



DOUGLAS SANTOS GONÇALVES

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Dendrocalamus asper* Backer ex. K.
Heyneke E *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.**

**LAVRAS - MG
2021**

DOUGLAS SANTOS GONÇALVES

MICROPROPAGAÇÃO DE *Dendrocalamus asper* Backer ex. K. Heyneke e *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.

Tese 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 a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani
Orientador

**LAVRAS - MG
2021**

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

Gonçalves, Douglas Santos.

Micropropagação de *Dendrocalamus asper* Backer ex. K.
Heyneke E *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C.Wendl. / Douglas
Santos Gonçalves. - 2021.

114 p. : il.

Orientador(a): Gilvano Ebling Brondani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.
Bibliografia.

1. Bambu. 2. Clonagem in vitro. 3. Regulador de Crescimento.
I. Brondani, Gilvano Ebling. II. Título.

DOUGLAS SANTOS GONÇALVES

MICROPROPAGAÇÃO DE *Dendrocalamus asper* Backer ex. K. Heyneke E *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.

MICROPROPAGATION OF *Dendrocalamus asper* Backer ex. K. Heyneke AND *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.

Tese 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 a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 05 de fevereiro de 2021.

Gilvano Ebling Brondani UFLA – DCF/ESAL
Dulcinéia de Carvalho UFLA – DCF/ESAL
Alexandre Alves de Carvalho UFLA – DAG/ESAL
Leandro Silva de Oliveira UFMG
Welligton Ferreira Campos UFVJM

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani
Orientador

**LAVRAS - MG
2021**

*À minha maior saudade, minhas avós
(In memoriam) Anália e Joana.*

*À minha mãe Neuza, pelo apoio
constante e por me mostrar o genuíno amor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que tenho e sou, por guiar sempre os meus passos, iluminar meu caminho e por todas as oportunidades que me fizeram chegar até aqui.

À minha mãezinha Maria, minha intercessora, a quem sempre recorro em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais que eu tanto amo e que são a minha base, pela educação que me deram, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pelo carinho e amor. Essa vitória não é minha e sim de vocês, sem vocês nada disso seria possível. E a toda minha família que de alguma maneira contribuiu nessa jornada, em especial aos meus primos Lucas e Jéssica.

Ao meu esposo Heverton, pelo apoio, companheirismo, incentivo e paciência, e por muitas vezes me enxergar melhor do que sou, me mostrando o lado positivo em todas as situações, obrigado meu amor.

Ao meu amigo irmão Daniel Dantas, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos amigos que Lavras me trouxe, Geise, Michele (Preta), Lucas, Isabela, Thayanne, Jusci, Fabrina, Giovanna, Bruna Almeida, João e Bruna Ferreira.

Aos colegas e amigos de Laboratório, Denys, Maria, Letícia, Sérgio, Samira, Alzerina, Palloma, Ana Cláudia e Poliana, vocês fizeram essa jornada ser bem mais leve

À Liliana Goulart, por todo o apoio, seu papel como profissional foi fundamental nessa etapa e me auxiliou a finalizá-la.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani, pela orientação, paciência, disponibilidade e ensinamentos, sou muito grato por ter tido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação.

À Prof. Dra. Dulcinéia de Carvalho por todo o ensinamento, dedicação e conselhos valiosos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências Florestais pela formação humana e profissional proporcionada.

Aos professores e técnicos do DCF, em especial à Chica, Juliano e Ana Luiza, pela disponibilidade e prontidão em ajudar.

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. Obrigado.

*Pois viver deveria ser - até o último
pensamento e derradeiro olhar - transformar-se.*

Lya Luft.

RESUMO

Diante da crescente demanda por produtos e subprodutos de origem florestal, a utilização de espécies de bambus que apresentam rápido crescimento e múltiplas utilizações é uma alternativa renovável, visando atender as necessidades de mercado. No entanto, a propagação dessas espécies em grande quantidade, de maneira rápida e homogênea, ainda é um desafio para o desenvolvimento do setor. Assim, esse estudo teve como objetivo principal desenvolver protocolos de micropropagação para *Dendrocalamus asper* e *Bambusa vulgaris*, e para isso a pesquisa foi dividida em três capítulos. No primeiro capítulo o objetivo do trabalho foi definir um protocolo de micropropagação para *D. asper* e avaliar a fidelidade genética das plantas micropropagadas. Foi possível observar que, o uso de hipoclorito de sódio na concentração (água:hipoclorito, v/v, 1,00 - 1,25% de cloro ativo) por 10 minutos resultou em 71,42% de estabelecimento, aos 30 dias. A suplementação do meio de cultura com 3,0 mg L⁻¹ de BAP resultou nos melhores valores médios para o número de brotos por explante. Concentrações de 2,0 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹ de BAP resultaram nas melhores porcentagens de brotos alongados. A concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB favoreceu a formação de raízes adventícias. As plantas micropropagadas apresentaram fidelidade genética, ou seja, podem ser consideradas clones das plantas matrizes. No segundo capítulo o objetivo foi avaliar o efeito da qualidade espectral na multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* e conclui-se que a qualidade espectral fluorescente branca é mais adequada para ser utilizada na multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro*, favorecendo o desenvolvimento de brotações destinadas à produção de plantas clonais. O terceiro capítulo teve como objetivo definir um protocolo de micropropagação para a clonagem de *Bambusa vulgaris* em diferentes sistemas de cultivo e avaliar a fidelidade genética das plantas micropropagadas. A utilização do meio de cultura semi-sólido suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose apresentou o melhor resultado para o número de brotos por explante, a concentração de 30,0 g L⁻¹ de sacarose no meio líquido resultou o melhor valor para o alongamento de brotos. O uso do carvão ativado no meio de cultura não influenciou a formação de raízes adventícias. As plantas micropropagadas apresentaram fidelidade genética e podem ser consideradas clones fiéis às plantas matrizes.

Palavras-chave: Bambu. Clonagem. Cultivo *in vitro*. ISSR. Regulador de crescimento. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

In view of the growing demand for products and by-products of forest origin, the use of bamboo species that show rapid growth and multiple uses is a viable alternative, aiming to meet market needs. However, the propagation of these species in large quantities, quickly and homogeneously, is still a challenge for the development of the sector. Thus, this study had as main objective to develop the micropropagation protocols for *Dendrocalamus asper* and *Bambusa vulgaris*, and for this purpose the research was divided into three chapters. In the first chapter the objective of this study was to define a micropropagation protocol for *D. asper* and to evaluate the genetic fidelity of micropropagated plants. The use of sodium hypochlorite, with the concentration (water: hypochlorite, v/v, 1.00 - 1.25% active chlorine), for 10 minutes resulted in 71.42% of establishment, within 30 days. The supplementation of the culture medium with 3.0 mg L⁻¹ of BAP resulted in the best average values for the number of shoots per explant. Concentrations of 2.0 mg L⁻¹ and 3.0 mg L⁻¹ of BAP resulted in the best percentages of elongated shoots. The concentration of 4.0 mg L⁻¹ of IBA favored the formation of adventitious roots. The micropropagated plants showed genetic fidelity, i.e., they can be considered clones of the parent plants. In the second chapter the objective was to evaluate the effect of spectral quality on the *in vitro* multiplication, elongation and rooting of *Bambusa vulgaris*. The white fluorescent spectral quality is more suitable to be used in the *in vitro* multiplication, elongation and rooting of *B. vulgaris*, favoring the development of shoots for the production of clonal plants. In third chapter the objective of this study was to define a micropropagation protocol for the cloning of *Bambusa vulgaris* in different cultivation systems and to evaluate the genetic fidelity of micropropagated plants. The use of semi-solid culture medium supplemented with 30.0 g L⁻¹ of sucrose showed the best results for the number of shoots per explant, the concentration of 30.0 g L⁻¹ of sucrose in the liquid medium resulted in the best results values for the elongation of shoots. Regarding rooting, the use of activated charcoal in the culture medium did not influence the formation of adventitious roots. The micropropagated plants showed genetic fidelity, i.e., they can be considered clones of the selected plants.

Keywords: Bamboo. Cloning. *In vitro* cultivation. ISSR. Plant growth regulator. Scanning electron microscopy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	BAMBUS.....	12
2.1.1	<i>Bambusa vulgaris</i>	13
2.1.2	<i>Dendrocalamus asper</i>.....	14
2.2	MICROPROPAGAÇÃO.....	14
2.3	FIDELIDADE GENÉTICA	16
	REFERÊNCIAS	18
	ARTIGO 1 - MICROPROPAGAÇÃO E FIDELIDADE GENÉTICA DE	
	<i>Dendrocalamus asper</i> Backer ex K. Heyneke	22
	ARTIGO 2 - QUALIDADE ESPECTRAL NO CULTIVO <i>in vitro</i> DE <i>Bambusa vulgaris</i>	
	Schrad. ex J. C. Wendl.....	53
	ARTIGO 3 - DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO PARA A	
	MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Bambusa vulgaris</i> Schrad. ex J. C. Wendl.....	83

1 INTRODUÇÃO

As espécies de bambus apresentam rápido crescimento e ampla ocorrência no mundo, com distribuição principal na Ásia, África e América do Sul (LIN et al., 2019). São plantas com grande versatilidade e utilizadas como alimento por meio do uso de brotos comestíveis, em artesanatos, fabricação de ferramentas, recuperação ambiental, controle de erosão e proteção do solo, alternativa aos combustíveis fósseis para a produção de energia e celulose para a fabricação de papel (MOURA et al., 2019; YORMANN; RÚGOLO; APÓSTOLO, 2020).

Devido a elevada capacidade de adaptação em diversos regimes ambientais e a condições edáficas tropicais, subtropicais e regiões temperadas (BHANDAWAT et al., 2019), o Brasil é detentor da maior diversidade de bambus da América Latina, com cerca de 232 espécies no total e estima-se que o país possua uma área plantada de aproximadamente 8 milhões de hectares (INBAR, 2017; SILVEIRA et al., 2019). Nesse sentido, dentre as espécies cultivadas no país está a *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl. e a *Dendrocalamus asper* Backer ex K. Heyneke, com grande destaque.

A utilização das espécies de bambus no país é pouco expressiva frente à ampla capacidade de aproveitamento silvicultural. Diante disto e com o intuito de incentivar o cultivo de espécies de bambus no Brasil, em 8 de setembro de 2011, foi sancionada a Lei número 12.484, que institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB), que tem por objetivo o desenvolvimento da cultura do bambu no País, por meio de ações governamentais e de empreendimentos privados (BRASIL, 2011; INBAR, 2015; ROSA et al., 2016).

Os bambus podem ser multiplicados sexuadamente ou assexuadamente, mas os ciclos de floração variam de espécie para espécie, chegando até 120 anos, e em muitos casos, as plantas morrem depois de florescerem e as sementes apresentam baixa viabilidade (BANIK, 2015, BENTON, 2015, LIN et al., 2019; ZHAO et al., 2017). Desta maneira, para potencializar o valor dos genótipos superiores, a melhor opção é a propagação vegetativa.

O desdobramento de touceiras e o plantio de pedaços de colmo, são técnicas bastante utilizadas, mas são métodos trabalhosos e com baixa eficácia (COSTA et al., 2017). Apesar das dificuldades e considerando algumas alternativas para a propagação das espécies de bambus, o cultivo *in vitro* pode ser uma ferramenta viável para a obtenção de um grande número de plantas clonais (FURLAN et al., 2018; RIBEIRO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2020).

Desta forma, os desenvolvimentos de protocolos específicos para cada espécie são importantes, tendo em vista que novos estudos sobre a micropropagação podem contribuir para uma maior otimização do processo e reduzir os custos de produção, apontando a necessidade de novas pesquisas nessa área (GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2017).

No entanto, em alguns casos, é possível observar que essa tecnologia pode ocasionar alterações genéticas conhecidas como variações somaclonais (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Tal variação é considerada uma desvantagem quando o objetivo principal é garantir a fidelidade genética, ou seja, quando se deseja obter uma planta micropropagada idêntica a planta matriz. Por esse motivo é importante aprofundar os estudos relacionados a fidelidade genética em clones obtidos por meio do cultivo *in vitro*, visando compreender os fatores envolvidos na propagação de bambus (KOZEN et al., 2017).

Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e aperfeiçoar protocolos de micropropagação de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl. e *Dendrocalamus asper* Backer ex K. Heyneke e avaliar a fidelidade genética das plantas micropropagadas por meio da utilização de marcadores moleculares ISSR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bambus

A espécie de bambus apresentam grande diversidade fenotípica e são pertencentes à família Poaceae e subfamília Bambusoideae. Com aproximadamente 1.642 espécies distribuídas em 120 gêneros, ocupam diversos ambientes em todo o mundo, com considerável variabilidade de hábitos, podendo ser lenhosos ou herbáceos (INBAR, 2012; JIANG, 2007).

Estima-se que as espécies de bambus cubram no mundo 22 milhões de hectares. A distribuição de bambus no mundo se estende desde a Latitude 51°N no Japão (Ilha de Sakhalin) até a Latitude de 47°S no sul da Argentina. As espécies de bambus ocorrem naturalmente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas de todos os países, exceto no continente Europeu. A maior riqueza de espécies é encontrada na Ásia seguido pela América do Sul, o menor número de espécies é encontrado na África. Apresentam bom desenvolvimento em locais com precipitação anual variando de 1.200 a 4.000 mm, com temperatura média anual entre 8 a 36°C e se adaptam em diferentes tipos de solos (BYSTRIAKOVA et al., 2003; GOYAL et al., 2012; INBAR, 2012; LIESE; KOHL, 2015).

Os bambus apresentam crescimento rápido, são espécies sempre-verdes e os ciclos de floração variam de 15-60 anos em bambus tropicais a 60-120 anos em espécies de clima temperado. Em muitos casos as plantas morrem depois de florescerem. O bambu pode ser colhido entre 3 e 5 anos, sem causar desmatamento ou perda de recursos, tendo em vista que seus sistemas radiculares são estabelecidos no subsolo e podem emitir novos brotos a cada ano. As espécies variam em altura de 0,5 a 40 m. O principal componente estrutural é o sistema de rizoma subterrâneo, a partir do qual os caules acima do solo (colmos) emergem (BANIK, 2015; BENTON, 2015; ZHAO et al., 2017).

Os bambus podem ser multiplicados por meio de sementes (sexuadamente) ou por propagação vegetativa (assexuadamente). No entanto, há uma deficiência na produção de sementes para a maioria das espécies, além da elevada variabilidade genética que pode existir em mudas propagadas via seminal. Desta maneira, para explorar o valor total dos genótipos superiores, a melhor opção é a propagação vegetativa. Dentre algumas alternativas para a propagação das espécies de bambus destaca-se o cultivo *in vitro*. Esse procedimento pode ser eficientemente usado para a obtenção de mudas de espécies economicamente importantes que

apresentam dificuldades de propagação (BANIK, 2015; BENTON, 2015; LIN et al., 2019; ZHAO et al., 2017).

Mais de 4.000 usos tradicionais e 1.500 aplicações comerciais são descritas para as espécies de bambus, possuindo potencial para uso econômico, ecológico e social devido às suas características morfológicas e silviculturais, incluindo os usos na construção civil, fabricação de utensílios e outras aplicações de bioenergia, são cultivadas como plantas ornamentais, utilizadas para controlar a erosão em áreas degradadas, artesanato, como forragem, fonte de fibra para a indústria de papel e celulose, fonte de biomassa para produção de energia e os brotos comestíveis são utilizados para alimentação humana (MOURA et al., 2019; YORMANN; RÚGOLO; APÓSTOLO, 2020; ZHAO et al., 2017).

No Brasil, a sua utilização é considerada reduzida frente a ampla capacidade de aproveitamento, tornando-o uma matéria prima destinada ao artesanato ou a estruturas de construção temporária. O Brasil é o país com maior diversidade de espécies de bambus do continente americano. Ao todo são 34 gêneros e 232 espécies exóticas e nativas, sendo 75% delas consideradas endêmicas. Estima-se que a área total brasileira de bambuzais gira em torno de oito milhões de hectares. Diante disto e com o intuito de incentivar o cultivo de espécies de bambus no Brasil, em 8 de setembro de 2011, foi sancionada a Lei número 12.484, que institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB), que tem por objetivo o desenvolvimento da cultura do bambu no País, por meio de ações governamentais e de empreendimentos privados (BRASIL, 2011; INBAR, 2015; INBAR, 2017; ROSA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2019).

2.1.1 *Bambusa vulgaris*

Bambusa vulgaris Schrad. ex J. C. Wendl. tem origem asiática e foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses (BANIK, 1995; TOMBOLATO; GRECO; PINTO, 2012).

Possuí colmo tortuoso que atinge aproximadamente 20 m de comprimento e diâmetro variando entre 5 e 10 cm. Os colmos têm alto teor de amido, o que caracteriza um potencial para a produção de derivados de álcool, além da composição química do colmo se comparar à de madeiras, o que potencializa sua utilização na forma de carvão vegetal (AKINLABI; ANANE-FENIN; AKWADA, 2017; TOMBOLATO; GRECO; PINTO, 2012; ZHAO-HUA; KABAYASHI, 2004).

O Brasil é detentor de grande diversidade de espécies de bambus e dentre as exóticas encontradas no país está o *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl., considerada economicamente a espécie mais importante dentro do gênero *Bambusa* (INBAR, 2017), e são cultivadas visando atender a demanda por reflorestamento, recuperação de solo, proteção ambiental, construção de casas, fabricação de móveis, implementos agrícolas, artesanato e produção de celulose para a fabricação de papel (CAIRO et al., 2018; FURLAN et al., 2018; GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014).

2.1.2 *Dendrocalamus asper*

Dendrocalamus asper Backer ex K. Heyneke é considerada uma das espécies mais relevantes na subfamília Bambusoideae que se caracteriza por plantas tropicais, onde se conhecem 83 espécies que crescem naturalmente no sul da Ásia (MONTIEL; SANCHÉZ, 2006).

A espécie *Dendrocalamus asper* é um bambu ornamental, nativo da China e comumente plantada na Tailândia, Vietnã, Malásia, Indonésia e Filipinas. Sendo encontrada de forma nativa ou naturalizada em regiões temperadas, tropicais e subtropicais. As espécies naturalizadas são aquelas que conseguem se estabelecer e reproduzir em ambientes nos quais foram introduzidas (RICHARDSON; VAN WILGEN; NUNEZ, 2008; SINGH et al., 2012).

Dendrocalamus asper é conhecido como bambu gigante ou bambu balde, é bastante resistente, flexível e de crescimento rápido. Natural do sudoeste asiático, essa espécie apresenta de 20 a 30 m de altura, 8 a 20 cm de diâmetro e os entrenós possuem de 20 a 45 cm de comprimento com paredes espessas (11 a 20 mm). É utilizado para a construção de habitações em muitas áreas rurais, em artesanatos, são adequados para a produção de celulose e fabricação de papel, fabricação de utensílios domésticos e móveis, alimentação através dos brotos comestíveis, fibra, biocombustível, construções diversas e fabricação de instrumentos musicais (BENTON et al., 2015; INBAR, 2012).

2.2 Micropropagação

A técnica de micropropagação ou propagação *in vitro* proporciona a clonagem de espécies vegetais, formando novos indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz. Isso ocorre a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos (folha, caule, raiz), os quais são

mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas. É quase sempre indicada para a espécie que são de difícil propagação pelos métodos convencionais, tornando possível a obtenção de elevado número de plantas sadias e geneticamente uniformes em menor período (WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2006). É baseada na teoria da totipotencialidade celular, onde, onde há possibilidade de regenerar uma planta completa a partir de uma célula, quando colocadas condições favoráveis. Para que isso ocorra, são utilizados meios nutritivos que tem o objetivo de fornecer substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998; HARTMANN et al., 2011).

A micropropagação ocorre de acordo com um procedimento padrão, no qual os explantes oriundos de material vegetal coletados no campo ou em casa de vegetação passam por uma limpeza e desinfestação prévia para o estabelecimento *in vitro*. Após o estabelecimento, os explantes são multiplicados, alongados e enraizados *in vitro* ou *ex vitro*, e por último, aclimatizados em ambiente *ex vitro* (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

No cultivo *in vitro* de espécies vegetais, a obtenção de sucesso está diretamente ligada à indução e ao controle da morfogênese. A disponibilidade e interação de auxinas e citocininas no meio de cultura tem ligação direta com a formação das raízes, parte aérea e calogênese. Dentre as citocininas mais utilizadas destacam-se a benzilaminopurina (BAP) e a cinetina, enquanto as auxinas mais comuns são o ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB) (BANIK, 2015; GRATAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Um dos processos de maior complexidade em plantas propagadas vegetativamente sob condições *in vitro* é a formação da raiz, principalmente quando se leva em consideração os fatores endógenos e exógenos envolvidos nesse processo, que ainda não são totalmente conhecidos. A caracterização do enraizamento *in vitro*, ocorre por meio de indução de raízes adventícias em brotações alongadas, advindas de gemas na fase de multiplicação/alongamento, buscando a obtenção de plantas completas para posterior transplante e aclimatização para as condições *ex vitro* (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013; SOUZA; PEREIRA, 2007).

A propagação *in vitro* para espécies de bambus é uma alternativa, considerado que por meio desta técnica existe a possibilidade de solução para grande parte dos problemas observados na propagação tradicional. No entanto, obter explantes de bambus isentos de contaminantes tem sido difícil na maioria das vezes, dificultando o estabelecimento *in vitro*. De

maneira geral, o objetivo dos protocolos de regeneração de cultura de tecidos nessas espécies, é alcançar uma produção em larga escala de plantas para o cultivo comercial, fornecendo material para programas de melhoramento genético e futuros bancos de germoplasma (BANERJEE; GANTAIT; PRAMANIK, 2011; JIMÉNEZ; GUEVARA, 2007).

2.3 Fidelidade genética

A micropropagação é considerada viável para a multiplicação de espécies de bambus (MUDOI et al., 2013; SINGH et al., 2013), e tem grande importância na clonagem de genótipos de interesse, podendo gerar plantas com a mesma identidade genética da planta matriz. No entanto, em alguns casos, é possível observar que essa tecnologia pode ocasionar alterações genéticas conhecidas como variações somaclonais (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Tal variação é considerada como uma desvantagem quando objetivo principal é garantir a fidelidade clonal ou quando se deseja obter uma planta micropropagada idêntica à planta matriz (MANTELL; MATTHEWS; MCKEE, 1994).

A variação somaclonal é uma variação fenotípica que pode ser de origem genética, quando é uma variação cromossômica que se torna herdável nas gerações seguintes, ou de origem epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material vegetal sofre, quando submetido ao cultivo *in vitro* que ocorrem em plantas micropropagadas quando comparadas com a planta matriz (ILLG, 1990; WANG; WANG, 2012). Neste contexto, variações genéticas são variações não esperadas que tem relação com mutações que alteraram a sequência de DNA. As variações epigenéticas estão ligadas a modificações na expressão gênica herdável, no entanto apresentam potencial reversível, estando associadas com modificações na estrutura da cromatina e/ou na metilação do DNA (HENIKOFF; MATZKE, 1997).

A ocorrência de mutação não pode ser prevista e, ao que tudo indica, vários fatores podem alterar a frequência e a natureza da variação somaclonal, tais como, o genótipo doador do explante, as condições de cultivo, o tipo de explante, o meio de cultura (sobretudo os reguladores de crescimento) além do estresse ocasionado pelo próprio cultivo *in vitro* (ILLG, 1990; VENKATACHALAM; SREEDHAR; BHAGYALAKSHMI, 2007).

A fidelidade genética de plantas micropropagadas é comumente abordada em diversos estudos, e quase sempre são realizados por meio de marcadores moleculares baseados em DNA. Os marcadores moleculares são considerados ferramentas de grande utilidade para a detecção

de variações no genoma, aumentando o poder da análise genética das plantas. Dentre as classes de marcadores moleculares disponíveis, os marcadores microssatélites ou ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) podem ser utilizados na discriminação e caracterização molecular de indivíduos, é uma das técnicas baseadas em PCR, que não necessita de informações preliminares da sequência de DNA, se destacando assim, como alternativa eficiente para caracterização de genomas complexos (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011; WANG; WANG, 2012).

REFERÊNCIAS

AKINLABI, E. T.; ANANE-FENIN, K.; AKWADA, D. R. **Bamboo: The Multipurpose Plant**. Springer International Publishing, Zurique, 2017.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.

BANERJEE, M.; GANTAIT, S.; PRAMANIK, B. R. A two steps method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 17, n. 4, p. 387-393, 2011.

BANIK, R. L. **A manual of vegetative propagation of bamboos**. New Delhi, Índia: INBAR Technical Report, 1995.

BANIK, R. L. Bamboo Silviculture. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (Ed.) **Bamboo: The plant and its uses**. Switzerland: Springer International Publishing, Zurique, 2015. p. 113-174.

BENTON, A. Priority Species of Bamboo. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (Ed.) **Bamboo: The plant and its uses**. Switzerland: Springer International Publishing, Zurique, 2015. p. 31-41.

BHANDAWAT, A. et al. Discovery and utilization of EST-SSR marker resource for genetic diversity and population structure analyses of a subtropical bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii*. **Biochemical Genetics**, New York, v. 57, n. 5, p. 652–672, 2019.

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, 2011.

BYSTRIAKOVA, N. et al. Distribution and conservation status of forest bamboo biodiversity in the Asia-Pacific Region. **Biodiversity & Conservation**, Dordrecht, v. 12, n. 9, p. 1833-1841, 2003.

CAIRO, P. C. et al. La biomasa de *Bambusa vulgaris* como alternativa para la recuperación de suelos degradados. **Revista Centro Agrícola**, Villa Clara, v. 45, n. 3, p. 51-58, 2018.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALSA, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, Brasil: Embrapa, 1998. p. 87-132.

COSTA, F. A. et al. Protocolo para micropropagação de duas espécies de *Guadua*. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p. 71-85.

FURLAN, F. C. et al. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, Valdivia, 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**, Irvine, v. 5, n. 2, p. 205- 211, 2014.

GOYAL, A. K. et al. Inventorying bamboo biodiversity of north bengal: a case study. **International Journal of Fundamental and Applied Sciences**, Argélia, v. 1, n. 1, p. 5–8, 2012.

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, Brasil: Embrapa, 1998. p. 183-260.

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

HENIKOFF, S.; MATZKE, M. A. Exploring and explaining epigenetic effects. **Trends in Genetics**, London, v.13, n. 8, p.293-295, 1997.

ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, Brasil: Embrapa, 1990. p. 287-295.

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

INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN - INBAR. **Evaluation of bamboo resources in Latin America** [online], Beijing, 2015. Disponível em: <<http://www.inbar.int/#1>>. Acesso em: jan. 2020.

INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN - INBAR. **Brazil becomes the latest member of inbar**, [online], Beijing, 2017. Disponível em: <http://www.inbar.int/brazil_joins_inbar/>. Acesso em: 10 mar, 2017.

JIANG, Z. **Bamboo and Rattan in the World**. Beijing, China: China Forestry Publishing House, 2007.

JIMÉNEZ, V. M.; GUEVARA, E. Micropropagation of bamboo species through axillary shoot proliferation. In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (Ed.) **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer Science & Business Media, Heidelberg, 2007. p. 465– 476.

KONZEN, E. R. et al. Molecular identification of bamboo general and species based on RAPD-RFLP markers. **Silva Fennica**, Helsinque, v. 51, n. 4, p. 1-16, 2017.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LIESE, W.; KOHL, M. **Bamboo - The plant and its uses**. Switzerland: Springer International Publishing, Zurique, 2015.

LIN, S. et al. Shoot proliferation and callus regeneration from nodular buds of *Drepanostachyum luodianense*. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 30, n. 6, p. 1997-2005, 2019.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas**. Ribeirão Preto, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

MONTIEL, M.; SÁNCHEZ, E. Ultraestructura de bambúes del género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) cultivados en Costa Rica IV: *Dendrocalamus asper*, clones Taiwán y Tailandia Mayra. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 54, n. 2, p. 65-75, 2006.

MOURA, J. B. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with Bamboo under cerrado brazilian vegetation. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 19, n. 3, p. 954-962, 2019.

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

NOGUEIRA, J. S. et al. Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P. M.; WIEDEMAN, G. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p.103-129.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

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

RIBEIRO, A. S. et al. Clonal bamboo production based on *in vitro* culture. **Bioscience Journal, Uberlândia**, v. 36, n. 4, p. 1261-1273, 2020.

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

ROSA, R. A. et al. Influência da espécie, tratamento preservativo e adesivo nas propriedades físicas do bambu laminado colado. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 913-924, 2016.

SILVEIRA, E. S. et al. Líquido da casca da castanha-de-caju (LCC) como repelente do caruncho-do-bambu *Bambusa vulgaris*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 1389-1397, 2019.

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**, New Delhi, 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**, Heidelberg, v. 35, n. 2, p. 419-430, 2013.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 9, n. 4, p. 103- 117, 2007.

TOMBOLATO, A. F. C.; GRECO, T. M.; PINTO M. M. Dez espécies de bambus exóticos mais comuns no paisagismo no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 18, v. 2, p.105-114, 2012.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, Brasil: Embrapa. 1998.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 193-205, 2007.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, Brasil: Editora UFV, 2013.

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

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo, Brasil: Embrapa Florestas, 2006.

YORMANN, G; E.; RÚGOLO, Z. E.; APÓSTOLO, N. M. Culms of *Bambusa vulgaris* cv. *vittata*, *Arundinaria simonii* and *Phyllostachys aurea* (Poaceae, Bambusoideae): Characterization of vascular bundles and fibers. **Flora**, Jena, v. 263, n. 151523, p. 1-10, 2020.

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

ZHAO, H. et al. Announcing the Genome Atlas of Bamboo and Rattan (GABR) project: promoting research in evolution and in economically and ecologically beneficial plants. **GigaScience**, London, v. 6, n. 7, p. 1-7, 2017.

ARTIGO 1 - MICROPROPAGAÇÃO E FIDELIDADE GENÉTICA DE *Dendrocalamus asper* Backer ex K. Heyneke

RESUMO

A utilização bambus no Brasil é pouco expressiva frente à ampla capacidade de aproveitamento silvicultural. Dentre as espécies cultivadas destaca-se o *Dendrocalamus asper*, o qual apresenta potencial econômico. Diante disso, o objetivo do trabalho foi definir um protocolo de micropropagação para *D. asper* e avaliar a fidelidade genética das plantas micropropagadas. Na fase de estabelecimento *in vitro* foi avaliado quatro tempos de imersão em hipoclorito de sódio (T1: 5 minutos; T2: 10 minutos; T3: 15 minutos e T4: 20 minutos). Os explantes considerados estabelecidos foram transferidos para meio de cultura MS suplementado com três concentrações de benzilaminopurina (BAP) (C1: 1,0 mg L⁻¹; C2: 2,0 mg L⁻¹ e C3: 3,0 mg L⁻¹). No enraizamento *in vitro* foram avaliadas três concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (C1: 2,0 mg L⁻¹; C2: 4,0 mg L⁻¹ e C3: 6,0 mg L⁻¹). A fidelidade genética foi avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. O uso de hipoclorito de sódio na concentração (água:hipoclorito, v/v, 1,00 - 1,25% de cloro ativo) por 10 minutos resultou em 71,42% de estabelecimento e houve 62,85% de emissão de brotações, aos 30 dias. A suplementação do meio de cultura com 3,0 mg L⁻¹ de BAP resultou nos melhores valores médios para o número de brotos por explante. Concentrações de 2,0 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹ de BAP resultaram nas melhores porcentagens de brotos alongados. A concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB favoreceu a formação de raízes adventícias. As plantas micropropagadas apresentaram fidelidade genética, ou seja, podem ser consideradas clones das plantas matrizes.

Palavras-chave: Bambu. Clonagem. Cultivo *in vitro*. Regulador de crescimento. ISSR.

**MICROPROPAGATION AND GENETIC FIDELITY OF *Dendrocalamus asper* Backer
ex K. Heyneke**

ABSTRACT

The use of bamboos in Brazil is not very significant despite the species great capacity for silvicultural exploitation. *Dendrocalamus asper* stands out among the cultivated species, which has economic potential. The objective of this study was to define a micropropagation protocol for *D. asper* and to evaluate the genetic fidelity of micropropagated plants. During the *in vitro* establishment phase, four periods of time of immersion in sodium hypochlorite were evaluated (T1: 5 minutes; T2: 10 minutes; T3: 15 minutes; and T4: 20 minutes). The explants which were considered established were transferred to an MS culture medium supplemented with three concentrations of benzylaminopurine (BAP) (C1: 1.0 mg L⁻¹; C2: 2.0 mg L⁻¹; and C3: 3.0 mg L⁻¹). During the *in vitro* rooting phase, three concentrations of indolbutyric acid (IBA) were evaluated (C1: 2.0 mg L⁻¹; C2: 4.0 mg L⁻¹ and C3: 6.0 mg L⁻¹). Genetic fidelity was assessed using ISSR molecular markers. The use of sodium hypochlorite, with the concentration (water: hypochlorite, v/v, 1.00 - 1.25% active chlorine), for 10 minutes resulted in 71.42% of establishment and in 62.85% of sprouting emissions, within 30 days. The supplementation of the culture medium with 3.0 mg L⁻¹ of BAP resulted in the best average values for the number of shoots per explant. Concentrations of 2.0 mg L⁻¹ and 3.0 mg L⁻¹ of BAP resulted in the best percentages of elongated shoots. The concentration of 4.0 mg L⁻¹ of IBA favored the formation of adventitious roots. The micropropagated plants showed genetic fidelity, i.e., they can be considered clones of the parent plants.

Keywords: Bamboo. Cloning. *In vitro* cultivation. Plant growth regulator. ISSR.

1 INTRODUÇÃO

Com exceção do continente Europeu, as espécies de bambus ocorrem naturalmente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas de todos os países. Mais de 4.000 usos tradicionais e 1.500 aplicações comerciais são descritas para as espécies de bambus, possuindo estas, potencial para uso econômico, ecológico e social devido às suas características morfológicas e silviculturais (LIESE; KOHL, 2015; ZHAO et al., 2017).

No Brasil, a sua utilização é pouco expressiva frente à ampla capacidade de aproveitamento silvicultural. Diante disto e com o intuito de incentivar o cultivo de espécies de bambus no Brasil, em 8 de setembro de 2011, foi sancionada a Lei número 12.484, que institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB), que tem por objetivo o desenvolvimento da cultura do bambu no País, por meio de ações governamentais e de empreendimentos privados (BRASIL, 2011; INBAR, 2015; ROSA et al., 2016).

Dentre as espécies cultivadas no Brasil, destaca-se o *Dendrocalamus asper* Backer ex. K. Heyneke, conhecido como bambu gigante ou bambu balde. De acordo com Benton (2015) as suas fibras produzem matéria prima considerada resistente, flexível e de rápido crescimento. É uma espécie utilizada para a construção de habitações em muitas áreas rurais e artesanatos, sendo adequada para a produção de celulose e fabricação de papel, fabricação de utensílios domésticos e móveis, alimentação por meio dos brotos comestíveis, fibra, biocombustível, construções diversas e fabricação de instrumentos musicais (INBAR, 2015; SINGH et al., 2012).

Os bambus podem ser multiplicados sexuadamente ou assexuadamente, no entanto, os ciclos de floração variam de espécie para espécie, chegando até 120 anos, e em muitos casos, as plantas morrem depois de florescerem e as sementes apresentam baixa viabilidade (BANIK, 2015; BENTON, 2015; LIN et al., 2019; ZHAO et al., 2017). Desta maneira, para potencializar o valor dos genótipos superiores, a melhor opção é a propagação vegetativa.

O desdobramento de touceiras e o plantio de pedaços de colmo, são técnicas bastante utilizadas, mas são métodos trabalhosos e com baixa eficácia (COSTA et al., 2017). Apesar das dificuldades e considerando algumas alternativas para a propagação das espécies de bambus, o cultivo *in vitro* pode ser uma ferramenta viável para a obtenção de um grande número de plantas clonais (FURLAN et al., 2018; RIBEIRO et al., 2016).

A micropropagação tem a sua importância na clonagem e melhoramento de genótipos de interesse (TAMBARUSSI et al., 2017), podendo gerar plantas em larga escala e com as mesmas características genéticas da planta matriz (BRONDANI et al., 2017; HARTMANN et al., 2011). No entanto, em alguns casos, é possível observar que essa tecnologia pode ocasionar alterações genéticas conhecidas como variações somaclonais (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Tal variação é considerada uma desvantagem quando o objetivo principal é garantir a fidelidade genética, ou seja, quando se deseja obter uma planta micropropagada idêntica a planta matriz. Por esse motivo é importante aprofundar os estudos relacionados a fidelidade genética em clones obtidos por meio do cultivo *in vitro*, visando compreender os fatores envolvidos na propagação de bambus (KOZEN et al., 2017).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi definir um protocolo de micropropagação para a clonagem de *Dendrocalamus asper* e avaliar a fidelidade genética das plantas micropropagadas por meio da utilização de marcadores moleculares ISSR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento *in vitro*

Para a condução dos experimentos foram utilizadas brotações oriundas de mudas de *Dendrocalamus asper* produzidas por sementes com um ano de idade. As mudas foram conduzidas em vasos com capacidade para quatro litros contendo areia lavada e terra de subsolo (1:1, v/v) como substrato, e dispostos em casa de vegetação localizada no Viveiro Florestal do *Campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As plantas foram fertirrigadas semanalmente com solução nutritiva desenvolvida para o crescimento e emissão de novas brotações (TABELA 1). O controle de plantas daninhas foi realizado por meio de arranque manual. A irrigação foi realizada uma vez ao dia, diretamente no substrato, evitando o contato da água com as partes aéreas do vegetal.

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva para a fertirrigação (adubação de crescimento).

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	(mg L ⁻¹)
Nitrato de potássio (Nuclear®)	KNO ₃ / 101,10	206,8500
Monoamônio fostato (Mallinckrodt®)	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	44,5700
Nitrato de amônio (Reagex®)	NH ₄ NO ₃ / 80,04	140,5000
Sulfato de cálcio (Vetec®)	CaSO ₄ .2H ₂ O / 172,17	87,1817
Nitrato de cálcio (Labsynth®)	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	57,1800
Sulfato de magnésio (Mallinckrodt®)	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	121,6680
Sulfato de manganês (Ecibra®)	MnSO ₄ .H ₂ O / 169,01	4,9223
Sulfato de cobre (Mallinckrodt®)	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,3929
Sulfato de ferro (Synth®)	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	9,9520
Sódio - EDTA (Nuclear®)	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	13,3110
Molibdato de sódio (Merck®)	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,0504
Sulfato de zinco (Mallinckrodt®)	ZnSO ₄ .7H ₂ O / 287,54	8,6000
Ácido bórico (Ecibra®)	H ₃ BO ₃ / 61,83	6,2000

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

Fonte: Do autor (2021).

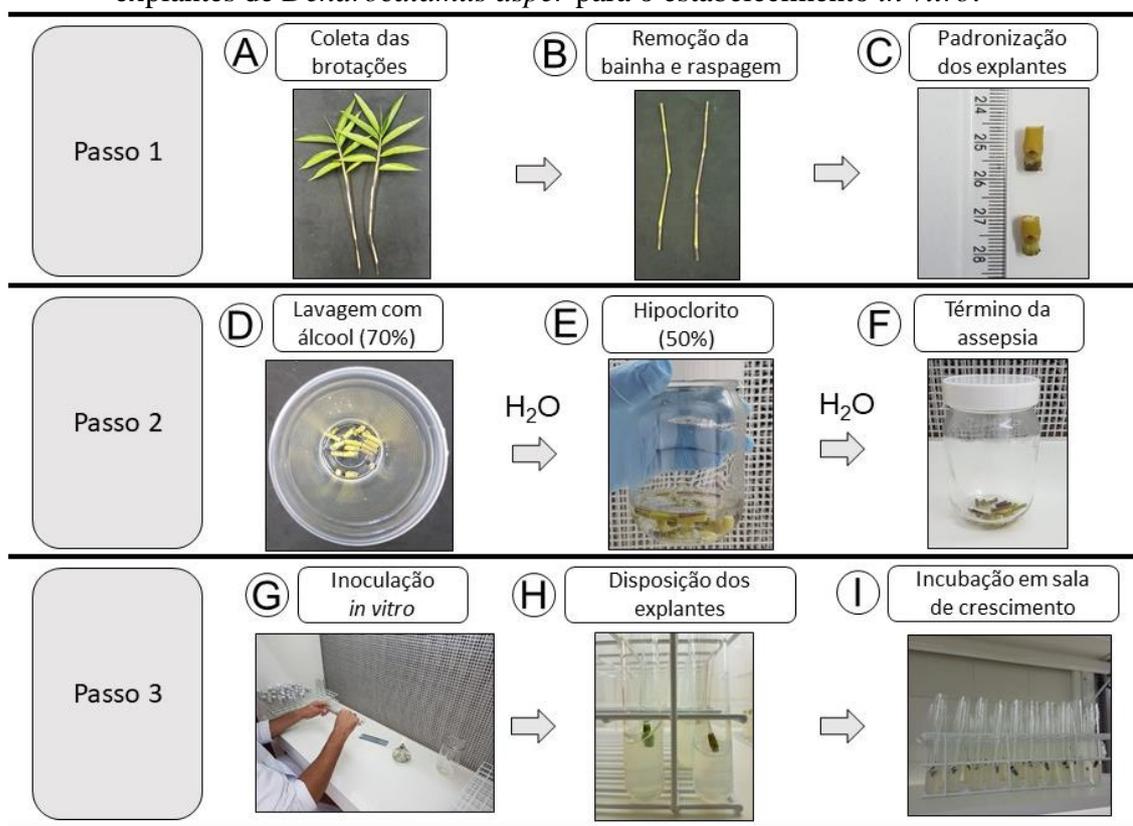
Aos 12 meses, as brotações foram coletadas e transportadas para o Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais da UFLA (FIGURA 1A). Posteriormente, as bainhas foliares foram removidas e seus resquícius cuidadosamente raspados (FIGURA 1B) com o auxílio de estilete, a fim de que a gema seja exposta facilitando a assepsia. O material então foi lavado com água deionizada e autoclavada e detergente neutro. Em seguida, as brotações foram reduzidas à explantes nodais de 1 cm de comprimento (FIGURA 1C) e foram submetidas a lavagem por 30 segundos em solução hidroalcoólica à 70% (FIGURA 1D), seguido de lavagem com água deionizada e esterilizada. Posteriormente foram imersos em solução contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) (água:hipoclorito, v/v, 1,00 – 1,25% de cloro ativo), onde foram testados quatro tempos de exposição ao agente desinfestante (T1: 5 minutos; T2: 10 minutos; T3: 15 minutos e T4: 20 minutos - FIGURA 1E). Passado esse período de imersão, os explantes foram transportados para câmara de fluxo laminar, onde foram submetidos a quatro lavagens com água deionizada e esterilizada, com o objetivo de eliminar resíduos superficiais de hipoclorito de sódio (FIGURA 1F).

Finalizando o tratamento asséptico, os explantes foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), os quais foram vedados com filme plástico à base de policloreto de vinila (PVC) (FIGURA 1G). Os tubos de ensaio (20 × 100 mm) foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de 24°C±1°C, sob irradiação de 40 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas (FIGURA 1H e 1I).

Ao final de 30 dias, foi avaliada a porcentagem de contaminação (fungos e/ou bactérias), oxidação e emissão de brotações. Os explantes isentos de contaminação e oxidação foram considerados estabelecidos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo avaliado quatro tempos de imersão em hipoclorito de sódio (T1: 5 minutos; T2: 10 minutos; T3: 15 minutos e T4: 20 minutos). Cada tratamento foi composto por 40 repetições contendo um explante em cada repetição.

Figura 1 - Fluxograma da coleta de brotos, padronização de explantes e assepsia testada em explantes de *Dendrocalamus asper* para o estabelecimento *in vitro*.



Legenda: A. brotações após a coleta em campo; B. pré-assepsia com remoção da bainha e raspagem; C. padronização dos explantes; D. lavagem por 30 segundos com solução hidroalcoólica à 70%; E. assepsia dos explantes com exposição ao agente desinfestante; F. término da assepsia; G. inoculação dos explantes *in vitro*; H-I. disposição e incubação dos tubos de ensaio contendo os explantes em sala de crescimento.

Fonte: Do autor (2021).

2.2 Multiplicação e alongamento *in vitro*

As fases de multiplicação e alongamento ocorreram concomitantemente, os explantes estabelecidos foram transferidos para frascos de vidro (72×72×100 mm) contendo 50 mL do meio de cultura MS suplementado com três concentrações de benzilaminopurina (BAP) (C1: 1,0 mg L⁻¹; C2: 2,0 mg L⁻¹ e C3: 3,0 mg L⁻¹). O ácido naftalenoacético (ANA) foi suplementado à 0,5 mg L⁻¹ em todos os tratamentos. Os frascos foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de 24°C±1°C, sob irradiação de 40 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

A cada 30 dias foi realizado subcultivo, mantendo-se os tratamentos. Em cada subcultivo foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, emissão de brotações, número de brotos e comprimento de brotos.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, testando-se três concentrações de BAP (1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹). Cada tratamento foi composto por 15 repetições contendo um explante em cada repetição.

2.3 Enraizamento *in vitro*

Explantes com tamanho superior a 5 cm de comprimento (oriundos das fases de multiplicação e alongamento) foram inoculados em frascos de vidro (72×72×100 mm) contendo 50 mL do meio de cultura MS suplementado com três concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (C1: 2,0 mg L⁻¹; C2: 4,0 mg L⁻¹ e C3: 6,0 mg L⁻¹). O meio de cultura foi suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP em todos os tratamentos. Os frascos foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de 24°C±1°C, sob irradiação de 40 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias foi avaliada a porcentagem de enraizamento.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, testando-se três concentrações de AIB (2,0; 4,0 e 6,0 mg L⁻¹). Cada tratamento foi composto por 15 repetições contendo um explante em cada repetição.

2.4 Preparo do meio de cultivo

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 / 342,30 g). O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) previamente a adição do ágar ao meio de cultura, e então autoclavado a temperatura de 127°C (1,5 kgf cm⁻²) durante 20 minutos. O BAP (C₁₂H₁₁N₅ / 225,25 g), ANA (C₁₂H₁₀O₂ / 186,2 g) e AIB (C₁₂H₁₃NO₂ / 203,24 g) foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem.

2.5 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas em software R Core Team (2018), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013). Os dados coletados dos experimentos foram analisados quanto à homocedasticidade e distribuição normal de resíduos por meio dos testes de Hartley ($p > 0,05$) e Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), respectivamente. Conforme os resultados dos testes de Hartley e Shapiro-Wilk, os dados foram

transformados por teste Box-Cox. Após, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foliares das plantas enraizadas *in vitro* foram coletadas e seccionadas em tamanhos de 0,5 cm², e colocadas submersas em microtubos (1,5 mL) contendo o fixador Karnovsky (glutaraldeído à 2,5%, paraformaldeído à 2,0%, 0,05 M de tampão cacodilato à pH de 7,2 + 0,001 M de CaCl₂) por 72 horas na geladeira. Posteriormente, as amostras passaram por tríplice lavagem em tampão cacodilato (0,05 M) por 10 minutos cada. Em seguida, foi iniciada a etapa de desidratação utilizando uma série graduada de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%) por 10 minutos cada, sendo a concentração 100% repassada 3 vezes. Após a desidratação, as amostras foram colocadas em um suporte poroso contendo acetona, e encaminhadas para a fase de secagem ao ponto crítico, onde a acetona foi volatizada e substituída pelo gás carbônico (CO₂). Para a montagem das amostras foliares nos *stubs*, os suportes foram envoltos por papel alumínio e fixados em fita de carbono dupla face, onde as amostras foram depositadas. Por fim, a etapa de metalização em ouro foi realizada. Posteriormente, foi feita a observação em MEV (LEO EVO-40) e as imagens foram registradas.

2.7 Fidelidade genética

Folhas jovens foram coletadas do material enraizado *in vitro* e também das plantas matrizes em vasos, visando avaliar a fidelidade genética. As extrações de DNA foram realizadas de acordo com protocolo adaptado de Ferreira e Grattapaglia (1998). Para avaliar a fidelidade genética foram utilizados 18 *primers*, cujas especificações estão apresentadas na Tabela 2.

As reações de ISSR foram preparadas em microplacas (PCR-96-Axygen Scientific), sendo que em cada poço foram colocados 3 µL de DNA (padronizado a 20 ng µL⁻¹ para todas as amostras) e 10 µL 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 µL⁻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 µL)]. As reações foram amplificadas em termociclador Gene Amp PCR System 9700, seguindo as seguintes etapas: 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 Gel Red TM (Uniscience). As análises dos amplicons foram realizadas visualmente.

Tabela 2 - *Primers* ISSR utilizados nas análises de fidelidade genética de indivíduos de *Dendrocalamus asper*.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
Chris	(CA) ₇ -YG
John	(AG) ₇ -YC
UBC809	(AG) ₈ -G
UBC811	(GA) ₈ C
UBC814	(CT) ₈ -TG
UBC825	(AC) ₈ -T
UBC827	(AC) ₈ -G
UBC834	(AG) ₈ YT
UBC835	(AG) ₈ -YC
UBC840	(GA) ₈ -YT
UBC841	(GA) ₈ -YC
UBC842	(GA) ₈ -YG
UBC844	(CT) ₈ -RC
UBC848	(CA) ₈ -RG
UBC857	(AC) ₈ YG
UBC880	(GGAGA) ₃
UBC898	(CA) ₆ -RY
UBC901	(GT) ₆ YR

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

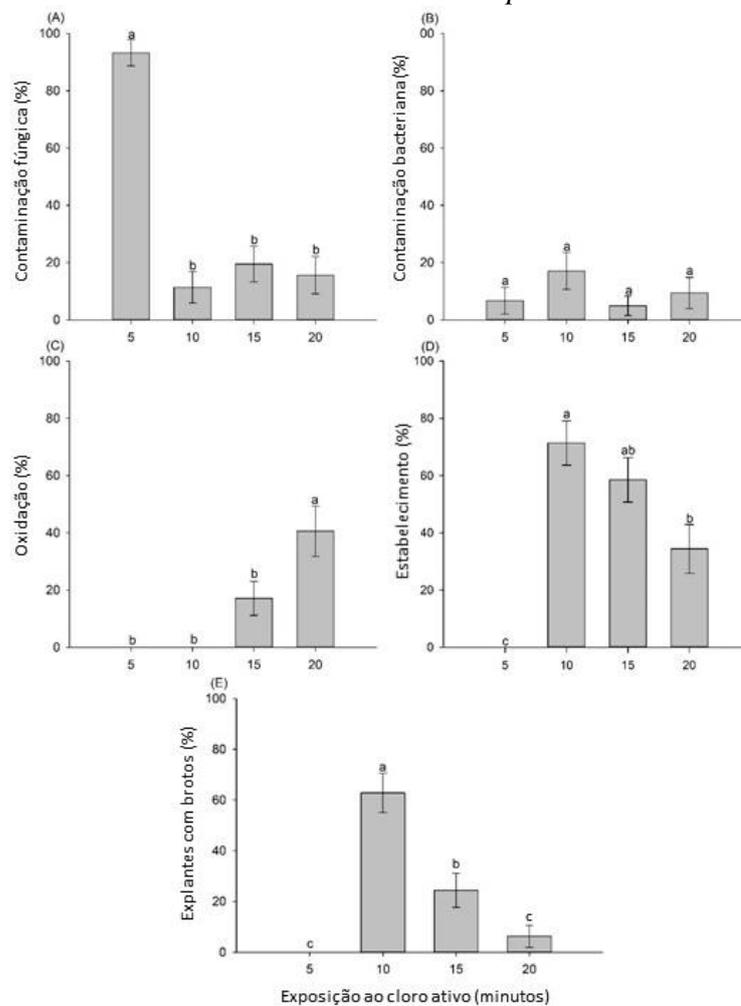
Fonte: Do autor (2020).

3 RESULTADOS

3.1 Estabelecimento *in vitro*

A utilização do cloro ativo como agente desinfestante influenciou significativamente o estabelecimento *in vitro* de *Dendrocalamus asper*. Em relação à contaminação fúngica (FIGURA 2A) houve diferença no tempo de 5 minutos, com elevada porcentagem de contaminação (93,33%). O menor valor para contaminação fúngica foi verificado no tempo 10 minutos com 11,42%.

Figura 2 - Estabelecimento *in vitro* de *Dendrocalamus asper* aos 30 dias.



Legenda: A. Porcentagem de contaminação fúngica; B. Porcentagem de contaminação bacteriana; C. Porcentagem de oxidação dos tecidos; D. Porcentagem de estabelecimento *in vitro* e E. Porcentagem de explantes com brotos. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

No que diz respeito a porcentagem de contaminação bacteriana, em todos os tratamentos testados houve manifestação de bactérias, com valores entre 4,8% e 17,4%, não existindo diferença significativa entre os tempos avaliados (FIGURA 2B).

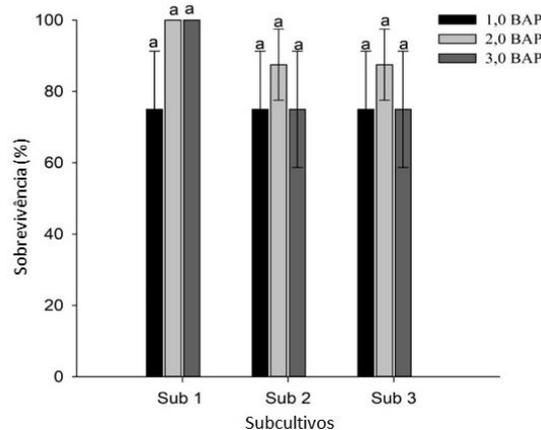
No que diz respeito a porcentagem de oxidação, houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados (FIGURA 2C), sendo possível observar que quanto maior foi o tempo de exposição ao cloro ativo (20 minutos) maior foi a porcentagem de oxidação (40%). Nos menores tempos de exposição ao cloro ativo (5 e 10 minutos) não houve oxidação dos tecidos.

O estabelecimento *in vitro* foi significativamente influenciado pelos diferentes tempos de exposição ao cloro ativo e as maiores porcentagens de estabelecimento (71,42%) e de explantes que emitiram brotações (62,85%), foram observadas no tratamento com 10 minutos de exposição ao cloro ativo (FIGURA 2D e 2E).

3.2 Multiplicação e alongamento *in vitro*

As fases de multiplicação e alongamento ocorreram concomitantemente. Acerca da sobrevivência, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos avaliados, com valores variando de 75% a 100% (FIGURA 3). Com isso, pode-se considerar que o protocolo utilizado para a multiplicação e alongamento *in vitro* de *D. asper* tenha sido eficiente, de acordo com esse parâmetro avaliado, devido à baixa porcentagem de mortalidade dos explantes e porcentagem de emissão de brotos considerada adequada.

Figura 3 - Sobrevivência *in vitro* em *Dendrocalamus asper* em relação da utilização de AIB e em relação aos subcultivos.



Legenda: Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados apresentados com média \pm erro padrão.

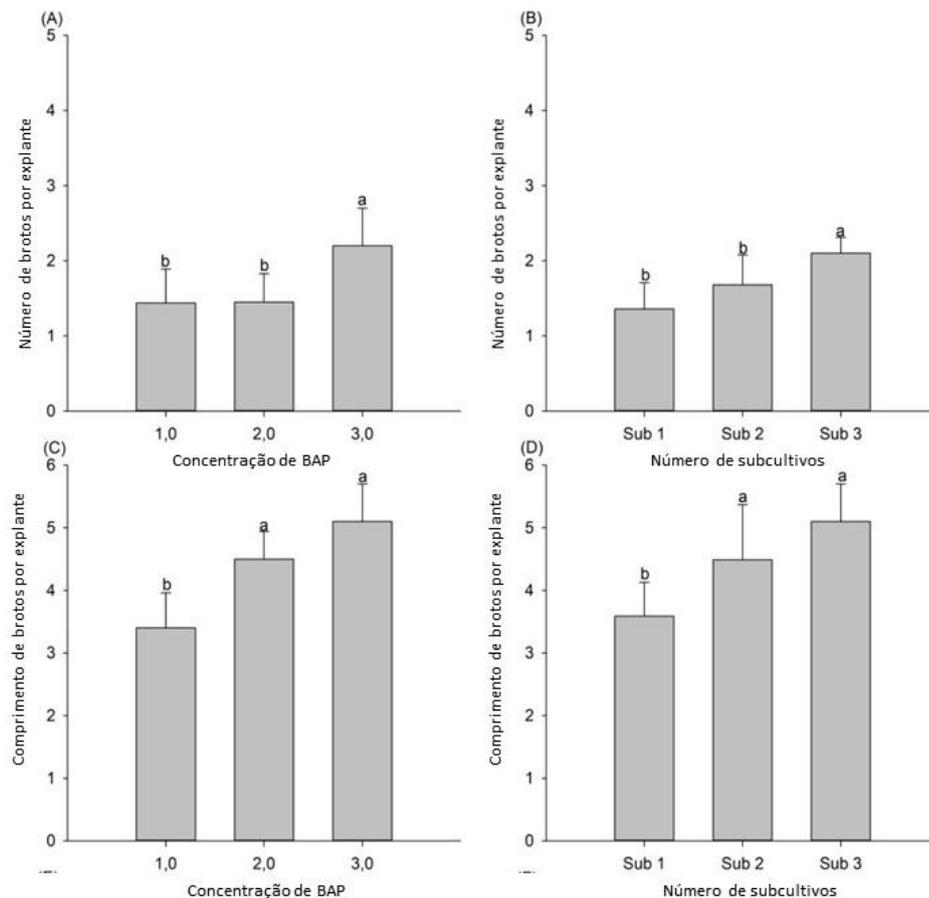
Fonte: Do autor (2021).

Houve diferença significativa para o número médio de brotos entre os tratamentos avaliados (FIGURA 4A e 4B), em que os maiores valores foram observados com a utilização de 3,0 mg L⁻¹ de BAP (2,2 brotos por explante) e no terceiro subcultivo realizado aos 90 dias (2,1 brotos por explante).

Em relação ao comprimento de brotos, os maiores valores foram observados nos tratamentos onde houve suplementação de 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura, resultando em brotos com comprimento médio de 4,4 cm e 5,0 cm, respectivamente (FIGURA 4C).

No que diz respeito ao número de subcultivos (realizados a cada 30 dias), os maiores valores médios de comprimento de brotos foram verificados no segundo (4,48 cm) e terceiro (5,1 cm) subcultivos (FIGURA 4D).

Figura 4 - Multiplicação e alongamento *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.



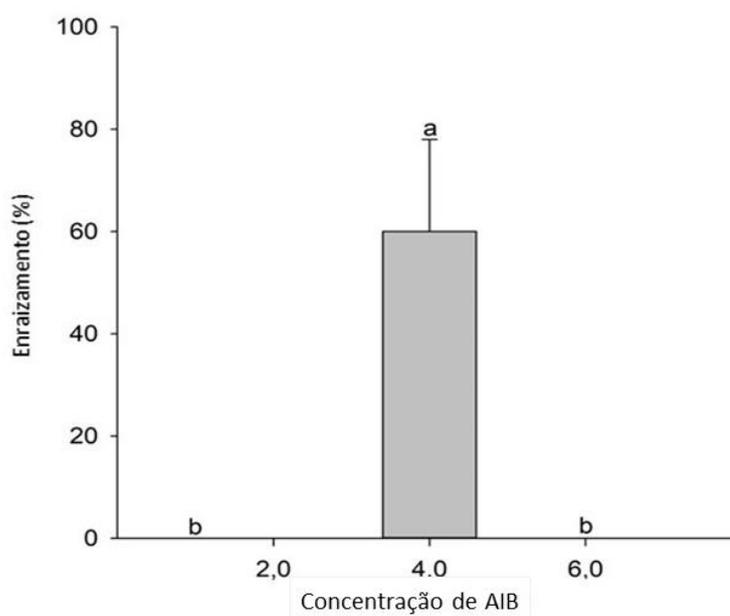
Legenda: A-B. número de brotos por explante em relação da utilização de BAP e em relação dos subcultivos; C-D. comprimento de brotos em relação da utilização de BAP e em relação dos subcultivos. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

3.3 Enraizamento *in vitro*

No que diz respeito ao enraizamento, houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados, havendo a emissão de raízes adventícias (FIGURA 5) apenas no tratamento em que foi utilizado 4,0 mg L⁻¹ de AIB (60% de enraizamento).

Figura 5 - Enraizamento *in vitro* em *Dendrocalamus asper* em relação da utilização de AIB aos 30 dias.



Legenda: Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

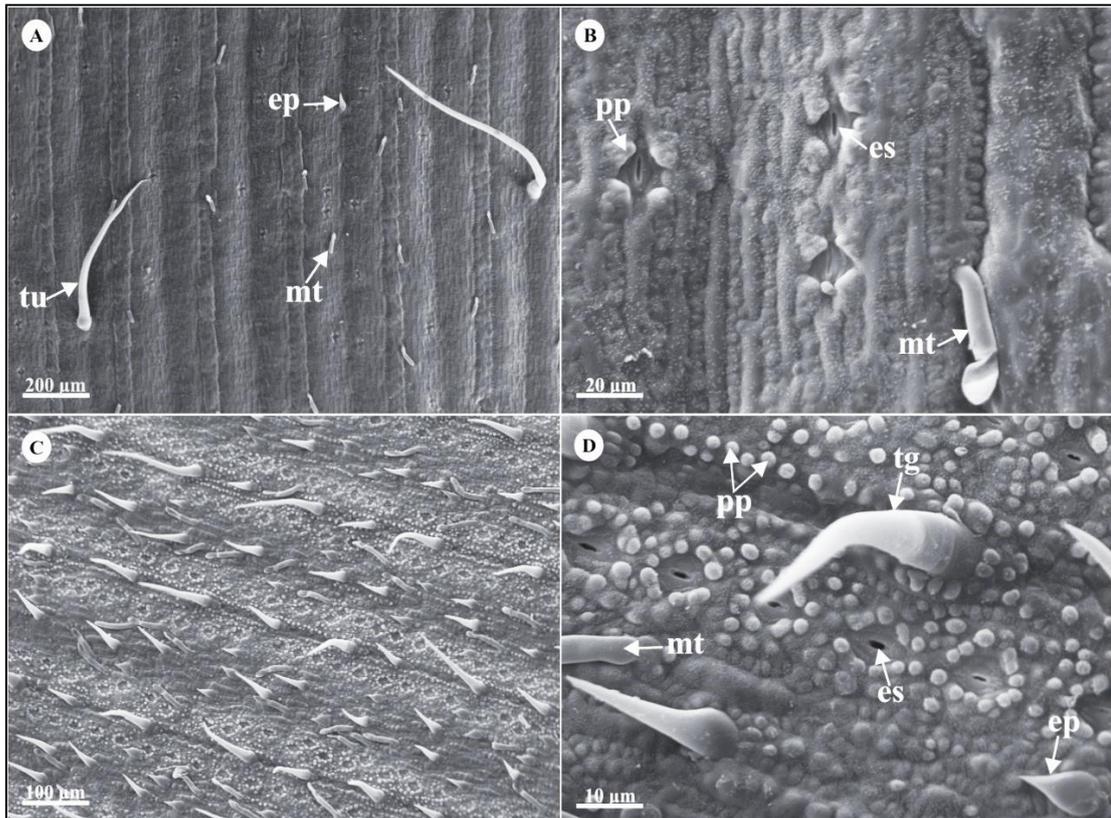
3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Por meio da microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar as características anatômicas da superfície foliar de plântulas de *D. asper* cultivadas *in vitro* (FIGURA 6). A superfície adaxial da lâmina foliar tem estômatos, espinhos, tricomas unicelulares curtos, longos e microtricomas, ambos em pequenas quantidades (FIGURA 6A). Na Figura 6B é possível observar estômatos envoltos por papilas epidérmicas e microtricoma.

Na superfície abaxial (FIGURA 6C), observa-se tricomas em forma de gancho, tricomas unicelulares longos, estômatos arranjados em fileiras próximos aos tricomas e uma grande densidade de papilas. Na Figura 6D, em alta ampliação, são observados com maior detalhe as

papilas, estando muitas vezes associadas aos estômatos, tricomas em forma de gancho, microtricoma, espinho e o padrão de distribuição dos estômatos.

Figura 6 - Características anatômicas da superfície foliar de *Dendrocalamus asper* cultivado *in vitro*.



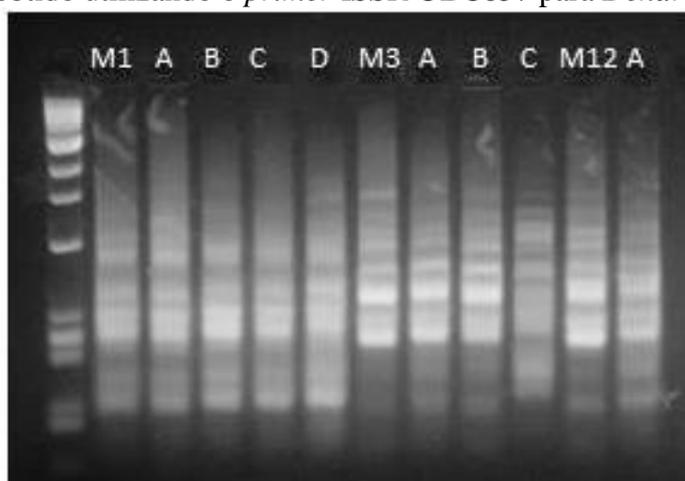
Legenda: A. Secção paradérmica da face adaxial com presença de tricomas unicelulares, estômatos, espinhos e microtricomas. B. Detalhes dos estômatos e presença de microtricoma. C. Face abaxial, nota-se microtricomas, espinhos, papilas, estômatos e tricomas. D. Detalhe dos estômatos com papilas e tricomas em forma de gancho. (ep) espinho, (es) estômato, (mt) microtricoma, (pp) papila, (tg) tricoma em forma de gancho, (tu) tricoma unicelular.

Fonte: Do autor (2021).

3.5 Fidelidade genética

Constatou-se que os indivíduos micropropagados são clones idênticos das plantas matrizes de *Dendrocalamus asper* (FIGURA 7). Os 18 *primers* testados amplificaram e produziram amplicons estáveis, sendo considerados na avaliação de fidelidade genética.

Figura 7 - Gel obtido utilizando o *primer* ISSR UBC857 para *Dendrocalamus asper*.



Fonte: Do autor (2021).

Nenhum dos indivíduos micropropagados apresentou polimorfismo, ou seja, os amplicons exibiram o mesmo perfil para todos os indivíduos (TABELA 3). A presença de monomorfismo confirma que não houve variação somaclonal durante os subcultivos.

Tabela 3 - Resultado das ampliações por *primers* para *Dendrocalamus asper*

<i>Primer</i>	Total de amplicons	Monomórficas	Polimórficas
Chris	3	3	0
John	6	6	0
UBC809	6	6	0
UBC811	6	6	0
UBC814	6	6	0
UBC825	5	5	0
UBC827	4	4	0
UBC834	6	6	0
UBC835	4	4	0
UBC840	6	6	0
UBC841	5	5	0
UBC842	3	3	0
UBC844	4	4	0
UBC848	5	5	0
UBC857	6	6	0
UBC880	6	6	0
UBC898	6	6	0
UBC901	3	3	0

Fonte: Do autor (2021).

4 DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento *in vitro*

A biotecnologia envolve ferramentas eficazes para propagar bambus em larga escala (ORNELLAS et al., 2017). No entanto, para essas espécies a contaminação por organismos fitopatênicos é um dos grandes empecilhos para a obtenção de sucesso na fase de estabelecimento *in vitro* (FURLAN et al., 2018; TORRES; HOULLOU; SOUZA, 2016).

A contaminação por microrganismos tem sido relatada para várias espécies de bambus, tais como para *Bambusa ventricosa* Mc-Clure (WEI et al., 2015), *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl (FURLAN et al., 2018), *Dendrocalamus asper* Backer ex. K. Heyneke (SINGH et al., 2012) e *Dendrocalamus strictus* Ness. (PANDEY; SINGH, 2012) corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Por conseguinte, é importante definir protocolos de assepsia contendo agentes antimicrobianos para minimizar a contaminação *in vitro* (ORNELLAS et al., 2017).

A utilização de cloro ativo apresenta-se como alternativa na micropropagação de *Dendrocalamus asper* sendo considerado um produto barato e eficaz para a desinfestação dos explantes (BRONDANI et al., 2013; BRONDANI et al., 2017). No presente estudo, o uso desse agente foi eficaz para o controle de fungos e bactérias (FIGURA 2A e 2B).

Por meio dos resultados obtidos na presente pesquisa, foi possível observar que a porcentagem de oxidação apresentou aumento em relação ao uso do hipoclorito de sódio, sendo que, quanto maior o tempo de exposição, maior foi a porcentagem de oxidação, inferindo assim, que os tecidos da espécie podem apresentar elevada sensibilidade quando expostos por maiores períodos de tempo ao tratamento químico.

Os eventos de oxidação são na maioria das vezes relacionados a mecanismos de cicatrização tecidual, que causam a exsudação de compostos fenólicos em resposta às lesões nos explantes durante o preparo do material e inoculação *in vitro* (MUDOI et al., 2013), podendo levar como consequência a a inviabilização dos explantes, afetando as próximas fases do cultivo (BRONDANI et al., 2017).

Em relação ao estabelecimento *in vitro* e emissão de brotações, os maiores valores foram observados no tempo de 10 minutos de exposição ao cloro ativo, resultando em 71,42% de estabelecimento e 62,85% de explantes com emissão de brotos aos 30 dias. O valor para o estabelecimento pode ser considerado adequado, denotando a importância de altas porcentagens

de indução de brotos para serem utilizadas para as demais fases da micropropagação. Na literatura observa-se porcentagens satisfatórias de estabelecimento *in vitro* para *Dendrocalamus asper* Backer ex. K. Heyneke (SINGH et al., 2012) e *Dendrocalamus strictus* Ness. (PANDEY; SINGH, 2012), com a utilização de cloro ativo como agente desinfestante, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Além disso, com o aumento do tempo de exposição ao agente desinfestante, a emissão de brotações foi menor. Tal fator pode estar relacionado com a toxidez que o cloro ativo pode ocasionar aos tecidos dos explantes, podendo acarretar na mortalidade. Segundo Brondani et al. (2013), múltiplos fatores podem interferir no estabelecimento *in vitro*, como o material genético, o tipo e origem do explante, as condições fisiológicas das matrizes, além do método de assepsia e a fitotoxicidade causada pelos agentes desinfestantes.

4.2 Multiplicação e alongamento *in vitro*

No presente estudo foi possível evidenciar que existe relação direta entre concentração de BAP com o número e comprimento de brotos emitidos, tendo em vista que a maior porcentagem de multiplicação e alongamento foi observada quando se utilizou maiores concentrações desse regulador de crescimento.

A adição de citocininas no meio de cultura é utilizada para induzir a multiplicação, alongamento de brotos e indução de ramos axilares, e são aplicadas de forma exógena e podem ser utilizadas isoladamente ou combinadas, dependendo do objetivo, da espécie e dos níveis endógenos encontrados no material utilizado (BANIK, 2015; SINGH et al., 2004).

Dados descritos na literatura corroboram com os encontrados nesse estudo, tendo em vista que Negi e Saxena (2011) trabalhando com *Bambusa nutans* Wall. ex Munro, e Pandey e Singh (2012) com *Dendrocalamus strictus* Nees, verificaram que maiores concentrações de citocinina na fase de multiplicação favorecem a emissão de brotações. A utilização de BAP também é descrita na literatura para auxiliar a multiplicação de espécies de *Dendrocalamus asper* Backer ex K. Heyneke (SINGH et al., 2012; SINGH et al., 2013; ORNELLAS et al., 2017) e *Drepanostachyum luodianense* Keng f. (LIN et al., 2019).

Em relação ao comprimento de brotos, Singh et al. (2012), trabalhando com *Dendrocalamus asper* Backer ex K. Heyneke, observaram que o aumento da concentração de BAP no meio cultivado não favoreceu o crescimento em comprimento, evidenciando que menores concentrações apresentaram resultados mais satisfatórios, diferindo dos resultados encontrados

no presente estudo, tendo em vista que nas maiores concentrações de reguladores de crescimento o número médio de comprimento dos brotos foi maior. Além disso, foi possível observar que os maiores valores para o número de brotos ocorreram no terceiro subcultivo e para o comprimento de broto, nos segundo e terceiro subcultivos, sugerindo que o aumento do número de subcultivos favorece a multiplicação e alongamento de *Dendrocalamus asper* Backer ex K. Heyneke.

De acordo com Santos et al. (2016), definir o número ideal de subcultivos é de grande relevância para a adaptação dos explantes à nova condição estabelecida, favorecendo a absorção da fonte exógena de citocinina e auxina e, em segundo caso, para aumentar a resposta ao estímulo morfogênico. Segundo Nogueira et al. (2017) durante a etapa de multiplicação, inúmeros subcultivos podem ser necessários até se atingir o número desejado de plantas, com idêntica composição genética da planta-matriz. Ainda de acordo com estes autores, inúmeros subcultivos são necessários devido ao esgotamento dos constituintes do meio de cultura (tais como carboidratos, sais minerais e vitaminas), além do acúmulo de compostos como o etileno e os polifenóis, que podem ser deletérios à cultura.

4.3 Enraizamento *in vitro*

Em relação ao enraizamento adventício, houve formação de raiz apenas no tratamento em que foi utilizada a concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB (60% de enraizamento). A etapa de enraizamento é recomendável para a obtenção de um sistema radicial com estruturação normal e funcional, o qual poderá favorecer a sobrevivência e o crescimento *ex vitro* das plantas, evitando possíveis perdas durante a aclimatização (NOGUEIRA et al., 2017). No entanto, esta fase da micropropagação é um dos grandes empecilhos durante o cultivo *in vitro* em espécies de bambus (BRAR; ANAND; SOOD, 2013). Para aumentar o sucesso da aclimatização, é comum o uso de diferentes auxinas, que de acordo com o movimento através dos tecidos, podem se manter ligadas no interior das células ou serem metabolizadas (SINGH et al., 2012).

O enraizamento é uma etapa fundamental em qualquer sistema de micropropagação, e comumente, as espécies de bambus não apresentam facilidade de enraizamento, sendo comum a obtenção de um baixo número de explantes responsivos (MUDOI et al., 2013; SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018). No entanto, Ramanayake et al. (2008) avaliaram diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de *Dendrocalamus giganteus* (Wall) Munro e *D. hookeri* Munro e verificaram até 100% de enraizamento nessas espécies

com o uso de AIB. Nogueira, Gomes e Scherwinski-Pereira (2019), verificaram elevadas porcentagens de enraizamento para *Guadua magna* Londoño & Filg. e *Guadua angustifolia* Kunth ao utilizarem concentração de 3,0 mg L⁻¹ de AIB. Essas observações reforçam a necessidade da suplementação de AIB ao meio de cultura para induzir raízes adventícias em *D. asper*, corroborando com os nossos resultados.

Não obstante, é importante levar em consideração que as mudas que servem como fonte de explante para a inoculação *in vitro* são de origem seminal, o que indica baixa idade ontogenética das plantas, fato este que pode influenciar na capacidade das células em responder a estímulos e rediferenciar-se, induzindo assim o enraizamento adventício com maior facilidade devido a juvenilidade dos tecidos (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014).

4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Segundo Montiel e Sanchez (2006a), o conhecimento anatômico ultraestrutural é importante em diversas áreas de estudos, principalmente para a correta identificação de espécies que são facilmente confundidas.

As características anatômicas da superfície foliar de plântulas de *D. asper* cultivadas *in vitro* são compatíveis com a caracterização realizada por Montiel e Sanchez (2006b), onde os autores também caracterizaram a superfície foliar de clones cultivados em Taiwan e Tailândia. De acordo com estes autores as superfícies das lâminas foliares dos clones apresentam tricomas largos e espinhos, corroborando com a descrição realizada no presente estudo para *Dendrocalamus asper*.

Na superfície abaxial (FIGURA 6C), foi verificada uma grande densidade de papilas, que são estruturas importantes na taxonomia de algumas espécies de bambus (OLIVEIRA; LONGHI-WAGNER; LEITE, 2008). Em *D. asper*, as papilas foram observadas em maior abundância na face abaxial, mas também podem ser encontradas na face adaxial. Observa-se, ainda, que há uma maior presença de estômatos, tricomas e células papilhosas na face abaxial quando comparada a face adaxial.

4.5 Fidelidade genética

As plantas micropropagadas são clones fiéis as plantas matrizes doadoras de propágulos, tendo em vista que não ocorreu variação genética ao longo quatro subcultivos (150 dias).

Mesmo que a variação somaclonal não tenha sido constatada no presente estudo, com o aumento dos subcultivos esse fenômeno pode ocorrer devido a influência de diversos fatores, inclusive pela adição de altas concentrações de reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultivo (VENKATACHALAM; SREEDHAR; BHAGYALAKSHMI, 2007) que podem causar distúrbios do ciclo celular (PESCHKE; PHILLIPS, 1992). Segundo Singh et al. (2013), a verificação da fidelidade genética de indivíduos micropropagados em um estágio inicial pode contribuir para definição de protocolos confiáveis, evitando problemas futuros com as plantas em campo após o plantio.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com espécies de bambus para a verificação da fidelidade genética de clones quando comparados com as plantas matrizes, por meio da utilização de marcadores ISSR, como Singh et al. (2012) em *Dendrocalamus asper*, Anand, Brar e Sood (2013) em clones de *Bambusa bambos* (L.) Voss e Nogueira, Gomes e Scherwinski-Pereira (2019), em *Guadua magna* Londoño & Filg. e *Guadua angustifolia* Kunth. Nesse estudo, não foi observada variação genética das plantas cultivadas *in vitro* mesmo após 5 meses de cultivo *in vitro* com a utilização de reguladores de crescimento, com isso, é possível sugerir que o protocolo utilizado foi eficiente para a produção de plantas clonais.

5 CONCLUSÕES

- O uso de hipoclorito de sódio na concentração de 1,00 - 1,25% de cloro ativo (água:hipoclorito, v/v) por 10 minutos resultou em 71,42% de estabelecimento de segmentos nodais e 62,85% de emissão de brotações, aos 30 dias.
- As fases de multiplicação e alongamento ocorreram simultaneamente. A suplementação do meio de cultura com 2,0 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹ de BAP apresentou os melhores resultados para o número de brotos e comprimento de brotos.
- A concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB induziu a formação de raízes adventícias.
- As plantas micropropagadas apresentaram fidelidade genética em relação às plantas matrizes.

6 AGRADecIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Aos técnicos, Dr^a. Ana Luiza Oliveira Timbó e José Pedro de Oliveira, pelo auxílio na condução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In vitro* propagation of an edible bamboo *Bambusa bamboos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, Kuwait, v. 2, n. 4, p. 257-261, 2013.
- BANIK, R. L. Bamboo Silviculture. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (Ed.) **Bamboo: The plant and its uses**. Switzerland: Springer International Publishing, Zúrique, 2015. p. 113-174.
- BENTON, A. Priority Species of Bamboo. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (Ed.) **Bamboo: The plant and its uses**. Switzerland: Springer International Publishing, Zúrique, 2015. p. 31-41.
- BRAR, J.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* seed germination of economically important edible bamboo *Dendrocalamus membranaceus* Munro. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 51, n. 1, p. 88-96, 2013.
- 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, 2011.
- BRONDANI, G. E. et al. Chemical sterilization of culture medium: a low cost alternative to *in vitro* establishment of plants. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 257-264, 2013.
- 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. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p. 86-102.
- COSTA, F. A. et al. Protocolo para micropropagação de duas espécies de *Guadua*. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p. 71-85.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília, Brasil: Embrapa-Cenargen, 1998.
- FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2. 2013.
- FURLAN, F. C. et al. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, Valdivia, v. 39, n. 1, p. 61-70, 2018.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8 ed. São Paulo, Brasil: Prentice-Hall, 2011.
- INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN. INBAR. **Evaluation of bamboo resources in Latin America** [online], Beijing, 2015. Disponível em: <<http://www.inbar.int/#1>>. Acesso em: jan. 2020.
- KONZEN, E. R. et al. Molecular identification of bamboo general and species based on RAPD-RFLP markers. **Silva Fennica**, Helsinque, v. 51, n. 4, p. 1-16, 2017.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.

LIESE, W.; KOHL, M. **Bamboo** - The plant and its uses. Switzerland: Springer International Publishing, Zurique, 2015.

LIN, S. et al. Shoot proliferation and callus regeneration from nodular buds of *Drepanostachyum luodianense*. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 30, n. 6, p. 1997-2005, 2019.

MONTIEL, M.; SÁNCHEZ, E. Ultraestructura de bambúes del género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) cultivados en Costa Rica III: *Dendrocalamus giganteus*. **Revista de Biología Tropical**, v. 54, n. 2, p. 59-63, 2006a.

MONTIEL, M.; SÁNCHEZ, E. Ultraestructura de bambúes del género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) cultivados en Costa Rica IV: *Dendrocalamus asper*, clones Taiwán y Tailandia Mayra. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 54, n. 2, p. 65-75, 2006b.

MUDOI, K. D. et al. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, 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**, Malden, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEGI, D.; SAXENA, S. *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. **Plant Biotechnology**, Nara, v. 5, n. 1, p. 35-43, 2011.

NOGUEIRA, J. S. et al. Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P. M.; WIEDEMAN, G. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p.103-129.

NOGUEIRA, J. S.; GOMES, H. T.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Guadua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, n. 1, e53743, 2019.

OLIVEIRA, R. P.; LONGHI-WAGNER, H. M.; LEITE, K. R. B. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia de *Raddia* Bertol. (Poaceae: Bambusoideae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 1-19, 2008.

ORNELLAS, T. S. et al. Effects of Vitrofur, BAP and meta-Topolin in the *in vitro* culture of *Dendrocalamus asper*. **Acta Horticulturae**, Korbeek-Lo, v. 1155, n. 1, p. 285-292, 2017.

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

PESCHKE, V. M.; PHILLIPS, R. L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 30, n. 1, p. 41-75, 1992.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.

RAMANAYAKE, S. M. S. D. et al. Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, n. 3, p. 270-273, 2008.

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

ROSA, R. A. et al. Influência da espécie, tratamento preservativo e adesivo nas propriedades físicas do bambu laminado colado. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 913-924, 2016.

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**, Dordrecht, v. 132, n. 1, p. 27-53, 2018.

SANTOS, E. O. et al. BAP concentration and subcultive number in torch ginger multiplication. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2016.

SINGH, S. R.; KUMAR, P.; ANSARI, S. A. A simple method for large-scale propagation of *Dendrocalamus asper*. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, 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**, New Delhi, 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**, Heidelberg, v. 35, n. 2, p. 419-430, 2013.

TAMBARUSSI, E. V. et al. Efficient and new method for *Tectona grandis in vitro* regeneration. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 17, n. 2, p. 124-132, 2017.

TORRES, G. R. C.; HOULLOU, L. M.; SOUZA, R. A. Control of contaminants during introduction and establishment of *Bambusa vulgaris in vitro*. **Research in Biotechnology**, Tamil Nadu, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2016.

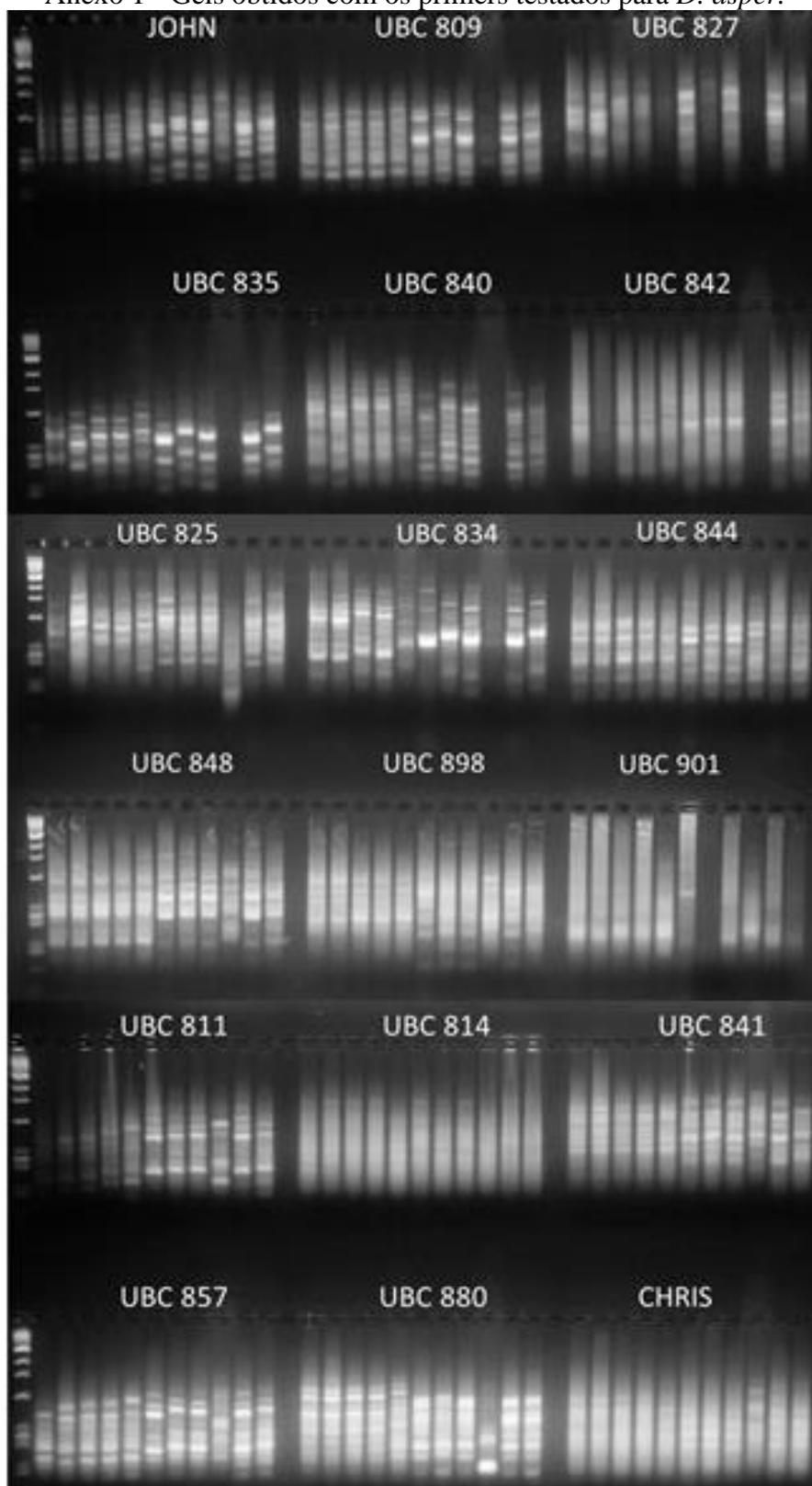
VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 193-205, 2007.

WEI, Q. et al. Establishment of an efficient micropropagation and callus regeneration system from the axillary buds of *Bambusa ventricosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2015.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry - part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, Dordrecht, v. 45, n. 4, p. 473-486, 2014.

ZHAO, H. et al. Announcing the Genome Atlas of Bamboo and Rattan (GABR) project: promoting research in evolution and in economically and ecologically beneficial plants. **GigaScience**, London, v. 6, n. 7, p. 1-7, 2017.

ANEXOS

Anexo 1 - Géis obtidos com os primers testados para *D. asper*.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 2 - Análise de variância para a porcentagem de contaminação fúngica dos explantes de *Dendrocalamus asper* em relação ao estabelecimento *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tempo	3	2,0959	0,6986	39,6391**	0,0001
Resíduo	134	2,3618	0,0176		
Total	137	4,4578			
CV(%)	27,57				
Média Geral	0,4815				

Nota: ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $1/\exp(x+0,5)$ onde x refere-se ao dado amostrado.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 3 - Análise de variância para a porcentagem de contaminação bacteriana dos explantes de *Dendrocalamus asper* em relação ao estabelecimento *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tempo	3	0,0464	0,0154	1,2320 ^{ns}	0,3010
Resíduo	134	1,6844	0,0125		
Total	137	1,7309			
CV(%)	19,65				
Média Geral	0,5704				

Nota: ^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $1/\exp(x+0,5)$, onde x refere-se ao dado amostrado.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 4 - Análise de variância para a porcentagem de oxidação dos explantes de *Dendrocalamus asper* em relação ao estabelecimento *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tempo	3	0,5259	0,1753	11,8179**	0,0001
Resíduo	134	1,9879	0,0148		
Total	137	2,5138			
CV(%)	22,10				
Média Geral	0,5509				

Nota: ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, Fc = valor calculado de F, QM = quadrado médio, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $1/\exp(x+0,5)$ onde x refere-se ao dado amostrado.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 5 - Análise de variância para a porcentagem de estabelecimento *in vitro* dos explantes de *Dendrocalamus asper*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tempo	3	3,4298	1,1432	17,6372**	0,0001
Resíduo	134	8,6861	0,0648		
Total	137	12,1159			
CV(%)	22,05				
Média Geral	1,1543				

Nota: ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $1/(x+0.5)^{0,5}$ onde x refere-se ao dado amostrado.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 6 - Análise de variância para a porcentagem de número de explantes com brotos de *Dendrocalamus asper* em relação ao estabelecimento *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tempo	3	1,1782	0,3927	20,3345**	0,0001
Resíduo	134	2,5882	0,01931		
Total	137	3,7665			
CV(%)	27,14				
Média Geral	0,5120				

Nota: ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $1/\exp(x+0.5)$ onde x refere-se ao dado amostrado.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 7 - Análise de variância para o número de brotos de *Dendrocalamus asper* em relação a multiplicação *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sub	2	0,7812	0,3906	12,6489**	0,0001
Sub (rep)	19	0,5867	0,0308	0,6946 ^{ns}	0,7970
BAP	2	1,1113	0,5556	12,4986**	0,0001
SUB×BAP	4	0,2388	0,0597	1,3429 ^{ns}	0,2760
Resíduo	32	1,4227	0,0446		
Total	59	4,1410			
CV(%)	16,51				
Média Geral	1,2770				

Nota: ^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $x^{0.5}$ onde x refere-se ao dado amostrado.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 8 - Análise de variância para o comprimento de brotos de *Dendrocalamus asper* em relação a multiplicação *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sub	2	1,4788	0,7394	8,2906**	0,0030
Sub (rep)	19	1,6945	0,0308	0,8473 ^{ns}	0,6410
BAP	2	1,5921	0,7960	7,5630**	0,0020
SUB×BAP	4	0,3822	0,0955	0,9078 ^{ns}	0,4710
Resíduo	32	3,3683	0,1052		
Total	59	4,1410			
CV(%)	15,80				
Média Geral	2,9529				

Nota: ^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $x^{0.5}$ onde x refere-se ao dado amostrado.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 9 - Análise de variância para a porcentagem de enraizamento de *Dendrocalamus asper* *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AIB	2	0,1763	0,0881	6,0000*	0,0160
Resíduo	12	0,1763	0,0147		
Total	14	0,3527			
CV(%)	27,14				
Média Geral	0,5120				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $1/\exp(x+0.5)$ onde x refere-se ao dado amostrado.

Fonte: Do autor (2021).

ARTIGO 2 - QUALIDADE ESPECTRAL NO CULTIVO *in vitro* DE *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.**RESUMO**

As espécies de bambus apresentam rápido crescimento, ampla ocorrência no mundo e diversas utilidades, no entanto, existem dificuldades em relação a produção de mudas clonais em escala comercial. Desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de protocolos eficazes com o intuito de minimizar as dificuldades e aumentar a eficiência da micropropagação de bambus. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da qualidade espectral na multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris*. Explantes estabelecidos *in vitro* foram transferidos para o meio de cultura MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), e submetidos à quatro tipos de qualidade espectral (T1: fluorescente - branca; T2: azul; T3: verde e T4: vermelho). No enraizamento *in vitro* o meio de cultura MS foi suplementado com 2 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 1 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP e aos mesmos espectros de luminosidade. A qualidade espectral fluorescente branca é mais adequada para ser utilizada na multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* de *B. vulgaris*, tendo em vista que na fase de multiplicação e alongamento houve 80% de sobrevivência, média de 2,2 brotos por explante, contendo comprimento médio de 7,47 cm. Na fase de enraizamento houve 50% de enraizamento, favorecendo o desenvolvimento de brotações destinadas à produção de plantas clonais *in vitro*.

Palavras-chave: Micropropagação. Luminosidade. Bambu. Clorofila. Microscopia eletrônica de varredura.

**SPECTRAL QUALITY ON *in vitro* CULTURE OF *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C.
Wendl.**

ABSTRACT

Bamboo species show rapid growth, wide occurrence in the world and several uses, however, there are difficulties in relation to the production of large scale seedlings of these species. Therefore, it is necessary to develop effective protocols in order to minimize difficulties and increase the efficiency of micropropagation of bamboo. The objective of this study was to evaluate the effect of spectral quality on the multiplication, elongation and rooting *in vitro* of *Bambusa vulgaris*. Explants established *in vitro* were transferred to MS culture medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ of benzylaminopurine (BAP) and 0.5 mg L⁻¹ of α -naphthaleneacetic acid (NAA), and subjected to four types of spectral quality (T1: fluorescent - white; T2: blue; T3: green and T4: red). For *in vitro* rooting, the MS culture medium was supplemented with 2 mg L⁻¹ of indolbutyric acid (IBA), 1 mg L⁻¹ of NAA and 0.5 mg L⁻¹ of BAP and submitted to the same light spectra. The white fluorescent spectral quality is more suitable to be used in the multiplication, elongation and rooting *in vitro* of *B. vulgaris*, considering that in the multiplication and elongation phase, the average was 2.2 shoots per explant, average length of 7.47 cm, 80% survival, and in the rooting phase 50% of the plants emitted roots, favoring the development of shoots for the production of *in vitro* clonal plants.

Keywords: Micropropagation. Luminosity. Bamboo. Chlorophyll. Scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

As espécies de bambus apresentam rápido crescimento e ampla ocorrência no mundo, com distribuição principal na Ásia, África e América do Sul (LIN et al., 2019). São plantas com grande versatilidade e utilizadas como alimento por meio do uso de brotos comestíveis, em artesanatos, fabricação de ferramentas, recuperação ambiental, controle de erosão e proteção do solo, alternativa aos combustíveis fósseis para a produção de energia renovável e celulose para a fabricação de papel (MOURA et al., 2019; YORMANN; RÚGOLO; APÓSTOLO, 2020).

Devido a elevada capacidade de adaptação em diversos regimes ambientais e às condições edáficas tropicais, subtropicais e regiões temperadas há grande distribuição de espécies de bambus no mundo (BHANDAWAT et al., 2019). O Brasil é detentor da maior diversidade de bambus da América Latina, com cerca de 232 espécies no total, e estima-se que o país possua uma área plantada de aproximadamente 8 milhões de hectares (INBAR, 2017; SILVEIRA et al., 2019). Nesse sentido, dentre as espécies cultivadas no Brasil está a *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl., com grande destaque, e que atraiu a atenção de cientistas e pesquisadores, especialmente no campo da biotecnologia voltadas à propagação das espécies, devido ao seu rápido crescimento, adaptação e inúmeras aplicações comerciais e industriais (DARABANT et al., 2014; FURLAN et al., 2018; GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014; KOZEN et al., 2017; RIBEIRO et al., 2020).

Contudo, diante das limitações em relação a produção de mudas em escala comercial de espécies de bambus, tais como a baixa produção de sementes e a utilização de métodos vegetativos ineficazes, o potencial de cultivo de *B. vulgaris* não tem sido explorado de maneira adequada. Algumas das alternativas de propagação ainda não testadas ou pouco estudadas refere-se ao cultivo *in vitro*, tendo em vista que a micropropagação é um método rápido e confiável para a obtenção de plantas clonais (FURLAN et al., 2018; LIN et al., 2019; ZHAO et al., 2017).

O cultivo *in vitro* pode ser utilizado com eficácia para a produção de mudas de espécies com importância econômica de maneira rápida e otimizada (RIBEIRO et al., 2016), no entanto, essas metodologias apresentam algumas dificuldades que podem interferir no sucesso da técnica, e um dos principais obstáculos estão relacionados aos fatores ambientais (BATISTA et al., 2018). Dentre tais fatores, a qualidade de luz (comprimento de onda dos espectros) é uma das características que pode interferir no cultivo *in vitro* de plantas (RIBEIRO et al., 2009;

SOUZA et al., 2019), com isso, muitos estudos relacionados ao efeito da qualidade de luz no cultivo *in vitro* vêm sendo realizados, uma vez que os diferentes níveis de comprimento de onda afetam o crescimento, desenvolvimento e o metabolismo das plantas (HERINGER et al., 2017; SOUZA, 2018).

Desta forma, em vista da necessidade do desenvolvimento de protocolos eficazes para a micropropagação de espécies de bambus, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da qualidade espectral na multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização geral

Para a condução dos experimentos foram coletados colmos seccionados de uma planta matriz de *Bambusa vulgaris* (FIGURA 1A), transportados e dispostos em casa de vegetação (FIGURA 1B) localizada no Viveiro Florestal do *Campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Após enraizados, os colmos foram conduzidos em vasos com capacidade para quatro litros contendo areia lavada e terra de subsolo (1:1, v/v) como substrato (FIGURA 1C).

Figura 1 - Resgate vegetativo e etapas da assepsia de explantes de *Bambusa vulgaris*.



Legenda: A. coleta de colmos seccionados, B. disposição dos colmos em casa de vegetação, C. colmos enraizados e com emissão de brotações, D. brotações coletadas, E. bainhas foliares retiradas, F. resquícios cuidadosamente raspados com o auxílio de estilete, G. explante padronizado e H. explantes prontos para ir para câmara de fluxo laminar. Barra = 1 cm.

Fonte: Do autor (2021).

As plantas foram fertirrigadas semanalmente com solução nutritiva para promover o crescimento e emissão de novas brotações (TABELA 1). A irrigação foi realizada uma vez ao dia, diretamente no substrato, evitando o contato da água com as partes aéreas do vegetal. O controle de plantas daninhas foi realizado por meio do arranque manual.

Brotações oriundas dos colmos enraizados foram coletadas e transportadas para o Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais da UFLA (FIGURA 1D). Posteriormente, as bainhas foliares foram removidas (FIGURA 1E) e seus resquícios cuidadosamente raspados (FIGURA 1F) com o auxílio de estilete, a fim de que a gema fosse exposta facilitando a assepsia. O material então foi lavado com água deionizada e autoclavada e detergente neutro. Em seguida, as brotações foram reduzidas à explantes nodais de 2 cm de comprimento (FIGURA 1G) e foram submetidos a lavagem por 30 segundos em solução hidroalcoólica à 70%, seguido de lavagem com água deionizada e esterilizada (FIGURA 1H).

Posteriormente foram imersos em solução contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) (água:hipoclorito, v/v, 1,00 – 1,25% de cloro ativo) durante dez minutos.

Tabela 1 - Composição básica da solução nutritiva para a fertirrigação (adubação de crescimento).

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	(mg L ⁻¹)
Nitrato de potássio (Nuclear®)	KNO ₃ / 101,10	206,8500
Monoamônio fostato (Mallinckrodt®)	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	44,5700
Nitrato de amônio (Reagex®)	NH ₄ NO ₃ / 80,04	140,5000
Sulfato de cálcio (Vetec®)	CaSO ₄ .2H ₂ O / 172,17	87,1817
Nitrato de cálcio (Labsynth®)	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	57,1800
Sulfato de magnésio (Mallinckrodt®)	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	121,6680
Sulfato de manganês (Ecibra®)	MnSO ₄ .H ₂ O / 169,01	4,9223
Sulfato de cobre (Mallinckrodt®)	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,3929
Sulfato de ferro (Synth®)	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	9,9520
Sódio - EDTA (Nuclear®)	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	13,3110
Molibdato de sódio (Merck®)	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,0504
Sulfato de zinco (Mallinckrodt®)	ZnSO ₄ .7H ₂ O / 287,54	8,6000
Ácido bórico (Ecibra®)	H ₃ BO ₃ / 61,83	6,2000

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: Do autor (2020).

Finalizando o tratamento asséptico, os explantes foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), os quais foram vedados com filme plástico à base de policloreto de vinila (PVC) (FIGURA 1G). Os tubos de ensaio (20 × 100 mm) foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de 24°C±1°C, sob irradiação de 40 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

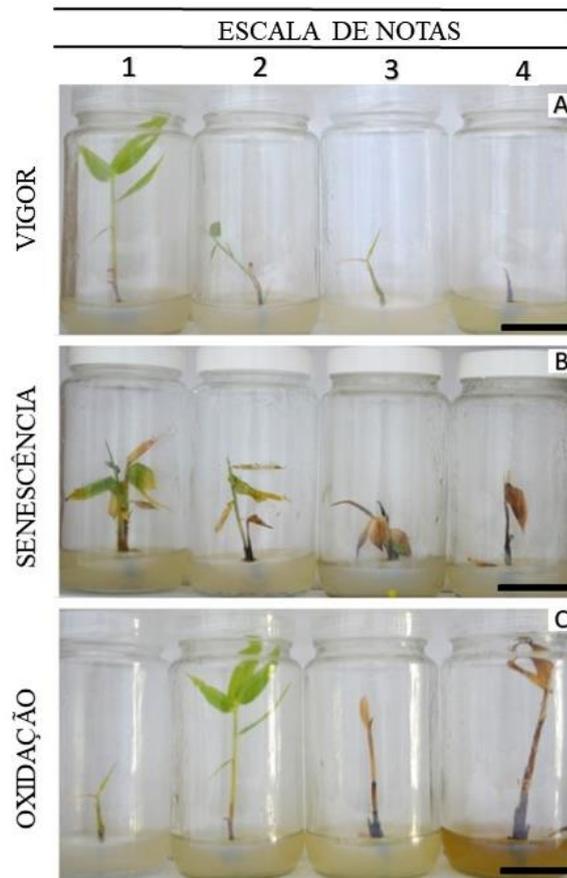
2.2 Qualidade espectral na multiplicação e alongamento *in vitro*

As fases de multiplicação de gemas e alongamento de brotos ocorreram ao mesmo tempo, para isso, os explantes estabelecidos foram transferidos para frascos de vidro (72×72×100 mm) contendo 50 mL do meio de cultura MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA). Os tratamentos

consistiram em quatro tipos de qualidade espectral: T1: fluorescente - branca; T2: azul; T3: verde e T4: vermelho, que foram fornecidas pela filtragem da saída de luz das lâmpadas fluorescentes por meio de folhas duplas de celofane. Os frascos foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob irradiação de $40\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Ao final de 30 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, vigor, senescência, oxidação, número de brotos por explantes, comprimento de brotos e número de folhas por explante. Para o vigor, senescência e oxidação, foi elaborada uma escala de notas de 1 a 4 adaptado de Oliveira et al. (2016) (FIGURA 2).

Figura 2 - Avaliações de vigor, senescência e oxidação de acordo com a escala de notas para *Bambusa vulgaris*.



Legenda: A (vigor): 1 = Ótimo: indução de brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional aparente; 2 = Bom: indução de brotações, porém com crescimento reduzido; 3 = Regular: pouco desenvolvimento das brotações e/ou deficiência nutricional aparente; 4 = Péssimo: senescência e morte dos explantes. B (senescência): 1 = Nula: sem senescência ou baixo amarelecimento das folhas mas sem comprometer o desenvolvimento; 2 = Baixa: pouca senescência com folhas amarelas; 3 = Média: senescência aparente nas folhas dos explantes com início de necrose; 4 = Alta: explante necrosado e com queda das folhas; C (oxidação): 1 = Nula: sem oxidação; 2 = Baixa: reduzida oxidação na base dos explantes; 3 = Média: início de oxidação dos explantes e mudança de coloração no meio de cultura; 4 = Alta: oxidação completa das brotações (meio de cultura escurecido). Barra = 2 cm.

Fonte: Do autor (2021).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, testando-se quatro qualidades espectrais de luz (fluorescente – branca, azul, verde e vermelho), cada tratamento foi constituído por 15 repetições contendo um explante em cada repetição.

2.3 Análise de pigmentos fotossintéticos

A extração foi realizada conforme metodologia adaptada de Lichtenthaler (1987), onde discos foliares (25 mg de matéria fresca de folhas) foram amostrados das brotações sob as diferentes fontes de luz e inoculados em 5 mL de solução de Dimetilsulfóxido –DMSO - (Sigma Aldrich®) por 48 horas no escuro. A absorbância das amostras foi determinada por triplicata em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro Genesys 10UV (ThermoScientific®, EUA).

2.4 Qualidade espectral no enraizamento *in vitro*

Brotações (explantes) de aproximadamente 3 cm de comprimento (oriundos das fases de multiplicação e alongamento) foram inoculados em frascos de vidro (72×72×100 mm) contendo 50 mL do meio de cultura MS suplementado com 2 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 1 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Os tratamentos consistiram em quatro tipos de qualidade espectral: T1: fluorescente - branca; T2: azul; T3: verde e T4: vermelho e foram fornecidas pela filtragem da saída de luz das lâmpadas fluorescentes por meio de folhas duplas de celofane. Os frascos foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de 24°C±1°C, sob irradiação de 40 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

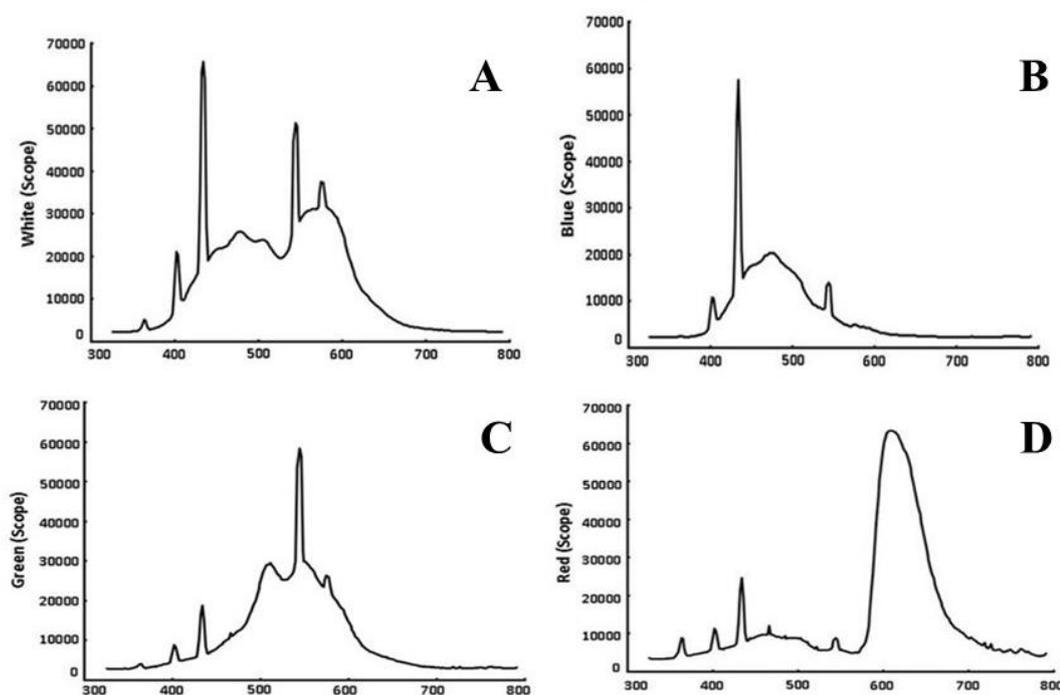
Ao final de 30 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, vigor, senescência, oxidação e enraizamento. Para o vigor, senescência e oxidação, foi elaborada uma escala de notas de 1 a 4 adaptado de Oliveira et al. (2016) (FIGURA 2).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, testando-se quatro qualidades espectrais de luz (fluorescente - branca, azul, verde e vermelho), cada tratamento foi constituído por 15 repetições contendo um explante em cada repetição.

2.5 Espectros de luz

Os espectros de luz foram aferidos por meio do espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA). As distribuições espectrais dos filtros de cada tratamento estão representadas na Figura 3.

Figura 3 - Variações do comprimento de onda (nm) utilizadas na experimentação emitida pelas lâmpadas fluorescentes e filtrada por folha dupla de celofane.



Legenda: A. fluorescente - branca; B. azul; C. verde e D. vermelho.

Fonte: Do autor (2021).

2.6 Preparo do meio de cultivo e condições ambientais da sala de crescimento

O meio de cultura foi preparado com água deionizada, adicionando-se 6 g L^{-1} de ágar e 30 g L^{-1} de sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ / 342,30 g). O valor do pH foi ajustado à 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) previamente a adição do ágar ao meio de cultura, e então autoclavado à temperatura de 127°C ($1,5 \text{ kgf cm}^{-2}$) durante 20 minutos. O BAP ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$ / 225,25 g), ANA ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$ / 186,2 g) e AIB ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ / 203,24 g) foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem. Os frascos foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, sob irradiação de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.7 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas em software R Core Team (2018), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013). Os dados coletados dos experimentos foram analisados quanto à homocedasticidade e distribuição normal de resíduos por meio dos testes de Hartley ($p > 0,05$) e Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), respectivamente. Conforme os resultados dos testes de Hartley e Shapiro-Wilk, os dados foram transformados por teste Box-Cox. Após, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

2.8 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foliares das plantas enraizadas *in vitro* foram coletadas e seccionadas em tamanhos de 0,5 cm², e colocadas submersas em microtubos (1,5 mL) contendo o fixador Karnovsky (glutaraldeído à 2,5%, paraformaldeído à 2,0%, 0,05M de tampão cacodilato à pH de 7,2, + 0,001 M de CaCl₂), por 72 horas na geladeira. Posteriormente, as amostras passaram por tríplice lavagem em tampão cacodilato (0,05 M) por 10 minutos cada. Em seguida, foi iniciada a etapa de desidratação utilizando uma série graduada de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%) por 10 minutos cada, sendo a concentração 100% repassada 3 vezes. Após a desidratação, as amostras foram colocadas em um suporte poroso contendo acetona, e encaminhadas para a fase de secagem ao ponto crítico, onde a acetona foi volatizada e substituída pelo gás carbônico (CO₂). Para a montagem das amostras foliares nos *stubs*, os suportes foram envoltos por papel alumínio e fixados em fita de carbono dupla face, onde as amostras foram depositadas. Por fim, a etapa de metalização em ouro foi realizada. Posteriormente, foi feita a observação em MEV (LEO EVO-40) e as imagens foram registradas.

3 RESULTADOS

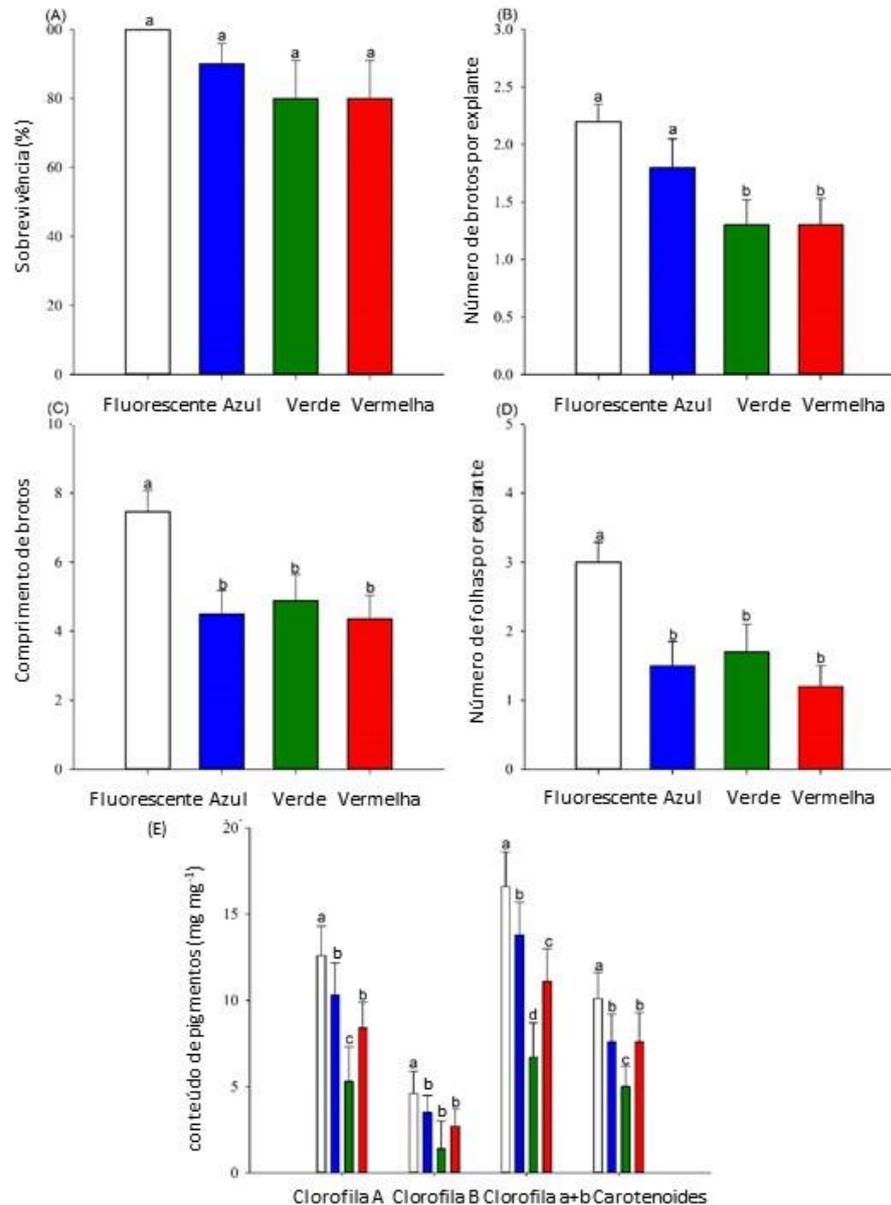
3.1 Qualidade espectral na multiplicação e alongamento *in vitro*

As diferentes qualidades espectrais utilizadas no cultivo *in vitro* dos explantes de *Bambusa vulgaris*, influenciaram a porcentagem de sobrevivência, aos 30 dias após a inoculação. A maior média para a sobrevivência ocorreu com o uso da qualidade espectral fluorescente – branca (100%), contudo não diferindo significativamente ($p > 0,05$) para a azul (90%), verde (80%) e vermelha (80%) (FIGURA 4A).

As fases de multiplicação de gemas e alongamento de brotos ocorreram simultaneamente, em relação ao número de brotos (em média 2,2 brotos), comprimento dos brotos (em média 7,47 cm) e número de folhas por explante (em média 3,0 folhas) diante das qualidades espectrais, foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$), sendo as maiores médias para o tratamento onde os explantes foram submetidos à fonte de luz fluorescente – branca.

Para o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, a qualidade espectral fluorescente - branca proporcionou os maiores valores de clorofila a (em média, 12,60 mg mg⁻¹), clorofila b (em média, 4,60 mg mg⁻¹), clorofila total (16,60 mg mg⁻¹) e carotenoides (10,10 mg mg⁻¹) (FIGURA 4E). Neste sentido, pode-se observar que o amplo espectro luminoso por meio da qualidade espectral fluorescente - branca foi determinante para a maior sobrevivência, emissão de brotos e folhas por explantes, para o comprimento de brotos e para o conteúdo de pigmentos fotossintéticos.

Figura 48 - Características observadas na multiplicação e alongamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* em relação às diferentes qualidades espectrais (Fluorescente - branca, Azul, Verde e Vermelho).



Legenda: A. sobrevivência; B. número de brotos por explante; C. comprimento de brotos; D. número de folhas por explante e E. conteúdo de pigmentos. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

Para o vigor e senescência, de acordo à escala de notas (FIGURA 2), foi observado comportamento similar, com os melhores resultados sendo registrados no tratamento em que os explantes foram submetidos a qualidade espectral fluorescente – branca (TABELA 2) resultando em 70% e 50% de frequência, respectivamente, na escala de nota 1. Para a oxidação

o melhor valor (escala de nota 1) foi observado com a utilização da qualidade espectral azul (80%). Com isso, baseando-se nessas informações, para a obtenção de plantas mais vigorosas e redução da senescência na multiplicação e alongamento *in vitro* é recomendada a utilização da qualidade de luz fluorescente branca e para redução da oxidação é indicada a utilização da qualidade espectral azul.

Tabela 210 - Porcentagem de frequência do vigor, senescência e oxidação, baseada na escala de notas da Figura 2, na multiplicação e alongamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* em diferentes qualidades espectrais (Fluorescente - branca, Azul, Verde e Vermelho).

Tratamento	Vigor (%)			
	1	2	3	4
Fluorescente	70,0	10,0	10,0	10,0
Azul	10,0	50,0	30,0	10,0
Verde	30,0	10,0	30,0	30,0
Vermelha	0,0	20,0	60,0	20,0
Média	27,5	22,5	32,5	17,5
Erro Padrão	15,4	9,4	10,3	4,7
Tratamento	Senescência (%)			
	1	2	3	4
Fluorescente	50,0	40,0	10,0	0,0
Azul	40,0	20,0	40,0	0,0
Verde	40,0	10,0	50,0	0,0
Vermelha	10,0	50,0	30,0	10,0
Média	35,0	30,0	32,5	2,5
Erro Padrão	8,6	9,1	8,5	2,5
Tratamento	Oxidação (%)			
	1	2	3	4
Fluorescente	70,0	10,0	20,0	0,0
Azul	80,0	20,0	0,0	0,0
Verde	50,0	30,0	20,0	0,0
Vermelha	30,0	50,0	20,0	0,0
Média	57,5	27,5	15,0	0,0
Erro Padrão	11,0	8,53	5,0	0,0

Nota: Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Legenda: A (vigor): 1 = Ótimo: indução de brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional aparente; 2 = Bom: indução de brotações, porém com crescimento reduzido; 3 = Regular: pouco desenvolvimento das brotações e/ou deficiência nutricional aparente; 4 = Péssimo: senescência e morte dos explantes. B (senescência): 1 = Nula: sem senescência ou baixo amarelecimento das folhas mas sem comprometer o desenvolvimento; 2 = Baixa: pouca senescência com folhas amarelas ; 3 = Média: senescência aparente nas folhas dos explantes com início de necrose; 4 = Alta: explante necrosado e com queda das folhas; C (oxidação): 1 = Nula: sem oxidação; 2 = Baixa: reduzida oxidação na base dos explantes; 3 = Média: início de oxidação dos explantes e mudança de coloração no meio de cultura ; 4 = Alta: oxidação completa das brotações (meio de cultura escurecido).

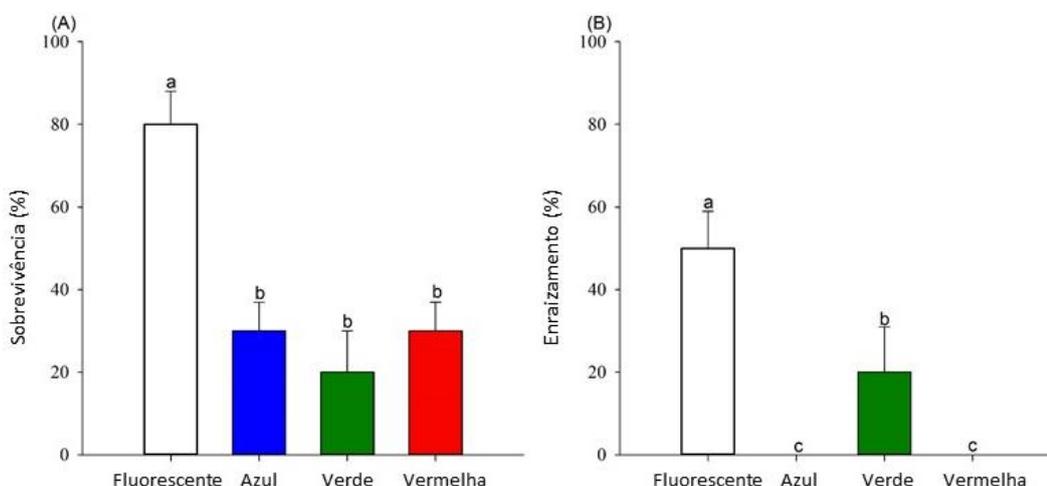
Fonte: Do autor (2021).

3.2 Qualidade espectral no enraizamento *in vitro*

Para a porcentagem de sobrevivência dos explantes, o maior valor foi observado com a utilização da qualidade espectral fluorescente – branca (em média, 80%), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) da qualidade espectral azul (em média 30%) verde (em média, 20%) e vermelha (em média, 30%) (FIGURA 5A).

Em relação ao enraizamento dos explantes, foi observada influência pelas qualidades espectrais utilizadas, com o melhor resultado diante da utilização de fonte de luz fluorescente - branca (em média, 50%), diferindo ($p < 0,05$) dos demais tratamentos (FIGURA 5B). Para a qualidade espectral azul e vermelha não foram observadas raízes, impossibilitando a produção de mudas clonais de *B. vulgaris*. Desta forma, a eficiência desempenhada pela luz monocromática na produção de plantas cultivadas pode variar, sendo necessária, muitas vezes, o uso de um amplo espectro luminoso, como visto no presente trabalho.

Figura 5 - Características observadas no enraizamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* em relação das diferentes qualidades espectrais (Fluorescente - branca, Azul, Verde e Vermelho).



Legenda: A. sobrevivência e B. enraizamento. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

Para o vigor de acordo com a escala de notas (FIGURA 2), a maior frequência na escala de nota 1 (66,6%) foi observada na qualidade de luz fluorescente – branca (TABELA 3), sendo considerado o melhor valor. Para a senescência, o maior valor (66,6%) foi observado na escala de nota 3, na qualidade luz verde. Para a oxidação o maior valor (77,7%) também foi observado

na escala de nota 3, no entanto, na qualidade de luz azul, valor não considerado adequado, tendo em vista que um aspecto indesejável no processo de enraizamento adventício é a oxidação fenólica na base dos explantes. Desta maneira, para a obtenção de plantas mais vigoras e redução da senescência e oxidação na fase de enraizamento *in vitro*, é indicado a utilização da qualidade espectral fluorescente – branca, levando em consideração que os maiores valores de frequência na escala de nota 1 (TABELA 3) foram observados quando os explantes foram submetidos à essa qualidade espectral.

Tabela 11 – Porcentagem de frequência de vigor, senescência e oxidação, baseada na escala de notas (Figura 2) no enraizamento de *Bambusa vulgaris* em diferentes qualidades espectrais (Fluorescente - branca, Azul, Verde e Vermelho).

Tratamento	Vigor (%)			
	1	2	3	4
Fluorescente	66,6	11,1	0,0	22,2
Azul	22,2	0,0	44,4	33,3
Verde	0,0	25,0	25,0	50,0
Vermelha	0,0	14,2	28,5	57,1
Média	22,2	12,5	24,5	40,6
Erro Padrão	15,5	5,13	9,0	7,9
Tratamento	Senescência (%)			
	1	2	3	4
Fluorescente	50,0	30,0	10,0	10,0
Azul	22,2	0,0	66,6	11,1
Verde	0,0	25,0	25,0	50,0
Vermelha	0,0	14,2	28,5	57,1
Média	18,0	17,3	32,5	32,0
Erro Padrão	11,8	6,6	11,9	12,4
Tratamento	Oxidação (%)			
	1	2	3	4
Fluorescente	50,0	30,0	10,0	10,0
Azul	22,2	0,0	77,7	0,0
Verde	11,1	11,1	44,4	33,3
Vermelha	0,0	28,5	42,8	28,5
Média	20,8	17,4	43,7	17,9
Erro Padrão	10,7	7,15	13,6	7,7

Nota: Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Legenda: A (vigor): 1 = Ótimo: indução de brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional aparente; 2 = Bom: indução de brotações, porém com crescimento reduzido; 3 = Regular: pouco desenvolvimento das brotações e/ou deficiência nutricional aparente; 4 = Péssimo: senescência e morte dos explantes. B (senescência): 1 = Nula: sem senescência ou baixo amarelecimento das folhas mas sem comprometer o desenvolvimento; 2 = Baixa: pouca senescência com folhas amarelas ; 3 = Média: senescência aparente nas folhas dos explantes com início de necrose; 4 = Alta: explante necrosado e com queda das folhas; C (oxidação): 1 = Nula: sem oxidação; 2 = Baixa: reduzida oxidação na base dos explantes; 3 = Média: início de oxidação dos explantes e mudança de coloração no meio de cultura ; 4 = Alta: oxidação completa das brotações (meio de cultura escurecido).

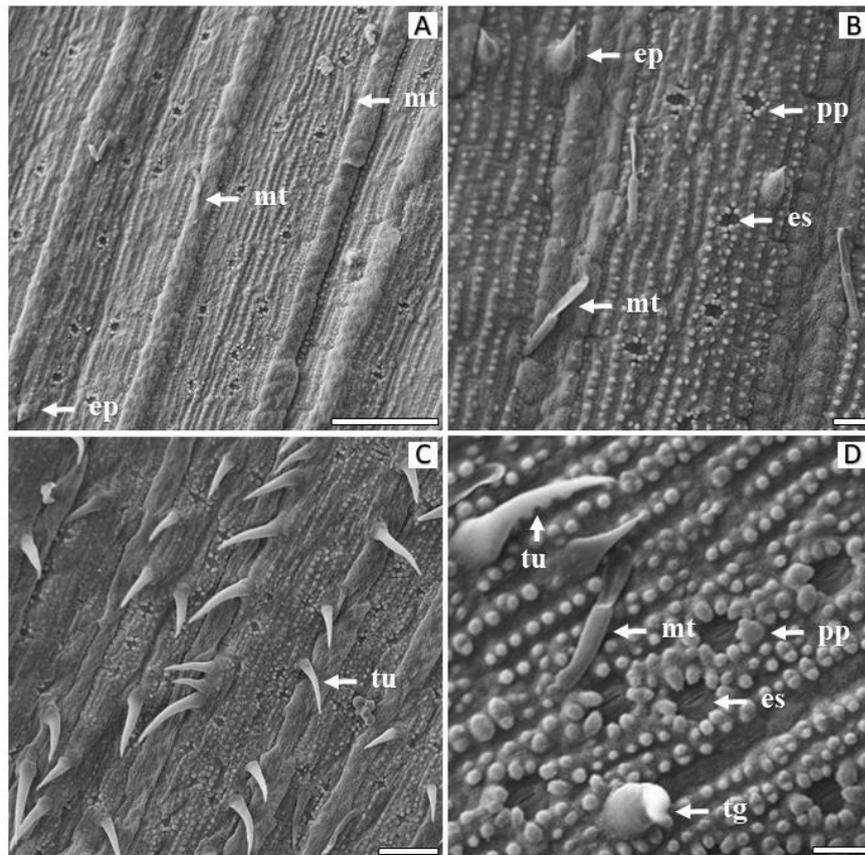
Fonte: Do autor (2021).

3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura permitiu observar as características anatômicas da superfície foliar de plântulas de *B. vulgaris* cultivadas *in vitro* por 30 dias (FIGURA 6).

Na superfície adaxial da lâmina foliar foi possível verificar a presença de microtricomas e espinhos em pequena quantidade (FIGURA 6A), além de papilas e estômatos (FIGURA 6B). Na superfície abaxial (FIGURA 6C), observa-se a presença de tricomas unicelulares em grande quantidade arranjados em fileiras. Na Figura 6D em maior ampliação, são observadas as papilas com maior detalhe, estando muitas vezes, associadas aos estômatos, tricoma unicelular, tricoma em forma de gancho e microtricoma.

Figura 9 - Características anatômicas da superfície foliar de *Bambusa vulgaris* cultivado *in vitro*.



Legenda: A. Face adaxial com presença de tricomas unicelulares e espinhos; B. Face adaxial, detalhes dos estômatos, presença de microtricoma, espinho e papila. C. Face abaxial, nota-se tricomas unicelular. D. Face abaxial, detalhe dos estômatos com papilas, tricoma em forma de gancho, estômatos, tricoma unicelular e microtricoma. (ep) espinho, (es) estômato, (mt) microtricoma, (pp) papila, (tg) tricoma em forma de gancho, (tu) tricoma unicelular. Barra= A: 100 μm ; B: 20 μm ; C: 30 μm e D: 30 μm .

Fonte: Do autor (2021).

4 DISCUSSÃO

4.1 Qualidade espectral na multiplicação e alongamento *in vitro*

A qualidade espectral utilizada na multiplicação e no alongamento *in vitro* influenciou a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes de *B. vulgaris*. Os maiores valores de sobrevivência foram observados na qualidade espectral fluorescente - branca, refletindo em maior qualidade da produção de mudas clonais de *B. vulgaris*.

De acordo com Trueman, Hung e Wendling (2018) para o sucesso da micropropagação é necessário que apenas alguns explantes emitam brotações livres de contaminação. Contudo, quando se necessita de material micropropagado, maiores quantidades de explantes com brotações são necessárias para aumentar rapidamente o número de brotos produzidos. Com isso é possível dar prosseguimento a fase de alongamento e enraizamento, denotando a importância de altas porcentagens de sobrevivência.

Para o número de brotos e folhas por explante e comprimento das brotações, verificou-se que a qualidade espectral fluorescente - branca proporcionou os melhores resultados. Dados na literatura são semelhantes aos encontrados neste estudo, uma vez que para *Bambusa oldhamii* foi constatado o maior número de brotos em condições de luz (30% azul + 70% luz vermelha) e em luz fluorescente - branca, e que a utilização de luz fluorescente - branca resultou em um aumento significativo comprimento de brotos (SILVEIRA, LOPES e SIBOV, 2020).

Existe variação nas respostas fisiológicas dos vegetais diante das qualidades espectrais, que são traduzidos em processos metabólicos e genéticos que promovem alterações no crescimento e desenvolvimento, a fim de otimizar adaptações das plantas às mudanças nas condições ambientais (LAZZARINI et al., 2017). Esses estudos evidenciam que as plantas necessitam de amplo espectro luminoso para otimizar os processos fotossintéticos, e essa necessidade varia de acordo com a espécie vegetal (LAZZARINI et al., 2017).

Quanto a biossíntese de clorofila a, b e carotenóides, a qualidade e intensidade de luz emitida apresenta maior eficiência e absorção no processo fotossintético, sob diferentes variações nos comprimentos de onda (GUPTA; KARMAKAR, 2017). No cultivo de *Bambusa oldhamii* foi observada que a utilização de LEDs 100% vermelhos resultaram em conteúdo relativamente baixo de clorofila e carotenóide, resultados que corroboram com os encontrados no presente estudo, quando comparando a utilização de luz fluorescente - branca com os demais

espectros de luz utilizados, tendo em vista que essa qualidade de luz proporcionou os maiores valores para os pigmentos fotossintéticos (SILVEIRA, LOPES e SIBOV, 2020).

Os teores de clorofila a e clorofila b apresentaram resultados similares em termos de valores na qualidade de luz fluorescente - branca e azul, esse fator pode estar relacionado devido a luz azul desempenhar um papel essencial na síntese de pigmentos fotossintéticos sendo responsável pela alocação de plastídeos nas folhas (BRENNER et al., 2005).

Ao avaliarem a quantificação de clorofila e carotenoide na espécie de bambu *Guadua chacoensis*, Polesi et al. (2019) observaram em uma visão geral que os indivíduos com senescência (amarelecimento ou embranquecimento das folhas e brotos) apresentaram menor conteúdo de clorofila e carotenóides, quando comparados a indivíduos que não apresentavam sinais de senescência (brotos e folhas verdes). Esse fato foi verificado no presente estudo, onde os explantes que foram submetidos a luz fluorescente branca apresentaram a maior frequência de indivíduos com baixa senescência (TABELA 2), apresentaram também maiores valores de conteúdo fotossintético (FIGURA 4H).

A absorção de amplo espectro luminoso promove um maior estado energético (TAIZ; ZEIGER, 2013). Com isso, a eficiência desempenhada pela luz monocromática na produção de plantas cultivadas varia entre as espécies, sendo necessária, muitas vezes, uma combinação de espectros de luminosidade (LAZZARINI et al., 2017).

Em relação à resposta dos explantes ao vigor e senescência, foi observada brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional aparente. A senescência em espécies de bambus pode ser vista como um processo natural ao longo do desenvolvimento de plastídios ou pode ser induzida por alguma condição de estresse (POLESI et al., 2019) como a qualidade e intensidade de luz. Além disso, esses resultados podem estar ligados a fatores ambientais internos que afetam o vigor e a senescência dos tecidos, em que menores frascos tendem a apresentar reduzidas concentrações de dióxido de carbono e elevadas concentrações de etileno, como também podem ser afetados por temperatura do ar e umidade relativa (SOUZA et al., 2019; XIAO; NIU; KOZAI, 2011).

De acordo com a Tabela 2 foram observadas frequências reduzidas para a escala de notas maiores da oxidação fenólica dos tecidos de *B. vulgaris*. Dados reportados na literatura corroboram com os encontrados no presente estudo, mostrando que os explantes de *B. vulgaris*, não apresentam elevada oxidação dos tecidos quando cultivados *in vitro* (BRONDANI et al., 2017; FURLAN et al., 2018). Trabalhando com diferentes espectros de luz em *Eucalyptus cloeziana* (OLIVEIRA et al., 2015) e *Corymbia citriodora* × *C. Torelliana* (SOUZA et al.,

2018), foi observada baixa oxidação fenólica e adequado vigor de tecidos na multiplicação *in vitro*. Em linhas gerais, a oxidação tem sido um problema associado na micropropagação, sendo reportada em diversos trabalhos (BORGES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2019). Desta forma, a utilização da qualidade espectral fluorescente - branca é a mais adequada para ser utilizada na multiplicação de *B. vulgaris in vitro*.

4.2 Qualidade espectral no enraizamento *in vitro*

O uso de fontes de luz com amplo espectro luminoso (luz fluorescente - branca) proporcionou maior porcentagem de sobrevivência e enraizamento. A qualidade espectral com variações no comprimento de onda, permite que a luz penetre melhor nas folhas, possibilitando maximizar a taxa fotossintética, quando comparados às luzes monocromáticas azul e vermelha (LIN et al., 2013).

Houve diferentes comportamentos para o vigor e senescência dos explantes conforme as qualidades espectrais (TABELA 3). Uma causa para essa diferenciação está relacionada a regulação de processos fisiológicos, como a fotomorfogênese, acarretando na maior qualidade, produção e desenvolvimento de mudas micropropagadas (GUPTA; KARMAKAR, 2017). Em contrapartida, diferentes ambientes de cultivo podem alterar o metabolismo dos propágulos, levar a desnaturação de enzimas e redução na absorção de nutrientes, influenciando no vigor, senescência e conseqüentemente na capacidade rizogênica na base dos propágulos (BATISTA et al., 2018; HARTMANN et al., 2011; PARK et al., 2013).

Além disso, um dos principais fatores limitantes para a regeneração de explantes é a ocorrência da oxidação fenólica (SILVA et al., 2015; TORMEN et al., 2018), por isso, metodologias que visem a superação ou a redução da oxidação de tecidos por meio da qualidade espectral fluorescente branca, são importantes estratégias a serem adotadas no sistema de propagação. No entanto, as respostas podem variar de acordo com as espécies de plantas (BORGES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2018; SOUZA et al., 2020).

As variações nas respostas, de acordo as qualidades espectrais utilizadas, também foram observadas na etapa de enraizamento em explantes de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* (SOUZA et al., 2020), demonstrando que a fonte de luz fluorescente branca exerce influência positiva na produção de mudas clonais. Com isso, o conhecimento da relação entre os comprimentos de onda, padrão de crescimento e enraizamento das plantas permitiu uma melhor definição dos protocolos para a obtenção de plantas clonais de *B. vulgaris*.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura

A presença de folhas desenvolvidas normalmente influencia os processos de fotossíntese, respiração e transpiração do vegetal, demonstrando a necessidade do conhecimento das estruturas anatômicas de espécies de bambus (NOGUEIRA et al., 2017). Ainda nesse contexto, Montiel e Sanchez (2006) ressaltam que o conhecimento anatômico ultraestrutural é fundamental em várias áreas de pesquisa, sobretudo para a correta identificação de espécies que são facilmente confundidas.

No presente estudo com *B. vulgaris* foi possível observar a presença de microtricomas e espinhos (FIGURA 6A) e a presença de estômatos em considerável quantidade nas folhas dos explantes cultivados *in vitro* (FIGURA 6B e 6D). De acordo com Taiz e Zeiger (2013), os estômatos são estruturas fundamentais no auxílio das plantas em ajustes quando submetidas a mudanças ambientais, tendo em vista que esses órgãos são responsáveis por maximizar a homeostase das plantas modulando as trocas gasosas entre as células e o ambiente externo. Situação que pode ocorrer no cultivo *in vitro* quando as plantas são submetidas a diferentes espectros de luz (BATISTA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2009). A presença de papilas em grande quantidade nas faces abaxiais e adaxiais foram observadas em associação aos estômatos, que de acordo com Luis et al. (2017), estas ocorrem frequentemente e são importantes para a taxonomia de algumas espécies de bambus.

Estudos anatômicos e estruturais de espécies de bambus cultivadas *in vitro* são frequentes, como para *Bambusa vulgaris* (FURLAN et al., 2018; GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2019), *Dendrocalamus asper* (MONTIEL; SANCHEZ, 2006) e *Dendrocalamus giganteus* (YASODHA; KAMALA; KALAIARASI, 2010), evidenciando a importância de tais pesquisas no estabelecimento de protocolos de micropropagação dessas espécies, corroborando assim com a justificativa da realização do presente estudo.

5 CONCLUSÃO

A qualidade espectral fluorescente - branca foi a mais adequada para ser utilizada na multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* de *B. vulgaris*, apresentando as melhores respostas para todas as características avaliadas.

6 AGRADecIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Aos técnicos, Dr^a. Ana Luiza Oliveira Timbó e José Pedro de Oliveira, pelo auxílio na condução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, D. S. et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018.
- BHANDAWAT, A. et al. Discovery and utilization of EST-SSR marker resource for genetic diversity and population structure analyses of a subtropical bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii*. **Biochemical Genetics**, New York, v. 57, n. 5, p. 652–672, 2019.
- BORGES, S. R. et al. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n. 3, p. 425-434, 2011.
- BRENNER, W. G. et al. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 44, n. 2, p. 314-333, 2005.
- 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. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p. 86-102.
- DARABANT, A. et al. Bamboo biomass yield and feedstock characteristics of energy plantations in Thailand. **Energy Procedia**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 134-141, 2014.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs** package. R package version 1.1.2. 2013.
- FURLAN, F. C. et al. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, Valdivia, 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**, Irvine, v. 5, n. 2, p. 205- 211, 2014.
- GARCÍA-RAMÍREZ, Y. et al. Effect of sucrose on physiological and biochemical changes of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl in temporary immersion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 137, n. 2, p. 239-247, 2019.
- GUPTA, S. D.; KARMAKAR, A. Machine vision based evaluation of impact of light emitting diodes (LEDs) on shoot regeneration and the effect of spectral quality on phenolic content and antioxidant capacity in *Swertia chirata*. **Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology**, Lausanne, v. 174, n. 1, p. 162-172, 2017.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8 ed. São Paulo, Brasil: Prentice-Hall, 2011.

HERINGER, A. S. et al. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 52, n. 39, p. 1-14, 2017.

INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN - INBAR. **Brazil becomes the latest member of inbar**, Beijing, 2017 [online]. Disponível em: <http://www.inbar.int/brazil_joins_inbar/>. Acesso em: 10 mai, 2020.

KONZEN, E. R. et al. Molecular identification of bamboo general and species based on RAPD-RFLP markers. **Silva Fennica**, Helsinque, v. 51, n. 4, p. 1-16, 2017.

LAZZARINI, L. E. S. et al. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas – revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017.

LICHTHENTHALE, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic bio membranes. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 148, n. 1, p. 350-382, 1987.

LIN, K. H. et al. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 150, p. 86-91, 2013.

LIN, S. et al. Shoot proliferation and callus regeneration from nodular buds of *Drepanostachyum luodianense*. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 30, n. 6, p. 1997-2005, 2019.

LUIS, Z, G. et al. Caracterização anatômica dos órgãos vegetativos de bambu (Poaceae, Bambusoideae). In: DRUMOND, P. M.; WIEDEMAN, G. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p.42-59.

MONTIEL, M.; SÁNCHEZ, E. Ultraestructura de bambúes del género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) cultivados en Costa Rica IV: *Dendrocalamus asper*, clones Taiwán y Tailandia Mayra. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 54, n. 2, p. 65-75, 2006.

MOURA, J. B. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with Bamboo under cerrado Brazilian vegetation. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 19, n. 3, p. 954-962, 2019.

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

NOGUEIRA, J. S. et al. Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P. M.; WIEDEMAN, G. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p.103-129.

OLIVEIRA, L. S. et al. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, Canberra, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015.

OLIVEIRA, L. S. et al. Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 235-247, 2016.

PARK, Y. G. et al. Growth and anthocyanin concentration of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo as affected by light source and DIF under controlled environment. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, Wanju-gun, v. 54, n. 2, p. 103-108, 2013.

POLESI, L. G. et al. Chloroplast ultrastructure and hormone endogenous levels are differently affected under light and dark conditions during *in vitro* culture of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 41, n. 10, p. 1-12, 2019.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.

RIBEIRO, M. N. O. et al. Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2388-2393, 2009.

RIBEIRO, A. S. et al. Clonal bamboo production based on *in vitro* culture. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 36, n. 4, p. 1261-1273, 2020.

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

SILVA, A. L. L. et al. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* Sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 47, n. 1, p. 311-318, 2015.

SILVEIRA, E. S. et al. Líquido da casca da castanha-de-caju (LCC) como repelente do caruncho-do-bambu *Bambusa vulgaris*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 1389-1397, 2019.

SILVEIRA, A. A. C.; LOPES, F. J. F.; SIBOV, S. T. Micropropagation of *Bambusa oldhamii* Munro in heterotrophic, mixotrophic and photomixotrophic systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 141, n. 1, p. 315-326, 2020.

SOUZA, D. M. S. C. et al. Light quality in the *in vitro* introduction of *Corymbia* hybrid clones. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 42, n. 6, p. 1-9, 2018.

SOUZA, D. M. S. C. et al. Effects of mixotrophism on elongation and adventitious rooting of *Eucalyptus dunnii* *in vitro*. **Cerne**, Lavras, v. 25, n. 4, p. 1-8, 2019.

SOUZA, D. M. S. C. et al. Light quality in micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 48, n. 127, p.1-10, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2013.

TORMEN, G. C. R. et al. Carbohydrate sources, alanine and calcium for *in vitro* multiplication of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Iheringia: Série Botânica**, Porto Alegre, v. 73, n. 3, p. 329-335, 2018.

TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, Basel, v. 9, n. 2, p. 1-42, 2018.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011.

YASODHA, R.; KAMALA, S.; KALAIARASI, K. Anatomical and Biochemical Changes Associated with *In Vitro* Rhizogenesis in *Dendrocalamus giganteus*. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, Dordrecht, v. 19, n. 2, p. 217-222, 2010.

YORMANN, G; E.; RÚGOLO, Z. E.; APÓSTOLO, N. M. Culms of *Bambusa vulgaris* cv. *vittata*, *Arundinaria simonii* and *Phyllostachys aurea* (Poaceae, Bambusoideae): Characterization of vascular bundles and fibers. **Flora**, Jena, v. 263, n. 151523, p. 1-10, 2020.

ZHAO, H. et al. Announcing the Genome Atlas of Bamboo and Rattan (GABR) project: promoting research in evolution and in economically and ecologically beneficial plants. **GigaScience**, London, v. 6, n. 7, p. 1-7, 2017.

ANEXOS

Anexo 12 - Análise de variância para a sobrevivência dos explantes de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	0,2750	0,0916	0,8050 ^{ns}	0,4949
Resíduo	36	4,1000	0,1138		
Total	39	4,3750			
CV(%)	38,57				
Média Geral	0,8750				

Nota: ^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 2 - Análise de variância para o número de brotos dos explantes de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	19,9000	6,6333	4,182*	0,0112
Resíduo	36	57,1000	1,5861		
Total	39	77,0000			
CV(%)	26,32				
Média Geral	1,8500				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 3 - Análise de variância para o comprimento brotos dos explantes de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	64,6290	21,5430	4,202*	0,0120
Resíduo	36	184,5700	5,1269		
Total	39	249,1990			
CV(%)	22,76				
Média Geral	5,2950				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 4 - Análise de variância para o número de folhas dos explantes de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	18,9000	6,3000	4,1850*	0,0122
Resíduo	36	54,2000	1,5055		
Total	39	73,1000			
CV(%)	36,32				
Média Geral	1,8500				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 5 - Análise de variância para a clorofila (A) de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	16,9000	5,6333	3,9764*	0,0201
Resíduo	36	51,0000	1,4166		
Total	39	67,9000			
CV(%)	36,32				
Média Geral	0,9155				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, Fc = valor calculado de F, QM = quadrado médio, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 6 - Análise de variância para a clorofila (B) de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	12,3000	4,1000	3,5912*	0,0241
Resíduo	36	41,0000	1,1416		
Total	39	53,4000			
CV(%)	33,33				
Média Geral	0,3065				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, Fc = valor calculado de F, QM = quadrado médio, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 7 - Análise de variância para a clorofila (AB) de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	31,1000	7,5853	3,6851*	0,011
Resíduo	36	74,1000	2,0583		
Total	39	105,2000			
CV(%)	38,13				
Média Geral	1,2152				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 8 - Análise de variância para a taxa de carotenoides de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	22,3500	7,4500	4,8631*	0,0171
Resíduo	36	55,1500	1,5319		
Total	39	77,5000			
CV(%)	29,12				
Média Geral	0,7587				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 9 - Análise de variância para a sobrevivência no enraizamento de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	2,2000	0,7333	3,568*	0,0234
Resíduo	36	7,4000	0,2055		
Total	39	9,6000			
CV(%)	53,35				
Média Geral	0,4000				

Nota: * Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 10 - Análise de variância para a porcentagem de enraizamento de *Bambusa vulgaris in vitro* submetidos a diferentes espectros de luz.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Luz	3	1,6750	0,5583	4,902**	0,0059
Resíduo	36	4,1000	0,1138		
Total	39	5,7750			
CV(%)	47,84				
Média Geral	0,1750				

Nota: ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância.

Fonte: Do autor (2021).

ARTIGO 3 - DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.

RESUMO

A busca por espécies que apresentam rápido crescimento e múltiplos usos é cada vez maior, nesse contexto, os bambus se mostram como uma alternativa para a obtenção de matéria prima renovável. O Brasil é detentor de grande diversidade de espécies e dentre as exóticas encontradas no país está o *Bambusa vulgaris*, considerada economicamente uma das espécies mais importantes do gênero *Bambusa*. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi definir um protocolo de micropropagação para a clonagem de *Bambusa vulgaris* em diferentes sistemas de cultivo e avaliar a fidelidade genética das plantas micropropagadas. As fases de multiplicação de gemas e alongamento de brotos *in vitro* ocorreram simultaneamente, onde, explantes considerados estabelecidos foram dispostos em três sistemas de cultivos: meio semi-sólido, meio líquido e biorreator de imersão temporária, e com sacarose em diferentes concentrações (0 e 30 g L⁻¹). Adicionalmente, o meio de cultura foi suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA). No enraizamento *in vitro* o meio de cultura MS foi suplementado com 2 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 1,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP, os tratamentos testados nessa fase consistiram em duas concentrações (0 e 100 mg L⁻¹) de carvão ativado. A fidelidade genética foi avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. A utilização do meio de cultura semi-sólido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose apresentou os melhores resultados para o número de brotos por explantes. A suplementação de 30 g L⁻¹ de sacarose ao meio líquido resultou nos melhores valores para o alongamento de brotos. Em relação ao enraizamento, o uso do carvão ativado no meio de cultura não influenciou a formação de raízes adventícias. As plantas micropropagadas apresentaram fidelidade genética e são clones fiéis à planta matriz.

Palavras-chave: Bambu. Clonagem. Cultivo *in vitro*. ISSR. Propagação vegetativa.

DIFFERENT CULTIVATION SYSTEMS FOR MICROPROPAGATION OF *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl.

ABSTRACT

The search for species that show rapid growth and multiple uses is increasing, in this context, an alternative for these applications are bamboo species. Brazil has a great diversity of species and among the exotic species found in the country is *Bambusa vulgaris*, considered economically one of the most important species of the *Bambusa* genus. Thus, the objective of the present work was to define a micropropagation protocol for the cloning of *B. vulgaris* in different cultivation systems and to evaluate the genetic fidelity of micropropagated plants. The phases of *in vitro* bud multiplication and shoot elongation occurred simultaneously, where explants considered established were arranged in three cultivation systems: semi-solid medium, liquid medium and temporary immersion bioreactor, and with sucrose in different concentrations (0 and 30 g L⁻¹). In addition, the culture medium was supplemented with 2 mg L⁻¹ of benzylaminopurine (BAP) and 0.5 mg L⁻¹ of α -naphthalenoacetic acid (NAA). MS culture medium was supplemented with 2 mg L⁻¹ of indole-3-butyric acid (IBA), 1.0 mg L⁻¹ of NAA and 0.5 mg L⁻¹ of BAP for the *in vitro* adventitious rooting, and the treatments tested in this phase consisted of two concentrations (0 and 100 mg L⁻¹) of activated charcoal. Genetic fidelity was assessed using ISSR molecular markers. The use of semi-solid culture medium supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose showed the best results for the number of shoots per explant; and 30 g L⁻¹ of sucrose supplemented in the liquid medium resulted the best values for the shoot length. Activated charcoal supplemented in the culture medium did not influenced the formation of adventitious roots. The micropropagated plants showed genetic fidelity, i.e., they can be considered clones of the selected plants.

Keywords: Bamboo. Cloning. *In vitro* cultivation. ISSR. Vegetative propagation.

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal brasileiro está apresentando desenvolvimento tecnológico, e a principal razão que intensifica essa dinâmica evolucionar é a grande demanda por produtos e subprodutos de origem florestal, que tem forte relação com o crescimento populacional e o aumento da utilização de fontes de energias renováveis, tendo como consequência a necessidade de expansão de produção de madeira e seus derivados, intensificando a importância do crescimento da produtividade das culturas para suprir o mercado (MOREIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2019; PEREIRA et al., 2019).

Desta forma, a busca por espécies que apresentam rápido crescimento e múltiplos usos é cada vez maior. Nesse contexto, uma alternativa ao uso de espécies florestais são os bambus, que de acordo com Li et al. (2015), podem servir como substitutas da madeira, tendo em vista que os bambus contribuem para o fornecimento de recursos florestais, além de favorecer diversas atividades ecológicas.

O Brasil é detentor de grande diversidade de espécies de bambus e dentre as exóticas encontradas no país está o *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl., considerada economicamente a espécie mais importante dentro do gênero *Bambusa* (INBAR, 2017). Os bambus são cultivados visando atender a demanda por reflorestamento, recuperação de solo, proteção ambiental, construção de casas, fabricação de móveis, implementos agrícolas, artesanato e produção de celulose para fabricação de papel (CAIRO et al., 2018; FURLAN et al., 2018; GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014; RIBEIRO et al., 2020).

No entanto, existem algumas carências no que diz respeito aos protocolos de propagação dessas plantas (NOGUEIRA; GOMES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2019) e ainda são necessários estudos mais aprofundados visando aprimorar as técnicas de produção de mudas clonais para aplicações comerciais. Considerando essa problemática, a propagação *in vitro* pode ser adotada como ferramenta biotecnológica visando a produção de mudas clonais (SANTOS et al., 2019). Desta forma, os desenvolvimentos de protocolos específicos para cada espécie são importantes, tendo em vista que novos estudos sobre a micropropagação utilizando diferentes condições de cultura, biorreatores e meios líquidos podem contribuir para uma maior otimização do processo e reduzir os custos de produção, apontando a necessidade de novas pesquisas nesse campo de estudo (GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014; MOREIRA et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2017; PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007).

Além disso, em algumas situações é possível observar que as técnicas de micropropagação podem ocasionar alterações genéticas, as quais são definidas por Larkin e Scowcroft (1981) como variações somaclonais, consideradas desvantajosas quando o objetivo principal é a obtenção de clones. Nesse contexto, a validação dos protocolos de micropropagação pode ser realizada com a utilização ferramentas moleculares.

Baseado no exposto, o objetivo do presente trabalho foi definir um protocolo de micropropagação para a clonagem de *Bambusa vulgaris* em diferentes sistemas de cultivo e avaliar a fidelidade genética das plantas micropropagadas por meio da utilização de marcadores moleculares ISSR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização geral

Para a condução dos experimentos foram utilizadas brotações coletadas de uma matriz adulta de *Bambusa vulgaris*. As plantas que serviram como fonte de brotações foram conduzidas em vasos com capacidade para quatro litros contendo areia lavada e terra de subsolo (1:1, v/v) como substrato, e dispostos em casa de vegetação localizada no Viveiro Florestal do *Campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As matrizes foram fertirrigadas semanalmente com solução nutritiva desenvolvida para o crescimento e emissão de novas brotações (TABELA 1). A irrigação foi realizada uma vez ao dia, diretamente no substrato, evitando o contato da água com as partes aéreas do vegetal. O controle de plantas daninhas foi realizado por meio de arranque manual.

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva para a fertirrigação (adubação de crescimento).

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	(mg L ⁻¹)
Nitrato de potássio (Nuclear®)	KNO ₃ / 101,10	206,8500
Monoamônio fostato (Mallinckrodt®)	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	44,5700
Nitrato de amônio (Reagex®)	NH ₄ NO ₃ / 80,04	140,5000
Sulfato de cálcio (Vetec®)	CaSO ₄ .2H ₂ O / 172,17	87,1817
Nitrato de cálcio (Labsynth®)	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	57,1800
Sulfato de magnésio (Mallinckrodt®)	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	121,6680
Sulfato de manganês (Ecibra®)	MnSO ₄ .H ₂ O / 169,01	4,9223
Sulfato de cobre (Mallinckrodt®)	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,3929
Sulfato de ferro (Synth®)	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	9,9520
Sódio - EDTA (Nuclear®)	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	13,3110
Molibdato de sódio (Merck®)	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,0504
Sulfato de zinco (Mallinckrodt®)	ZnSO ₄ .7H ₂ O / 287,54	8,6000
Ácido bórico (Ecibra®)	H ₃ BO ₃ / 61,83	6,2000

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

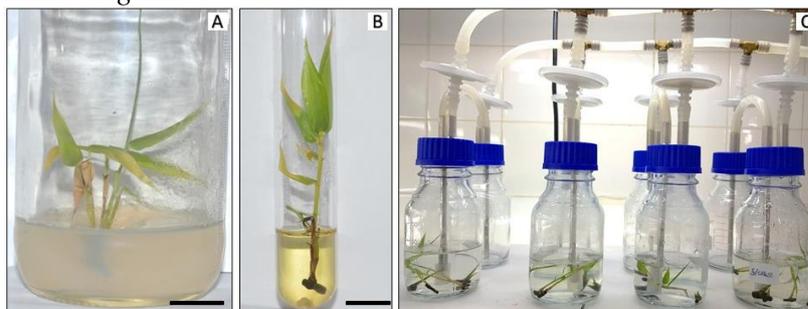
Fonte: Do autor (2021).

Após a coleta das brotações, as bainhas foliares foram removidas e seus resquícios cuidadosamente raspados com o auxílio de estilete, a fim de que a gema fosse exposta facilitando a assepsia. O material então foi lavado com água deionizada e autoclavada e detergente neutro. Em seguida, as brotações foram reduzidas à explantes nodais de 2 cm de comprimento e foram submetidos a lavagem por 30 segundos em solução hidroalcoólica à 70%, seguido de lavagem com água deionizada e esterilizada. Posteriormente foram imersos em solução contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) (água:hipoclorito, v/v, 1,00 – 1,25% de cloro ativo) durante dez minutos. Finalizando o tratamento asséptico, os explantes 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 de ensaio (20 × 100 mm) foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de 24°C±1°C, irradiação de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.2 Multiplicação e alongamento *in vitro*

As fases de multiplicação de gemas e alongamento de brotos *in vitro* ocorreram simultaneamente, onde, explantes considerados estabelecidos foram dispostos em 3 sistemas de cultivos: Meio semi-sólido, onde se utilizou frascos de vidro (72×72×100 mm) contendo 50 mL do meio de cultura MS (FIGURA 1A); Meio Líquido – onde se utilizou tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura líquido estacionário (FIGURA 1B) e Biorreator - Biorreator de Imersão Temporária, com 150 mL de meio de cultura líquido (FIGURA 1C), em que a sequência de imersão adotada para esse sistema foi de 1 minuto a cada 3 horas. A sacarose foi adicionada em diferentes concentrações (0 e 30 g L⁻¹).

Figura 1 – Sistemas de cultivo utilizados na fase de multiplicação e alongamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris*.



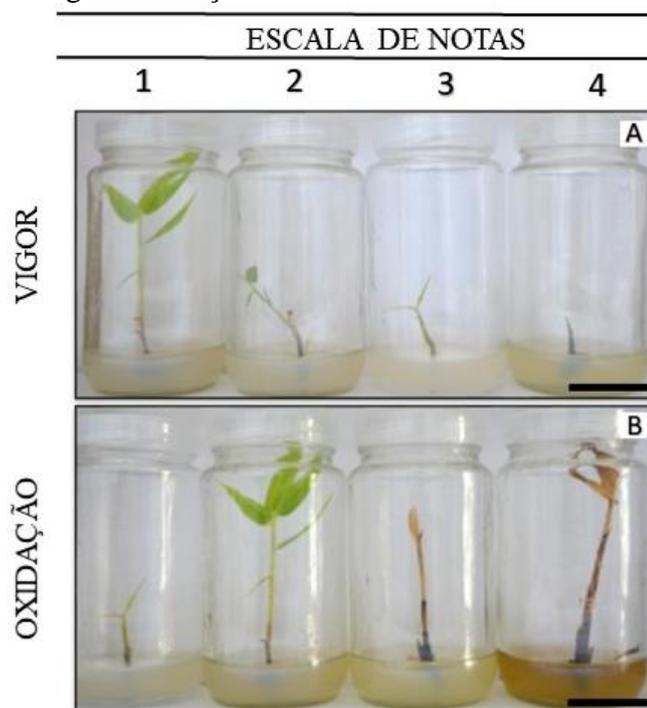
Legenda: A. Meio Semi-sólido; B. Meio líquido e C. Biorreator: Biorreator de Imersão Temporária. Barra = 1,0 cm.

Fonte: Do autor (2021).

Adicionalmente, o meio de cultura foi suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), visando induzir a multiplicação e acelerar a obtenção de brotações viáveis para o enraizamento *in vitro*. Os tratamentos foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de 24°C±1°C, irradiação de 40 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

A renovação de solução nutritiva e os subcultivos foram realizados quinzenalmente. Ao final dos 60 dias foi avaliada a sobrevivência, número e comprimento dos brotos e seu vigor. Para o vigor foi elaborada uma escala de notas de 1 a 4 adaptado de Oliveira et al. (2016) (FIGURA 2A).

Figura 2 - Avaliações de vigor e oxidação de acordo com a escala de notas de *Bambusa vulgaris*.



Legenda: A (vigor): 1 = Ótimo: indução de brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional aparente; 2 = Bom: indução de brotações, porém com crescimento reduzido; 3 = Regular: pouco desenvolvimento das brotações e/ou deficiência nutricional aparente; 4 = Péssimo: senescência e morte dos explantes; B (oxidação): 1 = Nula: sem oxidação; 2 = Baixa: reduzida oxidação na base dos explantes; 3 = Média: início de oxidação dos explantes e mudança de coloração no meio de cultura ; 4 = Alta: oxidação completa das brotações (meio de cultura escurecido). Barra = 2,0 cm.

Fonte: Do autor (2021).

O experimento foi conduzido no delineamento fatorial inteiramente casualizado, testando-se três sistemas de cultivo (semi-sólido, líquido e biorreator) e duas concentrações de sacarose (0 e 30 g L⁻¹). Cada tratamento foi constituído por 15 repetições contendo 1 explante em cada repetição.

2.3 Enraizamento *in vitro*

Explantos de aproximadamente 5 cm de comprimento (oriundos das fases de multiplicação e alongamento) foram inoculados em frascos de vidro (72×72×100 mm) contendo 50 mL do meio de cultura MS suplementado com 2 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 1 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Os tratamentos testados consistiram em duas concentrações (0 e 100 mg L⁻¹) de carvão ativado (Merck S.A.). Os frascos foram dispostos em sala de crescimento com temperatura de 24°C±1°C, irradiação de 40 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias foi avaliada a porcentagem de enraizamento e a oxidação dos tecidos. Para a oxidação foi elaborada uma escala de notas de 1 a 4 adaptado de Oliveira et al. (2016) (FIGURA 2B).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, testando-se duas concentrações de carvão ativado (0 e 100 mg L⁻¹). Cada tratamento foi composto por 20 repetições contendo um explante em cada repetição.

2.4 Preparo do meio de cultivo

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 / 342,30 g) quando necessário. O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) previamente a adição do ágar ao meio de cultura, e então autoclavado a temperatura de 127°C (1,5 kgf cm⁻²) durante 20 minutos. O BAP (C₁₂H₁₁N₅ / 225,25 g), ANA (C₁₂H₁₀O₂ / 186,2 g) e AIB (C₁₂H₁₃NO₂ / 203,24 g) foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem.

2.5 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas em software R Core Team (2018), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013). Os dados coletados dos experimentos foram analisados quanto à homocedasticidade e distribuição normal de resíduos por meio dos testes de Hartley ($p > 0,05$) e Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), respectivamente. Conforme os resultados dos testes de Hartley e Shapiro-Wilk, os dados foram

transformados por teste Box-Cox. Após, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

2.6 Fidelidade genética

Folhas jovens foram coletadas de plantas enraizadas *in vitro* e também das plantas matrizes em vasos, visando avaliar a fidelidade genética. As extrações de DNA foram realizadas de acordo com protocolo adaptado de Ferreira e Grattapaglia (1998). Para avaliar a fidelidade genética foram utilizados 20 *primers*, cujas especificações estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Especificações dos *primers* ISSR utilizados nas análises de fidelidade genética de indivíduos de *Bambusa vulgaris*.

<i>Primer</i>	Sequência
Becky	(CA) ₇ -YC
Chris	(CA) ₇ -YG
John	(AG) ₇ -YC
Manny	(CAC) ₄ -RC
Mao	(CTC) ₄ -RC
Omar	(GAG) ₄ -RC
UBC809	(AG) ₈ -G
UBC810	(GA) ₈ -T
UBC813	(CT) ₈ -T
UBC814	(CT) ₈ -TG
UBC825	(AC) ₈ -T
UBC827	(AC) ₈ -G
UBC834	(AG) ₈ YT
UBC835	(AG) ₈ -YC
UBC840	(GA) ₈ -YT
UBC842	(GA) ₈ -YG
UBC848	(CA) ₈ -RG
UBC857	(AC) ₈ YG
UBC898	(CA) ₆ -RY
UBC901	(GT) ₆ YR

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

Fonte: Do autor (2021).

As reações de ISSR foram preparadas em microplacas (PCR-96-Axygen Scientific), sendo que em cada poço foram colocados 3 μL de DNA (padronizado a 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ para todas as amostras) e 10 μL 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 μL^{-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 μL)]. As reações

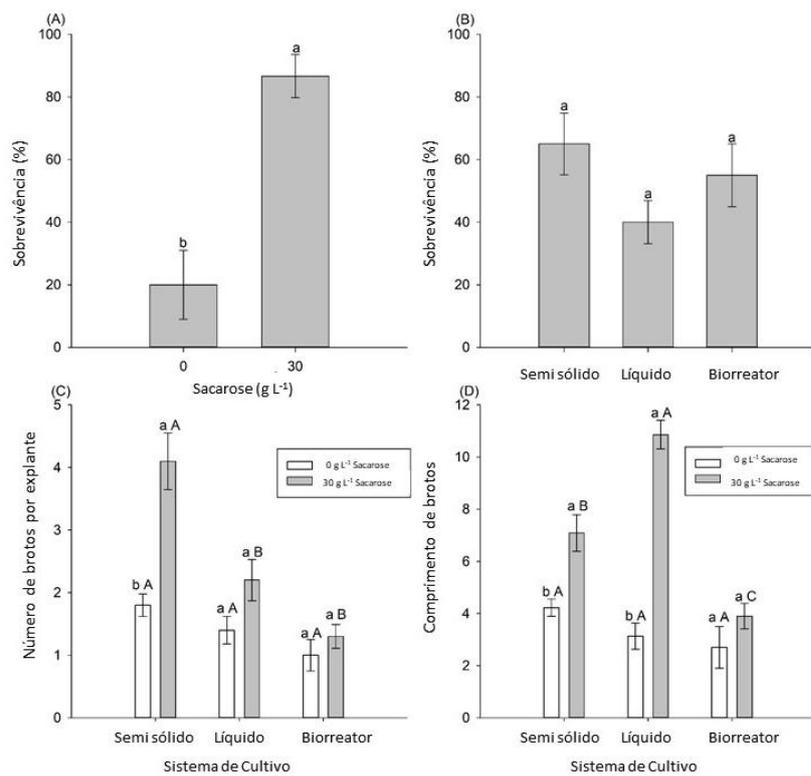
foram amplificadas em termociclador Gene Amp PCR System 9700, seguindo as seguintes etapas: 2 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 37 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C e 1 minuto a 72°C; e extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% e corado com Gel Red TM (Uniscience). As análises dos amplicons foram realizadas visualmente.

3 RESULTADOS

3.1 Multiplicação e alongamento *in vitro*

As fases de multiplicação de gemas e alongamento de brotos *in vitro* dos explantes de *Bambusa vulgaris* ocorreram simultaneamente, e nesse período em relação à sobrevivência, houve influência significativa ($p < 0,05$) da concentração de sacarose utilizada, com a maior média (86,6%) na concentração de 30 g L⁻¹. Na ausência de sacarose houve sobrevivência de apenas 20% (FIGURA 3A).

Figura 3 - Características observadas na multiplicação e alongamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* em relação aos diferentes sistemas de cultivo (semi-sólido, líquido e biorreator).



Legenda: A. sobrevivência em relação a utilização de sacarose; B. sobrevivência em relação aos sistemas de cultivo; C. número de brotos por explante em relação aos sistemas de cultivo e utilização de sacarose e D. comprimento de brotos em relação aos sistemas de cultivo e utilização de sacarose. Para A e B, valores médios seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey. Para C e D, valores médios seguidos por mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa em relação aos sistemas de cultivo, e valores médios seguidos por mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa em relação às concentrações de sacarose ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey. Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

Em relação ao sistema de cultivo adotado, não houve influência na porcentagem de sobrevivência aos 60 dias após a inoculação (FIGURA 3B), e a maior média ocorreu com o uso do sistema semi-sólido (65%), entretanto não diferindo ($p < 0,05$) do sistema líquido (40%) e biorreator (55%). Com isso, pode-se considerar que independente do sistema de cultivo utilizado a espécie *B. vulgaris* é altamente dependente da fonte de carboidrato (sacarose) para sua sobrevivência *in vitro*.

Acerca do número de brotos por explante (FIGURA 3C), houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao sistema de cultivo apenas quando os explantes foram submetidos ao método de cultivo em meio semi-sólido, resultando em 4,1 brotos por explante na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. No que diz respeito a concentração de sacarose utilizada, as médias diferiram ($p < 0,05$) quando foi utilizada a concentração de 30 g L⁻¹.

Para o comprimento de brotos alongados em relação aos sistemas de cultivos adotados (FIGURA 3D) houve diferença ($p < 0,05$), as maiores médias foram observadas quando os explantes foram submetidos aos sistemas semi-sólido e líquido, com 7,9 cm e 10,8 cm, respectivamente, ambos na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. No tocante à utilização de sacarose, as médias difeririam ($p < 0,05$) apenas quando os explantes foram suplementados com o carboidrato (30 g L⁻¹), com a maior média sendo constatada no sistema de cultivo líquido (10,8 cm). Desta forma é possível dizer que o sistema de cultivo líquido com a utilização de sacarose é o mais adequado para o alongamento de brotos de *B. vulgaris* em condições *in vitro*, evidenciando elevada dependência de carboidrato suplementado ao meio de cultura.

Conforme a escala de notas para o vigor (FIGURA 2A), as maiores frequências foram observadas na escala de nota 4 (TABELA 3), nos sistemas semi-sólido (70%) líquido (80%) e biorreator (80%) sem a suplementação com sacarose. Desta forma, o sistema semi-sólido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose resultou as melhores respostas para o vigor na fase de multiplicação e alongamento *in vitro*, levando em consideração que os maiores valores de frequência na escala de nota 1 foram observados quando os explantes foram submetidos a esse sistema de cultivo.

Tabela 3 - Porcentagem de frequência do vigor, baseada na escala de notas (Figura 2A) na multiplicação e alongamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* em diferentes sistemas de cultivo.

Tratamento	Vigor (%)			
	1	2	3	4
SS ¹ com sacarose	60	20	20	0
SS ¹ sem sacarose	0	10	20	70
Líq ² com sacarose	10	20	40	30
Líq ² sem sacarose	0	10	10	80
BIT ³ com sacarose	30	50	20	0
BIT ³ sem sacarose	10	10	0	80
Média	15,8	17,4	18,3	43,3
Erro Padrão	9,4	6,3	5,4	15,6

Nota: ¹Meio semi-sólido, ²Meio líquido e ³Biorreator de Imersão Temporária. Dados apresentados com média ± erro padrão.

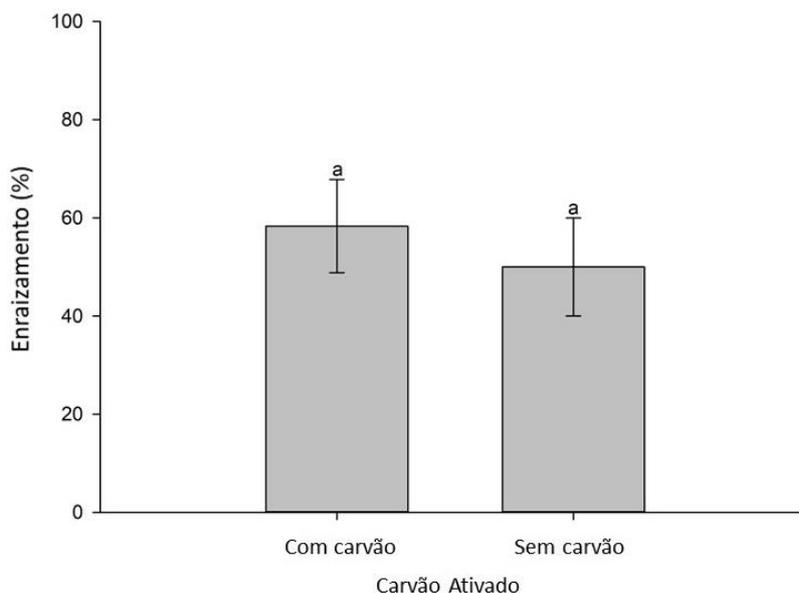
Legenda: Vigor): 1 = Ótimo: indução de brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional aparente; 2 = Bom: indução de brotações, porém com crescimento reduzido; 3 = Regular: pouco desenvolvimento das brotações e/ou deficiência nutricional aparente; 4 = Péssimo: senescência e morte dos explantes.

Fonte: Do autor (2021).

3.2 Enraizamento *in vitro*

No que diz respeito ao enraizamento dos explantes (FIGURA 4) não foi observada diferença ($p < 0,05$) em relação da adição de carvão ativado no meio de cultura aos 60 dias após a inoculação. A presença de raízes adventícias foi observada tanto na presença quanto na ausência de carvão ativado (FIGURA 5) suplementado ao meio de cultura, com 58,3% e 50% de enraizamento, respectivamente, não sendo possível afirmar que o uso do carvão ativado favoreceu a indução e emissão de raízes em *B. vulgaris*.

Figura 4 - Enraizamento *in vitro* em *Bambusa vulgaris* em relação a utilização de carvão ativo, aos 60 dias.



Legenda: Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados apresentados com média \pm erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 5 - Emissão de raízes adventícias em explantes de *Bambusa vulgaris in vitro*.



Legenda: A. enraizamento em meio de cultura com adição de carvão ativado e B e C. enraizamento em meio de cultura sem adição de carvão ativado. Barra = 1,0 cm.

Fonte: Do autor (2021).

Para a oxidação, de acordo com a escala de notas (FIGURA 2B), foi observada a frequência de 80% dos explantes cultivados no meio de cultura com carvão ativado na escala de notas 1 (TABELA 4), ou seja, não apresentaram oxidação nos tecidos e mudança de coloração no meio de cultivo. Em relação aos explantes submetidos ao meio de cultivo sem a adição de carvão ativado, a maior frequência foi verificada na escala de notas 3 (60%). Desta maneira, para a obtenção de plantas de *B. vulgaris* isentas de oxidação na fase de enraizamento,

a adição de carvão ativado no meio de cultura na concentração de 100 mg L⁻¹ pode ser uma alternativa.

Tabela 4 - Porcentagem de frequência de oxidação, baseada na escala de notas (Figura 2B) no enraizamento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* em diferentes concentrações de carvão ativado.

Tratamento (concentração de carvão ativado)	Oxidação (%)			
	1	2	3	4
Ausência	10	10	60	20
Presença (100 mg L ⁻¹)	80	20	0	0
Média	45	15	30	10
Erro Padrão	35	5	30	10

Nota: Dados apresentados com média ± erro padrão.

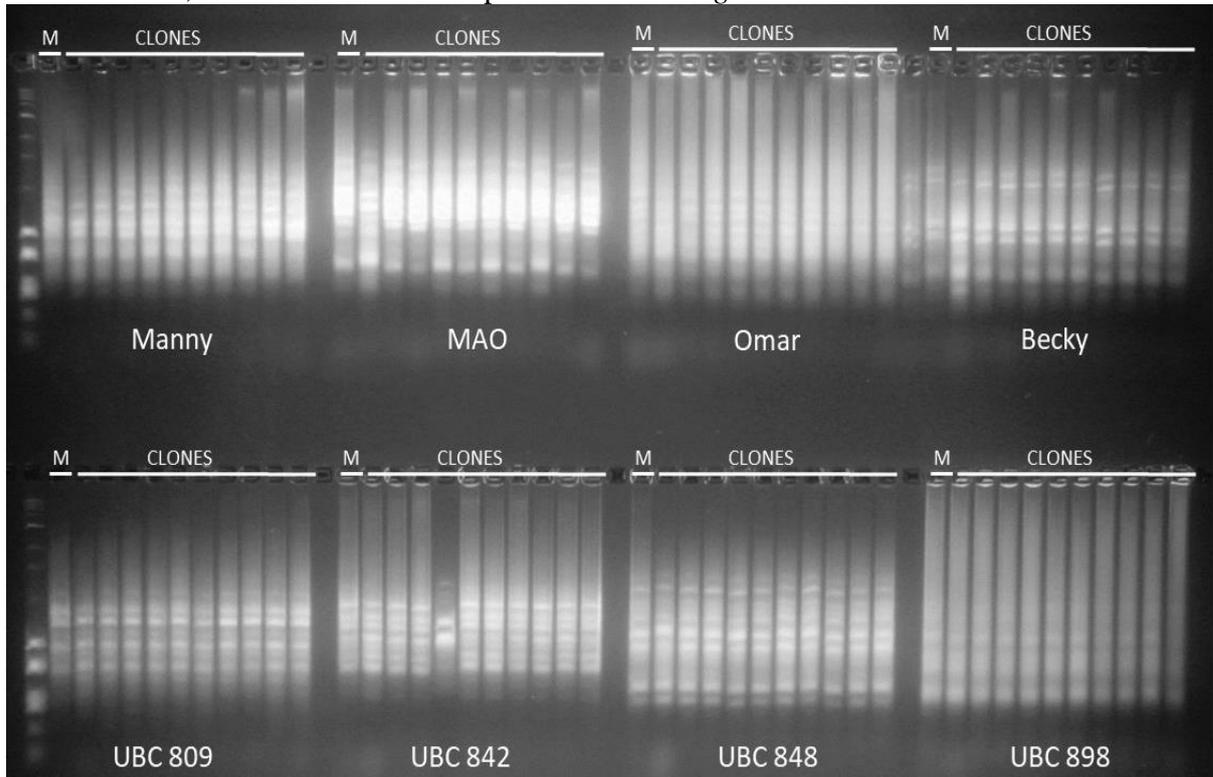
Legenda: Oxidação: 1 = Nula: sem oxidação; 2 = Baixa: reduzida oxidação na base dos explantes; 3 = Média: início de oxidação dos explantes e mudança de coloração no meio de cultura; 4 = Alta: oxidação completa das brotações (meio de cultura escurecido). Barra = 2,0 cm.

Fonte: Do autor (2021).

3.3 Fidelidade genética

Por meio das folhas jovens que foram coletadas das plantas enraizadas *in vitro* e as plantas matrizes em vasos, averiguou-se que os indivíduos micropropagados são clones idênticos às plantas matrizes de *Bambusa vulgaris*. Dos 20 *primers* testados, 15 exibiram características adequadas para avaliação, apresentando amplificação adequada e bandas discerníveis que foram considerados na verificação de fidelidade genética, a figura 6 apresenta o gel obtido com a utilização de alguns desses *primers* (FIGURA 6).

Figura 6 - Gel obtido utilizando os *primers* ISSR Manny, MAO, Omar, Becky, UBC 809, UBC 842, UBC 848 e UBC 989 para *Bambusa vulgaris*.



Fonte: Do autor (2021).

Nos 15 *primers* testados que apresentaram amplificação, foi observado monomorfismo em todas as bandas para todos os indivíduos (TABELA 5). Para a identificação das bandas, foram utilizados como critérios a forte intensidade e a clara separação de outras bandas. A ausência de polimorfismo confirma que não houve variação somaclonal.

Tabela 5 - Resultado das ampliações por *primers* para *Bambusa vulgaris*

<i>Primer</i>	Total de amplicons	Monomórficas	Polimórficas
Becky	5	5	0
Chris	3	3	0
John	4	4	0
Manny	6	6	0
MAO	4	4	0
Omar	5	5	0
UBC809	4	4	0
UBC810	3	3	0
UBC813	0	0	0
UBC814	0	0	0
UBC825	5	5	0
UBC827	0	0	0
UBC834	0	0	0
UBC835	4	4	0
UBC840	5	5	0
UBC842	4	4	0
UBC848	4	4	0
UBC857	3	3	0
UBC898	3	3	0
UBC901	0	0	0

Fonte: Do autor (2021).

4 DISCUSSÃO

4.1 Multiplicação e alongamento *in vitro*

A concentração de sacarose utilizada no meio de cultivo para a multiplicação de gemas e alongamento de brotos de *B. vulgaris in vitro* que ocorrem simultaneamente, influenciou diretamente a sobrevivência dos explantes. Levando em consideração os sistemas de cultivos adotados não foi verificada relação entre os tipos de sistemas e a sobrevivência da espécie.

Em um estudo utilizando três sistemas de cultivo (meio semi-sólido, líquido e biorreator de imersão temporária) em *B. vulgaris*, Ribeiro et al. (2016) verificaram que independente do sistema de cultivo adotado, a ausência de sacarose proporcionou maior taxa de mortalidade dos explantes cultivados *in vitro*, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Desta forma, é possível constatar que *B. vulgaris* tem forte dependência de carboidrato para a manutenção da sobrevivência e obtenção de sucesso nos protocolos de multiplicação da espécie.

Quando cultivadas *in vitro*, as plantas não encontram concentrações de CO₂ e O₂ em quantidades ideais para o seu desenvolvimento e podem ser tornar parcialmente heterotróficas. Com isso, as plantas necessitam de uma fonte de carboidrato exógena para realizar fotossíntese, sustentar seu crescimento e suprir as suas necessidades metabólicas, desta forma, a ausência de uma fonte de energia externa que beneficie a biossíntese dos componentes estruturais e funcionais no meio de cultura, pode provocar a mortalidade dos explantes (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998; GEORGE; HALL; KLERK, 2008; HARTMANN et al., 2011), acontecimento observado no presente estudo, nos tratamentos em que não foi utilizado sacarose.

Em relação ao número de brotos por explantes, a maior média foi verificada com a utilização do meio de cultura semi-sólido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose. Para o comprimento de brotos alongados, a utilização do meio líquido com sacarose (30 g L⁻¹) proporcionou os melhores resultados.

Analisando o efeito dos três sistemas de cultivo, Ribeiro et al. (2016) observaram que a utilização de meio de cultura líquido e do biorreator de imersão temporária apresentaram resultados mais satisfatórios para a multiplicação de gemas e o alongamento de brotos de *B. vulgaris in vitro*, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo para a multiplicação de gemas e corroborando no que diz respeito ao comprimento de brotos.

Segundo Nogueira et al. (2017), quando há maior contato entre a superfície dos explantes e o meio de cultura, a taxa de crescimento é maior devido um aumento da absorção de água e nutrientes, tendo em vista que o meio líquido oferece condições uniformes às culturas. Tal situação foi observada no presente estudo com *Bambusa vulgaris*, levando em consideração que a maior média de comprimento de brotos alongados foi verificada quando os explantes foram submetidos ao sistema de cultivo com meio líquido.

Uma importante questão que deve ser levada em consideração durante o cultivo *in vitro* é o estado físico do meio de cultura que pode estar na forma semi-sólida ou líquida podendo interferir diretamente no desenvolvimento *in vitro* dos explantes, devido às diferenças na forma de contato entre as plantas e o meio de cultura, sendo necessário definir a composição e tipo do meio de cultura utilizado, considerando ainda que as exigências nutricionais necessárias para o crescimento e desenvolvimento dos tecidos cultivados dependem de vários fatores como a espécie e o genótipo utilizado, podendo ocorrer variações até mesmo dentro da própria planta (GREENWAY et al., 2012; MENGARDA et al., 2009).

A adoção de diferentes meios de cultura e distintos sistemas no cultivo *in vitro* de bambus, é descrita para várias espécies na literatura, como *Bambusa vulgaris* (GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014; GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2019; RIBEIRO et al., 2016), *Guadua angustifolia* Kunth. (GUTIÉRREZ; LÓPEZ-FRANCO; MORALES-PINZÓN, 2016) e *Guadua longifimbriata* E.G. Camus e *Guadua angustifolia* Kunth. (COSTA et al., 2017), reforçando a importância e necessidade de estudos mais aprofundados para definições de protocolos de micropropagação de espécies com interesse comercial.

Em relação à resposta dos explantes ao vigor (TABELA 3), a maior frequência de explantes na escala de nota 1 (FIGURA 2A) foi observado no sistema de cultivo semi-sólido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (60%) e as maiores frequências de indivíduos na escala de nota 4 foram observadas no sistema de cultivo semi-sólido (70%), líquido (80%) e biorreator (80%), ambos sem a utilização de sacarose.

A concentração e o tipo de carboidratos utilizados no meio de cultura são fatores de extrema importância no cultivo *in vitro* de vegetais, tendo em vista que estes são fonte de energia e auxiliam a morfogênese da parte aérea e da raiz, influenciando o crescimento e desenvolvimento das brotações (CARVALHO et al., 2013; SILVA et al., 2016). Desta forma, é possível dizer que o baixo vigor observado em *B. vulgaris* no presente estudo, provavelmente foi ocasionado pela falta de suplementação do meio de cultura com sacarose, evidenciando mais

uma vez a necessidade da suplementação de carboidrato ao meio de cultura para favorecer o rápido crescimento e desenvolvimento *in vitro* de *B. vulgaris*.

4.2 Enraizamento *in vitro*

A utilização de carvão ativo não influenciou o enraizamento *in vitro* de *B. vulgaris*, sendo observada a formação de raízes tanto na ausência quanto na presença de carvão no meio de cultura. Segundo Sandhu, Wani e Jiménez (2018), o enraizamento de brotos de bambus em condições *in vitro* é uma etapa fundamental para a obtenção de sucesso na micropropagação. Além disso, de acordo com Mudoj et al. (2013), as espécies de bambus não enraízam com facilidade quando cultivadas *in vitro*. Geiss, Gutierrez e Bellini (2009) também relataram que esse fato pode ocorrer devido a rizogênese ser influenciada por diversos fatores, como concentrações de reguladores de crescimento, luminosidade, status nutricional e aspectos genéticos de cada indivíduo.

O fato do carvão ativado não ter influenciado o processo de enraizamento pode ter relação com a suplementação dos reguladores de crescimento que foram adicionados nas mesmas concentrações em todos os tratamentos avaliados. De acordo com Sandhu, Wani e Jiménez (2018) o enraizamento de espécies de bambus variam entre as espécies e é altamente específico entre cada genótipo, e essa resposta pode estar atribuída aos níveis de hormônios endógenos e aos requisitos diferentes de reguladores de crescimento exógenos de cada explante.

Fisicamente, o carvão ativado tem a capacidade de simular as condições de escuro, onde as raízes normalmente se desenvolvem melhor e quimicamente, tem efeito adsorvente, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio de cultivo. No entanto a utilização desse componente nem sempre apresenta vantagens, levando em consideração que o carvão ativado pode agir como promotor quanto como inibidor do crescimento, pois além de adsorver compostos tóxicos é capaz de adsorver nutrientes fundamentais para o crescimento, fazendo com que a liberação desses seja feita de forma gradual (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009; VILLA; PASQUAL; SILVA, 2014).

Para a oxidação na fase de enraizamento, constatou-se efeito benéfico da utilização de carvão ativado no meio de cultivo. O processo de oxidação normalmente é associado a mecanismos de cicatrização tecidual, que causam a exsudação de compostos fenólicos e é determinado pelo escurecimento dos explantes e do meio de cultura (MUDOJ et al., 2013; VAN WINKLE; JOHNSON; PULLMAN, 2003). A oxidação fenólica no cultivo *in vitro* é

recorrentemente relatada em estudos com espécies de bambus, tais como *Bambusa vulgaris* (BRONDANI et al., 2017; FURLAN et al., 2018), *Dendrocalamus asper* (BRONDANI et al., 2017), *Guadua longifimbriata* E.G. Camus e *Guadua angustifolia* Kunth. (COSTA et al., 2017), desta maneira, com os resultados obtidos no presente estudo é possível indicar a utilização do carvão ativado para solucionar tais problemas nas espécies de bambus. No entanto, de acordo com Furlan et al. (2018), é necessário a condução de mais pesquisas que busquem avaliar efetivamente a capacidade de enraizamento adventício de explantes de *B. vulgaris*, tendo em vista que os protocolos para esse fim são escassos.

4.3 Fidelidade genética

As plantas cultivadas *in vitro* não apresentaram variação genética quando comparadas com a matriz doadora de propágulos, mesmo quando submetidas aos reguladores de crescimento, diferentes sistemas de cultivos e oito subcultivos (120 dias), portanto, são consideradas clones fiéis.

O setor comercial voltado para as espécies de bambu ganhou destaque nos últimos anos e tudo indica um futuro promissor, com isso, o estabelecimento de tecnologias voltadas para a micropropagação de tecidos maduros e livres de variação somaclonal (SINGH et al., 2012; SINGH et al., 2013) é um desafio, pois, de acordo com Negi e Saxena (2011), a possibilidade de ocorrer variação genética não pode ser descartada e as avaliações morfológicas, fisiológicas e moleculares são fundamentais para a aplicação comercial das tecnologias de propagação.

A ocorrência de mutação não pode ser prevista e ao que tudo indica, vários fatores podem alterar a frequência e a natureza da variação somaclonal, tais como o genótipo doador do explante, as condições de cultivo, o tipo de explante, o meio de cultura, a utilização de reguladores de crescimento, além do estresse ocasionado pelo próprio cultivo *in vitro* (ILLG, 1990; VENKATACHALAM; SREEDHAR; BHAGYALAKSHMI, 2007). De maneira geral, a variação somaclonal é uma variação fenotípica que pode ser de origem genética, quando é uma variação cromossômica que se torna herdável nas gerações seguintes, ou de origem epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material vegetal é submetido, quando cultivado em condições *in vitro* (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011; WANG; WANG, 2012).

A fidelidade genética de plantas micropropagadas é comumente abordada em diversos estudos e é importante para a compreensão dos fatores envolvidos na propagação de bambus

(KOZEN et al., 2017) e, na maioria das vezes, são realizados por meio de marcadores moleculares baseados em DNA.

A utilização de marcadores ISSR para esses fins em espécies de bambus vêm sendo bastante utilizados, como os trabalhos realizados por Negi e Saxena (2010) em *Bambusa balcooa*, Anand, Brar e Sood (2013) em clones de *Bambusa bambos* (L.) Voss e Nogueira, Gomes e Scherwinski-Pereira (2019) em *Guadua magna* Londoño & Filg. e *Guada angustifolia* Kunth. Nesses estudos não foi observada variação genética das plantas nos sistemas de cultivo avaliados, evidenciando a eficiência do protocolo utilizado para a produção de clones.

5 CONCLUSÕES

- A utilização do meio de cultura semi-sólido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose apresentou os melhores resultados para o número de brotos por explante.
- A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose no meio líquido resultou nos melhores valores para o alongamento de broto.
- O uso do carvão ativado no meio de cultura não influenciou a formação de raízes adventícias, no entanto reduziu a oxidação dos tecidos.
- As plantas micropropagadas apresentaram fidelidade genética e são clones fieis às plantas matrizes.

6 AGRADecIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Aos técnicos, Dr^a. Ana Luiza Oliveira Timbó e José Pedro de Oliveira, pelo auxílio na condução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In vitro* propagation of an edible bamboo *Bambusa bamboos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, Kuwait, v. 2, n. 4, p. 257-261, 2013.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.
- 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. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p. 86-102.
- CAIRO, P. C. et al. La biomasa de *Bambusa vulgaris* como alternativa para la recuperación de suelos degradados. **Revista Centro Agrícola**, Villa Clara, v. 45, n. 3, p. 51-58, 2018.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, Brasil: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 87-132.
- CARVALHO, D. C. et al. Fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) and grapevine cv. Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) cultivated *in vitro* under different carbohydrates, amino acids and 6-Benzylaminopurine levels. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 2, p. 191-201, 2013.
- COSTA, F. A. et al. Protocolo para micropropagação de duas espécies de *Guadua*. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p. 71-85.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília, Brasil: Embrapa-Cenargen, 1998.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2. 2013.
- FURLAN, F. C. et al. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, Valdivia, 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**, Irvine, v. 5, n. 2, p. 205- 211, 2014.
- GARCÍA-RAMÍREZ, Y. et al. Effect of sucrose on physiological and biochemical changes of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl in temporary immersion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 137, n. 2, p. 239-247, 2019.
- GEISS, G.; GUTIERREZ, L.; BELLINI, C. Adventitious root formation: new insights and perspectives. **Annual Plant Reviews**, New Delhi, v. 37, n. 1, p. 127-156, 2009.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE E. F.; HALL M. A.; KLERK G. D. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrecht, 2008. p. 29-64.

GREENWAY, M. B. et al. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 48, n. 4, p. 403-410, 2012.

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

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

ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, Brasil: Embrapa, 1990. p. 287-295.

INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN - INBAR. **Brazil becomes the latest member of inbar**, Beijing, 2017 [online]. Disponível em: <http://www.inbar.int/brazil_joins_inbar/>. Acesso em: 10 mai, 2020.

KONZEN, E. R. et al. Molecular identification of bamboo general and species based on RAPD-RFLP markers. **Silva Fennica**, Helsinque, v. 51, n. 4, p. 1-16, 2017.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante': efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 1959-1966, 2009.

LI, P. et al. Current and potential carbon stocks in Moso bamboo forests in China. **Journal Environmental Management**, Heverlee, v. 156, n. 1, p. 89-96, 2015.

MENGARDA, L. H. G. et al. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 6, p. 469-474, 2009.

MOREIRA, J. M. M. A. P. Potencial e participação das florestas na matriz energética. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, n. 68, p. 363-372, 2011.

MOREIRA, A. L. et al. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.

MUDOI, K. D. et al. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, 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**, Malden, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEGI, D.; SAXENA, S. Ascertaining clonal fidelity of tissue culture raised plants of *Bambusa balcooa* Roxb. using inter simple sequence repeat markers. **New Forests**, Dordrecht, 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**, Nara, v. 5, n. 1, p. 35-43, 2011.

NOGUEIRA, J. S. et al. Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P. M.; WIEDEMAN, G. (Org.) **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro, Brasil: ICH, 2017. p.103-129.

NOGUEIRA, J. S.; GOMES, H. T.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Guadua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, n. 1, e53743, 2019.

OLIVEIRA, L. S. et al. Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 235-247, 2016.

OLIVEIRA, T. P. F. et al. Exigência nutricional e produtividade em minijardim clonal de *Toona ciliata* var. *australis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 1154-1167, 2019.

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

PEREIRA, A. K. S. et al. Determinação da composição química e potencial de polpação da madeira *Pterogyne nitens* Tul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 4, p. 1490-1500, 2019.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.

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

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**, Dordrecht, v. 132, n. 1, p. 27-53, 2018.

SANTOS, D. W. R. et al. Effects of a commercial biocide, kasugamycin and consistency of the culture medium on the *in vitro* establishment of bamboo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2019.

SILVA, I. M. C. et al. *In vitro* multiplication of pear tree cultivar Cascatense. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 581-594, 2016.

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**, New Delhi, 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**, Heidelberg, v. 35, n. 2, p. 419-430, 2013.

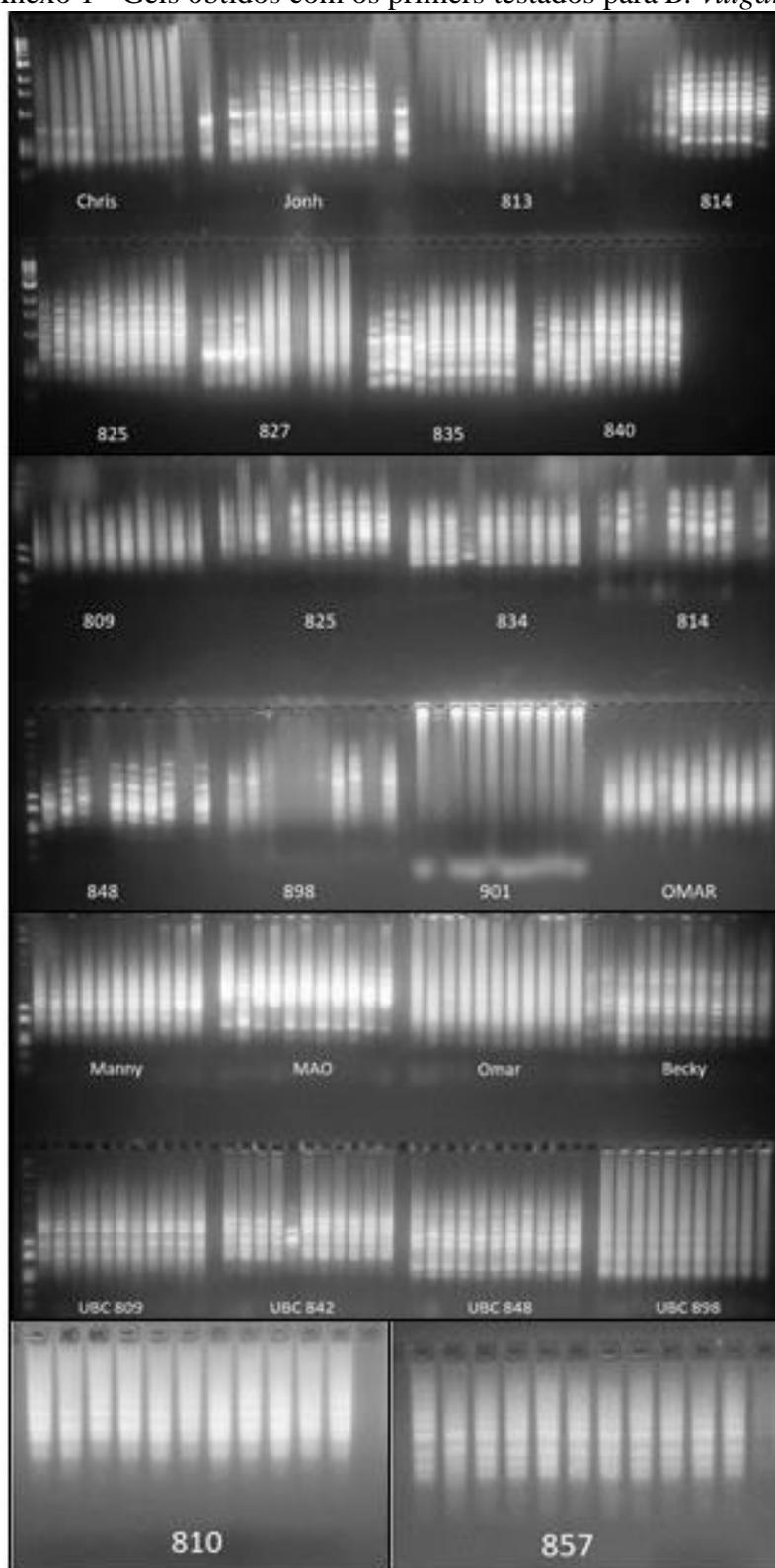
VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 12, p. 1175-1182, 2003.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 193-205, 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SILVA, E. F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio MS, benzilaminopurina e carvão ativado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 683-694, 2014.

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

ANEXOS

Anexo 1 - Géis obtidos com os primers testados para *B. vulgaris*

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 2 - Análise de variância para a sobrevivência de *Bambusa vulgaris* em relação a multiplicação de gemas *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sistema	2	0,1697	0,0848	2,318 ^{ns}	0,1090
Sacarose	1	1,7863	1,7863	48,6486**	0,0001
SIS×SAC	2	0,0625	0,0312	0,8514 ^{ns}	0,4320
Resíduo	54	1,9828	0,0367		
Total	59	4,0013			
CV(%)	19,49				
Média Geral	0,9831				

Nota: ^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $(\text{sob}+0,5)^{0,5}$.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 3 - Análise de número de brotos para a sobrevivência de *Bambusa vulgaris* em relação a multiplicação de gemas *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sistema	2	0,8791	0,4395	20,5829**	0,0001
Sacarose	1	0,5451	0,5451	25,5255**	0,0001
SIS×SAC	2	0,1403	0,0701	3,2864*	0,0450
Resíduo	54	1,1532	0,0213		
Total	59	2,7180			
CV(%)	18,01				
Média Geral	0,8110				

Nota: * ou ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $1/(\text{nb}^{0,5})$.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 4 - Análise de comprimento de brotos para a sobrevivência de *Bambusa vulgaris* em relação ao alongamento de brotos *in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sistema	2	5,4140	2,7070	38,5614**	0,0001
Sacarose	1	10,3907	10,3907	148,0160**	0,0001
SISxSAC	2	4,1735	2,0867	29,7263**	0,0001
Resíduo	54	3,7908	0,0702		
Total	59	23,7691			
CV(%)	11,94				
Média Geral	2,2182				

Nota: ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $cb^{0,5}$.

Fonte: Do autor (2021).

Anexo 5 - Análise de enraizamento de brotos de *Bambusa vulgaris in vitro*.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Carvão	1	0,0111	0,0111	0,1549 ^{ns}	0,6980
Resíduo	22	1,5853	0,0720		
Total	23	1,5965			
CV(%)	27,18				
Média Geral	0,9874				

Nota: ^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação experimental, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, Fc = valor calculado de F, Pr = probabilidade e Pr>Fc = significância. Dados transformados por $(enr+0,5)^{0,5}$.

Fonte: Do autor (2021).