



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Francisco Sebastian Montoya Serrano

**Respostas fotomorfológicas de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson e *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne em diferentes ambientes e meio de cultivo *in vitro***

Florianópolis

2022



Francisco Sebastian Montoya Serrano

**Respostas fotomorfológicas de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson e *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne em diferentes ambientes e meio de cultivo *in vitro***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

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

Florianópolis

2022



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

Montoya-serrano, Francisco Sebastian  
Respostas fotomorfológicas de *Guadua chacoensis* (Rojas)  
Londoño & P.M. Peterson e *Dendrocalamus asper* (Schult. &  
Schult. f.) Backer ex K. Heyne em diferentes ambientes e  
meio de cultivo in vitro / Francisco Sebastian Montoya  
serrano ; orientadora, Rosete Pescador, 2022.  
98 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,  
2022.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Micropropagação. 3.  
Fotoautotrófico. 4. Fotomixotrófico. 5. Nitrogênio. I.  
Pescador, Rosete . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos  
Vegetais. III. Título.



Francisco Sebastian Montoya Serrano

**Respostas fotomorfológicas de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson e *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne em diferentes ambientes e meio de cultivo *in vitro***

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

Prof. Marcos Vinicius Marques, Dr.

Universidade Federal de ...

Prof. Valdir Marcos Stefenon, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Lírio Luiz Dal Vesco, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina.

Certificamos que est é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Ciências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profª. Rosete Pescador, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2021



Este trabalho é dedicado aos meus pais,  
Maria Teresa e Hector Fco.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Maria Teresa Serrano, e ao meu pai, Hector Francisco Montoya, pela vida, apoio, amor incondicional e pelos ensinamentos.

Agradeço à minha companheira de vida, Cindy Julieth Correa, por todos os ensinamentos, amor, compartilhamentos, tempo dedicado e paciência pelas longas jornadas e ajuda nos trabalhos.

Agradeço à Profa. Dra. Rosete Pescador, por todos os ensinamentos, confiança depositada e pela orientação durante o mestrado e o doutorado no PPGRGV.

Agradeço especialmente ao Dr. Thiago Sanches Ornellas, pelos importantes ensinamentos, material vegetal de trabalho, acompanhamento e amizade brindada durante todo o processo de mestrado e doutorado.

Agradeço aos amigos e colegas que fiz no processo do doutorado e ao longo do tempo de permanência no CCA, pelos compartilhamentos, ensinamentos e aprendizados que cada um deles me brindou.

Agradeço ao Brasil por me permitir realizar o crescimento pessoal e profissional, as fundações e órgãos de fomento e aperfeiçoamento pessoal, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro através da bolsa de estudo que permitiu o desenvolvimento e elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) e Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal (NPBV), pela disponibilidade de matérias e equipamentos para o desenvolvimento do estudo de doutorado.



## RESUMO

Os bambus apresentam plantas com qualidades particulares e que podem ser utilizadas para inúmeras utilidades. A partir disto, o presente estudo objetivou avaliar o desenvolvimento das culturas de duas espécies de bambus gigantes, submetidas a fatores de diferentes espectros de luz LED, de ambiente e nutricionais durante a fase de cultivo *in vitro*, para obter mudas de melhor qualidade fisiológica e bioquímica. Neste estudo foram implantados dois experimentos: No primeiro, testou-se três fatores em culturas *in vitro* de *Guadua chacoensis* nas fases de pré-aclimatização e acimatação nas mudas: 1) diferentes espectros de luz LED (branca, azul-vermelha, azul e vermelha); em combinação com dois sistemas de troca gasosa, frascos vedados (vessel sealed) e frascos com membranas de troca gasosa (vessel ventiled) e da suplementação de sacarose ( $0 \text{ g L}^{-1}$  e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) no meio de cultura. Dados de altura das touceiras, número de brotações, presença de raiz, carboidratos solúveis totais, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm), foram determinados após 35 dias de cultivo *in vitro*. No segundo experimento, avaliou-se os efeitos morfológicos e bioquímicos das culturas de *Dendrocalamus asper*, com a otimização do meio de cultura em dois fatores: Três diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura, amônio; amônio-nitrato e nitrato, combinado com quatro concentrações cada (30, 60 90, 120 mM) e o tratamento testemunha (0 mM). Dados de altura das touceiras, número de brotações, índice de multiplicação, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e conteúdo de nitrogênio total no tecido vegetal, foram determinados após sete semanas de cultivo *in vitro*. Na avaliação das luzes LED e o sistema de troca gasosa, foi observado que a maior altura média esteve presente nos tratamentos com LED vermelho (8,44 cm). A respeito do número de brotações, foi observado o maior número médio no tratamento com LED azul-vermelho (4,66 brotos/touceiras). Para este experimento foi comprovado que a presença de raiz e os pigmentos fotossintéticos não apresentaram diferenças significativas. Os valores de Fv/Fm, mostraram que os tratamentos sem sistema de troca apresentaram maiores valores médios no momento da saída das touceiras do sistema *in vitro*. Na avaliação dos fatores luz LED com membrana e a suplementação com sacarose, foram observadas as maiores alturas médias no tratamento com LED vermelho (8,08 cm) e sem suplementação de sacarose (7,22 cm). A maior número médio de brotações novas foi observado no tratamento com LED branco (3,44 brotos) e, sem suplementação de sacarose (3,83 brotos). Referente aos carboidratos, o maior acúmulo médio foi no tratamento com LED branca com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $8,37 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ). Para o conteúdo de pigmentos fotossintéticos as maiores concentrações de clorofila *a* clorofila *b* foram observados nos tratamentos com LED vermelha sem sacarose. Referente a avaliação do Fv/Fm para foi observado as plantas cultivadas com suplementação de sacarose apresentam médias maiores. No segundo ensaio, foi observado uma maior altura das touceiras nos tratamentos com nitrato (5,56 cm) e amônio (4,75 cm), e nas concentrações 0, 30 e 60 mM. O número de brotações novas foi maior nos tratamentos com nitrato (1,69 brotos touceira) e testemunha (2,0 brotos/touceira). Os maiores conteúdos médios de clorofila *a* estiveram presentes nas concentrações 0 mM ( $21,32 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ), 30 mM ( $20,79 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) e 60 mM ( $15,95 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ), para a clorofila *b* no tratamento amônio-nitrato a 30 mM ( $14,42 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ). Na determinação do nitrogênio total no tecido vegetal o maior conteúdo foi observado no tratamento amônio-nitrato ( $26,83 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ).

**Palavras chaves:** micropropagação, fotoautotrófico, fotomixotrófico, meio de cultivo, nitrogênio.



## ABSTRACT

Bamboos present plants with particular qualities that can be used for countless uses. In this regard, the present study aimed to evaluate the development of cultures of two species of giant bamboos, submitted to factors of different LED light spectrums, environment, and nutrition factors during the *in vitro* cultivation phase to obtain seedlings of better physiological and biochemistry quality. In this study, two experiments were implemented: In the first one, three factors were tested in *in vitro* cultures of *Guadua chacoensis* in the pre-acclimatization and acclimatization phases in the seedlings: 1) different spectrums of LED light (white, blue-red, blue and red); in combination with 2) gas exchange systems, vessel sealed and flasks with gas exchange membranes (vessel vented) and sucrose supplementation (0 g L<sup>-1</sup> and 30 g L<sup>-1</sup>) in the culture medium. Data on clump height, number of shoots, root presence, total soluble carbohydrates, photosynthetic pigment content and maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) were determined after 35 days of *in vitro* cultivation. In the second experiment, the morphological and biochemical effects of *Dendrocalamus asper* cultures were evaluated, with the optimization of the culture medium in two factors: Three different nitrogen sources in the culture medium, ammonium; ammonium-nitrate and nitrate, combined with four concentrations each (30, 60, 90, 120 mM) and the control treatment (0 mM). Data on clump height, number of shoots, multiplication index, photosynthetic pigment content and total nitrogen content in plant tissue were determined after seven weeks of *in vitro* culture. In the evaluation of the LED lights and the gas exchange system, it was observed that the highest average height was present in the treatments with red LED (8.44 cm). Regarding the number of shoots, the highest average number was observed in the treatment with blue-red LED (4.66 shoots/clumps). For this experiment, it was proved that the presence of root and photosynthetic pigments did not show significant differences. The values of Fv/Fm showed that the treatments without gas exchange system had higher mean values at the moment of the clumps leaving the *in vitro* system. In the evaluation of the factors LED light with membrane and sucrose supplementation, the highest average heights were observed in the treatment with red LED (8.08 cm) and without sucrose supplementation (7.22 cm). The highest average number of new shoots was observed in the treatment with white LED (3.44 shoots) and without sucrose supplementation (3.83 shoots). Concerning carbohydrates, the highest average accumulation was in the treatment with white LED with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose (8.37 mg g<sup>-1</sup> FM). For the content of photosynthetic pigment, the highest concentrations of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* were observed in treatments with red LED without sucrose. With respect to the evaluation of Fv/Fm, it was observed that plants cultivated with sucrose supplementation had higher averages. In the second test, a greater height of the clumps was observed in the treatments with nitrate (5.56 cm) and ammonium (4.75 cm), and at concentrations of 0, 30 and 60 mM. The number of new shoots was higher in treatments with nitrate (1.69 shoots/clump) and control (2.0 shoots/clump). The highest average chlorophyll *a* contents were present at concentrations of 0 mM (21.32 mg g<sup>-1</sup> FM), 30 mM (20.79 mg g<sup>-1</sup> FM) and 60 mM (15.95 mg g<sup>-1</sup> FM) concentrations. For chlorophyll *b* in the 30 mM ammonium nitrate treatment (14.42 mg g<sup>-1</sup> FM). In the determination of total nitrogen in plant tissue, the highest content was observed in the ammonium-nitrate treatment (26.83 mg g<sup>-1</sup> FM).

**Keywords:** Micropropagation. Photoautrophic. Photomixotrophic. Culture media. Nitrogen.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. a) Distribuição mundial de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño e Peterson (Cor verde indicando presença da espécie) Fonte: Jardim Botânico de Missouri disponível em: [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org) b) touceira de *Guadua chacoensis* (fonte: [www.tropicalbamboo.org](http://www.tropicalbamboo.org)); c) colmos de *G. chacoensis*..... 33
- Figura 2 Figura 1. a) distribuição mundial de *Dendrocalamus asper* (schult. & schult. f.) backer ex k. heyne (cor verde indicando presença da espécie) (fonte: Jardim Botânico de Missouri disponível em: [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)) b) Touceira de *Dendrocalamus asper*. (fonte <http://www.bambuexport.com.ec>). ..... 34
- Figura 3. Altura média de touceiras (cm) de *Guadua chacoensis* cultivadas in vitro sob quatro espectros de luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) após 35 dias de cultivo..... 53
- Figura 4 Número médio de brotações novas geradas e índice de multiplicação aos 35 dias de cultivo in vitro de *G. chacoensis* sobre o efeito de quatro luzes tipo LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR). a) número médio de brotações e b) índice de multiplicação. .... 54
- Figura 5 enraizamento médio aos 35 dias de cultivo in vitro de *G. chacoensis* sobre o efeito de quatro espectros de luz LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e dois tipos de vedação (membrana de troca gasosa, S para ausência; V para presença)..... 54
- Figura 6 Conteúdo médio de carboidratos solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MF) de *G. chacoensis* aos 35 dias de cultivo in vitro sob quatro espectros de luzes LED e dois tipos de vedação (membrana de troca gasosa, S para ausência; V para presença). ..... 55
- Figura 7. Rendimento quântico máximo do PSII de touceiras de *G. chacoensis* ex vitro provenientes de cultivo in vitro sob luzes LED e dois tipos de vedação das tampas; a) tratamento com LED branca, com presença de membranas de trocas gasosas (WV) e com ausência de membranas (WS); b) tratamento com LED azul-vermelha, com presença de membranas de trocas gasosas (BRV) e com ausência de membranas (BRS); c) tratamento com LED vermelha, com presença de membranas de trocas gasosas (RV) e com ausência de membranas (RS); d) tratamento com LED azul, com presença de membranas de trocas gasosas (BV) e

com ausência de membranas (BS). Barras correspondem ao erro padrão da média.

- .....57
- Figura 8. Rendimento quântico máximo do PSII de touceiras de *G. chacoensis* cultivadas in vitro sob quatro espectros de luzes LED e dois tipos de vedação (com presença de membrana porosa a gases – vessel ventiled e com ausência de membrana porosa a gases – vessel sealed). ..... 59
- Figura 9. Altura média de touceiras (cm) de *Guadua chacoensis* cultivadas in vitro com dois sistemas de vedação, sob quatro luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) após 35 dias de cultivo. ....60
- Figura 10. Número médio de brotações novas geradas e índice de multiplicação aos 35 dias de cultivo in vitro de *G. chacoensis* sobre o efeito de quatro luzes tipo LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose no meio de cultura (0 e 30 g. L<sup>-1</sup>). a) efeito dos espectros de luz sob o número médio de brotações novas, b) efeito das concentrações de sacarose no número médio de brotações, c) efeito dos espectros de luz no índice de brotação e d) efeito da concentração de sacarose sob o índice de multiplicação ..... 60
- Figura 11. enraizamento médio aos 35 dias de cultivo in vitro de *G. chacoensis* sobre o efeito de quatro espectros de luz LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose no meio de cultura ((0 e 30 g. L<sup>-1</sup>). ..... 61
- Figura 12. Conteúdo médio de carboidratos solúveis totais (mg. g<sup>-1</sup>) em touceiras in vitro de *Guadua chacoensis* cultivadas in vitro sob luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose no meio de cultura (0 e 30 g. L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo. .... 62
- Figura 13. Teores médios de clorofila a (mg. g<sup>-1</sup> massa fresca) de touceiras de *G. chacoensis* cultivadas in vitro com sistema de ventilação sob quatro luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose (0 e 30 g L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo. .... 63
- Figura 14. Teores médios de clorofila b (mg. g<sup>-1</sup> massa fresca) de touceiras de *G. chacoensis* cultivadas in vitro com sistema de ventilação sob quatro luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose (0 e 30 g L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo. .... 64

- Figura 15. Teores médios de carotenoides totais ( $\text{mg. g}^{-1}$  massa fresca) de touceiras de *G. chacoensis* cultivadas in vitro com sistema de ventilação sob quatro luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose (0 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) após 35 dias de cultivo..... 64
- Figura 16. Rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) em folhas de *G. chacoensis* cultivadas in vitro sob quatro luzes LED e duas concentrações de sacarose no meio de cultura. (0 -  $30 \text{ g L}^{-1}$ ); a) tratamentos com LED branca, com  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (W0) e com  $30 \text{ g L}^{-1}$  (W30); b) tratamentos com luz LED azul-vermelha, com  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (BR0) e com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (BR30); c) tratamentos com luz LED vermelha, com  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (R0) e com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (R30); d) tratamentos com luz LED azul, com  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (B0) e com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (B30). ..... 65
- Figura 17. Rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) em folhas de *G. chacoensis* cultivadas in vitro sob luzes LED e duas concentrações de sacarose no meio de cultura 0 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ . ..... 67
- Figura 18. Altura média de touceiras (cm) de *Dendrocalamus asper*, cultivadas in vitro em meio de cultura MS. a) efeito das diferentes fontes de nitrogênio (testemunha, amônio, amônio-nitrato e nitrato); b) efeito das diferentes concentrações de nitrogênio (0 mM, 30 mM, 60mM, 90 mM, 120 mM), após sete semanas de cultivo. .... 85
- Figura 19. Número médio de novas brotações de *Dendrocalamus asper*, cultivadas em meio de cultura MS modificado. a) efeito das diferentes fontes de nitrogênio (testemunha, amônio, amônio-nitrato e nitrato); b) efeito das diferentes concentrações de nitrogênio (0 mM, 30 mM, 60mM, 90 mM, 120 mM), após sete semanas de cultivo in vitro. .... 86
- Figura 20. Índice de multiplicação em *Dendrocalamus asper* após sete semanas de cultivo in vitro de sob diferentes fontes (testemunha, amônio, amônio-nitrato e nitrato)... 86
- Figura 21. Teores médios de pigmentos fotossintéticos de *Dendrocalamus asper* de a) conteúdo de clorofila a sob diferentes concentrações de nitrogênio (0 mM, 30 mM, 60mM, 90 mM, 120 mM) e; b) conteúdo de clorofila b sob o efeito da interação das fontes de nitrogênio e as concentrações no meio de cultura após sete semanas de cultivo in vitro. .... 87
- Figura 22. Teores médios de nitrogênio total do tecido vegetal ( $\text{mg. g}^{-1}$  MS) de touceiras de *Dendrocalamus asper* cultivadas in vitro sob diferentes fontes de nitrogênio

18

(amônio, amônio-nitrato, nitrato) no meio de cultura após sete semanas de cultivo.

.....88

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Conteúdo médio de pigmentos fotossintéticos ( $\text{mg g}^{-1}\text{MF}$ ) de *G. chacoensis* cultivadas in vitro sob quatro espetros de luz LED e membrana de troca gasosa aos 35 dias de cultivo. .... 56
- Tabela 2. Tratamentos utilizados: formulações salinas de acordo com as modificações realizadas em concentrações e fonte de nitrogênio em meio de cultivo. .... 82



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**BAP** – 6 – benzilaminopurina

**Ca** – clorofila *a*

**Cb** – Clorofila *b*

**Cm** – centímetro

**g** - Grama

**°C** – Grau (s) célsius

**h** – Hora

**L** – Litro

**LCME**– Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

**LED** – diodos emissores de luz

**LFDGV**– Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal

**m** - Metro

**μL** – microlitro

**μM**– Micromolar

**Mg** – miligrama

**ml** – mililitro

**mM** - milimolar

**MS** – Meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962)

**N** - Nitrogênio

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**- amônio

**nm** – nanômetros

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - nitrato

**NPBV** - Núcleo em Pesquisa em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal

**%** - porcentagem

**rpm** – rotação por minuto

**s** - Segundo

**UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina



**LISTA DE SÍMBOLOS**

° grau

± mais ou menos

® marca registrada

TM Trademark



## SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS .....	29
1.1	<i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño & P.M. Peterson .....	32
1.2	<i>Dendrocalamus asper</i> (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne .....	33
1.3	FATORES DE ESTUDO .....	34
1.4	Estruturação da tese .....	37
1.4.1	Objetivos.....	37
1.4.1.1	Objetivo geral - Capítulo 1 .....	37
1.4.1.2	Objetivo geral - Capítulo 2 .....	37
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	39
2	CAPÍTULO 1 – efeito da qualidade de luz, ventilação natural e concentração de sacarose no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño & P.M. Peterson.	45
2.1	introdução .....	46
2.2	materias e metodos .....	48
2.2.1	Material vegetal e condições de cultivo.....	48
2.2.2	Cultivo <i>in vitro</i> sob luzes LED .....	49
2.2.2.3	<b>Experimento 1:</b> Influência de diferentes espectros de luz LED e da ventilação natural dos frascos na qualidade fisiológica de plantas de <i>Guadua chacoensis</i> . .....	49
2.2.2.4	<b>Experimento 2.</b> Influência da sacarose em combinação com diferentes espectros de luz LED no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Guadua chacoensis</i> em presença de ventilação natural. ....	50
2.2.3	Aclimatização .....	50
2.2.4	Variáveis analisadas.....	50
2.2.5	Análise de carboidratos solúveis totais.....	51
2.2.6	Análise parâmetros fotossintéticos .....	51
2.2.6.1	Análise de pigmentos fotossintéticos .....	51
2.2.6.2	Análise do rendimento quântico máximo do fotossistema II .....	52

	26	
2.2.7	Análises estatísticas .....	52
2.3	RESULTADOS .....	52
2.3.1	Utilização de sistemas heterotrófico e mixotrófico no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Guadua chacoensis</i> sob espectros de luz LED.....	52
2.3.1.1	Carboidratos solúveis totais.....	55
2.3.1.2	Pigmentos fotossintéticos .....	55
2.3.1.3	Determinação do rendimento quântico máximo do fotossistema II.....	56
2.3.2	Efeito de sistema de cultivo fotomixotrófico e fotoautotrófico no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Guadua chacoensis</i> sob espectros de luz LED .....	59
2.3.2.1	Carboidratos solúveis totais.....	62
2.3.2.2	Pigmentos fotossintéticos .....	62
2.3.2.3	Determinação do rendimento quântico máximo do fotossistema II.....	64
2.4	Discussão .....	67
2.5	CONCLUSÕES .....	72
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</u> .....	73
3	CAPÍTULO 2 – cultivos <i>in vitro</i> de <i>Dendrocalamus asper</i> (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne com diferentes FONTES DE NITROGÊNIO .....	79
3.1	INTRODUÇÃO .....	80
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
3.2.1	Material vegetal e condições de cultivo.....	81
3.2.2	Efeito do balanço de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ no meio de cultura. ....	82
3.2.3	Variáveis analisadas.....	83
3.2.4	Quantificação de pigmentos fotossintéticos .....	83
3.2.5	Determinação do nitrogênio na amostra vegetal .....	84
3.2.6	Análises estatística.....	84
3.3	RESULTADOS .....	84
3.3.1	Pigmentos fotossintéticos .....	87

3.3.2 Nitrogênio total no tecido vegetal.....	88
3.4 Discussão .....	88
3.5 Conclusões.....	92
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	93
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</u> .....	97



## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

A família Poaceae é classificada como a quinta maior família de plantas com flores do mundo, contendo cerca de 11.500 espécies e 768 gêneros (KELLOGG, 2015; SORENG et al., 2017). Esta família apresenta importância ecológica em ambientes naturais, grande sucesso na evolução e diversificação das suas espécies, com grande importância econômica; também possui notabilidade na alimentação humana e bioindústrias (GIRALDO-CAÑAS, 2010; HODKINSON, 2018). Dentro da família citada, a subfamília *Bambusoideae* contém 1.670 espécies em 125 gêneros, três tribos: *Olyreae* (bambus herbáceos) com 123 espécies em 21 gêneros; *Bambuseae* (bambus lignificados de clima tropical) com 966 espécies em 73 gêneros; *Arundinarieae* (bambus lignificados de clima temperado) com 581 espécies em 31 gêneros (CLARK et al., 2015; SORENG et al., 2017). A Subfamília *Bambusoideae* está presente em todos os continentes, com exceção da Antártida e da Europa, e são encontrados desde o nível do mar até 4000 m de altitude (KELCHNER; BPG, 2013).

A ocorrência dos bambus encontra-se principalmente nas regiões tropicais e subtropicais no mundo. A maior concentração está na região da Ásia pacífica (China: 626, Índia: 102, Japão: 84, Malásia: 50, entre outros) (SINGH et al., 2013). No continente americano, encontram-se distribuídos desde o México até o sul da Argentina, com exceção do Chile e das Ilhas do Caribe (FORERO; SOUZA, 2008). Igualmente, para os bambus lignificados os países com maior presença na América são Brasil (168 spp., 17 gêneros), Colômbia (75 spp., dez gêneros), Venezuela (71 spp., dez gêneros), Peru (58 spp., seis gêneros) e México (53 spp., oito gêneros) (RUIZ-SANCHEZ et al., 2021). Esta distribuição chega a cobrir cerca de 40% da superfície do planeta (HODKINSON, 2018).

Os bambus apresentam diferentes hábitos de crescimento sendo habitualmente classificados como alastrantes (*runners*), entouceirantes (*claspers*) e misturas de ambos (PRAKASH, 2020), essa diferença está diretamente ligada ao tipo do rizoma e sua morfologia (VAN DAM et al., 2018). Comumente, os bambus entouceirantes tem maior ocorrência em regiões de clima tropical, enquanto os bambus alastrantes ocorrem principalmente em regiões de clima temperado (PRAKASH, 2020).

Tradicionalmente, o bambu é propagado por dois métodos, de forma sexuada (sementes) e de forma vegetativa (cortes de rizoma e colmo e divisões de touceiras) (VAN DAM et al., 2018). A propagação por sementes apresenta dificuldades como: irregularidade e inviabilidade, florescimento gregário ou esporádicos, longos intervalos entre florescimentos e predação pela fauna local. Do mesmo modo, os métodos mais utilizados para a propagação do

bambu são os vegetativos (RAY; ALI, 2017), entre eles encontra-se o método do ramo basal, técnica que usa a parte aérea basal do colmo, que é introduzida no solo e são geradas mudas a partir de gemas nodais, o método do “chusquin” são brotações do rizoma a partir da estimulação por perturbações severas nos colmos (GRECO; CROMBERG, 2011; RIOS, 1995), segmentos nodais de colmo, secção de colmo com rizoma, mergulhia e alporquia de colmo (RAY; ALI, 2017).

No entanto, as limitações da propagação vegetativa encontram-se na disponibilidade e tamanho grande dos propágulos, dependência sazonal, incidência de doenças e pragas, baixa taxa de sobrevivência, porcentagem de enraizamento e taxa de multiplicação baixa, classificação taxonômica e o alto custo da produção de mudas. Desta forma, a obtenção de mudas em grande escala é um gargalo na cadeia produtiva do bambu (MUDOI et al. 2013; OPRINS et al. 2004; SINGH et al. 2013; VAN DAM et al., 2018).

Como alternativa, as técnicas de micropropagação apresentam vantagens como plantas saudáveis, possibilidade de propagação em grande escala, uniformidade genética e disponibilidade de mudas, independente da sazonalidade (RAJPUT et al. 2020). Historicamente, protocolos de micropropagação vêm sendo desenvolvidos desde o ano 1968, com o primeiro registro de germinação de embriões zigóticos de bambu *in vitro* em meio de cultura (ALEXANDRE; RAO, 1968). Nas últimas décadas, os protocolos continuam sendo desenvolvidos tanto na via organogênica como na via embriogênica (MUDOI et al., 2013). Porém, respostas morfogênicas *in vitro* tem-se encontrado como genótipo dependentes, e conseqüente com a alta diversidade de bambus, faz-se necessário o aperfeiçoamento, o refinamento e adaptação dos protocolos para cada espécie (SANDHU et al. 2018).

Neste sentido, protocolos de micropropagação de bambu de diversas espécies vêm sendo desenvolvidos com sucesso (MUDOI et al., 2013), a via organogênica é a mais relatada nestes estudos (NEGI; SAXENA, 2010). Porém, a redução das altas taxas de contaminação, o browning (por exsudação de fenóis, majoritariamente) e a hiperhidricidade na fase de estabelecimento das culturas continuam sendo o foco de novos estudos na procura de maior eficiência para a técnica (RAY; ALI, 2017).

Destaca-se que a cadeia produtiva do bambu gera mais de sete bilhões de dólares anuais a partir do desenvolvimento de diversos produtos, tais como papel, compensados, pisos, laminados, estruturas, alimentos, artesanato, revestimento, movelaria entre outros dos mais de 1.500 usos reportados. Dentre as espécies indicadas para este fim encontrassem *D. asper*, *D.*

*giganteus*, *D. latiflorus*, dentre outros (AZZINI; BERALDO, 2001; PEREIRA, 2001; GRECO; CROMBERG, 2011).

Além do gênero *Dendrocalamus*, plantas do gênero *Guadua*, tem grande relevância dentro da cadeia produtiva de bambus. Este gênero nativo da América, apresenta alta resistência e durabilidade, assim como usos conhecidos há mais de 500 anos e ligado à sua ampla distribuição no território brasileiro (AZZINI; BERALDO, 2001; PEREIRA, 2001; GRECO; CROMBERG, 2011).

Dentro dos estudos desenvolvidos com plantas dos gêneros de interesse deste estudo (*Guadua* e *Dendrocalamus*) se abrange grande quantidade de aspectos importantes no cultivo *in vitro*. Entre os trabalhos mais recentes com o gênero *Guadua* incluem-se: desinfestação e estabelecimento *in vitro* de *G. angustifolia* (BORGES-GARCIA et al., 2004), micropropagação de *G. angustifolia* a partir de gemas axilares (JIMENEZ et al., 2006), identificação e eliminação de bactérias contaminantes durante o estabelecimento e propagação *in vitro* de *G. angustifolia* (NADHA et al., 2012; RAMIREZ et al., 2009), micropropagação de *G. angustifolia* com uso do sistema de imersão temporária em biorreatores tipo RITA® (GUITIÉRREZ et al., 2016; HOLST, 2010), estabelecimento, micropropagação e consistência de meios de cultura para *G. longifimbriata* e *G. angustifolia* (COSTA et al., 2017), micropropagação de *G. chacoensis* (ORNELLAS et al., 2019), micropropagação e análise da fidelidade genética por marcadores moleculares ISSR de *G. magna* e *G. angustifolia* (NOGUEIRA et al., 2019), efeitos na biogênese dos cloroplastos em condições de luz e escuridão durante cultivo *in vitro* de *G. chacoensis* (POLESI et al., 2019).

Por sua vez, entre os trabalhos mais recentes com plantas *in vitro* do gênero *Dendrocalamus* pode-se encontrar: micropropagação de *D. asper* a partir de brotos nodais e sementes (ARYA, 2002a), micropropagação de *D. asper* através da indução de ramificações axilares forçadas (ARYA, 2002b), propagação *in vitro* de *D. asper* a partir de inflorescências imaturas (ARYA; ARYA, 2008), micropropagação via organogênese a partir de rizoma de *D. asper* e *D. membranaceus* (NIRMALA, 2011), propagação em larga escala a partir de segmentos nodais de *D. asper* (BANERJEE et al., 2011), germinação de sementes e micropropagação de *D. giganteus* (WAIKHOM et al., 2012), caracterização da melhor época de coleta para a introdução de material *in vitro* de *D. asper* (Índia) (SINGH et al., 2012), propagação *in vitro* utilizando sementes de *D. membranaceus* (BRAR et al., 2013), regeneração *in vitro* e avaliação da fidelidade genética de *D. strictus* (GOYAL et al., 2015), otimização da concentração do meio de cultura e fitoreguladores para propagação *in vitro* de *D. asper* (RESTU

et al., 2020), isolamento e caracterização de baterias endofíticas de culturas *in vitro* de *D. asper* e *Bambusa oldhamii* com posterior uso no co-cultivo *in vitro* de *G. chacoensis* (BELINCANTA et al., 2022).

A LEI nº 12.484/2011, que dispõe sobre a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentável e ao Cultivo do Bambu, e as pesquisas na área de cultura de tecidos são fundamentais para a conservação e produção massal de propágulos de qualidade com baixo preço e melhor conhecimento das espécies quanto ao seu desenvolvimento fisiológico e genético. Neste contexto no ano 2013 como iniciativa para o fortalecimento da cadeia produtiva do bambu, foi iniciado o projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil” (Chamada MCTI/AÇÃO TRANSVERSAL/CNPq No 66/2013 – Proc. 457726/2013-0). Como parte deste projeto, e procurando melhor qualidade das mudas a serem geradas para a cadeia produtiva, se propõe trabalhar com aspectos nutricionais e de qualidade de luz de duas espécies que incluem um bambu de origem americano (*Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson) e um asiático (*Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne).

### 1.1 *GUADUA CHACOENSIS* (ROJAS) LONDOÑO & P.M. PETERSON

*Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson, tem crescimento natural no sudeste da Bolívia, Paraguai, Brasil, Uruguai e Argentina em associações florestais (Figura 1a) (LIZARAZU ET AL., 2013; LIZARAZU; VEGA, 2012). Popularmente conhecido como “taquara”, “Taquaraçu” ou “Taquara brava” é uma espécie de bambu neotropical lignificado (Figura 1b, c) (JUDZIEWICZ et al., 1999; SCHMIDT; LONGHI-WAGNER, 2009). Esta espécie se desenvolve em altitudes de 75 a 420 m, com relatos de ocorrência no Brasil nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com ocorrência nos biomas Mata Atlântica e Pantanal; habitam florestas tropicais, preferentemente perto de cursos de água, matas de galerias, beira de rios, matas ciliares ou florestas de várzeas (LONDOÑO; PETERSON, 1992; SHIRASUNA, 2015).

**Figura 1. a) Distribuição mundial de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño e Peterson (Cor verde indicando presença da espécie) Fonte: Jardim Botânico de Missouri disponível em: [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org) b) touceira de *Guadua chacoensis* (fonte: acervo pessoal); c) colmos de *G. chacoensis*.**



A espécie possui elevado potencial para o uso socioeconômico, pelas suas características mecânicas e físicas, possibilitando o uso para construções, como casas, pontes e moveis, embora atualmente sejam relatados apenas usos destes para construção de habitações rústicas e artesanato (BENTON, 2015; LINDHOLM; PALM, 2007). Igualmente, sendo possível a transferência de tecnologias desenvolvidas para *Guadua angustifolia* que são adaptáveis a *G. chacoensis* (BENTON, 2015), porém, atualmente são poucas as informações encontradas.

*G. chacoensis* apresenta colmos de 10-20 m de altura e de 8-15 cm de diâmetro, lignificados e com presença de espinhos, de coloração verde, possui crescimento ereto na parte baixa do mesmo e curvo ou arqueado na parte apical (Figura 1a). Possui entrenós ocos, nós solitários e brotos solitários, estes últimos cobertos por um perfilo que se encontra a 2-4 mm acima da linha nodal. As folhas do colmo são coriáceas, de cor castanha clara, sendo a lâmina 1/3 – 1/4 do tamanho da bainha que por sua vez tem 50 cm de comprimento e 8-30 cm de largura e florescimento monocárpico (Londoño e Peterson, 1992).

## 1.2 *DENDROCALAMUS ASPER* (SCHULT. & SCHULT. F.) BACKER EX K. HEYNE

Por sua vez, a espécie *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne, conhecida como bamboo gigante tropical e subtropical, é originário do sudeste asiático, Índia subcontinental e Malásia (Figura 2a). Com usos reportados como material de construção pesada, biocombustível, fibras, alimento, madeira artesanato, instrumentos musicais e moveis, dentro outros (SINGH et al., 2012). Esta espécie é uma das mais cultivadas no mundo

(MUSTAFA et al., 2021), com grande potencial no Brasil de acordo com a semelhança climática que oferece este país com o seu centro de diversidade (MANHÃES, 2008).

**Figura 2. a) distribuição mundial de *Dendrocalamus asper* (schult. & schult. f.) backer ex k. heyne (cor verde indicando presença da espécie) (fonte: Jardim Botânico de Missouri disponível em: [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)) b) Touceira de *Dendrocalamus asper* (fonte: acervo pessoal).**



A espécie tem hábito de crescimento entouceirante, com colmos lenhosos de 20-30 metros de altura, 8-20 cm de diâmetro e paredes grossas de 11-22 mm, também, apresenta entrenós de cor verde pálido e 20-45 cm de altura acompanhados de pelos curtos de cor marrom (Figura 2b) (BENTON, 2015; MEREDITH, 2009; GRECO, 2013). Possui florescimento esporádico, podendo também apresentar florescimento gregário ocasionalmente (BANIK, 2016). A espécie tem ciclo monocárpico de cerca de 100 a 120 anos (ARYA et al., 1999).

### 1.3 FATORES DE ESTUDO

Durante o cultivo *in vitro*, as plantas são afetadas por fatores ambientais e condições em que se encontram (KOZAI, 2016). Geralmente, as plantas *in vitro* são cultivadas em sistemas heterotróficos, com substratos ricos em macro e micronutrientes, suplementados com uma fonte de carbono, sendo comumente utilizada a sacarose para tal fim (YASEEN et al., 2013, LEMBRECHTS et al., 2017). Nestes sistemas, as plantas são cultivadas com alta umidade relativa, troca gasosa reduzida dentro de frasco selados, iluminação e temperatura controlada (RODRIGUES et al., 2014).

Como alternativa, novos sistemas de cultivo *in vitro* são constantemente estudados, permitindo diferentes metabolismos nas plantas cultivadas, com redução da utilização de carbono exógeno ou até a isenção total deste permitindo o desenvolvimento de plantas com metabolismos mixotrófico ou autotróficos (MARTINS et al., 2020). O cultivo *in vitro* com ambientes que possibilitam os metabolismos mixotrófico e autotróficos apresentam

vantagens frente plantas com metabolismo heterotrófico, uma vez que a utilização constante de sacarose no meio de cultura pode desencadear a redução da expressão gênica relacionada à fotossíntese, por conseguinte baixas taxas fotossintéticas, biossíntese de carboidratos afetada, assim como o equilíbrio entre síntese e consumo destes, dentre outros (GRANOT et al. 2014; AGUILERA-ALVARADO; SANCHEZ-NIETO, 2017; CHAVES et al., 2020; NGUYEN et al., 2020)

Nos sistemas de micropropagação *in vitro* propícios para os metabolismos mixotrófico e autotróficos nas plantas, são utilizadas filtros ou membranas que permitem as trocas gasosas passiva dentro da atmosfera dos frascos, possibilitando o uso do carbono ambiental (MARTINS et al., 2020). Existem filtros para troca gasosa comerciais, porém, de acordo com Saldanha et al. (2012) e fatível a fabricação de filtros igualmente efetivos diretamente nos laboratórios a serem utilizados, reduzindo custos sem perda das vantagens na promoção da síntese de pigmentos fotossintéticos, crescimento das plantas e esterilidade dos frascos.

A luz, é outro fator importante nos sistemas de micropropagação *in vitro*, uma vez que, além de atuar como fonte de energia em plantas também sinaliza processos morfofisiológicos, de acordo ao comprimento de onda, intensidade, direção e fonte de emissão (KOZAI, 2016; LAZZARINI et al., 2017). Processos como fototropismo, morfogênese, abertura estomática, movimento dos cloroplastos, trocas gasosas, alongamento de estruturas, perfilhamento entre outros são processos influenciados pela luz (LAZZARINI et al., 2017, PAIK; HUQ, 2019; TEIXEIRA, 2020; MURD ET AL., 2021). Contudo, uma vez excedida a capacidade da captação de fótons pelos fotorreceptores e pigmentos fotossintéticos, as plantas utilizam rotas de dissipação, porém, quando a luz é excessiva e não existe uma rápida dissipação, os centros de reação são afetados havendo redução da eficiência fotossintética, existindo risco de fotoinibição com a prolongada exposição (DE HSIE et al., 2019).

Diversas pesquisas no uso de fontes de luz são realizadas constantemente na cultura de tecidos. Uma alternativa altamente avaliada no uso *in vitro*, são os diodos emissores de luz (LED), com capacidade de gerar espectros específicos de luz como é a luz amarela, verde, azul, vermelha e luz branca abrangendo todos os espectros da luz visível (BATISTA et al. 2018). As plantas detectam os sinais da luz através de fotorreceptores, que são capazes de transmitir esses sinais em uma cascata de resposta de sinalização de luz (TEIXEIRA, 2020). Dentre os fotorreceptores destacam-se os fitocromos, criptocromos, fototropinas, família das Zeitlupe e UVR88 (CHRISTIE et al., 2015; OUZOUNIS et al., 2015; TEIXEIRA, 2020).

De acordo com Teixeira (2020), os fitocromos estão envolvidos em várias funções do ciclo da vida, incluindo a germinação, desetiolação, desenvolvimento de estômatos, floração e senescência foliar, são sintetizados na forma inativa (Pr) e são convertidos na forma ativa (Pfr) após a absorção de luz vermelha; os criptocromos, estão presentes no núcleo, são ativados pela luz azul e tem função predominante durante a desetiolação e no controle fotoperiódico da floração; as fototropinas, receptores de UV-A e luz azul, tem efeitos genéticos responsáveis sob o fototropismo, posicionamento foliar, abertura estomática e o acúmulo de cloroplastos; as proteínas da família Zeitlupe, absorvem luz azul e UV-A e afetam o fotoperíodo da transição floral, regulação do oscilador circadiano e alongamento do hipocótilo; fotorreceptor UVR8 (UV RESISTANT LOCUS 8) afetado pela luz UV-B desencadeia uma ampla gama de alterações na expressão genica, levando a adaptações morfológicas e à produção de flavonóis que atuam como escudos protetores UV-B, medeia a flexão fototrópica, o movimento estomático e a ativação do gene da cascata do relógio circadiano.

Por outro lado, outro fator importante na micropropagação *in vitro* de espécies vegetais, são as soluções salina utilizadas como meio de cultivo e as diversas composições destas. A composição salina MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é a mais utilizadas para o cultivo *in vitro* de diversas espécies, assim como para bambu (SANDHU et al., 2018). Dentro dos constituintes desta formulação salina, o nitrogênio destaca-se como um dos nutrientes minerais essenciais e principais para as plantas (KOVALCHUK et al. 2018). Na composição salina MS, o nitrogênio utilizado está representado por duas sais, o nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), que disponibilizam  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na razão de 20:40 mM respectivamente (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

O nitrogênio em plantas, se apresenta importante com efeitos sobre a formação de calos, diferenciação celular, multiplicação, organogênese e embriogênese (NIEDZ; EVENS, 2008). Estruturalmente, está presente como constituinte de aminoácidos, proteínas, amidas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, hormônios de crescimento e clorofila (LEGHARI et al., 2016). Entretanto, existem relatos na literatura que indicam que a quantidade de nitrogênio na formulação MS é excessiva para o cultivo de várias espécies (MENKE-MILCZAREK; ZIMNY, 2001; NOWAK et al., 2007; GABRYSZEWSKA, 2015), fazendo necessário a otimização e estudo das concentrações e fontes para cada espécie e as respostas específicas das mesmas.

## 1.4 ESTRUTURAÇÃO DA TESE

O presente trabalho foi estruturado em dois capítulos. O primeiro capítulo trata sobre os efeitos de luzes LED, concentração de sacarose no meio de cultura e dois tipos de vedação das tampas dos frascos de cultivo (com e sem membrana porosa a gases) no cultivo *in vitro* de *Guadua chacoensis*. O segundo capítulo apresenta a otimização da concentração, balanço e fonte de nitrogênio para o cultivo *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

### 1.4.1 Objetivos

#### 1.4.1.1 Objetivo geral - Capítulo 1

Avaliar sistemas heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico na propagação *in vitro* de culturas de *G. chacoensis* na procura de melhor qualidade fisiológica e bioquímica nas plantas na fase de alongamento/enraizamento e aclimatação com vista a cadeia produtiva do bambu.

#### Objetivos específicos

Estudar o desenvolvimento morfológico de touceiras *in vitro* de *G. chacoensis* submetidas a sistemas heterotrófico, mixotrófico e autotrófico sob quatro luzes LED.

Analisar o comportamento bioquímico de touceiras de *G. chacoensis* nos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sob luzes LED, concentração de sacarose no meio de cultura e sistema de ventilação.

Avaliar a capacidade fotossintética de plantas de *G. chacoensis* procedentes de sistema *in vitro* sob luzes LED, duas concentrações de sacarose no meio de cultivo e dois sistemas de ventilação na fase de aclimatização *ex vitro*.

#### 1.4.1.2 Objetivo geral - Capítulo 2

Avaliar os efeitos morfológicos e bioquímicos, assim como aperfeiçoar o meio de cultura para culturas de *Dendrocalamus asper*, usando diferentes concentrações e duas fontes de nitrogênio, Nitrato e Amônio, e ainda o balanço delas.

**Objetivos específicos**

Otimizar a concentração de nitrogênio, assim como a fonte utilizada na composição salina utilizada para cultivo *in vitro* de *D. asper*.

Avaliar os efeitos morfológicos das diferentes concentrações e fontes de nitrogênio no meio de cultura sob culturas *in vitro* de *D. asper*.

Identificar o comportamento bioquímicos de touceiras de *D. asper in vitro* submetidas a diferentes fontes e concentrações de nitrogênio no meio de cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA-ALVARADO, G. P.; SÁNCHEZ-NIETO, S. Plant hexokinases are multifaceted proteins. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 7, p.1151-1160, 2017.
- ALEXANDER, M. P.; RAO, T. C. *In vitro* culture of bamboo embryo. **Current Science**, v. 37, p. 415, 1968.
- ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; DEV ARYA, I. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, India, v.18, p. 879-882, 1999.
- ARYA, I.D; SATSANGI, R.; ARYA, S. Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. **Journal of Sustainable Forestry**, 14, p. 103–114, 2002a.
- ARYA, S.; SATSANGI, R.; ARYA, I.D. Rapid mass multiplication of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. **Journal of Sustainable Forestry**, v. 4, p. 103–109, 2002b.
- 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.
- AZZINI, A.; BERALDO, A. L. **Métodos práticos para utilização do bambu**. Campinas: UNICAMP, 2001. 14 p.
- BANERJEE, M.; GANTAIT, S.; PRAMANIK, B.R. A two step method for accelerated mass propagation of *Dendrocalamus asper* and their evaluation in field. **Physiology Molecular and Biology of Plants** v. 17, p. 387, 2011.
- BANIK, R. L. *Silviculture of South Asian priority Bamboos*. **Springer, Singapore**, p. 117-128, 2016.
- BATISTA, D. S.; FELIPE, S. H. S.; SILVA, T. D.; DE CASTRO, K. M.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; MIRANDA, N. A.; et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter?. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018.
- BELINCANTA, C.; BOTELHO, G. R.; ORNELLAS, T. S.; ZAPPELINI, J.; GUERRA, M. P. Characterization of the endophytic bacteria from *in vitro* cultures of *Dendrocalamus asper* and *Bambusa oldhamii* and assessment of their potential effects in *in vitro* co-cultivated plants of *Guadua chacoensis* (Bambusoideae, Poaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 23, p. 25-36, 2021.
- BENTON, A. Priority Species of Bamboo. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (eds.) *Bamboo: the plant and its use*. **Springer International Publishing**, v. 10, p. 31-41, 2015.
- BORGES-GARCÍA, M.; ROS-ARALUCE, C.; CASTELLANOS-RUBIO, Y. MILANES-RODRÍGUEZ, S.; VELÁSQUEZ-FERIA, R. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. **Biotecnología Vegetal** v. 4, n. 4, p. 237–242, 2004.
- CARVALHO, L. R. D. **Caracterização e macropropagação de estacas de *Bambusa oldhamii* e *Bambusa tuldoides* coletadas em diferentes posições na planta matriz e sob o**

**efeito de AIB.** 2017. Dissertação (Mestrado Em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

CHAVES, M. C.; FREITAS, J. C. E.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; DE OLIVEIRA PRUDENTE, D.; COSTA, B. G. P.; GRAZUL, R. M. Influence of colorful light-emitting diodes on growth, biochemistry, and production of volatile organic compounds *in vitro* of *Lippia filifolia* (Verbenaceae). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 212, p. 112040, 2020.

CLARK, L.G.; LONDONO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. Bamboo taxonomy and habitat. In: LIESE, W.; KOEHL, M. eds. Bamboo, the plant and its uses. Heidelberg: Tropical Forest Series, **Springer, Cham**. p. 1–30, 2015.

COSTA, F. A.; MARQUES, A. A.; RONDON, J. N.; CEREDA, M. P. Protocolo para micropropagação de duas espécies de *Guadua*. In: DRUMOND, P.; WIEDMAN, G. (org.). Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia. **Embrapa Acre-livro técnico (INFOTECA-E)** 1. ed. Rio de Janeiro: ICH, 2017.

Christie, J. M.; Blackwood, L.; Petersen, J.; Sullivan, S. Plant flavoprotein photoreceptors. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 3, p. 401-413, 2015.

DE HSIE, B. S.; BUENO, A. I. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; DA CUNHA, S. H. B.; MARTINS, E. R.; PINTO, J. E. B. P. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 198, p. 111577, 2019.

FORERO, G.; HERMANN, S. **La guadua un sistema innovador para la construcción de vivienda en Anapoima -Cundinamarca**, 2008. Trabalho de conclusão de curso (especialização em gerência de projetos de engenharia) – Faculdade de Engenharia, Universidade de la Salle, Bogotá, 2008. Obtido de [https://ciencia.lasalle.edu.co/esp\\_gerencia\\_proyectos/36](https://ciencia.lasalle.edu.co/esp_gerencia_proyectos/36)

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

GRANOT, D.; KELLY, G.; STEIN, O.; DAVID-SCHWARTZ, R. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p. 809-819, 2014.

GRECO, T. M.; CROBERG, M. **Bambu Cultivo e Manejo. Florianópolis**: P.183. Insular 2011.

GRECO, T. M. **Diversidade de bambus (Poaceae: Bambusoideae) na ilha de Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GOYAL, A. K.; PRADHAN, S.; BASISTHA, B. C.; SEN, A. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 473-482, 2015.

- GUTIÉRREZ, L.G.; LÓPEZ-FRANCO, R.; MORALES-PINZÓN, T. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA®. **African Journal of Biotechnology** v. 15, p. 1503–1510, 2016.
- HODKINSON, T. R. Evolution and taxonomy of the grasses (Poaceae): a model family for the study of species-rich groups. **Annual Plant Reviews Online**, p. 255-294, 2018.
- HOLST, A. **Efecto del sistema de inmersión temporal (RITA®) sobre el desarrollo de plántulas *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae: Bambusoideae) y su posterior aclimatación.** Univesidad de Costa Rica, 2010.
- JIMÉNEZ, V. M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 3, p. 389-395, 2006.
- JUDZIEWICZ, E. J.; CLARK, L. G.; LONDOÑO, X.; STERN, M. J. **American Bamboos.** Washington, D. C.: Smithsonian Institution Press, 1999.
- KELCHNER, S. A.; BPG [Bamboo Phylogeny Group]. Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 67 p. 404-413, 2013.
- KELLOGG, E. A. Flowering plants, monocots, poaceae. In: Kubitski Ked. The families and genera of vascular plants. Cham: **Springer International**. v.13 p. 1–416, 2015.
- KOZAI, T. Why LED lighting for urban agriculture? In: KOZAI T.; FUJIWARA K.; RUNKLE, E. (eds). LED lighting for urban agriculture. **Springer, Singapore**, pp 3–18, 2016.
- LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; DUARTE, A. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas: revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017.
- LEMBRECHTS, R.; CEUSTERS, N.; MAURICE, P.; CEUSTERS, J. Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 226-231, 2017.
- LONDOÑO, X.; PETERSON, P. M. *Guadua Chacoensis* (Poaceae: Bambuseae), Its Taxonomic Identity, Morphology, and Affinities. **Novon** v. 2, n. 1, p. 41, 1992.
- LINDHOLM, M.; PALM, S. ***Guadua Chacoensis* in Bolivia -an Investigation of Mechanical Properties of a Bamboo Species.** Centre for Wood Technology & Design, Department of Management and Engineering - Linköping University, Linköping, 2007. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:liu:diva-10372>
- LIZARAZU, M.; VEGA, A.S. **Guadua.** In: ZULOAGA, F.O.; RÚGOLO DE AGRASAR, Z.E.; ANTON, A.M. (Eds.), Flora Argentina. Monocotyledoneae: Poaceae: Aristidoideae Pharoideae 3. Plantas Vasculares de la República Argentina, pp. 59–63 ISBN 978-987-1601-20-2, 2012.

- LIZARAZU, M.A.; RÚGOLO DE AGRASAR, Z.E.; VEGA, A.S. A new species of *Guadua* (Poaceae, Bambusoideae, Bambuseae) and synopsis of the genus in Argentina and neighboring regions. **Systematic Botany**, v. 38, p. 1062–1075, 2013.
- MANHÃES, A.P. **Caracterização da cadeia produtiva do bambu no Brasil**: Abordagem preliminar. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Florestal), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 39p, 2008.
- MARTINS, J. P. R.; RODRIGUES, L. C. D. A.; CONDE, L. T.; GONTIJO, A. B. P. L.; FALQUETO, A. R. Anatomical and physiological changes of *in vitro*-propagated *Vriesea imperialis* (Bromeliaceae) in the function of sucrose and ventilated containers. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 154, n. 1, p. 87-99, 2020.
- MEREDITH, T. J. Timber press pocket guide to Bamboos. London: **Timber Press**. p. 77-78, 2009.
- MUDOI, K. D.; SAIKIA, S. P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.
- MUSTAFA, A. A.; DERISE, M. R.; YONG, W. T. L.; RODRIGUES, K. F. A concise review of *Dendrocalamus asper* and related bamboos: germplasm conservation, propagation and molecular biology. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1897, 2021.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 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, p. 93–97, 2012.
- NGUYEN, Q. T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **Plant Factory**, p. 333-346, 2020.
- NIRMALA, C.; ALI, A. H.; BADAL, T. De novo organogenesis in the form of rhizome in *Dendrocalamus asper* and *D. membranaceus*. **Current Science**, v. 100, p. 468–470, 2011.
- NOGUEIRA, J. S.; GOMES, H. T.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Guadua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.
- ORNELLAS, T. S.; MARCHETTI, C. K.; OLIVEIRA, G. H. D.; FRITSCHÉ, Y.; GUERRA, M. P. Micropropagation of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.
- ORNELLAS, T. S.; WERNER, D.; HOLDERBAUM, D. F.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Effects of Vitrofuril, BAP and meta-Topolin in the *in vitro* culture of *Dendrocalamus asper*. **Acta Horticulturae**, p. 285-292, 2017.

- OUZOUNIS, T.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C. O. Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: a review. **HortScience**, v. 50, n. 8, p. 1128-1135, 2015.
- PAIK, I.; HUQ, E. Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 92, p. 114-121, 2019.
- PEREIRA, M. A. **Bambu: espécies, características e aplicações**. Bauru – SP: Editora da UNESP, p. 58, 2001.
- PRAKASH, C. Bamboo fibre. In Handbook of natural fibres. **Woodhead Publishing**, p. 219-229, 2020.
- POLESI, L.; FRAGA, H.; VIEIRA, L.; HERINGER, A.; ORNELLAS, T.; SANTOS, H.; GUERRA, M.; PESCADOR, R. Chloroplast ultrastructure and hormone endogenous levels are differently affected under light and dark conditions during *in vitro* culture of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, p. 10, 2019.
- RAMÍREZ, L. A.; CASTAÑO, S. M.; LÓPEZ, R. **Identificación de bacterias que afectan el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth**. Revista de Investigaciones Universidad del Quindío v. 1, p. 151–15, 2009.
- Rios, H. C. Propagation of *Guadua angustifolia*. Propagation and Management. **Bamboo, People and Environment**, p. 34-38, 1995.
- RESTU, M.; LAREKENG, S. H.; SETIAWAN, E. The optimization of *in vitro* micropropagation of betung bamboo (*Dendrocalamus asper* Backer) by medium concentrations and plant growth regulators. In IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**, v. 575, n. 1, p. 012024. IOP Publishing, 2020.
- RODRIGUES, S. P.; DE TOLEDO PICOLI, E. A.; DE OLIVEIRA, D. C.; DA SILVA CARNEIRO, R. G.; DOS SANTOS ISAIAS, R. M. The effects of *in vitro* culture on the leaf anatomy of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1933-1941, 2014.
- RUIZ-SANCHEZ, E.; TYRRELL, C. D.; LONDOÑO, X.; OLIVEIRA, R. P.; CLARK, L. G. Diversity, distribution, and classification of Neotropical woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae) in the 21st Century. **Botanical Sciences**, v. 99, n. 2, 198-228, 2021.
- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; DE AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; DO RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.
- SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 1, p. 27-53, 2018.
- SCHMIDT, R.; LONGHI-WAGNER, H. M. A tribo Bambuseae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 1, 2009.

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 of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 21. n. 2, p. 220-228, 2012.

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

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

SORENG, R. J.; PETERSON, P. M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; TEISHER, J. K.; CLARK, L. G.; BARBERA, P.; GILLESPIE, L. J.; ZULOAGA, F. O. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II. An update and comparison of two 2015 classifications. **Journal of Systematics and Evolution** 55:259–290, 2017.

TEIXEIRA, R. T. Distinct responses to light in plants. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 894, 2020.

VAN DAM, J. E.; ELBERSEN, H. W.; MONTAÑO, C. M. D. Bamboo production for industrial utilization. **Perennial Grasses for Bioenergy and Bioproducts**, 175-216, 2018.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I. A. Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.

## 2 CAPÍTULO 1 – EFEITO DA QUALIDADE DE LUZ, VENTILAÇÃO NATURAL E CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Guadua chacoensis* (ROJAS) LONDOÑO & P.M. PETERSON.

### RESUMO

*Guadua chacoensis* é um bambu sul-americano, de grande porte e alto potencial madeireiro. Possui características promissoras para o fortalecimento da cadeia produtiva do bambu no Brasil, porém, com baixa disponibilidade de material propagado, falta de tecnologias de propagação e material vegetativo para venda aos produtores. Com o intuito de aumentar a disponibilidade e qualidade de material genético desta espécie objetivou-se avaliar sistemas heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico na propagação *in vitro* de culturas de *G. chacoensis* na procura de melhor qualidade fisiológica e bioquímica nas plantas na fase de alongamento/enraizamento e aclimação com vista a cadeia produtiva do bambu. Os materiais vegetais foram submetidos a luz LED: branca (W), azul-vermelha (BR), azul (B) e vermelha (R); tipo de vedação da tampa: tampa vedada (vessel sealed - S) e tampa com membranas de trocas gasosas (vessel ventiled - V); e suplementação de sacarose ao meio de cultura (0 e 30 g L<sup>-1</sup>). Foram analisadas as seguintes variáveis: altura das touceiras (cm), número de brotações, presença de raiz (0-1), teores de carboidratos solúveis totais (mg g<sup>-1</sup> de massa fresca (MF)), conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg g<sup>-1</sup> MF) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm). Na avaliação das luzes LED e o sistema de vedação das tampas foi observado que a maior altura média (8,44 cm) foi observada sob LED vermelho. O maior número médio de brotações foi obtido no tratamento LED azul-vermelho (4,66 brotos). O maior teor de carboidratos este presente no tratamento luz LED branco sem ventilação. A avaliação do Fv/Fm mostrou os maiores números médios ao dia 35 de cultivo *in vitro* nos tratamentos, sem adição de sacarose (0 g L<sup>-1</sup>) e expostos as luzes LED branco (0,69), LED azul-vermelho (0,66) e LED azul (0,66), chegando à estabilização fotossintética nos dias 6, 7 e 7 respectivamente. Na avaliação dos fatores luz LED com membrana *versus* a suplementação com sacarose, a maior altura média foi observada em plantas mantidas sob LED vermelho (8,08 cm), e nas plantas sem suplementação (7,22 cm). O maior número de brotações médio (3,94 brotos/touceira) sob luz LED branco, e no tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (3,83). O conteúdo médio de pigmentos fotossintéticos, os tratamentos com luz LED vermelho sem suplementação apresentaram maiores conteúdos médios de clorofila *a* (17,22 mg g<sup>-1</sup> MF), clorofila *b* (7,51 mg g<sup>-1</sup> MF), o maior acúmulo de carotenoides totais (2,37 mg g<sup>-1</sup> MF) esteve presente no tratamento sem suplementação. Referente ao Fv/Fm para estes fatores, os maiores

números médios à saída do frasco estiveram nos tratamentos sem suplementação de sacarose ( $0 \text{ g L}^{-1}$ ) e LED (0,66) e LED azul-vermelho (0,65). Finalmente, conclui-se que o cultivo *in vitro* de *G. chacoensis* vê-se favorecido com a suplementação de sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), recipientes vedados e luz LED azul-vermelha e LED branco.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson (família Poaceae, subfamília *Bambusoideae*) é um bambu neotropical lignificado (JUDZIEWICZ et al., 1999; SCHMIDT; LONGHI-WAGNER, 2009), com ocorrência natural no norte da Argentina, sudeste da Bolívia, sul do Paraguai, (LONDOÑO; PERTESON, 1992), Brasil (SHIRASUNA et al, 2022) e Uruguai (LIZARAZU et al., 2013; LIZARAZU; VEGA, 2012). Esta espécie apresenta colmos de até de altura e 8-15 cm de diâmetro, lignificados (LONDOÑO; PERTESON, 1992). Estas características conferem a *G. chacoensis* grande potencial para uso em construções civis e industrialização (LINDHOLM; PALM, 2007; BENTON, 2015).

As plantas, como organismos sésseis tem seu desenvolvimento afetado por fatores ambientais, a luz é um fator que atua como fonte de energia para a fotossíntese e sinalizador de processos fisiológicos (HART, 2012; KOZAI, 2016). Dentro destes processos fisiológicos, a fotomorfogênese, permite o desenvolvimento e crescimento das plantas sob controle da luz (KENDRICK; KRONENBERG, 2012), dita resposta à luz, ocorre de acordo com a intensidade, comprimento de onda e direção da fonte de emissão (LAZZARINI et al., 2017). A luz é captada pelas plantas por meio de fotorreceptores, fitocromos e criptocromos, os quais são responsáveis pela identificação da quantidade, qualidade, direção e duração do período de luz (PARIHAR et al., 2016, MUNEER et al., 2014). Os principais comprimentos de onda para os processos fotobiológicos estão situados em três bandas distintas denominada: ultravioleta (UV), luz visível e infravermelho (VIERSTRA; ZHANG, 2011).

A luz de acordo à qualidade e intensidade pode influenciar a produção de biomassa, a altura, o comprimento do entrenó, o tamanho das folhas, entre outras características (FAN et al., 2013). Por conseguinte, a necessidade de luz durante o crescimento e desenvolvimento de plantas são supridas pelo sol ou por iluminação artificial (KIM et al., 2004). Do mesmo modo, as plantas cultivadas *in vitro* tem sua morfogênese influenciada pela qualidade da luz, densidade do fluxo de fótons e fotoperíodo (LIAN et al., 2002).

Os diodos emissores de luz (LEDs), são uma fonte de luz capaz abranger todo o espectro da luz visível (luz branca), mas também da emissão em espectros específicos

(STEELE, 2007; BATISTA et al., 2018). Os LEDs destacam-se entre as fontes de luz por suas características de baixa produção de calor, alta eficiência no processo de geração de luz, longo período de vida, massa e volume pequeno, comprimento de onda específico e baixo consumo de energia (YEH; CHUNG, 2009; GUPTA; JATOTHU, 2013; SING et al., 2015). Em virtude disto, os LEDs têm sido propostos como fonte luminosa para ambientes controlados ou em câmaras de crescimento de plantas (LAZZARINI et al., 2017), no cultivo *in vitro* de plantas, os LEDs vem sendo usados em substituição das lâmpadas fluorescentes, graças ao avanço da tecnologia, redução de preços e obtenção de melhores resultados em diversas espécies (HUNG et al., 2015; BATISTA et al., 2016, FERREIRA et al., 2017).

Os efeitos dos espectros de luz sobre o desenvolvimento e a fisiologia das plantas são diferentes para cada comprimento de onda, por exemplo, a luz azul (400-500 nm) é absorvida pelas fototropinas, a qual se envolve em processos fisiológicos como o fototropismo, morfogênese, funcionamento fotossintético, abertura estomática e movimentos dos cloroplastos (JARILLO et al., 2001; BRIGGS; CHRISTIE, 2002; CELAVA; LISCUM, 2005). Já a luz vermelha, emite um espectro luminoso estreito (660nm), perto da absorbância máxima da clorofila e fitocromos (MUNEER et al., 2014), influencia na fotomorfogênese e é absorvida pelo fitocromo (LAZZARINI et al., 2007). A luz azul (400-500 nm) é mais energética do que a luz vermelha, o que promove maior estado energético nas clorofilas; também está relacionada com as trocas gasosas, relações hídricas, desenvolvimento de cloroplastos e síntese de clorofila (LAZZARINI et al., 2017).

A fonte de carbono é outro fator importante na cultura *in vitro*. A fotomixotrofia, pode-se entender como um estado e modo metabólico no qual os organismos fotossintéticos são capazes de realizar fotossíntese e o metabolismo heterotrófico utilizando substratos de carbono orgânico simultaneamente (SOLYMOSSI et al., 2019; SONG et al., 2021). As plantas cultivadas em condições *in vitro* apresentam majoritariamente metabolismo heterotrófico e ou mixotrófico de acordo aos requerimentos e suplementações de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e a fonte de carbono (BHOJWANI; DANTU, 2013; YASEEN et al., 2013). Geralmente, a sacarose é a fonte externa de carbono mais utilizada na cultura *in vitro* de plantas (YASEEN et al., 2013, LEMBRECHTS et al., 2017).

No cultivo *in vitro*, as plantas são cultivadas em frascos selados com trocas gasosas reduzidas e alta umidade relativa, sob temperatura e iluminação controladas (RODRIGUES et al., 2014). Porém, novos sistemas de cultivo *in vitro* vem sendo desenvolvidos atualmente para permitir as trocas gasosas da atmosfera dos frascos de forma passiva (filtros ou

membranas), possibilitando o uso do carbono ambiental e reduzindo ou chegando a isenção das fontes de carbono exógeno, fornecendo ambientes para metabolismos mixotrófico ou autotrófico para as plantas (MARTINS et al., 2020). Desta maneira, a suplementação com sacarose e a utilização de troca gasosa no cultivo *in vitro* é um fator importante de estudo, pois apresenta diferenças para cada espécie (MARTINS et al., 2020).

Dentro da propagação *in vitro* de bambus são utilizadas rotas morfogênicas, a embriogênese somática e a organogênese. Exemplos disto podem ser observados para diferentes espécies como *Dendrocalamus asper* em que a partir de cada segmento nodal foi obtido 4,83 colmos a partir do explante inicial (SINGH et al., 2012), também para *Thyrsostachys siamensis* com calos induzidos a partir de segmentos nodais e indução média de brotos de 13,5 com 11,10  $\mu\text{m}$  de BA (OBSUWAN et al., 2018). Dentro de gênero *Guadua*, igualmente são encontrados estudos recentes de micropropagação *in vitro*, Costa et al. (2017) com culturas de *G. longifimbriata* e *G. angustifolia* conseguiram 24 e 35% de emissão de brotos (respetivamente) a partir de ramos laterais, assim como Ornellas et al. (2019) a partir de segmentos nodais de *G. chacoensis* obtiveram taxas de multiplicação 1:2 no primeiro cultivo e com subcultivos contínuos taxas com crescimentos linear, chegando a 92% de sobrevivência.

De acordo com o descrito anteriormente, este estudo objetivou avaliar sistemas heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico na propagação *in vitro* de culturas de *G. chacoensis* na procura de melhor qualidade fisiológica e bioquímica nas plantas na fase de alongamento/enraizamento e aclimação com vista a cadeia produtiva do bambu.

## 2.2 MATERIAS E METODOS

### 2.2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Plantas previamente estabelecidas *in vitro* de *G. chacoensis* da coleção de bambus do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDVG/UFSC) do departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC foram a fonte de explantes para a condução deste estudo. Todos os experimentos e análises foram desenvolvidas no Núcleo em Pesquisa em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal (NPBV/UFSC) da mesma universidade.

Touceiras de 3-5 colmos foram subcultivadas por seis vezes com intervalos entre subcultivos em períodos de 30 dias. O meio de cultura básico, denominado de MSB, utilizado

foi a formulação salina MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado com 2 mL de vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE 1951), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™ como agente gelificante. Para a multiplicação das culturas, o MBS foi suplementado com 15 µm de 6-benzilammonopurina (BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8, antes da autoclavagem por 20 min a 121 °C e 1,3 atm. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas luz, com lâmpadas fluorescentes (Philips modelo TL 40w/ 75 RS T12 Luz do Dia) e intensidade luminosa de 55± 5 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

## 2.2.2 Cultivo *in vitro* sob luzes LED

Para avaliar o desenvolvimento das culturas *in vitro*, em relação aos efeitos dos diferentes espectros de luz, foram testados o uso de frascos com diferentes tipos de vedação das tampas (sem e com membranas porosas a gases) e concentrações de sacarose, em dois experimentos distintos realizados de forma paralela:

### 2.2.2.3 *Experimento 1: Influência de diferentes espectros de luz LED e da ventilação natural dos frascos na qualidade fisiológica de plantas de Guadua chacoensis.*

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial (4x2) com oito tratamentos: quatro espectros de luz 1) LED branca; 2) LED vermelha (660 nm); 3) LED azul (400-500 nm) e; 4) LED azul-vermelha combinados com dois tipos de vedação: 1) frascos com a presença de membrana porosa a gases (vessel ventiled) e; 2) frascos sem a presença de membrana porosa a gases (vessel sealed). Cada unidade experimental foi constituída de três frascos (400 mL) e cada frasco contendo uma touceira de três colmos, com três repetições.

Para os tratamentos com presença de ventilação natural, foram usadas tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos com membranas porosas a gases, conforme descrito por Saldanha et al. (2012). Para os tratamentos sem membranas de trocas gasosas, foram utilizadas tampas de polipropileno sem orifícios. Em cada frasco foram adicionados 30 mL do meio de cultura MSB gelificado com 2 g L<sup>-1</sup> Phytigel™. Após a inoculação as culturas foram dispostas em prateleiras adaptadas com luzes LED (anteriormente descritas), onde permaneceram por 35 dias em sala de crescimento com fotoperíodo 16/8 horas de luz e escuridade respectivamente, com fluxo de fótons 60 ± 5 µm.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>.

#### 2.2.2.4 **Experimento 2.** *Influência da sacarose em combinação com diferentes espectros de luz LED no cultivo in vitro de Guadua chacoensis em presença de ventilação natural.*

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial (4x2) com oito tratamentos: quatro espectros de luz 1) LED branca; 2) LED vermelha (660 nm); 3) LED azul (400-500 nm) e; 4) LED azul-vermelha combinados com a adição ao meio de cultura de duas concentrações de sacarose: 0 e 30 g L<sup>-1</sup>. Cada unidade experimental foi constituída de três frascos (400 mL) e cada frasco contendo uma touceira de 3 colmos por frasco, com três repetições.

Salienta-se que, para todos os tratamentos foram usadas tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada com utilização de membranas de trocas gasosas, segundo a metodologia descrita por Saldanha et al. (2012). Em cada frasco foram adicionados 30 mL de meio de cultura MSB, gelificado com 2 g L<sup>-1</sup> Phytigel™ e concentração de sacarose modificada. Após a inoculação as culturas foram dispostas em prateleiras com luzes LED por 35 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro. O fluxo de fótons foi de 60 ± 5 μm.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>.

#### 2.2.3 **Aclimatização**

Touceiras provenientes de ambos os experimentos, com número final de colmos obtidos após 35 dias de cultivo *in vitro* (4-7 colmos), foram transferidas para ambiente de aclimatização em casa de vegetação, umidade relativa do ar 80 ± 5%, temperatura 30 °C, irrigação por pulverização em intervalos de três horas e incidência de radiação solar de 60%. As mudas foram dispostas em tubetes de 350 mL com substrato comercial Agrinobre® TN MIX CE 0,4. Após um período de 30 dias em câmara de aclimatização as mudas foram transferidas para campo e permaneceram por mais 30 dias.

Dados de rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (Fv/Fm), foram coletados a partir do primeiro dia da transferência do ambiente *in vitro* para ambiente *ex vitro* e de forma consecutiva por 30 dias.

#### 2.2.4 **Variáveis analisadas**

Dados de: altura das touceiras (cm); número de brotações novas; presença de raiz (0-1), teor de carboidratos solúveis totais (mg g<sup>-1</sup> de massa fresca (MF)), conteúdo de clorofila *a* e *b* (mg g<sup>-1</sup> MF), conteúdo de carotenoides totais (mg g<sup>-1</sup> MF) foram coletados aos 35 dias de cultivo *in vitro*.

### 2.2.5 Análise de carboidratos solúveis totais

Amostras representativas (200 mg) de material vegetal (colmo e folha) foram coletadas após 35 dias em cultivo para a determinação dos teores de carboidratos solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MF). A extração e quantificação foram realizadas utilizando o método de fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956). As amostras, em triplicata, foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para tubos falcon (15 mL), com adição de 0,4 mL de etanol (80% a  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e mantidas em banho maria a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Este processo foi repetido três vezes e seguido da filtragem com lã de vidro e o volume ajustado para 2 mL com etanol (80% a  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Em seguida, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  do extrato a 450  $\mu\text{L}$  de água destilada, 0,5 mL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (96%). O teor de carboidratos total foi estimado a partir de uma curva padrão determinada com base em um carboidrato padrão (Glucose) e com absorbância medida a 490 nm em leitor de placas de Elisa.

### 2.2.6 Análise parâmetros fotossintéticos

Como parâmetro fotossintéticos foram determinados os pigmentos fotossintéticos: clorofila *a* clorofila *b* e carotenoides totais; e o rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ).

#### 2.2.6.1 Análise de pigmentos fotossintéticos

Amostras representativas (30 mg) de folhas, após 35 dias em cultivo *in vitro*, foram utilizadas para a quantificação de pigmentos fotossintéticos: clorofila *a* clorofila *b* e carotenoides totais, de acordo com Wellburn (1994) foram coletadas amostras representativas (30 mg) de folhas após 35 dias em cultivo. Para extração foi adicionado 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas em banho maria por 4 h. Os extratos obtidos foram pipetados em triplicatas técnicas em placas de Elisa com volume de 300  $\mu\text{L}$  cada. Em seguida, foi determinada a absorbância em leitor de placas de Elisa nos comprimentos de onda de 665 nm, 649 nm e 480 nm. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para quantificação dos pigmentos ( $\text{mg g}^{-1}$  MF) com a utilização das fórmulas:

$$C_a = 12,19A_{665} - 3,45A_{645}$$

$$C_b = 21,99A_{649} - 5,32A_{665}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{480} - 2,14 C_a - 70,16 C_b) / 220$$

Em que  $C_a$  = concentração de clorofila *a*,  $C_b$  = concentração de clorofila *b* e  $C_{x+c}$  = concentração de carotenoides totais.

### 2.2.6.2 Análise do rendimento quântico máximo do fotossistema II

Amostras representativas das mudas em fase de aclimatização, foram transferidas para ambiente escuro, por uma hora, para obtenção da fluorescência basal ( $F_o$ ). Seguidamente, a partir de um pulso de saturação luminosa com intensidade em torno de  $6000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , com fonte de luz act\u00ednica por 0,7 segundos, foram obtidos os valores da fluoresc\u00eancia m\u00e1xima ( $F_m$ ).

A partir dos par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia obtidos, foi calculado o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo em atr\u00e1s da formula  $F_v/F_m = [(F_m - F_o)/F_m]$ , que representa a fra\u00e7\u00e3o de f\u00f3tons absorvidos utilizados na via fotoqu\u00edmica de amostras acondicionadas ao escuro (Genty et al. 1989).

### 2.2.7 An\u00e1lises estat\u00edsticas

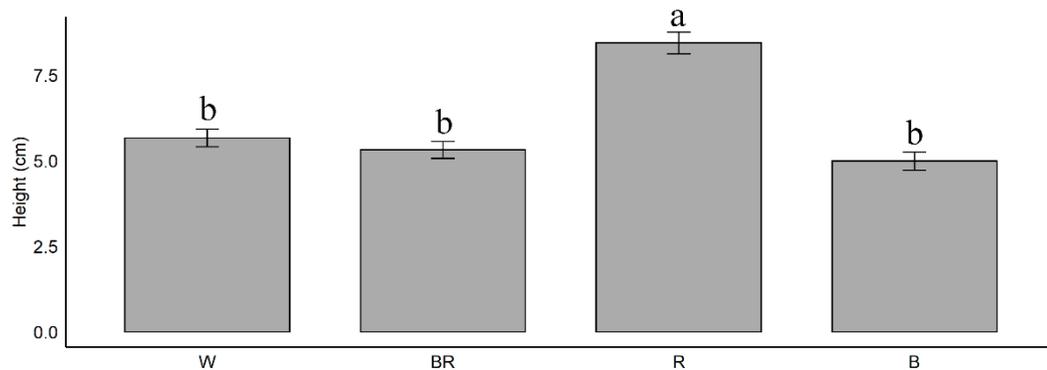
Os dados provenientes das coletas feitas no 35\u00b0 dias de cultivo *in vitro*, foram submetidos \u00e0 an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA). Quando as m\u00e9dias cumpriram os par\u00e2metros de homogeneidade e normalidade, foi realizada separa\u00e7\u00e3o de m\u00e9dias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Todos os dados foram analisados por meio do programa estat\u00edstico R (R Development Core Team, 2010).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Utiliza\u00e7\u00e3o de sistemas heterotr\u00f3fico e mixotr\u00f3fico no cultivo *in vitro* de *Guadua chacoensis* sob espectros de luz LED.

O uso de diferentes espectros de luz LED, no cultivo de *G. chacoensis*, revelaram diferen\u00e7as significativas ( $p < 0,05$ ), na altura m\u00e9dia das touceiras (Figura 3). As maiores e significativas ( $p < 0,05$ ) alturas m\u00e9dias das touceiras foram observadas quando se utilizou o espectro de luz LED vermelho (8,44 cm), quando comparado aos demais tratamentos (Figura 3). Por sua vez, as menores alturas m\u00e9dias foram observadas quando foram cultivadas em espectros de luz LED azul (4,99 cm).

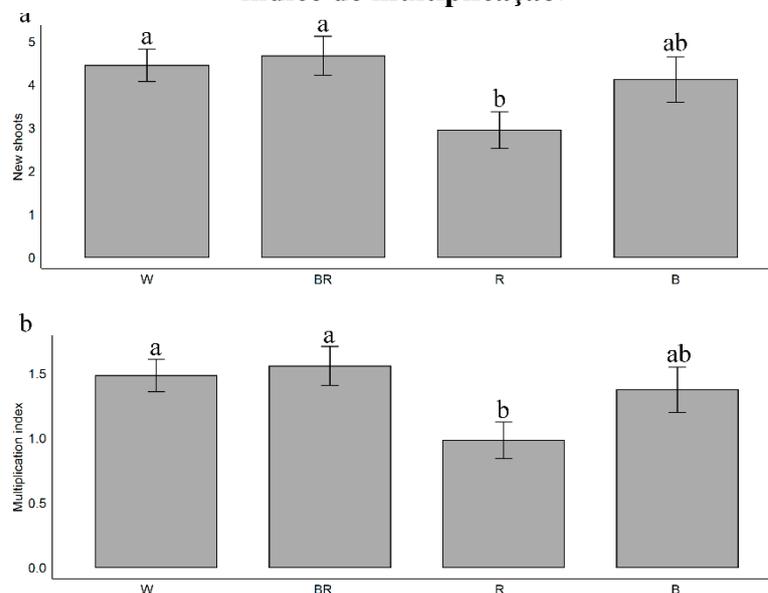
**Figura 3. Altura média de touceiras (cm) de *Guadua chacoensis* cultivadas *in vitro* sob quatro espectros de luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) após 35 dias de cultivo.**



\*Média de três repetições. Valores seguidos de letras diferentes indicam diferencia significativa para o teste Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 17,89. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

O número médio de brotações por touceiras também revelou diferenças significativas para os efeitos do fator luzes LED (Figura 4a). Observou-se que quando utilizado o espectro de luz LED azul-vermelho (4,66 brotos/ touceiras), LED branco (4,44 brotos/ touceiras) e LED azul (4,12 brotos/ touceiras) obtiveram-se os maiores números médios de brotação. Por sua vez, sob o efeito de luz LED vermelha, foi observada o menor número médio de brotações (2,94 brotos/ touceiras) (Figura 4a). Resultados semelhantes foram observados no índice de multiplicação para o fator luz LED (Figura 4b). os maiores índices médios de multiplicação foram observados nos tratamentos com luz LED azul-vermelho (1,55), luz LED branco (1,48) e luz LED azul (1,37). O menor índice médio de multiplicação foi observado no tratamento com luz LED vermelho (0,98) (Figura 4b).

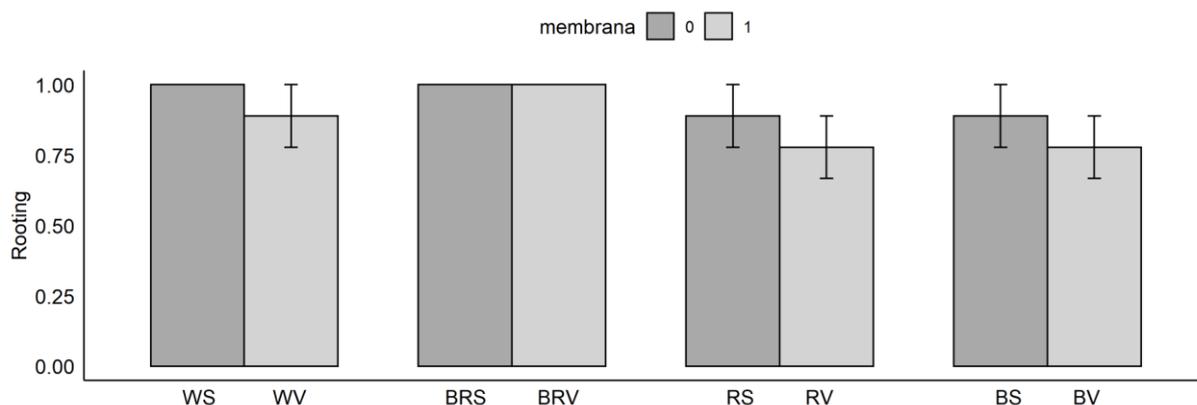
**Figura 4** Número médio de brotações novas geradas e índice de multiplicação aos 35 dias de cultivo *in vitro* de *G. chacoensis* sobre o efeito de quatro luzes tipo LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR). a) número médio de brotações e b) índice de multiplicação.



\*Médias de três repetições. Valores seguidos de letras diferentes indicam diferença significativa para o teste Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 44,60. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

A presença de raiz para plantas de *G. chacoensis* aos 35 dias de cultivo *in vitro* não apresentou diferenças significativas quando realizada a análise de variância (ANOVA) para os fatores estudados (Figura 5). Foi observado que todos os tratamentos apresentaram valores entre 85-100% de presença de raízes.

**Figura 5** enraizamento médio aos 35 dias de cultivo *in vitro* de *G. chacoensis* sobre o efeito de quatro espectros de luz LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e dois tipos de vedação (membrana de troca gasosa, S para ausência; V para presença).

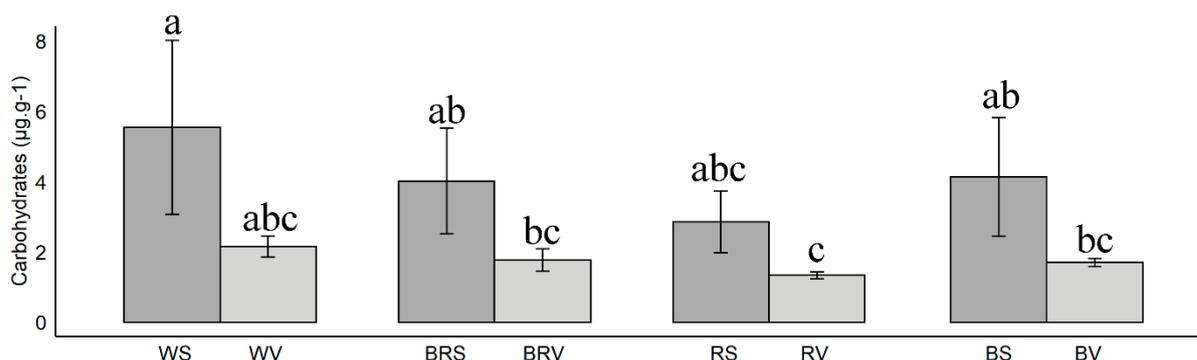


\* Médias de três repetições. CV (%) = 16,83. Barras correspondem ao erro padrão da média.

### 2.3.1.1 Carboidratos solúveis totais

O conteúdo médio de carboidratos solúveis totais, apresentou diferença significativa para a interação dos fatores luzes LED e sistemas de vedação das tampas (Figura 6). Foi observado o maior conteúdo médio no tratamento com LED branco sem membrana (5,54 mg g<sup>-1</sup> MF), porém, sem diferir dos tratamentos com LED azul sem membrana (4,13 mg g<sup>-1</sup> MF), LED azul-vermelho sem membrana (4,01 mg g<sup>-1</sup> MF), LED vermelho sem membrana (2,85 mg g<sup>-1</sup> MF) e LED branco com membrana (2,15 mg g<sup>-1</sup> MF). O menor conteúdo médio de carboidratos foi observado no tratamento com LED vermelho com membrana (1,34 mg g<sup>-1</sup> MF) (Figura 6).

**Figura 6** Conteúdo médio de carboidratos solúveis totais (mg g<sup>-1</sup> MF) de *G. chacoensis* aos 35 dias de cultivo *in vitro* sob quatro espectros de luzes LED e dois tipos de vedação (membrana de troca gasosa, S para ausência; V para presença).



\* Média de três repetições. Valores expressados em mg de glucose equivalentes (mg g<sup>-1</sup> GE) por cada 1g de material fresca, a partir de uma curva padrão com R<sup>2</sup> = 0,9881. CV (%) = 24,33.

### 2.3.1.2 Pigmentos fotossintéticos

Os conteúdos médios de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais, em plantas de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* por 35 dias sob os efeitos dos fatores luz LED e dois tipos de vedação das tampas, não apresentaram diferenças significativas na análise de variância ANOVA. (Tabela 1).

**Tabela 1. Conteúdo médio de pigmentos fotossintéticos (mg g<sup>-1</sup>MF) de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* sob quatro espectros de luz LED e membrana de troca gasosa aos 35 dias de cultivo.**

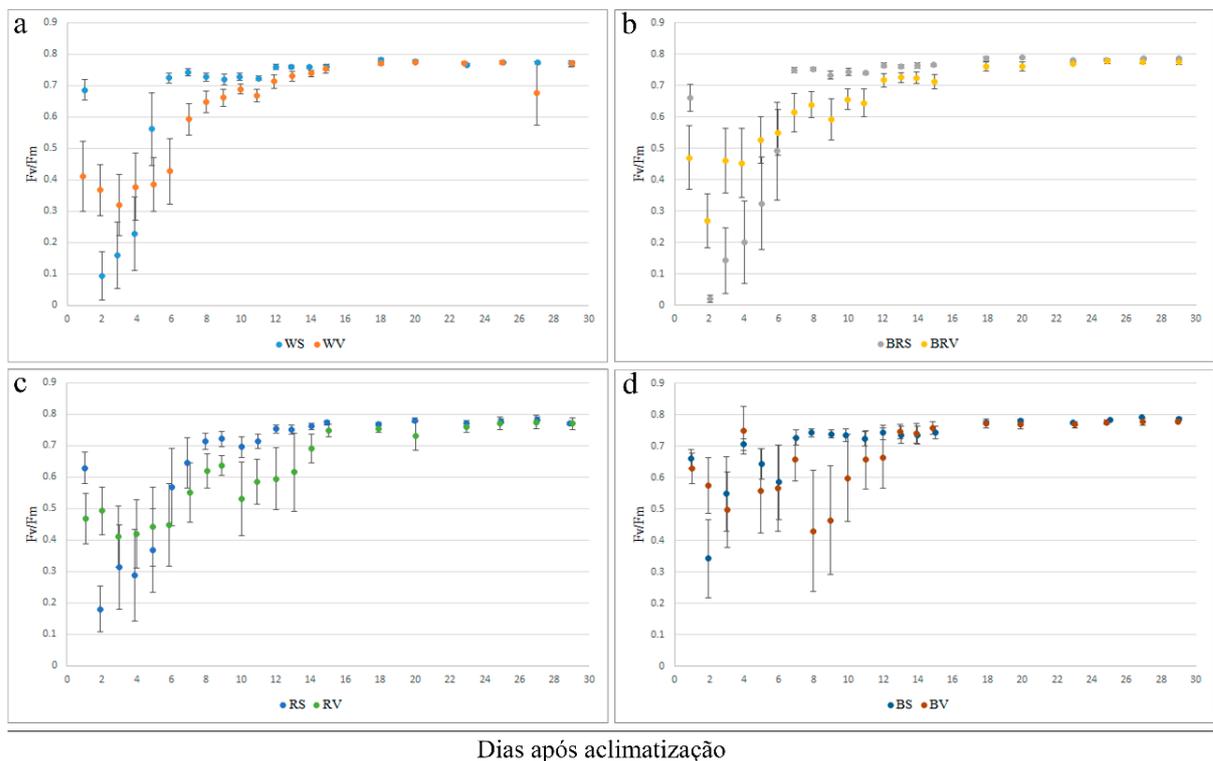
Espectro de luz	Membrana de troca gasosa	Pigmentos fotossintéticos (mg g <sup>-1</sup> MF)		
		Clorofila a <sup>1 NS</sup>	Clorofila b <sup>2 NS</sup>	Carotenoides Totais <sup>3 NS</sup>
LED branco	presença	11.92	5.32	2.03
	ausência	12.74	5.15	2.18
LED azul-vermelho	presença	7.09	2.64	1.77
	ausência	13.13	4.93	2.56
LED vermelho	presença	8.80	3.86	1.68
	ausência	9.68	3.38	2.38
LED azul	presença	7.00	4.00	1.36
	ausência	10.98	2.35	2.16
Média		10.17	3.95	2.02

\* Média de três repetições. Valores expressados em mg por cada 1 g de matéria fresca. CV (%): 1 = 39,34, 2 = 44,78, 3 = 21,87. NS = não significativo.

### 2.3.1.3 Determinação do rendimento quântico máximo do fotossistema II

As plantas cultivadas sob espectro de luz LED Branca apresentaram diferenças entre os tratamentos com membrana e na ausência de membrana de acordo às barras do erro padrão da média (Figura 7a). Enquanto as plantas cultivadas sob espectro de luz LED branco e ausência de membrana no dia 1 apresentava média de 0,69, as plantas sob espectro de luz LED branco e presença de membrana tinha média de 0,41. Porém, para o dia 2, as plantas sob espectro de luz LED branco e ausência de membrana apresentaram o maior decréscimo chegando a 0,09 e as plantas sob espectro de luz LED branco e presença de membrana apresentaram média de 0,37. No entanto, a estabilização e recuperação foi observada no tratamento com espectro de luz LED branca e ausência de membrana a partir do dia 6, a diferença, a estabilização do tratamento com espectro de luz LED branco e presença de membrana foi a partir do dia 13 (Figura 7a).

**Figura 7. Rendimento quântico máximo do PSII de touceiras de *G. chacoensis* ex vitro provenientes de cultivo *in vitro* sob luzes LED e dois tipos de vedação das tampas; a) tratamento com LED branca, com presença de membranas de trocas gasosas (WV) e com ausência de membranas (WS); b) tratamento com LED azul-vermelha, com presença de membranas de trocas gasosas (BRV) e com ausência de membranas (BRS); c) tratamento com LED vermelha, com presença de membranas de trocas gasosas (RV) e com ausência de membranas (RS); d) tratamento com LED azul, com presença de membranas de trocas gasosas (BV) e com ausência de membranas (BS). Barras correspondem ao erro padrão da média.**



As plantas cultivadas sob espectro de luz LED azul-vermelho apresentaram diferenças entre os tratamentos com membrana e na ausência de membrana quando comparadas barras do erro padrão da média (Figura 7b). No dia 1, as plantas sob espectro de luz LED azul-vermelho e ausência de membrana apresentaram média de 0,66 e as cultivadas na presença de membrana média igual a 0,47. Para o dia 2, ambos os tratamentos tiveram uma redução no valor médio sendo o tratamento com espectro de luz LED azul-vermelho e na presença de membrana 0,27 e o tratamento com espectro de luz LED azul-vermelho e na ausência de membrana 0,02 (o menor). Contudo, no 7º dia o tratamento com espectro de luz LED azul-vermelho e na ausência de membrana começou a estabilização. Entretanto, sob espectro de luz LED azul-vermelho e presença de membrana tardou até o 13º dia para começar a estabilização (Figura 7b).

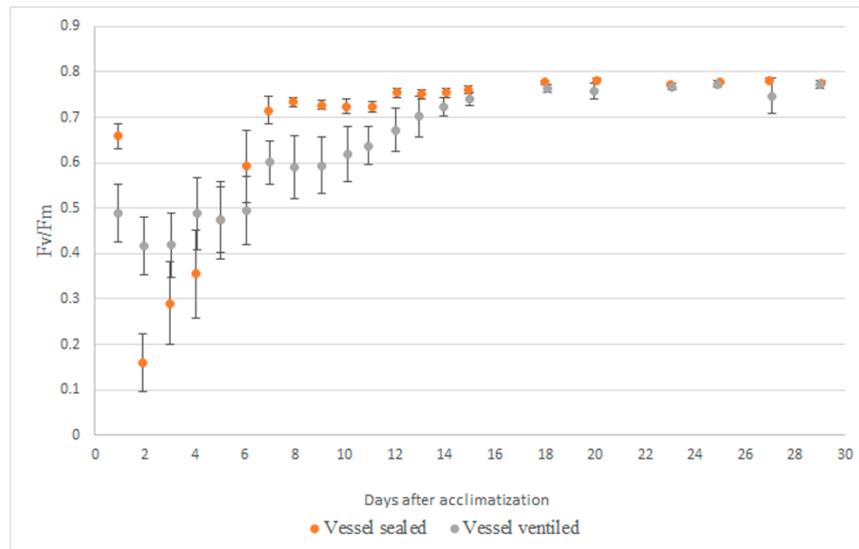
Para as plantas cultivadas sob espectro de luz LED vermelha foram observadas diferenças entre os tratamentos com presença e ausência de membranas na comparação das barras do erro padrão da média (Figura 7c). Para o dia 1, as plantas sob espectro de luz LED vermelha e ausência de membrana apresentaram média de 0,63 e as cultivadas sob espectro de luz LED vermelha e na presença de membranas apresentaram média de 0,48. No 2º dia, enquanto o tratamento com espectro de luz LED vermelha e ausência de membrana decrescia para 0,18, as cultivadas com espectro de luz LED vermelha e presença de membrana aumentou para 0,49. No 3º dia as plantas sob espectro de luz LED vermelha e ausência de membranas começou o aumento, chegando no início da estabilização no 8º dia. Porém, plantas cultivadas sob espectro de luz LED vermelha e na presença de membrana no 3º dia diminuíram para 0,41, a partir desse dia observou-se o início do aumento, chegando ao início da estabilização no 12º dia, enquanto as cultivadas sem membranas começaram a estabilização a partir do 15º dia (Figura 7c).

As plantas cultivadas sob espectro de luz LED azul foram as mais semelhantes no 1º dia no momento da saída do sistema *in vitro* para o *ex vitro*, entre os tratamentos com ausência e presença de membrana tendo média de 0,66 e 0,63 respectivamente (Figura 7d). Para o 2º dia, o tratamento com espectro de luz LED azul e na ausência de membrana decresceu para 0,34 assim como o tratamento com espectro de luz LED azul e presença de membrana para 0,57. Ambos os tratamentos apresentaram comportamentos aleatórios nos valores médios de  $F_v/F_m$  nos primeiros dias da aclimatização. As plantas cultivadas sob espectro de luz LED azul e na ausência de membrana apresentaram aumento dos valores médios até o dia 4 (0,70), depois decresceu até o dia 6 (0,59). Finalmente, o tratamento com espectro de luz LED azul e ausência de membrana no dia sete (0,73) começou a estabilização. Por outro lado, as plantas sob espectro de luz LED azul e presença de membrana apresentaram aumentos e decréscimos dos valores médios de  $F_v/F_m$  entre o 2º e 12º dia e no 13º dia começou a estabilização (Figura 7d).

Na sequência, foram avaliados os efeitos médios dos sistemas de vedação dos frascos, para presença de membranas de trocas gasosas (vessel ventiled) ou ausência membranas de trocas gasosas (vessel sealed) (Figura 8). No momento da saída das plantas do sistema *in vitro*, 1º dia, o tratamento com ausência de membranas apresentou a maior média geral (0,66) e o tratamento com presença de membrana (0,49). Embora, no 2º dia ambos os tratamentos apresentaram decréscimo nas médias, o tratamento com ausência de membrana foi o que exibiu a menor média (0,16). Na sequência, no 3º dia ambos os tratamentos começaram com o incremento de  $F_v/F_m$ . Porém, houve incremento mais rápido para o tratamento com ausência

de membrana, chegando à estabilização no 7º dia. Por sua vez, o tratamento com presença de membrana, apresentou o aumento menos rápido tardando até o 15º dia para chegar à estabilização (Figura 8).

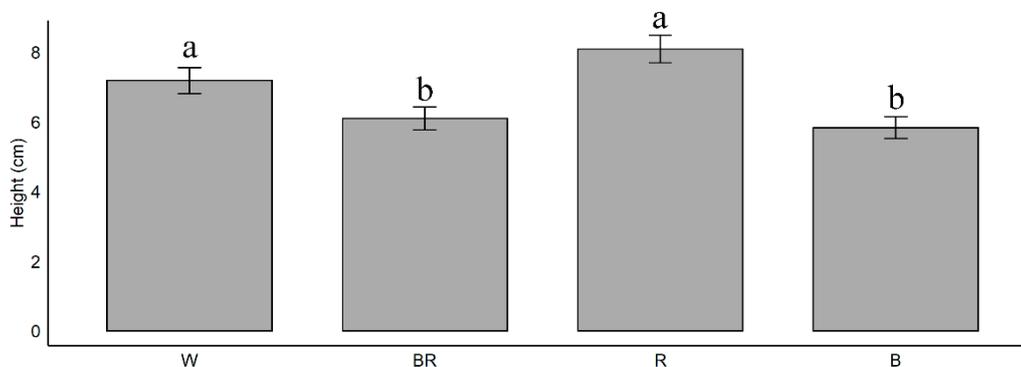
**Figura 8. Rendimento quântico máximo do PSII de touceiras de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* sob quatro espectros de luzes LED e dois tipos de vedação (com presença de membrana porosa a gases – vessel ventiled e com ausência de membrana porosa a gases – vessel sealed). \* Barras correspondem ao erro padrão da média.**



### 2.3.2 Efeito de sistema de cultivo fotomixotrófico e fotoautotrófico no cultivo *in vitro* de *Guadua chacoensis* sob espectros de luz LED

Os diferentes espectros de luz e concentração de sacarose no meio de cultura, revelaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas alturas médias das touceiras como fatores isolados (Figura 9). Para o fator luz LED, as maiores e significativas ( $p < 0,05$ ) alturas médias foram observadas nas plantas sob espectro de luz LED vermelho (8,08 cm) e espectro de luz LED branco (7,17 cm) (Figura 9a). Por sua vez, para o fator concentração de sacarose no meio de cultura, foi observado a maior e significativa altura média no tratamento sem sacarose (7,22 cm) (Figura 9b).

**Figura 9. Altura média de touceiras (cm) de *Guadua chacoensis* cultivadas *in vitro* com dois sistemas de vedação, sob quatro luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) após 35 dias de cultivo.**

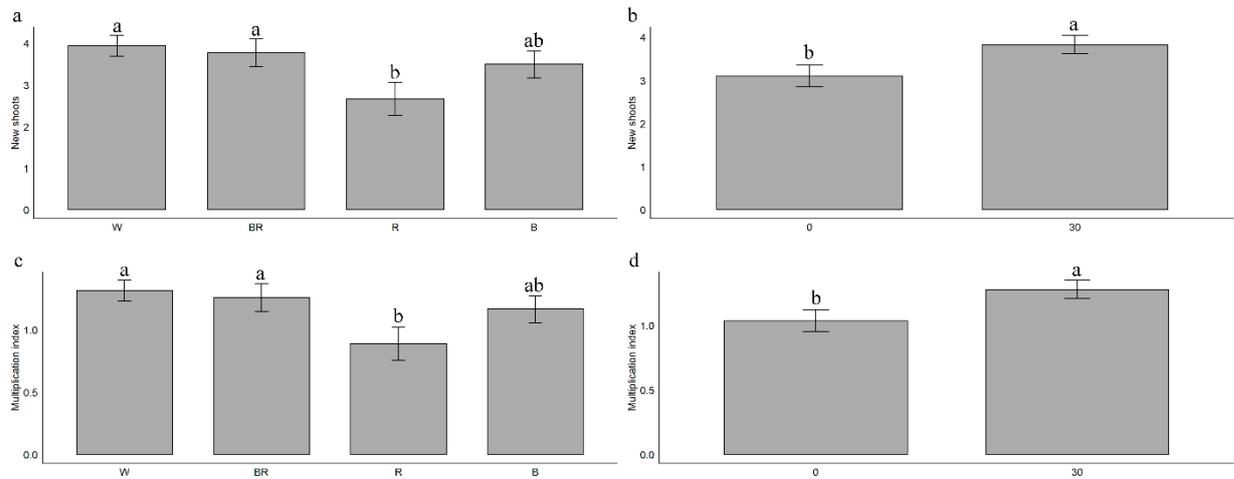


\* Média de três repetições. Valores seguidos de letras diferentes indicam diferencia significativa para o teste Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 20,30. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

O número médio de novas brotações, apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o efeito das luzes LED e a concentração de sacarose no médio de cultura como fatores isolados (Figura 10). Para o fator luz LED, foi observado que os tratamentos com luz LED branco (3,94 brotos/touceira), luz LED azul-vermelho (3,77 brotos/touceira) e luz LED azul (3,50 brotos/touceira) apresentaram os maiores números médios de brotações (Figura 10a). O fator concentração de sacarose, apresentou o maior número médio de brotações nas plantas com  $30 \text{ g L}^{-1}$  (3,83 brotos/touceira) (Figura 10b). O índice de multiplicação das touceiras, apresentou resultados semelhantes aos dados de brotação, tendo diferenças nos fatores isolados. Para o fator luz LED, o maior índice médio de multiplicação foi observado em touceiras sob luz LED branco (1,31), luz LED azul-vermelho (1,26) e luz LED azul (1,16) (Figura 10c). Por sua vez, para o fator concentração de sacarose no meio de cultivo, o maior índice médio foi observado no tratamento com  $30 \text{ g L}^{-1}$  (1,28) (Figura 10d).

**Figura 10. Número médio de brotações novas geradas e índice de multiplicação aos 35 dias de cultivo *in vitro* de *G. chacoensis* sobre o efeito de quatro luzes tipo LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose no meio de cultura (0 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ). a) efeito dos espectros de luz sob o número médio de brotações novas, b) efeito das concentrações de sacarose no número médio de brotações,**

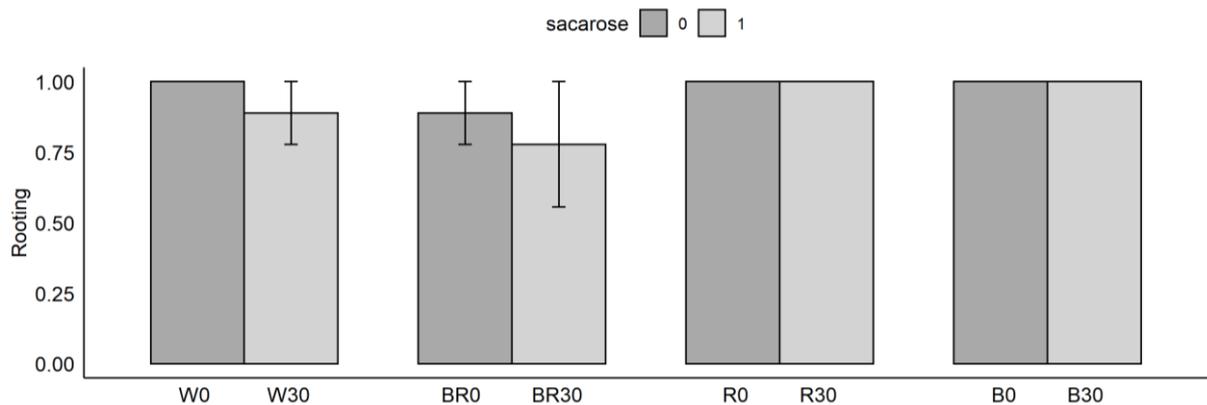
**c) efeito dos espectros de luz no índice de brotação e d) efeito da concentração de sacarose sob o índice de multiplicação**



\* Média de três repetições. Valores seguidos de letras diferentes indicam diferencia significativa para o teste Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 40,33. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

Quanto a presença de raiz para touceiras de *G. chacoensis*, após 35 dias de cultivo *in vitro*, não apresentou diferenças significativas quando realizada a análise de variância (ANOVA) para os fatores estudados. Foram observados porcentagem de 85 a 100% de enraizamento para todos os tratamentos (Figura 11).

**Figura 11. Enraizamento médio aos 35 dias de cultivo *in vitro* de *G. chacoensis* sobre o efeito de quatro espectros de luz LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose no meio de cultura ((0 e 30 g. L<sup>-1</sup>).**

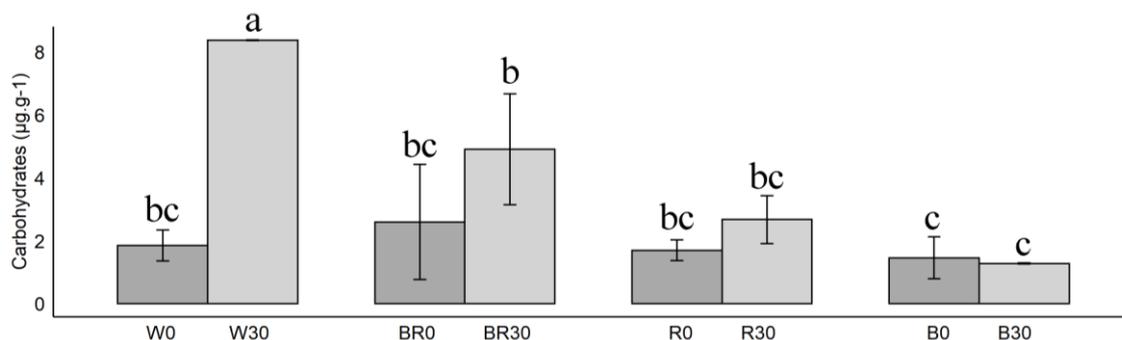


\* Médias de três repetições. CV (%) = 17,64. Barras correspondem ao erro padrão da média.

### 2.3.2.1 Carboidratos solúveis totais

O conteúdo médio de carboidratos solúveis totais para touceiras de *G. chacoensis* apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para a interação dos fatores, luz LED e concentrações de sacarose no meio de cultura. O maior conteúdo de carboidratos solúveis totais foi observado no tratamento espectro de luz LED branca e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (8,37 mg. g<sup>-1</sup>) (Figura 12). Os menores conteúdos médios de carboidratos foram encontrados nos tratamentos espectro de luz LED azul e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e espectro de luz LED e 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, porém, estes não diferiram dos tratamentos espectro de luz LED branca e com concentração de 0 g L<sup>-1</sup>, espectro de luz LED azul-vermelho e concentração de 0 g L<sup>-1</sup>, espectro de luz LED vermelha e concentração de 0 g L<sup>-1</sup> e espectro de luz LED vermelha com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 12). De igual forma, foi observado que os tratamentos com concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram maiores acúmulos que os tratamentos com 0 g L<sup>-1</sup>.

**Figura 12. Conteúdo médio de carboidratos solúveis totais (mg. g<sup>-1</sup>) em touceiras *in vitro* sob luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose no meio de cultura (0 e 30 g L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo.**



\* Média de três repetições. Valores seguidos de letras diferentes indicam diferencia significativa para o teste Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 55,32. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

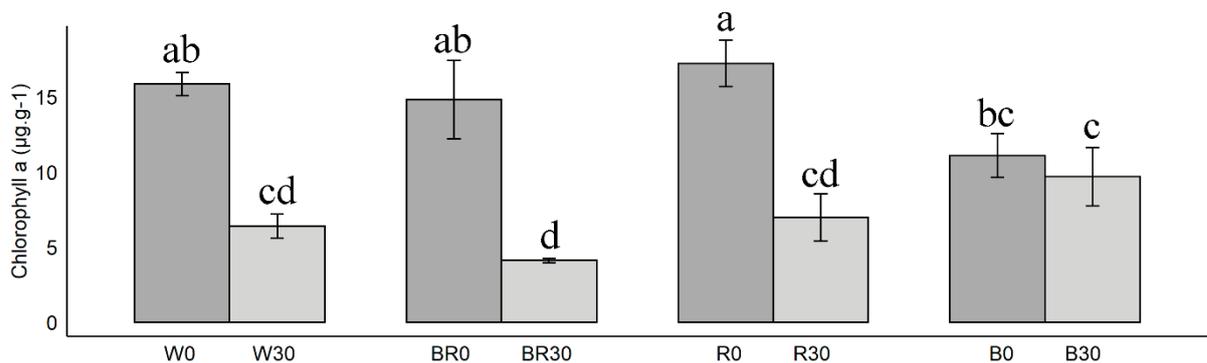
### 2.3.2.2 Pigmentos fotossintéticos

Relativo aos pigmentos fotossintéticos para as culturas de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* sob luzes LED e duas concentrações de sacarose no meio de cultura revelaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para a interação dos fatores nos conteúdos médios de clorofila *a* e clorofila *b*.

No conteúdo médio de clorofila *a*, foi observado que o tratamento com luz LED vermelho e 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose teve o maior acúmulo médio (17,22 mg. g<sup>-1</sup> MF), porém, não diferiu dos tratamentos com luz LED branco e de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose (15,84 mg. g<sup>-1</sup> MF) e com

luz LED azul-vermelho com e  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $14,81 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ). Por sua vez, os menores conteúdos médios foram observados nos tratamentos com luz LED azul-vermelho e concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  ( $4,13 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ), luz LED branco e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $6,39 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ) e luz LED vermelho e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $6,96 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figura 13).

**Figura 13. Teores médios de clorofila a ( $\text{mg. g}^{-1}$  massa fresca) de touceiras de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* com sistema de ventilação sob quatro luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose ( $0$  e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) após 35 dias de cultivo.**

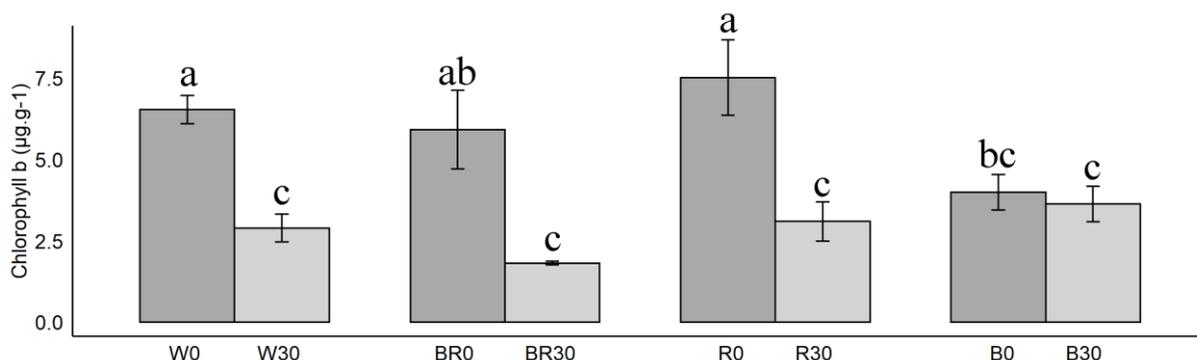


\*Médias de três repetições. Valores seguidos de letras diferentes indicam diferencia significativa para o teste Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 24,65. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

Com relação ao conteúdo de clorofila *b*, foi observado que o maior conteúdo esteve nos tratamentos com luz LED vermelho e concentração de  $0 \text{ g L}^{-1}$  ( $7,51 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ), espectro de luz LED branco e  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $6,53 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ) e espectro de luz LED azul-vermelho e  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $5,91 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ), sendo que este último não deferiu do tratamento espectro de luz LED azul e  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $3,98 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figura 14). Os tratamentos restantes apresentaram os menores conteúdos médios de clorofila *b*, verificou-se que todos estes tratamentos tratavam sobre os que tiveram concentração  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose no meio de cultura (Figura 14).

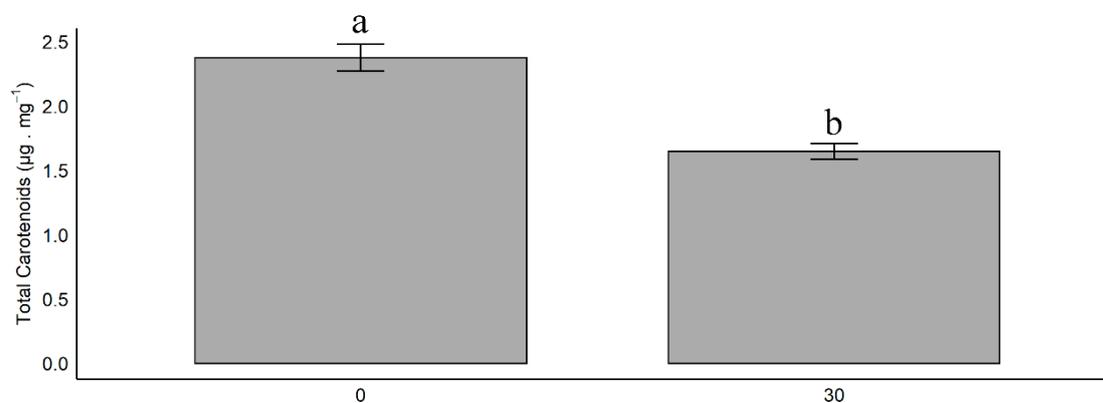
Com relação ao conteúdo médio de carotenoides totais, observou-se diferença significativa nos conteúdos médios em folhas provenientes dos tratamentos com diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo, o maior conteúdo médio de carotenoides totais foi observado nos tratamentos sem sacarose ( $2,37 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ), sendo diferente dos tratamentos com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose no meio de cultivo ( $1,65 \text{ mg. g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figura 15).

**Figura 14. Teores médios de clorofila b ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  massa fresca) de touceiras de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* com sistema de ventilação sob quatro luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose (0 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) após 35 dias de cultivo.**



\*Médias de três repetições. Valores seguidos de letras diferentes indicam diferencia significativa para o teste Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 28,17. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

**Figura 15. Teores médios de carotenoides totais ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  massa fresca) de touceiras de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* com sistema de ventilação sob quatro luzes LED (branca – W, azul – B, vermelho – R e azul-vermelha – BR) e duas concentrações de sacarose (0 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) após 35 dias de cultivo.**



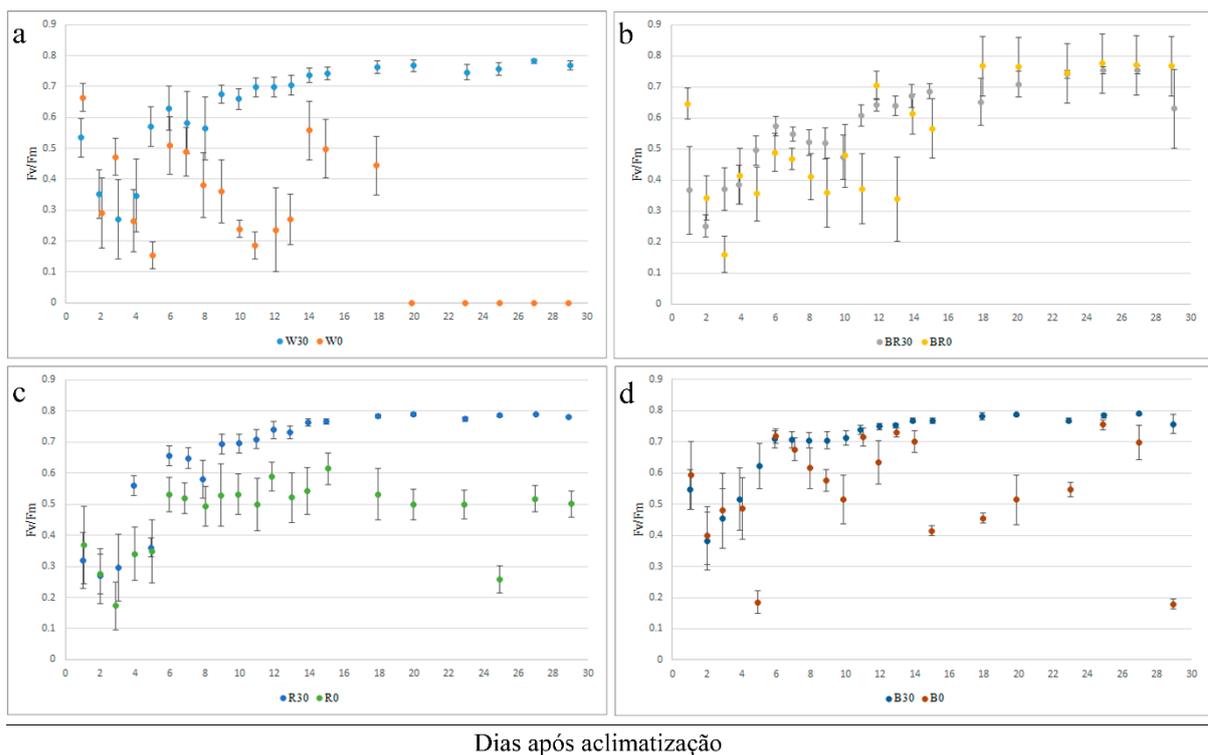
\*Médias de três repetições. Valores seguidos de letras diferentes indicam diferencia significativa para o teste Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 13,71. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

### 2.3.2.3 Determinação do rendimento quântico máximo do fotossistema II

No que se refere ao rendimento quântico máximo observou-se que as plantas cultivadas sob luz branca apresentaram diferenças entre os tratamentos sem sacarose e com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose de acordo às barras do erro padrão da média (Figura 16a). O tratamento espectro de luz LED branca com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose no dia 1 apresentava média de 0,53, enquanto que, o tratamento com  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose média de 0,66. Para o segundo dia *ex vitro*

as plantas de ambos os tratamentos apresentaram decréscimos 0,29 (0 g L<sup>-1</sup> de sacarose) e 0,35 (30 g L<sup>-1</sup> de sacarose). Foi observado que o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou o ponto mais baixo no terceiro dia da aclimatização (0,27). Contudo, a partir do quarto dia houve um acréscimo nos valores médios até chegar na estabilização a partir do dia 14. Por outro lado, o tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou acréscimos e decréscimos constantes nos valores médios, do segundo ao decimo oitavo dia, sendo o menor valor médio observado no quinto dia (0,15). A partir do dia 18, em virtude da abscisão das folhas, não foi possível continuar com as leituras (Figura 16a).

**Figura 16** Rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm) em folhas de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* sob quatro luzes LED e duas concentrações de sacarose no meio de cultura. (0 - 30 g L<sup>-1</sup>); a) tratamentos com LED branca, com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose (W0) e com 30 g L<sup>-1</sup> (W30); b) tratamentos com luz LED azul-vermelha, com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose (BR0) e com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (BR30); c) tratamentos com luz LED vermelha, com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose (R0) e com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (R30); d) tratamentos com luz LED azul, com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose (B0) e com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (B30). \* Barras correspondem ao erro padrão da média.



Quanto aos tratamentos com espectro de luz LED azul-vermelha se comportaram de forma diferenciada de acordo as concentrações de sacarose em cada dia avaliação (Figura 16b). No primeiro dia o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou média de 0,37 enquanto o tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou 0,65. Os menores valores médios foram

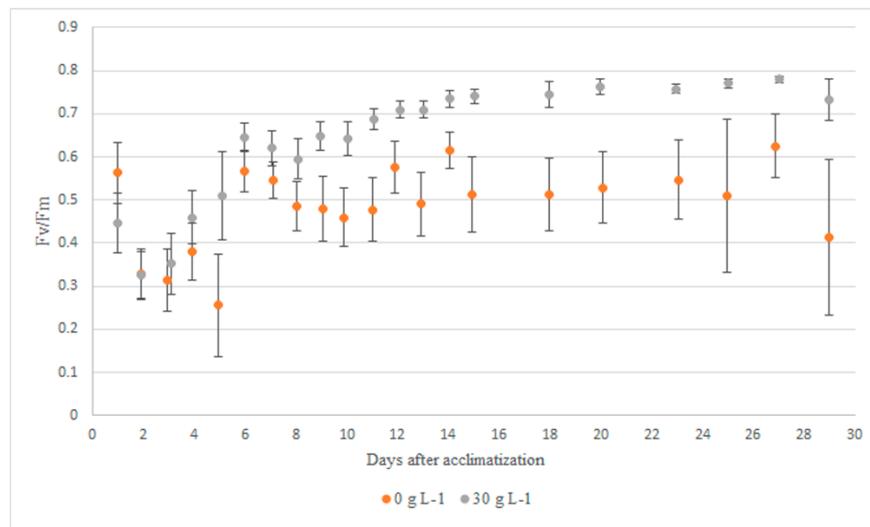
observados no dia dois para o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (0,25) e no dia três para o tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose (0,16). A estabilização fotossintética sucedeu a partir do dia 18 no tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose e a partir do dia 23 para o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 16b).

As plantas mantidas sob espectro de luz LED vermelha, nos tratamentos com 0 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, apresentaram valores semelhantes no primeiro e segundo dia da aclimatização (Figura 16c). No primeiro dia os valores médios apresentados foram 0,37 para o tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> e 0,32 para o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; e para o segundo dia 0,28 e 0,27 respectivamente, sendo este ao mesmo tempo o ponto mais baixo para o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou o menor valor médio no terceiro dia (0,17). A estabilização dos tratamentos ocorreu a partir do dia 12 para o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose com valor médio de 0,74 e por sua vez, o tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose mostrou uma estabilização com valores entorno a 0,50 – 0,60 (Figura 16c).

No que se refere aos tratamentos com espectro de luz LED azul apresentaram valores semelhantes no primeiro dia com valores médios de 0,59 para com 0 g L<sup>-1</sup> e 0,5 para o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, este comportamento foi observado para os primeiros quatro dias (Figura 16d). No entanto, os tratamentos apresentaram diferenças na estabilização, o tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou estabilização a partir do dia 11 com valor médio 0,74, por sua vez o tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose não apresentou valores de estabilidade até o final dos dias de avaliação (Figura 16d).

Finalmente, foram avaliados os efeitos médios das duas concentrações de sacarose no meio de cultura (0 e 30 g L<sup>-1</sup>) sobre rendimento quântico do fotossistema II (Figura 17). No momento da saída das plantas do *in vitro*, no primeiro dia, foi observado que as plantas cultivadas com concentração 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram maior média (0,56), por sua vez as plantas cultivadas com concentração 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose mostraram média de 0,44. No segundo e terceiro dia, os valores foram semelhantes para ambos os dois tratamentos, porém o tratamento com concentração 30 g L<sup>-1</sup> exibiu o aumento mais rápido e valores mais altos ao longo dos dias de avaliação. A estabilização dos tratamentos com concentração 30 g L<sup>-1</sup> apresentou estabilização a partir do dia 13 com média 0,73, no entanto o tratamento com concentração 0 g L<sup>-1</sup> apresentou a estabilização com valores 0,45 e 0,62 a partir do dia seis (Figura 17).

**Figura 17. Rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm) em folhas de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* sob luzes LED e duas concentrações de sacarose no meio de cultura 0 e 30 g L<sup>-1</sup>. \* Barras correspondem ao erro padrão da média.**



## 2.4 DISCUSSÃO

A luz é um fator abiótico que gera resposta no desenvolvimento das plantas, a partir da captação e o processo de sinalização. Estas respostas são dadas pelos fotorreceptores, nos quais são processados os fótons e geradas respostas com grande plasticidade em relação à quantidade, qualidade, direção e duração da luz que chega do ambiente onde se encontram (OUZOUNIS et al., 2015). As principais famílias de fotorreceptores são os fitocromos, criptocromos, fototropinas e UVR8, cada um encarregado pela captação de um comprimento de onda específico e as respostas fisiológicas correspondentes (MUNEER et al., 2014; OUZOUNIS et al., 2015).

A altura das touceiras, nas plantas de *G. chacoensis*, revelou um crescimento diferenciado sob o efeito das diferentes luzes LEDs aos 35 dias de cultivo *in vitro*. As plantas cultivadas sob luz vermelha apresentaram maiores alturas, independente de possuir sistema de ventilação ou não. Este fator demonstra que, provavelmente o efeito foi decorrente da luz diretamente. O mesmo efeito foi observado em plantas de soja, quando cultivadas em 100% de luz vermelha, apresentaram maior altura (alongamento do caule), sendo classificada como um crescimento anormal segundo FANG et al. (2021). Os mesmos autores ressaltam que este efeito de alongamento do caule não está mediado pelo fitocromo em plantas de soja, com base nos resultados da presença de luz vermelha/branca. Este efeito, também foi observado quando as brotações de *G. chacoensis* foram cultivadas com e sem suplementação de sacarose no meio de

cultura, bem como, as maiores alturas médias foram observadas com o uso de luz vermelha e luz branca revelaram. Dados que corroboram com os observados por Chen *et al.* (2014) com brotos de *Oryza sativa* L., onde a luz vermelha e a luz verde apresentaram maior alongamento das plantas.

Corroborando com o estudo anterior, foi observado, que plantas submetidas a meio de cultivo sem sacarose ( $0 \text{ g L}^{-1}$ ) mostraram a maiores alturas médias. Efeito semelhante, foi observado em plantas cultivadas *in vitro* de *Lomatozano artemisiifolia* Baker., com diferentes concentrações de sacarose e força iônica de macronutrientes da formulação MS. Segundo SILVA *et al.* (2021) as menores concentrações de macronutrientes e sacarose e cultivada sob luzes LED vermelho resultaram em plantas de maior altura média.

No presente estudo, *G. chacoensis* mostrou um crescimento dos caules diferenciado nos tratamentos com luz LED vermelha, efeito provável advindo da sinalização via fitocromo. Dentro dos fatores que afetam o desenvolvimento das plantas *in vitro* se encontram as substâncias orgânicas, os nutrientes minerais e os reguladores de crescimento (SILVA *et al.*, 2021). Os fitocromos ao captar a luz vermelha e vermelha distante alternam as suas formas de inativa (Pr) para a ativa (Pfr), efeito disso se provoca a sinalização da síntese de fitohormônios, dentre os quais encontra-se a giberelina GA1 e a auxina AIA (DEMOTES-MAINARD *et al.*, 2016). Dentro dos efeitos destes hormônios está o alongamento de entrenós (ALCANTARA-CORTES *et al.*, 2019), fazendo uma ligação entre a causa do crescimento dos entrenós com a ação da sinalização dos fitocromos, porém, são necessários estudos complementares para identificar os efeitos dos hormônios vegetais e identificar a conexão à base molecular da percepção da luz e o alongamento dos caules (DEMOTES-MAINARD *et al.*, 2016).

O número de brotações novas e o índice de multiplicação das touceiras, viu-se maiormente afetado com adição apenas do espectro vermelho, apresentando as menores médias destes parâmetros. De forma semelhante, quando estudados os efeitos das luzes LEDs e as concentrações de sacarose no meio de cultura, foi observado que o tratamento R0 foi o único que se diferenciou dos outros tratamentos no experimento 2. Resultados semelhantes foram observados em cultivo *in vitro* de *Pyrus communis* L., com o menor número médio de brotações sob luz LED vermelha (LOFTI *et al.*, 2019). Porém, para diversas espécies foi observado o aumento do número de brotações sob o efeito de luzes LED vermelha, como em *Myrtus communis* L. (Cioć *et al.* 2018) e *Stevia rebaudiana* (RAMÍREZ-MOSQUEDA *et al.*, 2017).

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas na presença de raízes para todos os fatores estudados (luzes LEDs, sistemas de ventilação e concentrações de sacarose

no meio de cultura). Aos 35 dias de cultivo *in vitro* as culturas de *G. chacoensis* apresentaram valores próximos ao 100%. Igualmente, o enraizamento espontâneo *in vitro* tem ocorrência observada para a mesma espécie (BELINCANTA et al., 2022; ORNELLAS et al., 2019). Caso contrário é observado em diferentes espécies, onde as diferentes luzes têm efeitos diferenciados, um exemplo disso é o observado para *Glycine max* onde uma proporção de 80:20% de luz azul e luz vermelha, respectivamente, induziu os melhores resultados enquanto a quantidade, volume e total de raiz (FANG et al. 2021), assim como, em *Protea cynaroides* L. em que luz LED vermelha teve a maior porcentagem de enraizamento (WU; LIN, 2012), ou *Ocimum basilicum* L. que apresentou efeito positivo da luz LED azul no enraizamento (LIM; EOM, 2013).

Alterações bioquímicas também têm sido atribuídas à influência da luz na cultura *in vitro* de diferentes plantas, dentre estas alterações encontra-se os conteúdos de sacarose, carboidratos solúveis e pigmentos fotossintéticos (GUPTA; JATOTHU 2013). Contudo, as plantas de *G. chacoensis* cultivadas *in vitro* sob luzes LED e sistemas de troca gasosa não apresentaram diferenças significativas.

Observou-se maior concentração dos teores de carboidratos solúveis nos tratamentos sem membranas de trocas gasosas de forma geral, assim como nos tratamentos com adição de sacarose no meio de cultivo. Também, foi observado um efeito diferenciado dos espectros de luz LED. Diferenças nos tratamentos com e sem adição de sacarose pode estar diretamente ligada a concentração de sacarose no meio de cultura, assim como apresentado por Yaseen et al. (2013) em que reportam que a sacarose utilizada como fonte de carbono na cultura *in vitro* é absorvida via floema e translocada para suprir o carbono ambiental no processo de autotrofia das plantas. De igual forma, os carboidratos são utilizados como constituintes estruturais dos tecidos da planta, assim como reservas que são acumulados para serem utilizados como fonte de energia em processos de crescimento, desenvolvimento e osmólitos em momentos de fortes estresses ambientais (GNASEKARAN et al., 2021). Porém, o comportamento de acúmulo médio de carboidratos observado neste estudo apresenta diferenças ao encontrado na literatura, normalmente um espectro específico ou a mistura de azul e vermelho provoca maior acúmulo de acordo a cada espécie. Exemplos disto foram os observados em *Glycine max* com maiores conteúdos de carboidratos sob luz vermelha (FANG et al., 2021), similar ao encontrado em *Brassica napus* L. (LI et al., 2013), por sua vez, maiores acúmulos sob luz azul/vermelha foram observados em *musa sp.*, (Bhaya; Al-RazzaqSalim, 2019), *Lippia filifolia* (CHAVES et al., 2020), *Solanum tuberosum* (JIANG et al., 2019), *Phoenix dactylifera* L. (AL-MAYAH, 2016).

No presente estudo foi visto que ocorreu maior teor de carboidratos nas plantas com suplementação de sacarose no meio de cultura, no entanto, os efeitos destes parâmetros correspondem às respostas de cada espécie, um exemplo disto, o estudo realizado por (ŠEVČÍKOVÁ et al., 2019) que mostrou que plantas de *Nicotiana tabacum* e *Solanum tuberosum* em sistema de cultivo mixotrófico apresentaram maior acúmulo de açúcares totais comparado com sistema autotrófico, no mesmo estudo, plantas de *Brassica napus* e *Fragaria vesca* apresentaram resultados opostos aos anteriores. Um comportamento semelhante ao encontrado neste estudo foi observado para *Prunus domestica* L. com maiores teores de carboidratos solúveis totais com a utilização de meio de cultura com suplementação de sacarose em sistemas fotomixotrófico e fotoautotrófico (GAGO et al., 2022).

Concernente aos teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas, na comparação dos sistemas de ventilação e as luzes LED não foram observadas diferenças significativas. Porém, quando foi utilizado o sistema de ventilação com membrana permeável a gases e as duas concentrações de sacarose no meio de cultura foram observadas diferenças nas concentrações de clorofila *a* e clorofila *b*, em plantas submetidas nos tratamentos com espectro de luz LED vermelho, luz LED branco e luz LED azul-vermelho sem adição de sacarose. De igual forma foi observada influência direta da concentração de sacarose no meio de cultura, sendo plantas submetidas a suplementação de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram menores conteúdos médio de pigmentos fotossintéticos. O baixo conteúdo de pigmentos fotossintéticos nos sistemas mixotróficos pode estar relacionado a ativação da hexoquinase. Granot *et al.* (2014) e Aguilera-Alvarado e Sanchez-Nieto (2017) explicam que conteúdos elevados de carboidratos continuamente nos tecidos podem desencadear a ativação da sinalização via hexoquinase que pode reduzir a expressão de genes fotossintéticos que ocasiona supressão da capacidade fotossintética das plantas. Consoante com o anterior, os resultados vistos no presente estudo podem ter correlação ao observar que as plantas cultivadas no sistema de cultivo mixotrófico (com suplementação de sacarose) tiveram baixo conteúdo de pigmentos fotossintéticos comparadas com o sistema autotrófico. Consequentemente, as taxas fotossintéticas baixas e a biossíntese deficiente de carboidratos são consequência da baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos e os efeitos negativos da adição de carboidratos no meio *in vitro* afetando o equilíbrio entre os processos de síntese e consumo de carboidratos (CHAVES et al., 2020; NGUYEN et al., 2020). Da mesma forma, diversos estudos relatam resultado semelhantes aos encontrados neste estudo, por exemplo *Bambusa vulgaris* Schrad (GARCÍA-REMÍREZ et al.,

2019), *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz (NÚÑEZ-RAMOS et al., 2021), *Eugenia dysenterica* (SILVEIRA et al., 2019).

Por outro lado, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos nas plantas pode servir como um marcador indireto da capacidade fotossintética da planta, ou dito de outra maneira, a prontidão da fotossintética da planta, mas estas respostas fisiológicas dependem da espécie como o mostrou o estudo realizado com *Solanum tuberosum*, *Fragaria vesca*, *Nicotiana tabacum* e *Brassica napus*, no qual, os as duas primeiras espécies tiveram maiores médias em sistema de cultivo com ventilação e sem sacarose, por outro lado *N. tabacum* não apresentou diferenças entre os sistemas de cultivo mixotrófico e autotrófico, e finalmente *B. napus* no sistema mixotrófico (ŠEVČÍKOVÁ et al., 2019).

Ao analisar o rendimento quântico máximo do fotossistema II em culturas de *G. chacoensis* foi observado que quando comparadas as culturas cultivadas com os dois tipos de vedação, os tratamentos com ausência de membrana porosa a gases apresentaram maiores médias de Fv/Fm no momento da retirada da condição *in vitro*, com exceção do tratamento com luz azul no qual os valores médios foram semelhantes para ambos os dois tipos de vedação das tampas. Os valores médios de Fv/Fm na retirada da condição *in vitro* para a condição *ex vitro* neste estudo, foram diferentes dos observados por Ornellas et al. (2019) para *G. chacoensis* com valor médio de  $0,536 \pm 0,015$  relatado pelos autores como um potencial relativamente baixo. Porém, valores de Fv/Fm semelhantes foram observados em este estudo em plantas cultivadas com duas concentrações de sacarose no meio de cultura no momento da saída do sistema *in vitro*. Da mesma forma, o observado no presente estudo é semelhante ao observado em um estudo realizado com híbridos de *Doritaenopsis* em sistema de cultivo *in vitro* com ventilação e presença de sacarose, foi observada maior estabilidade de Fv/Fm em todos os tratamentos (alta intensidade luminosa/baixa intensidade luminosa/injeção de CO<sub>2</sub>) (Shin et al. 2013).

No presente estudo foi observado que plantas cultivadas sob luz vermelha e modificação da concentração de sacarose no meio de cultivo apresentaram o menor valor médio de Fv/Fm ao momento da transferência do *in vitro* ao *ex vitro*. Resultado semelhantes, foram observados para soja, mostrando os menores resultados em presença de luz led vermelha 100% e 90/10% (V/A) (FANG et al. 2021). Consequente com o anterior, Miao et al. (2016) relata que luz vermelha reduz a atividade dos fotossistema, inibindo o transporte de elétrons do doador PSII para o PSI e o fluxo de elétrons de ciclos ativado, caso contrário dos observados na luz azul.

## 2.5 CONCLUSÕES

A partir do presente estudo foi possível observar que o espectro de luz LED vermelha promove maiores alturas das touceiras, porém, este tratamento reduz o número médio de brotações ou perfilhamento das touceiras. O cultivo de *G. chacoensis* apresenta vantagens na utilização de sistemas de cultivo *in vitro* heterotrófico e luzes LED nos espectros azul-vermelho e branco, observa-se que as plantas cultivadas sem sistema de trocas gasosas conseguiram valores estáveis de  $F_v/F_m$  mais rápido que as cultivadas com sistema de ventilação. Igualmente, com utilização de membranas de trocas gasosas, o cultivo *in vitro* em sistema fotomixotrófico de *G. chacoensis* apresenta melhores resultados sob espectros de luz LED branco, azul-vermelho e azul, porém, faz se necessário a suplementação com sacarose no meio de cultura, para melhor recuperação dos fotossistemas na fase *ex vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA-ALVARADO, G. P.; SÁNCHEZ-NIETO, S. Plant hexokinases are multifaceted proteins. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 7, p.1151-1160, 2017.
- BATISTA, D. S., DE CASTRO, K. M., DA SILVA, A. R., TEIXEIRA, M. L., SALES, T. A., SOARES, L. I., et al. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n. 3, p. 276-282, 2016.
- A.M.W. AL-MAYAHI. Effect of red and blue light emitting diodes “CRB-LED” on *in vitro* organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Alshakr, World J. **Microbiol. Biotechnol.** v. 32, p. 1–8, 2016.
- BATISTA, D. S.; FELIPE, S. H. S.; SILVA, T. D.; DE CASTRO, K. M.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; MIRANDA, N. A.; et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter?. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018.
- BHAYA, M. H. M.; AL-RAZZAQ SALIM, S. Impacts of plant growth regulators and light quality on banana (*Musa* spp.) micropropagation. **Plant Archives**, v. 19, n. 1, p. 1379-1385, 2019.
- BELINCANTA, C.; BOTELHO, G.; ORNELLAS, T. S.; ZAPPELINI, J.; GUERRA, M. P. Characterization of the endophytic bacteria from *in vitro* cultures of *Dendrocalamus asper* and *Bambusa oldhamii* and assessment of their potential effects in *in vitro* co-cultivated plants of *Guadua chacoensis* (Bambusoideae, Poaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 58, n. 1, p. 122-132, 2021.
- BRIGGS, W. R.; CHRISTIE, J. M. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. **Trends in plant science**, v. 7, n. 5, p. 204-210, 2002.
- CHAVES, M. C.; FREITAS, J. C. E.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; DE OLIVEIRA PRUDENTE, D.; COSTA, B. G. P.; GRAZUL, R. M. Influence of colorful light-emitting diodes on growth, biochemistry, and production of volatile organic compounds *in vitro* of *Lippia filifolia* (Verbenaceae). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 212, p. 112040, 2020.
- CELAYA, R. B.; LISCUM, E. Phototropins and Associated Signaling: Providing the Power of Movement in Higher Plants. **Photochemistry and photobiology**, v. 81, n. 1, p. 73-80, 2005.
- CHEN, C. C.; HUANG, M. Y.; LIN, K. H.; WONG, S. L.; HUANG, W. D.; YANG, C. M. Effects of light quality on the growth, development and metabolism of rice seedlings (*Oryza sativa* L.). **Research Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p.15-24, 2014.
- CIOĆ, M.; SZEWCZYK, A.; ŻUPNIK, M.; KALISZ, A.; PAWŁOWSKA, B. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, n. 3, p. 433-447, 2018.

- DONG, C.; FU, Y.; LIU, G.; LIU, H. Low light intensity effects on the growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity, yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) at different growth stages in BLSS. **Advances in Space Research**, v. 53, n. 11, p. 1557-1566, 2014.
- FAN, X. X.; XU, Z. G.; LIU, X. Y.; TANG, C. M.; WANG, L. W.; HAN, X. L. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. **Scientia horticulturae**, v. 153, p. 50-55, 2013.
- FANG, L.; MA, Z.; WANG, Q.; NIAN, H.; MA, Q.; HUANG, Q.; MU, Y. Plant growth and photosynthetic characteristics of soybean seedlings under different led lighting quality conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 2, p. 668-678, 2021.
- FERREIRA, L. T.; DE ARAÚJO SILVA, M. M.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 1, p. 211-221, 2017.
- GAGO, D.; SÁNCHEZ, C.; ALDREY, A.; CHRISTIE, C. B.; BERNAL, M. Á.; VIDAL, N. Micropropagation of Plum (*Prunus domestica* L.) in Bioreactors Using Photomixotrophic and Photoautotrophic Conditions. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 286, 2022.
- GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; BARRERA, G.P.; FREIRE-SEIJO, M. BARON, R.; CONCEPCIÓN-HERNÁNDEZ, M.; MENDOZA-RODRÍGUEZ, M. F.; TORRES-GARCÍA, S. Effect of sucrose on physiological and biochemical changes of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion. **Plant Cell Tiss Organ Cult** v. 137, n. 2, p. 239–247, 2019.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87-92, 1989.
- GHERGHINA, E.; LUTA, G.; DOBRIN, E.; DRAGHICI, E. M.; BALAN, D.; SANMARTIN, A. M. Biochemical changes under artificial led lighting in some *Lactuca sativa* L. varieties. **AgroLife Scientific Journal**, v. 9, p. 141-148, 2020.
- GNASEKARAN, P.; RAHMAN, Z. A.; CHEW, B. L.; APPALASAMY, S.; MARIAPPAN, V.; SUBRAMANIAM, S. Development of micropropagation system of *Zingiber officinale* var. rubrum Theilade using different spectrum light-emitting diode (LED) irradiation. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113748, 2021.
- GRANOT, D.; KELLY, G.; STEIN, O.; DAVID-SCHWARTZ, R. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 3, p. 809-819, 2014.
- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 211-220, 2013.
- HART, J. W. General introduction. In: Hart JW (ed) Light and plant growth, Topics in plant physiology: I, v, vol 1. **Springer Science & Business Media**, London, pp. 4–17, 2012.

HUNG, C. D.; HONG, C. H.; JUNG, H. B.; KIM, S. K.; VAN KET, N.; NAM, M. W.; CHOI, D. H.; LEE, H. I. Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 194-200, 2015.

JARILLO, J. A.; GABRYS, H.; CAPEL, J.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R.; CASHMORE, A. R. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. **Nature**, v. 410, n. 6831, p. 952-954, 2001.

JIANG, L.; WANG, Z.; JIN, G.; LU, D.; LI, X. Responses of Favorita potato plantlets cultured *in vitro* under fluorescent and light-emitting diode (LED) light sources. **American Journal Potato Research**. v. 96, n. 4, p. 396–402, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12230-019-09725-8>.

KENDRICK, R. E.; KRONENBERG, G. H. (Eds.). Photomorphogenesis in plants. **Springer Science & Business Media**. 2012.

KIM, H. H.; GOINS, G. D.; WHEELER, R. M.; SAGER, J. C. Green-Light Supplementation for Enhanced Lettuce Growth under Red- and Blue-Light-Emitting Diodes. **Chemical and Engineering News**, v. 39, n. 7, p. 1617–1622, 2004.

KOZAI, T. Why LED lighting for urban agriculture? In: KOZAI T.; FUJIWARA K.; RUNKLE, E. (eds). LED lighting for urban agriculture. **Springer, Singapore**, pp 3–18, 2016.

LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; DUARTE, A. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas: revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017.

LEMBRECHTS, R.; CEUSTERS, N.; MAURICE, P.; CEUSTERS, J. Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 226-231, 2017.

LI, H.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 117-124, 2013.

LIAN, M. L.; MURTHY, H.N.; PAEK, K. Y. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid ‘Pesaro’. **Scientia Horticulturae**, v. 94, n. 3-4, p. 365–370, 2002.

LIM, Y. J.; EOM, S. H. Effects of different light types on root formation of *Ocimum basilicum* L. cuttings. **Scientia horticulturae**, v. 164, p. 552-555, 2013.

LIZARAZU, M.; VEGA, A.S. **Guadua**. In: ZULOAGA, F.O.; RÚGOLO DE AGRASAR, Z.E.; ANTON, A.M. (Eds.), Flora Argentina. Monocotyledoneae: Poaceae: Aristidoideae Pharoideae 3. Plantas Vasculares de la República Argentina, pp. 59–63 ISBN 978-987-1601-20-2, 2012.

LIZARAZU, M.A.; Rguadua RÚGOLO DE AGRASAR, Z.E.; VEGA, A.S. A new species of *Guadua* (Poaceae, Bambusoideae, Bambuseae) and synopsis of the genus in Argentina and neighboring regions. **Systematic Botany**. v. 38, p. 1062–1075, 2013. <https://doi.org/10.1600/036364413x674779>

- MARTINS, J. P. R.; RODRIGUES, L. C. D. A.; CONDE, L. T.; GONTIJO, A. B. P. L.; FALQUETO, A. R. Anatomical and physiological changes of *in vitro*-propagated *Vriesea imperialis* (Bromeliaceae) in the function of sucrose and ventilated containers. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 154, n. 1, p. 87-99, 2020.
- MIAO, Y. X.; WANG, X. Z.; GAO, L. H.; CHEN, Q. Y.; Mei, Q. U. Blue light is more essential than red light for maintaining the activities of photosystem II and I and photosynthetic electron transport capacity in cucumber leaves. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 1, p. 87-100, 2016.
- MOREL, G.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, p. 138-140, 1951.
- MUNEER, S.; KIM, E. J.; PARK, J. S.; LEE, J. H. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4657-4670, 2014.
- 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.
- NGUYEN, Q. T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **Plant factory**, p. 333-346, 2020.
- NÚÑEZ-RAMOS, J. E.; QUIALA, E.; POSADA, L.; MESTANZA, S.; SARMIENTO, L.; DANIELS, D.; et al. Morphological and physiological responses of tara (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz) microshoots to ventilation and sucrose treatments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, n. 1, p. 1-14, 2021.
- ORNELLAS, T. S.; MARCHETTI, C. K.; OLIVEIRA, G. H. D.; FRITSCHKE, Y.; GUERRA, M. P. Micropropagation of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.
- OUZOUNIS, T.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C. O. Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: a review. **HortScience**, v. 50, n. 8, p. 1128-1135, 2015.
- PARIHAR, P.; SINGH, R.; SINGH, S.; TRIPATHI, D. K.; CHAUHAN, D. K.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Photoreceptors mapping from past history till date. **Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 223-231, 2016.
- ROCHA, P. S. G.; DE OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Uso de LEDs na multiplicação e enraizamento *in vitro* de framboesiras. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**. 2013.
- RODRIGUES, S. P.; DE TOLEDO PICOLI, E. A.; DE OLIVEIRA, D. C.; DA SILVA CARNEIRO, R. G.; DOS SANTOS ISAIAS, R. M. The effects of *in vitro* culture on the leaf anatomy of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1933-1941, 2014.

- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; DE AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; DO RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.
- SAMUOLIENĖ, G.; BRAZAITYTĖ, A.; JANKAUSKIENĖ, J.; VIRŠILĖ, A.; SIRTAUTAS, R.; NOVIČKOVAS, A.; et al. LED irradiance level affects growth and nutritional quality of *Brassica microgreens*. **Central European Journal of Biology**, v. 8, n. 12, p. 1241-1249, 2013.
- ŠEVČÍKOVÁ, H.; LHOTÁKOVÁ, Z.; HAMET, J.; LIPA VSKÁ, H. *Mixotrophic in vitro* cultivations: the way to go astray in plant physiology. **Physiologia plantarum**, v. 167, n. 3, p. 365-377, 2019.
- SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of *in vitro* plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 4, p. 445-454, 2013.
- SHIRASUNA, R.T.; AFONSO, E.A.L.; CLARK, L.G.; VIANA, P.L.; FILGUEIRAS, T.S. (in memoriam) *Guadua* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB13250>>. Acesso em: 10 jul. 2022
- SINGH, D.; BASU, C.; MEINHARDT-WOLLWEBER, M.; ROTH, B. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 139-147, 2015.
- SILVA, M. M.; DE OLIVEIRA, A. L.; OLIVEIRA-FILHO, R. A.; GOUVEIA-NETO, A. S.; CAMARA, T. J.; WILLADINO, L. G. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets *in vitro*. In **Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII**, v. 8947, p. 89471X. International Society for Optics and Photonics. 2014.
- SILVA, M. M.; DE OLIVEIRA, A. L. B.; OLIVEIRA-FILHO, R. A.; CAMARA, T.; WILLADINO, L.; GOUVEIA-NETO, A. The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 157-161, 2016.
- SILVA, L. D.; MOREIRA, M. P.; SILVEIRA, A. C.; SIBOV, S. T. Influence of macronutrients, sucrose and LED on *in vitro* culture of *Lomatozona artemisiifolia* (Asteraceae-Eupatorieae). **Rodriguésia**, v. 72, 2021.
- SILVEIRA, A. C.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, E. C.; SALES, N. D. S.; SILVA, L. C. D.; SIBOV, S. T. Shoot proliferation, leaf anatomy and pigment content of *Eugenia dysenterica* growing in conventional and natural ventilation systems 1. **Revista Ceres**, v. 66, p. 363-371, 2019.
- SOLYMOSSI, D.; MUTH-PAWLAK, D.; NIKKANEN, L.; FITZPATRICK, D.; VASUDEVAN, R.; HOWE, C.; LEA-SMITH, D. J.; ALLAHVERDIYEVA, Y. Cytochrome C<sub>M</sub> downscales photosynthesis under photo-mixotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **BioRxiv**, p. 853416, 2019.

SONG, X.; DIAO, J.; YAO, J.; CUI, J.; SUN, T.; CHEN, L.; ZHANG, W. Engineering a Central Carbon Metabolism Pathway to Increase the Intracellular Acetyl-CoA Pool in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Grown under Photomixotrophic Conditions. **ACS Synthetic Biology**, v. 10, n. 4, p. 836-846, 2021.

STEELE, R. V. The story of a new light source. **Nature photonics**, v. 1, n. 1, p. 25-26, 2007.

VIERSTRA, R. D.; ZHANG, J. Phytochrome signaling: solving the Gordian knot with microbial relatives. **Trends in plant science**, v. 16, n. 8, p. 417-426, 2011.

VIEIRA, L. D. N.; FREITAS, H. P.; DOS ANJOS, K.G.; PUTTKAMMER, C. C.; SCHERER, R. F.; DA SILVA, D.A.; GUERRA, M. P. Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' *in vitro* plantlets. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, n. 2, p. 91-98, 2015.

WANG, J.; LU, W.; TONG, Y.; YANG, Q. Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 250, 2016.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

WILKEN, D.; GONZALEZ, E. J.; GERTH, A.; GÓMEZ-KOSKY, R.; SCHUMANN, A.; CLAUS, D. Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv.'Grande naine'AAA). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 5, p. 582-589, 2014.

WU, H. C.; LIN, C. C. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro*. **HortScience**, v. 47, n. 10, p. 1490-1494, 2012.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, 2009.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I. A. Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.

### 3 CAPÍTULO 2 – CULTIVOS *in vitro* DE *Dendrocalamus asper* (SCHULT. & SCHULT. F.) BACKER EX K. HEYNE COM DIFERETNES FONTES DE NITROGÊNIO

#### RESUMO

*Dendrocalamus asper* é umas das espécies de bambus mais cultivadas no mundo, com ampla distribuição e adaptação pelo Brasil. Nos protocolos de propagação *in vitro* estabelecidos para esta espécie, geralmente, são utilizados meios de cultura com base na formulação salina MS. No entanto, esta formulação apresenta uma concentração de nitrogênio e pode ser excessiva para o cultivo de diversas espécies vegetais. A partir disto, objetivou-se avaliar os efeitos morfológicos e bioquímicos das culturas de *D. asper*, em relação as diferentes concentrações e fontes de nitrogênio mineral. Touceiras estabelecidas *in vitro* foram cultivadas em meio de cultura com diferentes fontes de nitrogênio: amônio, amônio-nitrato e nitrato em quatro diferentes concentrações: 30, 60, 90, 120 mM e um tratamento testemunha com 0 mM de N. Após sete semanas em cultivo foram analisadas as médias das variáveis: altura das touceiras (cm), número de novas brotações, índice de multiplicação, conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg g<sup>-1</sup> MF) e nitrogênio total (mg g<sup>-1</sup> MS) no tecido vegetal. Foram observadas as maiores alturas das touceiras nos tratamentos testemunha (5,56 cm), nitrato (5,07 cm) e amônio (4,75 cm) como fontes isoladas, e as maiores alturas para as concentrações 0, 30 e 60 mM de nitrogênio no meio de cultura. O número de brotações novas, foi maior com a utilização de nitrato (1,69 brotos/touceira) e testemunha (2,0 brotos/touceira). O maior índice de brotação foi observado no tratamento testemunha (0,67 brotos) e no tratamento nitrato (0,53 brotos). Para o conteúdo de clorofila *a* o tratamento testemunha (21,32 mg g<sup>-1</sup> MF) e as concentrações 0 mM 30 mM (20,79 mg g<sup>-1</sup> MF) e 60 mM (15,95 mg g<sup>-1</sup> MF) de tiveram os maiores conteúdos médios, para a clorofila *b* o tratamento amônio-nitrato com 30 mM de concentração teve o maior conteúdo (14,42 mg g<sup>-1</sup> MF). A análise de nitrogênio total no tecido vegetal revelou maior conteúdo médio de N no tratamento amônio-nitrato (26,83 mg g<sup>-1</sup> MF), seguido do tratamento amônio (19,89 mg g<sup>-1</sup> MF) independente da concentração. Conclui-se que as concentrações de 30 e 60 mM de nitrogênio total no meio de cultura foram adequadas para o cultivo *in vitro* de *D. asper*, além disto, as diferentes fontes de N revelaram respostas diferenciadas, quanto à altura, brotação, índice de multiplicação e conteúdo de pigmentos fotossintéticos.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A subfamília *Bambusoideae* (família Poaceae) possui grande diversidade, com 125 gêneros e aproximadamente 1680 espécies descritas, distribuídas em três tribos: *Olyreae*, *Bambuseae* e *Arundinarieae* (CLARK et al., 2015; SORENG et al., 2017; CLARK; OLIVEIRA, 2018) e com distribuição na maioria dos continentes, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (SING et al., 2013) chegando a cobrir 40% da superfície do planeta terra junto com as pastagens (HODKINSON, 2018). A ampla distribuição e o grande número de usos reportados (SINGH et al., 2012; LIESE et al., 2015; AKINLABI et al., 2017) tem gerado um grande interesse no mundo econômico e ambiental (PAUDYAL et al., 2019; RESTU et al., 2020).

*Dendrocalamus asper*, pertencente a subfamília *Bambuseae*, apresenta grandes qualidades como colmos lenhosos de até 30 metros de altura, entrenós de 20-45 cm, paredes grossas de 11-22 mm e diâmetro do colmo de 8-20 cm (BENTON, 2015), hábito de crescimento entouceirante não invasivo, multifuncionalidade (fonte de alimento e recursos substituto da madeira) e atributos ornamentais (cores e hábito de crescimento) (ORNELLAS et al., 2022). Estas características, além do rápido crescimento, conferem ao *D. asper* alto valor econômico e ser uma das espécies de bambu mais cultivadas no mundo (MUSTAFA et al., 2021).

Para *D. asper* são reportados métodos de propagação a partir de cortes de rizoma e colmo e brotações de matriz como métodos assexuados (SING et al., 2013) e a partir de sementes, porém, a espécie possui ciclos de florescimento de 100-120 anos (ARYA et al., 1999), podendo apresentar florescimentos esporádicos e gregários (BANIK, 2016) o que dificulta este método de propagação. Com o fim de obter métodos de propagação em larga escala, métodos cultura de tecidos e micropropagação vem sendo desenvolvidos atualmente para *D. asper* a partir de brotos nodais (ARYA, 2020), de inflorescências imaturas (ARYA; ARYA, 2008), segmentos de rizoma (NIRMALA, 2011), segmentos nodais (BANERJEE et al., 2011; SINGH et al., 2012), embriões somáticos (ORNELLAS et al., 2022), assim como a otimização do meio de cultura e fitoreguladores (RESTU et al., 2020).

Os nutrientes minerais são importantes componentes do meio da cultura para sistemas de cultivo *in vitro*. Assim, o nitrogênio é o principal dentre os 14 elementos minerais essenciais para o crescimento e desenvolvimento de plantas (KOVALCHUK et al. 2018). Desta forma, o meio de cultivo mais utilizado para os sistemas *in vitro* de bambus e a formulação salina de Murashige e Skoog (1962) (SANDHU et al. 2018). Neste meio, o conjunto de N está constituído por  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na razão de 20:40 mM respectivamente (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Fontes

de nitrogênio como o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são dois dos compostos principais da grande variedade de fontes de N para o meio de cultura, tradicionalmente usados (WADA et al. 2015). Vários efeitos do nitrogênio são relatados sobre diversas culturas, como diferenciação celular, formação de calos, multiplicação, organogênese e embriogênese (NIEDZ; EVENS, 2008). No entanto, não existem estudos sobre os usos destas fontes, as concentrações e os efeitos fisiológicos para a espécie objeto do presente estudo.

O nitrogênio metabolizado apresenta-se como constituinte dos ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, amidas, nucleotídeos, clorofila, e hormônios de crescimento, dentre outros constituintes da célula vegetal e sua deficiência está associada à inibição do crescimento da planta, clorose e amarelamento das folhas e translocação a tecido mais jovens (LEGHARI et al., 2016).

De acordo com Leljak-Levanić et al. (2004) é necessária a otimização da quantidade de nitrogênio no meio de cultura para cada espécie e as condições de crescimento. Em virtude disto, diversos trabalhos relatam o efeito da quantidade e fonte de nitrogênio no crescimento e desenvolvimento de plantas. Exemplo disto, são estudos desenvolvidos com *Zea mays* variedade brs 1030 cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada (GONDIM et al 2016), para *Saccharum officinarum* L. com avaliação de diferentes fontes de N e concentrações no meio de cultura (DE ALCANTARA et al., 2019; SURESH et al. 2019), *Helleborus niger* L em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio no meio de cultura (GABRYSZEWSKA, 2015). Adicionalmente o balanço do nitrato: amônio constantemente são fontes de estudo e sua importância sente enfatizada. Como exemplo os trabalhos realizados por Majerowicz et al. (2002) com cinco variedades de *Zea mays*, Ávila et al. (2010) com *Oryza sativa* L., Wada et al. (2015) com *Pyrus communis*, entre outros.

Desta forma, este estudo objetivou avaliar os efeitos morfológicos e bioquímicos, assim como aperfeiçoar o meio de cultura cultivado *in vitro* de *Dendrocalamus asper*, utilizando diferentes concentrações e duas fontes de nitrogênio, Nitrato e Amônio, e ainda o balanço delas.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Plantas previamente estabelecidas *in vitro* de *Dendrocalamus asper* provenientes da coleção de bambus do laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDVG) do departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

foram a fonte de explantes para a condução deste estudo. Todos os experimentos e análises foram desenvolvidas no Núcleo em Pesquisa em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal (NPBV/UFSC) da mesma universidade.

Touceiras de 3-5 colmos de *D. asper* foram subcultivadas seis vezes com intervalos entre subcultivos em períodos de 30 dias. O meio de cultura básico (MSB), utilizado foi a formulação salina MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 15 µm de 6-benzilamopurina (BAP) e adicionado de vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup> como agente gelificante. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 antes da esterilização em autoclave por 20 min a 121 °C e 1,3 atm. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento a 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas luz, com lâmpadas fluorescentes Philips modelo TL 40w/ 75 RS T12 Luz do Dia e intensidade luminosa de 55± 5 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 Efeito do balanço de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no meio de cultura.

Para avaliar as fontes de nitrogênio e a concentração no meio de cultura foi utilizado o meio de cultura MSB, anteriormente descrito, com modificação da concentração e fontes de nitrogênio.

O experimento foi conduzido em delineamento totalmente casualizado, em esquema fatorial (4x3), mas uma testemunha; com 13 tratamentos: 1) quatro concentrações crescentes de nitrogênio total no meio de cultivo (30, 60, 90 e 120 mM), combinadas com três fontes de nitrogênio (amônio - NH<sub>4</sub>Cl, nitrato - KNO<sub>3</sub> e amônio/nitrato -NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), mais um tratamento com concentração 0 mM de nitrogênio como testemunha (Tabela 3). Cada unidade experimental foi constituída de três frascos de 400 mL e cada frasco contendo uma touceira de três colmos, com 4 repetições, distribuídas em forma inteiramente casualizadas.

**Tabela 2. Tratamentos utilizados: formulações salinas de acordo com as modificações realizadas em concentrações e fonte de nitrogênio em meio de cultivo.**

	Compostos	Concentração original MS g L <sup>-1</sup> (mM)	Concentração de Nitrogênio g L <sup>-1</sup>			
			30 mM	60 mM	90 mM	120 mM
Tratamento 1	NH <sub>4</sub> Cl	0	1,6047	3,2095	4,8142	6,4189
Tratamento 2	KNO <sub>3</sub>	1,9 (18,8)	3,0331	6,0661	9,0992	12,1322
Tratamento 3	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65 (20,6)	1,6008	3,2017	4,8025	6,4034
	KNO <sub>3</sub>	1,9 (18,8)	1,0110	2,0220	3,0331	4,0441
Testemunha	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		-	-	-	-

No meio MSB foram modificadas as fontes assim, o primeiro tratamento constou da utilização de  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio no meio de cultura, para isto o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e o  $\text{KNO}_3$  foram retiradas e adicionado  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , o segundo tratamento tratou da utilização de  $\text{NO}_3^-$  como fonte de nitrogênio no meio de cultura, realizando a exclusão de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  deixando o  $\text{KNO}_3$  como única fonte; e como terceiro tratamento foram utilizadas as fontes originais da formulação MSB ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ ), porém com as concentrações anteriormente descritas e sempre na proporção  $1\text{NH}_4^+:2\text{NO}_3^-$ . A modificação das fontes foi realizada segundo o proposto por Ivanova e Van Staden (2009). Em cada frasco foram adicionados 30 mL do meio de cultura gelificado com  $2 \text{ g L}^{-1}$  Phytigel<sup>TM</sup>. Após a inoculação, o material vegetal foi disposto em prateleiras com lâmpadas fluorescentes Philips modelo TL 40w/ 75 RS T12 Luz do Dia e intensidade luminosa (fluxo de fótons) de  $55 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , com fotoperíodo 16/8 horas de luz e escuridão respectivamente, em sala de crescimento a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

É importante esclarecer que os íons de potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) nas soluções salinas modificadas, variaram de forma semelhante à molaridade utilizada de cada fonte de nitrogênio, o  $\text{K}^+$  para o nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) e o  $\text{Cl}^-$  com o cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), de acordo as concentrações relatadas na tabela 3 e de acordo ao proposto por Ivanova e Van Staden (2009).

### 3.2.3 Variáveis analisadas

Dados de: altura das touceiras (cm), número de brotações novas, índice de multiplicação, conteúdo de clorofila *a* ( $\text{mg g}^{-1}$  massa fresca (MF)), conteúdo de clorofila *b* ( $\text{mg g}^{-1}$  MF), conteúdo de carotenoides totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MF), conteúdo total de nitrogênio da amostra vegetal ( $\text{mg g}^{-1}$  MF) foram coletados às sete semanas de cultivo *in vitro*.

### 3.2.4 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A quantificação de pigmentos fotossintéticos: clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais, foi realizada segundo o protocolo de Wellbum (1994). Amostras representativas de folhas (30 mg), foram colocadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas em banho maria por 4h. Os extratos obtidos foram pipetados em triplicatas técnicas em placas de Elisa com 300  $\mu\text{L}$  de volume cada. Seguidamente, foi determinada a absorvância em leitor de placas de Elisa nos comprimentos de onda 665 nm, 649 nm e 480 nm. As absorvâncias obtidas foram utilizadas para quantificação dos pigmentos ( $\text{mg g}^{-1}$  MF) com a utilização das fórmulas:

$$\text{Ca} = 12,19\text{A}_{665} - 3,45\text{A}_{645}$$

84

$$C_b = 21,99A_{649} - 5,32A_{665}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{480} - 2,14 C_a - 70,16 C_b) / 220$$

Em que  $C_a$  = concentração de clorofila *a*,  $C_b$  = concentração de clorofila *b* e  $C_{x+c}$  = concentração de carotenoides totais.

### 3.2.5 Determinação do nitrogênio na amostra vegetal

Amostras representativas (48 mg) de touceiras secas (desidratadas em estufa a 65 °C até alcançar peso constante) foram utilizadas para a quantificação do nitrogênio total de acordo a Tedesco et al. (1995). As amostras foram trituradas e colocadas em tubos de digestão no qual foi adicionado 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adicionado 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,7 g da mistura de digestão segundo Tedesco et al. (1995). Na continuação do protocolo, foram colocados no bloco digestor a 180 °C até evaporação da água e posteriormente a temperatura aumentada a 350 °C por uma hora e finalmente o volume completado a 50 mL com água destilada.

Finalmente, para a determinação do nitrogênio, foram pipetados 10 mL do extrato, adicionado 5 mL de NaOH 10M, destilado e coletado 40 mL da solução. As amostras foram tituladas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025M e utilizado ácido bórico como indicador.

### 3.2.6 Análises estatística

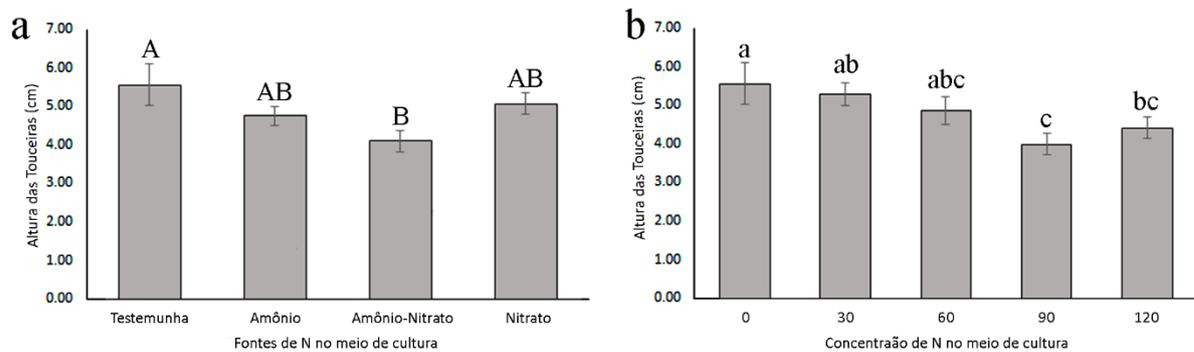
Os dados provenientes das coletas feitas às sete semanas de cultivo *in vitro*, foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando as medias cumpriram os paramentos de homogeneidade e normalidade, foi realizada separação de médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Todos os dados foram analisados por meio do programa estatístico R (R Development Core Team, 2010).

## 3.3 RESULTADOS

As diferentes fontes e concentrações de nitrogênio como fatores independentes, revelaram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ), para a altura média das touceiras (Figura 18). A maior altura média de touceiras provenientes de fontes de nitrogênio no meio de cultura foi observada no tratamento testemunha (5,56 cm), porém este não foi diferente estatisticamente do tratamento nitrato (5,07 cm) e amônio (4,75 cm) (Figura 18a). Referente ao efeito das concentrações, a maior e significativa ( $p < 0,05$ ) altura média foi observada no tratamento com 0 mM (5,56 cm), seguido do tratamento com 30 mM (5,29 cm) e 60 mM (4,87 cm), contudo, a menor alturas média foram obtidas na concentração de 90 mM (3,99 cm)

(Figura 18b). Para a interação das fontes e concentrações, não foram encontradas diferenças significativas.

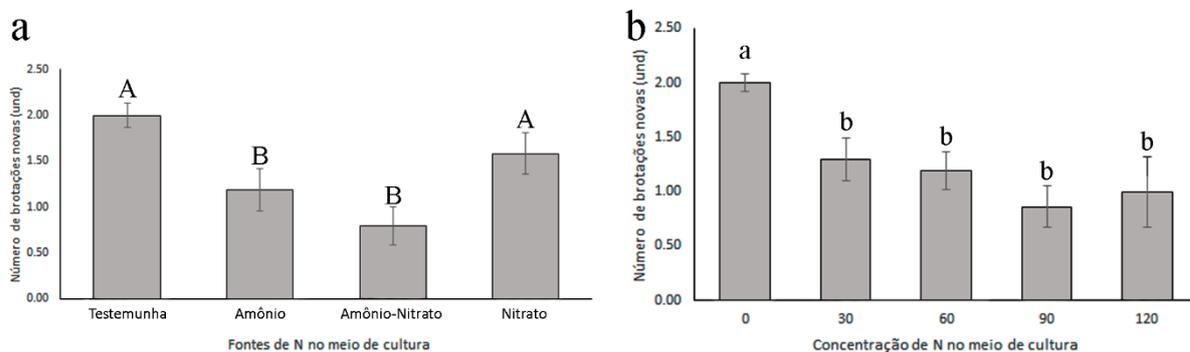
**Figura 18. Altura média de touceiras (cm) de *Dendrocalamus asper*, cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS. a) efeito das diferentes fontes de nitrogênio (testemunha, amônio, amônio-nitrato e nitrato); b) efeito das diferentes concentrações de nitrogênio (0 mM, 30 mM, 60mM, 90 mM, 120 mM), após sete semanas de cultivo.**



\* Média de 4 repetições. Valores seguidos de Letras diferentes indicam diferença significativa para o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (maiúsculas para fontes de nitrogênio, minúsculas para concentrações de nitrogênio). CV (%) = 37,85. Barras correspondentes ao erro padrão da média

O número médio de brotações novas após sete semanas de cultivo *in vitro* mostram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na ANOVA, quando avaliadas as diferentes fontes e concentrações de nitrogênio como fatores independentes. Em relação ao efeito das fontes de N, foram observados os maiores valores médios ( $p < 0,05$ ) do número de novos brotos nos tratamentos testemunha (2,0 brotos/touceira) e nitrato (1,69 brotos/touceira) (Figura 19a). Por sua vez, para o efeito das concentrações de N, o maior e significativo ( $p < 0,05$ ) número médio de brotações novas esteve no tratamento testemunha (2,0 brotos/touceira), sendo diferentes estatisticamente das demais concentrações (Figura 19b). A interação dos fatores avaliados não apresentou diferenças significativas.

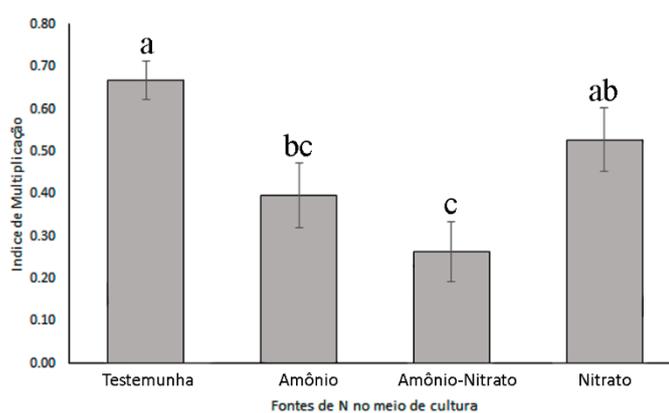
**Figura 19.** Número médio de novas brotações de *Dendrocalamus asper*, cultivadas em meio de cultura MS modificado. a) efeito das diferentes fontes de nitrogênio (testemunha, amônio, amônio-nitrato e nitrato); b) efeito das diferentes concentrações de nitrogênio (0 mM, 30 mM, 60mM, 90 mM, 120 mM), após sete semanas de cultivo *in vitro*.



\* Média de quatro repetições. Valores seguidos de Letras indicam diferença significativa para o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (maiúsculas para fontes de nitrogênio, minúsculas para concentrações de nitrogênio). CV (%) = 47,05. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

O índice de multiplicação revelou diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para o fator fonte de nitrogênio no meio de cultura (Figura 20). Observou-se que com a utilização dos tratamentos testemunha (0,67 brotos) e nitrato (0,53 brotos), obtive-se os maiores valores médios ( $p < 0,05$ ) índices de multiplicação. Por sua vez, o menor índice de multiplicação (0,20 brotos) foi observado no tratamento amônio-nitrato (Figura 20).

**Figura 20.** Índice de multiplicação em *Dendrocalamus asper* após sete semanas de cultivo *in vitro* de sob diferentes fontes (testemunha, amônio, amônio-nitrato e nitrato).

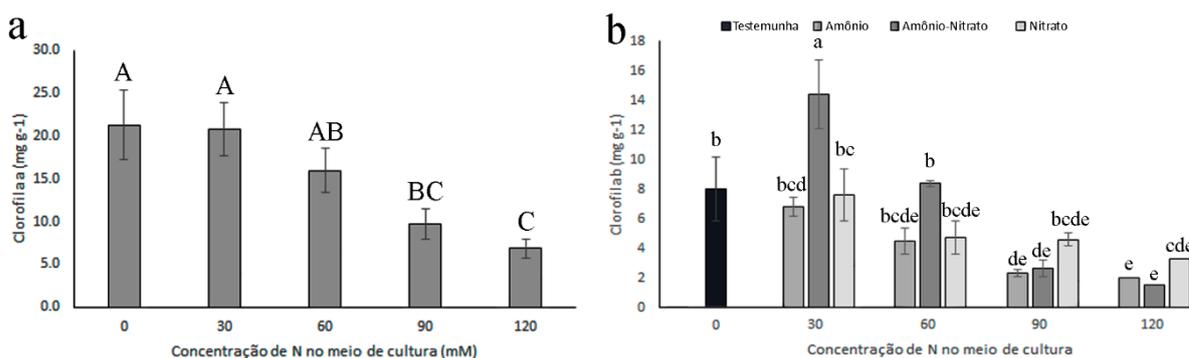


\*Médias de quatro repetições. Valores seguidos de letras indicam diferença significativa para o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 61,37. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

### 3.3.1 Pigmentos fotossintéticos

Com relação ao conteúdo médio de clorofila *a* para as culturas de *D. asper* cultivadas sob diferentes fontes e concentrações de N, em meio de cultura, foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para o fator concentração (Figura 21a). Assim os maiores conteúdos médios foram observados para as concentrações 0 mM (21,32 mg g<sup>-1</sup> MF), 30 mM (20,79 mg g<sup>-1</sup> MF) e 60 mM (15,95 mg g<sup>-1</sup> MF) sem diferir entre eles (Figura 21a). De modo contrário, os menores conteúdos médios foram observados nas maiores concentrações 90 mM (9,76 mg g<sup>-1</sup> MF) e 120 mM (6,83 mg g<sup>-1</sup> MF). Para as fontes de nitrogênio e a interação dos fatores foram não significativos para a ANOVA.

**Figura 21. Teores médios de pigmentos fotossintéticos de *Dendrocalamus asper* de a) conteúdo de clorofila *a* sob diferentes concentrações de nitrogênio (0 mM, 30 mM, 60mM, 90 mM, 120 mM) e; b) conteúdo de clorofila *b* sob o efeito da interação das fontes de nitrogênio e as concentrações no meio de cultura após sete semanas de cultivo *in vitro*.**



\*Média de quatro repetições. Valores seguidos de letras indicam diferença significativa para o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (maiúsculas para fontes de nitrogênio, minúsculas para concentrações de nitrogênio). CV (%): a= 47,43, b= 44,52. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

No teor médio de clorofila *b* foram observadas diferenças significativas nas folhas de *D. asper* ( $p < 0,05$ ) para a interação das fontes e as concentrações de nitrogênio no meio de cultura (Figura 21b). O tratamento amônio-nitrato 30 mM com conteúdo médio de clorofila *b* igual a 14,42 mg g<sup>-1</sup> MF foi diferente estatisticamente quando comparado aos demais tratamentos (Figura 21b). Na sequência, os tratamentos amônio-nitrato 60 mM (8,42 mg g<sup>-1</sup> MF), testemunha (8,04 mg g<sup>-1</sup> MF), nitrato 30 mM (7,64 mg g<sup>-1</sup> MF), amônio 30 mM (6,82 mg g<sup>-1</sup> MF), nitrato 60 mM (4,75 mg g<sup>-1</sup> MF), nitrato 90 mM (4,62 mg g<sup>-1</sup> MF) amônio 60 mM (4,52 mg g<sup>-1</sup> MF) foi a ordem decrescente dos teores de clorofila *b* para os tratamentos em segundo ordem. O menor conteúdo médio nas folhas de *D. asper* de clorofila *b* foi observado

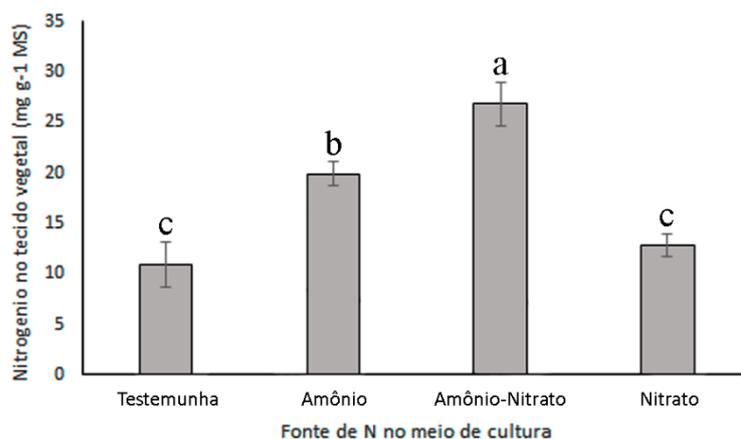
quando o material vegetal foi submetido ao tratamento amônio-nitrato 120 mM (1,53 mg g<sup>-1</sup> MF) (Figura 21b).

O conteúdo médio de carotenoides totais não apresentou diferenças estatísticas significativas para nenhum dos fatores para a ANOVA, independente dos tratamentos utilizados.

### 3.3.2 Nitrogênio total no tecido vegetal.

O conteúdo médio de nitrogênio em amostras de *D. asper* apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as diferentes fontes para o ANOVA (Figura 22). Observou-se que com a utilização de amônio-nitrato as plantas tiveram o maior conteúdo médio (26,83 mg g<sup>-1</sup> MS), seguido do tratamento amônio (19,89 mg g<sup>-1</sup> MS). Os menores conteúdos médios de N foram observados nos tratamentos nitrato (12,88 mg g<sup>-1</sup> MS) e tratamento testemunha (10,95 mg g<sup>-1</sup> MS) (Figura 22).

**Figura 22. Teores médios de nitrogênio total do tecido vegetal (mg. g<sup>-1</sup> MS) de touceiras de *Dendrocalamus asper* cultivadas *in vitro* sob diferentes fontes de nitrogênio (amônio, amônio-nitrato, nitrato) no meio de cultura após sete semanas de cultivo.**



\*Média de quatro repetições. Valores seguidos de letras indicam diferença significativa para o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). CV (%) = 25,47. Barras correspondentes ao erro padrão da média.

### 3.4 DISCUSSÃO

*Dendrocalamus asper* é um bambu dos mais amplamente cultivado no mundo (MUSTAFA et al., 2021), demandando um grande número de mudas. Os métodos de micropropagação se apresentam como alternativa para suprir a demanda de mudas de qualidade genética e fitossanitária. Nos protocolos de sistema de propagação *in vitro* a solução salina MS

é utilizada no meio de cultura para o cultivo *in vitro* desta espécie (SANDHU et al. 2018; ORNELLAS et al., 2017; ZANG et al., 2019; RESTU et al., 2020; ORNELLAS et al., 2022).

Dentro dos elementos químicos utilizados para a nutrição das plantas, o nitrogênio é considerado essencial para o crescimento e desenvolvimento, tendo um papel importante no metabolismo, sendo atribuídos incrementos na fotossíntese, massa total e vigor, constituindo aminoácidos, enzimas, proteínas, dentre outras moléculas (LEGHARI et al., 2016). Na formulação do meio de cultura MS, tem-se o nitrogênio na forma de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) e nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) na concentração de 60 mM de nitrogênio total (MURASHIGE; SKOOG, 1962). No presente estudo, foram observados efeito diferenciados sob a influência das fontes e concentrações de nitrogênio no meio de cultura em plantas de *D. asper* cultivadas *in vitro*, conforme ao apresentado anteriormente.

A altura das touceiras de *D. asper*, apresentou-se diferente sob o efeito das fontes de nitrogênio às sete semanas de cultivo *in vitro*. Observou-se que as plantas cultivadas no tratamento testemunha (0 mM de N) (5,56 cm), o tratamento nitrato (5,07 cm) e no tratamento amônio (4,75 cm) apresentaram as maiores alturas médias (Figura 17a). Respostas diversas nos parâmetros de crescimento das culturas afetadas pela quantidade e fonte de nitrogênio tem sido reportadas também na literatura para várias espécies, como por exemplo em trabalho com oito cultivares de *Rubus idaeus* L. e um de *R. odoratus* L., nas quais os autores observaram efeitos positivos na qualidade geral dos genótipos com o aumento do  $\text{NO}_3^-$ , assim como, a interação do nitrato e o amônio promoveu o alongamento dos brotos (POOTHONG; REED, 2016), de forma diferente, na espécie *Gerbera hybrida* (*G. jamesonii* × *G. viridifolia*), não verificaram efeitos no crescimento e desenvolvimento dos brotos relacionados com o  $\text{NO}_3^-$  (NIEDZ et al., 2014). Inclusive, para cinco cultivares de *Pyrus* Wada et al. (2015), observaram respostas diferentes para cada espécie, de acordo com a quantidade total de nitrogênio no meio de cultura e a razão nitrato: amônio, tendo como conclusão de que as respostas podem ser específicas para cada espécie.

De forma semelhante, verificou-se que as concentrações 0 mM, 30 mM e 60 mM de N no meio de cultura promoveram as maiores alturas nas touceiras de *D. asper* (Figura 17b). A partir destes resultados é possível definir que a concentração 30 mM de nitrogênio no meio de cultura é o suficiente para o desenvolvimento de *D. asper* em sistema *in vitro*, ao não apresentar diferença com a concentração 60 mM normalmente utilizado na formulação salina MS. Diversos estudos têm sugerido que o nitrogênio total da formulação MS pode ser maior do que apresentada para o cultivo e desenvolvimento de várias espécies (MENKE-MILCZAREK;

ZIMNY, 2001; NOWAK et al., 2007; GABRYSZEWSKA, 2015). Similarmente, em estudo desenvolvido com *D. asper*, foi observado que 3/4 da concentração MS junto com 3 ppm de Thidiazuron (TDZ) apresentou-se como a concentração, mas adequada para o cultivo *in vitro* desta espécie (RESTU et al., 2020). No presente estudo, também foi visto que a concentração crescente de nitrogênio pode afetar o desenvolvimento dos colmos de *D. asper*, como observado nas concentrações 90 e 120 mM. Resultados semelhantes foram observados para *Stevia rebaudiana* Bertoni, com a redução da regeneração de plântulas com o aumento da concentração do nitrogênio no meio de cultura (MAGANGANA et al., 2018).

Resultado importante obtido no presente estudo, foi quando plantas submetidas ao tratamento testemunha, tanto para as fontes quanto para as concentrações (0 mM de N), manifestaram maiores valores médios para altura das touceiras, número de brotações e índice de brotação. Nem sempre estes resultados são considerados benéficos para as plantas de uma forma geral, pois pode-se tratar de uma resposta ao estresse e translocação do elemento nos tecidos das plantas. Esta interpretação pode ser confirmada pelas concentrações do nitrogênio total no tecido de touceiras de *D. asper* no presente estudo (Figura 21), em que foram observados menores conteúdos médios no tratamento testemunha (10,95 mg g<sup>-1</sup>). A mobilização do nitrogênio nas plantas, se apresenta como uma estratégia importante para a sobrevivência delas, principalmente quando submetidas as condições de estresses pelos a fatores ambientais. A mobilização do nitrogênio é induzida pelos genes GLN1, GDH e ASN, através da ativação das enzimas GS1 e GDH, desencadeiam o transporte desde folhas senescentes para raízes e outros órgãos de armazenamento das plantas para posterior utilização (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010; MUR et al., 2016).

Referente ao número de brotações novas, foram observadas diferenças significativas para as fontes e concentrações de nitrogênio no meio de cultura (Figura 18). Os maiores números médios de brotações foram obtidos com o tratamento testemunha (2,0 brotos/touceira), porém como explicado anteriormente, este resultado é resposta ao estresse. Igualmente, foi observado o maior número médio de brotações e o maior índice médio de multiplicação decorrente da utilização de nitrato como única fonte de N (Figura 18a, 19). Resultados do presente trabalho corroboram com aqueles obtidos em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, quando cultivados *in vitro* em sistema imersão temporário e meio semissólido, o número de brotações foi maior quando as culturas foram submetidas a maior concentração de do nitrato em relação ao amônio, para ambos os dois sistemas (MAXIMO et al., 2015), resultado semelhante foram obtidos para dois cultivares de *Pyrus communis* e *P. cordata*, com

aumento na qualidade dos brotos com a utilização de maior concentração de nitrato versus a concentração de amônio (WADA et al., 2015). O nitrato além de ser a maior fonte de nitrogênio para as plantas, também atua como uma molécula de sinalização para o desencadeamento de diversos processos fisiológicos (MEDICI; KROUK, 2014). Com o aumento do nitrato, aumentar as concentrações da enzima nitrato redutase (NR), aumentando assim a absorção e utilização efetiva do nitrato, gerando repostas fisiológicas em crescimento da parte aérea das plantas (LEA et al., 2006). Os resultados do presente estudo em altura e brotação das touceiras quando utilizado o nitrato, pode estar relacionado ao aumento da enzima NR.

Com relação aos teores médios de pigmentos fotossintéticos, verificou-se para a clorofila *a*, que as concentrações de 0, 30 e 60 mM, promoveram os maiores teores médios. Para a clorofila *b* foi observado o maior teor médio no tratamento amônio-nitrato a 30 mM, de igual forma foi observado diminuição dos teores médios de clorofila *b* com aumento da concentração de N. A clorofila e os carotenoides como pigmentos intimamente ligados ao processo fotossintético tem grande importância nos processos biológicos das plantas, como assimilação do fluxo de fótons, a dissipação da foto-oxidação, coloração das plantas, capacidade fotossintética (YUE et al., 2021), ativação do sistema fotossintético e a transformação em energia química (LI et al., 2013). O conteúdo de pigmentos pode estar mediado por diferentes fatores, entre eles a disponibilidade e captação de nitrogênio para processos metabólicos, uma vez que é um constituinte da clorofila (ARGENTA et al. 2001; LEGHARI et al., 2016).

De acordo com Malavolta et al. (1997), é possível utilizar como indicador do nível de absorção do nitrogênio nas plantas o conteúdo de clorofila. Contudo, no presente estudo foi observado para clorofila *a* e *b* uma diminuição nos teores médios com o aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultura, possivelmente associado a estresse oxidativo (MISZALSKI et al., 2016) ou toxidez com concentrações muito elevadas, porém, em geral os macronutrientes são considerados menos tóxicos do que os micronutrientes, possibilitando assim a utilização de doses elevadas; de igual forma, o efeito das concentrações elevadas e a diminuição de parâmetros produtivos nas plantas pode estar ligado ao desbalanço de nutrientes o que interfere na absorção de outros gerando sintomas semelhantes toxidez, sendo sintomas de deficiência de outro (MAGANGANA et al., 2018).

Ao finalizar o período de sete semanas de cultivo, as touceiras de *D. asper* apresentaram diferenças significativas no conteúdo médio de nitrogênio no tecido vegetal para o fator fontes de nitrogênio utilizadas no meio de cultura. O maior conteúdo médio de nitrogênio

no tecido vegetal foi observado em touceiras mantidas em meio de cultura com amônio-nitrato (26,83 mg g<sup>-1</sup> MS), seguido do tratamento com amônio. É de salientar que o menor conteúdo de nitrogênio nas touceiras esteve presente no tratamento testemunha, o que corrobora os dados e as hipóteses sobre a redistribuição, remobilização e respostas fisiológicas das plantas nos parâmetros morfológicos analisados anteriormente. A assimilação do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é um processo mais demandante energeticamente do que a assimilação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, porém na presença do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e existindo elevada concentração na célula pode conduzir a acidificação e toxicidade (ZHANG et al. 2019; SINGH et al., 2022). Contudo, em estudo realizado com *Phyllostachys edulis* (bambu) foi observado que apresentava alta plasticidade e adaptação as concentrações altas de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sem redução do crescimento quando comparado com *Castanopsis fargesii* (ZOU et al., 2020).

Segundo o anteriormente citado, poderia se pensar que as plantas de *D. asper* apresentam um comportamento semelhante, como visto na Figura 21, as duas fontes que tiveram maiores acúmulos de nitrogênio foram o amônio-nitrato e o amônio, indicando a capacidade desta espécie à absorção e utilização do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uma vez que a concentração não ultrapasse níveis tóxicos.

### 3.5 CONCLUSÕES

Por meio deste estudo foi possível observar que as fontes isoladas de nitrogênio no meio de cultura MS, amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), promoveram maiores alturas das touceiras, porém não se diferenciaram estatisticamente da presença de amônio mais nitrato. O uso de concentrações superiores a 60 mM de nitrogênio total, no meio de cultura MS resultaram na redução da altura das touceiras. O número de brotações e o índice de multiplicação foram maiores com a utilização de nitrato como fonte única no meio de cultura. De forma semelhante, observou-se que concentrações superiores a 60 mM de N, no meio de cultura, causa diminuição no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Por outro lado, evidenciou-se que as touceiras de *D. asper* tem maior acúmulo de nitrogênio no tecido vegetal em presença de amônio e amônio-nitrato. Por tanto, o cultivo *in vitro* de *D. asper* com a concentração de 30 mM de N, em meio de cultura MS, não afeta o desenvolvimento das touceiras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINLABI, E. T.; ANANE-FENIN K.; AKWADA, D. R. Applications of bamboo. In: Akinlabi ET, Anane-Fenin K, Akwada DR (eds) Bamboo: the multipurpose plant. **Springer, Cham**, p. 179–219, 2017.
- ÁVILA, F. W.; BALIZA, D. P.; FAQUIN, V.; ARAÚJO, J. L.; RAMOS, S. J. Interação entre silício e nitrogênio em arroz cultivado sob solução nutritiva. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, p.184-190, 2010.
- BENTON, A. Priority Species of Bamboo. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (eds.) Bamboo: the plant and its use. **Springer International Publishing**, v. 10, p. 31-41, 2015.
- CLARK, L.G.; LONDONO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. Bamboo taxonomy and habitat. In: LIESE, W.; KOEHL, M. eds. Bamboo, the plant and its uses. Heidelberg: Tropical Forest Series, **Springer Verlag**. p. 1–30, 2015.
- CLARK, L. G.; OLIVEIRA, R. P. Diversity and evolution of the new world bamboos (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae, Olyreae). In: Proceedings of the 11th World bamboo congress, Xalapa, Mexico. **The World Bamboo Organization, Plymouth**, p. 35–47, 2018.
- DE ALCANTARA, G. B.; MACHADO, M. P.; DE OLIVEIRA, R. A.; BESPALHOK, J. C. *In vitro* multiplication of sugarcane with different nitrogen and sucrose concentrations. **Científica**, v. 47, n. 1, p. 70-76, 2019.
- GABRYSZEWSKA, E. A. Effect of different sucrose and nitrogen salt levels in the medium and temperature on in vitro propagation of *Helleborus niger* L. **Acta Agrobotanica**, v. 68, n. 2, 2015.
- GONDIM, A. R. D. O.; PRADO, R. D. M.; FONSECA, I. M.; ALVES, A. U. Crescimento inicial do milho cultivar brs 1030 sob omissão de nutrientes em solução nutritiva. **Revista Ceres**, v.63, p. 706-714, 2016.
- GUTIÉRREZ, L. G.; LÓPEZ-FRANCO, R.; MORALES-PINZÓN, T. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA®. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 28, p. 1503-1510, 2016.
- HODKINSON, T. R. Evolution and taxonomy of the grasses (Poaceae): a model family for the study of species-rich groups. **Annual Plant Reviews Online**, p. 255-294, 2018.
- IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Nitrogen source, concentration, and  $\text{NH}_4^+$ :  $\text{NO}_3^-$  ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 2, p. 167-174, 2009.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal. 2.ed.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 431, 2008.
- Kovalchuk, I.Y.; Mukhitdinova, Z.; Turdiyev, T.; et al. Nitrogen ions and nitrogen ion proportions impact the growth of apricot (*Prunus armeniaca*) shoot cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 133, p. 263–273, 2018.

- LEA, U. S.; LEYDECKER, M. T.; QUILLERÉ, I.; MEYER, C.; LILLO, C. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. **Plant Physiology**, v. 140, n. 3, p. 1085-1094, 2006.
- Leghari, S. J.; Wahocho, N. A.; Laghari, G. M.; HafeezLaghari, A.; MustafaBhabhan, G.; HussainTalpur, K.; et al. Role of nitrogen for plant growth and development: A review. **Advances in Environmental Biology**, v. 10, n. 9, p. 209-219, 2016.
- LELJAK-LEVANIĆ, D.; BAUER, N.; MIHALJEVIĆ, S.; JELASKA, S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. **Journal Plant Physiology**, v. 161, p. 229–236, 2004.
- LI, D.; TIAN, M.; CAI, J.; JIANG, D.; CAO, W.; DAI, T. Effects of low nitrogen supply on relationships between photosynthesis and nitrogen status at different leaf position in wheat seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 70, p. 257-263, 2013.
- LIESE, W.; WELLING, J.; TANG, T. K. H. Utilization of bamboo. In: Liese W, Köhl M (eds) *Bamboo: the plant and its uses*. **Springer**, p 299, 2015.
- MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J.; MEDICI, L. O.; BISON, O.; PEREIRA, M. B.; SANTOS JÚNIOR, U. M. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Brazilian Journal of Botany**, 25, 129-136, 2002.
- MAGANGANA, T. P.; STANDER, M. A.; MAKUNGA, N. P. Effect of nitrogen and phosphate on in vitro growth and metabolite profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 1, 141-151, 2018.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2nd ed. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, Piracicaba. p. 319, 1997.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of botany**, v. 105, n. 7, p. 1141-1157, 2010.
- MÁXIMO, W. P. F.; ALMEIDA SANTOS, P. A.; MENDONÇA, E. G.; SANTOS, B. R.; PAIVA, L. V. Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) ratios for propagation of *Eucalyptus* hybrid in two different *in vitro* cultivation systems. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 12, p. 1242-1248, 2015.
- MENKE-MILCZAREK, I.; ZIMNY, J.  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  requirement for wheat somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 23, n. 1, 37-42, 2001.
- MEDICI, A.; KROUK, G. The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 19, p. 5567-5576, 2014.
- MISZALSKI, Z.; SKOCZOWSKI, A.; SILINA, E.; DYMOVA, O.; GOLOVKO, T.; KORNAS, A.; STRZALKA, K. Photosynthetic activity of vascular bundles in *Plantago media* leaves. **Journal of Plant Physiology**. v. 204, p. 36–43, 2016.

- MOREL, G.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, 138-140, 1951.
- MUSTAFA, A. A.; DERISE, M. R.; YONG, W. T. L.; RODRIGUES, K. F. A concise review of *Dendrocalamus asper* and related bamboos: germplasm conservation, propagation and molecular biology. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1897, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10091897>
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MUR, L. A.; SIMPSON, C.; KUMARI, A.; GUPTA, A. K.; GUPTA, K. J. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. **Annals of botany**, v. 119, n. 5, p. 703-709, 2017.
- NIEDZ, R. P.; EVENS, T. J. The effects of nitrogen and potassium nutrition on the growth of nonembryogenic and embryogenic tissue of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **BMC Plant Biology**, n. 8, p. 126, 2008.
- NIEDZ, R. P.; HYNDMAN, S. E.; EVENS, T. J.; WEATHERSBEE, A. A. III. Mineral nutrition and in vitro growth of *Gerbera hybrida* (Asteraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** v. 50, p. 458–470, 2014.
- NOWAK, B.; MICZYŃSKI, K.; HUDY, L. The effect of total inorganic nitrogen and the balance between its ionic forms on adventitious bud formation and callus growth of Węgierka Zwykła plum (*Prunus domestica* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, p. 479–484, 2007.
- ORNELLAS, T. S.; WERNER, D.; HOLDERBAUM, D. F.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Effects of Vitrofuril, BAP and meta-Topolin in the *in vitro* culture of *Dendrocalamus asper*. **Acta Horticulturae**, p. 285-292, 2017.
- PAUDYAL, K.; ADHIKARI, S.; SHARMA, S.; SAMSUDIN, Y. B.; PAUDYAL, B. R.; BHANDARI, A.; BIRHANE, E.; DARCHA, G.; TRINH, T. L.; BARAL, H. Framework for assessing ecosystem services from bamboo forests: lessons from Asia and Africa. **CIFOR**, v. 255, 2019.
- POOTHONG, S.; REED, B. M. Optimizing shoot culture media for *Rubus* germplasm: the effects of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and total nitrogen. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n. 3, p. 265-275, 2016.
- RESTU, M.; LAREKENG, S. H.; SETIAWAN, E. The optimization of *in vitro* micropropagation of betung bamboo (*Dendrocalamus asper* Backer) by medium concentrations and plant growth regulators. In IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**, v. 575, n. 1, p. 012024. IOP Publishing, 2020.
- SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 1, p. 27-53, 2018.
- SINGH, S.R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement

of bamboo—a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology Plants**, v.19 n. 1, p. 21–41, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-012-0147-1>

SINGH, V.; CHAUHAN, R.; KAUR, I.; QURAIISHI, A. Assessment of culture medium without commercial ammonium nitrate for *in vitro* culture of industrially important plant species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, n. 1, p. 95-106, 2022.

SORENG, R. J.; PETERSON, P. M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; TEISHER, J. K.; CLARK, L. G.; BARBERÁ, P.; GILLESPIE, L. J.; ZULOAGA, F. O. A world-wide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: an update and a comparison of two 2015 classifications. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, p. 259–290, 2017.

SURESH, Y.; NAGARAJA, T. E.; LOHITHASWA, H. C.; SHIVAKUMAR, K. V.; MENIARI, T. Effectiveness of different sources of nitrogen in MS media for rapid *in vitro* shoot initiation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes. **International Sugar Journal**, v. 121, n. 1452, p. 920-924, 2019.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análises de solo, plantas e outros materiais. **Porto Alegre: Ufrgs**, v. 5, p. 174, 1995.

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. 3, p. 66-71, 2019.

ZHANG, K.; WU, Y.; HANG, H. Differential contributions of  $\text{NO}_3^{-1}$ / $\text{NH}_4^{+3}$  to nitrogen use in response to a variable inorganic nitrogen supply in plantlets of two Brassicaceae species *in vitro*. **Plants Methods**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2019.

ZOU, N.; SHI, W.; HOU, L.; KRONZUCKER, H. J.; HUANG, L.; GU, H.; et al. Superior growth, N uptake and  $\text{NH}_4^+$  tolerance in the giant bamboo *Phyllostachys edulis* over the broad-leaved tree *Castanopsis fargesii* at elevated  $\text{NH}_4^+$  may underlie community succession and favor the expansion of bamboo. **Tree Physiology**, v. 40, n. 11, p. 1606-1622, 2020.

WADA, S.; NIEDZ, R. P.; REED, B. M. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 1, p. 19-27, 2015.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

Yue, C.; Wang, Z.; Yang, P. The effect of light on the key pigment compounds of photosensitive etiolated tea plant. **Botanical Studies**, v. 62, n. 1, p. 1-15, 2021.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo foi realizado como um esforço acadêmico e aplicado de ampliar o conhecimento do cultivo *in vitro* de bambus lignificados, os pontos limitantes e aspectos que poderiam beneficiar os processos de micropropagação das culturas. Este trabalho iniciou-se como parte do projeto “Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável da Cadeira Produtiva do Bambu no Sul do Brasil”; dentro do subprojeto “Macro e Micropropagação e conservação *in vitro* de germoplasmas de bambu” em um esforço contínuo de diversas instituições como o laboratório de fisiologia do desenvolvimento e genética vegetal (LFDVG/UFSC), o núcleo de pesquisas em biotecnologia e desenvolvimento vegetal (NPBV/UFSC) e a associação catarinense do bambu (BambuSC) pelo fortalecimento da cadeia produtiva e a qualidade das mudas entregues aos produtores. Porém, dentro dos fatores limitantes encontram-se aspectos como o baixo rendimento dos métodos de propagação tradicionais, estabelecimento de culturas *in vitro*, fitossanidade com a manifestação de microrganismos no sistema *in vitro*, e o entendimento da dinâmica e resposta das culturas a diversos aspectos ambientais. Com o grande esforço de estudantes de pós-graduação e graduação conseguiu-se o estabelecimento da coleção de bambus *in vitro* do LFDGV, vencendo uma das principais limitantes, promovendo assim o desenvolvimento e execução de trabalhos com estas culturas. Fazendo parte desta iniciativa, e com as culturas já estabelecidas *in vitro*, este trabalho teve como alvo principal, a avaliação de fatores ambientais subministrados as culturas *in vitro* com o intuito do estudo das respostas morfofisiológicas e bioquímicas de cada uma das espécies de estudo, numa tentativa de maior entendimento sobre o bambu e visando melhor qualidade das mudas geradas, protocolos utilizados e fortalecimento da cadeia produtiva do bambu brasileiro. Espécies de bambu de reconhecida importância econômica foram micropropagados com sucesso em diferentes sistemas metabólicos: heterotrófico, mixotrófico e autotrófico, assim como em diferentes concentrações salinas de meio de cultura. Os resultados gerados, espera-se permitam o avanço no conhecimento científico dos bambus lignificados de grande porte em diferentes campos como a propagação, fisiologia do metabolismo e desenvolvimento, e conservação dos bambus.

Os resultados obtidos neste estudo responderam perguntas importantes, gerando conhecimentos sobre o cultivo *in vitro* de bambus tropicais gigantes lignificados. No esforço acadêmico pelo conhecimento do desenvolvimento fisiológico dos bambus *in vitro*, com cada resposta a um interrogante, surgem novos questionamentos. No presente estudo em trabalho com *G. chacoensis* em sistemas de cultivo *in vitro* heterotrófico, mixotrófico e autotrófico foram testadas duas concentrações de sacarose em complemento com as luzes LED, e os

resultados mostraram a necessidade da suplementação com sacarose no meio de cultura, também, foi encontrado que as plantas cultivadas em sistema heterotrófico mostraram maior adaptação ao sistema *ex vitro* independente do comprimento de onda utilizado. Destes resultados, surgem novas perguntas que poderiam gerar novas pesquisas. As novas hipóteses que surgem a partir dos dados obtidos com *G. chacoensis* são: Doses intermediárias de sacarose no meio de cultura (entre 0 e 30 g L<sup>-1</sup>) geram dados diferentes aos encontrados neste estudo na fase de adaptação das touceiras ao sistema *ex vitro*?; A umidade relativa dentro dos frascos de cultivo podem afetar o desenvolvimento e mudanças fisiológicas das touceiras gerando melhor qualidade fotossintética das touceiras para a sua aclimatização?; visto que as touceiras cultivadas com sistemas de ventilação e entrada de CO<sub>2</sub> passiva, mostraram resultados diferentes e menores no rendimento quântico máximo do fotossistema II (análise estreitamente relacionada com a capacidade fotossintética e prontidão das plantas para a aclimatização) que as plantas cultivadas em sistema *in vitro* heterotrófico, o enriquecimento ou entrada forçada de CO<sub>2</sub> teria efeito diferenciado para o sistema heterotrófico? Estará ligado este resultado a diferenças anatômicas nas folhas das touceiras nos diferentes sistemas avaliados? Como estas muitas mais perguntas são geradas e poderiam ser estudadas em pesquisas futuras para esta espécie.

De modo semelhante, no estudo realizado com *D. asper* e diferentes fontes e concentrações de nitrogênio no meio de cultura, no presente trabalho, foram obtidos resultados diferenciados por efeito dos fatores avaliados. Porém, futuramente podem ser realizados diferentes estudos sobre sintetização e ativação enzimática ligada a captação do nitrogênio do meio de cultura, o efeito da modificação da concentração e fonte de outras moléculas no meio de cultura na procura do refinamento da solução salina utilizada para o cultivo *in vitro* de bambus, estudo das modificações anatômicas causadas por estas moléculas em diferentes metodologias de propagação ou efeito das mesmas em propagação em diferentes rotas morfogênicas.

Por último e como visto neste estudo, as respostas aos fatores avaliados são específicas para cada espécie de bambu, seria necessário realizar estudos semelhantes aos realizados para cada espécie no presente trabalho, quer isto dizer, analisar os efeitos dos sistemas heterotróficos, mixotrófico e autotróficos para *D. asper* e o refinamento do meio de cultura para *G. chacoensis*.