



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Giuliano Rigo

**Comportamento morfofisiológico de *Dendrocalamus Asper* (Schult f.) Backer ex Heyne  
no sistema de propagação *in vitro* por *Clusters* e no processo de aclimatização**

Florianópolis

2020

Giuliano Rigo

**Comportamento morfofisiológico de *Dendrocalamus Asper* (Schult f.) Backer ex Heyne  
no sistema de propagação *in vitro* por *Clusters* e no processo de aclimatização**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências com área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosete Pescador.

Florianópolis

2020

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

Rigo, Giuliano

Comportamento morfofisiológico de *Dendrocalamus Asper*  
(Schult f.) Backer ex Heyne no sistema de propagação in  
vitro por Clusters e no processo de aclimatização /  
Giuliano Rigo ; orientadora, Rosete Pescador, 2020.

74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,  
2020.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Dendrocalamus asper*.  
3. Propagação in vitro por Clusters. 4. Aclimatização. 5.  
Multiplicação/Albinismo/Oxidação/Açúcares Solúveis  
Totais/Anatomia Vegetal. I. Pescador, Rosete. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Giuliano Rigo

**Comportamento morfofisiológico de *Dendrocalamus Asper* (Schult f.) Backer ex Heyne  
no sistema de propagação *in vitro* por *Clusters* e no processo de aclimatização**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Tamaso Mioto  
Centro de Ciências Biológicas  
Universidade Federal Santa Catarina

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais  
Centro de Ciências Agrárias  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais  
Centro de Ciências Agrárias  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

---

Pr. Dr. Cláudio Roberto da Fonseca

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

---

Pr<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosete Pescador

Orientadora

Florianópolis, 2020.

*“Ao Brasil e seu povo aguerrido. Dedico!”*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela sabedoria e orientação nos momentos de provação.

À minha família, em especial meus pais e meu irmão, pelo apoio incondicional e pela coragem em acompanhar cada um de meus passos pelo caminho obscuro e gratificante da ciência.

À Universidade Federal de Santa Catarina e à sociedade brasileira pelos subsídios e pelo sentimento de pertencimento.

À minha orientadora Dra. Rosete Pescador pela paciência, atenção e pelo espírito de benevolência.

A todos os meus colegas de formação, em especial Msc. Thiago Sanches Ornellas e Msc. Francisco Sebastian Montoya, pela interlocução de informações e infindável inteligência.

Aos técnicos, estagiários e acadêmicos.

A todos muito obrigado!

“Ao longo de minha trajetória pude absorver ensinamentos primordiais, aprendendo com os acontecimentos e rotinas científicas, e em especial, com os grandes homens da história. Buscando inspiração para criar, aprendi com os gênios que “ *o insucesso é apenas uma oportunidade de recomeçar com mais inteligência, visto que pensar é o trabalho mais difícil que existe.* ” (Henry Ford, 1922)

Aprendi com os grandes homens da filosofia que os “*heróis genuínos se fazem desde dentro, na luta da alma pela verdade da existência. Antes de brilhar em ações espetaculares têm de vencer a mentira interior e pagar, com a solidão moral extrema, o preço da sinceridade.* ” (Olavo de Carvalho, 1995)

Entendi com minha pouca experiência que “*para o triunfo do mal só é preciso que os bons homens não façam nada.* ” (Edmund Burke, 1757)

Por isso, vós mestres, “*tomem consciência da realidade em que estão inseridos, façam as perguntas certas e invistam energia no primordial, deixem de lado egos inflados e tenham em mente que os privilégios da vida acadêmica em que estão inseridos é oriundo do suor do povo de maioria simples deste país. Somente com inteligência, disciplina, determinação e humildade, terão a satisfação do reconhecimento espontâneo e recíproco pelos serviços prestados ao seu país. E quando sob pressão de situações tempestuosas lembrem-se de seus valores, seu Deus e da sua pátria, o mar agitado há de torná-los marinheiros de grande valor e coragem.* ” (Giuliano Rigo, 2020)

Orgulhoso pela trajetória parafraseio finalmente Sir Winston Churchill (1938), Nobel de Literatura e Premier do Império Britânico na segunda grande guerra, para mim, uma grande referência histórica e que levo para minha vida. Dizia ele: “*Sucesso não é o final, fracasso não é fatal: é a coragem para continuar que conta. A coragem é a primeira das qualidades humanas, sendo esta a qualidade que garante todas as demais. Entenda que todas as grandes coisas são simples. E muitas podem ser expressas numa só palavra: coragem; justiça; honra; dever; piedade; esperança e coragem.* ”

## RESUMO

A espécie *Dendrocalamus asper* é uma espécie de bambu com grande potencial econômico pelo seu porte avantajado, precocidade e adaptação em ambientes de clima tropical. A propagação convencional desta espécie é feita por métodos pouco eficientes e quando submetida ao sistema de propagação *in vitro* apresenta respostas mais eficientes na obtenção de propágulos. O processo de micropropagação é indispensável, apresentando vantagens e limitações, parte destas limitações estão associadas à forma de disposição do material *in vitro* na forma de colmos individualizados ou aglomerados. Além disso, a possibilidade de obter elevado número de propágulos, depende da adaptação dos materiais à condição de campo. O processo de adaptação das plantas micropropagadas à condição *ex vitro* depende do processo de pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização em ambiente controlado, com objetivo de proporcionar às plantas micropropagadas ambiente adequado para o desenvolvimento de órgãos ativos e funcionais nas condições de campo. Neste aspecto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da propagação *in vitro* de colmos individualizados e aglomerados, com tratamentos contendo diferentes números de colmos, tendo como parâmetros avaliados a taxa de multiplicação, oxidação e albinismo do material vegetal, além de eficiência de uso do meio de cultura e geração de plantas ao longo de 180 dias, descrevendo anatomicamente o surgimento da nova brotação no sistema de propagação *in vitro* e a concentração de carboidratos totais no material vegetal. Na fase de adaptação às condições de campo, o objetivo foi avaliar o comportamento de 200 plântulas micropropagadas submetidas por 40 dias ao processo de pré-aclimatização e por 50 dias ao processo de aclimatização, quantificando alterações morfológicas no sistema aéreo e radicular. Dos resultados obtidos na etapa de propagação *in vitro* observou-se que o tratamento apresentando maior taxa de multiplicação foi o tratamento T03 (Quatro aglomerados de três colmos cada em 40 mL de meio de cultura) com 1,22 brotos novos.colmo<sup>-1</sup>, sendo também o tratamento com maior eficiência de uso do meio de cultura e maior geração de brotos no período avaliado. A menor taxa de oxidação foi observada no tratamento T06 (Três aglomerados de seis colmos) com 0,3 brotos oxidados.colmo<sup>-1</sup>, sendo identificados dois processos de oxidação neste estudo, um deles pelo efeito do contato do material vegetal com meio de cultura contendo 6-benzilaminopurina e outro pelo efeito da senescência de colmos aglomerados. A menor taxa de albinismo foi observada no tratamento T01 (Cinco colmos individualizados) com seis colmos albinos a cada 1000, intrínseco aos materiais desta espécie submetidos ao sistema de propagação *in vitro*. Nas avaliações anatômicas observou-se que as brotações se originaram de células presentes na base dos colmos, na região meristemática do rizoma. O tratamento que apresentou melhor desempenho foi o tratamento T03, com a maior taxa de multiplicação, baixa taxa de albinismo e taxa de oxidação aceitável. Os resultados da pesquisa com aclimatização mostram que as plantas micropropagadas apresentam alterações no crescimento ainda no processo de pré-aclimatização emitindo novas raízes e folhas, em um período de 40 dias, com quedas abruptas do processo oxidativo. As mesmas plantas quando submetidas ao processo de aclimatização por período de 50 dias, apresentaram incrementos de comprimento no sistema radicular existente, até os 10 dias, com posterior incremento no número de folhas, número de raízes e comprimento das plantas no período de 10 a 25 dias. Dos 25 aos 50 dias, as plantas direcionam seu crescimento para a expansão da área foliar, limitando a emissão de novas folhas e raízes. A mortalidade foi de 17 % das plantas ao final de todo o processo. Concluiu-se que para a propagação *in vitro* do *Dendrocalamus asper* a melhor disposição do material é na forma de quatro aglomerados de três colmos por frasco, assim como, para o período de adaptação *ex vitro*, recomenda-se a individualização dos colmos oriundos da multiplicação, com 40 dias de pré-aclimatização e 50 dias de aclimatização.

**Palavras-chave:** Micropropagação, Aclimatização, Eficiência.

## ABSTRACT

The species *Dendrocalamus asper* is a bamboo species with great economic potential due to its large size, precocity and adaptation in tropical climate environments. The conventional propagation of this species is done by inefficient methods and when submitted to the *in vitro* propagation system, it presents more efficient responses in obtaining propagules. The micropropagation process is indispensable, presenting advantages and limitations, part of these limitations are associated with the way of introducing the material *in vitro* in the form of individualized or clusters culms. In addition, the possibility of obtaining a high number of propagules depends on the adaptation of the materials to the field condition. The adaptation process of micropropagated plants to the *ex vitro* condition depends on the process of pre-acclimatization *in vitro* and acclimatization in a controlled environment, in order to provide micropropagated plants with an adequate environment for the development of active and functional organs under field conditions. In this regard, the objective of this work was to evaluate the influence of the *in vitro* propagation of individualized and clusters culms, with treatments containing different numbers of culms, taking as parameters the multiplication rate, oxidation and albinism of the plant material, in addition to the efficiency of use of the plant culture medium and plant generation over 180 days, anatomically describing the emergence of new sprouting in the *in vitro* propagation system and the concentration of total carbohydrates in the plant material. In the adaptation phase to the field conditions, the objective was to evaluate the behavior of 200 micropropagated seedlings submitted for 40 days to the pre-acclimatization process and for 50 days to the acclimatization process, quantifying morphological changes in the aerial and root system. From the results obtained in the *in vitro* propagation stage, it was observed that the treatment with the highest multiplication rate was the T03 treatment (Four clusters of three culms each in 40 mL of culture medium), being also the treatment with the greatest efficiency in the use of culture medium and higher generation of shoots in the evaluated period. The lowest oxidation rate was observed in treatment T06 (Three clusters of six culms), two oxidation processes being identified in this study, one of them by the effect of the contact of the plant material with culture medium containing 6-benzylaminopurine and the other by the effect of senescence of culms in great clusters. The lowest rate of albinism was observed in treatment T01 (Five individualized culms), intrinsic to the materials of this species submitted to the *in vitro* propagation system. In the anatomical evaluations, it was observed that the shoots originate from cells present at the base of the culms, in the meristematic region of the rhizome. The treatment that showed the best performance was the T03 treatment, with the highest multiplication rate, low albinism rate and acceptable oxidation rate. The results of the research with acclimatization show that micropropagated plants show changes in growth even in the pre-acclimatization process, emitting new roots and leaves, in a period of 40 days. The same plants, when submitted to the acclimatization process for a period of 50 days, showed increases in length in the existing root system, up to 10 days, with a subsequent increase in the number of leaves, number of roots and length of plants in the period from 10 to 25 days. From 25 to 50 days, the plants direct their growth towards the expansion of the leaf area, limiting the emission of new leaves and roots. Mortality was 17% of plants at the end of the entire process. It was concluded that for the *in vitro* propagation of *Dendrocalamus asper*, the best disposition of the material is in the form of four clusters of three culms per flask, as well as, for the *ex vitro* adaptation period, it is recommended to individualize the culms from the multiplication, with 40 days of pre-acclimatization and 50 days of acclimatization.

**Keywords:** Micropropagation, Acclimatization, Efficiency.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Plantas de *Dendrocalamus asper* estabelecidas *in vitro* em fase de multiplicação para obtenção de suficiência amostral.....38
- Figura 02:** Representação esquemática dos frascos representando os tratamentos com número diferente de colmos por aglomerados e número diferente de aglomerados por frasco da espécie *Dendroclamus asper* no sistema de propagação *in vitro*.....39
- Figura 03:** Material vegetal de *Dendrocalamus asper* utilizado na análise de Microscopia Óptica de Luz.....40
- Figura 04:** Microscopia óptica de luz de colmo de *Dendrocalamus asper* na região de intersecção do colmo com o novo broto no sentido longitudinal.....43
- Figura 05:** Tendência da taxa de multiplicação média dos tratamentos com diferentes números de colmos aglomerados da espécie *Dendrocalamus asper* submetidos ao sistema de propagação *in vitro*.....45
- Figura 06:** Diferença de área de contato dos colmos de *Dendrocalamus asper* com o meio de cultura, quando individualizados (T02) e aglomerados (T10) contendo o mesmo número de colmos em ambos.....46
- Figura 07:** Número de propágulos gerados ao longo do intervalo de subcultivos *in vitro* (180 dias) em diferentes tratamentos de *Clusters* da espécie *Dendrocalamus asper*.....49
- Figura 08:** Rendimento de propágulos de *Dendrocalamus asper* gerados por volume de meio de cultura em 180 dias de subcultivos *in vitro* (brotos. L<sup>-1</sup>) nos diferentes tratamentos.....50
- Figura 09:** A. Colmo de *Dendrocalamus asper* introduzido em meio de cultura para multiplicação *in vitro* na fase de emissão de nova brotação. B. Colmos e brotos de *Dendrocalamus asper* necrosados a partir do processo de oxidação do material vegetal.....51
- Figura 10:** Colmos oxidados localizados nas extremidades e no centro dos aglomerados da espécie *Dendrocalamus asper* quando submetidos ao sistema de propagação *in vitro*.....53
- Figura 11:** Taxa de oxidação média dos tratamentos com diferentes números de colmos aglomerados da espécie *Dendrocalamus asper* submetidos ao sistema de propagação *in vitro*.....54

<b>Figura 12:</b> Folhas com diferentes gradações de clorofila em colmos de <i>Dendrocalamus asper</i> submetidas ao sistema de propagação <i>in vitro</i> .....	55
<b>Figura 13:</b> Taxa de albinismo médio dos tratamentos com diferentes números de colmos aglomerados da espécie <i>Dendrocalamus asper</i> submetidos ao sistema de propagação <i>in vitro</i> .....	56
<b>Figura 14:</b> Comprimento médio dos colmos, número médio de folhas e raízes no processo de pré-aclimatização de materiais micropropagados de <i>Dendrocalamus asper</i> .....	65
<b>Figura 15:</b> Crescimento de colmos e raízes em plantas micropropagadas de <i>Dendrocalamus asper</i> submetidas à aclimatização por um período de tempo de 50 dias e o ganho percentual diário nos intervalos de 0 a 10, 10 a 25 e 25 a 50 dias.....	66
<b>Figura 16:</b> Número de folhas e raízes em plantas micropropagadas de <i>Dendrocalamus asper</i> submetidas à aclimatização por um período de tempo de 50 dias e o ganho percentual diário nos intervalos de 0 a 10, 10 a 25 e 25 a 50 dias.....	67
<b>Figura 17:</b> Incremento de área foliar em plantas micropropagadas de <i>Dendrocalamus asper</i> submetidas à aclimatização por um período de tempo de 50 dias e o ganho percentual diário nos intervalos de 0 a 10, 10 a 25 e 25 a 50 dias.....	68
<b>Figura 18:</b> Evolução da parte aérea e sistema radicular do <i>Dendrocalamus asper</i> ao longo do processo de propagação <i>in vitro</i> , pré-aclimatização e aclimatização.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Taxa de multiplicação média dos diferentes tratamentos da espécie <i>Dendrocalamus asper</i> submetidos à propagação <i>in vitro</i> (Duncan 5%).....	44
<b>Tabela 02:</b> Comparação de médias (Duncan 5%) de carboidratos totais entre os tratamentos T01, T03, T06, T12 e T18 e a distribuição destes no aglomerado de colmos da espécie <i>Dendrocalamus asper</i> submetidas ao sistema de propagação <i>in vitro</i> .....	48
<b>Tabela 03:</b> Taxa de oxidação média dos diferentes tratamentos da espécie <i>Dendrocalamus asper</i> submetidos à propagação <i>in vitro</i> (Duncan 5%).....	52
<b>Tabela 04:</b> Taxa de albinismo médio dos diferentes tratamentos da espécie <i>Dendrocalamus asper</i> submetidos à propagação <i>in vitro</i> (Duncan 5%).....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BAP** – 6-benzilaminopurina (Molécula química do grupo das citocininas).

**cm** – Centímetros (Unidade de medida de comprimento).

**g** – Gramas (Unidade de medida de peso).

**Hg** – Mercúrio (Elemento químico).

**INBAR** – International Network for Bamboo and Rattan (Organização Internacional de Bambu e Rattan).

**L** – Litro (Unidade de medida de volume).

**LED** – Light Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz).

**MF** – Matéria Fresca.

**mg** – Miligramas (Unidade de medida de peso).

**mm** – Milímetros (Unidade de medida de comprimento).

**MS** – Meio de Cultura Murashige & Skoog (1962).

**pH** – Potencial Hidrogênionico (Escala de Íons em Solução).

**Rpm** – Rotação por minuto (Unidade de medida de velocidade).

**TA** – Taxa de Albinismo.

**TM** – Taxa de Multiplicação.

**TO** – Taxa de Oxidação.

**μM** – Micromolar (Unidade de medida molaridade).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - <i>DENDROCALAMUS ASPER</i> (SCHULT F.) BACKER EX. HEYNE</b> .....	17
3.1 Origem e Distribuição.....	17
3.2 Uso e hábito de crescimento .....	17
3.3 Morfologia e Anatomia.....	18
3.4 Reprodução Sexuada.....	20
3.5 Propagação Assexuada.....	21
3.6 Processo de micropropagação.....	21
3.7 Fitorreguladores e tecidos meristemáticos.....	23
3.8 Propagação <i>In vitro</i> da espécie .....	24
3.9 <i>Clusters</i> (Aglomerados de colmos).....	25
3.10 Fase de Aclimatização do <i>Dendrocalamus asper</i> .....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
<b>4. CAPÍTULO I - PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ESPÉCIE <i>DENDROCALAMUS ASPER</i> NA FORMA DE AGLOMERADOS DE COLMOS (<i>CLUSTERS</i>)</b> .....	36
RESUMO.....	36
4.1 Introdução .....	37
4.2 Material e Métodos .....	38
4.3 Resultados e Discussão.....	42
4.4 Conclusões .....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
<b>5. CAPÍTULO II – PRÉ-ACLIMATIZAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE <i>DENDROCALAMUS ASPER</i></b> .....	61
RESUMO.....	61
5.1 Introdução .....	61
5.2 Material e Métodos .....	62
5.3 Resultados e Discussão .....	64
5.4 Conclusões .....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
<b>6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	74

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os bambus são parte de um agrupamento de plantas pertencentes à família Poaceae, subfamília Bambusoideae, constituída de 240 gêneros e 1641 espécies distribuídas em grande parte na Ásia e América do Sul, sendo o continente asiático o centro de referência para 61% das espécies descritas (SORENG et al., 2015). Destacam-se pelo rápido crescimento, com hábito perenifólio e grande versatilidade de usos, abrangendo desde aplicações na alimentação e fitoterapia, até usos na silvicultura, bioenergia, indústria de papel, celulose e movelaria. Tornaram-se, portanto, uma alternativa sustentável para geração de renda em países tropicais e subtropicais emergentes, frente a sua versatilidade de usos e expressiva diversidade genética (NAUTIYAL et al., 2008; SEETHALAKSHMI et al., 2008).

Segundo o Internacional Network for Bamboo and Rattan – INBAR (2018) das espécies de maior relevância mundial de bambus, destacam-se aquelas dos gêneros *Dendrocalamus* Ness., pela sua multifuncionalidade e ampla adaptação em diferentes regiões do mundo, sendo espécies com elevado potencial no combate à miséria, no estímulo à conservação ambiental e na geração de desenvolvimento tecnológico. Essas espécies apresentam grande potencial de uso, sendo conhecidas principalmente pelo seu porte avantajado, crescimento acelerado e boa estrutura, que lhes conferem grande potencial para fins de construção civil e na indústria da madeira, com pesquisas em diversos setores (MARINHO, 2012).

O gênero apresenta seu centro de origem no sul de Mianmar, onde no Brasil, as espécies *Dendrocalamus asper* Backer. e *Dendrocalamus giganteus* Munro. foram as primeiras introduzidas se adaptando bem às condições ambientais das regiões sul e sudeste, passando a ser denominadas popularmente como bambus-gigantes (JUDZIEWICZ et al., 1999; MONTIEL; SÂNCHEZ, 2006). A espécie *D. asper* é uma das espécies de bambu mais cultivadas no mundo, com grande potencial no Brasil pela semelhança climática do país com seu centro de diversidade (MANHÃES, 2008; MARINHO, 2012). Seus colmos são utilizados na construção civil, bem como apresentam qualidade de fibra superior para a produção de papel, celulose e fibra têxtil em comparação às espécies comumente utilizadas (MALANIT et al., 2011).

No Brasil, a maior parte das espécies de bambu incluindo as do gênero *Dendrocalamus* spp. são pouco difundidas e suas cadeias produtivas ainda se apresentam deficitárias, assim como, pesquisas científicas, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico são limitados (BERALDO; AZZINI, 2004; DANTAS et al., 2005). Dentre as limitações para o incremento

da cadeia produtiva brasileira, a de maior relevância é à baixa oferta de material propagativo com qualidade genética, fisiológica e sanitária conhecidas, devido à floração rara da espécie com plantas desuniformes e métodos de propagação vegetativa pouco eficientes na geração de propágulos (DRUMOND; WIEDMAN, 2017). Atualmente, a maior parte dos propágulos utilizados para os cultivos de bambuzeiro apresentam origem a partir de métodos de propagação convencionais como desdobramento de touceiras, enraizamento de estacas e pedaços de colmo, culminando em um estabelecimento desuniforme, com problemas fitossanitários frequentes e falhas no *stand* de plantas, dificultando estimar com precisão as perspectivas de produtividade (NADHA et al., 2012).

Neste contexto, a biotecnologia se enquadra como uma das alternativas para a produção de mudas através de sistemas de micropropagação, em que pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) são retirados de plantas-matrizes, sendo descontaminados e cultivados *in vitro*. Este método permite que as plantas geradas sejam geneticamente idênticas ao ancestral comum, com fisiologia e sanidade padronizadas (NADHA et al., 2012). Entretanto, esta técnica ainda apresenta algumas limitações com processo de contaminação na introdução *in vitro* e oxidação do material vegetal, conseqüentemente, requerendo estudos científicos mais aprofundados para superar gargalos direcionados à sua implementação (SANDHU et al., 2018).

Um dos principais aspectos a serem abordados é a influência do hábito de crescimento entouceirante do *Dendrocalamus asper* no sistema de propagação *in vitro*. Trata-se de uma espécie que produz caules do tipo colmo de forma aglomerada em condições naturais, caules estes que compartilham a mesma origem meristemática no rizoma (QUIESHING et al., 2001; LONDOÑO, 2002). De acordo com Ornellas et al. (2017), a propagação em *clusters* (aglomerados de colmos) possivelmente está relacionada com uma maior estabilidade e uniformidade na propagação *in vitro* da espécie, com efeitos benéficos sobre todos os parâmetros morfofisiológicos do material vegetal.

As mudas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* apresentam ainda, lacunas de conhecimento relacionadas ao processo final de pré-aclimatização *in vitro* e posteriormente, aclimatização, sendo esta a etapa final de adaptação das plantas à condição de campo. A aclimatização tem como foco preparar as plantas fisiologicamente à transição de uma condição heterotrófica artificial para a condição autotrófica natural, observando aspectos de desenvolvimento de órgãos vitais, como folhas, caules e raízes, essenciais para a sobrevivência das plantas em condições *ex vitro* (VALE et al., 2019).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Descrever o padrão de comportamento da espécie *Dendrocalamus asper* durante o processo de propagação *in vitro* por *clusters* e no processo de aclimatização.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar quantitativamente os padrões de multiplicação, oxidação e albinismo do material vegetal propagado *in vitro*;

- Descrever qualitativamente o padrão anatômico de surgimento de novos brotos desde a sua origem meristemática em condições *in vitro*;

- Quantificar a distribuição dos açúcares solúveis totais nos colmos aglomerados;

- Avaliar os padrões morfológicos de adaptação das plantas propagadas *in vitro* no processo de pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - *DENDROCALAMUS ASPER* (SCHULT F.) BACKER EX. HEYNE**

#### **3.1 Origem e Distribuição**

A família Poaceae apresenta um notável número de espécies, com distribuição em várias regiões do mundo, compreendendo plantas fisiologicamente adaptadas a um largo espectro de habitats. Dentre as espécies desta família, destacam-se aquelas pertencentes à subfamília Bambusoideae, podendo ser categorizadas quanto ao seu hábito de crescimento como bambus herbáceos, bambus lignificados temperados e bambus lignificados tropicais (BENNETZEN et al., 2007; SUNGKAEW et al., 2009; SORENG et al., 2015).

A subfamília Bambusoideae ocorre nas mais variadas latitudes, sendo cosmopolita, limitando sua ocorrência à Europa e à Antártida, com espécies presentes desde o nível do mar até elevadas altitudes. O centro de diversidade deste agrupamento de espécies concentra-se na Ásia e a América do Sul, sendo o Brasil um dos países com destaque em diversidade de gêneros e espécies nativas, com a maioria destes indivíduos de caráter endêmico dos territórios em que ocorrem (BYSTRIAKOVA et al., 2004).

Historicamente, os bambus são utilizados pelos seres humanos há cerca de três milênios, com registros antigos de uso por populações tradicionais, em especial, no continente asiático e americano, locais estes, que atualmente apresentam os maiores centros de diversidade das espécies da subfamília Bambusoideae e as espécies com maior destaque de uso (FILGUEIRAS; GONÇALVES, 2006).

#### **3.2 Uso e hábito de crescimento**

Mundialmente, 240 gêneros foram descritos da subfamília Bambusoideae, dentre eles, um dos que apresenta grande relevância científica e socioeconômica é o gênero *Dendrocalamus* Ness., diante de sua expressiva aplicabilidade nos setores de construção civil, indústria de papel e celulose, com estudos científicos direcionados à produção de polímeros, biocombustíveis e materiais particulados/compensados (TOMBOLATO et al., 2012; SANDHU et al., 2018). Algumas das espécies congêneres mais estudadas são o *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult f.) Backer. ex k. Heyne, *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) Nees., *Dendrocalamus latiflorus* Munro., *Dendrocalamus giganteus* Munro., *Dendrocalamus longispathus* (Kurz.) Kurz. e *Dendrocalamus hookeri* Munro. (SANDHU et al, 2018).

De acordo com Lin (1968) e Azzini et al. (1989), este gênero apresenta grande porte, sendo categorizado como lignificado de clima tropical por possuir características específicas, podendo atingir 30 metros de altura e colmos ocos com até 0,3 m de diâmetro. As paredes do colmo podem apresentar espessura de até três centímetros e sua taxa de crescimento pode chegar a 1,0 m.dia<sup>-1</sup>, com máxima altura de colmos aos 180 dias, portanto, sendo destaque na elevada produção de biomassa e precocidade durante os estádios de desenvolvimento vegetativo.

O gênero *Dendrocalamus* spp. apresenta mais de 100 usos registrados e inúmeras patentes voltadas aos seguintes usos: alimentício (brotos comestíveis, bebidas fermentadas), medicinal, ornamental e principalmente, aquele voltado à construção civil. O gênero é utilizado em construções projetadas integralmente em bambu substituindo madeiras de lei, na produção de derivados de bambu, como compensados, laminados e painéis particulados, além de polímeros e biocombustíveis (PANDE; PANDEY, 2008; LIESE; WELLING; TAN, 2015).

A espécie *Dendrocalamus asper* é uma espécie originária do sudeste asiático, mais especificadamente Mianmar, naturalmente, as maiores populações naturais da espécie estão situadas no continente asiático em especial nas zonas tropicais da Tailândia e China, com vastas áreas territoriais. A espécie suporta elevadas altitudes de até 1500 m, com ótimo desenvolvimento em regiões de 400 a 500 m de altitude, exigindo anualmente, cerca de 2400 mm de pluviosidade anuais (SCHRODER, 2010).

O *D. asper* é considerado por Londoño (2001) uma das espécies exóticas de maior importância no Brasil. Esta espécie é popularmente conhecida como bambu-balde ou bambu-gigante, tendo sido introduzida possivelmente pelos colonizadores portugueses. Apresenta as características de grande porte do gênero, sendo uma planta perene, lignificada e de clima tropical, com elevada produção de biomassa em curto espaço de tempo (TOMBOLATO et al., 2012). A espécie apresenta larga adaptação ao território brasileiro pela semelhança com seu centro de origem, com limitações para as regiões com ocorrência de geada e elevadas altitudes no sul e sudeste, assim como, aquelas apresentando pluviosidades baixas presentes em alguns locais das regiões sul, centro-oeste e nordeste (JUDZIEWICZ et al., 1999; BPG, 2012).

### **3.3 Morfologia e Anatomia**

A subfamília Bambusoideae é caracterizada por apresentar espécies de metabolismo fotossintético C3 e ausência de anatomia Kranz, com crescimento monopodial ou simpodial,

apresentando caules aéreos do tipo colmo sólido ou oco (JUDZIEWICZ et al., 1999; BPG, 2012).

Os bambus podem apresentar aspectos morfoanatômicos diversos, as folhas podem assumir morfologias diferentes, podendo haver a formação de folhas caulinares, catafilos do rizoma ou folhas de ramificações. As folhas do colmo são conhecidas como bainhas do colmo por se apresentarem envoltas nos entrenós e nas gemas em crescimento, formando uma estrutura semelhante a uma capa com função de proteção (LIESE, 1998; JUDZIEWICZ, 1999). Os catafilos do rizoma são folhas reduzidas que exercem função de proteção das gemas laterais presentes nos nós dos rizomas, enquanto que as folhas de ramificações são as principais responsáveis pelos processos fotossintéticos e respiratórios da planta (TOMAZELLO-FILHO; AZZINI, 1987; JUDZIEWICZ, 1999; LIESE, 2003).

Os estômatos são formados por um par de células-guarda que se apresentam no formato halteriforme, ocorrendo principalmente na face abaxial das folhas em fileiras paralelas, intercalados com as células da epiderme, de forma, que a diferenciação destas estruturas se dá do ápice para a base das folhas (METCALFE, 1960; ESAU, 1976). Embora, os bambus compartilhem uma anatomia foliar e micromorfologia epidérmica bastante semelhante, que os distinguem de outras gramíneas, as variações anatômicas e micromorfológicas podem ser informativas à categorização taxonômica (MACCLURE, 1966; DAS et al., 2008; DESAI; RAOLE, 2013).

Os caules dos bambus são classificados morfológicamente por colmos, por apresentarem nós e entrenós, sendo que compõem a parte aérea das plantas e fornecem sustentação para os ramos, folhas e estruturas reprodutivas. Os colmos se originam nas gemas laterais presentes em nós dos rizomas, sendo regiões meristemáticas que se desenvolvem formando brotos (QUIESHING et al., 2001; LONDOÑO, 2002).

Os caracteres morfológicos e anatômicos dos colmos têm sido utilizados na identificação dos bambus, em especial, através da diferenciação nas estruturas dos feixes vasculares presentes nos colmos, onde as análises realizadas para fins de identificação permeiam formato, tamanho, arranjo, quantidade de feixes vasculares e distribuição dos demais tecidos, assim como, propriedades físicas da fibra do colmo para determinação da aplicação (LONDOÑO, 2002; LIESE, 2004; GRECO et al., 2011).

Os rizomas juntamente com as raízes constituem o sistema de órgãos subterrâneos do bambú, sendo o rizoma um órgão segmentado em nós e entrenós, com maior desenvolvimento

em bambus com colmos lignificados, enquanto as espécies de hábito herbáceo apresentam menor desenvolvimento do mesmo. O rizoma é responsável pela emissão de novos colmos e raízes, armazenamento e transporte de nutrientes, além de sustentação da parte aérea (JUDZIEWCZ et al., 1999; LONDOÑO; KOBAYASHI, 2001).

As raízes dos bambus diferem estruturalmente dos colmos e rizomas, visto que não estão segmentadas em nós e entrenós, onde a maior parte do sistema radicular é formado por raízes adventícias, que se desenvolvem a partir dos nós encontrados nos rizomas e nas bases dos colmos (LIESE, 1998; JUDZIEWICZ et al. 1999). O sistema subterrâneo dos bambus destaca-se pela elevada adaptabilidade a diferentes condições ambientais e de solo, sendo mais eficiente em relação às demais espécies da família Poaceae (RAO, 1985). Neste sentido, a morfofisiologia e os caracteres evolutivos da subfamília Bambusoideae apresentam um comportamento específico frente às diferentes condições em que são submetidas, em especial nos processos utilizando técnicas distintas de propagação (SANDHU et al., 2018).

### **3.4 Reprodução Sexuada**

Ao longo dos últimos anos o consumo de derivados de bambu aumentou significativamente em vários países do mundo, contudo, há limitações na cadeia produtiva, oriundas principalmente de déficit de material propagativo e sementes, sendo o gênero composto por espécies com eventos raros de floração e com baixa padronização de touceiras para propagação vegetativa (RAMANAYAKE, 2006; SANDHU et al., 2018).

A espécie *Dendrocalamus asper* apresenta frequência de florações que varia de 25 a 60 anos de forma cíclica. Desta maneira, o material propagativo originário da reprodução sexuada é bastante escasso, com elevado grau de variabilidade genética. A floração ocorre de forma gregária envolvendo várias touceiras, formando frutos do tipo cariopse e após a dispersão, ocorre morte das plantas envolvidas no evento (VELLER et al., 2015; ZHAO et al., 2014).

Neste aspecto, a propagação sexuada em escala comercial é bastante complexa, com limitações para a produção de mudas em larga escala e na realização de cultivos em outras regiões compatíveis com as exigências da espécie (SALGADO; GREGO, 2002). Dos principais problemas da produção de mudas por sementes destacam-se a baixa uniformidade genética das plantas e baixa durabilidade das sementes na etapa pós-colheita, assim como plantas de crescimento inicial bastante lento e pouco vigoroso, tornando esta etapa um gargalo para o

estabelecimento da cadeia produtiva do *Dendrocalamus asper* fora do continente asiático (KIGOMO, 2007; CORTES, 2013).

### **3.5 Propagação Assexuada**

A propagação assexuada é a forma mais utilizada na produção de mudas da espécie *Dendrocalamus asper*, os métodos mais conhecidos são a segmentação de rizomas ou raízes, uso de brotações novas ou segmentos de caule em crescimento, formando novas plantas a partir dos tecidos meristemáticos destes órgãos vegetativos e de armazenamento (MATOS JR., 2004). A divisão de touceiras é outro método muito utilizado em espécies com hábito de crescimento entouceirante, sendo os colmos cortados acima do segundo nó e divididos em hastes como materiais propagativos. Entretanto, a maior taxa de enraizamento observada dentre os métodos de propagação assexuada convencional, está no método de placas de colmo, contendo gemas primárias não brotadas, obtidas na base dos colmos (AZZINI; SALGADO, 1993; CORTES, 2013).

Outra forma muito utilizada no gênero *Dendrocalamus* spp. são as ramificações primárias presentes no terço superior das plantas, sendo estes materiais propagativos obtidos após a colheita dos colmos maduros da espécie (SOUZA, 2010). A maior parte dos métodos convencionais de propagação assexuada da espécie, mesmo sendo mais efetivos que o método de propagação sexuada através de sementes, geram mudas desuniformes, com padrões de sanidade desconhecidos e muitas vezes, com elevada demanda de espaço, mão-de-obra e recursos financeiros, demandando métodos de cunho biotecnológico (DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

### **3.6 Processo de micropropagação**

O processo de micropropagação, consiste em cultivar meristemas e induzir a formação de material propagativo geneticamente idêntico aos parentais, onde fragmentos vegetais (explantes) são isolados da planta-matriz e cultivados em condições favoráveis para o seu desenvolvimento. A partir disso, o material vegetal passa a apresentar um metabolismo mixotrófico, dependendo de nutrientes e água do meio de cultura para a sua manutenção e desenvolvimento, possibilitando a regeneração de tecidos através da orgâno genese ou embriogênese somática (RAMANAYAKE, 2006).

A primeira tentativa de propagação *in vitro* de bambu foi realizada por Alexander & Rao (1968), através de proliferação de brotos axilares. Esta forma de propagação envolve

estímulos de gemas presentes na axila de cada folha, provando ser o método mais aplicável, confiável e eficiente para a produção em larga escala, com fidelidade clonal de plantas de genótipos superiores, através do uso de explantes (GIELIS et al., 2011; JIMÉNEZ, GUEVARA, 2007; GEORGE; DEBERGH, 2008).

A micropropagação aumentou a expectativa de sucesso da cadeia produtiva do bambu, através do desenvolvimento de protocolos de regeneração *in vitro* com proliferação de brotos axilares formando novos órgãos específicos via orgânogenese e/ou embriogênese somática, buscando produção de plantas para o plantio operacional, assim como, fornecimento de material para programas de melhoramento e conservação do germoplasma (MUDOI et al., 2013; GOYAL; SEM, 2016). Segundo Gielis (1995), a estimativa é que a partir de um único explante em algumas espécies de bambu poderiam ser geradas até 10 mil novas plantas em um período de doze meses, utilizando a técnica de micropropagação.

Limitações quanto ao uso das técnicas de propagação *in vitro* para bambuzeiro ainda são muito expressivas, prevalecendo contaminações sistêmicas e superficiais, assim como, oxidações, flutuações nas taxas de multiplicação e baixa resposta ao enraizamento nas condições *in vitro* (GIELIS et al., 2001). Uma das maiores limitações no processo de multiplicação é a produção de polifenol oxidases após o corte do tecido vegetal, resultando no escurecimento do meio de cultura e oxidação dos explantes, sendo que os produtos da oxidação apresentam fitotoxidez ao material vegetal, com ocorrência de necrose e morte celular sequencial (COMPTON; PREECE, 1986; HUANG et al., 2002; OPRINS et al., 2004).

Das exigências nutricionais do bambu em sistemas de propagação *in vitro* a formulação salina mais utilizada é a MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), tendo sido testada com sucesso para os gêneros *Dendrocalamus* Ness. e *Bambusa* Schreb. (SHIRGURKAR et al., 1996; CHANG; HO, 1997; SINGH et al., 2001; ARYA et al., 2008; OGITA et al., 2008). Além da formulação salina, são utilizados carboidratos para a manutenção do material vegetal e desenvolvimento das estruturas *in vitro*, como a sacarose. Além disso, agentes gelificantes como ágar-ágar são utilizados na composição do meio de cultura. Adicionalmente, os fitorreguladores são os principais promotores da divisão e alongamento celular de forma rápida e eficiente, sendo utilizados em concentrações específicas para cada espécie, durante o processo, com ênfase no balanço hormonal de citocininas e auxinas (JIMÉNEZ, 2005; WAIKHOM; SHARMA, 2009).

### 3.7 Fitorreguladores e tecidos meristemáticos

Os fitorreguladores são compostos naturais ou sintéticos que em pequenas doses atuam como mensageiros químicos desencadeando ou inibindo mudanças fisiológicas no metabolismo vegetal, como crescimento e desenvolvimento. Esses compostos ligam-se a receptores específicos na célula vegetal, na membrana, no citoplasma ou no núcleo, alterando o receptor e culminando em uma cascata de sinalização intracelular, conectando o estímulo a uma resposta celular específica por vias bioquímicas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Alguns dos fitorreguladores de grande relevância no processo de micropropagação são os compostos pertencentes ao grupo das Auxinas e Citocininas (SANDHU et al., 2018).

As auxinas e citocininas são fitohormônios relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas. As auxinas são produzidas endogenamente nas regiões meristemáticas do caule e folhas jovens em tecidos com rápida divisão celular e crescimento. Promovem basicamente o alongamento celular, mediando o fototropismo e a dominância apical, além de mediar a diferenciação vascular e emissão foliar. Por sua vez, citocininas são compostos que induzem a divisão celular, sendo endogenamente produzidas no meristema apical das raízes em maior quantidade, com transporte via xilema de forma acrópeta, regulando processos metabólicos voltados à regulação da divisão celular na parte aérea e em raízes, modificando a dominância apical e promovendo o crescimento de gemas laterais (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Neste contexto, os tecidos meristemáticos desempenham um papel crucial no desenvolvimento vegetativo, sendo definidos como regiões que se apresentam como fonte de células indiferenciadas com potencial de recrutamento para a geração de novos órgãos e tecidos, portanto, os meristemas podem ser definidos como grupos de células que retêm a capacidade de proliferação celular e regulam o desenvolvimento das plantas. Os meristemas são descritos de acordo com sua competência e posição no tecido vegetal, sendo eles os meristemas axilares e apicais, de caule e raiz, que mantêm um aspecto de pluripotência celular e são capazes de se autoperpetuar por estímulos celulares (fitohormônios) (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Além dos meristemas apical e axilar, estudos mostram a presença de outro tipo de meristema em monocotiledôneas, encontrado na base dos entrenós e que é derivado do meristema apical, sendo denominado como meristema intercalar. Este tecido é composto por agrupamento de células que mantêm sua atividade mesmo distante do ápice e apresenta como principal competência exercer o alongamento dos entrenós (EVERT, 2013). O meristema

intercalar é definido como um tecido meristemático isolado, delimitado acima e abaixo por tecidos já diferenciados, sendo que regiões bem definidas de meristema intercalar só ocorrem nos estágios finais de desenvolvimento do entrenó (FISHER; FRENCH, 1976). Além disso, estudos de propagação com regiões de meristema intercalar foram realizados, com obtenção de resultados promissores, indicando ser uma região do colmo com potencial para a aplicação de técnicas de micropropagação (DAQUINTA et al., 2007).

### **3.8 Propagação *in vitro* da espécie *Dendrocalamus asper***

Nos últimos anos alguns trabalhos com morfofisiologia e propagação *in vitro* foram realizados com as espécies do gênero *Dendrocalamus* spp., em destaque o *Dendrocalamus hamiltonii*, *Dendrocalamus latiflorus*, *Dendrocalamus asper* e *Dendrocalamus giganteus*, usando explantes originários de meristemas florais da espécie, tais como sementes e nódulos, considerando o uso de fitorreguladores na otimização do processo de multiplicação *in vitro* (CHAMBERS et al., 1991; ARYA et al., 1999; RAMANAYAKE; YAKANDAWALA, 1997; SANDHU et al., 2018).

A espécie *Dendrocalamus asper* apresenta boa resposta à propagação *in vitro*, com elevado vigor e taxa de multiplicação, em especial, utilizando como explantes segmentos nodais com 2,0 a 3,0 cm em meio gelificado com ágar-ágar, contendo formulação salina Murashige & Skoog (1962) e 3% de sacarose como fonte de carbono. Além disso, alguns trabalhos abordam a necessidade 3,0 a 5,0  $\mu\text{M}$  de 6-benzilaminopurina (BAP), sendo um regulador vegetal da família das citocininas mais eficiente que a cinetina na indução das brotações laterais no processo de multiplicação *in vitro* do material vegetal (KUMAR; BANERJEE, 2014).

Pesquisas atuais, mostram que os melhores resultados na introdução e multiplicação *in vitro* da espécie, são obtidos utilizando como propágulos sementes, pela facilidade de controlar a sanidade do material e pela indução natural do processo de germinação, formando plântulas vigorosas e responsivas aos fitorreguladores (SANDHU et al., 2018).

De acordo com Ornellas et al. (2017), os melhores efeitos do BAP na propagação *in vitro* do *Dendrocalamus asper* ocorreram em concentrações de 15 a 20  $\mu\text{M}$ , com aumentos significativos da taxa de multiplicação. Além disso, Ornellas et al. (2017), demonstrou um incremento na taxa de multiplicação do material vegetal quando propagado em “clusters” (aglomerados), simulando *in vitro*, a condição de hábito de crescimento *ex vitro* da espécie em touceiras de colmos.

Neste aspecto, a aplicação das técnicas de micropropagação em monocotiledôneas, em especial da família botânica Poaceae, pode culminar em alterações morfoanatômicas e fisiológicas no material vegetal, resultantes da interação com as condições de desenvolvimento *in vitro*, alterações estas que podem ser observadas na espécie *Dendrocalamus asper* em mudanças do padrão morfológico dos órgãos, processos oxidativos, assim como, variações somaclonais e epigenéticas do material vegetal (SANDHU et al., 2018).

Segundo Kumar & Banerjee (2014), a espécie *Dendrocalamus asper* quando submetida à propagação *in vitro* apresentou materiais com ausência de clorofila (albinos), com capacidade de multiplicação normalizada. Desta forma, o processo de multiplicação *in vitro* da espécie apresenta variações anatômicas estruturais nos cloroplastos, possivelmente, resultado do efeito da exposição do material vegetal às moléculas utilizadas no meio de cultura ou ao ambiente em que as plantas são submetidas em condições *in vitro*.

É importante salientar que o metabolismo das plantas é regulado normalmente por mensageiros químicos, sendo que o metabolismo primário está diretamente relacionado à manutenção e ao desenvolvimento vegetal. No metabolismo primário, são produzidos metabolitos como lipídeos, proteínas e carboidratos, que estão envolvidos na respiração, assimilação de nutrientes, crescimento e desenvolvimento, sendo por isso considerados essenciais na quantificação da atividade morfogênica do material, em especial, os carboidratos, que estão envolvidos em variações estruturais e de resposta rápida (KLIEBSTEIN, 2004; TAIZ, ZEIGER, 2009).

### **3.9 Clusters (Aglomerados de colmos)**

A espécie *Dendrocalamus asper* apresenta naturalmente o hábito de crescimento entouceirante, com emissão de brotos, formando colmos, a partir do rizoma. Estes colmos apresentam-se interconectados, sendo que as novas brotações originadas do rizoma respondem ao comportamento dos colmos maduros, ou seja, a geração de novos brotos depende fisiologicamente das condições dos colmos pré-existentes na touceira. A interconexão entre colmos torna as respostas da espécie mais rápidas quando sob efeito de estresse ambiental, translocando seiva dos colmos para as áreas de maior exigência, podendo estas áreas serem regiões de novas brotações, órgãos reprodutivos ou mesmo ferimentos teciduais, com redistribuição dos assimilados em caso de recursos limitados (GRECO et al., 2011; DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

A quebra de dominância apical de colmos maduros resulta no aumento de brotações laterais na touceira, transparecendo a equilibrada relação de fitohormônios responsáveis, respectivamente, pela dominância apical e crescimento da parte aérea das plantas (auxinas) e pelas brotações laterais e formação de novas plantas a partir de regiões meristemáticas pré-existentes (citocininas) (SANDHU et al., 2018). Neste sentido, a relação entre a dominância apical e brotações laterais é comum em muitas espécies, com destaque em plantas de propagação vegetativa (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Desta forma, esta redistribuição de assimilados entre colmos não é observada somente em plantas de bambu, mas também em outras poáceas de metabolismo C3, como arroz e trigo. Estudos com *Oryza sativa* demonstram que a espécie apresenta perfilhamento, com sistemas de colmos interconectados, através da emissão de perfilhos diretamente ligados em sua base de origem meristemática, com redistribuição conhecida da seiva entre os colmos em casos de manejo produtivo, mudanças no hábito de crescimento ou como respostas a estresses ambientais (SANTOS et al., 2017).

A redistribuição da seiva é observada na alteração do desenvolvimento dos colmos quando seu número é reduzido ou aumentado na mesma touceira. Quando os perfilhos diminuem, os colmos remanescentes apresentam elevado desenvolvimento e aumento de produtividade de grãos, concentrando a seiva elaborada nestes. Nas mesmas condições, o número elevado de colmos interconectados acarretam na diminuição desta produtividade média, assim como seu desenvolvimento (SANTOS et al., 2017).

A espécie *Triticum aestivum* apresenta hábito de perfilhamento similar ao arroz, com vasos condutores translocando seiva elaborada entre colmos em caso de alterações de manejo, pastejo ou quebra de dominância por herbicidas químicos, levando à maior brotação lateral (FIOREZE et al., 2019). Culturas como cevada, cana-de-açúcar, sorgo e outras forrageiras diversas da família Poaceae apresentam hábito de perfilhamento ou entouceirante, com redistribuição de açúcares e nutrientes entre colmos (TAVARES et al., 2018; ARAÚJO et al., 2017; MAIA et al., 2017).

Das plantas rizomatosas com hábito de crescimento em touceiras a banana (*Musa* spp.) apresenta grande destaque com grande similaridade de desenvolvimento e hábito de crescimento com os bambus, emitindo diversos afilhos a partir de gemas presentes no mesmo rizoma. Quando um dos afilhos finaliza seu desenvolvimento, parte dos assimilados

remanescentes é redistribuído para os afilhos mais jovens, como um sistema de reaproveitamento dos assimilados (SALOMÃO et al., 2016).

A implementação de um sistema de propagação *in vitro* mantendo o padrão natural do hábito de crescimento entouceirante de colmos ou perfilhos, possivelmente apresenta maior eficiência na redistribuição de assimilados, mantendo maior estabilidade entre os colmos aglomerados. Hábito esse presente em especial nas espécies do gênero *Dendrocalamus* spp, com efeito positivo sobre os aspectos quantitativos e qualitativos do desenvolvimento *in vitro* das plantas (ORNELLAS et al., 2017).

### **3.10 Fase de Aclimatização do *Dendrocalamus asper***

A aclimatização é a fase consecutiva ao processo de propagação *in vitro* e anterior à introdução das plantas na condição *ex vitro*. O objetivo da aclimatização é adaptar as plantas gradualmente à condição de campo, possibilitando que as plantas façam fotossíntese e absorvam nutrientes do solo para o seu crescimento e manutenção do seu desenvolvimento, de forma normalizada (WIJAYANI et al., 2018).

Em condições *in vitro*, as plantas apresentam o processo fotossintético parcialmente ativo, pois absorvem o carbono necessário ao seu desenvolvimento da sacarose presente no meio de cultura, reduzindo o gasto de energia com a fotossíntese pela pronta disponibilidade de carbono no substrato. Portanto, o sistema fotossintético destas plantas não é funcional ou é pouco desenvolvido, sendo que a absorção de nutrientes e carbono ocorre com o contato da planta diretamente com o meio de cultura, com baixa incidência de raízes funcionais (VALE et al., 2019).

As etapas da propagação *in vitro* consistem basicamente na introdução dos explantes, multiplicação e alongamento (pré-aclimatização), com o meio de cultura adequado para cada etapa. Desta forma, a pré-aclimatização é uma etapa primordial para a etapa posterior de aclimatização, onde o material passa de um meio de cultura com citocininas, passando para um meio com ausência deste regulador de crescimento. Resultado disto é a promoção do crescimento vertical dos colmos (meristema apical caulinar), desenvolvimento de folhas e primórdios radiculares (meristema apical radicular) ainda no sistema *in vitro*, preparando as plantas para a aclimatização, com órgãos vegetativos desenvolvidos (VALE et al., 2019).

Durante a aclimatização parte das plantas acaba morrendo, entretanto, as plantas remanescentes renovam as raízes e sofrem um processo de estresse adaptativo, oriundo da alteração da temperatura, umidade relativa do ar, composição do substrato, buscando uma adaptação gradual das plantas para os fatores de campo, evitando perdas ainda maiores das plantas oriundas de micropropagação (SANDHU et al., 2018).

Neste aspecto, a espécie *Dendrocalamus asper* apresenta hábito de crescimento e floração bastante particulares, com métodos de propagação convencionais de baixa eficiência, exigindo métodos mais eficientes, como o sistema de propagação *in vitro*. Além disso, adaptar as plantas à condição *ex vitro* é fundamental para consumação do processo de produção de mudas micropropagadas, superando o gargalo de baixa disponibilidade de propágulos na cadeia produtiva nacional, almejando o suprimento de mudas em grande escala de forma padronizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M.P.; RAO, T.C.. *In vitro* culture of bamboo embryos. **Current Science**, v.37, p. 415, 1968.

ARAÚJO, R.M.; OLIVEIRA, A.; CUADRA, S.Y.; ALMEIDA, I.R.; WEBER, H. Condições agrometeorológicas para perfilhamento máximo da cultura de cana-de-açúcar em dois ambientes distintos de produção. **Revista da Sociedade Brasileira de Agrometeorologia**, v. 25, n.01, p. 257-264, 2017.

ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; DEV ARYA, I. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, v.18, p. 879-882, 1999.

ARYA, S.; SATSANGI, R.; ARYA, I.D.. Direct regeneration of shoots from immature inflorescences in *Dendrocalamus asper* (edible bamboo) leading to mass propagation. **Bamboo Science Culture**, v.21, p. 14–20, 2008.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L.. **Enraizamento de plantas lenhosas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1, p.261-96, 1998.

AZZINI, A.; CIARAMELLO D.; SALGADO, A. L. B. Velocidade de crescimento dos colmos de algumas espécies de bambu. **O Agrônomo**, Campinas, v.41, n.3, 1989.

AZZINI, A.; SALGADO, A.L.B. Enraizamento de propágulos de bambu em diferentes substratos. **Bragantia**, v. 52, n. 2, p. 113-118, 1993.

BENNETZEN, J. L.; MA, J.; DEVOS, K. M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. **Annals of Botany**, n.1, v.95, p. 127-132, 2007.

BERALDO, A.L., AZZINI, A.. **Bambu: características e aplicações**. Guaíba: Livraria Editora Agropecuária, 2004. 180p.

BPG - Bamboo Phylogeny Group. An updated tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v. 24, n.1, p. 1-10, 2012.

BYSTRIAKOVA, N.; KAPOS, V.; LYSENKO, I.. **Bamboo Biodiversity**. UNEPWCMC/INBAR, 2004.

CHAMBERS, S.M.; HEUCH, J.H.R.; PIRRIE, A. Micropropagation and *in vitro* flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, p. 45-48, 1991.

CHANG, W.C.; HO, C.W.. Micropropagation of bamboos. In: Bajaj YSP (ed) High-tech and micropropagation V. **Springer**, Berlin, p. 203–219, 1997.

COMPTON, M.E.; PREECE, J.E.. Exudation and explant establishment. **IAPTC News**, v.50, p. 09-18, 1986.

CORTES, L.F.B. Reproducción de la *Guadua angustifolia* por el método de chusquines. **International Network for bamboo and rattan (INBAR)**, p. 16, 2013.

DANTAS, A.B. et al.. **O uso do bambu na construção do desenvolvimento sustentável**. Instituto do Bambu. Maceió. Instituto do Bambu, 2005. 84p.

DAQUINTA, M.; GREGORI, A.; CID, M.; LEZCANO, Y.; SAGARRA, F. Formación de callos e inducción de brotes a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua angustifolia* Kunth. **Biociencia Vegetal**, v. 7, p. 119-122, 2007.

DAS M.; BHATTACHARYA, S.; SINGH, P.; FILGUEIRAS, T. S.; PAL, A.. Bamboo taxonomy and diversity in the era of molecular markers. **Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology**, v. 47, p. 226-239, 2008.

DESAI, R. J.; RAOLE, V. M.. Leaf micromorphological studies in subfamily Bambusoideae and pooideae from Gujarat, India. **Kathmandu University Journal Of Science, Engineering and Technology**, v.9, n.1, p. 37-47, 2013.

DRUMOND, P.M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. ICH: Rio de Janeiro. 1ed., 2017. 659p.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1976.

EVERT, R. F.. **Anatomia das plantas de Esau: Meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento**. São Paulo: Blucher, 2013.

FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. S. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **The journal of the American Bamboo Society**, v. 18, n. 01, p. 7-18. 2004.

FIOREZE, S.L.; VACARI, J.; TUREK, L.H.; DRUN, R.P. Componentes produtivos do trigo em função da temperatura no período de diferenciação de espiguetas. **Journal of Agroveterinary Sciences**, v.18, n.01, p. 24-32, 2019.

FISHER, J.B.; FRENCH, J.C. The occurrence of intercalary and uninterrupted meristems in the internodes of tropical monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 63, p. 510-525, 1976.

GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C.. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. (eds). Plant propagation by tissue culture. **Springer**, New York, p. 29–64, 2008.

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

GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K.; OPRINS, J.; DEBERGH, P.C.. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v.552, p. 195–204, 2011.

GOYAL, A.K.; SEN, A.. In vitro regeneration of bamboos, the “Green Gold”: an overview. **Indian Journal Biotechnology**, v.15, p. 09–16, 2016.

GRECO, T. M.; PINTO, M. M.; TOMBOLATO, A. F. C. Diversity of bamboo in Brazil. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**, v.23, n.1, p. 01-16, 2011.

HUANG, L.C.; LEE, Y.L.; HUANG, B.L.; KUO, C.I.; SHAW, J.F.. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. **In Vitro Cellular & Development Biology of Plant**, v.38, p. 358–365, 2002.

INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN (INBAR). **Bamboo and Rattan: for inclusive and green development**. Disponível em: <http://www.inbar.int>. Acesso em: 23 de maio de 2018.

JIMÉNEZ, V.M.. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, p. 91–110, 2005.

JIMÉNEZ, V.M.; GUEVARA, E.. Micropropagation of bamboo species through axillary shoot proliferation. In: JAIN, S.M.; HAGGMAN, H. (eds). **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Springer, Dordrecht, p. 465–476, 2007.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; STERN, M.J. **American Bamboos**. Washington, Smithsonian Institution Press, 1999.

KABADE, A.U.. **Studies on refinement of protocols for rapid and mass in vitro clonal propagation, evaluation of genetic fidelity and growth performance of bamboo species - *Bambusa bambos* (L.) Voss and *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) Nees**. Forest Research Institute Dehradun, 2009.

KIGOMO, B.N. Guidelines for growing bamboo. **Guidelines Series**, n. 4, p. 59, 2007.

KLIEBENSTEIN, D.J.. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a review through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. **Plant Cell Environmental**, v.27, p. 675-684, 2004.

KUMAR, V.; BANERJEE, M. Albino regenerants proliferation of *Dendrocalamus asper* in vitro. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.10, n.1, p. 09-13, 2014.

LIESE, W.. **The anatomy of bamboo culms**. Technical Report, 1998.

LIESE, W.. **Structures of a bamboo culm affecting its utilization**. **Proceedings of International Workshop on Bamboo Industrial Utilization**, p. 01-08, 2003.

LIESE, W. **Preservation of a bamboo culm in relation to its structure**. In: Simposio Internacional Guadua, 2004.

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.

LIN, W.C. **The bamboos Thailand**. Taiwan: Taiwan Forestry Research Institute, 1968, 52 p.

LONDOÑO, X. Evaluation of bamboo resources in Latin America. **INBAR Working Paper**, v. 35, p. 1-30, 2001.

LONDOÑO, X.. **Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del nuevo mundo**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2002.

LONDOÑO, X.; KOBAYASHI, M. Comparative study of the silica bodies of *Bambusa* and *Guadua*. **Caldasia**, v.16, p. 407-441, 2001.

MAIA, C.P.; BARBOSA, D.P.; SANTOS, L.F.C.; PEREIRA, N.L.; GUIMARÃES, A.K.V. Caracteres produtivos do sorgo híbrido SS-318 submetido a doses de nitrogênio. **Revista Agroecossistemas**, v. 09, n. 02, p.53-65, 2017.

MALANIT, P.; BARBU, M. C.; FRÜWALD, A.. Physikalische und mechanische Eigenschaften von Furnierstreifenholz (OSL) aus einer asiatischen Bambusart (*Dendrocalamus asper* Backer). **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 69, n. 1, p. 27-36, 2011.

MANHÃES, A.P.. **Caracterização da cadeia produtiva do bambu no Brasil: Abordagem preliminar**. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Florestal – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2008. 39p.

MARINHO, N. P. **Características das fibras do bambu (*Dendrocalamus giganteus*) e potencial de aplicação em painéis de fibra de média densidade (mdf)**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica e de Materiais – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba. 2012. 144p.

MATOS, JR. **Bambus como recurso florestal: suas aplicações, manejo, silvicultura, propagação, entomologia e a situação no DF**. Monografia. Brasília: Universidade de Brasília, 2004.

MCCLURE, F. A.. **The bamboos**. Boston: Havard University, 1966.

METCALFE, C. R.. **Anatomy of the Monocotyledons I. Gramineae**. Oxford: Clarendon Press, 1960.

MONTIEL, M.; SÁNCHEZ, E. Ultraestrutura de bambúes del género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) cultivados en Costa Rica III: *Dendrocalamus giganteus*. **Ver. Biol. Trop.** v.54, n.2, p.59-63, 2006.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v.15, p. 473–497, 1962.

NADHA, H.K.; SALWAN, R.; KASANA, R.C.; ANAND, M. SOOD A. Identification and elimination of bacterial contamination during *in vitro* propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 30, p. 93-97, 2012.

NAUTIYAL, S.; NEGI, S.S.; BISWAS, S.; RATHORE, R.K.. **Farmers friendly cost effective propagation technique of bamboo**. In: International conference on improvement of bamboo productivity and marketing for sustainable livelihood. Cane and Bamboo Technology Centre, New Delhi, p. 253–271, 2008.

OGITA, S.; KASHIWAGI, H.; KATO, Y.. *In vitro* node culture of seedlings in bamboo plant, *Phyllostachys meyeri* McClure. **Plant Biotechnology**, v.25, p.381–385, 2008.

OPRINS, J.; GRUNEWALD, W.; GILLIS, K.; DELAERE, P.; PEETERS, H.; GIELIS, J.. **Micropropagation: a general method for commercial bamboo production**. In: 7th world bamboo congress, New Delhi, 2014.

ORNELLAS, T.S.; WERNER, D.; HOLDERBAUM, D.F.; SCHERER, R.F.; GUERRA, M.P. Effects of vitrofural, BAP and meta-Topolin in the *in vitro* culture of *Dendrocalamus asper*. **Acta Horticulture**, v. 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.

QISHENG, Z.; SHENXUE, J.; YONGYU, T. **Industrial utilization on bamboo**. INBAR: Technical Report, n. 26, 2001.

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

RAMANAYAKE, S.M.S.D. Flowering in bamboo: An enigma. **Ceylon Journal Science (Biological Science)**, v. 35, p. 95-105, 2006.

RAO, A. N. Anatomical studies on certain bamboos growing in Singapore. **The Journal of the American Bamboo Society**. International Bamboo Workshop, p. 209-226, 1985.

SALGADO, A.L.; GREGO, C.R. **A utilização do bambu como alternativa econômica para o semi- -árido**. Anais do 10<sup>a</sup> Agrinordeste, p.7-8, 2002.

SALOMÃO, L.C.C.; SIQUEIRA, D.L.; LINS, L.C.R.; CECON, P.R. Development and production of banana tree derived from different types of seedlings. **Revista Ceres**, Viçosa, v.63, n. 03, p. 340-347, 2016.

SANDHU, M.; WANI, S.H.; JIMÉNEZ, V.M.. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.132, p. 27-53, 2018.

SANTOS, A.B.; STONE, L.F.; HEINEMANN, A.B.B.; SANTOS, T.P.B. Physiological indices of irrigated rice affected by flooding and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 64, n. 02, p. 122-131, 2017.

SCHRODER, Stephane. *Dendrocalamus asper*. **Guadua Bamboo**. 2010.

SEETHALAKSHMI, K.; JJEESH, C.M.; UNNI, K.K.. **Traditional methods for bamboo propagation in nursery**. In: International conference on improvement of bamboo productivity and marketing for sustainable livelihood. The Cane and Bamboo Technology Centre, New Delhi, p. 28–36, 2008.

SHIRGURKAR, M.V.; THENGANE, S.R.; POONAWALA, I.S.; JANA, M.M.; NADGAUDA, R.S.; NASCARENHAS, A.F.. A simple *in vitro* method of propagation and rhizome formation in *Dendrocalamus strictus* Nees.. **Current Science**, v.70, p. 940–943, 1996.

SINGH, M.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S.. Thidiazuron-induced shoot multiplication and plant regeneration in bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees). **Journal Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.10, p. 133–137, 2001.

SORENG, R.J.; PETERSON, P.M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; ZULOAGA, F.O.; JUDZIEWICZ, E.J.; FILGUEIRAS, T.S.; DAVIS, J.I.; MORRONE, O.. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematic and Evolution**, v. 53, p. 117–137, 2015.

SOUZA, E.B. **Estudo da viabilidade técnica para o cultivo de bambu gigante (*Dendrocalamus giganteus*) em Planaltina-DF**. UPIS – Faculdades Integradas, Boletim Técnico, p.46, 2010.

SUNGKAEW, S.; STAPLETON, C.M.A.; SALAMIN, N. & HODKINSON, T.R. Nonmonophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): A multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s.s.. **Journal of Plant Research**, v.122, p. 95- 108, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed., Artmed, 2009, 820p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, 2013. 918 p.

TAVARES, L.C.; LEMES, E.S.; BRUNES, A.P.; OLIVEIRA, S.; MENDONÇA, A.O.; VILLELA, F.A. Suplementação de boro na sementeira e no perfilhamento em cevada. **Ciências Agrárias**, v.61, p. 01-07, 2018.

TOMAZELLO-FILHO, M; AZZINI, A. Estrutura anatômica, dimensões das fibras e densidade básica de colmos de *Bambusa vulgaris* Schrad. **IPEF**, n.36, p. 43-50, 1987.

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

VALE, P.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.; COSTA, F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. Height and number of shoots on the survival and development of micropropagated bamboo plantlets during pre-acclimatization. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 49, p. e53751, 2019.

VELLER, C.; NOWAK, M. A.; DAVIS, C. C. Extended flowering intervals of bamboos evolved by discrete multiplication. **Ecology Letters**, online first, 2015.

WAIKHOM, S.D.; SHARMA, G.J.. In vitro propagation of *Arundinaria callosa* Munro. an edible bamboo from nodal explants of mature plants. **Open Plant Science Journal**, v.3, p. 35–39, 2009.

WIJAYANI, A.; SUPRIYANTA, B.; SRILESTARI, R. Acclimatization of *Chrysanthemum* plantlet after gamma ray irradiation. **Journal of Advanced Agricultural Technologies**, v.05, n.03, p. 257-260, 2018.

ZHAO, X.Y.; WANG, X.Y.; ZHAO, L.; ZHANG, X. M.; CHEN, S. Y.; MA, P. F; HU, X. Y.; LI, D. Z.; GUO, Z. H. Investigating the microRNAs of two developmental phases of *Dendrocalamus latiflorus* (Poaceae:Bambusoideae) inflorescences. **Plant Molecular Biology Reporter**, online first, 2014.

#### 4. CAPÍTULO I - PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA ESPÉCIE *DENDROCALAMUS ASPER* NA FORMA DE AGLOMERADOS DE COLMOS (*CLUSTERS*).

##### RESUMO

A espécie *Dendrocalamus asper* quando submetida ao sistema de propagação *in vitro* apresenta respostas de multiplicação, oxidação e alterações morfológicas no material vegetal. O processo de micropropagação é indispensável, apresentando vantagens e limitações, parte destas podem estar associada à forma de disposição do material *in vitro* na forma de colmos individualizados ou aglomerados. Neste aspecto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da propagação de colmos individualizados e aglomerados, com tratamentos contendo diferentes números de colmos aglomerados, sobre a taxa de multiplicação, oxidação e albinismo do material vegetal, assim como, eficiência de uso do meio de cultura e geração de brotos no período de 180 dias, descrevendo anatomicamente o surgimento de novas brotações. Dos resultados obtidos observou-se que o tratamento apresentando maior taxa de multiplicação foi o tratamento T03 (Quatro aglomerados de três colmos). A menor taxa de oxidação foi observada no tratamento T06 (Três aglomerados de seis colmos), sendo identificados dois processos de oxidação neste estudo, um deles oriundo do contato do tecido vegetal com o meio de cultura contendo 6-benzilaminopurina e outro do senescimento do material vegetal no centro dos grandes aglomerados de colmos. A menor taxa de albinismo foi observada no tratamento T01 (Cinco colmos individualizados). Observou-se que as brotações se originam de células presentes na base dos colmos, na região meristemática do rizoma. O tratamento que apresentou melhor desempenho foi o tratamento T03, com a maior taxa de multiplicação, baixa taxa de albinismo e taxa de oxidação aceitável, além de elevada eficiência no uso do meio de cultura e na geração de novos brotos no período de 180 dias.

**Palavras-chave:** Multiplicação *in vitro*, Anatomia, Multiplicação, Oxidação, Albinismo.

##### ABSTRACT

The species *Dendrocalamus asper* when submitted to the *in vitro* propagation system presents multiplication, oxidation and morphological changes in the plant material. The micropropagation process is essential, with advantages and limitations, part of which may be associated with the way in which the material is disposed *in vitro* in the form of individualized or clusters culms. In this respect, the objective of this work was to evaluate the influence of the propagation of individualized and clusters culms, with treatments containing different numbers of clusters culms, on the multiplication rate, oxidation and albinism of plant material, as well as efficiency of use of the culture and generation of shoots in the period of 180 days, anatomically describing the appearance of new shoots. From the results obtained, it was observed that the treatment with the highest multiplication rate was the T03 treatment (Four clusters of three culms). The lowest oxidation rate was observed in treatment T06 (Three clusters of six culms), two oxidation processes were identified in this study, one of them coming from the contact of the plant tissue with the culture medium containing 6-benzylaminopurine and the other from the senescence of the material plant in the center of the large clumps of culms. The lowest rate of albinism was observed in treatment T01 (Five individualized culms). It was observed that the shoots originate from cells present at the base of the culms, in the meristematic region of the rhizome. The treatment that showed the best performance was the T03 treatment, with the highest multiplication rate, low albinism rate and acceptable oxidation rate, in addition to high efficiency in the use of the culture medium and in the generation of new shoots in the period of 180 days.

**Keywords:** *In vitro* multiplication, Anatomy, Multiplication, Oxidation, Albinism.

## 4.1 Introdução

Os bambus são um grupo de plantas pertencentes à família Poaceae, subfamília Bambusoideae, composta por 240 gêneros e 1641 espécies distribuídas amplamente na Ásia e na América do Sul, sendo o continente asiático o centro de referência para 61% das espécies descritas (SORENG et al. 2015).

O *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Baker ex K. Heyne é uma espécie do sudeste asiático, de região tropical e conhecida pelo seu grande tamanho. Os colmos maduros e sua biomassa são usadas como biocombustível, fibra, alimento e madeira. (SINGH et al., 2013). O *D. asper* é convencionalmente propagado por aglomerados, enraizamento de estacas, pedaços de rizoma e menos frequentemente por sementes (NADHA et al., 2012).

Os métodos convencionais de propagação são considerados ineficientes por apresentarem multiplicação lenta, plântulas desuniformes, problemas fitossanitários e variações produtivas entre plantas (SINGH et al., 2013).

A propagação *in vitro* das espécies é uma alternativa na solução de problemas de propagação tradicionais. O método de propagação *in vitro* permite a produção de mudas geneticamente idênticas (clones), com padrão fisiológico e sanitário conhecidos. Os explantes são selecionados em regiões meristemáticas de plantas progenitoras conhecidas e são inoculados estéreis *in vitro*. Os principais benefícios do método são: alta eficiência de propagação, ausência de patógenos e seleção de materiais padronizados, entretanto, esta técnica apresenta problemas de oxidação e variações morfológicas no padrão vegetal, com demandas de aperfeiçoamento (SANDHU et al., 2018).

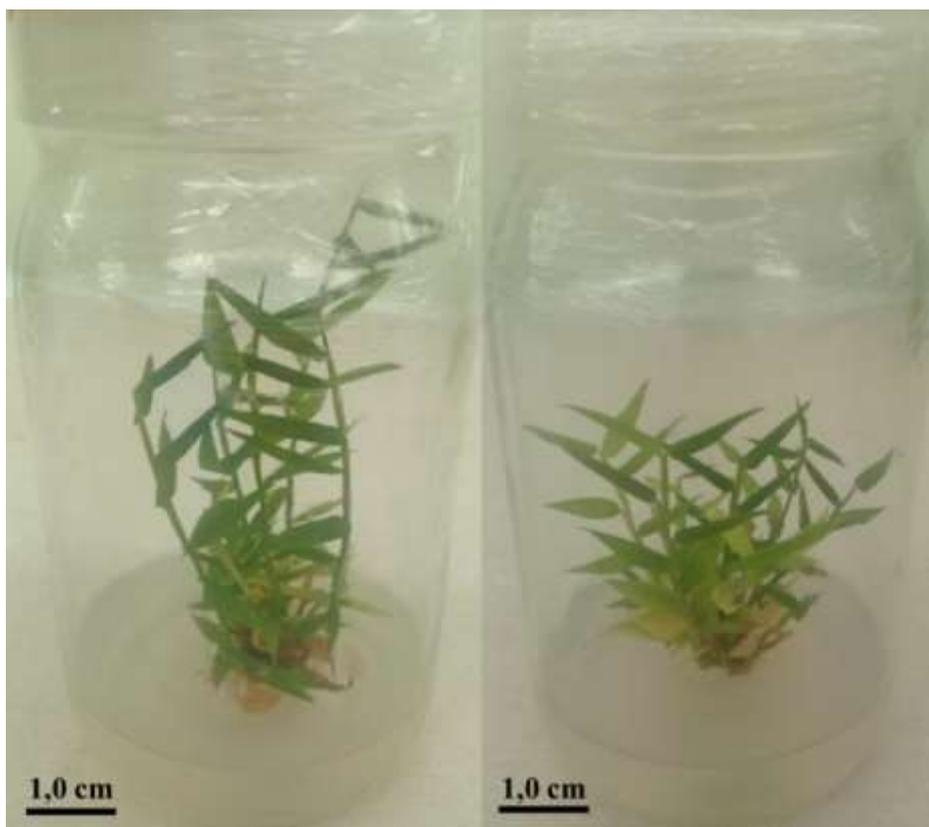
A maioria dos bambus cresce naturalmente em colmos aglomerados (hábito entouceirante), o efeito da propagação de brotos agrupados *in vitro* simulando as condições de desenvolvimento natural inerentes à espécie pode afetar a eficiência do método de micropropagação de forma positiva (ORNELLAS et al., 2017).

Levando em consideração esses aspectos, no presente estudo avaliou-se a propagação da espécie na forma de colmos aglomerados no comportamento do material vegetal *in vitro*. Adicionalmente, foi avaliada a formação de brotos por microscopia óptica no processo de propagação, além da quantificação de carboidratos solúveis totais em diferentes posições de colmos no aglomerado.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Material Vegetal

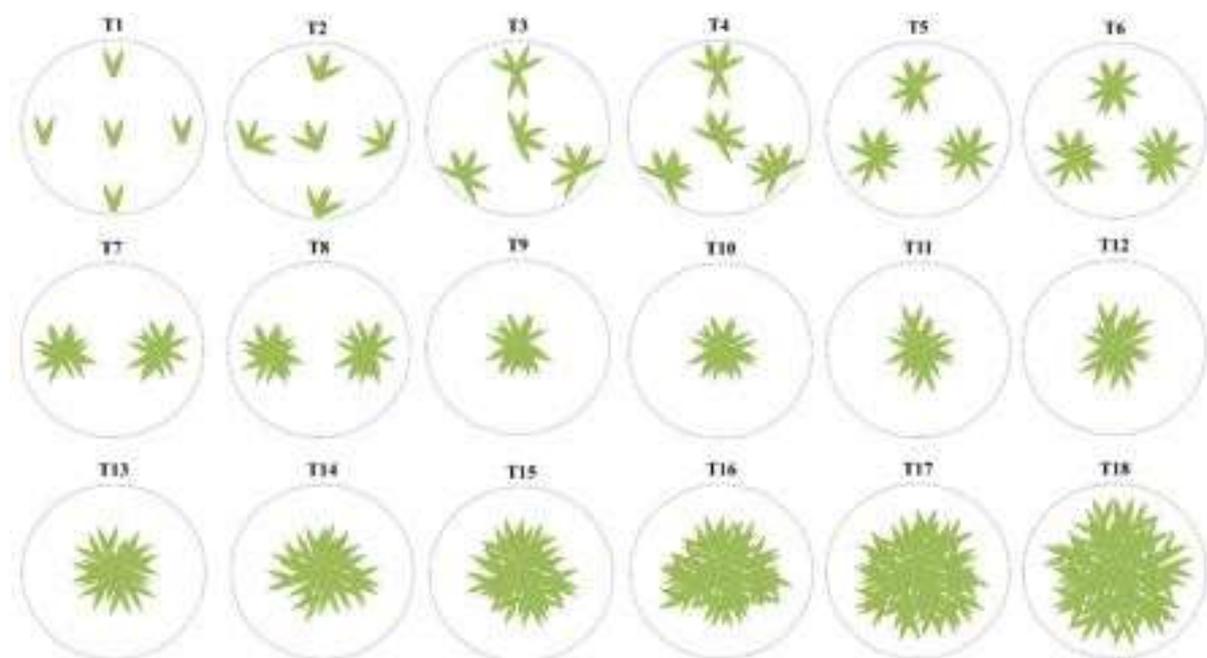
As sementes de *D. asper* foram introduzidas *in vitro* de acordo com Ornellas et al. (2017). As plântulas provenientes de sementes germinadas foram introduzidas em meio de cultura contendo sais basais da formulação MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 15 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e gelificado com 7,0 g.L<sup>-1</sup> de Ágar-Ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e submetido à esterilização em autoclave vertical por 20 minutos a 121 °C e 1,1 kgf.cm<sup>-2</sup>. O meio de cultura foi mantido em prateleira com luz LED branca (77,0 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>) a 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz. A subcultura foi realizada com intervalos de 30 dias para um meio de cultura fresco, permanecendo por 12 meses até que fosse obtido material suficiente para o experimento (Figura 01).



**Figura 01:** Plantas de *Dendrocalamus asper* estabelecidas *in vitro* em fase de multiplicação para obtenção de suficiência amostral.

#### 4.2.2 Experimento de *Clusters*

Os materiais vegetais foram selecionados pelo comprimento médio dos colmos ( $5,0 \pm 1,0$  cm) e pelo número de colmos agrupados. Os aglomerados de colmos foram cultivados em frascos (67,2 x 129,3 mm - 350,0 mL) contendo 40 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 5,0 mL.L<sup>-1</sup> de vitaminas de Morel, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 µM de 6-benzilaminopurina. O experimento teve 18 tratamentos, com 60 frascos por tratamento. Os tratamentos foram compostos por aglomerados de colmos iniciais, dispostos de forma distinta em cada tratamento visando o melhor aproveitamento do meio de cultura conforme apresentado na figura 02.



**Figura 02:** Representação esquemática dos frascos representando os tratamentos com números diferente de colmos por aglomerados e número diferente de aglomerados por frasco da espécie *Dendroclamus asper* no sistema de propagação *in vitro*. **Legenda:** T01. Cinco colmos individualizados; T02. Cinco aglomerados com dois colmos cada; T03. Quatro aglomerados com três colmos cada; T04. Quatro aglomerados com quatro colmos cada; T05. Três aglomerados com cinco colmos cada; T06. Três aglomerados com seis colmos cada; T07. Dois aglomerados com sete colmos cada; T08. Dois aglomerados com oito colmos cada; T09. Um aglomerado com nove colmos; T10. Um aglomerado com dez colmos; T11. Um aglomerado com doze colmos; T12. Um aglomerado com quatorze colmos; T13. Um aglomerado com dezoito colmos; T14. Um aglomerado com vinte e quatro colmos; T15. Um aglomerado com trinta colmos; T16. Um aglomerado com quarenta colmos; T17. Um aglomerado com cinquenta colmos; T18. Um aglomerado com sessenta colmos.

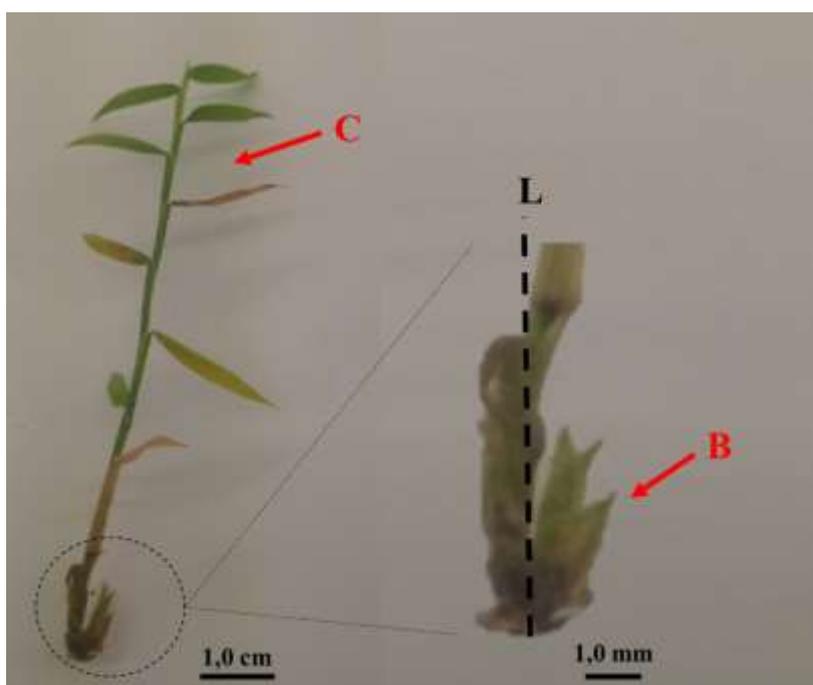
Os tratamentos com mais de um aglomerado de colmos por frasco foram posicionados a uma distância mínima de 2,0 cm entre eles. O experimento foi dividido em seis blocos

avaliados em intervalos de tempo de 30 dias até os 180 dias, com renovação simultânea do meio de cultura. As culturas foram mantidas em prateleiras com luz branca a  $25 \pm 2$  °C e 16h de fotoperíodo.

#### 4.2.3 Microscopia Óptica de Luz dos Brotos

A análise microscópica foi realizada em brotos novos de até 1,0 cm de comprimento originados dos colmos principais. Estes foram seccionados na área basal longitudinalmente, mantendo os tecidos do colmo principal e da nova brotação na prancha. Foram selecionadas nove amostras aleatórias, cortadas longitudinalmente (Figura 03). As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, tampão fosfato (pH 7,2), por 72 h sob vácuo ( $-20$  polegadas. Hg<sup>-1</sup>). Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão fosfato (pH 7,2) e desidratadas em séries etílicas 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%, duas vezes por série e 30 minutos em cada série.

Depois disso, o processo de infiltração com historesina e álcool etílico foi realizado, respectivamente, na proporção 20%:80%, 40%:60%, 60%:40%, 80%:20%, 100%:0%. As amostras foram finalizadas utilizando a historesina e seu ativador em moldes. Os blocos de resina foram secos por 72h a 36 °C. Os blocos de resina com material vegetal foram seccionados em um micrótomo @LEICA RM, os cortes foram corados com Azul de Toluidina em tampão fosfato 0,2M a pH 6,8 e as imagens foram capturadas com microscopio óptico de luz @LEICA DM 2500 com câmera acoplada @OPTICAM OPT 5.1.



**Figura 03:** Material vegetal de *Dendrocalamus asper* utilizado na análise de Microscopia Óptica de Luz. **Legenda:** C. Colmo desenvolvido; B. Novo broto; L. Corte longitudinal contendo a intersecção do colmo e a nova brotação.

#### 4.2.4 Avaliação Quantitativa do Material Vegetal

Dos aspectos quantitativos avaliados, foram calculadas as taxas de multiplicação, oxidação e albinismo de cada tratamento. A taxa de multiplicação avaliada foi responsável pela proporção de novos brotos por colmos, após 30 dias, calculada pela fórmula:  $TM = \frac{\text{Novos Brotos}}{\text{Colmos}}$ . Foram considerados brotos novos, aqueles de até 1,0 cm de comprimento.

A taxa de oxidação avaliada levou em consideração a proporção de brotações oxidadas por colmos, após 30 dias, calculada pela fórmula:  $TO = \frac{\text{Brotos Oxidados}}{\text{Colmos}}$ . Os brotos oxidados considerados foram aqueles que apresentaram tecido escurecido e início de necrose.

A taxa de albinismo avaliada representou a proporção de brotos albinos gerados por colmo, após 30 dias, calculada pela fórmula:  $TA = \frac{\text{Brotos Albinos}}{\text{Colmos}}$ . Os brotos albinos considerados foram aqueles com tecido apresentando ausência de clorofila total ou parcial na forma de variação.

A eficiência dos tratamentos levou em consideração o número de brotos gerados por litro de meio de cultura e número de brotos totais gerados ao final do período de multiplicação *in vitro* (180 dias), almejando o tratamento com número de brotos maximizados, mitigação do uso de reagentes e tempo de micropropagação delimitado.

#### 4.2.5 Quantificação de Carboidratos

A análise de carboidratos foi realizada em 15 repetições nos tratamentos T1, T3, T6, T12 e T18. Os novos brotos, com até 1,0 cm de comprimento, de cada tratamento foram separados dos colmos desenvolvidos, sendo avaliados os materiais periféricos novos e centrais do aglomerado.

De cada tratamento foi selecionado 1,0 g do material fresco para a extração dos carboidratos solúveis totais, sendo este material pesado e macerado em nitrogênio líquido (-196 °C). As amostras foram submetidas ao método Dubois et al. (1956), visando quantificar os açúcares solúveis totais, tendo sido realizadas consecutivas centrifugações (10 min. / 3000 rpm) e aquecimentos em banho maria (5 min. / 70°C) de forma alternada, por três vezes. Posteriormente, as amostras centrifugadas foram filtradas, sendo o sobrenadante filtrado submetido à análise de carboidratos solúveis totais. As amostras extraídas foram submetidas a uma curva de calibração, sendo lidas em um espectrofotômetro de luz.

#### **4.2.6 Análise Estatística**

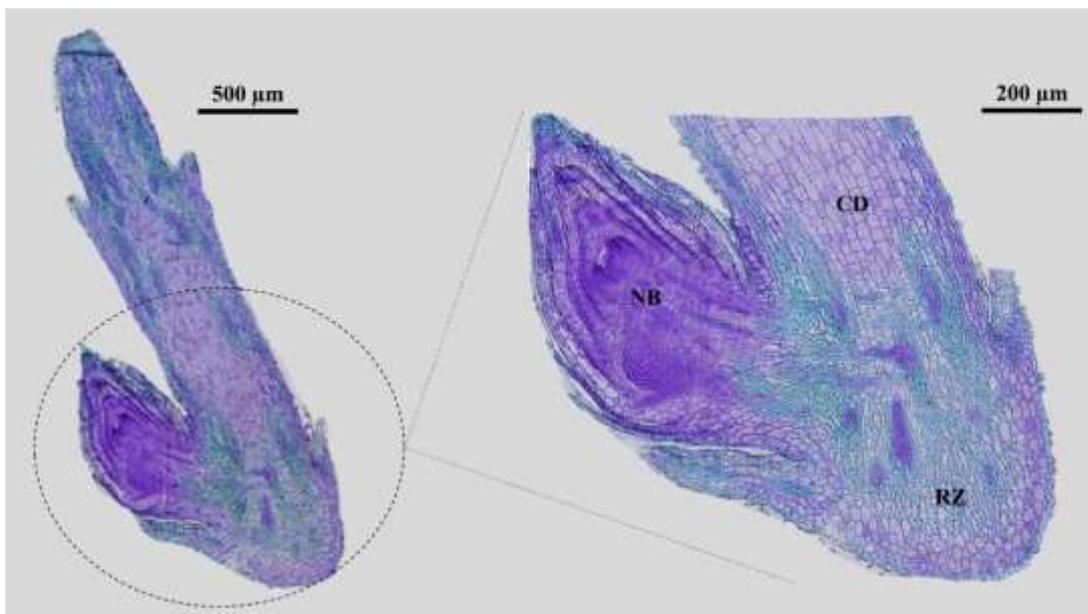
As taxas de multiplicação, oxidação e albinismo foram submetidas à análise de variância e ao teste de separação média de Duncan (5%) e curva de tendência dos dados. Os dados de leitura de carboidratos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação médias (Duncan 5%). Os dados absolutos de eficiência de uso do meio de cultura e geração de brotos no período foram analisados em gráfico de barras e curva de tendência, respectivamente. As imagens microscópicas com cortes longitudinais da intersecção dos brotos com os colmos foram submetidas à análise descritiva, identificando as estruturas observadas e comparando à literatura pré-existente.

### **4.3 Resultados e Discussão**

#### **4.3.1 Anatomia do Material Vegetal**

Ao observar as imagens microscópicas do colmo da espécie *Dendrocalamus asper* submetida ao processo de propagação *in vitro*, observa-se o surgimento de nova brotação em resposta ao contato com meio de cultura contendo BAP, broto este que teve origem na base do colmo, que permaneceu em contato com o regulador de crescimento vegetal do grupo das citocininas. Os cortes longitudinais do tecido mostram que a nova brotação se origina de gemas laterais presentes no rizoma localizado na base do colmo (Figura 04).

O broto apresentou pequenos folículos de proteção ao seu redor, além de células pequenas e densamente agrupadas, desde a região de origem, na base do colmo, até o centro da nova brotação. Ao observar o colmo principal as células apresentam-se alongadas, com maior tamanho e menos adensadas em uma única região. O corante Azul de Toluidina apresentou diferentes respostas de coloração quando em contato com as células do colmo principal e quando em contato com as células do novo broto. O corante atuou com tom azul esverdeado nos feixes centrais do colmo desenvolvido e tom violeta escuro nas suas extremidades e células da nova brotação.



**Figura 04:** Microscopia óptica de luz de colmo de *Dendrocalamus asper* na região de intersecção do colmo com o novo broto no sentido longitudinal. **Legenda:** CD. Colmo Desenvolvido; RZ. Rizoma na base do colmo; NB. Nova Brotação. (apontamento da região meristemática)

De acordo com O'Brien et al. (1964), o corante azul de toluidina quando manifesta coloração azul esverdeada manifesta presença de tecidos lignificados, comumente associado à esclerênquimas, células com função de sustentar e proteger tecidos anteriormente desenvolvidos. O mesmo autor relata que a presença de coloração violeta e arroxeadada manifesta a presença de parênquimas. Analisando a figura 04, observa-se, portanto, maior presença de tecidos lignificados no colmo desenvolvido, enquanto que, na nova brotação, as células predominantes apresentam maior quantidade de células parenquimáticas, muito comuns em tecidos novos e que originam outras células.

Como pode ser observado, os tecidos vegetais da espécie *Dendrocalamus asper* apresentam alterações anatômicas quando submetidos ao meio de cultura com citocinina (BAP) na fase de multiplicação, ocorrendo respostas associadas à divisão celular e surgimento de novas brotações. De acordo com as imagens obtidas, as novas brotações se originam de regiões meristemáticas presentes na base dos colmos, como observado no corte longitudinal da região de intersecção do colmo com sua nova brotação (Figura 04).

Observou-se também, que há um aglomerado de células pequenas com capacidade de multiplicação na região basal dos colmos estendo-se até a iniciação dos brotos novos, confirmando a presença de meristemas.

A resposta intensificada do processo de multiplicação é oriunda do contato das gemas basais do caule com o meio de cultura contendo regulador de crescimento do grupo das citocininas (BAP). O BAP ao entrar em contato com os receptores celulares meristemáticos desencadeia uma cascata de sinalização celular interna, promovendo a inibição da dominância apical dos colmos (crescimento vertical) e estimulando brotações laterais (TAIZ, ZEIGER, 2013).

### 4.3.2 Quantificação do comportamento *in vitro*

#### 4.3.2.1 Taxa de Multiplicação do Material Vegetal

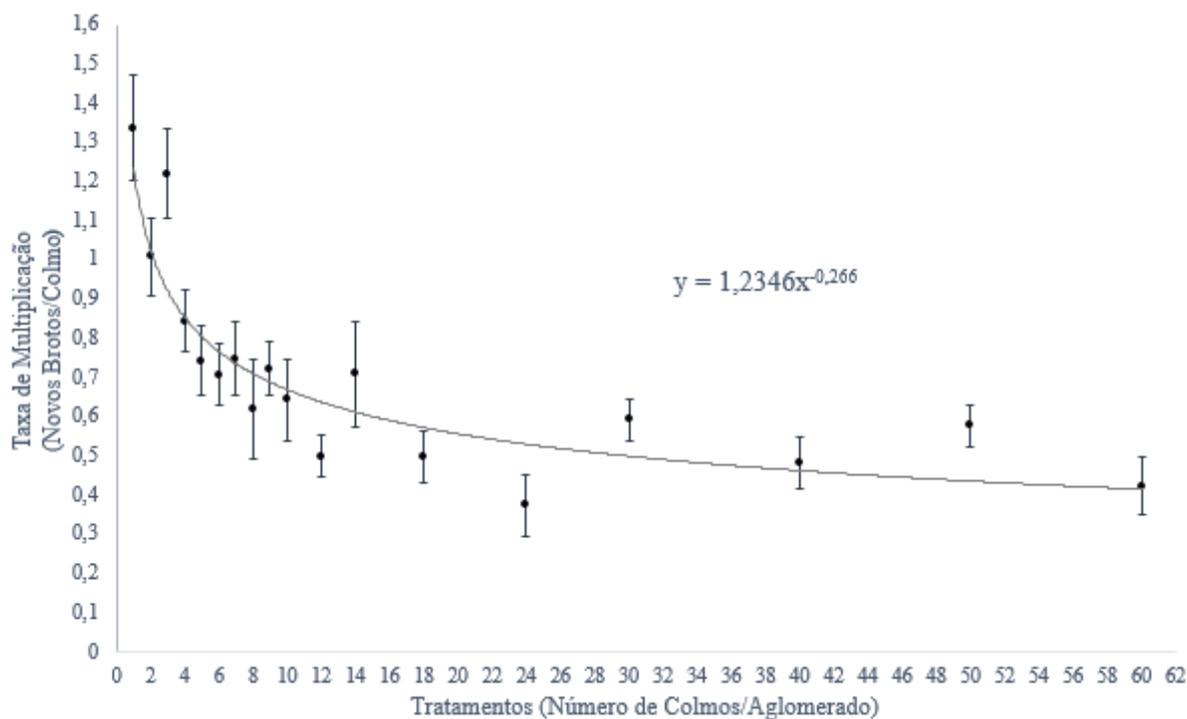
Os tratamentos com diferentes números de colmos aglomerados submetidos ao meio de cultura contendo BAP apresentaram diferenças significativas no que diz respeito ao número médio de brotos propagados por colmo, refletido pela taxa de multiplicação, dos materiais submetidos ao sistema de propagação *in vitro*.

As maiores taxas de multiplicação foram observadas no tratamento T01 (cinco colmos individualizados), com taxa de multiplicação de  $1,337 \pm 0,133$  novos brotos por colmo, e no tratamento T03 (quatro aglomerados de três colmos), com taxa de multiplicação de  $1,219 \pm 0,114$  novos brotos por colmo, estatisticamente iguais. As menores taxas de multiplicação são observadas no tratamento T14 (um aglomerado com 24 colmos), com taxa de multiplicação de  $0,376 \pm 0,079$  brotos por colmo, e nos tratamentos T18 ( $0,424 \pm 0,074$  brotos por colmo), T16 ( $0,485 \pm 0,066$  brotos por colmo), T13 ( $0,499 \pm 0,064$  brotos por colmo) e T11 ( $0,501 \pm 0,055$  brotos por colmo), que não diferem significativamente entre si (Tabela 01).

**Tabela 01:** Taxa de multiplicação média dos diferentes tratamentos da espécie *Dendrocalamus asper* submetidos à propagação *in vitro* (Duncan 5%).

Trat.	Taxa de Multiplicação	Trat.	Taxa de Multiplicação	Trat.	Taxa de Multiplicação
T01	$1,337 \pm 0,133$ <b>a</b>	T09	$0,724 \pm 0,068$ <b>c</b>	T17	$0,579 \pm 0,053$ <b>d</b>
T03	$1,219 \pm 0,114$ <b>a</b>	T12	$0,709 \pm 0,135$ <b>c</b>	T11	$0,501 \pm 0,055$ <b>e</b>
T02	$1,008 \pm 0,099$ <b>b</b>	T06	$0,707 \pm 0,079$ <b>c</b>	T13	$0,499 \pm 0,064$ <b>e</b>
T04	$0,844 \pm 0,079$ <b>c</b>	T10	$0,645 \pm 0,104$ <b>d</b>	T16	$0,485 \pm 0,066$ <b>e</b>
T07	$0,749 \pm 0,093$ <b>c</b>	T08	$0,62 \pm 0,126$ <b>d</b>	T18	$0,424 \pm 0,074$ <b>e</b>
T05	$0,743 \pm 0,09$ <b>c</b>	T15	$0,593 \pm 0,055$ <b>d</b>	T14	$0,376 \pm 0,079$ <b>f</b>

Observou-se também um padrão de taxa de multiplicação inversamente proporcional ao aumento do número de colmos aglomerados (Figura 05).



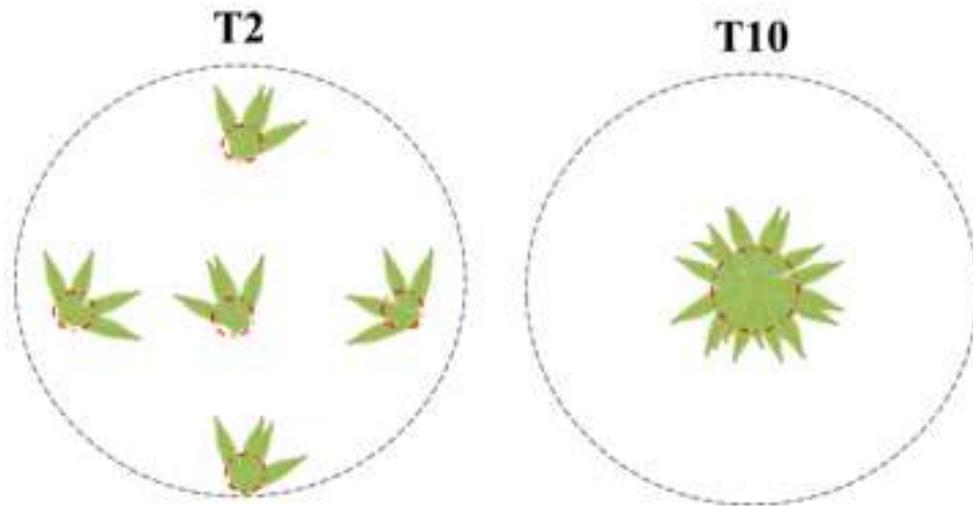
**Figura 05:** Tendência da taxa de multiplicação média dos tratamentos com diferentes números de colmos aglomerados da espécie *Dendrocalamus asper* submetidos ao sistema de propagação *in vitro*.

Os estudos mostram mudança no padrão de comportamento do material vegetal quanto à taxa de multiplicação, havendo diminuição desta quando os colmos estão aglomerados em maior número. Por sua vez, colmos individualizados ou aglomerados em menor número apresentam uma taxa de multiplicação expressivamente maior.

Parte do efeito observado embasa-se na área vegetal dos colmos em contato com o meio de cultura, sendo que colmos individualizados apresentam maior área superficial relativa em contato com o meio ( $1,71 \text{ mm}^2 \cdot \text{colmo}^{-1}$ ), permitindo que os nutrientes minerais e os reguladores de crescimento sejam absorvidos em concentrações maiores pelo contato de um maior número de células com o meio de cultura. Portanto, há uma alteração no padrão de crescimento e desenvolvimento do material vegetal. O contato intensificado com o meio de cultura contendo citocinina leva os colmos a uma maior eficiência de multiplicação.

Por sua vez, os aglomerados com elevado número de colmos, apresentam menor área relativa por colmos em contato com o meio de cultura, em especial, quando levado em consideração os colmos mais centrais do aglomerado (menos contato) e os periféricos (mais contato). Os colmos da periferia, possivelmente pela maior área de contato com o meio, apresentam maior vigor de multiplicação em detrimento dos colmos centrais, com menor vigor,

resultando em uma taxa de multiplicação média dos colmos do aglomerado inferior à taxa de multiplicação dos tratamentos com colmos individualizados ( $1,25 \text{ mm}^2 \cdot \text{colmo}^{-1}$ ) (Figura 06).



**Figura 06:** Diferença de área de contato dos colmos de *Dendrocalamus asper* com o meio de cultura, quando individualizados (T02) e aglomerados (T10) contendo o mesmo número de colmos em ambos.

Os colmos dispostos em aglomerados no processo de propagação *in vitro*, estão conectados por áreas basais de mesma origem meristemática, condição semelhante ao que ocorre com touceiras da espécie no ambiente *in vivo*. A interconexão entre colmos leva a um balanço de translocação de solutos, com uma relação fonte e dreno entre colmos interconectados (TAIZ, ZEIGER, 2013).

A translocação entre colmos é observada em espécies de bambu com hábito de crescimento entouceirante, assim como, em bananeira e outras gramíneas como trigo e arroz, plantas estas que apresentam emissão de perfilhos ligados por feixes vasculares, estes que redistribuem a seiva contendo carboidratos e outros sais, com o objetivo de equilibrar a razão de crescimento entre colmos (TAIZ, ZEIGER, 2013; SANTOS et al., 2017; FIOREZE et al., 2019; TAVARES et al., 2018; SALOMÃO et al., 2016).

Os antecedentes científicos descrevem que a propagação *in vitro* do *Dendrocalamus asper* foi conduzida utilizando os mais variados propágulos, em especial, sementes e segmentos nodais. As taxas de multiplicação *in vitro* de maior sucesso são oriundas de propágulos na forma de sementes, com taxas de 0,5 a 0,98 novos brotos por colmos (JIMENÉZ; GUEVARA, 2007; LIN et al., 2012; MUDOI et al., 2013; GOYAL; SEN, 2016).

De acordo com Ornellas et al. (2017) a taxa de multiplicação *in vitro* média para a mesma espécie foi de 0,69 novos brotos gerados por colmo, com maximização do processo em meio de cultura contendo 15 µM de BAP. Entretanto, trabalhos anteriores apresentam taxas de multiplicação *in vitro* superiores para a mesma espécie, contendo as mesmas concentrações de BAP, com taxa de multiplicação de 0,80 brotos gerados por colmos (ZANG et al., 2019), 0,90 novos brotos por colmo (SINGH et al., 2012) e 0,95 novos brotos por colmo (BENERJEE et al., 2011), tendo portanto, taxas de multiplicação semelhantes às aquelas observadas nos tratamentos iniciais deste estudo.

Quando comparado ao gênero *Bambusa* spp., observa-se uma diferença abrupta na taxa de multiplicação, com médias que variam de 0,20 a 0,45 novos brotos gerados por colmos em um intervalo de 30 dias sob a mesma concentração de BAP (MUDOI et al, 2014). Os principais problemas observados para a espécie *Dendrocalamus asper* submetida aos sistemas de propagação *in vitro* foram as flutuações na taxa de multiplicação de alguns materiais, originadas de mudanças nas características morfofisiológicas dos tecidos, como oxidação e mudanças abruptas nos componentes do meio de cultura, segundo os estudos de Gielis et al. (2011).

#### 4.3.2.2 Quantificação de Carboidratos Solúveis Totais

Ao observar a concentração de açúcares solúveis totais nos diferentes tratamentos, o tratamento T01 (cinco colmos individualizados) apresentou as maiores concentrações de açúcares solúveis totais na matéria fresca de seus colmos, com  $6,67 \pm 0,32$  mg.g MF<sup>-1</sup>, quando comparado com outros tratamentos com colmos aglomerados. As menores concentrações médias de açúcares foram observadas no tratamento T18 (sessenta colmos aglomerados), contendo concentração média de  $2,86 \pm 0,37$  mg.g MF<sup>-1</sup>. Há portanto, um relação inversamente proporcional entre quantidade de açúcares solúveis totais na matéria fresca e o número de colmos aglomerados (Tabela 02).

Na quantificação de carboidratos solúveis totais observou-se diferença de concentração nos materiais vegetais dos brotos novos da periferia do aglomerado e colmos desenvolvidos no centro do aglomerado. Os brotos novos posicionados majoritariamente na periferia destes, onde há maior taxa de multiplicação média, apresentaram menor concentração de carboidratos, quando comparados colmos internos, que apresentam concentrações médias maiores de carboidratos.

**Tabela 02:** Concentrações médias de carboidratos solúveis totais (mg.g MF<sup>-1</sup>) em colmos provenientes dos tratamentos T01, T03, T06, T12 e T18 da espécie *Dendrocalamus asper* em sistema de propagação *in vitro*, submetidos ao teste de comparação de médias (Duncan 5%). Letras minúsculas comparando tratamentos e maiúsculas comparando posição dos colmos na touceira.

Posição do Colmo	Tratamentos				
	T01	T03	T06	T12	T18
Broto Externo (mg/g.MF-1)		3,73 ± 0,43 <b>Ba</b>	3,40 ± 0,33 <b>Ba</b>	3,06 ± 0,10 <b>Bb</b>	2,57 ± 0,56 <b>Bb</b>
Colmos Internos (mg/g.MF-1)		5,18 ± 0,23 <b>Aa</b>	4,17 ± 0,45 <b>Ab</b>	3,61 ± 0,22 <b>Ac</b>	3,14 ± 0,17 <b>Ad</b>
Média Total (mg/g.MF-1)	6,67 ± 0,32 <b>a</b>	4,46 ± 0,33 <b>b</b>	3,79 ± 0,39 <b>c</b>	3,34 ± 0,16 <b>d</b>	2,86 ± 0,37 <b>e</b>

A interconexão entre os colmos acarreta em uma redistribuição dos assimilados na forma de carboidratos solúveis totais e outros nutrientes, sendo que quanto maior o número de colmos aglomerados, maior este processo de redistribuição, nesse caso, diminuindo o vigor no processo de multiplicação dos colmos, pela redistribuição dos carboidratos dos tecidos mais novos (periferia da touceira) aos colmos mais desenvolvidos ( $5,0 \pm 2,0$  cm de comprimento), posicionados nas áreas mais centrais do aglomerado.

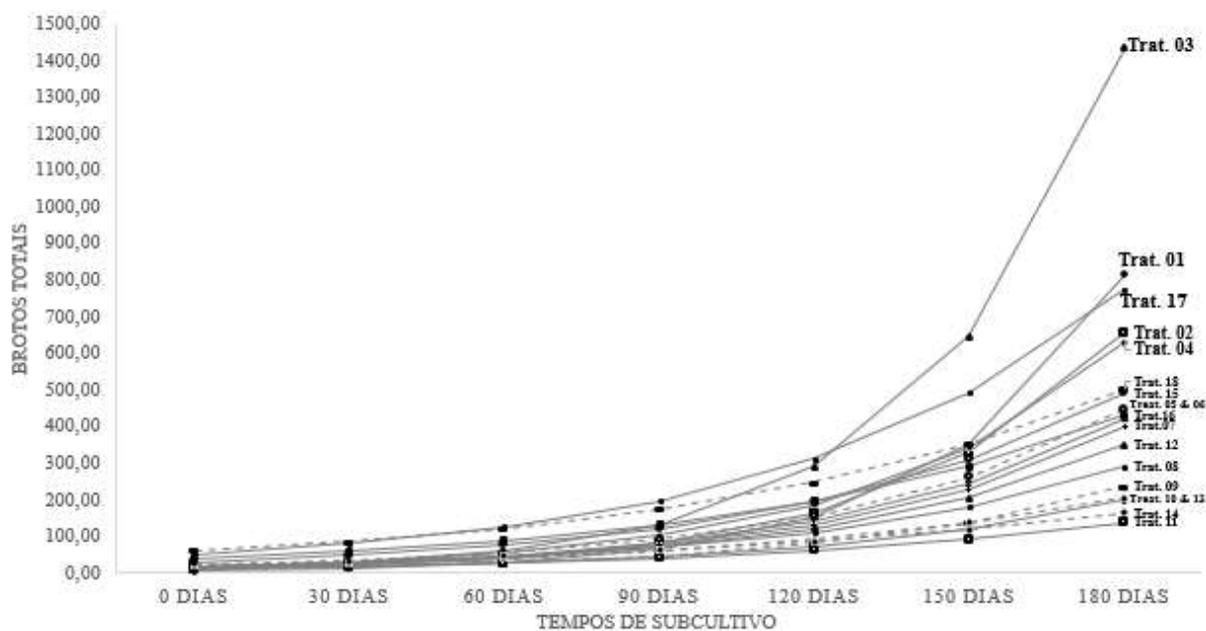
As concentrações de açúcares solúveis totais no material vegetal explica a diminuição da taxa de multiplicação em aglomerados com elevados números de colmos, pelo processo de redistribuição dos assimilados, e perda de vigor no processo de multiplicação dos tecidos mais jovens, enquanto que, no tratamento com colmos individualizados o processo de multiplicação é mais vigoroso pela concentração maior de açúcares no material vegetal em multiplicação. O vigor de multiplicação observado diz respeito ao aumento da taxa de multiplicação, com o maior número de brotos gerados por colmo.

#### 4.3.2.3 Eficiência de Multiplicação ao Longo do Tempo

No que se refere à eficiência do processo de multiplicação, através da geração de brotos ao longo de 180 dias, no presente estudo, verificou-se que o tratamento T03 contendo quatro aglomerados, cada um com três colmos, apresentou o maior número de propágulos gerados no período (Figura 07). O tratamento T03 apresentou maior eficiência na produção de propágulos quando comparado ao tratamento T01, que por sua vez, apresentou a maior taxa de multiplicação (Tabela 02).

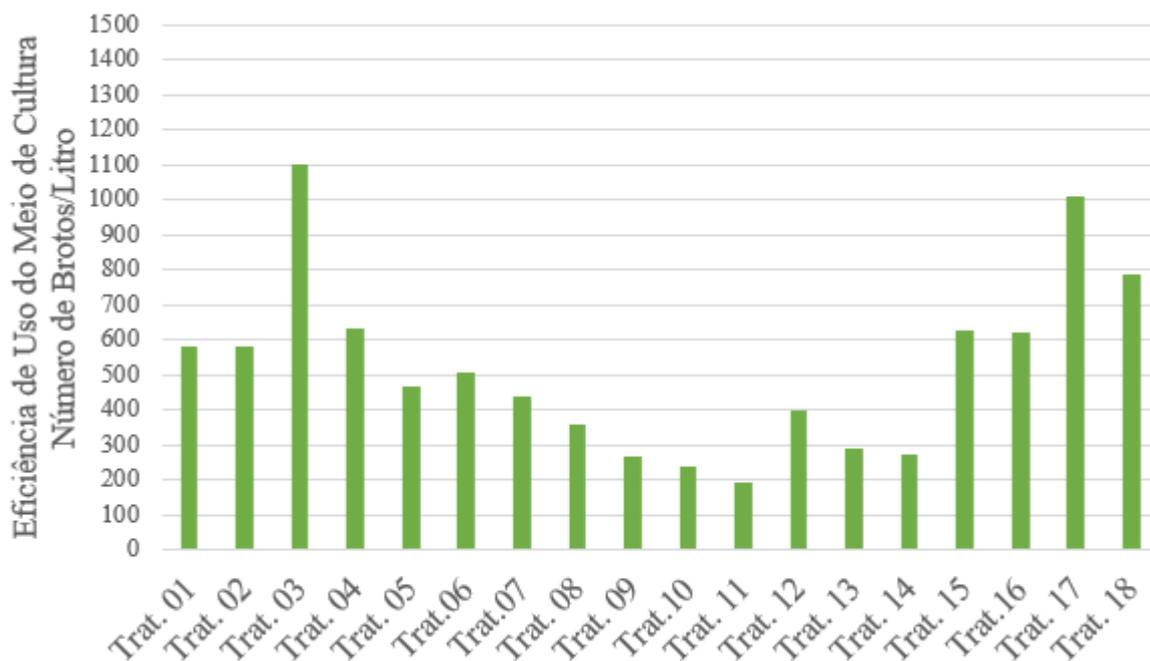
A maior eficiência observada, deve-se ao fato do tratamento T03 apresentar maior número de colmos iniciais por frasco (12 colmos / TM: 1,219 / N°: 1434 Brotos) quando comparado ao tratamento T01 (05 colmos / TM: 1,337 / N°: 814 Brotos), desta forma, resultando em uma melhor utilização da área do meio de cultura, acarretando em um saldo maior de brotos ao final de 180 dias. O tratamento T11, contendo um aglomerado com 12

colmos, apresentou o menor número de brotos gerados ao final do período de propagação (12 colmos / TM: 0,50 / N<sup>o</sup>: 137 Brotos).



**Figura 07:** Número de propágulos gerados ao longo do intervalo de subcultivos *in vitro* (180 dias) em diferentes tratamentos de *Clusters* da espécie *Dendrocalamus asper*.

Quanto à eficiência de uso do meio de cultura, o tratamento T03 apresenta o maior rendimento de propágulos por litro de meio de cultura (1100 brotos.L<sup>-1</sup>), seguido do tratamento T17 (um aglomerado de 50 colmos) com 1011 brotos.L<sup>-1</sup>. O menor rendimento de propágulos por volume de meio de cultura foi observado no tratamento T11 (196 brotos.L<sup>-1</sup>) (Figura 08).



**Figura 08:** Rendimento de propágulos de *Dendrocalamus asper* gerados por volume de meio de cultura em 180 dias de subcultivos *in vitro* (brotos. L<sup>-1</sup>) nos diferentes tratamentos. (Brotos oxidados). (Monocromático)

De acordo com Ornellas et al. (2017), a propagação *in vitro* da espécie *Dendrocalamus asper* em aglomerados de três a cinco colmos uniformemente selecionados, apresentaria incrementos na taxa de multiplicação quando comparada à propagação por colmos individualizados. Isso ocorre mediante à estabilidade fisiológica do material vegetal propagado em condição semelhante ao seu hábito de crescimento natural.

Através das avaliações observou-se um melhor aproveitamento do meio de cultura combinado à uma elevada taxa de multiplicação no tratamento com aglomerados de até três colmos, dispostas em quatro aglomerados por frasco, corroborando portanto, o incremento do processo quando comparado aos tratamentos restantes, em especial, aqueles com colmos propagados individualmente (T01) ou com aglomerados contendo elevado número de colmos (> T10).

#### 4.3.2.4 Comportamento Oxidativo do Material Vegetal

O material propagado apresentou oxidação do material em todos os tratamentos com diferentes frequências, dependendo da conformação (aglomerados ou individualizados) e disposição do material *in vitro*. Ao observar o comportamento oxidativo do material vegetal durante a propagação *in vitro*, os colmos de bambu ao entrarem em contato com o meio de cultura contendo reguladores de crescimento do grupo das citocininas, deram início ao processo de multiplicação, gerando novos brotos (Figura 09 – A). O processo de oxidação da espécie *D.*

*asper* ocorreu através de dois processos que resultam no escurecimento progressivo dos tecidos (Figura 09 – B).



**Figura 09:** A. Colmo de *Dendrocalamus asper* introduzido em meio de cultura para multiplicação *in vitro* na fase de emissão de nova brotação. B. Colmos e brotos de *Dendrocalamus asper* necrosados a partir do processo de oxidação do material vegetal.

A primeira forma de oxidação observada quando em contato com o meio de cultura o tecido vegetal produz polifenóis oxidases, como forma de defesa da planta à solução salina e aos reguladores de crescimento do meio de cultura, a que é submetida (COMPTON; PREECE, 1986; HUANG et al., 2002; OPRINS et al., 2014).

Neste estudo foi observada uma segunda forma de iniciação do processo de oxidação do material, que se dá pelo processo de necrose dos tecidos mais velhos presentes no centro dos aglomerados de colmos, em especial, pelo processo natural de senescência de folhas, levando à morte dos colmos mais centrais. A oxidação do material vegetal é constatada em várias espécies de bambu quando introduzidas no sistema de propagação *in vitro*, em especial, as espécies do gênero *Dendrocalamus* spp., que mesmo com elevado vigor de multiplicação, apresentam escurecimento dos órgãos em contato com o meio de cultura.

Ao analisar a taxa de oxidação dos tratamentos com diferentes números de colmos por aglomerados, observou-se que os tratamentos T02 (cinco aglomerados com dois colmos) e T01 (cinco colmos individualizados), apresentam as maiores taxas de oxidação quando submetidos ao processo de propagação *in vitro*, respectivamente, com  $0,924 \pm 0,067$  brotos oxidados por colmo e  $0,903 \pm 0,089$  brotos oxidados por colmo.

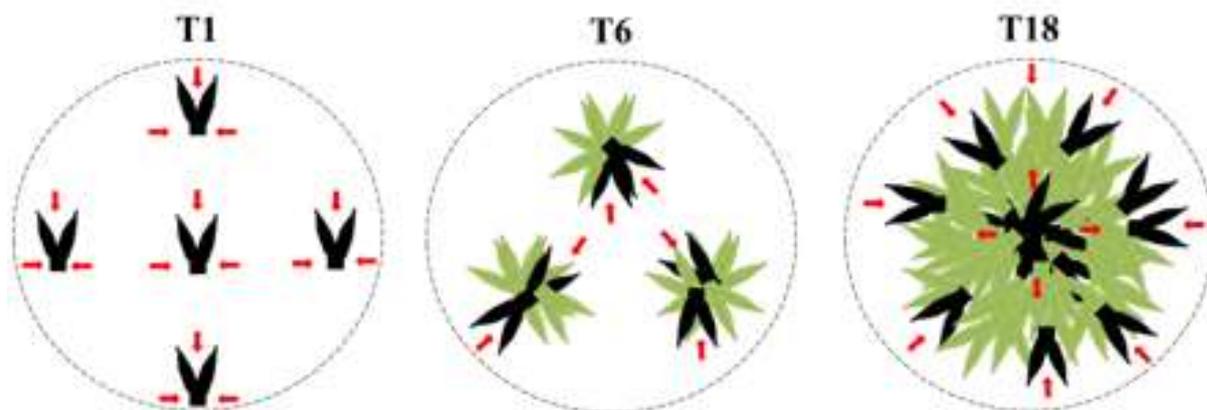
Em contrapartida, as menores taxas de oxidação foram observadas nos tratamentos T08 com  $0,277 \pm 0,054$  brotos oxidados por colmo (dois aglomerados com oito colmos), T07 com  $0,288 \pm 0,083$  brotos oxidados por colmo (dois aglomerados com sete colmos) e T06 com  $0,320 \pm 0,060$  brotos oxidados por colmo (três aglomerados com seis colmos) (Tabela 03).

**Tabela 03:** Taxa de oxidação média dos diferentes tratamentos da espécie *Dendrocalamus asper* submetidos à propagação *in vitro* (Duncan 5%).

Trat.	Taxa de Oxidação	Trat.	Taxa de Oxidação	Trat.	Taxa de Oxidação
T02	$0,924 \pm 0,067$ <b>a</b>	T10	$0,551 \pm 0,066$ <b>c</b>	T05	$0,481 \pm 0,078$ <b>d</b>
T01	$0,903 \pm 0,089$ <b>a</b>	T17	$0,549 \pm 0,041$ <b>c</b>	T18	$0,452 \pm 0,090$ <b>d</b>
T04	$0,779 \pm 0,112$ <b>b</b>	T13	$0,54 \pm 0,068$ <b>c</b>	T09	$0,439 \pm 0,089$ <b>d</b>
T03	$0,688 \pm 0,093$ <b>b</b>	T11	$0,513 \pm 0,062$ <b>d</b>	T06	$0,32 \pm 0,060$ <b>e</b>
T12	$0,602 \pm 0,092$ <b>c</b>	T16	$0,509 \pm 0,080$ <b>d</b>	T07	$0,288 \pm 0,083$ <b>e</b>
T14	$0,579 \pm 0,054$ <b>c</b>	T15	$0,481 \pm 0,082$ <b>d</b>	T08	$0,277 \pm 0,054$ <b>e</b>

Entretanto, observa-se que há um padrão diferenciado de oxidação nos diferentes tratamentos, não sendo uma curva de resposta uniforme, resultado do efeito de dois diferentes processos de oxidação já explanados acima.

Há, portanto, a oxidação pelo efeito da emissão das polifenóis oxidases do material vegetal novo em contato direto com o meio de cultura, localizado nas extremidades do aglomerado de colmos, sendo observado em todos os tratamentos, tanto em colmos individualizados, como em colmos aglomerados. A necrose do material vegetal mais velho, localizado no centro de grandes aglomerados de colmos é observado a partir dos tratamentos com mais de 10 colmos (Figura 10).



**Figura 10:** Colmos oxidados localizados nas extremidades e no centro dos aglomerados da espécie *Dendrocalamus asper* quando submetidos ao sistema de propagação *in vitro*. **Legenda:** T1. Tratamento com cinco colmos individualizados; T6. Tratamento com três aglomerados de seis colmos; T18. Tratamento com um aglomerado de sessenta colmos.

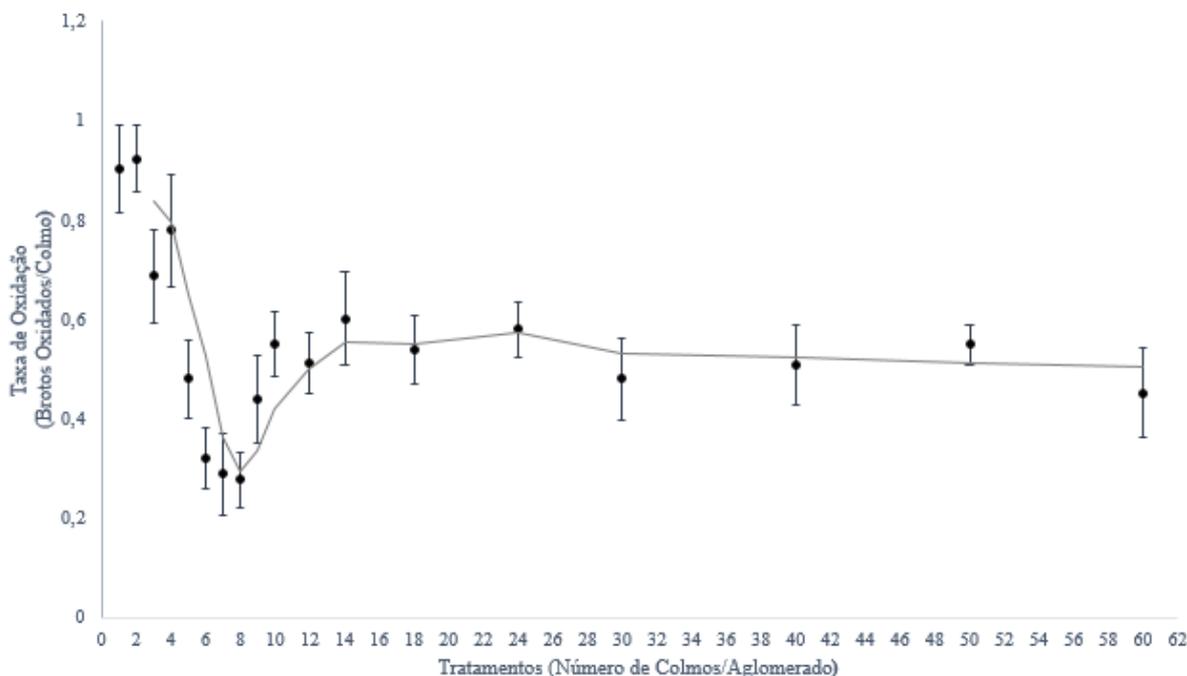
Ocorre, respectivamente, decréscimo gradual do processo oxidativo do material vegetal do tratamento T01 ao tratamento T06 (efeito da diminuição das polifenóis oxidases nas extremidades do aglomerado), pelo efeito da diminuição do contato da área superficial dos colmos com o meio de cultura. Havendo posteriormente, uma estabilização da oxidação até o tratamento T8 (dois aglomerados de oito colmos) e aumento progressivo até o tratamento T18, oriundo da necrose de colmos mais velhos presentes no centro dos aglomerados (Figura 11).

Os tratamentos com colmos individualizados apresentam maior exposição de área basal relativa por colmo em contato com o meio de cultura contendo sais e reguladores, desta forma, mais área tecidual em contato com o meio acaba reagindo e liberando de forma responsiva polifenóis oxidases. Conforme ocorre o aumento do número de colmos aglomerados, a área superficial dos colmos em contato com o meio de cultura diminui, levando a um processo de oxidação menos intenso nos aglomerados com seis a dez colmos.

Entretanto, aglomerados com muitos colmos, acabam apresentando diferenças de maturidade fisiológica, com colmos centrais mais desenvolvidos em relação aos colmos periféricos do aglomerado e seus brotos. Desta forma, no mesmo aglomerado de colmos há novas brotações surgindo e colmos mais velhos senescendo, gerando um processo secundário de oxidação no centro dos mesmos, resultado dos tecidos necrosados.

É importante salientar que os materiais com menor oxidação são aqueles que apresentam menor área de contato com o meio de cultura e que não apresentam necrose no centro de seus aglomerados. Além disso, uma desvantagem bastante visível na propagação por aglomerados

contendo muitos colmos é a dificuldade em manter a uniformidade de tamanho e padrão de desenvolvimento dos colmos.



**Figura 11:** Taxa de oxidação média dos tratamentos com diferentes números de colmos aglomerados da espécie *Dendrocalamus asper* submetidos ao sistema de propagação *in vitro*.

O escurecimento do material vegetal *in vitro* do *Dendrocalamus asper* está associado, portanto, ao aumento das moléculas de polifenóis oxidases liberadas quando os tecidos vegetais tem lesão e entram em contato com o meio de cultura. Os produtos da oxidação pelas polifenóis oxidases podem ser fitotóxicos e levar à necrose, assim como, à perda de capacidade de absorção dos nutrientes e a morte dos explantes. O principal fator ambiental de incremento do escurecimento dos tecidos está associado à composição do meio de cultura (COMPTON; PREECE, 1986; HUANG et al., 2002; OPRINS et al., 2014).

De acordo com Huang et al. (2002), a principal molécula promotora de escurecimento dos tecidos vegetais do *Dendrocalamus asper* é a 6-benzilaminopurina (BAP), molécula reguladora de crescimento do grupo das citocininas, utilizada com objetivo de induzir as brotações laterais na propagação *in vitro*. Além disso, constatou-se que a melhor maneira de conter o escurecimento dos tecidos é diminuir o intervalo de tempo para a realização das subculturas, tornando-as mais frequentes, renovando o meio em até 30 dias (MUDOI et al., 2014).

A maior parte dos trabalhos descreve presença majoritária da oxidação dos materiais do gênero *Dendrocalamus* spp. e *Bambusa* spp., alcançando até 70% do material (SANDHU et al.,

2018). Zang et al. (2019), observou que as taxas de escurecimento do material vegetal variam de 40 a 60% na espécie *Dendrocalamus asper*, enquanto que no presente estudo, as taxas de oxidação variaram entre 28 e 93%, pela influência direta da conformação dos materiais vegetais (colmos individualizados e aglomerados).

Na literatura são apresentados resultados relatando elevada ocorrência do processo de oxidação em materiais de bambu de forma geral, com destaque para o gênero *Dendrocalamus* spp., sendo uma espécie extremamente responsiva à oxidação quando exposto ao meio de cultura contendo 6-benzilaminopurina (BAP).

#### 4.3.2.5 Albinismo do Material Vegetal

Uma das principais alterações morfológicas observadas no material vegetal foi a ausência de clorofila em alguns propágulos, nos órgãos foliares e caulinares, caracterizando albinismo. Ocorrem, portanto, plantas variegadas e albinas, com potencial de gerar novas plantas contendo as mesmas características de ausência de clorofila quando em propagação *in vitro* (Figura 12).



**Figura 12:** Folhas com diferentes gradações de clorofila em colmos de *Dendrocalamus asper* submetidas ao sistema de propagação *in vitro*. **Legenda:** **A.** Folha de planta albina, folha de planta em senescência e folha de planta normal. **B.** Plantas albinas.

Analisando a taxa de albinismo, observam-se que os tratamentos com o maior número de colmos aglomerados apresentam maior incidência de brotos albinos, com destaque para os tratamentos T14 (um aglomerado com vinte e quatro colmos) com  $0,116 \pm 0,009$  brotos albinos por colmo, T18 (um aglomerado com sessenta colmos) com  $0,105 \pm 0,012$  brotos albinos por colmo, T13 (um aglomerado vinte colmos) com  $0,102 \pm 0,013$  brotos albinos por colmo, T16 (um aglomerado com quarenta colmos) com  $0,100 \pm 0,013$  brotos albinos por colmo e T15 (um

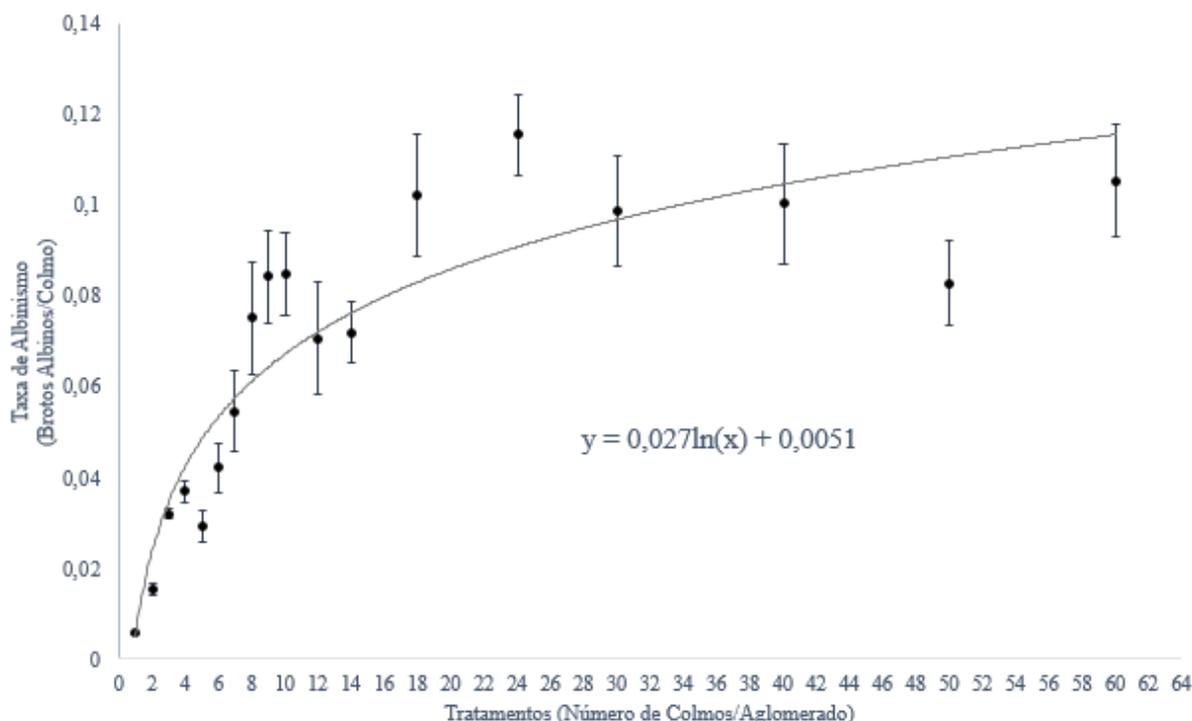
aglomerado com trinta colmos) com  $0,099 \pm 0,012$  brotos albinos por colmo, estatisticamente iguais.

Em contrapartida, os materiais com menor incidência de brotos albinos são os tratamentos T01 (cinco colmos individualizados) com  $0,006 \pm 0,0002$  brotos albinos por colmo, T02 (cinco aglomerados com dois colmos) com  $0,015 \pm 0,001$  brotos albinos por colmo e T05 (três aglomerados de cinco colmos) com  $0,029 \pm 0,003$  brotos albinos por colmo (Tabela 04).

**Tabela 04:** Taxa de albinismo médio dos diferentes tratamentos da espécie *Dendrocalamus asper* submetidos à propagação *in vitro* (Duncan 5%).

Trat.	Taxa de Albinismo	Trat.	Taxa de Albinismo	Trat.	Taxa de Albinismo
T14	$0,116 \pm 0,009$ a	T09	$0,084 \pm 0,010$ b	T06	$0,042 \pm 0,005$ e
T18	$0,105 \pm 0,012$ a	T17	$0,083 \pm 0,009$ b	T04	$0,037 \pm 0,002$ e
T13	$0,102 \pm 0,013$ a	T08	$0,075 \pm 0,012$ c	T03	$0,032 \pm 0,001$ f
T16	$0,1 \pm 0,013$ a	T12	$0,072 \pm 0,007$ c	T05	$0,029 \pm 0,003$ f
T15	$0,099 \pm 0,012$ b	T11	$0,071 \pm 0,012$ c	T02	$0,015 \pm 0,001$ g
T10	$0,085 \pm 0,009$ b	T07	$0,055 \pm 0,009$ d	T01	$0,006 \pm 0,0002$ h

Há portanto, uma relação diretamente proporcional entre o aumento da taxa de albinismo com o aumento do número de colmos aglomerados (Figura 13).



**Figura 13:** Taxa de albinismo médio dos tratamentos com diferentes números de colmos aglomerados da espécie *Dendrocalamus asper* submetidos ao sistema de propagação *in vitro*.

A relação do aumento de propágulos albinos gerados pode estar associado ao excesso de colmos interagindo na mesma touceira, respondendo a um intenso processo de multiplicação.

Mesmo esta resposta morfológica tendo estado presente em outros trabalhos com a espécie *Dendrocalamus asper*, o excesso de colmos apresenta uma elevação expressiva nas taxas de brotos com ausência de clorofila.

A presença de materiais vegetais apresentando albinismo foi relatada anteriormente para espécie *Dendrocalamus asper* em trabalhos com segmentos nodais propagados *in vitro* (ZANG et al., 2019). De acordo com Kumar & Benerjee (2014), materiais contendo brotos albinos no procedimento de propagação *in vitro* foram observados em culturas com mais 100 dias, podendo este evento estar relacionado à longa exposição ao sistema de propagação.

Observa-se que o aparecimento de brotos albinos é inerente à espécie *Dendrocalamus asper* quando propagada *in vitro*, possivelmente, uma resposta ao estresse do ambiente heterotrófico com reguladores de crescimento, além disso, a presença de muitos colmos na mesma touceira pode levar a uma maior incidência de brotos albinos, como observado no estudo presente.

A presença do albinismo dá-se de forma aleatória na população da espécie *in vitro* e de formas variáveis, com materiais apresentando diferentes colorações, podendo ocorrer colorações variegadas, totalmente albinas e materiais com capacidade de reverter o albinismo para a normalidade de coloração. A regeneração destes materiais permanece vigorosa, podendo estes colmos gerar plantas com coloração semelhante (aclorofiladas) ou normalizada (clorofiladas).

#### 4.4 Conclusões

- A espécie *Dendrocalamus asper* apresenta mudanças no padrão de multiplicação, oxidação e em sua morfoanatomia quando submetida ao processo de propagação *in vitro*. As novas brotações se originam do tecido meristemático presente na base do colmo, mais especificadamente na região do rizoma;

- Há diferença significativa nas taxas de multiplicação, oxidação e albinismo quando os colmos são propagados individualizados e em aglomerados;

- O tratamento que apresentou maior taxa de multiplicação, assim como, melhor eficiência ao longo do processo de repicagem na geração de propágulos foi o tratamento T03, contendo, quatro aglomerados de três colmos propagados em meio de cultura MS contendo 15 µM de BAP;

- A espécie *Dendrocalamus asper* apresentou elevada incidência de processos oxidativos em todos os tratamentos, sendo identificados dois processos de oxidação distintos: pela liberação de polifenóis oxidases dos tecidos em contato com o meio de cultura e pela senescência de colmos no centro dos aglomerados. Os tratamentos com menor taxa de oxidação foram os tratamentos T06 a T08, sendo que tratamentos com colmos individualizados ou aglomerados com muitos colmos apresentaram elevada frequência de oxidação nos colmos;

- A espécie *Dendrocalamus asper* apresentou incidência de plantas albinas e variegadas quando submetida ao sistema de propagação *in vitro*, havendo uma relação diretamente proporcional da incidência de brotos albinos e número de colmos aglomerados;

- Considerando-se o objetivo da propagação *in vitro*, de obter o maior número de propágulos uniformes, utilizando a menor quantidade de meio de cultura em um período de tempo determinado, recomenda-se o uso do tratamento T03 com quatro aglomerados de três colmos da espécie *Dendrocalamus asper* dispostos *in vitro*. Este tratamento apresentou baixa ocorrência de albinismo no material vegetal, elevada eficiência de uso do meio de cultura, apresentando somente problemas relativos à oxidação, recorrente também nos outros tratamentos, sendo possível, utilizar outros reguladores de crescimento do grupo das citocininas para evitar tais efeitos colaterais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

COMPTON, M.E.; PREECE, J.E.. Exudation and explant establishment. **IAPTC News**, v.50, p. 09-18, 1986.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K.; OPRINS, J.; DEBERGH, P.C.. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v.552, p. 195–204, 2011.

GOYAL, A.K.; SEM, A. *In vitro* regeneration of bamboos, the “Green Gold”: an overview. **Indian Journal Biotechnology**, v. 15, p. 09–16, 2016.

HUANG, L.C.; LEE, Y.L.; HUANG, B.L.; KUO, C.I.; SHAW, J.F.. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. **In Vitro Cellular & Development Biology of Plant**, v.38, p. 358–365, 2002.

JIMÉNEZ, V.M.; GUEVARA, E.. Micropropagation of bamboo species through axillary shoot proliferation. In: JAIN, S.M.; HAGGMAN, H. (eds). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. **Springer**, Dordrecht, p. 465–476, 2007.

KUMAR, V.; BANERJEE, M. Albino regenerants proliferation of *Dendrocalamus asper* in vitro. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.10, n.1, p. 09-13, 2014.

LIN, X.; HUANG, L.; FANG, W. Bamboo regeneration via embryogenesis and organogenesis. In: Sato K-I (ed), **Embryogenesis**. 2012.

MUDOI, K.D.; SAIKIA, S.P.; BORTHAKUR, M. Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall. ex. Munro Afr., **Journal Biotechnology**, v.13, p.1961–1972, 2014.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v.15, p. 473–497, 1962.

NADHA, H.K.; SALWAN, R.; KASANA, R.C.; ANAND, M. SOOD A. Identification and elimination of bacterial contamination during *in vitro* propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 30, p. 93-97, 2012.

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

OPRINS, J.; GRUNEWALD, W.; GILLIS, K.; DELAERE, P.; PEETERS, H.; GIELIS, J.. **Micropropagation: a general method for commercial bamboo production**. In: 7th world bamboo congress, New Delhi, 2014.

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

SANDHU, M.; WANI, S.H.; JIMÉNEZ, V.M.. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.132, p. 27-53, 2018.

SINGH, S.R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* {Schult. & Schult. F.} Backer ex k. Heyne): an exotic edible bamboo. **Journal Plant Biochem Biotechnol**, v. 21, 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. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v.19, n.1, p. 21-41, 2013.

SORENG, R.J.; PETERSON, P.M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; ZULOAGA, F.O.; JUDZIEWICZ, E.J.; FILGUEIRAS, T.S.; DAVIS, J.I.; MORRONE, O.. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematic and Evolution**, v. 53, p. 117–137, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, 2013. 918 p.

ZANG, Q.; LIU, Q.; ZHUGE, F.; WANG, X.; LIN, X. *In vitro* regeneration via callus induction in *Dendrocalamus asper* (Schult.) Backer, **Propagation of Ornamental Plants**, v.19, n.03, p. 66-71, 2019.

## 5. CAPÍTULO II – PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO E ACLIAMATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE *DENDROCALAMUS ASPER*.

### RESUMO

O processo de adaptação das plantas micropropagadas à condição *ex vitro* depende do processo de pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização em ambiente controlado, com objetivo de proporcionar às plantas ambiente adequado para o desenvolvimento de órgãos ativos e funcionais nas condições de campo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de 200 plântulas micropropagadas submetidas por 40 dias ao processo de pré-aclimatização e por 50 dias ao processo de aclimatização, quantificando alterações morfológicas no sistema aéreo e radicular. Dos resultados obtidos conclui-se que as plantas micropropagadas apresentam alterações no crescimento ainda no processo de pré-aclimatização emitindo novas raízes e folhas, em um período de 40 dias. As mesmas plantas quando submetidas ao processo de aclimatização por período de 50 dias, apresentaram incrementos de comprimento no sistema radicular existente, até os 10 dias, com posterior incremento no número de folhas, número de raízes e comprimento das plantas no período de 10 a 25 dias. Dos 25 aos 50 dias, as plantas direcionam seu crescimento para a expansão da área foliar, limitando a emissão de novas folhas e raízes. A sobrevivência foi de 83 % das plantas ao final de todo o processo.

**Palavras-chave:** Adaptação *ex vitro*, Plantas aclimatizadas, Bambu-gigante.

### ABSTRACT

The adaptation of micropropagated plants in the *ex vitro* condition depends on pre-acclimatization *in vitro* and acclimatization in a controlled environment. The objective is to provide plants with an adequate environment for the development of active and functional organs under natural conditions. The objective of this research was to evaluate the behavior of 200 micropropagated seedlings submitted for 40 days to pre-acclimatization and 50 days to the acclimatization process, quantifying morphological changes in the aerial and root systems. The results show that the micropropagated plants show changes in growth in the pre-acclimatization process, emitting new roots and leaves, in the period of 40 days. The plants submitted to the acclimatization process for a period of 50 days, showed increases in the length of the roots, up to 10 days, with a subsequent increase in the number of leaves, number of roots and length of the plants in the period from 10 to 25 days. Between 25 and 50 days, the plants grew in the leaf area, limiting the emission of new leaves and roots. Mortality was 17% of plants at the end of the entire process.

**Keywords:** *Ex vitro* adaptation, Acclimatized plants, Giant bamboo.

### 5.1 Introdução

As plantas desenvolvidas a partir de explantes sob condições *in vitro*, apresentam um metabolismo mixotrófico dependendo exclusivamente do carbono, água e nutrientes do meio de cultura para a manutenção de seu metabolismo e desenvolvimento vegetativo. Desta forma, há grande inibição do desenvolvimento de órgãos foliares e radiculares, pela presença de reguladores vegetais do grupo das citocininas inibindo as respostas associadas às auxinas inerentes à planta, acarretando na emissão de novos brotos e inibição da dominância apical (SILVEIRA et al., 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A aclimatização é o processo onde ocorre a transferência das plantas para as condições *ex vitro* de forma gradual, ocorrendo a transição do metabolismo heterotrófico das condições *in vitro* para um metabolismo autotrófico nas condições *ex vitro*, com as plantas iniciando a fotossíntese para obtenção de carbono e desenvolvimento vegetativo, além da emissão de raízes adaptadas ao novo substrato. Há, neste processo de transição, inúmeras espécies que apresentam elevada mortalidade e perda de vigor como resposta ao déficit hídrico, estresse térmico e luminoso na câmara de aclimatização, em detrimento, do ambiente *in vitro* (HAZARIKA, 2003).

As plantas apresentam no sistema de propagação *in vitro* raízes pouco desenvolvidas, quebradiças e pouco funcionais, devido à facilidade de absorção de nutrientes diretamente através dos tecidos caulinares com o meio de cultura, portanto, com sistema radicular incapaz de absorver água e sais do substrato sólido na aclimatização (HOFFMANN et al., 2001; RIBEIRO et al., 2008). O processo de sobrevivência na transição do meio MS com BAP para a aclimatização melhora com o processo de pré-aclimatização e enraizamento *in vitro*, submetendo as plantas a um meio de cultura sem reguladores de crescimento, por um período determinado (SOUZA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2010).

Uma das principais alternativas para melhorar a resiliência das plantas ao processo de transição é o período de pré-aclimatização, induzindo as plantas à emissão de primórdios radiculares, crescimento de ápices caulinares e radiculares. Plantas de diversas espécies apresentam adaptação significativa no processo de pré-aclimatização anterior à aclimatização e mudanças no padrão de crescimento de folhas, caules e raízes, estabelecendo plantas uniformes e vigorosas para as condições de campo (CHANDRA et al., 2010; JACKSON, 2003; OLIVEIRA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2013).

A espécie *Dendrocalamus asper* apresenta uma lacuna de estudos voltados ao comportamento e sobrevivência na etapa de pré-aclimatização e aclimatização. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi descrever morfológicamente o comportamento de mudas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* na transição entre os ambientes de cultivo.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Origem do Material Vegetal**

Os materiais vegetais são oriundos do sistema de propagação *in vitro*, especificadamente da fase de multiplicação. O período em que foram submetidas ao sistema de propagação *in vitro*

foi de 18 meses em meio de cultura contendo 15  $\mu\text{M}$  de BAP, sendo repicadas mensalmente. Os materiais selecionados foram colmos individualizados com 3,0 a 4,0 cm de comprimento, com ausência de raízes e elevado grau de incidência de materiais com oxidação (> 95%), normal para a espécie quando em contato com o meio de cultura contendo BAP, e ausência de albinismo. Foram selecionadas plantas do tratamento T03 (Quatro aglomerados de três colmos) que tiveram seus colmos individualizados para a fase de pré-aclimatização buscando maximizar a dominância apical dos materiais, visando crescimento de colmo e emissão de folhas e raízes na etapa.

### **5.2.2 Pré-aclimatização**

As plantas selecionadas foram introduzidas em frascos contendo 40 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com ausência de reguladores de crescimento. O meio de cultura foi submetido à esterilização em autoclave vertical a 121 °C a 1,1  $\text{kgf.cm}^{-2}$ . As plantas foram repicadas para frascos (67,2 x 129,3 mm - 350,0 mL), dispostos em grupos de cinco colmos individualizados, separados em no mínimo 2,0 cm de distância, por um período de 40 dias.

Ao todo foram selecionados para a fase de alongamento pré-aclimatização 200 colmos individualizados. Foram avaliados padrões de crescimento dos colmos, emissão de folhas e raízes, assim como, mudanças nos padrões de oxidação e morte de plantas, com avaliações aos 0 e 40 dias.

### **5.2.3 Aclimatização**

Após o período de 40 dias as plantas foram retiradas dos frascos e lavadas em água destilada, removendo o meio de cultura da base das plantas e separando possíveis brotos gerados na fase de pré-aclimatização, mantendo ao menos um primórdio radicular por colmo.

Os colmos individualizados foram introduzidos em tubete com 100  $\text{cm}^3$  e substrato @MAXFÉRTIL, com umidade de substrato a nível de capacidade de campo. As plantas foram dispostas em estufa de nebulização, com umidade do ar acima de 80%, 30 °C de temperatura, nebulização com intervalos de 3h e incidência de radiação de 60%, por um período de 50 dias.

## 5.2.4 Variáveis Analisadas

As plantas em aclimatização foram avaliadas nos períodos de 0, 10, 25 e 50 dias, quantificando o crescimento de colmos, emissão de folhas, área foliar, número de folhas, número de raízes, comprimento das raízes, percentual de mortalidade da espécie na etapa e o ganho percentual diário de cada parâmetro nos intervalos de 0 a 10, 10 a 25 e 25 a 50 dias. As medidas de comprimento foram feitas com régua escalonada e a área foliar foi quantificada utilizando fotos com escala submetidas ao aplicativo @ImageJ para a medição digital.

## 5.3 Resultados e Discussão

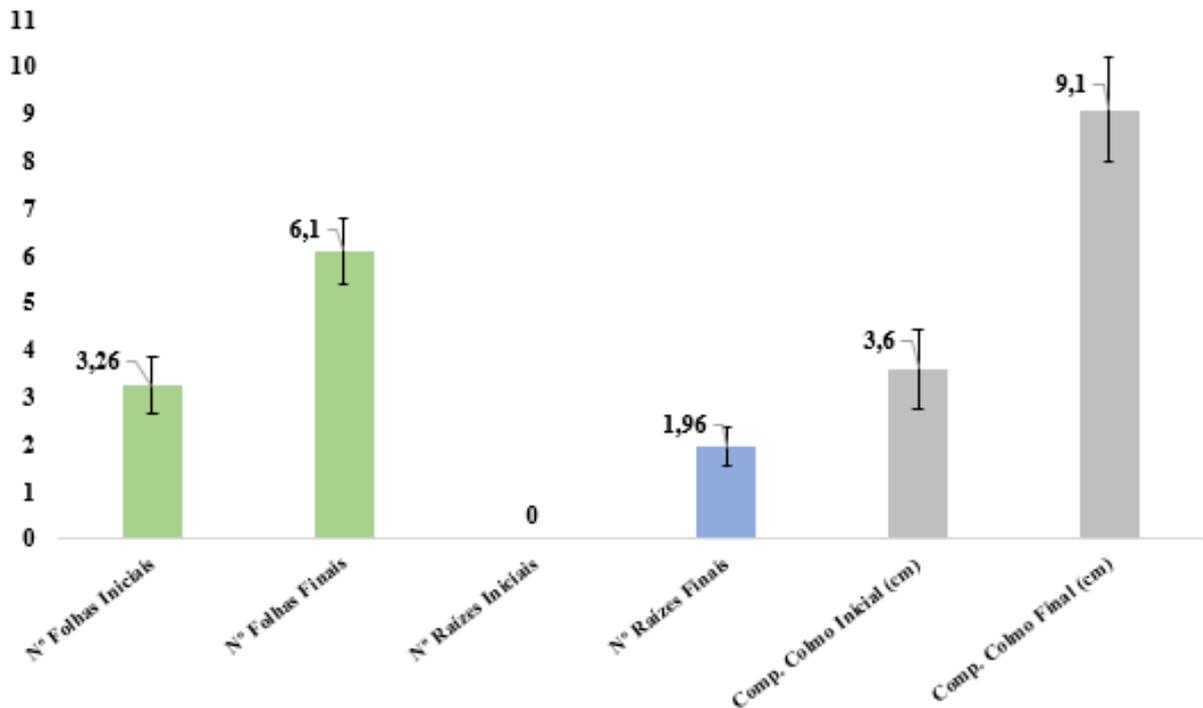
### 5.3.1 Pré-aclimatização

Ao observar o processo de pré-aclimatização os materiais apresentaram ausência de mortalidade na etapa, assim como, não apresentaram amarelecimento e senescência das folhas. Houve queda da oxidação de 94,1% para 16,5% dos colmos em um período de 40 dias, diminuindo de forma acentuada.

A oxidação observada é oriunda do contato do *Dendrocalamus asper* com o meio de cultura com regulador de crescimento do grupo das citocininas (6-benzilaminopurina), ocorrendo a liberação de polifenol oxidases do tecido para o meio de cultura, causando o escurecimento do substrato e do próprio tecido. Quando introduzidas em meio de cultura sem BAP, os colmos diminuíram significativamente o processo oxidativo, com queda de 87,6% em 40 dias.

No que diz respeito, ao desenvolvimento vegetativo das plantas, houve incremento no número de folhas, raízes e comprimento de colmos, sem novas brotações nos colmos pela ausência de citocininas no meio de cultura. Inicialmente, o colmo apresentava em média  $3,26 \pm 0,62$  folhas, aos 40 dias, o mesmo material, apresentou em média  $6,1 \pm 0,71$  folhas, com incremento de 87,1 %.

Quanto ao número de raízes, inicialmente todos os materiais apresentavam ausência de raízes, pelo efeito da citocinina no meio de cultura de multiplicação, após 40 dias, o número de raízes médio foi de  $1,96 \pm 0,41$  raízes. Os colmos inicialmente apresentavam em média  $3,6 \pm 0,82$  cm de comprimento, posteriormente 40 dias, apresentavam em média  $9,1 \pm 1,1$  cm de comprimento, com aumento de 152,7 % no período (Figura 14).



**Figura 14:** Comprimento médio dos colmos, número médio de folhas e raízes no processo de pré-aclimatização de materiais micropropagados de *Dendrocalamus asper*.

Ao contrário da etapa de multiplicação *in vitro*, a pré-aclimatização não apresenta BAP na composição do meio de cultura, desta forma, as respostas do processo de propagação diminuem e há rearranjo fisiológico do material vegetal, com realocação dos assimilados para os meristemas apicais do caule e raiz, aumentando o desenvolvimento dos órgãos aéreos e radiculares, por influência, das auxinas naturais no metabolismo destas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

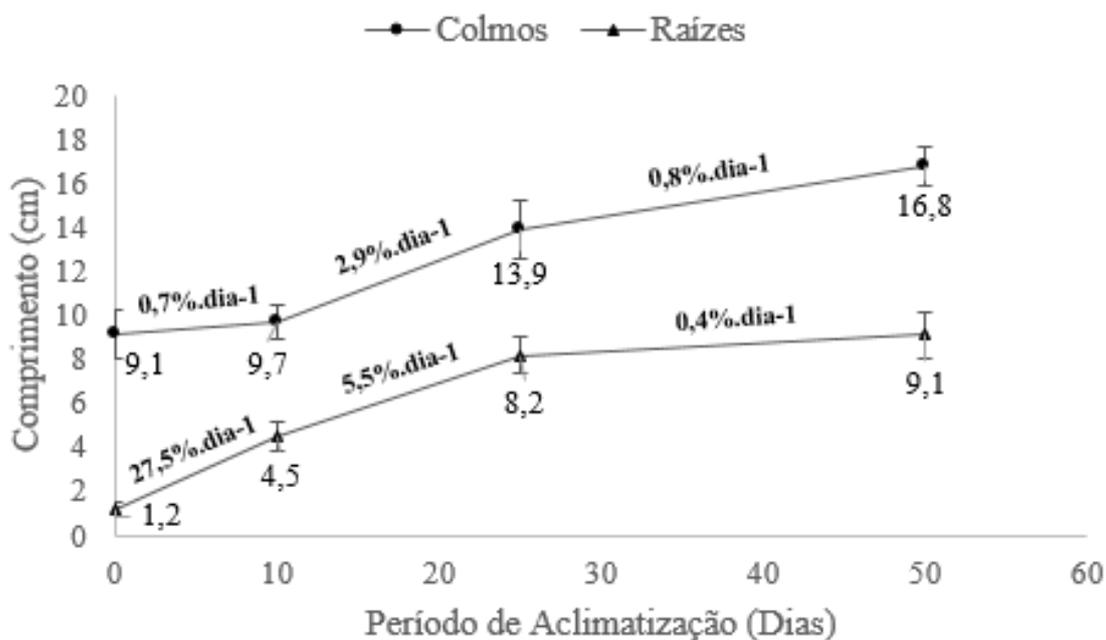
### 5.3.2 Aclimatização

Ao observar as plantas introduzidas no processo de aclimatização observou-se uma diferença significativa no padrão de emissão de folhas e raízes, assim como, no comprimento de colmos, raízes e área foliar das plantas ao longo do período de 50 dias do processo de aclimatização. Houve mortalidade de 17% na transição do ambiente *in vitro* para o sistema de aclimatização, com 34 das 200 plantas mortas, mortalidade esta observada majoritariamente nos primeiros 10 dias de aclimatização. A maior parte dos colmos aclimatizados individualmente estabeleceram-se após 25 dias em touceiras de três a cinco colmos permanecendo até os 50 dias

Nos primeiros 10 dias de aclimatização observa-se que as plantas apresentam um crescimento de colmo reduzido, de 9,1 cm para 9,7 cm em média, com crescimento de 0,7

$\%.\text{dia}^{-1}$ , passando para a marca de 13,9 cm em média aos 25 dias ( $2,9 \%. \text{dia}^{-1}$ ) e finalizando o período de crescimento com 16,8 cm em média aos 50 dias ( $0,8 \%. \text{dia}^{-1}$ ). Observou-se que o maior ganho de comprimento em colmos foi observado no período de 10 a 25 dias de aclimatização. Houve, após 50 dias, um incremento de 7,7 cm no comprimento dos colmos, dos quais 4,2 cm ocorreram no período de 10 a 25 dias (Figura 15).

Quanto ao crescimento das raízes, nos primeiros 10 dias as plantas apresentaram um crescimento acentuado, passando de 1,2 cm para 4,5 cm em média, com crescimento de  $27,5 \%. \text{dia}^{-1}$ , passando para a marca de 8,2 cm em média aos 25 dias ( $5,5 \%. \text{dia}^{-1}$ ) e finalizando o período de crescimento com 9,1 cm em média aos 50 dias ( $0,4 \%. \text{dia}^{-1}$ ). Portanto, o maior incremento no comprimento das raízes foi observado no período de 0 a 10 dias de aclimatização. Houve, após 50 dias, um incremento de 7,9 cm no comprimento das raízes, dos quais 3,3 cm ocorreram no período de 0 a 10 dias (Figura 15).

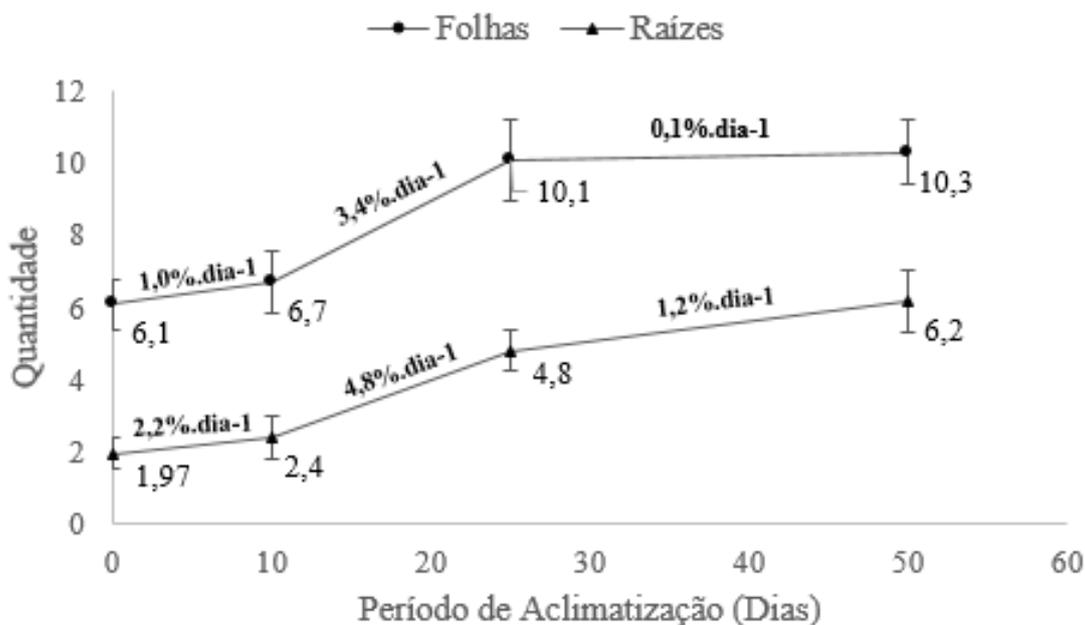


**Figura 15:** Crescimento de colmos e raízes em plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* submetidas à aclimatização por um período de tempo de 50 dias e o ganho percentual diário nos intervalos de 0 a 10, 10 a 25 e 25 a 50 dias.

No que diz respeito à quantidade de órgãos emitidos, tendo sido avaliados folhas e raízes, houve diferença significativa nos diferentes períodos de avaliação. As plantas inicialmente apresentavam em média 6,1 folhas passando para 6,7 folhas em média por colmo ( $1,0 \%. \text{dia}^{-1}$ ). Aos 25 dias os colmos apresentaram 10,1 folhas em média ( $3,4 \%. \text{dia}^{-1}$ ) e finalizando o período com 10,3 folhas aos 50 dias ( $0,1 \%. \text{dia}^{-1}$ ). O maior incremento na

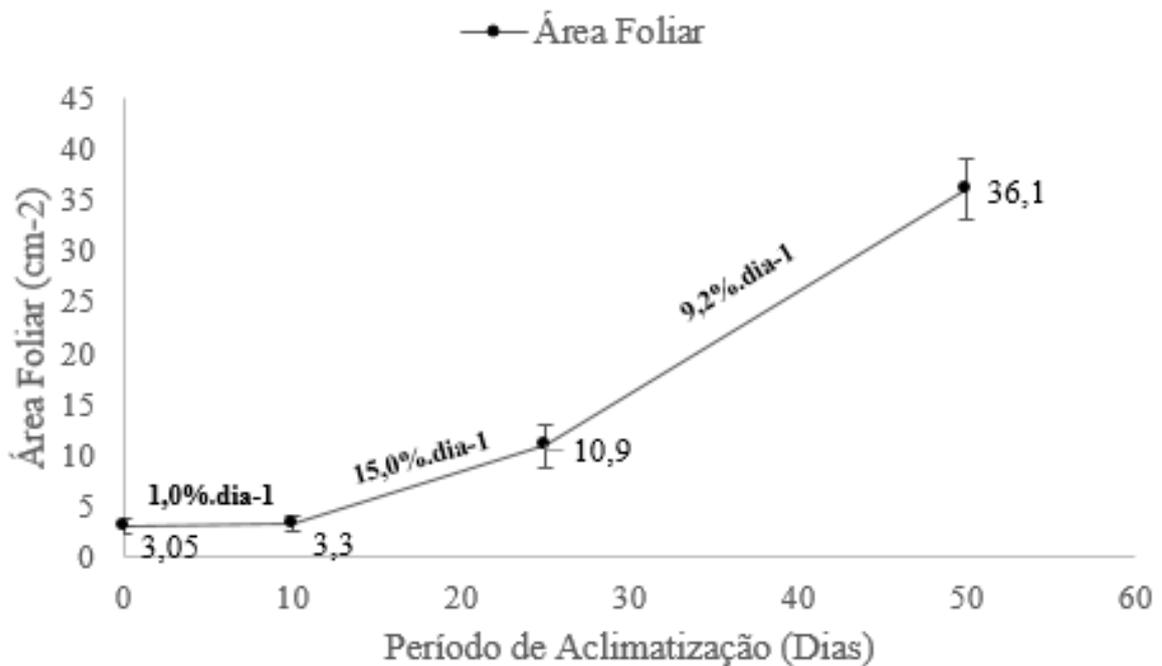
quantidade de folhas foi observado no período de 10 a 25 dias de aclimatização. Houve um incremento total no período de em média 4,2 folhas por colmo, sendo que destas, 3,4 folhas foram emitidas no período de 10 a 25 dias (Figura 16).

Ao observar a emissão de raízes, observa-se que inicialmente os colmos apresentavam em média 1,97 raízes passando para 2,4 raízes após 10 dias de aclimatização (1,0 %.dia<sup>-1</sup>), aumentando para 4,8 raízes aos 25 dias (4,8 %.dia<sup>-1</sup>) e finalizando o período de aclimatização com 6,2 raízes por colmo (1,2 %.dia<sup>-1</sup>). O aumento mais intenso no número de raízes emitidas ocorreu no período de 10 a 25 dias. Houve um incremento total 4,2 raízes no período de 50 dias, nas quais 2,4 raízes foram emitidas no período de 10 a 25 dias (Figura 16).



**Figura 16:** Número de folhas e raízes em plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* submetidas à aclimatização por um período de tempo de 50 dias e o ganho percentual diário nos intervalos de 0 a 10, 10 a 25 e 25 a 50 dias.

Ao observar a área foliar média das plantas no processo de aclimatização observa-se que esta permanece praticamente inalterada no intervalo dos 10 primeiros dias, passando de 3,05 cm<sup>2</sup> de área foliar para 3,3 cm<sup>2</sup>, com crescimento de 1,0 %.dia<sup>-1</sup>. No período de 10 a 25 dias, a área atingiu 10,9 cm<sup>2</sup>, com acréscimo de 15,0 %.dia<sup>-1</sup> e ao fim do período de 50 dias, atingiu 36,1 cm<sup>2</sup> com aumento de área de 9,2 %.dia<sup>-1</sup>. Observou-se que o maior incremento de área foliar começou aos 10 dias com aumento geométrico até os 50 dias (Figura 17).



**Figura 17:** Incremento de área foliar em plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* submetidas à aclimatização por um período de tempo de 50 dias e o ganho percentual diário nos intervalos de 0 a 10, 10 a 25 e 25 a 50 dias.

Ao analisar o comportamento geral das plantas no processo de aclimatização observar-se que as plantas ao iniciarem o processo de aclimatização até os 10 primeiros dias priorizam o crescimento vertical das raízes existentes no substrato, buscando melhorar sua capacidade de nutrição e absorção de água no substrato (Figura 18).

O período de 10 a 25 dias é extremamente importante, pois é o momento em que ocorre de forma mais intensa o aumento do número de folhas, aumento de área foliar, aumento no crescimento dos colmos e emissão de novas raízes. Há, portanto, nos primeiros 10 dias de aclimatização um processo de estresse de origem ambiental sobre as plantas de *Dendrocalamus asper*, posteriormente, entrando em uma fase de desenvolvimento completo da parte aérea e sistema radicular (Figura 18).

No período de 25 a 50 dias, há uma paralização das emissões foliares e radiculares, crescimento reduzido de raízes e colmos, e um incremento progressivo da área foliar. Nesta fase, a planta se dedica em aumentar sua área fotossintética, absorvendo nutrientes a partir de um sistema radicular já estabelecido (Figura 18).



**Figura 18:** Evolução da parte aérea e sistema radicular do *Dendrocalamus asper* ao longo do processo de propagação *in vitro*, pré-aclimatização e aclimatização. **Legenda:** **IM.** Início da Fase de Multiplicação; **FM.** Final da Fase de Multiplicação; **PA.** Final da fase de Pré-aclimatização *in vitro*; **10D.** 10 dias de aclimatização; **25D.** 25 dias de aclimatização; **35D.** 35 dias de aclimatização; **50D.** 50 dias de aclimatização.

Estudos anteriores demonstram que plantas cultivadas *in vitro* geralmente apresentam alterações morfofisiológicas quando comparadas às condições de campo, mudanças estas que influenciam severamente os processos metabólicos e fisiológicos associados à fotossíntese e a transpiração. Plantas quando mantidas *in vitro*, adquirem características de plantas de sombra e ao serem transferidas às condições *ex vitro*, causam fotoinibição ou fotoxidação da clorofila, levando à maior mortalidade quando não pré-aclimatizadas (HAZARIKA, 2006; FAISAL; ANIS, 2009).

Em espécies cítricas observa-se que há processos de alteração no padrão de crescimento e emissão de raízes, com posterior desenvolvimento da parte aérea no processo de aclimatização. A taxa de sobrevivência deste agrupamento de plantas foi menor quando as plantas foram transferidas do meio de multiplicação diretamente para o sistema de aclimatização, com aumento de propágulos mortos. A redução das perdas foi constatada quando

as mesmas plantas foram submetidas à etapa da pré-aclimatização com maior enraizamento e crescimento de brotos ainda no ambiente *in vitro* (SOARES; MIRANDA, 2016).

Em estudos realizados com aclimatização de cafeeiro, as plantas apresentaram intenso desenvolvimento radicular até os 30 primeiros dias do processo de aclimatização, posteriormente com desenvolvimento foliar até os 90 dias de aclimatização, com taxas de perda de até 40% das plantas nos primeiros 20 dias, diante do estresse térmico e hídrico. As mudas de café apresentaram maior desenvolvimento quando apresentavam primórdios radiculares em maiores concentrações inicialmente (SANTOS et al., 2014; GONÇALVES et al., 2019).

Observa-se que a maioria das espécies apresenta perdas de plantas micropropagadas quando introduzidas no processo de aclimatização diretamente, perdas estas que ficam menos intensas quando passam pelo período de pré-aclimatização *in vitro*. Além disso, a maior parte das plantas ao iniciarem o processo de aclimatização sofrem estresse térmico, luminoso e hídrico, buscando desenvolver inicialmente seu sistema radicular no substrato e posteriormente, sua parte aérea, equilibrando absorção de água e nutrientes inicialmente e desenvolvendo seu sistema fotossintético.

## 5.4 Conclusões

- Durante o processo de pré-aclimatização de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* ocorre diminuição da oxidação ainda no sistema *in vitro*, além de emissão de primórdios radiculares e foliares preparando o material para o processo de aclimatização;

- No processo de aclimatização as plantas de *Dendrocalamus asper* desenvolvem em comprimento suas raízes nos primeiros 10 dias de aclimatização, sendo que dos 10 aos 25 dias de aclimatização ocorre o maior desenvolvimento do caule em comprimento, emissão de novas raízes e folhas, assim como expansão da área foliar;

- Considerando-se que a pré-aclimatização e aclimatização são etapas que têm como objetivo adaptar gradualmente o metabolismo da planta às condições de campo, recomenda-se que o processo de pré-aclimatização dure ao menos 40 dias, proporcionando um bom processo de transição para a etapa de aclimatização de mudas micropropagadas de *Dendrocalamus asper*. Recomenda-se um período de aclimatização por um período de tempo de ao menos 50 dias em estufa de nebulização, com sucesso no estabelecimento de plantas, apresentando bom desenvolvimento dos órgãos foliares e radiculares no período de 10 a 25 dias de aclimatização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnol Lett**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.

FAISAL, M.; ANIS, M. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 99, p.125-132, 2009.

GONÇALVES, W.; ALMEIDA, J.A.S.; SALOMOM, M.V.; GUERREIRO FILHO, O.G. **Aclimatização e aclimação de mudas micropropagadas de híbridos F1 de *Coffea arabica* L.** X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2019.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

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

HOFFMANN, A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 2, p. 462- 467, 2001.

JACKSON, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Special issue, p. 96-109, 2003.

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

OLIVEIRA, Y. de et al. Pré-aclimatização *in vitro* de abacaxi ornamental. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1647-1653, 2010.

RIBEIRO, M. de N. O. et al. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-deleite). **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 1, p. 101-106, 2008.

SANTOS, M.R.A., LIMA, R.A., FERREIRA, M.G.R., ROCHA, J.F., ESPÍNDULA, M.C. & ALVES, E.A. Acclimatization of micropropagated plantlets of *Coffea canephora*. **Journal Biotechnology and Biodiversity**, v.5, p. 12-19, 2014.

SILVEIRA, D. G. et al. Development of micropropagated shoots and plants of Caroa in different substrates. **Acta Horticulturae**, v. 865, p. 305-313, 2010.

SILVEIRA, D.G.; VIDAL, A.M.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F.; SOUZA, F.V.D. Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 544-553, 2013.

SOARES, B.O.; MIRANDA, V.S. Rooting *in vitro* and *ex vitro* acclimatization of citrus cultivars. **Rev. Ciênc. Agrar.**, v.59, n.2, p. 144-151, 2016.

SOUZA, F. V. D. et al. **Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliaáceas**. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 177-205.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Através do presente estudo é possível concluir que há efeitos positivos do método de propagação em *clusters* da espécie *Dendrocalamus asper* no sistema de propagação *in vitro*, baseado na melhora dos parâmetros avaliados e na otimização do processo. Há, entretanto, um equilíbrio ténue que não deve ser desconsiderado no uso desta técnica, em que a propagação na forma de colmos individualizados ou *clusters* com muitos colmos não é recomendada. Neste sentido, recomenda-se que na propagação *in vitro* de *Dendrocalamus asper*, especificadamente na fase de multiplicação, que as plantas sejam conduzidas em aglomerados de no máximo três colmos e quatro aglomerados por frasco, nas respectivas condições deste experimento.

Das perspectivas de estudo para a fase de propagação *in vitro* por *clusters* há destaque para a elucidação dos hormônios vegetais e açúcares envolvidos no desenvolvimento *in vitro* desta espécie. Além disso, a ocorrência de plantas albinas e oxidadas é mediada por fatores ainda pouco conhecidos. Há necessidade, portanto, de estudos aprofundados relacionados ao efeito destes eventos na eficiência do processo de propagação *in vitro* e às moléculas envolvidas no sistema de defesa e senescência destas plantas. A ocorrência de albinismo além do já mencionado, apresenta possibilidades de inúmeros estudos, como o de categorização dos diferentes níveis de aclorofilamento das plantas e o efeito das condições *in vitro* na ocorrência deste evento, observando possíveis alterações genéticas e/ou epigenéticas no material. A continuidade do estudo envolvendo a propagação *in vitro* de *Dendrocalamus asper* na forma de *clusters* é fundamental para embasar o uso da técnica nesta e em outras espécies que apresentam hábito de crescimento semelhante, com potencial de uso nas mesmas condições.

No que diz respeito à fase de pré-aclimatização e aclimatização o estudo comprovou a eficiência no estabelecimento de plantas micropropagadas de *Dendrocalamus asper* em condições *ex vitro*, com boa resposta no desenvolvimento aéreo e radicular, emissão e formação de novos órgãos vitais para a sobrevivência das plantas em condições de campo. Como perspectivas há necessidade de futuros estudos voltados à fase de pré-aclimatização e aclimatização da espécie, definindo o período de cada etapa, substrato e ambiente mais adequado, além de estudos fotossintéticos mais aprofundados na fase de transição *in vitro* para *ex vitro*, monitorando possíveis respostas de estresse e adaptação do material vegetal. De forma geral, esta dissertação respondeu suas hipóteses iniciais e concluiu seus objetivos previamente estabelecidos, permitindo a continuidade de novas pesquisas nas áreas de fisiologia, biotecnologia e conservação dos recursos genéticos vegetais para fins científicos ou produtivos.