability of the technique tested.

Keywords: Bamboo. Clonal multiplication. *In vitro* culture. Seasonality. Mini-incubators. Genetic fidelity. ISSR markers. Adventitious rooting.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Bambu: aspectos gerais	11
2.1.1	<i>Bambusa vulgaris</i>	12
2.2	Micropropagação.....	14
2.2.1	Formação da raiz adventícia	18
2.2.2	Fidelidade genética	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Material vegetal	21
3.2	Micropropagação.....	21
3.2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	21
3.2.2	Alongamento <i>in vitro</i>	24
3.2.3	Enraizamento <i>ex vitro</i>	24
3.2.4	Microjardim clonal de <i>Bambusa vulgaris</i>	25
3.3	Análises histológicas	26
3.4	Fidelidade genética	27
3.4.1	Coleta do material e extrações de DNA	27
3.4.2	Marcadores ISSR.....	27
3.5	Análise de dados	28
3.5.1	Fase de estabelecimento <i>in vitro</i>	28
3.5.2	Fase de enraizamento <i>ex vitro</i>	29
3.5.3	Fidelidade genética	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Micropropagação.....	30
4.1.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	30
4.1.2	Enraizamento <i>ex vitro</i>	35
4.1.3	Formação do microjardim clonal.....	41
4.2	Análises histológicas	42
4.3	Fidelidade genética	43
5	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS	47

ANEXOS	55
---------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Bambus são espécies pertencentes à família Poaceae e subfamília Bambusoideae com grande importância comercial, uma vez que possuem múltiplos aproveitamentos. Abrangem usos tradicionais, ecológicos e industriais, como alimentação, sequestro de carbono e produção de celulose, respectivamente. Por possuírem alta plasticidade quanto às condições climáticas possuem potencial de adaptação, o que faz com que parte dessas espécies sejam cosmopolitas, ou seja, podem ser encontradas em praticamente qualquer lugar do planeta, inclusive no Brasil.

O Brasil possui grande diversidade destas espécies (nativas e exóticas), sendo o detentor da maior diversidade nativa da América Latina. Dentre as espécies exóticas encontradas no país está o *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl., que é considerada a espécie mais importante economicamente dentro do gênero *Bambusa*. Até o ano de 2015 o país possuía uma área de aproximadamente 8 milhões de hectares ocupados por espécies de bambus de interesse econômico, na qual estimam ser cultivados cerca de quarenta mil hectares de *B. vulgaris* apenas na região do nordeste. Esta área plantada está em processo de expansão devido às políticas de fomento ao cultivo de bambus aplicadas pelo governo brasileiro.

A Lei nº 12.484 institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB) a qual fomenta o cultivo por meio de ações governamentais e privadas. Esse incentivo é benéfico especialmente quando se objetiva a propagação da espécie, uma vez que bambus apresentam inconsistências na produção de sementes, fato que dificulta a propagação seminal, sendo que a propagação vegetativa é uma alternativa para a obtenção de mudas. Apesar de frequente, a propagação vegetativa de bambus por meio de métodos tradicionais como o desmembramento de touceiras, ainda não é capaz de atender à crescente demanda por mudas e às expectativas geradas com o aumento da diversificação de produtos. Portanto, ainda são necessários maiores estudos que aprimorem as técnicas de produção de mudas.

Nesse contexto, a micropropagação é frequentemente empregada, uma vez que permite a produção em larga escala, menores variações genéticas e promove o rejuvenescimento/revigoramento do tecido vegetal. A micropropagação de bambus, no entanto, ainda apresenta algumas dificuldades ao longo do processo. Dentre as mais relatadas estão a contaminação por organismos endofíticos, hiperhidricidade, escurecimento do meio por exsudação fenólica, instabilidade de velocidade de multiplicação e dificuldade de enraizamento (BANIK, 2015b; MUDOI et al., 2013; SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018). Visando

minimizar tais dificuldades diversos estudos vêm sendo realizados, os quais testam novas técnicas de assepsia, novos meios de cultivos, aplicações exógenas de reguladores de crescimento e fatores que promovem eventos como o surgimento de brotos e enraizamento adventício.

Por meio da micropropagação espera-se produzir indivíduos normais, sadios e geneticamente iguais à planta matriz. Existem técnicas de desinfestação, como uso prolongado de antibióticos, que podem provocar variações somaclonais por meio da produção de calos ou produzindo indivíduos com má formação, cujo desempenho posterior não será satisfatório. Para verificar a ocorrência desses eventos podem ser realizados testes de fidelidade genética e análises anatômicas dos tecidos após a aclimatização das mudas micropropagadas.

Nesse sentido, este estudo teve como objetivo geral desenvolver um protocolo de micropropagação de *Bambusa vulgaris* e formar um microjardim clonal. Como objetivos específicos buscou-se: i) avaliar o efeito da sazonalidade e da origem dos tecidos na fase de estabelecimento *in vitro*; ii) enraizar microplantas *ex vitro* em relação ao efeito do uso de antibiótico como agente desinfestante e o efeito de diferentes meios de cultura associados com reguladores de crescimento; iii) formar um microjardim clonal; iv) validar a fidelidade genética de microcepas por meio de marcadores moleculares ISSR; v) analisar anatomicamente os propágulos e descrever a formação de raízes adventícias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bambu: aspectos gerais

Os bambus compreendem cerca de 1.641 espécies vegetais e 120 gêneros botânicos, os quais são pertencentes a subfamília Bambusoideae e família Poaceae (SORENG et al., 2015). Ao todo, estas espécies possuem mais de 4 mil finalidades (HSIUNG, 1988; INBAR, 2012), que vão desde usos tradicionais como alimentação, fabricação de casas e artesanatos em geral, até usos mais elaborados como a geração de energia e produção de papel (LIU et al., 2012; NEGI; SAXENA, 2011). Além disso, são espécies com alto potencial de fixação de carbono contribuindo na mitigação do aquecimento global (PEREIRA, 2001; YUEN; FUNG; ZIEGLER, 2017) por estarem consideradas entre as plantas com crescimento mais rápido do mundo (CHEN et al., 2010; WANG et al., 2015).

No geral, bambus são plantas lenhosas com altura variando de 0,5 m a 40 m. Possuem sistema de rizoma subterrâneo a partir do qual emergem grupos de colmos com entrenós ocultos revestidos por paredes espessas e lenhosas e nós preenchidos. É a partir dos colmos que emergem as ramificações, folhas e flores, embora estruturas reprodutivas sejam raras nas espécies de bambu. Quando presentes, as flores são individuais, pequenas e carregadas em inflorescências longitudinais, enquanto as sementes são do tamanho de um grão de arroz. As espécies de bambus podem ser diferenciadas por meio de características morfológicas como orientação de crescimento de colmo, distância entre os nós, número de ramificações e hábitos de floração (AKINLABI; ANANE-FENIN; AKWADA, 2017; AMADA; UNTAO, 2001).

Diversas espécies de bambus ocorrem naturalmente na maioria dos continentes, com exceção da Europa e Antártida, em associação a condições ideais de precipitação, temperatura e altitude. De forma geral, as áreas de ocorrência apresentam precipitação anual variando entre 1.200 a 4.000 mm, temperatura média anual de 8 a 36°C e altitudes de até 4.300 m (BEHARI, 2006; SODERSTROM; CALDERON, 1980). Contudo, sua distribuição tem sido alterada nos últimos anos em função da introdução de espécies provenientes de programas de melhoramento em áreas distintas, inclusive na Europa. Assim, em todo mundo são cultivadas cerca de 100 espécies em escala comercial (AKINLABI; ANANE-FENIN; AKWADA, 2017).

Nesse contexto, o Brasil é detentor da maior diversidade de bambus da América Latina, com cerca de 232 espécies no total (INBAR, 2017). Estima-se que o país possua uma área de aproximadamente 8 milhões de hectares (INBAR, 2015), ocupadas principalmente por

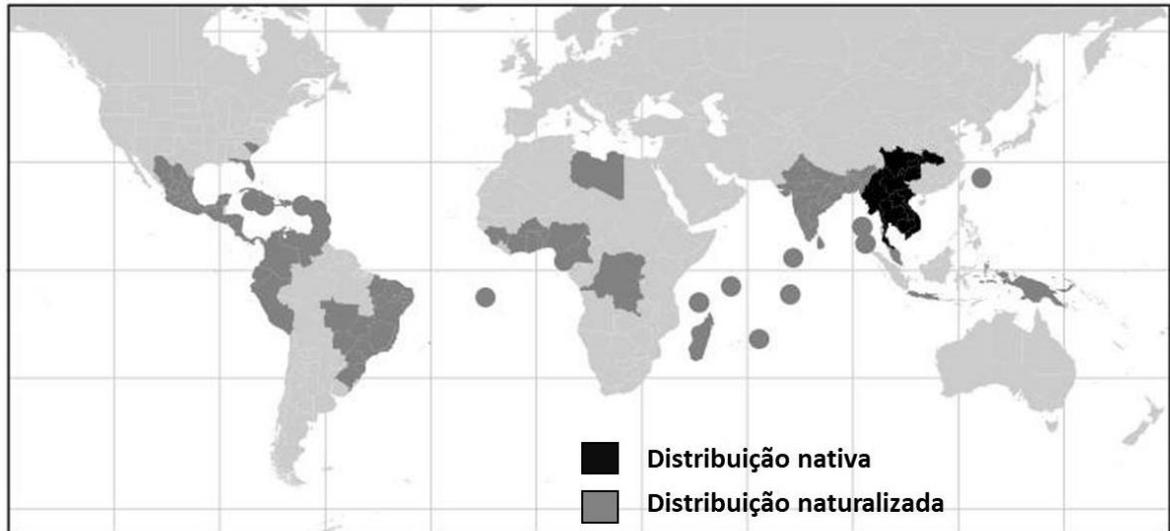
Bambusa vulgaris, *Guadua angustifolia*, *Phyllostachys aurea*, *Phyllostachys bambusoides*, *Phyllostachys nigra* e *Phyllostachys pubescens*. Apesar da grande área, o país ainda carece de informações a respeito do seu potencial produtivo (MARINHO et al., 2012). Visando desenvolver a cultura do bambu no país, em 8 de setembro de 2011 foi sancionada a Lei n 12.484, que institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB) a qual fomenta o cultivo por meio de ações governamentais e privadas (BRASIL, 2011).

Um dos principais desafios do cultivo de bambus refere-se à propagação, que em espécies vegetais podem ocorrer de forma sexuada (seminal) e assexuada (vegetativa). No entanto, nem todas as espécies de bambus produzem sementes ou as produzem de forma esporádica, com comportamento errático de reprodução no qual longos intervalos de até 120 anos são necessários para a floração (AKINLABI; ANANE-FENIN; AKWADA, 2017; RAMYARANGSI, 1988). Geralmente após a floração a planta pode apresentar mortalidade (BANIK, 2015a; SINGH et al., 2013). Assim, a utilização de técnicas vegetativas para a produção de tais espécies em escala comercial é a alternativa mais viável dentro de cenários econômicos. Dentre estas técnicas, a mais empregada ainda é o desmembramento de touceiras, que além de apresentar baixo rendimento é relativamente onerosa (GIELIS et al., 2001). Como alternativa, nos últimos anos estão sendo realizados estudos sobre a micropropagação da espécie (GOYAL; SEN, 2016; MUDOI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016; SANDHU; WANI; JÍMENEZ, 2018), uma vez que a técnica possibilita a obtenção de um grande número de plantas clonais a partir de poucas matrizes (HARTMANN et al., 2011).

2.1.1 *Bambusa vulgaris*

A espécie *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl. é considerada como a mais importante economicamente do mundo dentro do gênero *Bambusa*, sendo encontrada de forma nativa ou naturalizada em regiões temperadas, tropicais e subtropicais (FIGURA 1). Espécies naturalizadas são aquelas que conseguem se estabelecer e reproduzir em ambientes nos quais foram introduzidas (RICHARDSON; VAN WILGEN; NUNEZ, 2008). Dentre outras finalidades, são cultivadas visando atender a alta demanda por reflorestamento, recuperação de solo, proteção ambiental, construção de casas, fabricação de móveis, implementos agrícolas, artesanato e produção de papel (GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014; KOSHY; GOPAKUMAR, 2005).

Figura 1 - Distribuição mundial da espécie *Bambusa vulgaris*.



Bambusa vulgaris Schrad. ex J.C.Wendl.

Fonte: Adaptado de VORONTSOVA et al. (2016).

Segundo Banik (2015a), algumas características morfológicas dos indivíduos variam conforme a idade, conforme descreve a Tabela 1. No entanto, de forma geral podemos dizer que possuem colmos tortuosos, com entrenós frequentemente curvados, com diâmetro variando entre 5 e 10 cm e altura aproximada de 20 metros. Apresenta espessura do colmo de 1,5 cm e distância internodal variando de 25 a 35 cm (AKINLABI; ANANE-FENIN; AKWADA, 2017). Quanto à floração, seu comportamento ainda é pouco conhecido, sabendo-se apenas que apresenta comportamento esporádico com intervalos superiores a 100 anos e produzindo sementes estéreis em sua maioria. Apesar disso, a espécie apresenta alto potencial de propagação vegetativa, o que contribui para seu elevado interesse comercial. Seu cultivo está bastante difundido na região Nordeste do Brasil, principalmente nos estados do Maranhão, Pernambuco e Paraíba (LIMA NETO; RIBEIRO; BEZERRA NETO, 2009). Estima-se que nessa região são cultivados cerca de quarenta mil hectares de *B. vulgaris* para produção de pasta celulósica, os quais são colhidos mecanicamente após ciclos de três anos (BENTON 2015, INBAR, 2015).

Tabela 1- Descrição morfológica de indivíduos de *Bambusa vulgaris*.

<i>Bambusa vulgaris</i>	
Idade	Descrição morfológica
Primeiro ano	Bainha: Exceto nos 2-3 nós basais. Brotações: Um terço da copa com ramos frondosos. Apresenta brotações fortes e centrais com pequenos brotos auxiliares ao longo do colmo, exceto nos 3-4 nós basais. Colmo: Nós verdes e brilhantes. Presença de anéis de raiz adventícia nos 3-4 nós basais.
Segundo ano	Bainha: Pode apresentar nos 1-2 nós basais, coloração levemente escurecida. Brotações: Mais da metade da porção superior do colmo tem ramos grossos e folhosos. Ausência de pequenos ramos auxiliares. Colmo: envolto por folhas verdes. Anéis radiculares adventícios presentes nos nós basais começam a secar e escurecer.
Terceiro ano	Bainha: Ausente. Brotações: Ramos são mais grossos e robustos de cor verde clara e poucas folhas. As brotações começam nos 3-4 nós basais, mas formam pequenos ramos finos. Colmo: Ligeiramente verde-amarelado e sem anéis de raiz adventícia nos nós.
Quarto ano	Bainha: Ausente. Brotações: Ramos fortes e grossos apenas no terço superior do colmo, amarelados e com algumas folhas. Brotos dos nós basais quase mortos deixando uma cicatriz preta no colmo. Colmo: Tornando-se amarelado.

Fonte: Adaptado de Banik (2015a).

2.2 Micropropagação

A micropropagação consiste na utilização de partes de órgãos, tecidos ou células que, quando cultivados *in vitro*, em condições assépticas e em meio de cultura adequado, produzem novas plantas, idênticas à planta matriz (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; THORPE, 2007). Segundo Gielis (1995), por meio da micropropagação é possível produzir milhares de plantas por ano a partir de um único explante, além de permitir menores variações genéticas em relação à planta matriz, promover o rejuvenescimento/revigoramento do tecido vegetal e a sanidade das mudas (BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; NEHRA et al., 2005). No entanto, por demandar elevado investimento inicial em instalações, mão de obra qualificada e especificidade na aplicação das metodologias de acordo com o material vegetal utilizado, a micropropagação pode não ser a técnica mais adequada para determinadas espécies e condições. Ainda assim, existem muitas espécies de difícil propagação e grande interesse econômico que justificam o uso da técnica. Além disso, é muito comum que a micropropagação seja empregada visando a formação de microjardins clonais, os quais permitem a coleta de

microestacas com maior potencial de sucesso em outros procedimentos de propagação vegetativa (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A técnica da micropropagação se baseia na totipotência celular que é a capacidade da célula de, sob estímulos específicos, originar células diferenciadas e originar um organismo completo (FALEIRO; ANDRADE; REIS, 2011). Nesse sentido, é possível induzir a ocorrência de alguns eventos como brotação de ramos axilares e enraizamento por meio da aplicação exógena de reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento mais utilizados para o controle morfogênico são citocininas e auxinas, que podem ser utilizadas isoladamente ou combinadas, dependendo do objetivo, da espécie e dos níveis endógenos encontrados no material utilizado (BANIK, 2015b; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SINGH et al., 2004). De forma geral e simplificada, as auxinas são utilizadas para a formação de raízes, enquanto as citocininas promovem a indução de gemas. As concentrações utilizadas para promover o estímulo desejável variam de acordo com a espécie e o com o material utilizado como explante, uma vez que a concentração os hormônios produzidos pela planta podem influenciar. Dentre as citocininas mais utilizadas estão a benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (KIN), enquanto as auxinas mais comuns são o ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB) (BANIK, 2015b; GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Durante a micropropagação ocorrem cinco fases que vão desde a escolha das matrizes até a aclimatização das mudas produzidas no campo. A primeira fase, conhecida como fase 0 é a fase de escolha e preparo das matrizes e desinfestação dos explantes, nessa fase busca-se selecionar os indivíduos de interesse e torna-los os mais vigorosos possíveis. Para isso, já nas matrizes podem ser aplicadas técnicas de nutrição e de combate a doenças, além de infestação de fungos e bactérias. Nesse sentido, matrizes que se encontram em ambientes controlados costumam apresentar maior vigor frente àquelas que estão em campo (BELTRAME, 2013; ROCA; MROGINSKI, 1991; XAVIER et al., 2013).

Ainda nessa fase, são coletadas brotações, as quais serão reduzidas a explantes que passarão por um processo de limpeza e desinfestação. Esta limpeza pode ocorrer seguindo procedimentos diversos, que variam de acordo com as necessidades de cada espécie, uma vez que espécies com taxas de contaminação elevadas necessitam de técnicas e reagentes mais agressivos que permitam maior eficiência do que aquelas com baixa contaminação. Dentre os reagentes utilizados estão etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio, cloreto de mercúrio, ácido

clorídrico, cloreto de benzalcônio e peróxido de hidrogênio (BRONDANI et al., 2013; SOUSA et al., 2008; TORRES; CALDAS; BUSO, 1998; XAVIER et al., 2013).

Na fase seguinte, fase 1, busca-se o estabelecimento do material. Para isso, os explantes desinfestados são inoculados, geralmente de forma individual e sob câmara de fluxo laminar, em recipientes contendo o meio de cultura com solução nutritiva adequada para a espécie. Existem diversos meios de cultura cujas composições estão consagradas e atendem às necessidades de várias espécies, como é o caso do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MC COWN, 1981), JADS (CORREIA et al., 1995) entre outros, porém é possível realizar adaptações e elaboração de novos meios (RIBEIRO et al., 2016). Após inoculados os explantes, os recipientes são transferidos para ambientes com condições de temperatura e luminosidade controladas onde permanecem por um prazo determinado até que possam ser avaliados, geralmente por cerca de 30 dias. Explantes vivos que não apresentam contaminação fúngica, bacteriana e/ou oxidação são considerados estabelecidos e estão aptos para serem submetidos a próxima fase (BELTRAME, 2013; TORRES; CALDAS; BUSO, 1998; XAVIER et al., 2013).

A fase 2 é a fase de multiplicação, onde os explantes são transferidos para meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento que induzem a emissão de brotos. Nessa fase é comum a utilização de citocininas e auxinas, buscando uma concentração maior de citocininas a fim de estimular tais brotações. Ao final de períodos pré-estabelecidos, que podem variar de acordo com a necessidade de cada material, esses explantes são subcultivados e repicados para novos recipientes contendo o mesmo meio, porém fresco. A multiplicação pode ocorrer só ou concomitante com a fase 3, fase de alongamento, que busca o alongamento dos brotos multiplicados (SILVEIRA et al., 2001; XAVIER et al., 2013).

Por fim, ocorre a fase 4 que corresponde ao enraizamento e aclimatização. Existem diferentes formas de conduzir essa fase, tanto *in vitro* quanto *ex vitro* (XAVIER et al., 2013). No enraizamento *in vitro* os indivíduos são transferidos para meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento visando a formação de raízes adventícias. Para essa finalidade, também são aplicadas auxinas e citocininas, porém em uma proporção de auxinas maior. Já no enraizamento *ex vitro*, os indivíduos são transferidos para recipientes contendo composições diversas de substrato em condições mais próximas daquelas em que se desenvolvem as mudas. Alguns pesquisadores defendem a utilização desta última técnica, uma vez que elas facilitam a transição das condições de laboratório para as condições de campo, permitindo uma maior aclimatização e conseqüentemente uma maior taxa de sobrevivência. Em ambas as técnicas,

após a emissão das raízes as mudas são transferidas para tubetes contendo o substrato adequado e levadas para casa de sombra com iluminação reduzida em 50% das condições externas, onde permanecem por alguns dias até que sejam levadas para a área de pleno sol para a rustificação. Após rustificadas podem ser despachadas para o plantio (BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012, 2017a).

No decorrer das fases da micropropagação podem ocorrer situações que dificultem sua aplicação podendo até chegar a reduzir a porcentagem de sucesso. Dentre essas situações estão a contaminação por microrganismos como fungos e bactérias, exsudação fenólica, instabilidade de velocidade de multiplicação, dificuldade de enraizamento, má formação de raízes, mutações genéticas e várias outras. Para minimizá-las, diversos estudos vêm sendo realizados buscando elaborar protocolos reprodutíveis de micropropagação de diversas espécies (BANIK, 2015b; FURLAN et al., 2018; MUDOI et al., 2013; SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018).

Considerando estas situações, destaca-se a contaminação microbiana, que pode ser endofítica ou epifítica. Microrganismos endofíticos são aqueles encontrados no interior de tecidos e órgãos saudáveis do vegetal e que, quando *in vivo*, não costumam produzir efeitos negativos aparentes nos hospedeiros. No entanto, quando cultivados *in vitro* os explantes podem sofrer com a contaminação por esses microrganismos, já que eles possuem taxas de crescimento superiores às do explante passando assim a competir por nutrientes presentes no meio de cultivo. Nessas mesmas condições, tal competição também ocorre com microrganismos epifíticos, que são aqueles adquiridos de forma externa, provavelmente durante a manipulação incorreta ou assepsia ineficiente (CARVALHO; RODRIGES; SANTOS, 2012; DANTAS, 2017).

A presença de microrganismos contaminantes na micropropagação é indesejada, uma vez que, segundo a Lei nº 10.711 de 5 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, as mudas produzidas via propagação convencional ou micropropagação, visando fins comerciais devem estar isentas de contaminantes para serem consideradas sanitariamente seguras (BRASIL, 2003). Na busca pela eliminação dos contaminantes podem ser realizadas técnicas ou utilizados agentes desinfestantes que comprometam o sucesso da multiplicação clonal.

Como forma de comprovar a efetividade da micropropagação podem ser realizados testes de fidelidade genética, por meio de marcadores moleculares, garantindo o processo de clonagem em que se baseia a técnica. Bem como análises anatômicas que permitem visualizar a formação e o tipo dos tecidos celulares, confirmando o adequado desenvolvimento dos órgãos

o que permite inferir o bom desempenho de suas funções e, conseqüentemente, do vegetal. Tais análises são frequentemente empregadas sobretudo quando se deseja verificar o processo de enraizamento adventício, que constitui etapa chave para o sucesso da micropropagação.

2.2.1 Formação da raiz adventícia

As raízes são fundamentais para a realização das funções de um vegetal uma vez que sustentam a planta no solo, absorvem água e nutrientes e armazenam fotoassimilados (BELLINI; PACURAR; PERRONE, 2014). A sua conformação original pode apresentar alterações em resposta às condições ambientais e à possíveis estresses, dando origem a raízes laterais e raízes adventícias (FRANCO et al., 2011). As raízes laterais e adventícias diferem no processo de formação. As laterais são formadas a partir de células de raízes pré-existentes enquanto que as adventícias são provenientes de células distintas, como do caule, folhas ou até mesmo células de raízes maduras (VILLACORTA-MARTÍN et al., 2015). A formação de raízes adventícias é relativamente importante para a propagação vegetativa de espécies florestais, uma vez que as espécies de alto potencial industrial costumam apresentar dificuldades de enraizamento (NEGISHI et al., 2014).

A formação de raízes adventícias pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e expressão. Na fase de indução ocorrem as modificações moleculares e bioquímicas que possibilitarão alterações anatômicas. Na fase de iniciação ocorre a multiplicação celular e surgimento dos primórdios radiculares. Finalmente na fase de expressão ocorre o crescimento dos primórdios radiculares e emergência da raiz (GOULART et al., 2014; HARTMANN et al., 2011; LI et al., 2009). O processo de enraizamento adventício envolve múltiplos fatores, tais como concentrações de reguladores de crescimento, luminosidade, status nutricional e aspectos genéticos (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009).

As raízes adventícias podem ser formadas por organogênese direta de tecidos de células diferenciadas, como do câmbio vascular ou por organogênese indireta através da indução de calos. No entanto, a presença de calo na região de conexão vascular pode trazer problemas uma vez que está é uma região frágil, podendo facilmente comprometer a funcionalidade da raiz (LI et al., 2009). Além disso, segundo Bardini et al. (2003) a presença de calos também proporciona maior ocorrência de variação somaclonal.

Nos bambus, as raízes adventícias compõem grande parte do sistema radicular. Segundo Luis et al. (2017), a estrutura anatômica destas raízes de bambus inicia-se externamente pela a

epiderme, passando pelo córtex e cilindro vascular, até a medula. Ainda segundo esses autores, a epiderme é a camada de células mais externa, cujas células são alongadas e com medidas semelhantes, quando vistas a partir de seção transversal. As células epidérmicas podem possuir forma, tamanho e espessura da parede diferentes entre as espécies de bambu. A região do córtex é formada por células parenquimáticas, podendo ocorrer aerênquima em determinadas espécies (LUIS et al., 2017; RAECHAL; CURTIS, 1990; RAO, 1985). Apresenta periciclo composto por células parenquimáticas ou esclerenquimáticas, que vão até a região do floema. O tecido vascular compreende a região interna da raiz, na qual os feixes vasculares podem estar dispostos de forma a formar um cilindro vascular concêntrico ou podem estar dispersos. Em algumas espécies, pode ocorrer a existência de medula oca (LUIS et al., 2017; RAECHAL; CURTIS, 1990; SILVA FILHO, 2006)

2.2.2 Fidelidade genética

Testes de fidelidade genética constituem ferramenta importante para a comprovação de ensaios de clonagem. Por meio deles é possível identificar se durante o processo ocorreram mutações no DNA que comprometeram o resultado e produziram indivíduos diferentes daqueles selecionados. Tais testes podem ser realizados com relativa facilidade por meio de marcadores moleculares (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011; CAIXETA et al., 2009; PENG; ZHANG; ZHANG, 2015; WANG; WANG, 2012).

Marcadores moleculares são fenótipos moleculares advindos de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. De forma mais clara, são características de DNA, herdadas geneticamente, que diferenciam dois ou mais indivíduos, permitindo gerar uma grande quantidade de informações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998). Por acessarem diretamente o genoma eles evitam o efeito ambiental e, portanto, os erros de identificação (BORBA et al., 2005). Além dos testes de pureza genética, também são utilizados para detecção de genes de resistência a doenças e pragas, estudos de diversidade, desenvolvimento de mapas genéticos, seleção de genitores, estudos de interação genótipo-ambiente, entre outros (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Muitos dos marcadores moleculares importantes para a genética de plantas são obtidos por meio da tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction). Esta tecnologia consiste na síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um determinado segmento de DNA. A cada ciclo este segmento é duplicado, criando uma reação em cadeia,

uma vez que cada molécula sintetizada pode servir de molde para o próximo ciclo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A reação de PCR é realizada em três fases: a desnaturação, o anelamento de *primers* e a polimerização da cadeia nucleotídica. Na primeira fase, o duplo filamento de DNA alvo é desnaturado por meio da elevação de temperatura, que pode variar entre 92 a 95°C. A temperatura é rapidamente reduzida na fase seguinte para valores entre 35 a 60°C, variando de acordo com o tamanho e a sequência do *primer* utilizado. Esta fase permite a união de cada primer com as sequências complementares da região alvo. Na fase final do ciclo, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase possa adicionar nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, gerando assim uma extensão do fragmento de DNA. Este ciclo se repete por várias vezes, de acordo com a finalidade, dobrando a quantidade de DNA da sequência-alvo a cada ciclo, o que permite iniciar a reação com pequenas quantidades. São exemplos de marcadores obtidos por meio de PCR o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), microssatélites SSR (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), entre outros (FALEIRO, 2007; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica molecular de detecção de marcadores ISSR é uma das baseadas em PCR, que não necessita de informações prévias da sequência de DNA, se destacando assim, como alternativa eficiente para caracterização de genomas complexos. Consistem em fragmentos de DNA com 100 a 3.000 pb, amplificados, utilizando um único primer com 16 a 20 pb, via PCR. Esses fragmentos são flanqueados em ambas extremidades por sequências de microssatélites (FALEIRO, 2007; NG; TAN, 2015). Possui como vantagem a geração de um grande número de bandas informativas por reação, porém, por apresentar controle genético dominante, não diferencia indivíduos heterozigotos de homozigotos (FALEIRO, 2007; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para a realização dos experimentos foram coletadas brotações de matrizes de *Bambusa vulgaris* com o mesmo material genético cultivado em três diferentes ambientes: A₁- matriz localizada no campus da Universidade, A₂- muda conduzida em vasos suspensos em casa de vegetação e A₃- mudas conduzidas em vasos em casa de sombra com sistema de microaspersão. A fonte primária dos explantes, a planta matriz, está localizada no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), mais precisamente na estação experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). As demais fontes de propágulos são resultantes de experimento prévio realizado no ano de 2016 (KOZEN et al., 2016, dados não publicados), no qual foram coletados da planta matriz colmos seccionados para o enraizamento em vasos plásticos contendo areia.

3.2 Micropropagação

3.2.1 Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro* foram testados os efeitos dos locais de coleta de propágulos e da sazonalidade. Foram considerados três locais de coleta (A₁- matriz localizada no campus da Universidade, A₂- muda conduzida em vasos suspensos em casa de vegetação e A₃- mudas conduzidas em vasos em casa de sombra com sistema de microaspersão) e nove inoculações a partir de coletas de propágulos realizadas em meses diferentes (abril, maio, julho, setembro, outubro, novembro, janeiro, fevereiro e março) de 2017 até 2018. Para efeitos de sazonalidade foram consideradas as condições climáticas de coleta: temperatura média nos 30 dias anteriores à coleta (°C), temperatura mínima nos 30 dias anteriores à coleta (°C), temperatura máxima nos 30 dias anteriores à coleta (°C) e precipitação média nos 30 dias anteriores à coleta (mm). Os dados climatológicos foram obtidos pelo site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) segundo a estação meteorológica OMM:83687, localizada em Lavras, Minas Gerais.

Dentre os locais de coleta, o material proveniente diretamente do campo passou apenas pela poda de alguns colmos a fim de estimular a brotação lateral. Os materiais dos vasos

passaram semanalmente por fertirrigação (TABELA 2) e controle de daninhas por meio de arranque manual. Entretanto, o que diferenciou os dois locais de acondicionamento dos vasos foi a forma de irrigação e exposição do material à água e a incidência de irradiação solar. Enquanto o material acondicionado na casa de vegetação foi irrigado apenas uma vez ao dia e diretamente no substrato, evitando o contato da água com as partes aéreas; o material da casa de sombra foi exposto a irrigações automáticas diárias por meio de microaspersão e a um sombreamento de 50%, obtido com a utilização de sombrite.

Tabela 2 - Composição da solução nutritiva para a fertirrigação (adubação de crescimento) de mudas de *Bambusa vulgaris*.

Nutriente	Solução Nutritiva* mg L ⁻¹	Peso molecular
N-NO ₃ ⁻	60,00	14,00
N-NH ₄ ⁺	30,00	14,00
P	12,00	30,97
Ca	30,00	40,08
K	80,00	39,10
S	18,92	32,06
Mg	12,00	24,31
Cu	0,10	63,54
Fe	2,00	55,85
Mo	0,02	95,94
Mn	1,60	54,94
Zn	1,96	65,37
B	1,08	10,81

Fonte de macro e micronutriente	FQ / PM	Solução estoque			
		mg L ⁻¹	mg 10 mL ⁻¹	g 10 mL ⁻¹	g 500 mL ⁻¹
Nitrato de potássio	KNO ₃ / 101,10	206,8500	206,8500	0,20685	10,3425
Monoamônio fostato	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	44,5700	44,5700	0,04457	2,2285
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃ / 80,04	140,5000	140,5000	0,1405	7,0250
Sulfato de cálcio	CaSO ₄ .2H ₂ O / 172,17	87,1817	87,1817	0,0871817	4,3591
Nitrato de cálcio	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	57,1800	57,1800	0,05718	2,8590
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	121,6680	121,6680	0,121668	6,0834
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O / 169,01	4,9223	4,9223	0,0049223	0,2461
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,3929	0,3929	0,0003929	0,0196
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	9,9520	9,9520	0,009952	0,4976
Sódio – EDTA	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	13,3110	13,3110	0,013311	0,6656
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,0504	0,0504	0,000504	0,0025
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O / 287,54	8,6000	8,6000	0,0086	0,4300
Ácido bórico	H ₃ BO ₃ / 61,83	6,2000	6,2000	0,0062	0,3100

Nota: O pH foi ajustado para 6,2(±1) à 25°C com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), ambos à 1M. FQ = fórmula química, PM = peso molecular.

Fonte: Adaptado de Brondani et al. (2014).

Após a coleta, as brotações (FIGURA 2a) tiveram as bainhas retiradas (FIGURA 2b) e seus resquícios cuidadosamente raspados (FIGURA 2c) com o auxílio de estilete, a fim de expor a gema facilitando a assepsia. O material foi então lavado com água esterilizada e detergente neutro. Logo, os segmentos foram reduzidos à explantes nodais de aproximadamente 2 cm (FIGURA 2d e 2e), os quais foram imersos em solução contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) à 50% (água:hipoclorito, v/v, 2,0-2,5% de cloro ativo) durante dez minutos. Passado esse

período de imersão os explantes foram levados para câmara de fluxo laminar onde passaram por quatro lavagens com água deionizada e esterilizada, a fim de eliminar quaisquer resíduos de hipoclorito de sódio.

O meio de cultura foi preparado com água deionizada, adicionando-se 6 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁/ 342,30g). O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e/ou NaOH (0,1M) previamente à adição de ágar ao meio nutritivo. A solução foi distribuída nos tubos e então autoclavada a temperatura de 127° C (≈ 1,5 kgf cm⁻²) durante 20 minutos.

Após o procedimento de assepsia, os segmentos nodais foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), os quais foram vedados com filme plástico à base de policloreto de vinila (PVC). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C±1°C, sob irradiação de 40 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Figura 2- Etapas da assepsia de explantes de *Bambusa vulgaris*. a- brotações coletadas, b- bainhas retiradas, c- resquícios cuidadosamente raspados com o auxílio de estilete, d- explante e e- explantes prontos para ir para câmara de fluxo laminar.



Legenda: Barra = 1 cm.

Fonte: Do autor (2018).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3×9), sendo os fatores constituídos pelas 3 origens do material (A₁- matriz localizada no campus da Universidade, A₂- muda conduzida em vasos suspensos em casa de vegetação e A₃- mudas conduzidas em vasos em casa de sombra com sistema de microaspersão) e nove diferentes meses de coletas de propágulos (abril, maio, julho, setembro, outubro, novembro, janeiro, fevereiro e março). As avaliações ocorreram 30 dias após a inoculação. Foram

avaliados o estabelecimento *in vitro* de explantes, a contaminação fúngica e a perda de material ocasionada por eventos de oxidação e/ou bactéria.

3.2.2 Alongamento *in vitro*

Os segmentos nodais estabelecidos anteriormente foram transferidos para frascos de vidro (72×72×100 mm) contendo 40 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido, suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,5 mg L⁻¹ ácido naftalenoacético (ANA). O meio de cultura foi preparado com água deionizada, 6 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁/ 342,30g). Após a suplementação com os reguladores de crescimento, o valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e/ou NaOH (0,1M). Foi adicionado ágar ao meio nutritivo e então a solução foi distribuída nos frascos. Os frascos foram autoclavados à temperatura de 127° C (≈ 1,5 kgf cm⁻²) durante 20 minutos. Os explantes foram subcultivados para novos frascos a cada 21 dias.

Após o quinto subcultivo, metade dos explantes apresentaram contaminação bacteriana e estes foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS líquido suplementado com 200 mg L⁻¹ de antibiótico a base de sulfato de estreptomicina, nos quais foram mantidos por uma semana. O antibiótico foi esterilizado por meio de filtração (Filtro Millipore) e aplicado em câmara de fluxo laminar. Passado esse período, todos os explantes (com e sem contaminação bacteriana) foram devidamente identificados e subcultivados para tubos de ensaio que continham o mesmo tratamento da fase inicial de alongamento, porém líquido. Após 15 dias, os explantes foram subcultivados em meio de cultura MS semissólido, suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ ANA. Ao todo, foram realizados 16 subcultivos visando a manutenção e alongamento dos explantes.

3.2.3 Enraizamento *ex vitro*

Nesta etapa foram utilizados 30 explantes provenientes da etapa anterior de alongamento. Tais explantes foram identificados e divididos em dois grupos: indivíduos que foram tratados com antibiótico e ausência dessa aplicação. Cada grupo foi novamente dividido em três subgrupos os quais transferidos para frascos contendo meios de enraizamento diferentes.

Foram testados três tipos de meio de cultura semissólidos para estimular o enraizamento, M₁- Wood Plant Medium, WPM (LLOYD; MC COWN, 1981); M₂- MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e; M₃- água deionizada e ágar. Todos os meios foram suplementados da mesma forma, com 1 g L⁻¹ de carvão ativado, 2 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,5 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP). Os meios de cultura foram preparados com água deionizada, 6 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁/ 342,30g). Após a suplementação com os reguladores de crescimento, o valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e/ou NaOH (0,1M). Foi adicionado ágar ao meio nutritivo e então a solução foi distribuída nos frascos. Os frascos foram autoclavados à temperatura de 127° C (≈ 1,5 kgf cm⁻²) durante 20 minutos. Os explantes permaneceram por sete dias em meio de enraizamento e depois foram submetidos ao enraizamento *ex vitro* em sistema de miniestufim.

Para o enraizamento *ex vitro* os explantes foram transferidas para bandejas de células (12,5 mL por célula) contendo substrato composto pela mistura de vermiculita média, material orgânico a base de casca de pinus decomposta e fibra de coco (1:1:1, v/v). A fim de manter a umidade relativa do ar elevada, os tubetes foram cobertos com polietileno, formando um miniestufim (BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012, 2017a) o qual foi mantido em sala de crescimento.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3×2), sendo os fatores constituídos pelos 3 diferentes meios de cultura (M₁- WPM, M₂- MS e M₃- água + ágar) e utilização de antibiótico (ausência e presença), com cinco repetições de 1 explante por repetição. Os explantes foram acondicionados nesse sistema durante 45 dias e, ao fim desse período, foram avaliados quanto a sobrevivência, enraizamento, número de folhas e raízes.

3.2.4 Microjardim clonal de *Bambusa vulgaris*

Os explantes foram transferidos para casa de sombra, com sombrite reduzindo a iluminação natural em 50%, para aclimatização durante 20 dias. Após o processo de aclimatização, foram transferidas para uma estrutura de canaletão visando a formação do microjardim clonal em condições *ex vitro*.

O canaletão consistiu em uma estrutura suspensa com irrigação periódica e por gotejamento. O substrato utilizado para preencher essa estrutura e acondicionar as microcepas

foi a areia. Junto a irrigação, periodicamente foram adicionados os nutrientes mencionados na Tabela 3, permitindo uma fertirrigação frequente.

Tabela 3 – Solução nutritiva utilizada em sistema de canaletão para *Bambusa vulgaris*.

Fonte de Macro e Micronutriente	FQ/PM	mg L ⁻¹	g L ⁻¹	g 1000 L ⁻¹
Nitrato de cálcio	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O/ 236,15	589,1966	0,5892	589,1966
Monoamônio fosfato	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	11,4272	0,0114	11,4272
Cloreto de potássio	KCl/ 74,56	171,6215	0,1716	171,6215
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O/ 246,48	304,1711	0,3042	304,1711
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O/ 169,01	4,6144	0,0046	4,6144
Ácido bórico	H ₃ BO ₃ / 61,83	5,7197	0,0057	5,7197
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O/ 287,54	4,3987	0,0044	4,3987
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O/ 249,68	0,3929	0,0004	0,3929
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O/ 241,95	0,1261	0,0001	0,1261
Ferrilene®	-	33,3000	0,0333	33,3000

Fonte: Do autor (2019).

3.3 Análises histológicas

Com o objetivo de analisar o processo de formação das raízes adventícias foram realizados cortes transversais na raiz, caule e região da inserção da raiz no caule. As análises foram feitas em um indivíduo cujas características representavam a média do conjunto total das microplantas. Esse indivíduo, seccionado em regiões de colmo, interseção da raiz no colmo e raiz, foi fixado em solução de FAA70 (JOHANSEN, 1940) por três dias e então transferido para o álcool 70% por 24 horas. Após esse período, foi feita a desidratação em série etílica a 80, 90 e 100% em intervalos de 30 minutos e deixado em solução de resina 1:1 (resina: álcool) por 24 horas. Por fim, o material foi deixado por duas horas em resina pura e então foi emblocado em historesina.

Os cortes foram realizados em micrótomo de mesa regulado na espessura de 8 µm e as seções coradas com azul de toluidina – pH 4,7. As lâminas semipermanentes foram confeccionadas usando verniz vitral Acrilex® e foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico cujas imagens foram capturadas em escala micrométrica. Uma análise descritiva em cada amostra foi realizada visando identificar a disposição dos tecidos da região da emergência da raiz adventícia e evidências de zonas meristemáticas.

3.4 Fidelidade genética

3.4.1 Coleta do material e extrações de DNA

Folhas jovens foram coletadas de microcepas que se estabeleceram no canaletão e também da planta matriz em campo, visando comparar suas informações genéticas e então verificar a fidelidade genética.

As extrações de DNA foram realizadas de acordo com protocolo adaptado de Ferreira e Grattapaglia (1998). Em um cadinho, foram maceradas amostras contendo 50 mg de tecido foliar, com o auxílio de nitrogênio líquido, polivinilpirrolidona (PVP-P), tampão de extração CTAB 2% e β -mercaptoetanol. Em microtubos, as amostras foram incubadas por 40 minutos em banho seco, com agitação manual periódica (a cada 10 minutos). Após este período foram adicionados às amostras 600 μ L de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), submetendo-as novamente à agitação manual para formar uma emulsão homogênea. Em seguida foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos. Transferiu-se 500 μ L do sobrenadante para novos tubos contendo 450 μ L de isopropanol gelado, que foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 μ L de etanol 70%. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram deixados na bancada *overnight* para a secagem à temperatura ambiente. Finalmente as amostras foram ressuspensas em tampão tris-EDTA pH 8,0.

As amostras foram avaliadas quanto à qualidade em gel de agarose 1,0 %, corado com GelRedTM (Uniscience), diluído a 0,2% em relação à concentração original do fabricante.

3.4.2 Marcadores ISSR

Para avaliar a diversidade dos materiais genéticos, foram utilizados 13 *primers*, cujas especificações estão apresentadas na Tabela 4.

As reações de ISSR foram preparadas em microplacas (PCR-96-Axygen Scientific), sendo que em cada poço foram colocados 3 μ L de DNA (padronizado a 20 ng μ L⁻¹ para todas as amostras) e 10 μ L de mix de reação [1,5 mM de tampão de PCR Phoneutria®, 1,5 mM de dNTP, 1 U de Taq polimerase Phoneutria® (5 U μ L⁻¹), Taq diluente (à base de BSA e Tris HCl) e 0,2 mM de cada *primer*, completando o volume final com água ultrapura (4,2 μ L)].

Tabela 4 – Especificações dos *primers* ISSR utilizados nas análises de fidelidade genética de indivíduos de *Bambusa vulgaris*.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
John	(AG) ₇ -YC
Manny	(CAC) ₄ -RC
Mao	(CTC) ₄ -RC
Omar	(GAG) ₄ -RC
Chris	(CA) ₇ -YG
Becky	(CA) ₇ -YC
UBC809	(AG) ₈ -G
UBC827	(AC) ₈ -G
UBC835	(AG) ₈ -YC
UBC840	(GA) ₈ -YT
UBC842	(GA) ₈ -YG
UBC848	(CA) ₈ -RG
UBC898	(CA) ₆ -RY

Nota: R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).

Fonte: Do autor (2019).

As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700, nas seguintes condições: 2 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 37 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C e 1 minuto a 72°C; e extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% e corado com GelRed™ (Uniscience). As amostras foram distribuídas nas microplacas de forma que a matriz ocupou o primeiro poço seguida pelos 10 indivíduos micropropagados numerados de acordo com a identificação do canaletão.

3.5 Análise de dados

3.5.1 Fase de estabelecimento *in vitro*

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett, Shapiro-Wilk e análise de variância (ANOVA) ($P < 0,05$). Para todas as variáveis respostas, os dados foram transformados utilizando a equação $(X+1)^{0,5}$. De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Além disso, foi realizado um teste de correlação de Pearson ($P < 0,05$) a partir dos dados de temperatura máxima, temperatura média, temperatura mínima e precipitação média.

3.5.2 Fase de enraizamento *ex vitro*

A partir dos dados de sobrevivência e enraizamento (presença ou ausência) e de número de folhas e raízes emitidas por explante (variáveis resposta), em cada uma das combinações entre as variáveis explanatórias meios de cultura (M₁- WPM, M₂- MS e M₃- água + ágar) e antibiótico (presente ou ausente), foram realizados os testes de Bartlett, Shapiro-Wilk e análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade de erro ($P < 0,05$). Os dados foram transformados utilizando a equação $(X+0,5)^{0,5}$ para a variável resposta sobrevivência e $(X+1)^{0,5}$ para o enraizamento.

3.5.3 Fidelidade genética

Os fragmentos amplificados foram comparados com marcador de peso molecular conhecido Ladder 1Kb Plus. Utilizando apenas bandas bem definidas, foi avaliado o monomorfismo existente em cada banda.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Micropropagação

4.1.1 Estabelecimento *in vitro*

Dos 1816 explantes inoculados ao longo de um ano, apenas 21,86% foram estabelecidos. A contaminação fúngica foi responsável pela eliminação de 39% dos explantes. Considerando a época do ano foi observado um intervalo de 9 a 31% de estabelecimento, sendo maio e fevereiro os meses de menor e maior estabelecimento, respectivamente. A presença de fungos apresentou uma importância de 50%, sendo que a presença de bactérias, oxidação e mortalidade não foram avaliadas isoladamente. O resumo dos resultados, bem como as variáveis analisadas estão no Anexo I.

A ocorrência de fungos nos explantes foi significativamente influenciada pela origem do material, época de coleta e interação entre esses fatores (TABELA 5). Nesse sentido, os explantes que apresentaram maior ocorrência de fungos foram inoculados no mês de abril e oriundos da casa de sombra (76,8%) (FIGURA 3). Enquanto que a menor ocorrência foi observada nos explantes inoculados no mês de novembro e oriundos do campo (1,9%) (FIGURA 3). A elevada contaminação por fungos tem sido relatada por outros autores (BRONDANI et al., 2017b; CARVALHO; RODRIGES; SANTOS, 2012; DANTAS, 2017; FURLAN et al., 2018).

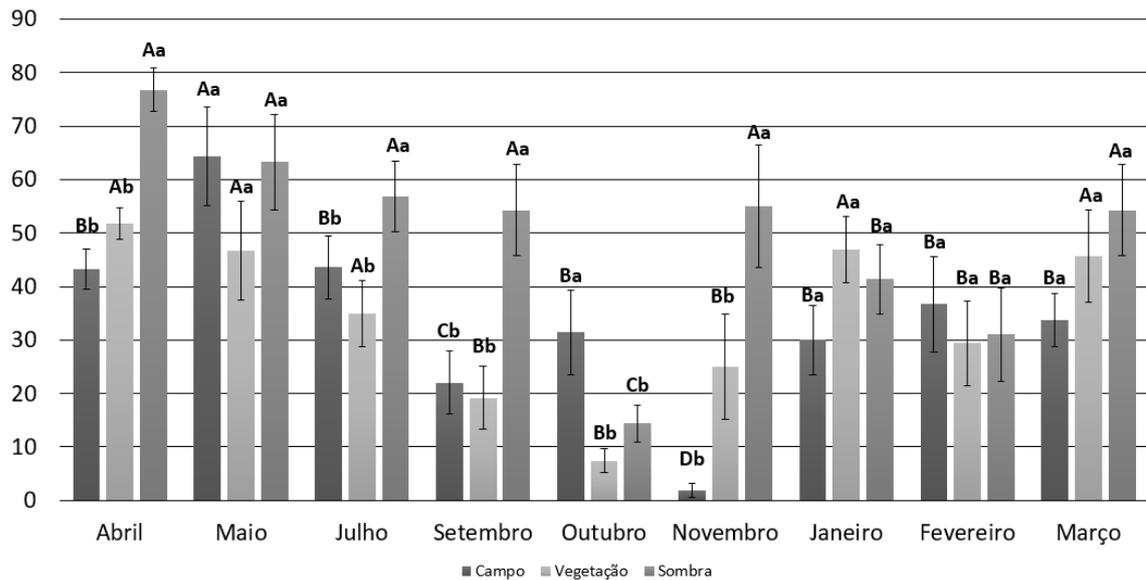
Tabela 5 – Análise de variância para a porcentagem de contaminação fúngica dos explantes de *Bambusa vulgaris* em relação aos fatores origem e coleta de brotos.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Origem	2	1,10	0,5490	15,609	1,90 e-07 **
Coleta	8	8,13	1,0164	28,899	<2e-16 **
Origem × Coleta	16	1,98	0,1239	3,523	2,72e-06 **
Erro	1787	62,85	0,0352		
Total Corrigido	1813	74,06			
CV(%)	16,14				
Média Geral	1,1616				

Nota: “***” Valores significativos ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por $(X+1)^{0,5}$, onde X refere-se ao dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 3 – Porcentagem da ocorrência de fungos em relação às origens e aos meses de coleta de explantes de *Bambusa vulgaris*.



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Letras maiúsculas devem ser analisadas de acordo com a época de coleta do propágulo enquanto as letras minúsculas devem ser analisadas de acordo com a origem do propágulo.

Fonte: Do autor (2019).

Em termos gerais, pode-se observar que as médias dos valores das temperaturas máximas, médias e mínimas e da precipitação média dos 30 dias que antecederam as coletas influenciaram significativamente as variáveis ocorrência de fungos, ocorrência de outras contaminações e o estabelecimento dos explantes de *Bambusa vulgaris* (TABELA 6).

Tabela 6 – Matriz de Correlação de Pearson para a média das temperaturas máximas (TMAX), temperaturas mínimas (TMIN), temperaturas médias (TMED), precipitações médias (PMED), ocorrências de fungos (FUN), ocorrências de outros eventos de contaminação (OUT) e estabelecimento (EST) de explantes de *Bambusa vulgaris*.

Variável	TMIN	TMAX	TMED	PMED	FUN	OUT
TMAX	0,7731 **					
TMED	0,9185 **	0,9257 **				
PMED	0,6357 **	0,5572 **	0,6377 **			
FUN	0,0286 ns	-0,1367 **	-0,0650 *	0,0041 ns		
OUT	-0,0453 ns	0,0538 *	0,0141 ns	-0,0507 *	-0,6424 **	
EST	0,0211 ns	0,0979 **	0,0605 **	0,0549 *	-0,4235 **	-0,4195 **

Nota: ns Valor não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. “**” e “***” Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

Fonte: Do autor (2019).

O aumento da ocorrência de fungos conforme a elevação da precipitação média (fevereiro) foi relatado por outros autores em estudos com bambus (ANAND; BRAR; SOOD,

2013; RAMANAYAKE; YAKANDAWALA, 1997; SAXENA; BHOJWANI, 1993; SINGH et al., 2012) e pode estar relacionado às condições ideais de proliferação de fungos endofíticos. Em contrapartida, o decréscimo dessa ocorrência no mês de outubro, mês com a maior temperatura máxima, sugere que a temperatura possa ter atingido níveis limitantes para o crescimento dos fungos manifestados.

A contaminação fúngica dos explantes coletados em casa de vegetação se manteve em todos as coletas e, mesmo que reduzida, manteve um comportamento semelhante às demais origens. A Umidade Relativa (UR) do ar pode explicar esse comportamento, uma vez que mesmo um material com irrigação controlada pode absorver mais água do ambiente em determinados dias propiciando um ambiente de condições ideais para a proliferação e manutenção de fungos. Além disso, é na região das raízes, por meio de lesões próprias do crescimento radicular, que ocorre grande parte da colonização por fungos endofíticos. Também ocorre um decréscimo na intensidade de colonização conforme se distanciam da raiz em razão da mobilidade reduzida dos microrganismos pelos tecidos (AZEVEDO, 1998). Nesse sentido, mesmo que os explantes coletados em casa de vegetação tenham passado por irrigações controladas e direcionadas ao substrato, a reduzida distância dos brotos em relação a raiz pode ter contribuído também para que as condições continuassem favoráveis para o desenvolvimento desses fungos.

Como alternativa para a redução da contaminação microbiana em *B. vulgaris*, Furlan et al. (2018) observaram redução significativa de fungos ao utilizar cloro ativo incorporado ao meio de cultura. No entanto, apesar disso, também encontraram baixas porcentagens de estabelecimento *in vitro* (16%). Ainda visando aumentar a porcentagem de estabelecimento, para a mesma espécie, Ribeiro et al. (2016) também testaram diferentes sistemas de cultivo e observaram um maior estabelecimento quando utilizado o sistema de biorreatores de imersão temporária, correspondendo a um valor de 100% dos explantes estabelecidos.

A ocorrência de outros eventos como contaminações bacterianas e oxidações também foi significativamente influenciada interação entre a origem do material e a época de coleta (TABELA 7). A maior ocorrência desses outros eventos foi observada nos explantes coletados no campo e inoculados no mês de novembro (87,18%) (FIGURA 4). A menor ocorrência foi observada nos explantes inoculados no mês de abril e oriundos da casa de sombra (19,44%) (FIGURA 4).

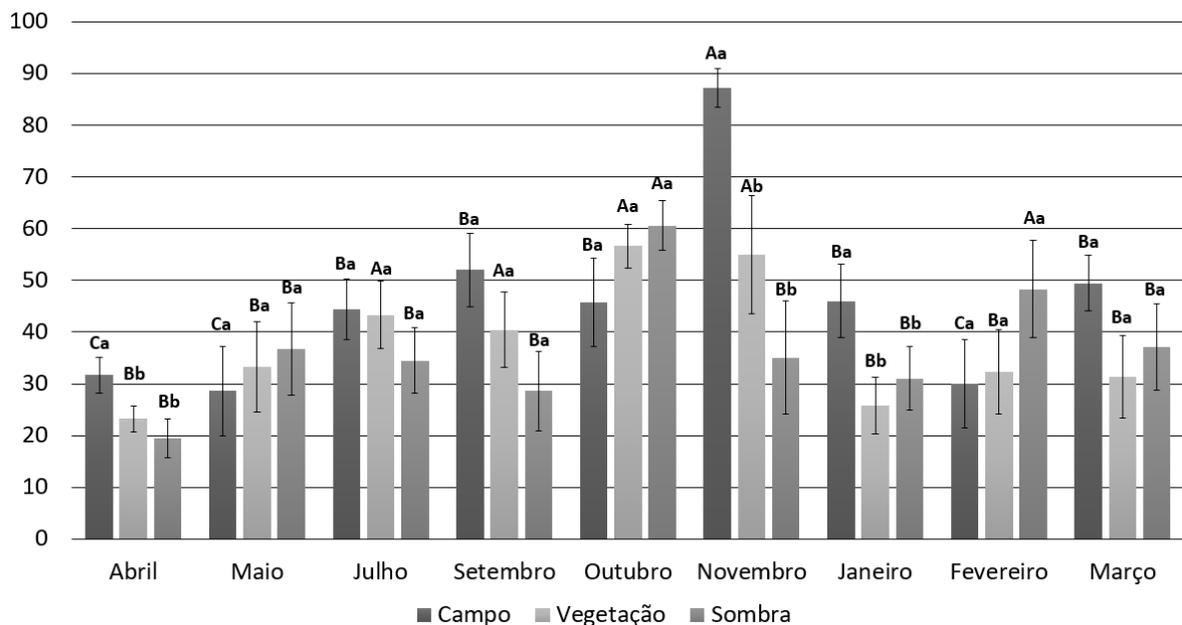
Tabela 7 – Análise de variância para a porcentagem de contaminação por outros eventos dos explantes de *Bambusa vulgaris* em relação aos fatores origem e coleta de brotos.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Origem	2	0,82	0,4087	11,020	1,75e-05 **
Coleta	8	5,74	0,7178	19,355	<2e-16 **
Origem × Coleta	16	1,34	0,0837	2,256	0,003 **
Erro	1787	66,28	0,0371		
Total Corrigido	1813	74,18			
CV(%)	16,57				
Média Geral	1,1623				

Nota: “***” Valores significativos ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por $(X+1)^{0,5}$, onde X refere-se ao dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 4 – Porcentagem de ocorrência de outros eventos de contaminação em relação às origens e aos meses de coleta de explantes de *Bambusa vulgaris*.



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Letras maiúsculas devem ser analisadas de acordo com o mês da coleta do propágulo enquanto as letras minúsculas devem ser analisadas de acordo com a origem do propágulo.

Fonte: Do autor (2019).

O estabelecimento não foi significativamente influenciado pela interação entre a origem do material e a época de coleta, mas sim pelos fatores isolados (TABELA 8). Em relação à origem, os explantes que mais estabeleceram foram aqueles oriundos da casa de vegetação (FIGURA 5). Já em relação ao mês de coleta a maior taxa de estabelecimento foi observada no mês de fevereiro (31,18%) e a menor no mês de maio (9,09%) (FIGURA 6).

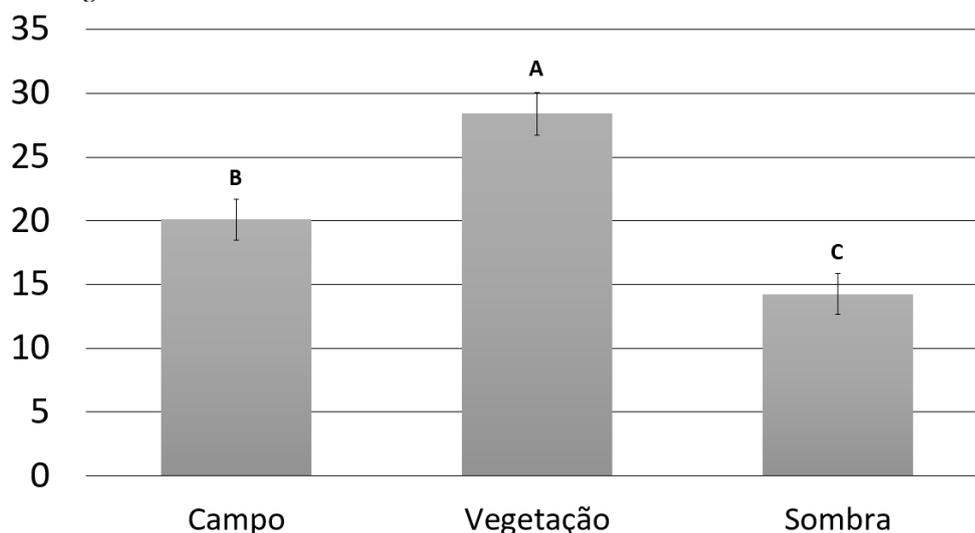
Tabela 8 – Análise de variância para a porcentagem de estabelecimento dos explantes de *Bambusa vulgaris* em relação aos fatores origem e coleta dos brotos.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Origem	2	1,04	0,5200	18,426	1,20e-08 **
Coleta	8	1,28	0,1599	5,666	3,95e-07 **
Origem × Coleta	16	0,45	0,0282	1,000	0,454 ^{ns}
Erro	1787	50,44	0,0282		
Total Corrigido	1813	53,21			
CV(%)	15,40				
Média Geral	1,091				

Nota: ^{ns} Valor não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro e “**” Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. Dados transformados por $(X+1)^{0,5}$, onde X refere-se ao dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 5 – Porcentagem de estabelecimento em relação a origens de explantes de *Bambusa vulgaris*.

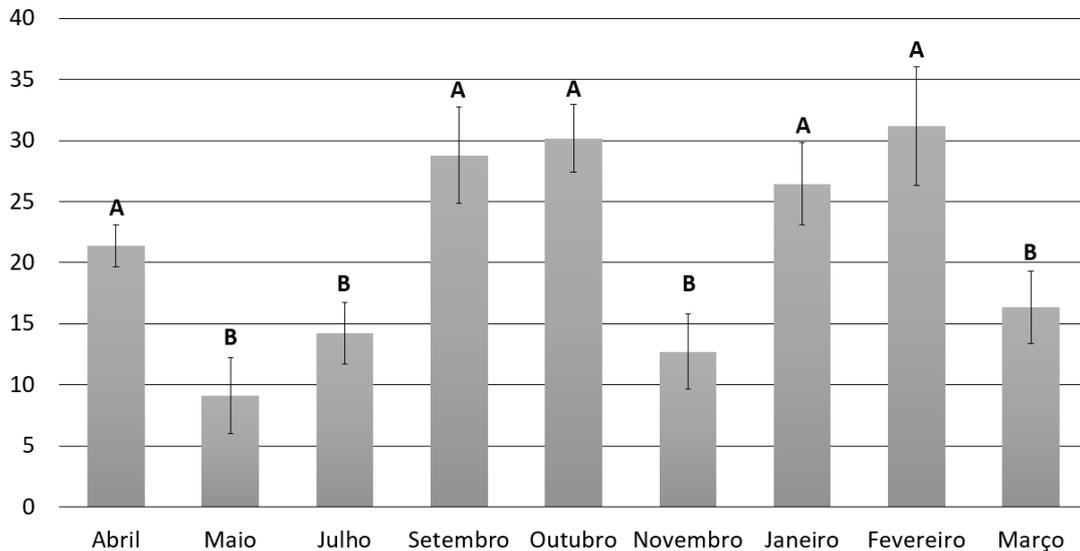


Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

Contudo, foram estabelecidos explantes *in vitro* em todas as coletas de brotações, sendo o mês de fevereiro o mais indicado. Isso pode estar associado com o relatado por Civínová e Sladký (1990) sobre potencial morfogenético de árvores adultas, o qual aumenta durante a estação de crescimento devido a níveis elevados de reguladores de crescimento endógeno.

Figura 6 – Porcentagem de estabelecimento em relação aos meses de coleta de explantes de *Bambusa vulgaris*.



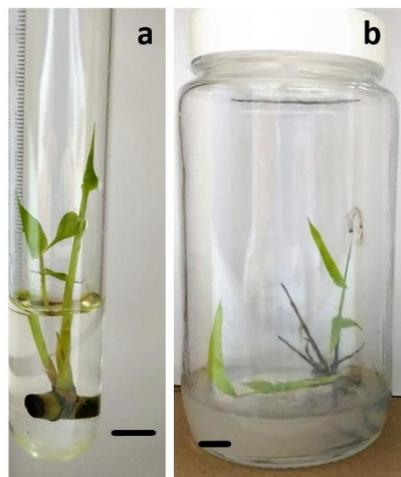
Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

4.1.2 Enraizamento *ex vitro*

Os explantes passaram pelo protocolo de alongamento, no qual foram subcultivados em meio MS líquido (FIGURA 7a) e em meio MS semissólido (FIGURA 7b). Quando atingiram o padrão desejado (FIGURA 7b) foram colocados em meio de enraizamento (FIGURA 8) e depois transferidos para os miniestufins (FIGURA 9).

Figura 7 – Explantes de *Bambusa vulgaris* subcultivados em meio MS líquido (a) e em meio MS semissólido (b).



Legenda: Barra = 1 cm.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 8 – Explante de *Bambusa vulgaris* em meio MS de enraizamento.



Legenda: Barra = 1 cm.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 9 – Estrutura de miniestufim montada para enraizamento de *Bambusa vulgaris*.



Fonte: Do autor (2019).

Após 45 dias a sobrevivência foi de 50%, sendo que 36,6% enraizaram. De acordo com as análises dos fatores testados, meio de cultura e presença de antibiótico, os resultados não foram significativos tanto para a variável sobrevivência quanto para enraizamento (TABELAS 9 e 10). Considerando os meios de cultura utilizados a maior sobrevivência foi observada no MS (80%) e a menor no WPM (30%) (FIGURA 10). Já em relação ao uso de antibiótico, a maior sobrevivência foi na ausência desse agente químico (53,33%) (FIGURA 11).

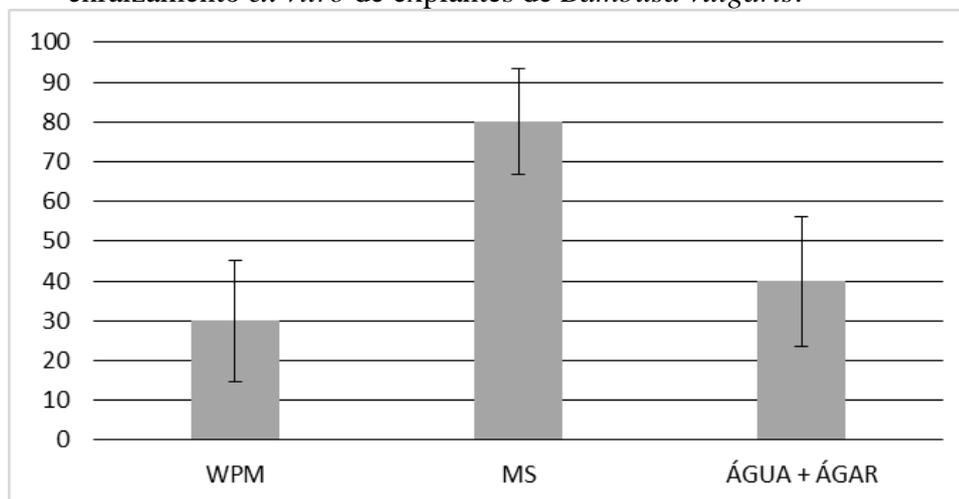
Tabela 9 – Análise de variância para a porcentagem de sobrevivência dos explantes de *Bambusa vulgaris* em relação aos tratamentos testados.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Meio de Cultura	2	0,37510	0,18756	3,0000	0,06870 ^{ns}
Agente Químico	1	0,00890	0,00893	0,1430	0,70880 ^{ns}
Meio de cultura × Agente Químico	2	0,12500	0,06252	1,0000	0,38270 ^{ns}
Erro	24	1,50050	0,06252		
Total Corrigido	29	2,00950			
CV(%)	25,88				
Média Geral	0,966				

Nota: ^{ns} Valor não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por $(X+0,5)^{0,5}$, onde X refere-se ao dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental.

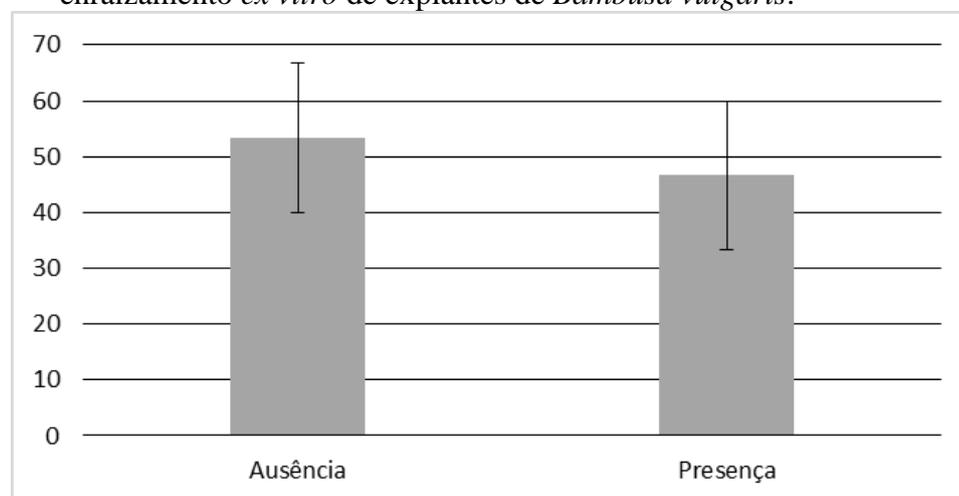
Fonte: Do autor (2019).

Figura 10 – Porcentagem de sobrevivência em relação ao meio de cultura utilizado no enraizamento *ex vitro* de explantes de *Bambusa vulgaris*.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 11 – Porcentagem de sobrevivência em relação à utilização de agente químico no enraizamento *ex vitro* de explantes de *Bambusa vulgaris*.



Fonte: Do autor (2019).

Para a variável enraizamento, considerando o meio de cultura, o melhor resultado foi observado também no MS (50%) (FIGURA 12), enquanto que para o uso de antibiótico o melhor resultado foi na ausência desse agente químico (46,67%) (FIGURA 13). A Tabela 11 apresenta os valores obtidos para as variáveis número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e diâmetro da maior raiz.

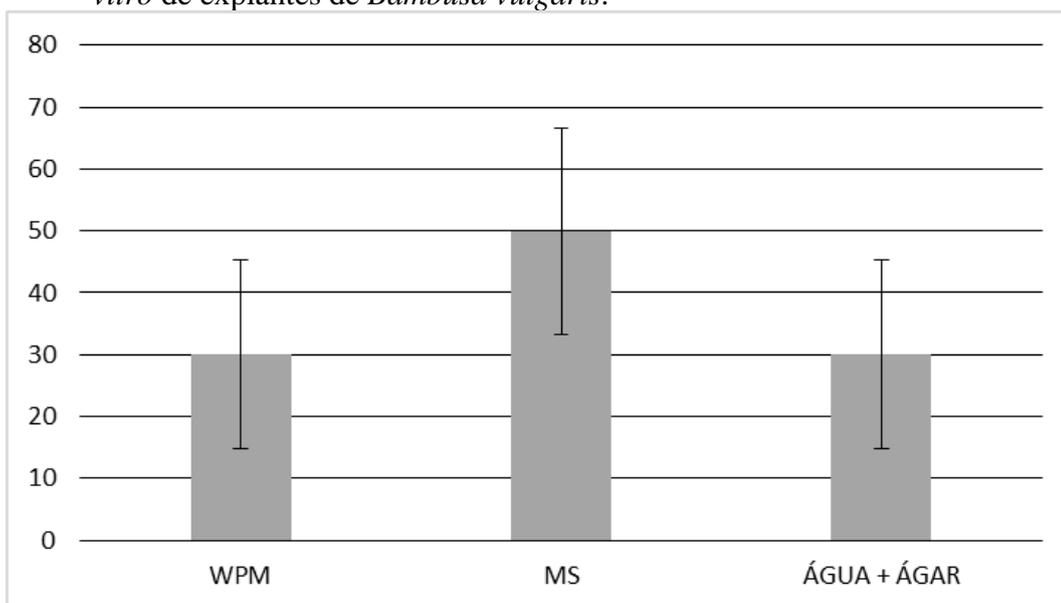
Tabela 10 – Análise de variância para a porcentagem de enraizamento dos explantes de *Bambusa vulgaris* em relação aos tratamentos testados.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Meio de Cultura	2	0,04580	0,02288	0,5710	0,5720 ^{ns}
Agente Químico	1	0,05150	0,05147	1,2860	0,2680 ^{ns}
Meio de cultura × Agente Químico	2	0,13730	0,06863	1,7140	0,2010 ^{ns}
Erro	24	0,96080	0,04003		
Total Corrigido	29	1,19540			
CV(%)		17,37			
Média Geral		1,152			

Nota: ^{ns} Valor não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por $(X+1)^{0,5}$, onde X refere-se ao dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental.

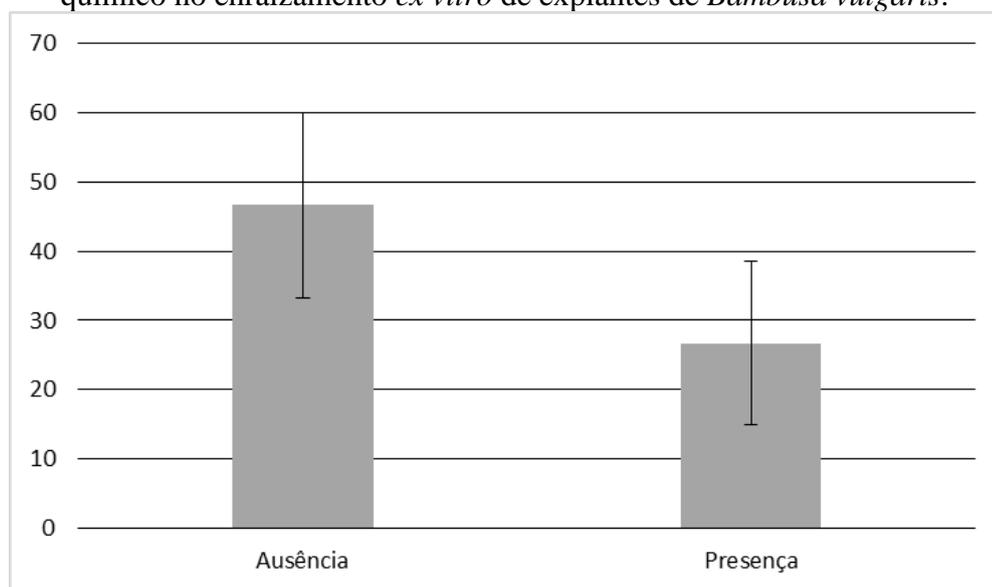
Fonte: Do autor (2019).

Figura 12 – Porcentagem de enraizamento em relação ao meio de cultura no enraizamento *ex vitro* de explantes de *Bambusa vulgaris*.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 13 – Porcentagem de enraizamento em relação à utilização de antibiótico como agente químico no enraizamento *ex vitro* de explantes de *Bambusa vulgaris*.



Fonte: Do autor (2019).

Tabela 11 – Valores médios das variáveis analisadas (NF- Número de folhas; NR- Número de raízes; CMR- Comprimento da maior raiz; DMR- Diâmetro da maior raiz) para os explantes de *Bambusa vulgaris* que enraizaram ao final do teste em sistema de mini-estufim

Meio de cultura	Agente Químico ¹	NF	NR	CMR	DMR
WPM	Ausência	2	1	13,5	0,55
WPM	Presença	3	1	11,05	0,51
MS	Ausência	3	2	9,64	0,57
MS	Presença	2	2	7,2	0,89
Água+ágar	Ausência	4	2	10,8	0,87
Água+ágar	Presença	8	1	9	0,42

Nota: ¹ Antibiótico a base de Sulfato de Estreptomicina (200 mg L⁻¹)

Fonte: Do autor (2019).

O fato de o meio de cultura não ter sido estatisticamente relevante durante o processo de enraizamento e aclimatização pode estar associado a presença da mesma suplementação em todos os tratamentos, indicando que talvez esse seja o fator determinante para estimular a produção de raízes. Todos os meios foram suplementados igualmente com com 1 g L⁻¹ de carvão ativado, 2 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,5 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP). Há também a possibilidade de que os explantes tenham estado em condições ideais de nutrição durante a fase de alongamento *in vitro* e, portanto, tenham sido pouco influenciados pela a mudança na disponibilização de nutrientes. Uma outra possibilidade refere-se ao tempo que os explantes permaneceram nos meios de

indução de enraizamento, o qual, apesar de ter gerado o estímulo necessário para a rizogênese na maioria dos explantes, pode ter sido insuficiente para outros. Dentre outros autores, Pandey e Singh (2012) e Ramanayake, Meemaduma e Weerawardene (2006) observaram que a utilização de maiores concentrações de auxinas pode resultar em um maior enraizamento.

Pandey e Singh (2012) encontraram dificuldades para o enraizamento *in vitro* de propágulos de *Dendrocalamus strictus*. Os autores avaliaram diferentes concentrações de AIB, AIA e ANA como suplementação do meio MS e o único tratamento que apresentou resultados foi contendo 5 mg L⁻¹ de AIB. Para *Bambusa vulgaris* var. *striata*, Ramanayake, Meemaduma e Weerawardene (2006), observaram que na ausência de AIB não houve indução de raízes e que com o aumento das concentrações de AIB (0, 2, 3, 6 e 10 mg L⁻¹), a porcentagem de enraizamento também aumentou. No entanto, o enraizamento obtido com doses acima de 3 mg L⁻¹ de AIB não apresentou diferenças significativas, sugerindo que essa poderia ser a concentração ideal.

A suplementação utilizada nos meios de cultura pode estar relacionada com o reduzido enraizamento (36,6%). Um comportamento distinto era esperado, tendo em vista que os bambus *in vivo* possuem como característica o surgimento espontâneo de raízes adventícias nas regiões dos nós que desempenham a mesma função dos rizomas, que são pedaços de ramos modificados cuja função é absorção, transporte e armazenamento de nutrientes (BANIK, 2015; DING et al., 1997).

O uso de carvão ativado no meio de cultura, de forma isolada ou combinada com reguladores de crescimento, visando induzir o enraizamento tem sido estudado por diversos pesquisadores em várias espécies (THOMAS, 2008). No entanto para híbridos de *Ulmus* (JOURA et al., 1998) e para *Lavandula vera* (ANDRADE et al., 1999) o enraizamento foi maior na ausência de carvão ativado. Para *Anacardium occidentale* (BOGGETTI; JASIK; MANTELL, 2001), a utilização não influenciou significativamente o enraizamento.

Ainda nesse sentido, as diferentes respostas dos explantes podem estar associadas a idade ontogenética dos explantes, que influencia na capacidade das células de responder a estímulos e rediferenciar-se. Singh (2015) observou que, para eucalipto, a porcentagem máxima de enraizamento de explantes de origem seminal atingia 80%, enquanto que para explantes maduros era de apenas 20%.

Mesmo com a ausência de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, o uso de meio de cultivo MS sem adição de antibiótico permitiu um enraizamento de 80% dos explantes, sendo então recomendado para a rizogênese *ex vitro* de *Bambusa vulgaris*. O

resultado obtido nesse tratamento é considerado satisfatório, uma vez que a pesquisa foi realizada visando a clonagem de indivíduos maduros. Esse resultado é promissor quando se trata de programas de melhoramento genético de *Bambusa vulgaris* que almejam estabelecer plantios homogêneos.

4.1.3 Formação do microjardim clonal

Dentre os explantes levados para aclimatização em casa de sombra e posterior formação do microjardim clonal (FIGURA 14), 71% apresentavam raízes e crescimento adequado e emissão de brotos, que se mantiveram após transferidos para o sistema de canaletão em leito de areia.

Figura 14 – Microjardim clonal de *Bambusa vulgaris*. a- no dia da transferência para o canaletão e b- após 45 dias.



Legenda: Barra = 5 cm.

Fonte: Do autor (2019).

O microjardim clonal formado em sistema de canaletão é amplamente utilizado para diversas espécies de eucalipto e permite uma maior eficiência na micropropagação (TITON et al., 2003). No entanto para bambus não é tão difundido. Por meio desse estudo, com a consolidação do microjardim clonal de *Bambusa vulgaris* será possível investigar os efeitos desse sistema de cultivo para a espécie.

O adequado desempenho em condições ambientais externas pode estar relacionado com a utilização do método de enraizamento *ex vitro* em miniestufins. Corroborando com o que foi relatado por Baccarin et al. (2015) e Brondani et al. (2012), (2017a), o método reduziu o estresse ocasionado durante a aclimatização por meio de uma transição gradual das condições de umidade, temperatura e fatores nutricionais, fazendo com que não ocorresse a morte de nenhum indivíduo enraizado.

O adequado desempenho *ex vitro* faz com que a alternativa de implementar um microjardim clonal seja viável, uma vez que permite a frequente produção de plantas completas, além de facilitar o processo de aclimatização.

4.2 Análises histológicas

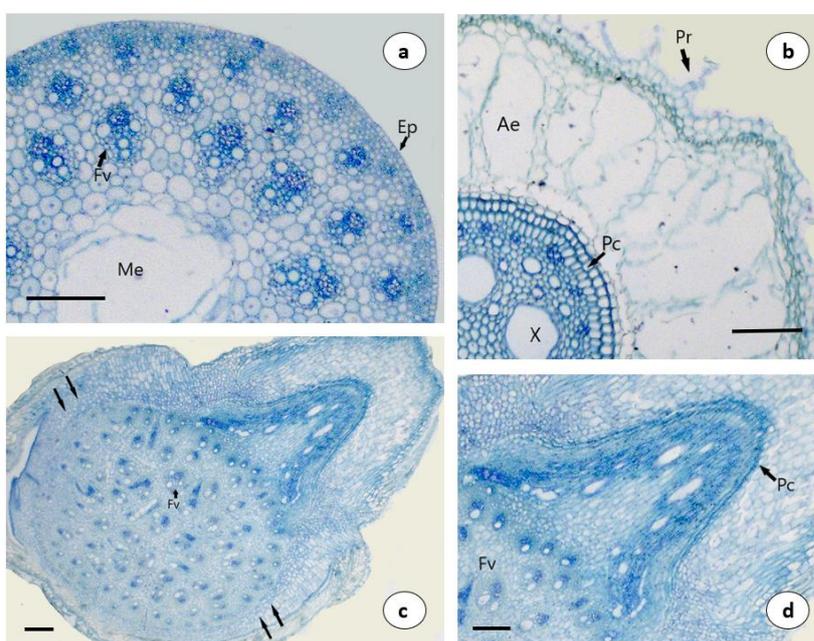
Os cortes histológicos dos segmentos nodais de *B. vulgaris* permitiram observar que na formação de raízes adventícias ocorreu uma rediferenciação de tecidos que abrangeu grande parte do explante (FIGURA 15c). Verificou-se uma conexão direta entre a região de rediferenciação e às raízes adventícias que estão sendo formadas, sem a ocorrência de organogênese indireta (calo) (FIGURA 15d). Foi possível perceber que as raízes adventícias se formaram na região do nó e isso pode ser devido a maior quantidade de células meristemáticas. Observando as raízes adventícias foi possível identificar a região medular, periciclo, aerênquima na região do córtex e a presença de pelos radiculares (FIGURA 15a). Os pelos radiculares são comuns em raízes adventícias de bambu e facilitam a absorção de solutos pela planta (FURLAN et al., 2018). No colmo, na porção superior ao nó e à interseção das raízes (FIGURA 15b) foi possível observar redução das células e o surgimento de um espaço vazio central, caracterizando a região oca comum aos colmos bambus.

Ao evidenciar a conexão direta na formação das raízes adventícias a análise anatômica sugere um resultado satisfatório da metodologia empregada. Isso porque o uso de antibióticos pode estimular a ocorrência de calos (TAMBARUSSI et al., 2015), cuja presença em uma região de conexão vascular é indesejada considerando que a região de conexão é frágil, podendo comprometer a funcionalidade da raiz (LI et al., 2009). A elevada abrangência dos eventos de rediferenciação também sugere a formação de raízes bem estruturadas e com provável bom desempenho na absorção de nutrientes.

O elevado número de células de aerênquima também foi observado em raízes de outras monocotiledôneas por Carvalho Filho (2014), Graciano-Ribeiro (2002) Seago Jr. et al. (2005).

A formação de aerênquima na raiz auxilia na troca gasosa entre o sistema radicular e a parte aérea, o que permite maior difusão de gases como o oxigênio e o etileno, fazendo com que a raiz se encontre aerada mesmo quando o ambiente externo esteja hipóxico, como pode ocorrer em cultivos *in vitro* (CARVALHO FILHO, 2014; DREW, 1997; SURALTA; YAMAUCHI, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2006; YIN et al., 2010).

Figura 15 – Cortes transversais de indivíduos micropropagados de *Bambusa vulgaris*. a- região entrenodal do explante, b- raiz, c- região de interseção entre raiz e caule onde as setas indicam a região de início da rediferenciação celular e d- detalhes da formação da raiz adventícia.



Legenda: Barra = 100 nm. Ae = aerênquima; Ep = epiderme; Fv = feixes vasculares; Me = região medular; Pc = periciclo, Pr = pelos radiculares e X = xilema.

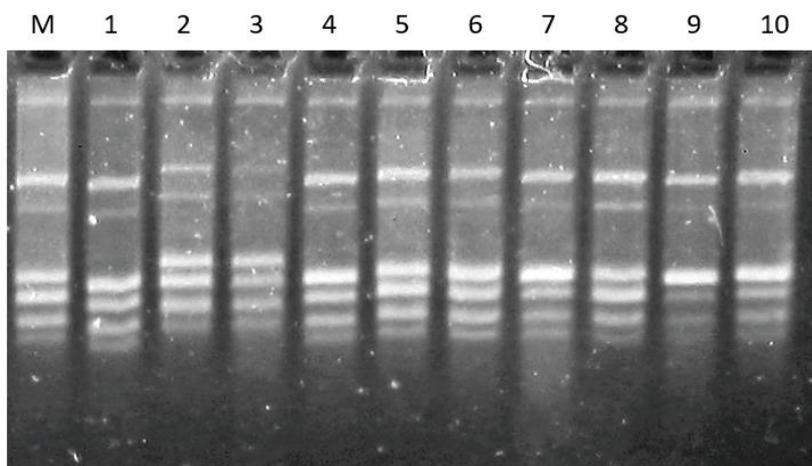
Fonte: Do autor (2019).

4.3 Fidelidade genética

Foi possível confirmar que os indivíduos micropropagados são cópias fiéis da matriz de *Bambusa vulgaris* (FIGURA 16). Dos 13 primers testados, apenas 10 apresentaram amplificação adequada e bandas discerníveis, sendo considerados para a avaliação de fidelidade genética. Para a identificação das bandas, foram utilizados como critérios a forte intensidade e a clara separação de outras bandas. Sendo assim, observou-se um total de 39 bandas, o que representa uma média de aproximadamente quatro bandas por *primer*. Conforme apresentado na Tabela 12, todas as bandas foram consideradas monomórficas, ou seja, apresentaram o

mesmo perfil para todos os indivíduos. A ausência de polimorfismo confirma que não ocorreu variação somaclonal durante os subcultivos.

Figura 16 – Gel obtido utilizando o *primer* ISSR UBC848 para *Bambusa vulgaris*.



Legenda: M – Planta matriz; 1 a 10 – Indivíduos micropropagados.
Fonte: Do autor (2019).

Tabela 12 – Resultado das ampliações por *primer* para *Bambusa vulgaris*.

<i>Primer</i>	Total de bandas	Monomórficas	Polimórficas
John	4	4	0
Manny	3	3	0
Mao	5	5	0
Omar	3	3	0
Chris	4	4	0
Becky	0	0	0
UBC809	3	3	0
UBC827	4	4	0
UBC835	0	0	0
UBC840	3	3	0
UBC842	4	4	0
UBC848	6	6	0
UBC898	0	0	0

Fonte: Do autor (2019).

A ausência de variações genéticas no processo de micropropagação sugere que o protocolo foi eficiente, não ocorrendo interferência do uso de antibióticos na descontaminação do material e nem da quantidade de subcultivos. O uso de antibióticos pode interferir estimulando a produção de calos, estruturas de células que se desdiferenciam e/ou

rediferenciam proporcionando maior susceptibilidade de ocorrência de variação somaclonal (BARDINI et al., 2003).

Nesse estudo, não foi observada variação genética mesmo após 16 subcultivos, durante cerca de 10 meses. Tremblay, Levasseur e Tremblay (1999) e Yang et al. (1999) relataram a existência de correlação entre o tempo de cultivo *in vitro* e o aumento da instabilidade genética. No entanto, o mesmo não foi observado para *Curcuma longa* (PANDA et al., 2007) e *Swertia chirayita* (JOSHI; DHAWAN, 2007), cujos subcultivos se estenderam por 26 e 44 meses.

A ausência de variações genéticas ao final do processo de micropropagação também foi observada, por meio da utilização de marcadores moleculares, para *Bambusa balcooa* (NEGI; SAXENA, 2010), *Guadua angustifolia* (NADHA et al., 2011), *Bambusa bambos* (ANAND; BRAR; SOOD, 2013), *Dendrocalamus asper* (SINGH et al., 2013) e *Dendrocalamus strictus* (GOYAL et al., 2015).

O uso de marcadores moleculares ISSR em outras culturas também permitiu avaliar a fidelidade genética em indivíduos micropropagados. Para *Aloe vera* (KATHUNA et al., 2018), *Curcuma angustifolia* (JENA et al., 2018), *Eleusine coracana* (BABU; VINOOTH; RAVINDHRAN, 2018), *Saccharum officinarum* (THORAT, 2017), *Tecomella undulata* (CHHAJER; KALIA, 2016) e *Tetrastigma hemsleyanum* (PENG; ZHANG; ZHANG, 2015) o método foi considerado como alternativa rápida e reprodutível, capaz de permitir a confirmação da integridade genética da cultura.

5 CONCLUSÕES

A sazonalidade apresentou papel importante na média de explantes estabelecidos (21,86%), estando relacionada com a ocorrência de fungos (38,95%). Os explantes coletados no mês de fevereiro apresentaram maiores porcentagens de estabelecimento *in vitro* (31,18%), apesar de as menores porcentagens de contaminação fúngica terem ocorrido no mês de outubro (13,09%).

A metodologia resultou em média de 36,6% de enraizamento e a utilização de antibiótico não apresentou influência significativa.

A utilização do meio de cultura MS na ausência de antibiótico resultou em 80% de enraizamento. A aclimatização de *B. vulgaris* por meio de miniestufins apresentou resultados satisfatórios (100%).

As análises moleculares e histológicas permitiram confirmar a eficácia do protocolo de cultivo *in vitro*, mostrando que a quantidade de subcultivos e o uso de antibiótico não interferiram na composição genética e na formação das raízes adventícias, produzindo clones geneticamente fiéis a planta matriz.

A metodologia utilizada nesse estudo para a micropropagação de *Bambusa vulgaris* permitiu a formação de um microjardim clonal.

REFERÊNCIAS

- AKINLABI, E. T.; ANANE-FENIN, K.; AKWADA, D. R. **Bamboo: the multipurpose plant.** Springer International Publishing, 2017.
- ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In Vitro* Propagation of an Edible Bamboo *Bambusa bambos* and Assessment of Clonal Fidelity through Molecular Markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 2, n. 4, p. 257-261, 2013.
- AMADA, S.; UNTAO, S. Fracture properties of bamboo. **Composites Part B: Engineering**, v. 32, n. 5, p. 451-459, 2001.
- ANDRADE, L. B. et al. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, n. 2, p. 79-83, 1999.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana.** Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p. 117-137.
- BABU, G. A.; VINOTH, A.; RAVINDHRAN, R. Direct shoot regeneration and genetic fidelity analysis in finger millet using ISSR markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 1, p. 157-164, 2018.
- BACCARIN, F. J. B. et al. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, n. 4, p. 465-483, 2015.
- BAIRU, M. W., AREMU, A. O., VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147- 173, 2011.
- BANIK, R. L. Morphology and growth. In: LIESE, W.; KOHL, M. (eds). **Bamboo: the plant and its uses.** Cham: Tropical Forestry Springer, 2015a. p. 43-89.
- BANIK, R. L. Bamboo Silviculture. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (eds) **Bamboo: The plant and its uses.** Cham: Tropical Forestry Springer, 2015b. p. 113-174.
- BARDINI, M. et al. Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 2, p. 157-162, 2003.
- BEHARI, B. Status of bamboo in India. In: **Compilation of papers in preparation of national status report on forests and forestry in India.** New Delhi: Ministry of Environment and Forests, 2006. p. 115-116
- BELLINI, C.; PACURAR, D. I.; PERRONE, I. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 639-666, 2014.
- BELTRAME, H. S. **Micropropagação de clones híbridos de *Castanea sativa* × *C. crenata* e *C. sativa* × *C. mollissima* para posterior estudos de resistência a *Phytophthora cinamomi*.** 2013. 80 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal), Universidade de Coimbra, 2013.

BENTON, A. Priority Species of Bamboo. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (eds) **Bamboo**. Cham: Tropical Forestry Springer, 2015. p. 31-41.

BOGGETTI, B.; JASIK, J.; MANTELL, S. H. *In vitro* root formation in *Anacardium occidentale* microshoots. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 2, p. 175-179, 2001.

BORBA, R. S. et al. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2ª Ed. Viçosa: UFV, 2009.

BRASIL. Lei n. 10.711, de 5 de agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 5 ago. 2003.

BRASIL. Política nacional de incentivo ao manejo sustentado e ao cultivo do bambu Lei nº 12.484, de 8 de setembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, set, 2011.

BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.

BRONDANI, G. E. et al. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii*: efeito do genótipo, AIB, zinco, boro e coletas de brotações. **Cerne**, v. 20, n. 1, p. 147-156, 2014.

BRONDANI, G. E. et al. Mini-incubators improve the adventitious rooting performance of *Corymbia* and *Eucalyptus* microcuttings according to the environment in which they are conditioned. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 2409-2423, 2017a.

BRONDANI, G. E. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex JC Wendl e *Dendrocalamus asper* (Schult. et Schult. F.) Backer ex K. Heyne. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. (orgs) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017b. p. 86-102.

CAIXETA, E.T. et al. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Org.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Editora Jard, 2009. p.11-101.

CARVALHO, A. C. P. P.; RODRIGUES, A. A. DE J.; SANTOS, E. O. **Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

CARVALHO FILHO, J. F. **Características anatômicas da raiz de *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty submetida a esgoto sanitário**. 2014. 115p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2014.

CHHAJER, S.; KALIA, R. K. Evaluation of genetic homogeneity of *in vitro*-raised plants of *Tecomella undulata* (Sm.) Seem. using molecular markers. **Tree Genetics & Genomes**, v. 12, n. 5, p. 1-10, 2016.

CHEN, C. Y. et al. Analysis of the cellulose synthase genes associated with primary cell wall synthesis in *Bambusa oldhamii*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11, p. 1270-1279, 2010.

CIVÍNOVÁ, B.; SLADKÝ, Z. Stimulation of the regeneration capacity of tree shoot segment explants *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 32, n. 6, p. 407-413, 1990.

CORREIA, D. et al. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, v. 48, n. 49, p. 107-116, 1995.

DANTAS, P. V. P. **Prospecção biotecnológica de fungos endofíticos de bambu (*Bambusa vulgaris*) micropropagado na produção de enzimas e atividade antimicrobiana**. 2017. 85p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

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

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Biology**, v. 48, n. 1, p. 223-250, 1997.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, n. 1, p. 49-59, 2009.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

FALEIRO, F. G., ANDRADE, S. D., REIS, F. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998.

FRANCO, J. A. et al. Root development in horticultural plants grown under abiotic stress conditions—a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 543-556, 2011.

FURLAN, F. C. et al. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, v. 39, n. 1, p. 61-70, 2018.

GARCÍA-RAMÍREZ, Y. et al. Effect of BA treatments on morphology and physiology of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 2, p. 205-211, 2014.

GEISS, G.; GUTIERREZ, L.; BELLINI, C. Adventitious root formation: new insights and perspectives. **Annual Plant Reviews**, v. 37, n. 1, p. 127-156, 2009.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D (eds) **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 2008.

GIELIS, J. Bamboo and biotechnology. **European Bamboo Society Journal**, v. 8, n. 1, p. 27-39, 1995.

GIELIS, J. et al. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v. 552, n. 1, p. 195-203, 2001.

GOULART, P. B. et al. Morfoanatomia da rizogênese adventícia em miniestacas de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 3, p. 521-532, 2014.

GOYAL, A. K. et al. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 473-482, 2015.

GOYAL, A. K.; SEN A. *In vitro* regeneration of bamboos, the “Green Gold”: An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 9-16, 2016.

GRACIANO-RIBEIRO, D. **Caracteres anatômicos aplicados à taxonomia e variações ambientais das espécies de *Otachyrium* da América do Sul**. 2002. 215p. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa- CNPH, 1998. p. 183-260.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8 ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011.

HSIUNG, W. Prospects for bamboo development in the world. **Journal de La American Bamboo Society**, v. 8, n. 2, p. 168-177, 1988.

INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN - INBAR. **Bamboo: a new approach to carbon credits** [online]. 2012. Disponível em: <<http://www.inbar.int/2012/11bamboo-anew-approach-to-carbon-credits-2/>>. Acesso em: dez, 2017.

INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN - INBAR. **Evaluation of bamboo resources in Latin America** [online]. 2015. Disponível em: <<http://www.inbar.int/#1>>. Acesso em: dez, 2017.

INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN - INBAR. **Brazil becomes the latest member of inbar**, 2017 [online]. Disponível em: <http://www.inbar.int/brazil_joins_inbar/>. Acesso em: dez, 2017.

JENA, S. et al. High-frequency clonal propagation of *Curcuma angustifolia* ensuring genetic fidelity of micropropagated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, n. 3, p. 473-486, 2018.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. London: McGraw-Hill Book Company, 1940.

JOSHI, P.; DHAWAN, V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 22-26, 2007.

JOUIRA, H. B. et al. Adventitious shoot production from strips of stem in the Dutch elm hybrid 'Commelin': plantlet regeneration and neomycin sensitivity. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, n. 2, p. 153-160, 1998.

KHATUNA, M. M. et al. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro*-propagated *Aloe vera* plants using DNA-based markers. **Scienceasia**, v. 44, n. 2, p. 87-91, 2018.

KOSHY, K. C.; GOPAKUMAR, B. An improvised vegetative propagation technique for self-incompatible bamboos. **Current Science**, v. 89, n. 9, p. 1474-1476, 2005.

LI, S. W. et al. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, v. 75, n. 2, p. 230-247, 2009.

LIMA NETO, M. C.; RIBEIRO, J. S.; BEZERRA NETO, E. Enraizamento de estacas de bambu com o uso de auxinas. **Ciência Animal**, v. 7, n. 2, p. 175-179, 2009.

LIU, D. et al. Bamboo fiber and its reinforced composites: structure and properties. **Cellulose**, v. 19, n. 5, p. 1449-1480, 2012.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings-International Plant Propagators' Society**, v. 30, n. 1, p. 421-427, 1980.

LUIS, Z. G. L. et al. Caracterização anatômica dos órgãos vegetativos de bambu (Poaceae, Bambusoideae). In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. (orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p. 86-102.

MARINHO, N. P. et al. Análise química do bambu-gigante (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro) em diferentes idades. **Ciência Florestal**. v. 22, n. 2, p. 417-422, 2012. <http://dx.doi.org/10.5902/198050985749>.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, n. 1, p.14-17, 1998.

MODESTO, A. C. B. et al. Tempo de exposição ao cloro ativo para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Bambusa vulgaris*. In: XXXI Congresso de Iniciação Científica da UFLA, 2018, Lavras. **Anais eletrônicos...** Lavras: UFLA, 2018.

MUDOI, K. D. et al. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.

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

NADHA, H. K. et al. Evaluation of clonal fidelity of *in vitro* raised plants of *Guadua angustifolia* Kunth using DNA-based markers. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 23, p. 5636-5641, 2011.

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

NEGI, D.; SAXENA, S. *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. **Plant Biotechnology**. v. 5, n. 1, p. 35-43, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s11816-010-0154-z>.

NG, W.; TAN, S. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? **ASM Science Journal**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.

NEGISHI, N. et al. Hormone level analysis on adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*. **New forests**, v. 45, n. 4, p. 577-587, 2014.

NEHRA, N. S. et al. Invited review: forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, n. 6, p. 701-717, 2005.

PANDA, M. K. et al. Assessment of genetic stability of micropropagated plants of *Curcuma longa* L. by cytophotometry and RAPD analyses. **International Journal of Integrative Biology**, v. 1, n. 3, p. 189-195, 2007.

PANDEY, B. N.; SINGH, N. B. Micropropagation of *Dendrocalamus strictus* nees from mature nodal explants. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 4, n. 1, p. 5-9, 2012.

PENG, X.; ZHANG, T.; ZHANG, J. Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 1, p. 67-77, 2015.

PEREIRA, M. A. R. **Bambu, espécies, características e aplicações**. Bauru: UNESP, 2001.

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

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; MEEMADUMA, V. N.; WEERAWARDENE, T. E. *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* ‘Striata’). **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 1, p. 109-113, 2006.

RAMYARANGSI, S. Techniques for seed storage of *Thyrsostachys siamensis*. In: RAO, I. V. R.; GNANAHARAN, R.; SASTRY, C. B. (eds.) **Bamboos current research**. Cochin, India: Proceedings of the international bamboo workshop, 1988. p. 133-135.

RIBEIRO, A. S. et al. Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação. **Nativa**, v. 4, n. 1, p. 15-18, 2016.

RICHARDSON, D. M.; VAN WILGEN, B. W.; NUNEZ, M. A. Alien conifer invasions in South America: short fuse burning?. **Biological Invasions**, v. 10, n. 4, p. 573-577, 2008.

ROCA, W. M; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos em la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. Cali, Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991.

SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 1, p. 27-53, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1354-9>.

SAXENA, S.; BHOJWANI, S. S. *In vitro* clonal multiplication of 4-year-old plants of the bamboo, *Dendrocalamus longispatus* Kurz. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 29, n. 3, p. 135-142, 1993.

SEAGO JR, J. L. et al. A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. **Annals of Botany**, v. 96, n. 4, p. 565-579, 2005.

SILVEIRA, C. A. P. et al. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 488-492, 2001.

SINGH, S. R.; KUMAR, P.; ANSARI, S. A. A simple method for large-scale propagation of *Dendrocalamus asper*. **Scientia Horticulturae**, v. 100, n. 1, p. 251-255, 2004.

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

SINGH, S. R. et al. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 419-430, 2013.

SINGH, A. Micropropagation of plants. In: BAHADUR B. et al. (eds) **Plant biology and biotechnology**. New Delhi: Springer, 2015. p. 329-346.

SODERSTROM, T. R.; CALDERON, C. E. Ecology and phytosociology of bamboo vegetation. In: NUMATA M. (ed) **Ecology of grasslands and bamboolands in the world**. Springer, 1980. p. 223–236.

SOUSA, G. C. et al. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 405-407, 2008.

SORENG R. J. et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**, v. 53, n. 2, p. 117-137, 2015. <https://doi.org/10.1111/jse.12150>

SURALTA, R. R.; YAMAUCHI, A. Root growth, aerenchyma development, and oxygen transport in rice genotypes subjected to drought and waterlogging. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, n. 1, p. 75-82, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4th. Sunderland, EUA: Sinauer Associate, 2006.

TAMBARUSSI, E. V. et al. Influence of antibiotics on indirect organogenesis of Teak. **Annals of Forest Research**, v. 58, n. 1, p. 177-183, 2015.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 618-631, 2008.

THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 169-180, 2007.

TITON, M. et al. Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 27, n. 5, p. 619-625, 2003.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e a transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998.

TREMBLAY, L.; LEVASSEUR, C.; TREMBLAY, F. M. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 10, p. 1373-1381, 1999.

VILLACORTA-MARTÍN, C. et al. Gene expression profiling during adventitious root formation in carnation stem cuttings. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 789-807, 2015.

VORONTSOVA, M. S. et al. **World Atlas of Bamboos and Rattans**. INBAR, 2016.

XAVIER, A; WENDLING, R. L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2ª Ed., rev. e ampl. - Viçosa, MG: ED: UFV, 2013.

WANG, Q. M., WANG, L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 9, p. 1535-1547, 2012.

WANG, H. Y. et al. Endogenous hormonal equilibrium linked to bamboo culm development. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 11312-11323, 2015.

YANG, H. et al. Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 6, p. 520-526, 1999.

YIN, D. et al. Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 2, p. 122-130, 2010.

YUEN, J. Q.; FUNG, T.; ZIEGLER, A. D. Carbon stocks in bamboo ecosystems worldwide: Estimates and uncertainties. **Forest Ecology and Management**, v. 393, n. 1, p. 113-138, 2017.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

ANEXOS

ANEXO I – Resultados médios para a porcentagem de contaminação fúngica, outros eventos¹ e estabelecimento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* de acordo com a origem e época de coleta de propágulos.

Coleta	T min (°C)	T máx (°C)	T med (°C)	Precipitação med (mm)	Origem	Fungo (%)	Outros eventos (%)	Estabelecimento (%)	
2017	Abril	19,6	24,0	21,5	5,1	Campo	43	32	25
						Vegetação	52	23	25
						Sombra	77	19	4
	Maio	16,7	21,7	19,1	2,8	Campo	64	29	7
						Vegetação	47	33	20
						Sombra	63	37	0
	Julho	12,1	18,5	16,1	0,0	Campo	43	44	13
						Vegetação	35	43	22
						Sombra	57	34	9
	Setembro	15,2	23,1	18,7	0,0	Campo	22	52	26
						Vegetação	19	40	40
						Sombra	54	29	17
Outubro	17,5	26,4	22,1	3,3	Campo	31	46	23	
					Vegetação	7	57	36	
					Sombra	14	61	25	
Novembro	18,9	24,2	21,9	2,6	Campo	1	87	12	
					Vegetação	25	55	20	
					Sombra	55	35	10	
2018	Janeiro	19,3	25,3	22,6	8,8	Campo	30	46	24
						Vegetação	47	26	27
						Sombra	41	31	28
	Fevereiro	17,9	25,3	23,1	2,9	Campo	37	30	33
						Vegetação	29	32	38
						Sombra	31	48	21
Março	20,8	25,3	23,4	3,0	Campo	34	49	17	
					Vegetação	46	31	23	
					Sombra	54	37	9	
					Médias gerais	39	39	22	

Nota:¹ Oxidação ou bactéria ou mortalidade.

Fonte: Do autor (2019).

ANEXO II - Resultados médios para a porcentagem de enraizamento de *Bambusa vulgaris* em relação ao meio de cultura e antibiótico¹.

Meio de cultura	Antibiótico	Sobrevivência (%)	Enraizamento (%)
WPM	Presença	40	40
WPM	Ausência	20	20
MS	Presença	60	20
MS	Ausência	100	80
Água+ágar	Presença	40	20
Água+ágar	Ausência	40	40
Média geral		50	37

Nota:¹ Antibiótico a base de Sulfato de Estreptomicina (200 mg L⁻¹)

Fonte: Do autor (2019).