

Thiago Sanches Ornellas

Dissertação de Mestrado

**Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas)
Londoño & P. M. Peterson**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ornellas, Thiago Sanches
Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson / Thiago Sanches Ornellas ; orientador, Miguel Pedro Guerra, 2017.
66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Cultura de tecidos vegetais. 3. Micropropagação. 4. Bambus. 5. *Guadua chacoensis*. I. Guerra, Miguel Pedro. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

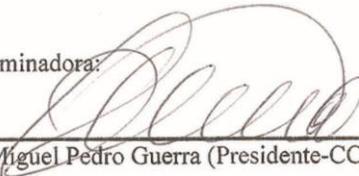
Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson

por

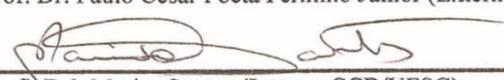
Thiago Sanches Ornellas

Dissertação julgada e aprovada em 24/02/2017, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

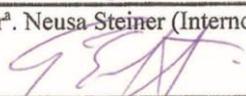
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Presidente-CCA/UFSC)


Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior (Externo-CBS/UFSC)


Prof.ª Dr.ª. Marisa Santos (Interno-CCB/UFSC)


Prof.ª. Dr.ª. Neusa Steiner (Interno-CCB/UFSC)


Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2017

Este trabalho é dedicado
a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A vida pelas idas e vindas, boas e ruins, que ajudaram no meu desenvolvimento por meio de doces lições e suculentas recompensas;

Aos meus pais, Eduardo e Eliana, por todo amor, apoio e ensinamentos ao longo da minha existência;

A minha irmã, Thaisa, pelo apoio e aprendizado mútuo;

A minha namorada, Manuela, pelo companheirismo, carinho e paciência;

Ao professor Miguel Guerra pela orientação e confiança depositada;

Ao Yohan Fritsche, Daniel Holderbaum, Edison Cardona, Gleison Oliveira e Lara Ribeiro pelas colaborações diretas na execução dos trabalhos;

Aos colegas do RGV e do LFDGV pelas discussões, confraternizações e apoio na execução dos trabalhos. Catarina P., Daniela W., Daniel R., Diogo K., Dorival A., Fernando S., Francis D., Gustavo K., Hugo F., Joseph R., Julia Z., Leila V., Lido B., Liliana P., Lilian, Luciano, Luiza G., Maria Eduarda B., Morgana L., Maiby, Marcia R., Patrick M., Ana Flávia P., Ramon S., Renan N., Thiago T., Vanessa P.

A coordenação do RGV/UFSC, a Bernadete Ribas, aos professores por todo conhecimento compartilhado e banca avaliadora pela disponibilidade e colaborações;

A CAPES pela bolsa de estudos;

A BambuSC, ao Hans Kleine, Thiago Greco, Marcos Marques, Marcelo Venturi e Ari Boehme, e ao projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil” (CNPq 66/2013).

RESUMO

Os bambus são gramíneas diversificadas e versáteis quanto aos potenciais e usos agrícolas, florestais, ambientais, econômicos e sociais. O Brasil apresenta a maior diversidade de espécies de bambus do novo mundo, porém a cadeia produtiva no país segue sendo incipiente. Dentre os bambus lignificados das Américas existem 32 espécies no gênero *Guadua*, das quais 18 são nativas do Brasil. Entretanto, apenas *Guadua angustifolia*, nativa da Colômbia, é amplamente usada e estudada no mundo. Ferramentas biotecnológicas apresentam um variado leque de aplicações tanto para a geração de conhecimentos, quanto para o desenvolvimento de tecnologias e inovações para promover e ampliar seu uso sustentável e sua conservação. Atualmente o principal gargalo da cadeia produtiva é a baixa oferta de mudas e a baixa viabilidade de produção destas pelos métodos convencionais. Técnicas de propagação vegetativa de alto desempenho como a propagação clonal massal por micropropagação estão sendo empregadas para suprir a atual demanda. O presente trabalho objetivou desenvolver metodologia para introdução *in vitro*, multiplicação e aclimatização de propágulos, visando estabelecer um protocolo de micropropagação para *Guadua chacoensis*. Foi testada metodologia de introdução *in vitro* em função do uso de PPM[®] e diferentes formas de cultivo das matrizes doadoras de explantes. As culturas estabelecidas foram multiplicadas por meio de segmentos nodais simples e por divisão de touceiras com 3-4 colmos. Neste segundo método, analisou-se a eficiência de doses crescentes da citocinina BAP. Realizou-se o enraizamento e alongamento das culturas em frascos com filtro HEPA que permitem ventilação natural do frasco. Por fim, aclimatizaram-se as plantas sob três níveis de irradiância (35%, 65% e 100%), acompanhando-se a eficiência fotoquímica do PSII (Fv/Fm) durante este processo. As melhores taxas de estabelecimento de explantes (32,5 %) foram obtidas a partir de segmentos nodais de matrizes em sala de crescimento sob cultivo hidropônico e constatou-se que o uso do biocida PPM[®] aumentou da efetividade do processo de introdução *in vitro* de explantes obtidos de matrizes sob cultivo em sala de crescimento. Utilizando-se segmentos nodais basais dos colmos de microplantas, obteve-se 64,28% de estabelecimento de novas plantas que com 90 dias de cultivo tinham em média 3-4 colmos e rizomas formados. Por meio de divisão de touceiras obteve-se até 1,73 de índice

de multiplicação de colmos com 15 μM de BAP aos 30 dias de cultivo. O uso de frascos com ventilação natural incrementou o número de colmos formados em função do número de trocas gasosas aos 58 dias de cultivo. Observou-se uma tendência de incremento da densidade estomática com o aumento das trocas gasosas no cultivo *in vitro*. Os valores de Fv/Fm não foram diferentes entre os tratamentos de pré-aclimatização em frascos com ventilação natural, mas foram significativamente menos variáveis no tratamento de 35% de irradiância. Aos 12 dias de acclimatização novas folhas já haviam expandido em todos os tratamentos e aos 30 dias os valores de Fv/Fm foram estáveis e semelhantes entre os três tratamentos e a plantas acclimatizadas há 90 dias. A sobrevivência de plantas foi de 92%, 84% e 36%, nos respectivos tratamentos de 35%, 65% e 100% de irradiância. A presente dissertação relata o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para o bambu americano *Guadua chacoensis*.

Palavras chave: *Plant Preservative Mixture, BAP, acclimatização, Fotossistema II*

ABSTRACT

Bamboos are diversified and versatile grasses for agricultural, forestry, environmental, economic and social potentials and uses. Brazil presents the greatest bamboo species diversity in the new world, but the country productive chain is still incipient. Among the americans woody bamboos there are 32 species in the genus *Guadua*, of which 18 are native. However, only *Guadua angustifolia*, native to Colombia, is widely used and studied in the world. Biotechnology tools present a wide range of applications both for generation of knowledge and for technologies development and innovations to promote and extend their sustainable use and conservation. Nowadays, the main bottleneck of the productive chain is low supply of seedlings and low production viability by conventional methods. Vegetative propagation by high performance techniques such as mass clonal propagation by micropropagation have been employed to supply the current demand. The aim of present work was to develop methodology for *in vitro* inoculation, multiplication and seedlings acclimatization, in order to establish micropropagation protocol for *Guadua chacoensis* species. *In vitro* inoculation methodology was tested by using PPM[®] and different cultivation way of explants donor mother plants. Established cultures were multiplied by vitroplants nodal segments as well as by means of clumps with 3-4 culms division. Increasing doses of BAP efficiency were tested for multiplication on de the second method. Rooting and culms elongation were carried out in HEPA filter flasks that allow different gas exchange rates. Finally, plants were acclimatized under three irradiance levels (35%, 65% and 100%), and photochemical efficiency of PSII (Fv/Fm) was tracked during this process. Best rates of explants establishment (32.5%) were resulted from nodal segments of hydroponic mother plants and PPM[®] biocide using increased the *in vitro* introduction effectiveness of nodal segments from matrices under growth room conditions. A mean of 64.28% new plants was established by using microplant basal segments, reaching rhizomed clumps with 3-4 culms after 90 days in culture. By clumps division, it was obtained a multiplication index of up to 1.73 shoots in response to 15 μ M BAP dose after 30 days in culture. Flasks with natural ventilation filters stimulated an increase in new culms development after 58 days in culture. A trend of increasing stomatal density was observed with the increase in the number of gas exchanges *in vitro*. Fv/Fm values were not different between pre-acclimatization treatments, but were significantly less variable at the 65% shading treatment. At 12nd acclimatization day new leaves had

already expanded in all treatments, and at 30th day Fv/Fm values were stable and similar among all treatments and young acclimatized plants of 90 days. Plant survival was 92%, 84% and 36% in irradiance treatments of 65%, 35% and 100%, respectively. Present dissertation reports the development of propagation micropropagation protocol for the american bamboo *Guadua chacoensis*.

Key words : *Plant Preservative Mixture, BAP, acclimatization, Photosystem II*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A) Potencial distribuição do gênero *Guadua*; (B) *Guadua magna* Londoño & Filg. (Goiânia/GO, 2015); (C) *Guadua bicolor* no Instituto Agrônômico de Campinas (Tatuí/SP, 2014); (D) Sinflorescência de *Guadua sp* 25
- Figura 2. Plantas matrizes de *Guadua chacoensis*. (A) Cultivadas a campo; (B) Cultivadas em substrato comercial sob condições controladas de sala de crescimento; (C) Cultivadas em sistema hidropônico sob condições controladas de sala de crescimento. 42
- Figura 3. Taxa de explantes estabelecidos, contaminados e que não brotaram e não contaminaram (sem resposta) aos 30 dias após a introdução *in vitro* de *Guadua chacoensis*, em função do manejo das matrizes e uso de *Plant Preservative Mixture* (PPM®) no meio de cultura. 47
- Figura 4. Taxas de contaminações por somente fungos, somente bactérias ou ambos na mesma unidade amostral, observadas aos 30 dias após a introdução *in vitro* de *Guadua chacoensis*, em função do manejo da planta matriz e da presença ou ausência de *Plant Preservative Mixture* (PPM®) no meio de cultura. 49
- Figura 5. Ocorrência de microrganismos no meio de cultura ao longo dos 30 dias após a introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Guadua chacoensis* em função das plantas matrizes e do uso de *Plant Preservative Mixture* (PPM®) - 0 ml/l (linha tracejada e pontos vermelhos) e 2 ml/l (linha contínua e pontos azuis). 50
- Figura 6. Micropropagação de *Guadua chacoensis*. (A) Segmento nodal brotado oriundo de plantas *in vitro*; (B) Touceira obtida por segmento nodal após 90 dias de cultivo; (C) Divisão de touceira com rizoma formado; (D) Multiplicação de touceiras em frasco do tipo Microbox® com filtro de número de trocas gasosas (NTG) de 3,4. h⁻¹; (E) Processo de pré aclimatização em frasco do tipo Microbox® com filtro de NTG = 0,4. h⁻¹; (F) Macroproliferação prévia à aclimatização. 52

Figura 7. Análise de regressão do efeito de doses de BAP sobre a multiplicação de touceiras *in vitro* de *Guadua chacoensis*. (A) índice de multiplicação; (B) Altura média do maior colmo; (C) Comprimento médio de raízes formadas; (D) Número médio de raízes formadas..... 53

Figura 8. Incremento do número de colmos de *Guadua chacoensis* ao longo do tempo sob diferentes condições *in vitro* com ventilação natural por filtros com diferentes números de trocas gasosas (NTG). Linha contínua e pontos vermelhos: NTG=0,4. h⁻¹; Linha tracejada e pontos azuis: NTG=3,4. h⁻¹. 54

Figura 9. Acompanhamento dos valores de rendimento fotoquímico máximo do PSII (Fv/Fm) ao longo dos 30 dias de aclimatização das plantas de *Guadua chacoensis* em diferentes níveis de irradiância (35%, 65% e 100%). Linha contínua e pontos azuis: pré-aclimatização em frasco com NTG = 0,4. h⁻¹; Linha tracejada e pontos vermelhos: pré-aclimatização em frasco com NTG = 3,4 .h⁻¹. 57

Figura 10. Aclimatização de *Guadua chacoensis*. (A e B) 30 dias de aclimatização em tubetes de 290 cm³; (C) 90 dias em vaso 1000 cm³..... 58

Figura 11. Diagrama do processo de micropropagação do bambu *Guadua chacoensis*. ' 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição salina da solução hidropônica utilizada para o cultivo e manutenção de matrizes e mudas por fertirrigação..... 43

Tabela 2. Taxas de estabelecimentos de segmentos nodais de plantas *in vitro* de *Guadua chacoensis* em função da posição da gema no colmo e do uso de frascos com ventilação natural ou vedados. 51

Tabela 3. Densidade estomática das faces abaxial e adaxial, distância entre nervuras em folhas de *Guadua chacoensis* cultivadas sob condições *in vitro* sob diferentes números de trocas gasosas por hora (NTG) e em condições *ex vitro* após aclimatização. 55

Tabela 4. Taxa de sobrevivência de plantas de *Guadua chacoensis* aos 30 dias de aclimatização sob 35%, 65% e 100% de irradiância. Plantas pré aclimatizadas em frascos com número de trocas gasosas por hora (NTG) de 0,4 e 3,4. 58

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- INBAR** - *International Network for Bamboo and Rattan*
IPGRI - *International Plant Genetic Resources Institute*
PNMCB - Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu
MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
BPG – *Bamboo Phylogeny Group*
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
RBB – Rede Brasileira do Bambu
BAMBUSC – Associação Catarinense de Bambu
BAP – Benzilaminopurina
NTG – Número de trocas gasosas
AIA – Ácido indolacético
PPM[®] – *Plant Preservative Mixture*[®]
HEPA – *High Efficiency Particulate Arrestance*
PAM – *Pulse Amplitude Modulated*
PSII – Fotossistema II
F_v/F_m – Rendimento fotoquímico máximo do PSII
F₀ – Fluorescência basal
F_m – Fluorescência máxima

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1. INTRODUÇÃO	21
1.2. POTENCIAL NO BRASIL.....	21
1.3. POLÍTICAS PÚBLICAS	22
1.4. BAMBUS AMERICANOS.....	23
1.5. GÊNERO GUADUA	24
1.6. PROPAGAÇÃO.....	26
1.8. PLANTAS MATRIZES E MINIJARDIM CLONAL	27
1.9. MICROPROPAGAÇÃO	28
1.10.FOTOSSÍNTESE.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
2. ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO POR ORGANOGÊNESE DIRETA DE GUADUA CHACOENSIS (ROJAS) LONDOÑO & P. M. PETERSON	39
2.1. INTRODUÇÃO	39
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
2.4. CONCLUSÕES	60
2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. INTRODUÇÃO

Bambus são monocotiledôneas pertencentes à família Poaceae, subfamília Bambusoideae. Esta é subdividida em três tribos, a Bambuseae (bambus lignificados tropicais), Arundinarieae (bambus lignificados temperados) e a Olyrae (bambus herbáceos). Os bambus são plantas cosmopolitas encontradas pelo globo entre as latitudes 46°N e 47°S, desde o nível do mar até 4000 m de altitude (CLARK, 1990). Muitas espécies de bambus são identificadas e classificadas botanicamente a partir de características estereis observadas durante o ciclo vegetativo e por isto é frequente a identificação de novas espécies ou mudanças dessas entre grupos taxonômicos (LONDOÑO; ZURITA, 2008). Estima-se a existência de 116 gêneros e mais de 1439 espécies no mundo, presentes de forma nativa em todos os continentes com exceção da Europa e Antártida (BPG, 2012).

Como plantas úteis, os bambus acompanham os humanos há cerca de 6000 anos, com grande importância ambiental, cultural, social e econômica (FILGUEIRAS; GONÇALVES, 2006), sendo registrados mais de 1500 usos das plantas de bambu e de seus produtos. Seus usos estão associados à construção civil, controle de erosão, fibras e celulose, instrumentos musicais e agrícolas, alimentação humana e animal, medicinal, artesanato, ornamentação, entre outros (JUDZIEWICZ et al., 1999). Recentemente, com o avanço da ciência e tecnologias, surgiram novos usos como os produtos engenheirados (e.g. laminados, compensados e particulados), biocombustíveis e polímeros (PANDE; PANDEY, 2008; LIESE; WELLING; TAN., 2015)

A *International Network for Bamboo and Rattan* (INBAR) em cooperação com *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), determinaram 20 espécies prioritárias de bambus com base nos seguintes critérios: usos, cultivos, produtos e processos, germoplasma e recursos genéticos, e agroecologia (RAO et al., 1998).

1.2. POTENCIAL NO BRASIL

O Brasil possui potencial para plantios tanto de espécies nativas como exóticas. Entre as primeiras destacam-se algumas espécies do gênero *Guadua*, que apresentam colmos de grande diâmetro e paredes espessas, conferindo resistência e durabilidade. Espécies dos gêneros *Merostachys* e *Chusquea*, já são utilizadas

tradicionalmente para artesanato e também apresentam forte potencial de uso ambiental e ornamental. Dentre as exóticas, as de maior potencial pertencem aos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Phyllostachys* (AZZINI; BERALDO, 2001).

O maior plantio comercial de bambus do Brasil encontra-se no nordeste do país, onde o Grupo Industrial João Santos utilizava o bambu como matéria prima celulósica na produção de cartão duplex para embalagens e papel Kraft. Para isto este grupo cultivava em Coelho Neto – MA uma área de 30.000 ha da espécie *Bambusa vulgaris* (LOBOVIKOV et al., 2005; PNF, 2005). Outra recente iniciativa do Grupo Suzano – Papel e Celulose e o Instituto Jatobás, é a Fazenda dos Bambus localizada em Pardinho-SP, onde são cultivadas 62 espécies de bambus e são realizadas pesquisas sobre a cultura (www.fazendadosbambus.com.br). Ainda no estado de São Paulo, o Projeto LUPA disponibiliza mapas com a distribuição de algumas áreas cultivadas de bambus. Podem-se observar concentrações de plantios na região de Mogi das Cruzes e Registro, apresentando talhões de até 120 ha (SÃO PAULO, 2008). Em Santa Catarina os cultivos mais expressivos são de 40 ha no município de Frei Rogério e 100 ha em Rio Negrinho (comunicação pessoal)¹.

1.3. POLÍTICAS PÚBLICAS

Publicado pelo Ministério do Meio Ambiente, por meio do Programa Nacional de Florestas, o documento que apresenta reflexões sobre o uso sustentável do bambu no Brasil, cita a importância da necessidade conservação das espécies nativas por meio da implantação de bancos de germoplasma regionais (PNF, 2005).

Em abril de 2011 foi firmado entre o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil e o Ministério da Ciência e Tecnologia da China um memorando de entendimento para promoção da cooperação bilateral em Ciência e Tecnologia na área de desenvolvimento dos bambus. Em setembro do mesmo ano foi decretada a lei nº 12.484/2011 que institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB) e que prevê apoio ao desenvolvimento tecnológico da cadeia produtiva do bambu. O Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) em

¹Publicação eletrônica de Hans Jürgen Kleine. Mensagem recebida por <thisorn@gmail.com> em 01 out. 2014.

conjunto com Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) lançaram uma chamada pública com o objetivo de estruturar a Rede Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do bambu, visando atender às demandas tecnológicas dessa nova política nacional (MCTI/Ação Transversal/CNPq n.º 66/2013).

Em 2002 o Brasil foi convidado pela INBAR para ser país membro, mas o convite foi declinado com a justificativa de excesso de gastos com as contribuições anuais. Após 14 anos, em 25 de agosto de 2016 entrou em vigor o decreto legislativo aprovando o texto do Acordo com o INBAR, o que torna o país membro da rede (BRASIL, 2016).

1.4. BAMBUS AMERICANOS

Por volta de 40% das espécies mundiais de bambus são endêmicas das Américas (KELCHNER; BPG, 2013) e o Brasil apresenta a maior diversidade de bambus do novo mundo (JUDZIEWICZ et al., 1999), sendo listadas 232 espécies nativas distribuídas em 34 gêneros, sendo as maiores ocorrências na Mata Atlântica e Amazônia, onde na região sudoeste desta ocorre uma área estimada em 9 milhões de hectares de floresta associada a bambus lignificados (*Guadua spp.*) (FILGUEIRAS; GONÇALVES, 2004). De acordo com documento publicado pela FAO e INBAR, o continente americano contém 28% dos recursos de bambu do mundo (LOBOVIKOV et al., 2007). A região da costa atlântica da América do Sul é considerada um dos principais centros de diversidade de Bambusoideae do novo mundo (OHRNBERGER, 1999). Segundo a lista de espécies da flora do Brasil (floradobrasil.jbrj.gov.br) sete espécies de *Guadua* são nativas do domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, considerado por Mayers e colaboradores (2000) um dos cinco *hotspot* de biodiversidade mais importantes do planeta.

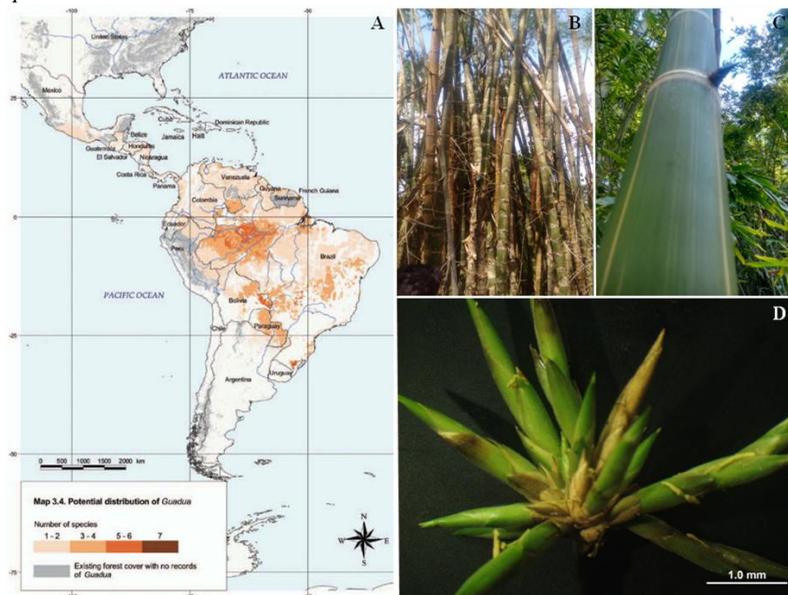
Na lista de espécies prioritárias de bambus para o mundo (RAO et al., 1998), os autores descrevem a única espécie americana da lista, *Guadua angustifolia*, como de alto valor potencial para comercialização, industrialização e para fins de recuperação ambiental e consideraram a espécie como não domesticada. *G. angustifolia* e *G. amplexifolia* são apontadas como as únicas espécies do gênero que são cultivadas economicamente na América do Sul (LONDOÑO, 1998). Em revisão atual da lista proposta em 1998, Benton (2015) indica *G. chacoensis* como espécie de potencial semelhante ao *G. angustifolia* e muito utilizado por povos nativos da América latina.

Além do potencial econômico de seus colmos, os guaduas apresentam forte apelo ambiental, podendo-se associar com outras espécies florestais e de ampla ocorrência em margens de rios, protegendo o solo, reciclando nutrientes e melhorando a qualidade da água. (LONDOÑO, 1992). Outros estudos demonstram diversas associações com fauna, insetos e mamíferos (HAEMIG, 2005).

1.5. GÊNERO GUADUA

Dentre os cinco gêneros da subtribo Guaduinae, o *Guadua* possui 32 espécies reconhecidas (CLARK *et al.*, 2015) e apresenta em geral, plantas com colmos agrupados de médio a grande porte, com hábito ereto a escandente. Podendo ser maciços e muitas vezes ocos com parede espessa. O sistema de rizomas apresenta entrenós curtos a longos. Os guaduas possuem anéis de tricomas brancos na região dos nós e na maior parte das espécies com colmos e ramos espinescentes (JUDZIEWICZ *et al.*, 1999), embora isto não seja considerada característica diagnóstica do gênero (LONDOÑO, 2002) e são conhecidas espécies que apresentam vários graus de espinescência (YOUNG; JUDD, 1992). O gênero *Guadua* distribui-se por todo o Brasil, sendo 18 espécies consideradas nativas e cinco endêmicas (SHIRASUNA, 2015). Embora o país apresente alta diversidade de espécies, a cadeia produtiva recente ainda se baseia em espécies exóticas e tecnologias produzidas nos países de origem destas espécies, negligenciando as espécies nativas com alto potencial.

Figura 1. (A) Potencial distribuição do gênero *Guadua*; (B) *Guadua magna* Londoño & Filg. (Goiânia/GO, 2015); (C) *Guadua bicolor*. no Instituto Agronômico de Campinas (Tatuí/SP, 2014); (D) Sinflorescência de *Guadua* sp..



Fonte: (A) BYSTRIAKOVA et al., 2002; (B-D) Acervo pessoal.

Guadua chacoensis apresenta distribuição geográfica desde o norte da Argentina, sudeste da Bolívia, sul do Paraguai e Brasil, em geral em matas de galerias e beiras de rios, em altitude de 75 a 450 m (LONDOÑO; PETERSON, 1992; JUDZIEWICZ et al. 1999). A espécie é comumente cultivada por colecionadores e produtores de bambus, pelo hábito, cor e pelo indumento dos entrenós. Os colmos possuem 10-20 m de altura com diâmetro de 10-13 cm. Estes geralmente apresentam-se eretos com entrenós ocós e pubescência branca junto aos nós, e ramos espinoscentes (SCHIMDT; LONGHI-WAGNER, 2009; GRECO; CROMBERG, 2011).

1.6. PROPAGAÇÃO

A propagação convencional de bambus é feita por sementes, divisão de touceiras e rizomas, e mudas por segmentos de colmos. No entanto, sazonalidade na disponibilidade de sementes, custos elevados e problemas enfrentados com o transporte dos propágulos vegetativos, e a baixa eficiência propagativa dos métodos convencionais obrigam o desenvolvimento de métodos de propagação alternativos (GIELIS et al., 2001). Além disso, quando disponíveis, as sementes têm curta viabilidade e são normalmente apreciadas pela fauna (SINGH et al., 2013).

Os eventos reprodutivos sexuados em bambus podem ocorrer de duas formas, floração gregária e esporádica. No primeiro caso, os indivíduos de uma determinada espécie ou população florescem simultaneamente e produzem grandes quantidades de propágulos que normalmente são de curta viabilidade temporal. Comumente após esse fenômeno as plantas entram em senescência e morrem. Floração esporádica pode ocorrer individualmente ou em populações. Para ambas as formas de floração, os intervalos são muito variáveis entre as espécies, podendo alcançar 120 anos (JANZEN, 1976). No caso dos bambus lignificados das Américas, os ciclos de floração podem ocorrer a cada 30 anos (GUERREIRO, 2014).

Métodos de macropropagação por meio de brotações basais de colmo, segmentos nodais de ramos laterais e divisão de touceiras jovens já são conhecidos e utilizados na produção de mudas em larga escala de apenas algumas espécies de guaduas. Estes são destacadamente relatados na literatura americana e são conhecidos respectivamente por, *chusquines*, *riendas* e macroproliferação (CRUZ-RIOS, 2009).

Chusquines é o nome popular colombiano dado as brotações do rizoma estimuladas por perturbações severas nos colmos. São amplamente utilizados para preparação de novas mudas em *guaduales* de produção de colmos. *Riendas* é outro termo colombiano utilizado para as ramificações laterais dos colmos. Podem-se obter mudas a partir de segmentos nodais desses ramos, e há relatos de uso de auxinas exógenas no aumento da eficiência do enraizamento desses propágulos (GRECO; CROMBERG, 2011). Macroproliferação é o termo cunhado por Banik (1987) e utilizado para conceituar um método propagativo por divisão de touceiras em bambus e consiste na retirada de perfílios enraizados a partir de mudas jovens (KOSHY; GOPAKUMAR, 2005).

O processo pode ser realizado em plantas obtidas por sementes (SINHA et al., 2012), por métodos convencionais de macropropagação (VISWANATH et al., 2012 a,b), e comumente aplicado em mudas obtidas por cultura de tecidos após a aclimatização (MISHRA et al., 2011; SINGH et al., 2012; VISWANATH et al., 2012 a)

Singh e colaboradores (2012) relatam que a produção de mudas de *Dendrocalamus asper* dobrou por meio da macroproliferação após a micropropagação. Mudoi e Borthakur (2009) triplicaram a produção de *Bambusa balcoa* pelo uso da técnica. Viswanath et al. (2012a) relataram que *G. angustifolia* adaptou-se bem ao procedimento e mudas de segmentos nodais com três meses foram multiplicadas a uma taxa 10 a 12 vezes anualmente.

1.8. PLANTAS MATRIZES E MINIJARDIM CLONAL

As plantas matrizes para a propagação vegetativa podem ser mantidas em chamados jardins clonais ou em condições *in vitro*. Jardins clonais são grupos de plantas matrizes de mesmo genótipo ou vários genótipos, que são destinadas a produção de propágulos para formação de pomares ou viveiros comerciais (CARVALHO; SILVA, 2012). Dentro desse conceito estão os minijardins clonais que apresentam como diferença principal ao anterior a redução do espaço necessário para implantação e o aumento da oferta de propágulos, aumentando assim a eficiência (HIGASHI et al., 2000). Desde a inovação do uso de tubetes na produção de mudas florestais (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983) a silvicultura clonal evoluiu significativamente quanto ao uso de minijardins clonais e miniestaquia na propagação massal (ASSIS, 2001; XAVIER; SILVA, 2010). Minijardins clonais cultivados à campo apresentam diversos problemas relacionados a fotossíntese, nutrição, doenças e consequentemente possuem matrizes de menor qualidade. Atualmente muitos matrizeiros são formados em casas de vegetação ou salas de crescimento sob condições controladas de luz (fotoperíodo e espectros específicos), temperatura, fitossanidade e nutrição e até tratamentos com fitoreguladores. Comumente utilizam-se sistemas hidropônicos de irrigação localizada e de subirrigação (ASSIS et al., 2004; PREECE, 2008). A maturidade das plantas fornecedoras de propágulos tem grande influência sobre a eficiência da propagação vegetativa e por isso muitas vezes, viveiristas recorrem a plantas oriundas de cultura de tecidos para formação de seus matrizeiros (PREECE, 2008).

1.9. MICROPROPAGAÇÃO

A falta de mudas de bambu com boa qualidade genética e fitossanitária é um atual gargalo na cadeia produtiva, pois os métodos convencionais de propagação não conseguem atender demanda (OPRINS et al., 2004). Devido ao baixo rendimento e alta heterogeneidade dos métodos convencionais de propagação da maioria dos bambus lignificados, a micropropagação é importante alternativa para produção de mudas em larga escala (MUDOI et al., 2013).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais apresentam grande potencial para o desenvolvimento e a propagação massal de germoplasmas elite, com garantia de qualidade genética e fitossanitária (GUERRA et al., 1999). Além disso, permitem conservação *ex situ* de material genético dos indivíduos estabelecidos, complementando métodos de conservação *in situ* (SINGH et al., 2013). Rao et al. (1998) apresentaram a alta demanda quanto aos recursos genéticos de *G. angustifolia*, afirmando a necessidade de geração de mais informações sobre populações naturais para fins de conservação, especificamente com pesquisas sobre sementes, conservação *in vitro*, e ampliação de intercâmbio de germoplasma. Além disso, os autores relataram a necessidade de tecnologias de propagação para a promoção das espécies. A introdução *in vitro* de determinado genótipo possibilita a sua conservação a médio e longo prazo por meio de técnicas de conservação *in vitro*, isolando o germoplasma de fatores bióticos e abióticos do meio ambiente (ENGELMANN, 2011).

Diversos tecidos vegetais, desde juvenis e derivados de plantas maduras podem ser utilizados para iniciar culturas *in vitro*. Porém, os mais utilizados são embriões zigóticos e segmentos nodais (MUDOI et al., 2013; SINGH et al., 2013). Os primeiros são comumente utilizados para indução de embriogênese somática, enquanto o segundo é o explante mais usado para protocolos de organogênese.

Problemas na introdução de espécies de bambus *in vitro* são um dos principais gargalos da micropropagação devido à elevada taxa de manifestação de microorganismos associados à planta matriz, especialmente quando esta se encontra em condições de campo (DAS; PAL, 2005; RAMANAYAKE et al., 2006). Em trabalho recente realizado pelo LFDGV, foram obtidas culturas axênicas de *Dendrocalamus asper* por meio do uso do biocida Vitrofurax no meio de cultura (ORNELLAS et al., 2017). Além disso, a maturidade dos tecidos dos explantes e a época do ano em que é realizada a coleta destes são

determinantes na brotação das gemas dormentes e na carga de microorganismos associados (BANERJEE; GANTAIT; PRAMANIK., 2011; SINGH et al., 2012). Jiménez et al. (2006) observaram durante a inoculação *in vitro* de *G. angustifolia*, menores taxas de manifestação de microrganismo em explantes obtidos de matrizes sob cultivo protegido, principalmente quando em associação com o uso de biocida no meio de cultura.

Vencida a fase de introdução, as culturas passam pelo estágio de multiplicação no qual geralmente utilizam-se citocininas, com destaque para a Benzilaminopurina (BAP) (MUDOI, 2013). Além da eficiência do estímulo as brotações adventícias, as citocininas podem favorecer a reversão às características juvenis (PREECE, 2008). Em algumas culturas pode ocorrer rizogênese espontânea durante a fase de multiplicação, enquanto outras necessitam passar por mais um estágio *in vitro* para a indução do enraizamento prévio à aclimatização.

Com a indução do enraizamento bem sucedida, plantas *in vitro* podem ser aclimatizadas e este procedimento em muitos casos é considerado ponto crítico do processo de micropropagação, pois os propágulos passam por mudanças ambientais drásticas e necessitam adaptar-se as novas condições. Ziv (1995) relata as mudanças nas ceras epicuticulares das folhas, a funcionalidade dos estômatos e excessiva transpiração causando perdas importantes de água, principalmente durante as primeiras 48 horas iniciais de aclimatização *ex vitro*. Neste contexto, novos frascos com filtros permeáveis a gases estão sendo comercializados para fins de cultura de tecidos, como por exemplo, os frascos Microbox (Combusiness, Bélgica - www.microbox-container.com). Esses modelos de frascos são desenhados para aproximar condições da atmosfera controlada *in vitro* às condições *ex vitro* (HAZARIKA, 2006). O processo de aclimatização demanda plasticidade morfoanatômica das plantas durante a mudança repentina de condições ambientais. As folhas de plantas cultivadas *in vitro* geralmente apresentam epiderme e cutícula menos espessa e com menor deposição de ceras comparativamente ao ambiente natural (ZIV; CHEN, 2008). Ziv (1991) relata a baixa funcionalidade de célula guardas de plantas *in vitro*, e que o incremento na luminosidade e redução da umidade relativa pode estimular modificações nos estômatos.

1.10. FOTOSSÍNTESE

O processo de fotossíntese pode ser descrito como a produção de compostos orgânicos realizada por organismos autotróficos a partir de matéria prima inorgânica quando em presença de luz (HALL; RAO, 1980). Em geral a fotossíntese ocorre majoritariamente em função da área foliar e da capacidade fotossintética da estrutura foliar da copa. Esta pode variar em função da posição, idade e estado nutricional das folhas e da umidade e intensidade luminosa no ambiente. Um fator importante para a fotossíntese dos bambus é o tempo de vida da estrutura foliar como um todo, pois a cada época de alongamento dos colmos, novas folhas sombrearão folhas de anos anteriores (KLEINHENZ; MIDMORE, 2001). A troca constante das folhas e a estrutura foliar com idades variadas permitem que as plantas mantenham-se sempre verdes e com taxas de fotossínteses adequadas (HIDALGO-LÓPEZ, 2003).

Os parâmetros da fotossíntese de um vegetal podem ser utilizados como indicadores da condição fisiológica. Atualmente, com o avanço das tecnologias eletrônicas, diversos aparelhos vêm sendo desenvolvidos para avaliar esses parâmetros de forma rápida sem a necessidade de destruição do material analisado. A avaliação da fluorescência da clorofila *a* por meio da fluorimetria de amplitude modulada (PAM) pode fornecer informações sobre a influência dos fatores do ambiente sobre os rendimentos quânticos do fotossistema II e a taxa de transporte de elétrons entre os fotossistemas (CAMPOSTRINI, 2001) com importante vantagem da rápida obtenção da informação sem a necessidade de destruição do material analisado (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE ASSIS, T. F. Evolution of technology for cloning Eucalyptus in large scale. *In: Proceedings of the IUFRO International Symposium on Developing the Eucalypt of the Future*, Valdivia, Chile. 2001.

DE ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on Eucalyptus. **Plantation forest biotechnology for the 21st century. Research Signpost**, Trivandrum, India, p. 303-333, 2004.

AZZINI, A.; BERALDO, A. L. **Métodos práticos para utilização do bambu**. Campinas: UNICAMP, 2001.

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

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

BANIK, R. L.. Techniques of bamboo propagation with special reference to pre-rooted and pre-rhizomed branch cuttings and tissue culture. *In: Recent research in bamboos. Proceedings of the International bamboo workshop*. 1985. p. 160-169.

BENTON, A. Priority species of bamboo. *In: Bamboo*. Springer International Publishing, 2015. p. 31-41. 2015.

BRASIL. Comissão De Relações Exteriores E Defesa Nacional. Aprova o texto do acordo sobre a constituição da rede internacional do Bambu e do Ratã. Projeto de decreto legislativo n°. 20 de 25/08/2016. Relator: Jorge Viana. **Lex: Parecer n°. 755 do Diário do Senado federal n. 135**, p. 315-323. 2016.

BYSTRIAKOVA, N.; KAPOS, V.; LYSENKO, I. **Potential distribution of woody bamboos in Africa and America**. Cambridge, UNEP_WCMC, 2002.

CAMPINHOS, E. J.; IKEMORI, Yara Kiemí. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. **IPEF**, v. 23, p. 47-52, 1983.

CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas. Universidade Estadual do Norte Fluminense. **Apostila**, 2001.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M. M. de A. **Plantas Matrizes na propagação vegetativa**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 36 p. 2012.

CLARK, L. G. Diversity and biogeography of Neotropical bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 125-132, 1990.

CRUZ-RÍOS, H. **Bambú-Guadua** (*Guadua angustifolia Kunth*): Bosques naturales en Colombia y plantaciones comerciales en México. Colômbia: Colmex. 691p. 2009

DAS, M.; PAL, A. In vitro regeneration of *Bambusa balcoa* Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 81:109-112, 2005

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. S. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **The journal of the American Bamboo Society**, 18(1), 7-18. 2004

FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. S. Bambus nativos no Brasil: oportunidades e desafios para seu conhecimento. **Seminário nacional do bambu: estruturação da rede de pesquisa e desenvolvimento**, 1, 196 p. 2006.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta** -General Subjects, 990(1), p. 87-92. 1989.

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

GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. 1999. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 2, Embrapa, Brasília, p.533-568. 1999.

GRECO, T.M., CROMBERG, M. **Bambu cultivado e manejo**. Editora Insular, Florianópolis, 184p. 2011.

GUERREIRO, C. Flowering cycles of woody bamboos native to southern South America. **Journal of plant research**, v. 127, n. 2, p. 307-313, 2014.

HAEMIG, P. D. Birds and mammals associated with bamboo in the Atlantic Forest. **Ecology. Info**, (5). 2005.

HALL, D.O.; RAO, K.K.. **Fotossíntese**. São Paulo: EPU/EDUSP. 18-71, 1980

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

HIDALGO-LOPEZ, O. **Bamboo: the gift of the Gods**. D'vinni Ltda., Bogotá, Colômbia. 2003. 553p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. A evolução do jardim clonal na produção de mudas. **IPEF notícias**, v. 24, n. 148, p. 4-6, 2000.

JANZEN, D. H. Why bamboos wait so long to flower. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 7, n. 1, p. 347-391, 1976.

JIMENEZ V.M., CASTILLO J., TAVARES E., GUEVARA E., MONTIEL M.. In vitro propagation of the neo-tropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tissue Organ Cult** v. 86, p.389–395, 2006

JUDZIEWICZ, E. J.; CLARK, L. G.; LONDONO, X.; STERN, M. J. (1999). **American bamboos**. Smithsonian Institution Press.

KELCHNER, S. A.; BAMBOO PHYLOGENY GROUP. Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular phylogenetics and evolution**, 67(2), p. 404-413.,2013.

- KLEINHENZ, V.; MIDMORE, D. J. Aspects of bamboo agronomy. **Advances in Agronomy**, 74, 99–145. 2001
- KOSHY, K. C.; GOPAKUMAR, B. An improvised vegetative propagation technique for self-incompatible bamboos. *Current Science*, 89(9), 1474–1476, 2005
- LIESE, W.; WELLING, J.; TAN., T.K.H. Utilization of Bamboo. 2015. *In: LIESE, W.; KÖHL, M. (Eds.). Bamboo: the plant and its uses.* Springer. 2015.
- LOBOVIKOV, M.; BALL, L.; GUARDIA, M.; RUSSO, L.. World bamboo resources: a thematic study prepared in the framework of the global forest resources assessment No. 18. **Food & Agriculture Org.** 2005.
- LOBOVIKOV, M., PAUDEL, S., PIAZZA, M., REN, H., WU, J.. *World bamboo resources: a thematic study prepared in the framework of the Global Forest Resources Assessment.* FAO, Rome. 2007
- LONDOÑO, X.. Evaluation of bamboo resources in Latin America. **A Summary of the Final Report of Project**, n. 96-8300, p. 01-4, 1998.
- LONDOÑO, X.. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del nuevo mundo. **INCIVA**, Cali, Colombia. 2002.
- LONDOÑO, X.; PETERSON, P. *Guadua chacoensis (Poaceae: Bambusoideae)*, its taxonomic identity, morphology and relationships. **Novon** 2:41–47. 1992
- LONDOÑO, X.; ZURITA, E. Two new species of *Guadua* (Bambusoideae: Guaduinae) from Colombia and Bolivia. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, p.25-34. 2008.
- MISHRA, Y.; PATEL, P.; ANSARI, S. Acclimatization and Macroproliferation of Micropropagated Plants of *Bambusa tulda* Roxb . **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, 2(3), p. 498–501. 2011.

MUDOI, K.D.; BORTHAKUR, M. *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field-grown culms and scope for upscaling. *Curr Sci* 96: p. 962-966, 2009.

MUDOI, K. M.; SIDDHARTHA, P. S.; ADRITA, G.; ANIMESH, G.; DEBASHISHA, B.; MINA, B., Micropropagation of important bamboos: a review, **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 2770–2785, 2013.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A., & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403 n. 6772, p. 853-858, 2000.

OHRNBERGER, D. **The bamboos of the world**: Annotated nomenclature and literature review of the species and the higher and lower taxa. 1999.

OPRINS, J.; GRUNEWALD, W.; GILLIS, K.; DELAERE, P.; PEETERS, H.; GIELIS, J. Micropropagation: a general method for commercial bamboo production. *In: Proceedings of the 7th World Bamboo Congress*. 2004.

ORNELLAS, T.S; WERNER, D.; HOLDERBAUM, D.F.; SCHERER, R.F.; GUERRA, M.P. Effects of Vitrofuril, BAP and meta-Topolin in the *in vitro* culture of *Dendrocalamus asper*. **Acta Horticulturae**, n.1155, p. 285-292. 2017

PANDE, S. K.; PANDEY, S. Bamboo for the 21st century. **International Forestry Review**, v. 10, n. 2, p. 134-146, 2008.

PREECE, J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. *In: George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G. J. Plant propagation by tissue culture* p.403-422. Springer Netherlands. 2008.

PNF. I Reunião de Avaliação e Perspectivas do Uso Sustentável do Bambu no Brasil. Ministério do Meio Ambiente – Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Brasília. Programa Nacional de Florestas – Relatório PNF-01/2005. 12p. 2005.

RAMANAYAKE, S.M.S.D; MEEDMADUMNA, V.N.; WEERAWARDENE, T.E. In vitro shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* ‘Striata’). **Scientia Horticulturae** n. 13, p. 109–113, 2006.

RAO, A. N.; RAO, V. R.; WILLIAMS, J. T. **Priority species of bamboo and rattan.** 1998.

SHIRASUNA, R.T. Guadua in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13247>> BFG.

Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.

Rodriguésia, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015.

SINGH, S.R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F. Backer ex K Heyne): an exotic edible bamboo. **J Plant Biochem Biotechnol** v. 21 n. 2, p. 220–228, 2012.

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

SINHA, R. K.; DEBBARMA, S.; SINHA, S. Cyclic macro-proliferation of bambusa cacharensis through seedlings - a socio-economically important bamboo species of north-east india, **International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences**, v. 2 n.3, p. 14–17, 2012.

VISWANATH, GEETA JOSHI, P.V. SOMASEKHAR, M.R.JAGADISH, S. C. J. *Guadua angustifolia* Kunth : Potential bamboo species for humid tropics of peninsular india, **IWST Technical Bulletin n. 9**, 2012 a.

VISWANATH, S., JOSHI, G., SOMASHEKAR, P. V, RANE, A. D., SOWMYA, C., & JOSHI, S. C. *Dendrocalamus stocksii* (Munro.): A potential multipurpose bamboo species for Peninsular India, **IWST Technical Bulletin n. 10**, 2012 b.

XAVIER, A. E SILVA, R.L. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no brasil. **Agronomia Costarricense**, 34(1): 93-98, 2010

YOUNG, S. M., & JUDD, W. S. Systematics of the *Guadua angustifolia* complex (*Poaceae: Bambusoideae*). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 737-769. 1992.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. *In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds) Micropropagation—Technology and Application* . Kluwer Academic Publ., Dordrecht. P. 45–69, 1991

ZIV, M. In vitro acclimatization. *In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; LILA, M. SMITH (eds) Automation and environmental control in plant tissue organ culture*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 493-516, 1995

ZIV, M.; CHEN, J. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. *In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.D.. (Ed). Plant propagation by tissue culture*. 3.ed. Dordrecht: Springer, V.1, p.465-478, 2008

2. ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO POR ORGANOGÊNESE DIRETA DE *Guadua chacoensis* (ROJAS) LONDOÑO & P. M. PETERSON

2.1. INTRODUÇÃO

Guadua chacoensis, espécie de bambu neotropical liguinificado vulgarmente conhecido como “Taquara”, “Taquara brava”, “Taquaraçú” ou “Taquaruçú”. Encontra-se naturalmente distribuído no norte da Argentina, sudeste da Bolívia, sul do Paraguai e Brasil (JUDZIEWICZ et al., 1999). Neste, ocorre nos biomas Mata Atlântica e Pantanal, geralmente associada a matas ciliares ou florestas de várzeas, com relatos nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SHIRASUNA, 2015). Assemelha-se a *G. angustifolia*, espécie nativa do noroeste da América do Sul e Panamá com colmos de 10-20 m de altura com 10-13 cm diâmetro, geralmente eretos com entrenós ocos, apresentando pubescência branca junto aos nós e ramos espinescentes (LONDOÑO; PETERSON, 1992). Devido seu grande porte, qualidades físicas e mecânicas, a espécie possui importante potencial social e econômico. Sendo muitos dos usos e tecnologias desenvolvidas para *G. angustifolia* possivelmente transferíveis e adaptáveis para *G. chacoensis*, embora atualmente sejam relatados apenas usos deste para construção de habitações rústicas e artesanato (BENTON, 2015). Entretanto, as novas tecnologias de beneficiamento e utilização de bambus lignificados como matéria prima (LIESE; WELLING; TAN, 2015) podem aumentar as possibilidades de usos dos bambus nativos.

Apesar de o Brasil apresentar a maior diversidade de bambus do novo mundo (JUDZIEWICZ et al., 1999), a cadeia produtiva no país começou a formar-se recentemente e ainda é considerada dispersa e informal (MANHÃES, 2008). O conhecimento sobre as espécies de bambus nativos ainda tem muito a avançar, e a insipiência fragiliza a biodiversidade devido à erosão genética causada por ações antrópicas e avanço das fronteiras agrícolas. Além disto, se não planejada visando sustentabilidade, a iminente cadeia produtiva do bambu no país também pode ser uma ameaça aos estoques naturais devido à baixa disponibilidade de matéria prima plantada e a falta de conhecimento sobre dinâmica populacional das espécies (FILGUEIRAS;

GONÇALVES, 2006). Por isso, é dever da ciência, governo e setor privado agregarem valor aos bambus americanos por meio do conhecimento, e garantir a conservação *in situ* e a manutenção de germoplasmas em condições *ex situ* para fins de melhoramento vegetal e promoção do uso (CDB, 1992; LONDOÑO, 2010).

Neste contexto, métodos propagativos eficientes são imprescindíveis para o reflorestamento de áreas degradadas, matas ciliares e disponibilidade de material para a indústria em desenvolvimento. Além disso, Magalhães e Almeida (2011) apresentam que a Rede Brasileira do Bambu (RBB) coloca como prioridade a produção de mudas em larga escala para plantios comerciais. Os métodos convencionais de propagação são por meio de sementes, divisão de touceiras, segmentos de rizomas e colmos. Porém, a disponibilidade de sementes em bambus lignificados americanos é irregular devido aos longos ciclos vegetativos e florescimentos em intervalos médios de 30 anos (GUERREIRO, 2014).

Em muitos casos, os métodos assexuados de macropropagação apresentam baixa eficiência e altos custos, além de problemas relacionados à logística de transporte dos propágulos devido suas dimensões (GIELIS et al., 2001). Diante deste cenário, ferramentas biotecnológicas são imprescindíveis para o melhoramento genético e propagação massal de bambus (LONDOÑO, 2013). Técnicas de cultura de tecidos viabilizam a produção em larga escala de mudas com qualidade fisiológica e fitossanitária a partir de genótipos superiores selecionados. Além disto, facilitam a conservação *ex situ* de grande variabilidade genética em pouco espaço por médio e longo prazo (ENGELMANN, 2011).

Existem diversos relatos de pesquisas com cultura de tecidos de bambus, sendo a maioria deles realizados com espécies asiáticas (SINGH et al., 2013; MUDOI et al., 2013). Poucos trabalhos relatam a propagação de espécies americanas por meio de cultura de tecidos (MARULANDA et al., 2005; JIMENEZ et al., 2006; JIMENEZ e GUEVARRA, 2007; GUTIERREZ; LÓPEZ-FRANCO; MORALES-PINZÓN, 2016). *Guadua angustifolia* possui o maior número de estudos realizados devido ao seu conhecimento mundial como uma das 20 espécies prioritárias de bambus, sendo a única americana da lista (RAO et al., 1998).

Consenso na literatura sobre cultura de tecidos de bambus, a dificuldade de introdução de material vegetal em condições *in vitro* é devido à associação de microrganismos de forma epifítica e endofítica

com espécies de bambus, muitas vezes com manifestações tardias já no processo de multiplicação (JIMENEZ; GUEVARA, 2007; BANERJEE; GANTAIT; PRAMANIK, 2011). O manejo das plantas doadoras de explantes e o uso de biocidas no meio de cultura podem colaborar para o aumento da eficiência neste estágio do processo (JIMENEZ et al., 2006). O PPM[®] é um composto biocida de amplo espectro utilizado para cultura de tecidos vegetais que pode ser usado tanto na desinfestação como adicionado ao meio de cultura (Plant Cell Technology, EUA).

Outro gargalo da micropropagação é a fase de aclimatização para condições *ex vitro*, principalmente devido à baixa eficiência fotossintética das plantas e necessidade de mudanças no controle hídrico. Baseado nisto, uma nova geração de frascos com filtros do tipo HEPA (*High Efficiency Particulate Arrestance*) permitem a manutenção da atmosfera interna do recipiente de forma protegida, reduzindo os níveis de etileno e garantindo níveis adequados de O₂ e CO₂ ao longo do cultivo *in vitro*. O uso destes pode colaborar para mudanças no aparato fotossintético *in vitro*, podendo favorecer a aclimatização e aumentando as taxas de sobrevivências (HAZARIKA, 2006).

O rendimento fotoquímico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) pode ser avaliado como indicador dos níveis de estresse das plantas em função de variações ambientais (MAXWELL; JONHSON, 2000). Além disso, análises de fluorescência da clorofila *a* podem elucidar parâmetros na identificação e seleção de genótipos com alta eficiência fotoquímica (KUMAR; PAL; TEOTIA, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação de *Guadua chacoensis* visando à propagação em larga escala de mudas desta espécie como requisito para a consolidação de uma cadeia produtiva de bambus no Brasil.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) no departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro de Ciências Agrárias (CCA).

Material vegetal: A partir de plantas gentilmente cedida pela Associação Catarinense de Bambus (BambuSC) e oriundas de sementes obtidas de floração gregária de *Guadua chacoensis* ocorrida em 2008, foram produzidas novas plantas multiplicadas por meio de divisão de

touceiras e *riendas*. Estas formaram as plantas matrizes que foram manejadas em diferentes condições de cultivo.

Plantas matrizes: As plantas matrizes utilizadas como doadoras de explantes para o experimento de introdução *in vitro* foram cultivadas em vasos sob condições de campo e ambiente protegido (sala de crescimento)(Figura 2).

Figura 2. Plantas matrizes de *Guadua chacoensis*. (A) Cultivadas a campo; (B) Cultivadas em substrato comercial sob condições controladas de sala de crescimento; (C) Cultivadas em sistema hidropônico sob condições controladas de sala de crescimento.



Fonte: Acervo pessoal.

As plantas matrizes cultivadas a campo ficaram expostas às condições climáticas locais, apenas sendo controlada a sua nutrição mineral por meio de fertirrigação quinzenal com solução hidropônica e irrigações (Tabela 1) em períodos de baixa pluviosidade. As demais plantas matrizes foram cultivadas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (16h) e irrigação. Sob cultivo protegido, foram cultivadas matrizes de duas formas, em substrato comercial (Tropstrato Florestal – VidaVerde) e em sistema hidropônico de recirculação por gotejamento em substrato inerte, argila expandida. No primeiro, foram realizadas irrigações semanais e fertirrigações quinzenais com solução hidropônica apenas sobre o substrato, enquanto no segundo a solução foi trocada mensalmente e lavagens foram feitas no substrato a cada troca de solução, visando à

remoção de excesso salino acumulado. Tratamentos fitossanitários foram realizados nas matrizes apenas quando observados sinais de moléstias ou ataque de pragas.

Tabela 1. Composição salina da solução hidropônica utilizada para o cultivo e manutenção de matrizes e mudas por fertirrigação.

ânion/cátion	mg.L⁻¹	ânion/cátion	mg.L⁻¹
N-NO3	189,5	B	0,41
N-NH4	17,71	Cu	0,41
P2O5	119,28	Fe	17,60
K2O	169,69	Mn	0,41
CaO	209,00	Zn	0,16
MgO	40,50	Mo	0,09
SO4	52,50		

Introdução in vitro: Para a introdução *in vitro* foram selecionados segmentos nodais de 10-15 mm com a gema protegida pela bainha. Realizou-se uma pré-desinfestação com detergente comercial doméstico e escovação sob água corrente. Em seguida foram removidas as bainhas e os segmentos nodais foram submetidos à agitação por 20 minutos em solução de Agrimicina (2 g/l) e Mancozeb (3g/l) acrescida de Tween[®] 20 (1 gota/100 ml). Posteriormente os explantes foram imersos em álcool 70° GL por 60 segundos e então imersos em hipoclorito de sódio (4,0 % de cloro ativo) e Tween[®] 20 (1 gota/100 ml) durante 20 minutos sob agitação constante. Em câmara de fluxo laminar foi realizada tríplice lavagem com água deionizada e estéril. Previamente à inoculação em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura, os explantes foram reduzidos para em torno de 5 mm, retirando-se parte de ambas as extremidades danificadas pelo processo de desinfestação. Os segmentos nodais inoculados foram mantidos no escuro por sete dias a fim de reduzir oxidação dos explantes. A manifestação de fungos e bactérias no meio de cultura foi avaliada visualmente e contabilizada ao longo dos 30 dias iniciais das culturas.

O delineamento utilizado foi totalmente casualizado com 20 repetições por tratamento sendo cada segmento nodal em tubo de ensaio uma unidade amostral.

Meios de cultura: Para todos os experimentos foi utilizado o meio de cultura basal de composição salina proposta por Murashige e Skoog (1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e suplementado com vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951). Utilizou-se Phytigel[®] (2g/l)

como agente geleificante. O pH do meio de cultura foi sempre aferido para 5,8 antes da esterilização em autoclave (121° C e 1,1 atm) por 15-20 minutos.

No experimento de introdução *in vitro* utilizou-se a citocinina BAP na concentração de 15 µM para todos os tratamentos. Os fatores testados foram as plantas matrizes fornecedoras de explantes e a presença do composto PPM[®] (2 ml/l) no meio de cultura. A mesma dose de citocinina foi usada para os testes de estabelecimento de novas plantas a partir de segmentos nodais de culturas *in vitro*, enquanto nos testes de multiplicação por divisão de touceira, foram testadas três concentrações (5, 15, 25 µM) de BAP e a ausência desta como testemunha. Após multiplicação, as culturas foram subcultivadas em meio de cultura isentos de fitorreguladores para promover o desenvolvimento de raízes e alongamento de colmos e expansão foliar.

Multiplicação por segmentos nodais: Utilizando segmentos nodais de microplantas para a obtenção de escala na multiplicação *in vitro*, testou-se a posição do segmento nodal no colmo para o estabelecimento de novas touceiras. Consideraram-se as duas gemas mais próximas ao rizoma como basais e as duas seguintes em direção ao ápice como intermediárias. Outro fator testado neste experimento foi o uso de frascos hermeticamente fechados (vedados) ou frascos com filtro que permite trocas gasosas por ventilação natural. Neste experimento o filtro utilizado permite um número de trocas gasosas (NTG) de 0,4 .h⁻¹ (Combiness Microbox[®] - Filtro branco). Utilizou-se a citocinina BAP na concentração de 15 µM para todos os tratamentos. O experimento foi realizado em delineamento totalmente casualizado com oito repetições por tratamento, sendo cada unidade um frasco com sete segmentos nodais inoculados.

Multiplicação por divisão de touceiras: A fim de determinar concentração adequada de citocinina para a multiplicação de touceiras com rizoma *in vitro*, analisou-se regressão de quatro doses (0, 5, 15 e 25 µM) de BAP em frascos do tipo Microbox[®] com filtro de capacidade de NTG de 3,4. h⁻¹. Para esse experimento utilizaram-se touceiras de 3-4 colmos, propagadas por divisão de touceiras e contendo rizomas desenvolvidos. Previamente a inoculação nos tratamentos as vitroplantas foram cultivadas por 30 dias em meio de cultura sem fitorreguladores, visando redução de efeitos residuais de fitorreguladores do processo de multiplicação prévio para obtenção de suficiência amostral. Utilizou-se 200 ml de meio de cultura e quatro plantas foram inoculadas por frasco. Avaliou-se o índice de multiplicação de cada

planta pela razão do número de colmos da touceira inoculada e o número de colmos obtidos após 30 dias de cultivo. Avaliou-se ainda a altura do maior colmo de cada touceira e o comprimento e número de raízes desenvolvidas. O delineamento utilizado foi totalmente casualizado com quatro repetições, sendo cada uma delas um frasco com quatro touceiras inoculadas.

Macroproliferação in vitro: Touceiras obtidas na fase de multiplicação e com rizoma desenvolvido tiveram três colmos seccionados acima do primeiro nó basal e o restante dos colmos foram seccionados na base do colmo. Estas foram cultivadas em frascos Microbox[®] de 800 ml de volume total, com 100 ml de meio de cultura semisólido. Durante o processo avaliou-se o desenvolvimento de novos colmos e folhas, em função de dois tipos de filtros de HEPA, com capacidade de número NTG de 0,4 e 3,4 h⁻¹. O número de novos colmos e folhas foi observado aos 12, 28, 42 e 58 dias.

Aclimatização: As touceiras obtidas foram divididas em novas touceiras com 3-5 colmos de acordo com a estrutura dos rizomas. Estas tiveram suas raízes lavadas em água destilada e seccionadas quando maiores que 15 cm. As novas touceiras formadas foram mantidas em tubos de ensaio contendo água destilada e aclimatadas ao escuro por 60 minutos. Em seguida mediu-se o valor da fluorescência basal (F_0) e fluorescência máxima aclimatada ao escuro (F_m) na primeira folha apical totalmente expandida do maior colmo. Esta folha foi marcada e teve os parâmetros F_0 e F_m acompanhados durante a aclimatização. As medidas da fluorescência foram realizadas a partir das 22h com o fluorímetro Mini-PAM (Walz), considerando um tempo mínimo de 60 minutos de aclimação das plantas ao escuro. O valor do rendimento fotoquímico potencial máximo (F_v/F_m) foi obtido segundo a equação, $F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$ (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989). As plantas foram transplantadas para tubetes de 290 cm³ com substrato comercial e vermiculita (1:1) e acondicionadas sob cúpulas plásticas a fim de manter alta umidade relativa. Testaram-se três níveis de irradiância sobre as plantas durante o processo de aclimatização, sendo uma das cúpulas coberta com sombrite 65%, outra com 35% e a terceira não foi coberta, permitindo irradiância máxima. Durante os sete primeiros dias foi obtido o rendimento fotoquímico potencial máximo nas folhas previamente marcadas e depois aos 12, 17, 30 dias em folhas desenvolvidas na condição *ex vitro*. As plantas foram irrigadas diariamente por aspersão durante os sete primeiros dias e depois a cada dois dias. Foi iniciada fertirrigação semanal a partir do 20º dia de

cultivo. A taxa de sobrevivência foi determinada aos 30 dias, considerando touceiras com folhas saudias e desenvolvimento de novos colmos.

Densidade estomática: Para a contagem de estômatos e mensuração da distância entre nervuras das folhas, realizaram-se impressões em cianoacrilato da parte mediana das folhas excluindo-se a nervura central. Imagens das impressões da superfície das folhas foram capturadas em microscópio óptico (Olympus IX80), com magnificação de 200 vezes. Com auxílio do software “CellSens” (Olympus) foram obtidos valores médios do número de estômatos por mm² e da distância entre nervuras de um campo por folha.

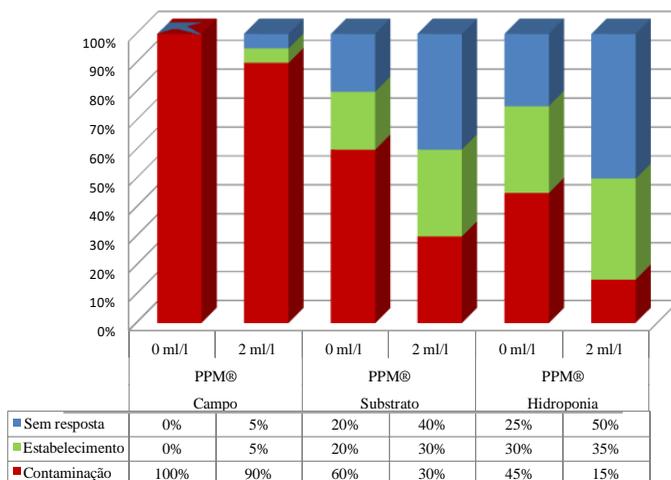
Análises estatísticas: Dados binários (brotação, contaminações) foram avaliados por tabela de contingência e pelo teste *Chi* quadrado de Pearson com correção de Yates quando necessário. Teste exato de Fisher foi utilizado para as análises de sobrevivência. Análises de regressão utilizaram modelos lineares e modelos lineares generalizados. Para todos os modelos selecionados aplicou-se o critério de informação de Akaike (AKAIKE, 1974). Efeitos e coeficientes foram considerados significantes quando $p < 0,05$ e médias foram separadas ao nível de 95% de significância. Todas as análises foram realizadas na plataforma R (R CORE TEAM, 2014) e os pacotes utilizados foram "car" (FOX e WEISBERG, 2011), "gdata" (WARNS, 2012), "ggplot2" (WICKHAM, 2009), "agricolae" (MENDIBURU, 2015), "gmodels" (WARNES et al., 2015) e "MASS" (VENABLES; RIPLEY, 2002).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Introdução in vitro: O procedimento de introdução *in vitro* resultou de maneira geral em 22% de culturas estabelecidas (*i.e.* explantes brotados e sem manifestação de microrganismos) no trigésimo dia após a inoculação. Entretanto, se considerarmos a questão do manejo das plantas matrizes, as diferenças foram significativas e os tratamentos de explantes obtidos a de plantas à campo, em substrato em sala de crescimento e sistema hidropônico em sala de crescimento, resultaram em respectivamente 2,5 %, 25 % e 32,5 % de estabelecimentos de culturas axênicas (Figura 3). Ou seja, estabeleceram-se 29% dos explantes obtidos de matrizes em cultivo protegido e apenas 5% dos obtidos de matrizes em condição de campo. Correa et al. (2014) relataram uma taxa de 15 % de estabelecimento no melhor tratamento obtido para desinfestação de segmentos nodais de *G. angustifolia*

utilizando hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo) por 15 minutos. Considerando-se apenas os tratamentos de plantas matrizes sobre cultivo protegido, e excluindo-se o fator PPM no meio de cultura, obtivemos 30% de estabelecimento de explantes obtidos de matrizes hidropônicas e 20% de matrizes em substrato.

Figura 3. Taxa de explantes estabelecidos, contaminados e que não brotaram e não contaminaram (sem resposta) aos 30 dias após a introdução *in vitro* de *Guadua chacoensis*, em função do manejo das matrizes e uso de *Plant Preservative Mixture* (PPM®) no meio de cultura.

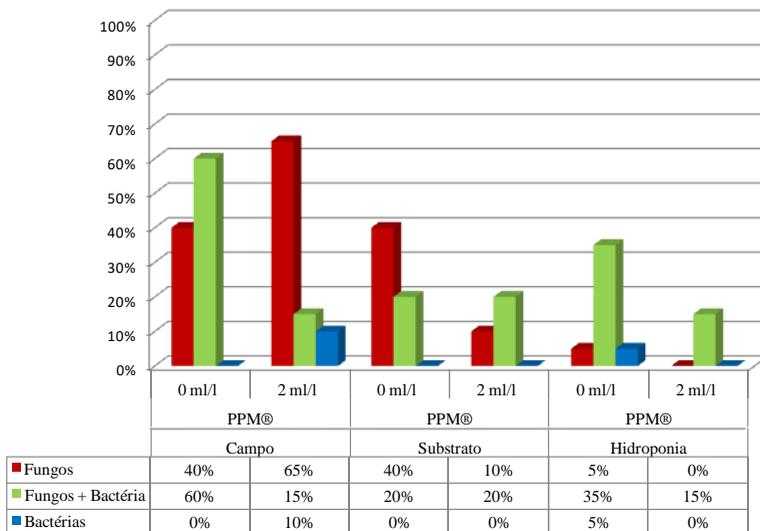


Os resultados mostraram que as taxas de estabelecimentos estão mais associadas ao manejo das plantas matrizes que ao uso do *Plant Preservative Mixture* no meio de cultura, ocorrendo maiores taxas de brotação e menores de contaminação em explantes originados do cultivo protegido. Não se observou influência do uso de PPM® no meio de cultura quanto às taxas de explantes sem resposta (não contaminados e não brotados) e acredita-se que a ocorrência destes seja em função da alta agressividade do processo de desinfestação, devido à alta concentração de cloro ativo na solução de hipoclorito de sódio. A maior ocorrência de unidades sem resposta foi no tratamento com explantes obtidos de matrizes hidropônicas, que eram de menores dimensões e mais tenros que o dos outros dois tratamentos de matrizes.

A exposição das matrizes as intempéries como chuvas e ventos, interação com animais e variações ambientais (fotoperíodo, temperatura, amplitude térmica), e a organismos epifíticos e endofíticos resulta em plantas com menor qualidade fisiológica e fitossanitária (CARVALHO; SILVA, 2012). Portanto, analisando-se apenas plantas doadoras de explantes sob cultivo protegido, detectou-se diferença significativa do uso do PPM[®] quanto à manifestação de microrganismos durante a introdução *in vitro*, provavelmente devido às menores cargas microbianas associadas ao ambiente de cultivo. Jimenez et al. (2006), em incrementos sucessivos de procedimentos com relação às plantas matrizes e desinfestação de explantes de *G. angustifolia*, obtiveram as menores taxa de contaminação (11%) em segmentos nodais cultivados em casa de vegetação e uso de 2 ml/l de PPM no meio de cultura, o que corrobora com a menor taxa de contaminação (15%) obtida em plantas cultivadas sob sistema hidropônico em sala de crescimento e o uso de 2 ml/l de PPM[®] no meio de cultura.

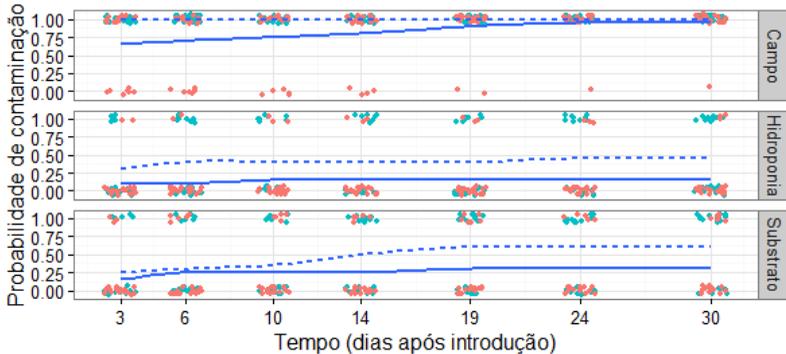
Correa et al. (2014) observaram 32% de segmentos nodais contaminados por bactérias, utilizando-se matrizes cultivadas em casa de vegetação. Se comparado ao tratamento de matrizes em sala de crescimento e ausência de PPM[®] no meio de cultura, obtivemos uma menor ocorrência de manifestação bacteriana, provavelmente devido ao uso de maior concentração de cloro ativo na solução de hipoclorito de sódio e exposição a este por maior período.

Figura 4. Taxas de contaminações por somente fungos, somente bactérias ou ambos na mesma unidade amostral, observadas aos 30 dias após a introdução *in vitro* de *Guadua chacoensis*, em função do manejo da planta matriz e da presença ou ausência de *Plant Preservative Mixture* (PPM®) no meio de cultura.



Observou-se alta ocorrência de manifestação fúngica, principalmente nos explantes obtidos em condição de campo. Jimenez et al. (2006) relataram que o tratamento rotineiro das plantas matrizes com fungicida e bactericida colabora com a redução dos microrganismos no estágio I da micropropagação. Correa et al. (2014) com a mesma prática relatam a não ocorrência de fungos durante a introdução *in vitro* de *G. angustifolia*.

Figura 5. Ocorrência de microrganismos no meio de cultura ao longo dos 30 dias após a introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Guadua chacoensis* em função das plantas matrizes e do uso de *Plant Preservative Mixture* (PPM[®]) - 0 ml/l (linha tracejada e pontos vermelhos) e 2 ml/l (linha contínua e pontos azuis).



A Figura 5 apresenta a evolução da ocorrência de manifestação de microrganismos ao longo dos 30 dias de avaliação. Observa-se que no tratamento de explantes obtidos a campo, em ausência de PPM[®] 100% das unidades já havia contaminado nos primeiros dias de avaliação, inviabilizando a brotação dos segmentos nodais. Com o uso de PPM[®] ocorreu um atraso no desenvolvimento de microrganismos, que no caso do tratamento a campo foi relativo a bactérias (dados não apresentados). Orlikowska et al. (2012) avaliando o efeito de doses de PPM[®] (10x e 20x maiores que a utilizada no presente trabalho) sobre o crescimento de bactérias observaram que a inibição do crescimento variou em função da espécie e tempo, sendo que o efeito inibitório do produto variou de 3 a 21 dias nas condições estudadas.

Multiplicação por segmentos nodais: Segmentos nodais obtidos da porção basal (Figura 6 - A) dos colmos tiveram maior frequência de estabelecimento comparativamente a segmentos da parte intermediária dos colmos. Observou-se uma média de 64,28% dos segmentos basais estabelecidos enquanto apenas 32,65% de segmentos intermediários formaram novas touceiras (Tabela 2).

Acredita-se que os principais fatores para esses resultados sejam a diferenciação avançada da gema, maior quantidade de reservas na região basal dos colmos e ao gradiente de balanço hormonal ao longo do colmo. Estudos que avaliaram a posição da gema no ramo lateral durante a introdução *in vitro*, mostraram maiores taxas de brotações de

gemas basais e intermediárias dos ramos laterais relativamente às gemas apicais (Marulanda et al. 2002; 2005).

Tabela 2. Taxas de estabelecimentos de segmentos nodais de plantas *in vitro* de *Guadua chacoensis* em função da posição da gema no colmo e do uso de frascos com ventilação natural ou vedados.

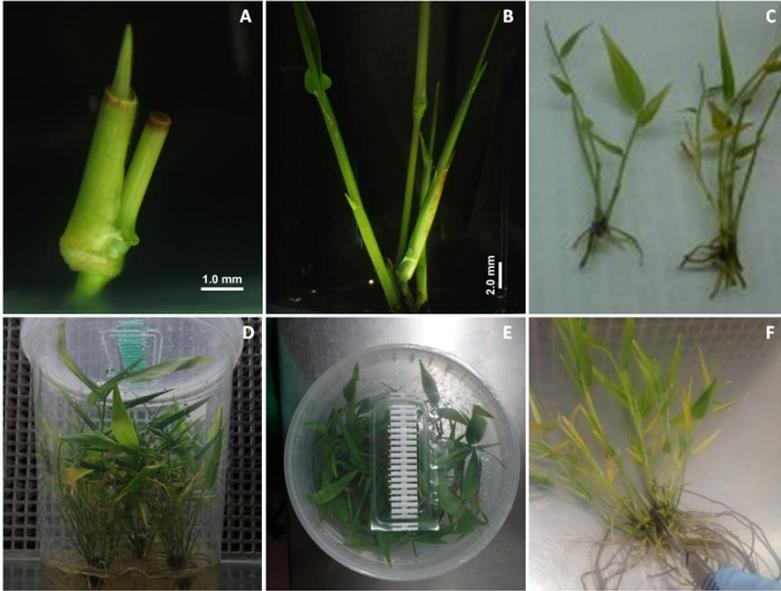
Posição do segmento nodal no colmo*	Atmosfera dos frascos ^{ns}	
	Ventilação Natural	Vedados
Basal	57,14±9,4	67,35±8,1
Intermediária	26,79±8,3	40,48±4,4

Valores (Média ± Erro Padrão). ‘*’ diferença significativa e ‘ns’ diferença não significativa pelo teste F ($p < 0,05$).

Após 90 dias de cultivo foram obtidas touceiras de, em média, 3 colmos e rizoma formado (Figura 6 – B). Jimenez et al. (2006) relataram baixas taxas de multiplicação utilizando este método e oxidação dos segmentos nodais simples aos 70 dias de cultivo.

Embora demande maior tempo para obtenção de altas taxas de multiplicação, o método de formação de novas plantas a partir de segmentos nodais de plantas *in vitro* (Figura 6 – A), permite o aumento da escala de forma homogênea a partir de poucas plantas, até a formação de touceiras com rizomas, que poderão ser multiplicadas por divisão de touceiras (Figura 6-C) aumentando o rendimento dos cultivos *in vitro*.

Figura 6. Micropropagação de *Guadua chacoensis*. (A) Segmento nodal brotado oriundo de plantas *in vitro*; (B) Touceira obtida por segmento nodal após 90 dias de cultivo; (C) Divisão de touceira com rizoma formado; (D) Multiplicação de touceiras em frasco do tipo Microbox® com filtro de número de trocas gasosas (NTG) de 3,4. h⁻¹; (E) Processo de pré aclimatização em frasco do tipo Microbox® com filtro de NTG = 0,4. h⁻¹; (F) Macroproliferação prévia à aclimatização.

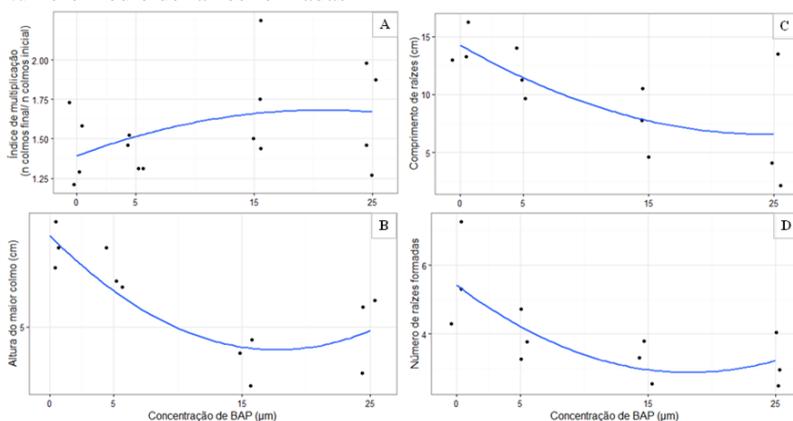


Fonte: Acervo pessoal.

Multiplicação por divisão de touceiras: Avaliando-se o efeito das doses de BAP, observou-se relação entre o índice de multiplicação e a dose desta citocinina até a maior concentração avaliada. Além disso, o aumento nas concentrações reduziu significativamente a altura do maior colmo da touceira, o número e o comprimento das raízes formadas durante os 30 dias de cultivo. Os resultados corroboram com os obtidos por Jimenez et al. (2006), porém o incremento de BAP nas culturas de *G. angustifolia* foi mais efetivo quanto às taxas multiplicativas. Isso implica em uma correlação positiva menos acentuada em *G. chacoensis*, o que demonstra menor resposta das culturas ao aumento das doses de BAP, comparativamente ao obtido para *G. angustifolia*. Acredita-se que esse efeito possa ter sido causado por possível efeito residual desta citocinina durante o processo prévio de multiplicação para obtenção de suficiência amostral. Desta forma, touceiras cultivadas em meio controle

(sem fitorregulador) continuaram apresentando altos índices de multiplicação comparativamente aos apresentados por Jimenez et al. (2006). Além disso, o tempo de avaliação de 30 dias pode não ter sido suficiente para a identificação do efeito das doses de BAP, resultando em alta homogeneidade do índice de multiplicação em resposta ao incremento deste fitorregulador. Porém no período de quatro semanas, Gutierrez et al. (2016) relataram índices de multiplicação de 2,7 e 3,0 novos brotos por touceira com rizoma sob cultivo em meio semi-sólido e em biorreatores de imersão temporária, respectivamente.

Figura 7. Análise de regressão do efeito de doses de BAP sobre a multiplicação de touceiras *in vitro* de *Guadua chacoensis*. (A) índice de multiplicação; (B) Altura média do maior colmo; (C) Comprimento médio de raízes formadas; (D) Número médio de raízes formadas

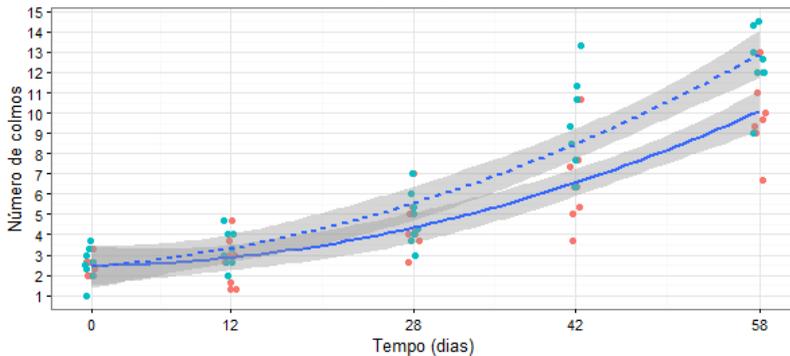


O incremento de BAP no meio de cultura teve correlações negativas com o crescimento em altura dos colmos e o desenvolvimento de novas raízes, tanto em quantidade quanto em comprimento de raízes por planta (Figura 7 – B, C e D).

Marulanda et al. (2005) relataram incremento da altura dos colmos com a retirada de BAP do meio de cultura. Os mesmos autores relatam uso da auxina AIA (1 mg/l) e obtenção de 90% de enraizamento das culturas de *G. angustifolia*, mas no presente estudo 100% das plantas formaram raízes sem a necessidade de suplementação com auxina, ocorrendo enraizamento até na maior dose testada de BAP. A cada subcultivo as raízes foram seccionadas e rapidamente novas raízes se formavam, corroborando com as observações relatadas por Jimenez et al. (2006).

Pré aclimatização: O crescimento de touceiras quanto ao desenvolvimento de novos colmos originados do rizoma foi semelhante entre os dois tratamentos até o 28º dia, ocorrendo alongamento, desenvolvimento do sistema radicular, e aumento da área foliar. Porém, a partir do 42º dia de cultivo contabilizou-se um número significativamente maior de colmos nas touceiras cultivadas sob filtro de 3,4 NTG. h^{-1} , atingindo aos 58 dias uma média de 12,5 colmos por touceira, enquanto com o menor NTG o valor médio foi de 10 colmos por touceira. Especula-se que a maior taxa de troca gasosa e a redução ou esgotamento da sacarose do meio de cultura possa ter estimulado maior assimilação de carbono inorgânico, porém novos estudos devem ser realizados para elucidações. Além da disponibilidade de CO_2 , o maior NTG também favorece a redução do etileno e da umidade relativa da atmosfera do frasco (ZOBAYED, 2005). Sob alta umidade relativa, pequenas alterações deste parâmetro estimulam mudanças significativas nas taxas de transpiração da cultura, e conseqüentemente absorção de água e nutrientes (KOZAI; SMITH, 1995).

Figura 8. Incremento do número de colmos de *Guadua chacoensis* ao longo do tempo sob diferentes condições *in vitro* com ventilação natural por filtros com diferentes números de trocas gasosas (NTG). Linha contínua e pontos vermelhos: NTG=0,4. h^{-1} ; Linha tracejada e pontos azuis: NTG=3,4. h^{-1} .



Densidade estomática: Analisando impressões das faces abaxiais e adaxiais das lâminas foliares observou-se que não houve diferenças significativas quanto à densidade estomática de folhas desenvolvidas nos frascos com diferentes NTG, apenas uma tendência de redução do número de estômatos em ambas as lâminas das folhas após aclimatização, provavelmente devido ao aumento da área foliar (Tabela 3). A redução da densidade de estômatos também foi relatada por Tichá

et al. (1999) em plantas de *Nicotiana tabacum* após aclimatização principalmente em função da expansão foliar. Além disto, os autores relataram mudanças no tamanho e morfologia dos estômatos de folhas desenvolvidas *ex vitro*. O funcionamento e as dimensões do complexo estomático não foram alvos do presente estudo e a metodologia de impressão em cianoacrilato para análise das dimensões estomáticas poderia resultar em distorções.

A troca de CO₂ e vapor d'água entre a folha e sua atmosfera são controlados pela densidade estomática e a abertura e fechamento dos estômatos (LAKE; WOODWARD, 2008). Zobayed et al. (1999) comparando sistemas fotoautotróficos e fotomixotrófico relataram incremento da densidade estomática e redução das dimensões dos estômatos no primeiro, justificados pela maior concentração de CO₂ e menor umidade dos frascos de cultivo. Estes fatores podem estar associados ao incremento da densidade estomática em função do incremento do NTG. h⁻¹ nas culturas *in vitro*, já que a menor dimensão do filtro de maior NTG pode resultar em maior déficit de vapor de pressão no frasco. Isto estimula à transpiração e conseqüentemente a absorção de nutrientes do meio de cultura, porém também aumenta a evaporação e desidratação deste (KOZAI; KUBOTA, 2005).

Tabela 3. Densidade estomática das faces abaxial e adaxial, distância entre nervuras em folhas de *Guadua chacoensis* cultivadas sob condições *in vitro* sob diferentes números de trocas gasosas por hora (NTG) e em condições *ex vitro* após aclimatização.

NTG . h ⁻¹	Densidade estomática (estômatos/mm ²)		Distância entre nervuras (µm)
	Abaxial	Adaxial	
0,4	184±10 a	67±7 a	180±5 b
3,4	205±10 a	66±6 a	167±2 b
Ex vitro	179±10 a	44±5 a	228±7 a

Valores (Média ± Erro Padrão) seguidos pela mesma letra na coluna não são significativamente diferente de acordo com ANOVA seguida de teste TUKEY (p<0.05; n = 8)

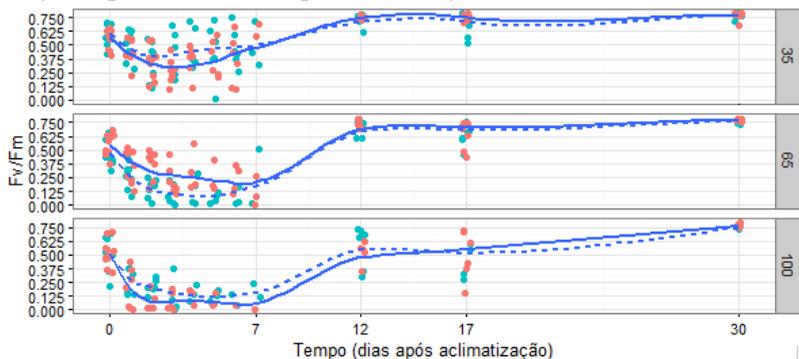
Macroproliferação in vitro: Antes do transplante *ex vitro* as touceiras foram divididas novamente em touceiras de 3-4 colmos (Figura 6 – F). O índice de multiplicação deste processo foi de 3,6 para plantas cultivadas nos frascos com NTG=3,4 .h⁻¹ e 2,6 nos frascos com NTG=0,4 .h⁻¹. Esses valores são referentes a touceiras cultivadas por 58

dias após secção drástica da parte aérea que estimulou o desenvolvimento de novos brotos a partir de reservas do rizoma.

Fv/Fm: Os valores do rendimento fotoquímico máximo (*Fv/Fm*) entre os dois tratamentos de ventilação natural não foram significativamente diferente e tiveram uma média geral de $0,536 \pm 0,015$ logo após a retirada da condição *in vitro*. O acompanhamento de *Fv/Fm* durante os sete primeiros dias de aclimatização *ex vitro* demonstrou que incremento repentino de irradiância sobre folhas advindas de cultivos *in vitro* causou fotoinibição seguida de fotoxidação das folhas avaliadas, resultando em clorose a partir dos ápices e conseqüente abscisão foliar. Nos tratamentos, 100% de irradiância e com 35% de redução da irradiância, respectivamente 100% e 90% das folhas marcadas já havia senescido no 12º dia de acompanhamento, enquanto 35% das folhas do tratamento com 65% de redução da irradiância haviam aclimatado à nova condição na mesma data. Observou-se que a senescência das folhas marcadas ocorreu de forma acelerada no tratamento de total exposição. Apenas neste tratamento as novas folhas desenvolvidas após o transplante para a condição *ex vitro* também senesceram. Resultados semelhantes foram observados por Matysiak (2004), quando folhas desenvolvidas em condições *ex vitro* na maior intensidade luminosa continuavam sofrendo fotodano, não aclimatando a nova condição. Porém, as folhas deste tratamento atingiram valores estáveis de *Fv/Fm* mais rapidamente que os expostos a baixas intensidades luminosas, diferentemente do observado para *G. chacoensis*. Segundo Harazika (2006) a persistência de folhas após aclimatização é dependente do grau de estresse do novo ambiente, e folhas persistentes tem valiosa influência fotossintética, enquanto folhas não persistente apenas servem de reserva nutricional. No tratamento de 65% de irradiância, folhas desenvolvidas após transferência para a condição *ex vitro* mantiveram-se saudáveis e com valores de *Fv/Fm* semelhantes ao tratamento de maior redução de irradiância.

Aos 30 dias do processo de aclimatização, observaram-se valores estáveis e iguais para todas as plantas sobreviventes dos três tratamentos ($0,775 \pm 0,004$), valores estes considerados aceitáveis na faixa entre 0,75 e 0,85 (BOLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989), e semelhantes a plantas jovens da mesma espécie, saudáveis e cultivadas em mesma condição (Figura 10 - C). Os valores obtidos também corroboram com os obtidos por Kumar et al. (2002) para a espécie *G. angustifolia* e Matysiak (2004) para *Rhododendron catawbiense*.

Figura 9. Acompanhamento dos valores de rendimento fotoquímico máximo do PSII (Fv/Fm) ao longo dos 30 dias de aclimatização das plantas de *Guadua chacoensis* em diferentes níveis de irradiância (35%, 65% e 100%). Linha contínua e pontos azuis: pré-aclimatização em frasco com NTG = 0,4 .h⁻¹; Linha tracejada e pontos vermelhos: pré-aclimatização em frasco com NTG = 3,4 .h⁻¹.



Sobrevivência *ex vitro* das plantas: Aos 30 dias do processo de aclimatização sobreviveram 38%, 84% e 92% das plantas nos tratamentos de irradiância plena, 65% e 35% de irradiância, respectivamente (Tabela 3). Sendo 35% de irradiância estatisticamente significativo para a maior taxa de sobrevivência e melhor eficiência no processo de aclimatização. As taxas de sobrevivência não foram diferentes para os pré-tratamentos de aclimatização *in vitro*, embora o cultivo prévio em frascos com NTG = 0,4 .h⁻¹ apresentou maior número absoluto de plantas estabelecidas *ex vitro* nos três tratamentos de irradiância. Acredita-se que a maior densidade estomática promovida pela pré aclimatização em frascos com NTG = 3,4 .h⁻¹ tenham influenciado para maiores perdas de água. Pois há uma correlação positiva entre condutância estomática e densidade de estômatos, sendo que esta densidade e o padrão de distribuição dos estômatos em ambas as lâminas das folhas pode determinar o grau de sensibilidade a mudanças na umidade relativa (EL-SHARKAWY et al., 1985). Zobayed et al. (1999) relatam a menor resposta de fechamento estomático ao escuro em cultivos fotomixotróficos. Embora incremento do número de estômatos possa colaborar na regulação hídrica, se os estômatos de folhas desenvolvidas *in vitro* apresentam problemas no fechamento, essa alta condutância pode resultar transpiração excessiva e desidratação das plantas. Além disso, o aumento do número de estômatos, e consequentemente de poros, aumentam as chances de infecções por patógenos (BAKKER, 1991).

Tabela 4. Taxa de sobrevivência de plantas de *Guadua chacoensis* aos 30 dias de aclimatização sob 35%, 65% e 100% de irradiância. Plantas pré aclimatizadas em frascos com número de trocas gasosas por hora (NTG) de 0,4 e 3,4.

Pré aclimatização (NTG.h ⁻¹)	Sobrevivência nos níveis de Irradiância (%)		
	35	65	100
0,4	100	92	50
3,4	83	77	25
Média (n)	92 (25)	85 (26)	38 (22)

Figura 10. Aclimatização de *Guadua chacoensis*. (A e B) 30 dias de aclimatização em tubetes de 290 cm³; (C) 90 dias em vaso 1000 cm³.

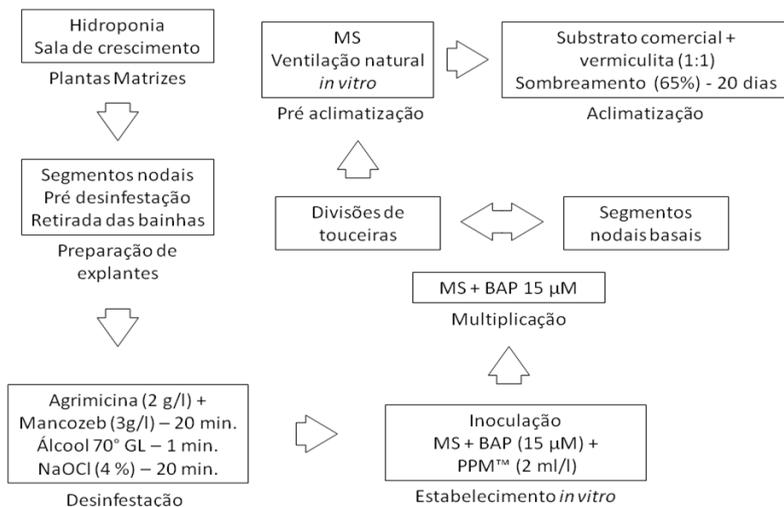


Fonte: Acervo pessoal.

Os valores obtidos por Marulanda et al. (2005) e Gutierrez et al. (2016) corroboram com as taxas de sobrevivências observadas em 35% da irradiância total. Enquanto Jimenez et al. (2006) relatam 100% de sobrevivência sob sombreamento de 50% e irrigação periódica por nebulização.

Um diagrama resumido do protocolo de micropropagação de *G. chacoensis* é apresentado na Figura 11.

Figura 11. Diagrama do processo de micropropagação do bambu *Guadua chacoensis*.



Fonte: Autor.

2.4. CONCLUSÕES

- Plantas matrizes cultivadas em ambientes com condições controladas apresentaram menor manifestação de microrganismos durante o processo de introdução *in vitro*. O uso de PPM[®] na concentração de 2 ml/l também reduziu significativamente a contaminação das culturas iniciadas.

- Para a multiplicação de culturas *in vitro* de *G. chacoensis* por meio de segmentos nodais, recomenda-se a utilização de segmentos basais de colmos bem desenvolvidos.

- O uso da citocinina Benzilaminopurina na concentração de 15 µM resulta em um índice de multiplicação de brotos de 1,73 por touceira a cada 30 dias de cultivo.

- Nas condições da presente pesquisa a taxa de sobrevivência de plantas com 3-4 colmos após macroproliferação e aclimatização foi de 92% quando transplantadas para substrato comercial e vermiculita (1:1) sob sombreamento de 65% (35% de irradiância) em casa de vegetação.

2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstra a importância da formação de plantas matrizes sob condições de cultivo controladas e o uso do biocida PPM[®] para a eficiente introdução *in vitro* de genótipos superiores de bambus. Além disto, comprovou-se a possibilidade de formação de novas plantas a partir de segmentos nodais de vitroplantas e confirmou-se a eficiência da multiplicação pelos métodos de divisão de touceiras em condições *in vitro* e macroproliferação prévia a aclimatização, aumentando o rendimento do processo de propagação massal.

O acompanhamento da eficiência fotoquímica potencial em folhas de *G. chacoensis* durante o processo de aclimatização *ex vitro* forneceu resultados preliminares sobre o comportamento das plantas e determinou-se nível de irradiância adequado para a rápida disponibilidade de mudas após o processo de micropropagação *in vitro*. Embora a metodologia deva ser aperfeiçoada e análises complementares são imprescindíveis para completa explicação do fenômeno da aclimatização pelo prisma da fluorescência da clorofila *a*.

Buscando aperfeiçoamento do proposto protocolo, deverão ser aplicadas novas melhorias nos manejos das plantas matrizes (*e.g.* tratamentos fitossanitários rotineiros) e avaliação de doses do biocida no

meio de cultura podem ser alternativas para melhorias na restrição dos microrganismos já na condição *in vitro*.

Novos estudos devem ser realizados sobre o comportamento fotomixotrófico de plantas *in vitro* cultivadas em frascos com trocas gasosas por ventilação natural ou forçada, testando-se a ausência de fonte orgânica de carbono no meio de cultura, perfil de carboidratos nas plantas e dimensões e funcionalidade dos estômatos.

Por fim, análises de fidelidade genotípica deverão ser realizadas a fim de verificar a segurança quanto à ocorrência de variações somaclonais durante o protocolo proposto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification, **IEEE Transactions on Automatic Control** 19 (6), 716–723. 1974

BAKKER, J. C. Effects of humidity on stomatal density and its relation to leaf conductance. **Scientia Horticulturae**, v. 48, n. 3-4, p. 205-212, 1991.

BANERJEE, M.; GANTAIT, S.; PRAMANIK, B.R. A two step method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their field evaluation. **Physiol. Mol. Biol. Plant.** 17:387–393, 2011.

BENTON, A. Priority Species of Bamboo. *In*: LIESE, W.; KÖHL, M. (eds.) **Bamboo: the plant and its use**. Springer International Publishing, p. 31-41. 2015.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R.; OQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E.G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. **Functional Ecology** 3:497-514. 1989

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M. M. de A. Plantas Matrizes na propagação vegetativa. Campina Grande: Embrapa Algodão, 36 p. 2012.

CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA (CDB). **Convenção sobre diversidade biológica**. Brasília: Ministério do meio Ambiente, 1992.

CORREA, L. A. R.; MORENO, J. E. G.; GONZÁLEZ, N. E. C. Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v. 5, n. 1, 2014.

EL-SHARKAWY, M.A.; COCK, J.H.; HERNANDEZ, A.D.P. Stomatal response to air humidity and its relation to stomatal density in a wide range of warm climate species. **Photosynthesis research**, v. 7, n. 2, p. 137-149, 1985.

ENGELMANN, Florent. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. S. Bambus nativos no Brasil: oportunidades e desafios para seu conhecimento. **Seminário nacional do bambu: estruturação da rede de pesquisa e desenvolvimento**, 1, 196 p. 2006.

FOX, J.; WEISBERG, S. car: Companion to Applied Regression. **R package verion 2.0-15**. 2011

GALMÉS, J.; FLEXAS, J.; SAVÉ, R.; MEDRANO, H. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. **Plant and Soil.**, 290:139–155, 2007;

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects**, 990(1), p. 87-92. 1989.

GIELIS J., PEETERS H., GILLIS K., OPRINS J., DEBERGH P.C. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulture** 552:195–203. 2001

GUERREIRO, C. Flowering cycles of woody bamboos native to southern South America. **Journal of plant research**, v. 127, n. 2, p. 307-313, 2014.

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

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

JIMENEZ V.M., CASTILLO J., TAVARES E., GUEVARA E., MONTIEL M.. In vitro propagation of the neo-tropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tissue Organ Cult** v. 86, p.389–395, 2006

JIMÉNEZ, V. M.; GUEVARA, E. Chapter 43: Micropropagation of Bamboo Species Through Axillary Shoot Proliferation. *In*: JAIN, S.M.; HAGGMAN, H. **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**, 465–476. 2007

JUDZIEWICZ, E. J.; CLARK, L. G.; LONDONO, X.; STERN, M. J. **American bamboos**. Smithsonian Institution Press. 1999.

KUMAR, R.; PAL, M.; TEOTIA, U. V. S. Diurnal changes in chlorophyll fluorescence in four species of bamboo. **Journal of Bamboo and Rattan**, v. 1, n. 4, p. 341-349, 2002.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. In vitro aerial environments and their effects on growth and development of plants. *In*: **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Springer, Dordrecht,. p. 31-52. 2005

LAKE, J.A.; WOODWARD, F.I. Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. **New Phytologist**, v. 179, n. 2, p. 397-404, 2008.

LIESE W.; WELLING, J.; TA N, T.K.H. Utilization of Bamboo. 2015. *In*: LIESE, W.; KÖHL, M. (Eds.). **Bamboo: the plant and its uses**. Springer. 2015.

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

LONDOÑO, X. Genetic diversity of the bamboos of America and specifically of the genus *Guadua*. *In: I International Symposium on Genetic Resources of Bamboos and Palms and III International Symposium on Ornamental Palms 1003*. 2010. p. 43-50.

MAGALHÃES, A. C. T. V.; ALMEIDA, J. G. Carta de Rio Branco *In: Anais do II seminário nacional do bambu – Consolidação da Rede Brasileira do Bambu, 25-28/08/2010*. Rio Branco – AC. Universidade de Brasília, Brasília-DF, 314p. 2011.

MANHÃES, A. P.. Caracterização da cadeia produtiva do bambu no Brasil: abordagem preliminar. **Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal)–Departamento de Silvicultura, Instituto de Florestas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2008.**

MARULANDA, M.; CARVAJALINO, M.; VARGAS, C.; LONDOÑO, X.. La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la *Guadua*. **Memorias Seminario-Taller: Avances en la Investigación sobre Guadua. Pereira, Colombia, p. 1-5, 2002.**

MARULANDA, M.; GUTIÉRREZ, L.; URIBE, M.; MÁRQUEZ, M. Micropropagación de *Guadua angustifolia*. Biotecnología vegetal. Vol. 6 N° 2. *In: VII Simposio Internacional*. 2005

MATYSIAK, B. Effect of light intensity on growth and chlorophyll fluorescence of *Rhododendron* microcuttings during acclimatization. **Folia Hort**, v. 16, p. 107-114, 2004.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MUDOI, K. M.; SIDDHARTHA, P. S.; ADRITA, G.; ANIMESH, G.; DEBASHISHA, B.; MINA, B., Micropropagation of important

bamboos: a review, **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 2770–2785, 2013.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v.38, p.138-140, 1951.

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

ORLIKOWSKA, T.; ZAWADZKA, M.; ZENKTELER, E.; SOBICZEWSKI, P. Influence of the biocides PPM (TM) and Vitrofuril on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 87(3), 223-230 . 2012.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2014. URL <http://www.R-project.org/>.

SHIRASUNA, R.T. Guadua in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13247>> BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015.

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

TICHÁ, I.; RADOCHOVÁ, B.; KADLEČEK, P. Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, n. 3, p. 469-474, 1999.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. 2002

WARNES, G.R. gdata: Various R programming tools for data manipulation. **R package version 2.11.0**. 2012

WICKHAM, H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer New York. 2009

ZIV, M.; CHEN, J. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. *In*: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.D.. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: Springer, V.1, p.465-478, 2008

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T.. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 35, n. 3, p. 183-188, 1999.

ZOBAYED, S. M. A. Ventilation in micropropagation. *In*: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Springer Netherlands, p. 147-186, 2005.