



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

Carolina Kades Marchetti

**CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE *Chusquea mimosa* (BAMBUSOIDEAE; POACEAE)**

Florianópolis

2022

Carolina Kades Marchetti

**CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE  
*Chusquea mimosa* McClure & L. B. SM**

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra.

Florianópolis

2022

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

Marchetti, Carolina Kades

CONSERVAÇÃO EX SITU DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE  
Chusquea mimosa McClure & L. B. SM / Carolina Kades  
Marchetti ; orientador, Dr. Miguel Pedro Guerra, 2022.  
52 p.

Dissertação (mestrado) - 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. Conservação de Recursos Genéticos Vegetais. 3. Bambus nativos do Brasil. 4. Biotecnologia . 5. Cultura de tecidos vegetais. I. Guerra, Dr. Miguel Pedro . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

**CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE  
*Chusquea mimosa* McClure & L. B. SM**

**POR**

Carolina Kades Marchetti

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado em 31/08/2022 por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga  
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Universidade Federal de Santa Catarina

—  
Profa. Dra. Rosete Pescador  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

---

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Coordenador da Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

---

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra  
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, que sempre me incentivaram, possibilitaram meus estudos e acima de tudo, acreditam no meu potencial.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Izabel Kades Marchetti e Vilson Marchetti por sempre apoiarem meus estudos.

Aos meus familiares, irmãos de sangue e coração, Guilherme Kades Marchetti, Saiuri Marchetti, Juliana Moretti e Larissa Vendruscolo, e meu afiliado Heitor Moretti Andrade, que fizeram parte de muitos momentos da minha vida nesse processo, ajudando mesmo de longe, tornando-o mais leve dentro do possível considerando o cenário de saúde mundial.

Agradeço ao Dr. Miguel Pedro Guerra, pela confiança na orientação, e paciência devido aos atrasos decorrentes da pandemia.

Aos meus colegas de pós-graduação do RGV, Thiago Ornellas, Milena Machado, Julia Zapelini, Yohan Fritsche, Tainara Gris, Suelen Guterres, Daniela Goeten, Lucas Franco, Marcos Pinheiro, Poliane Alves. e tantos outros que se listar vira uma lista telefônica, rs. Agradeço a todos vocês pela parceria, trocas de conhecimento e muitas horas de laboratório desde que entrei no LFDGV. Sempre lembrarei dos que fizeram parte dessa caminhada, pelos conselhos, aprendizados diários e nossas confraternizações.

Agradeço a coordenação do RGV/UFSC e a banca avaliadora pelas considerações feitas para enriquecer o trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudos, e fomento nas pesquisas sobre Bambus nativos, com grande potencial, mas por vezes negligenciados.

Por fim, agradeço a UFSC, por continuar oferecendo o acesso à educação gratuita e de qualidade no Brasil.

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I: Revisão bibliográfica.....</b>	<b>15</b>
Figura 1. Distribuição geográfica do gênero <i>Chusquea</i> no Brasil.....	13
<b>CAPÍTULO II: Conservação ex situ de sementes de <i>Chusquea Mimosa McClure &amp; L. B. Sm</i> em baixas temperaturas e criopreservação.....</b>	<b>20</b>
Figura 1. Touceiras de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm na Serra do Rio do Rastro, SC; (A e B) Touceiras a campo; (C) destaques de colmos; (D e E) sinflorescências; e (F) ramificação avermelhada.....	23
Figura 2. Sementes de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm. A: Diferentes padrões se sementes encontrados em uma mesma população. B: semente cheia e semente falhada, sem a pálea e lema. Barra A: 2mm; B: 0,5mm.....	23
Figura 3. Teor de umidade (A) e porcentagem de germinação (B) de sementes de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm em função da desidratação por sílica gel por até 96 horas.....	28
Figura 4. Percentual de germinação (A) e contaminação (B) in vitro em sementes de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm, após conservação em diferentes temperaturas de armazenamento ao longo de seis meses.....	30
Figura 5. Percentual de germinação de sementes de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm, com diferentes tempos de imersão no crioprotetor PVS3.....	31
Figura 6. Germinação de sementes de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm. (A) e Colmo desenvolvido in vitro (B) após a coleta a campo; Germinação da semente (C) e Colmo desenvolvido in vitro (D) após 6 meses de conservação em sala de crescimento a aproximadamente 25° C; Germinação da semente (E) e Colmo desenvolvido in vitro (F) após 6 meses de conservação em geladeira a 6° C; Germinação da semente (G) e Colmos desenvolvidos in vitro (H) após 6 meses de conservação em freezer a -20° C; Germinação da semente (I) e Colmos desenvolvidos in vitro (J) após 6 meses de criopreservação em NL a - 196° C; e semente oxidada após introdução in vitro (K). Barras: A, C, E, G, I, K: 2 mm; B, D, F, H, J: 5 mm.....	32
<b>CAPÍTULO III: Micropropagação de <i>Chusquea Mimosa McClure &amp; L. B. Sm</i> utilizando 6-benzilaminopurina e Metatopolina.....</b>	<b>38</b>
Figura 1. Taxas de germinação (A) e contaminação (B) em sementes de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm, com e sem a retirada da pálea e lema na introdução in vitro.....	44
Figura 2. Percentual de multiplicação in vitro de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm, com o uso de BAP e mT em diferentes concentrações.....	45
Figura 3. <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm após a introdução in vitro. A: Colmo com primeira folha desenvolvida após 15 dias; B: Colmo após 30 dias; C: Touceira após 60 dias, com sinais de hiperhidricidade e D: Touceira com colmo inicial oxidado e desenvolvimento de brotações laterais. Barras: A: 1mm; B, C e D: 2mm.....	45
Figura 4. Touceiras de <i>Chusquea mimosa</i> McClure & L. B. Sm após 30 dias em diferentes concentrações de BAP e mT. A: Testemunha; B: Tratamento BAP 10µm; C: Tratamento mT 20µm. Barras: 2mm.....	46



## **LISTA SIGLAS DE ABREVIACOES**

**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina

**CCA** - Centro de ciências agrárias

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

**BAP** – Benzilaminopurina

**mT** – Metatopolina

**RAS** – Regras de análises de sementes

**PVS3** – Plant Vitrification Solution 3

**CK** - Citocinina

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO GERAL</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivos específicos	12
<b>3. Capítulo I: Revisão bibliográfica</b>	<b>14</b>
3.1 Chusquea Mimosa	14
3.2 Importância da espécie	15
3.3 Conservação <i>ex situ</i>	15
3.4 Propagação convencional de bambus	16
3.5 Micropropagação de bambus	17
<b>4. Referências bibliográficas</b>	<b>18</b>
<b>5. Capítulo II: Conservação <i>ex situ</i></b>	<b>23</b>
5.1 Resumo	23
5.2 Introdução	24
5.3 Material e métodos	25
<b>5.3.1 Curva de desidratação</b>	<b>27</b>
<b>5.3.2 Conservação das sementes</b>	<b>28</b>
<b>5.3.3 Solução crioprotetora PVS3</b>	<b>28</b>
<b>5.3.4 Análises estatísticas</b>	<b>29</b>
5.4 Resultados e discussão	29
<b>5.4.1 Curva de desidratação</b>	<b>29</b>
<b>5.4.2 Conservação <i>ex situ</i></b>	<b>31</b>
5.5 Conclusão	36
<b>6. Referências bibliográficas</b>	<b>36</b>
<b>7. Capítulo III: Micropropagação de <i>Chusquea mimosa</i></b>	<b>41</b>
7.1 Resumo	41
7.2 Introdução	42
7.3 Material e métodos	43
<b>7.3.1 Introdução <i>in vitro</i> de sementes</b>	<b>43</b>
<b>7.3.2 Multiplicação</b>	<b>44</b>
<b>7.3.3 Análises estatísticas</b>	<b>45</b>
7.4 Resultados e discussão	45
<b>7.4.1 Introdução <i>in vitro</i></b>	<b>45</b>
<b>7.4.2 Multiplicação</b>	<b>46</b>
7.5 Conclusões	49
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>49</b>

## 1. RESUMO GERAL

Os bambus distribuem-se amplamente pelo planeta e apresentam grande importância econômica, social e ecológica. No Brasil, a sua cadeia produtiva encontra-se em estruturação, e a multifuncionalidade deste grupo taxonômico revela atributos únicos quanto aos demais recursos genéticos vegetais. Além dos múltiplos usos, os bambus prestam diversos serviços ecossistêmicos aos ambientes onde habitam. Ferramentas biotecnológicas são importantes aliadas para a caracterização e o uso sustentável de bambus, principalmente quando se considera que as espécies desse grupo somente florescem e produzem sementes em longos intervalos de tempo. O presente trabalho teve como objetivo utilizar essas ferramentas para a conservação *ex situ* de sementes e a micropropagação visando a produção massal de mudas de *Chusquea mimosa*, bambu nativo do Brasil, com grande ocorrência na região Sul do País. Nos anos de 2019 e 2021 foram registrados florescimentos por meio de observação do grupo de pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais – UFSC. Todas as sementes utilizadas nos experimentos foram obtidas de touceiras de *Chusquea mimosa* localizadas na região da Serra do Rio do Rastro, município de Lauro Müller – Santa Catarina, Brasil. As sementes foram inicialmente submetidas à curva de desidratação para a determinação do ponto crítico tolerado para o armazenamento. E uma curva de regressão utilizando uma solução de vitrificação PVS3 por 30, 60, 120 e 180 minutos, com uma testemunha sem adição de PVS3 para o tratamento de criopreservação. Posteriormente as curvas, as sementes foram submetidas às quatro condições de temperatura, (-196, -20, 6 e 25 °C), onde permaneceram armazenadas por seis meses, sendo avaliadas a germinação em quatro períodos (0, 2, 4, e 6, meses). O descongelamento das amostras que ficaram sob as temperaturas de (-196, -20,) foi realizado a 40° C. Ao final de cada período de armazenamento as sementes foram submetidas à desinfestação e então inoculadas *in vitro*. A criopreservação (-196 °C) mostrou maior potencial de conservação com cerca de 50% de taxa de germinação após os 6 meses, enquanto os tratamentos conservados nas temperaturas de 6 °C, 25 °C e -20 °C apresentaram taxas de germinação de 30,3%, 10% e 6,6% respectivamente. A micropropagação do *Chusquea mimosa* foi avaliada a partir da germinação *in vitro* testando-se a retirada da pálea e lema das sementes. Esse procedimento aumentou em 40% a taxa de germinação em relação às sementes que tiveram todas as estruturas intactas, além da diminuição de 20% na taxa de contaminação após a introdução *in vitro*. A multiplicação *in vitro*, foi realizada em meio de cultura MS, com uma curva de

regressão das citocininas (Cks): 6-benzilaminopurina (BAP) e meta-topolina (mT) (0, 10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ ). Após 30 dias avaliou-se o número de colmos, altura de colmos, comprimento de raízes. Foi concluído que o meio MS suplementado com 20  $\mu\text{M}$  de mT apresentou o maior incremento em número de colmos, mas de forma geral, o uso das duas citocininas promoveu aumento da taxa de multiplicação quando comparado à testemunha.

## 2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver técnicas de conservação *ex situ* para sementes de *Chusquea mimosa*, e estabelecer um protocolo para a sua propagação massal *in vitro*.

### 2.1 Objetivos específicos

- a) Estabelecer uma curva de desidratação das sementes de *Chusquea mimosa* para a conservação *ex situ* de sementes de *Chusquea mimosa*.
- b) Avaliar os efeitos das diferentes temperaturas e criopreservação ao longo do tempo na germinação de sementes.
- c) Estabelecer um protocolo de micropropagação a partir de plântulas derivadas de sementes germinadas *in vitro*.

CAPÍTULO I:  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Chusquea Mimosa

O bambu *Chusquea mimosa* McClure & L.B. Sm (tribo Bambuseae), é uma espécie nativa e endêmica do Brasil, com ampla distribuição na região sudeste (SCHMIDT, 2008), com predominância para os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (Figura 1).

Popularmente conhecido como caraá, cará-mimoso, cará-de-vara e carajá, essa espécie engloba os bambus lignificados de clima tropical. No Sul do Brasil se distribui pela Mata Atlântica em formações do tipo Ciliar ou Galeria, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila e Floresta Ombrófila Mista (CLARK et al., 2022). Essa espécie apresenta expressivo potencial de uso econômico, sendo importante para a estabilidade dos ecossistemas os quais ocorrem (LIN, 2012).

As touceiras de *C. mimosa* tem colmos de cerca de 1,6 metros de altura, e 1 a 3 cm de diâmetro (SCHMIDT, 2009). Os rizomas são paquimorfos e os colmos são sólidos, eretos e com a base e ápices arqueados, com coloração uniforme, suas ramificações extravaginais com gemas triangulares em posição vertical. As folhas dos ramos são lanceoladas e as folhas do colmo são triangulares e decíduas. Possui inflorescências do tipo sinflorescência, paniculadas, abertas e contraídas; glumas múticas, curtas e subuladas e lemas e páleas com nervuras glabras (CLARK et al., 2022).



Fonte: Adaptado de FISHER et al., (2014).

**Figura 1.** Em azul: Distribuição geográfica do gênero *Chusquea* no Brasil. Seta: Localização da Serra do Rio do Rastro em Lauro Muller, SC – Coordenadas Geográficas: 27°59'32.33" S e 49°34'55.90" O (WGS 84).

### 3.2 Importância da espécie

Os bambus são gramíneas com reconhecida importância econômica, social e ambiental. Contudo, a disponibilidade natural deste recurso é cada vez mais reduzida em consequência do constante desmatamento, degradação do meio ambiente, expansão das fronteiras agrícolas e às dificuldades e limitações legais para a sua exploração em ecossistemas naturais.

De forma geral, os bambus apresentam usos múltiplos, com destaque para construção civil onde é conhecido como o “aço vegetal”, demonstrando em testes de resistência à tração e compressão pela densidade, pode ser mais eficiente que concreto (CARBONARI et al., 2017). Na indústria moveleira e design é um dos nichos onde o bambu tem grande espaço, justamente pela sustentabilidade que vem embutida ao seu uso na fabricação das peças (ORTHEY, 2015). Além de outras áreas como na alimentação com a produção de biomassa e outros produtos alimentícios, no paisagismo e artesanatos (FILGUEIRAS & GONÇALVES, 2006; SANTI, 2015), dentre outros.

### 3.3 Conservação *ex situ*

A conservação *ex situ* é uma técnica na qual plantas são conservadas fora do seu habitat natural, possibilitando a coleta e manutenção da diversidade genética, testando diversas estratégias, para avaliar o potencial de variação, seleção e até hibridização de indivíduos e populações desejáveis, e é uma opção de utilização principalmente para as espécies que apresentam longos ciclos de florescimento e dificuldades de propagação (ENGELS & ELGELMANN, 1998; ELGELMANN, 2011).

Uma das técnicas que tem se destacado para os bambus é a conservação de sementes em baixas temperaturas, com taxas de regeneração de cerca de 56% (AHMAD, 2021). Aliando essas técnicas com a cultura de tecidos é possível a regeneração de plantas completas (SINGH et al., 2013), bem como a propagação em grande escala a partir de uma pequena quantidade de material (MENEZES et al, 2012).

A criopreservação pode ser definida como a conservação de um determinado material vegetal em temperaturas ultrabaixas, como  $-196^{\circ}\text{C}$ , alcançada pelo uso de nitrogênio líquido (NL), possibilitando a estabilidade genética e segurança do material a longo prazo (SANTOS, 2000).

Um dos maiores desafios da criopreservação é evitar a formação de cristais de gelo no interior das células, pois esse processo causa a ruptura das membranas levando ao colapso celular (ENGELMANN, 1997). Para superar essas limitações são utilizados crioprotetores, tais como o *Plant Vitrification Solution* (PVS3) (NISHIZAWA et al.,

1993), que apesar de apresentar uso incipiente nos bambus, para outra poaceae, como *Oryza Sativa*, se tem trabalhos mostrando o potencial de aumento de regeneração em até 45% Huang et al., (1995), além de estudos que mostram os efeitos que a criopreservação pode causar em *Oryza Sativa* em níveis celulares utilizando análises de microscopia e citometria de fluxo (WANG et al., 1998; MOUKADIRI et al., 2002). E análises de microscopia eletrônica de crioscopia e a microscopia eletrônica de réplica de fratura por congelamento, apresentando evidências ultra estruturais causadas por congelamento, e dito isso, sugerir estados vítreos para evitar a ocorrência dos danos (FUJIKAWA & JITSUYAMA, 1998).

### 3.4 Propagação convencional de bambus

Os métodos convencionais de propagação vegetativa utilizados em bambus são a divisão de touceiras e do rizoma, a segmentação de colmos ou por meio de sementes. Contudo, esses métodos apresentam problemas relacionados a alguns fatores, tais como a falta de uniformidade e logística devido ao volume e peso do material vegetal e no caso das sementes, a disponibilidade (GIELIS et al., 2001).

Um dos fatores limitantes da propagação de bambus por sementes, é seu longo e imprevisível ciclo reprodutivo, tornando a ocorrência do florescimento e produção de sementes variável dentro de cada espécie (THAPLIYAL, 2015). Além disso, a floração pode ocorrer de duas principais formas: a gregária e monocárpica ou esporádica. No primeiro caso, os indivíduos florescem e produzem sementes simultaneamente, posteriormente entram em senescência e morrem. As sementes que forem dispersas darão origem aos indivíduos que estabelecerão a nova população naquele ambiente. No segundo caso, um ou mais indivíduos da população, ou mais de uma população, podem florescer ao mesmo tempo, e com intervalos variáveis de 20 a 120 anos (JANZEN, 1976; AZZINI, 1982).

Dentro das várias problemáticas relacionadas ao ciclo reprodutivo dos bambus, a viabilidade das sementes é uma das principais discutidas, pois além de imprevisível, em geral apresenta uma viabilidade curta, o que limita a produção regular e constante de mudas em larga escala para viabilizar a cadeia produtiva no Brasil (SINGH et al., 2013). Sabendo-se disso, se faz necessário o registro e monitoramento dos eventos de florescimento de indivíduos e/ou populações, associando-as às técnicas de biotecnologia para a sua caracterização, propagação e conservação.

### 3.5 Micropropagação de bambus

Decorrente das limitações da propagação convencional de bambus, destaca-se as ferramentas biotecnológicas associadas à micropropagação, o que possibilita a produção de genótipos de elite, uniformes, com garantias fitossanitárias e em grande escala (GUERRA et al., 1999). Essas técnicas são efetivas para a criação de protocolos de micropropagação para diferentes espécies, demonstrado por diversos estudos desenvolvidos nos últimos anos (JIMÉNEZ et al., 2006; RAMANAYAKE et al., 2006; ORNELLAS, 2017; ORNELLAS et al., 2019; PASQUALINI et al., 2019).

A micropropagação de bambus ocorre em cinco estágios principais: 1) Seleção de plantas matrizes e explantes; 2) Introdução e estabelecimento *in vitro*; 3) Multiplicação de touceiras; 4) Enraizamento e; 5) Aclimatização (NOGUEIRA et al., 2017).

O estágio de introdução *in vitro* é caracterizado pela desinfestação e inoculação do material vegetal até o seu estabelecimento em condições assépticas. Durante o cultivo *in vitro* podem ocorrer contaminações bacterianas e fúngicas, muito associadas à planta matriz e sua microbiota associada, tornando um dos principais problemas nas etapas de introdução e multiplicação *in vitro* dos bambus (RAMANAYAKE et al., 2006).

No estágio de multiplicação são utilizados meios de cultura com formulações salinas suplementadas com fontes de carbono, vitaminas, fitorreguladores e agente geleificante, objetivando disponibilizar as condições adequadas à proliferação dos brotos. Os fitorreguladores são amplamente utilizados para a micropropagação de bambus, com destaque para a 6-benzilaminopurina (BAP) (ARYA et al., 1999; SINGH et al., 2012).

Para muitas espécies de bambus o enraizamento *in vitro* pode ocorrer de forma concomitante ao estágio de multiplicação, sem necessidade de uma etapa exclusiva para a indução do sistema radicular. No entanto, quando não ocorre naturalmente, pode influenciar a aclimatização, e por isso, muitas vezes se faz necessária a utilização de auxinas, sendo estes fitorreguladores amplamente utilizados para a indução de raízes em inúmeras espécies, e apresentando resultados positivos para bambus (ARYA et al., 2012).

A aclimatização é a última etapa antes da liberação para o plantio, onde ocorre a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. Nessa etapa, as plantas estão sujeitas ao contato com o ambiente externo, o que pode resultar em perda das mudas pela

ocorrência de distúrbios fisiológicos ocasionados pela diferença de umidade e estresse pelo elevado fluxo respiratório causado pela diferença de ambiente até a consolidação das mudas (NOGUEIRA, 2018).

Dessa forma, a micropropagação a partir de plântulas derivadas da germinação *in vitro* de sementes de *C. mimos*, se mostra uma alternativa com potencial para evitar as altas taxas de contaminação, que são comumente observadas em outras fontes de explantes, como por exemplo, gemas axilares de *D. asper* utilizadas no trabalho de Ornellas, (2017), provenientes de touceiras estabelecidas a campo, onde possuem grande interação com microrganismos, que nem sempre são facilmente desinfestados para a introdução *in vitro*.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z; DING, Y; SHAHZAD, A. **Biotechnological Advances in Bamboo**. Springer Singapore, cap 12. 2021.

ARYA, S. et al. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, Vol. 18, n. 10, p. 879–882, 1999.

ARYA, I. D.; KAUR, B; ARYA, S. Rapid and mass propagation of economically important Bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. **Indian Journal of Energy**, v. 1, n. 1, p. 11-16, 2012.

AZZINI, A; ARANHA, C; PIO, R. M. Florescimento e frutificação em bambu. **Bragantia**, v. 41, n. 18, p. 175-180, 1982.

BARAUNA, D; ORTHEY, A. L; RAZERA, Dalton Luiz. Perspectivas de sustentabilidade e responsabilidades no uso do bambu industrializado para o design de móveis no brasil. **Blucher Design Proceedings**, v. 2, n. 9, p. 4132-4142, 2016.

CARBONARI, G. et al. Bambu—O aço vegetal. **Mix Sustentável**, v. 3, n. 1, p. 17-25, 2017.

CLARK, L.G. et al. *Chusquea* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB13106>>. Acesso: abr. 2022

ENGELMANN F. In vitro conservation methods. In: Callow JA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (eds.) **Biotechnonology and Plant Genetic Resources**. Cab International p 119-161. 1997.

ENGELS, J. M. M.; ENGELMANN, F. Botanic gardens and agricultural genebanks: building on complementary strengths for more effective global conservation

of plant genetic resources. Annals. Fifth international botanic gardens conservation congress, Kirst- Enbosch, South Africa, p.14-18. 1998.

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

FUJIKAWA, S., & JITSUYAMA, Y. Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification. In: **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. Proceedings of an international workshop, Tsukuba, Japan, October, 1998**. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 2000. p. 36-42.

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

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

HUANG, CN, WANG, JH, YAN, QS, ZHANG, XQ, & YAN, QF. Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 11, pág. 730-734, 1995.

JIMÉNEZ, V.M. et al. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.86, p. 389–395, 2006.

MCCLURE, F.A. & Smith, L.B., Flora Ilustrada Catarinense: Gramíneas, Bambúseas: 1-78, 1967. **Obra Original** Clark, L.G., Brittonia, 44(4): 387-422, 1992.

MENEZES, T. P. et al. Micropropagação e endoreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* HAW. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 868-876, 2012.

MOUKADIRI, O.; O'CONNOR, JE; CORNEJO, MJ. Effects of the cryopreservation procedures on recovered rice cell populations. **CryoLetters**, v. 23, n. 1, pág. 11-20, 2002.

NISHIZAWA, S. et al. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 67-73, 1993.

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

NOGUEIRA, J. S. Estratégias para a conservação ex situ de *Dendrocalamus asper* e micropropagação de espécies do gênero *Guadua* (Bambusoideae, Poaceae). 2018.

ORTHEY, A. L. Uso do bambu industrializado no Brasil e sua aplicação no design de móveis: estudo de caso da empresa Oré Brasil. p, 28-35. 2015.

ORNELLAS, T.S. Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. 2017.

ORNELLAS, T. S. et al. Micropropagação de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 2019.

PASQUALINI, A. P. D. A., SCHNEIDER, G. X., FRAGA, H. P. D. F., BIASI, L. A., & QUOIRIN, M. (2019). *In vitro* establishment of *Bambusa oldhamii* Munro from field-grown matrices and molecular identification of endophytic bacteria. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 49.

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

SANTI, T. O potencial do bambu: desafios e oportunidades da fibra na produção de celulose e papel e as novas pesquisas sobre seu uso para fins energéticos e geração de biomateriais. **Revista de tecnologia em celulose e papel. Ano lxxvi nº**, v. 4, 2015.

SANTOS AS, et al. The application of peach palm fibers as an alternative to fiber reinforced polyester composites. **J Reinf Plast Comp** 27:1805-1816. 2008.

SCHMIDT, R. A tribo Bambuseae Nees (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. 2008.

SCHMIDT, R; LONGHI-WAGNER, Hilda Maria. A tribo Bambuseae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 1, 2009.

SINGH, S. R. et al. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex k. Heyne): an exotic edible bamboo. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 188 Vl. 21, n. 2, p. 220–228, 2012.

SINGH, S. R. et al. 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.

THAPLIYAL, M., JOSHI, G., BEHERA, F. Bamboo: Flowering, seed germination and storage. **KAUSHIK, S.; SINGH, YP; KUMAR, D.; THAPLIYAL, M**, p. 89-108, 2015.

WANG, JH, JG; Ge, F. LIU e C.N HUANG. Ultrastructural changes during cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells by vitrification **CryoCartas** 19: 49-54.1998.

CAPÍTULO II:  
CONSERVAÇÃO *EX SITU*

## 5. Conservação *ex situ* de sementes de *Chusquea Mimosa* (Bambusoideae; Poaceae) em baixas temperaturas e criopreservação.

### 5.1 Resumo

*Chusquea mimosa* é um bambu nativo e de ocorrência endêmica no Brasil, com distribuição preferencial nas regiões Sudeste e Sul do país. Popularmente conhecido como caraá, cará-mimoso, cará-de-vara e carajá, essa espécie se encontra na Mata Atlântica, correspondendo ao grupo dos bambus lignificados de clima tropical. Essa espécie se destaca pelo potencial de usos, que vão desde alimentação, agricultura, artesanatos, indústria civil e moveleira, além dos serviços ecossistêmicos prestados à natureza, que agregam valor econômico e contribuem para a expansão da cadeia produtiva no Sul do Brasil. Contudo, a cadeia produtiva tem um gargalo, a reprodução sexuada, que depende produção de sementes, sendo que o ciclo reprodutivo ainda é pouco conhecido. Ferramentas biotecnológicas podem ser úteis para a caracterização e o uso sustentável de bambus, principalmente quando se considera que as espécies desse grupo raramente produzem sementes. O presente trabalho teve como objetivo a conservação *ex situ* de sementes do *Chusquea mimosa*. As sementes foram submetidas à uma curva de desidratação, revelando que 72 h de desidratação resultou em teores 16,3% de umidade, mantendo a sua viabilidade. Testou-se tempos de imersão no crioprotetor PVS3, onde o tempo de 60 minutos resultou em 80% de regeneração *in vitro*, após a criopreservação. Foi avaliada a germinação nas sementes conservadas nas temperaturas (-196, -20, 6 e 25 °C), por 6 meses, em períodos de 2 meses. O descongelamento das amostras submetidas as temperaturas de (-196 e -20 °C) foi feito a 40° C por 2 minutos. A criopreservação demonstrou maior potencial de conservação com cerca de 50% de taxa de germinação, já os tratamentos conservados em 6 °C, 25 °C e -20 °C apresentaram 30,3 %, 10 % e 6,6 %, respectivamente.

**Palavras-chave:** Conservação de sementes, *Chusquea mimosa*, criopreservação, baixas temperaturas, regeneração *in vitro*.

## 5.2 Introdução

Os bambus pertencem a família Poaceae, subfamília Bambusoideae, e são subdivididos entre três tribos: Bambuseae, Arundinarieae e Olyrae. O bambu *Chusquea mimosa* McClure & L.B. Sm (tribo Bambuseae), popularmente conhecido como caraá, caraá-mimoso, caraá-de-vara e carajá, engloba os bambus lignificados de clima tropical, e no sul do Brasil, se distribui pelo bioma mata atlântica (CLARK et al., 2022). Assim como espécies pertencentes ao gênero *Chusquea*, diversas outras espécies de bambus correm riscos de devido ao extrativismo, perda de habitat natural e manejo inadequado da cultura extinção (MMA, 2014).

As touceiras de *C. mimosa* apresentam colmos de cerca de 1,6 metros de altura, e 1 a 3 cm de diâmetro (SCHMIDT, 2009). Os bambus apresentam expressivo potencial econômico, sendo importantes para a estabilidade dos ecossistemas os quais ocorrem (LIN, 2012). De forma geral, apresentam usos múltiplos, com destaque para construção civil onde é conhecido como o aço vegetal (CARBONARI et al., 2017). Na indústria moveleira e design é um dos nichos onde o bambu tem grande espaço, justamente pela sustentabilidade que vem embutida ao seu uso na fabricação das peças (ORTHEY, 2015). Além de outras áreas como na alimentação com a produção de biomassa e outros produtos alimentícios, no paisagismo e artesanatos (FILGUEIRAS & GONÇALVES, 2006; SANTI, 2015).

O principal gargalo nessa cadeia com grande potencial é a propagação, pois o ciclo reprodutivo baseado na produção de sementes é longo e imprevisível para cada espécie de bambu (THAPLIYAL, 2015), podendo ocorrer de forma gregária e monocárpica ou esporádica (SINGH et al., 2013), com intervalos variáveis de 20 a 120 anos (JANZEN, 1976; AZZINI, 1982). Além disso, a viabilidade das sementes é, de forma geral, curta e variável para espécie.

A conservação *ex situ* é uma técnica na qual plantas são conservadas fora do seu habitat natural, possibilitando a coleta e manutenção da diversidade genética, testando diversas estratégias, para avaliar o potencial de variação, seleção e até hibridização de indivíduos e populações desejáveis, e é uma opção de utilização principalmente para as espécies que apresentam longos ciclos de florescimento e dificuldades de propagação (ENGELS & ELGELMANN, 1998; ELGELMANN, 2011).

Dentre essas técnicas, a conservação de sementes em baixas temperaturas, entre elas a criopreservação, tem demonstrado bons resultados, com taxas de regeneração de

cerca de 56% em *Dendrocalamus asper* (AHMAD, 2021). Torna-se assim possível aliar essa técnica com a cultura de tecidos para possibilitar a regeneração de plantas completas em larga escala (SINGH et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes temperaturas na conservação *ex situ* de sementes de *Chusquea mimosa*.

### 5.3 Material e métodos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), no Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), seguidas das etapas de seleção de plantas matrizes e coleta de material vegetal. Os testes de viabilidade foram adaptados do Manual de Regras para Análises de Sementes (RAS).

As sementes foram provenientes de touceiras de *C. mimosa* localizadas na região da Serra do Rio do Rastro, município de Lauro Muller – SC, onde foi observada a ocorrência de floração gregária em 2019, 2020 e 2021. As plantas matrizes estão localizadas em ambiente de floresta, expostas às condições climáticas da região (Figura 1). Para a realização de todos os experimentos foram separadas as sementes íntegras das não íntegras (figura 2 B).



Fonte: Acervo pessoal

**Figura 1.** Touceiras de *Chusquea mimosa* McClure & L. B. Sm na Serra do Rio do Rastro, SC – Coordenadas Geográficas: 27°59'32.33" S e 49°34'55.90" O (WGS 84); (A e B) Touceiras a campo; (C) destaques de colmos; (D e E) sinflorescências; e (F) ramificação avermelhada.



**Figura 2.** Sementes de *Chusquea mimosa* McClure & L. B. Sm. A: Diferentes padrões de sementes encontradas em uma mesma população localizada na Serra do Rio do Rastro, SC. B: semente íntegra e semente não íntegra, após a extração da pálea e lema. Barra A: 2mm; B: 0,5mm.

**5.3.1 Curva de desidratação:** A desidratação das sementes de *C. mimososa* foi realizada com base na metodologia aplicada por Nogueira, (2018), utilizando sílica gel. As sementes foram acondicionadas em microtubos de 2 µL, e então acomodadas dentro de uma placa de Petri contendo sílica gel.

As sementes foram submetidas a tratamentos de 0, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 96 horas em sala com temperatura controlada de  $\pm 25^\circ\text{C}$ . Ao final de cada período, as sementes foram pesadas para a determinação da umidade, que foi verificada pela equação:

$$\%deumidade(U) = \frac{100(P - p)}{P - t}$$

Onde:

P = peso inicial da semente;

p = peso final da semente nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 96 horas;

t = tara, peso do recipiente.

Após a pesagem, as sementes foram desinfestadas, iniciando com a lavagem em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar (CFL), foram acondicionadas em uma seringa estéril e então imersas em solução de biocida Kasumin<sup>®</sup> (2 mL L<sup>-1</sup>) e Tween<sup>®</sup> 20 (1 gota/100 ml de solução) por 20 minutos, álcool 70° GL por 1 minuto, e então imersas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) acrescido de Tween<sup>®</sup> 20 (1 gota/100 ml de solução) por 15 minutos. Em seguida, foi realizada tríplex lavagem com água deionizada autoclavada e as sementes transferidas para um papel absorvente estéril para a retirada do excesso de água. Para finalizar, foram inoculadas em tubos de ensaio (25 mm X 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi o MS/2 (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951), sacarose à 1,5% (p/v), e gelificado pela adição de Phytigel<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi aferido para 5,8 e a esterilização foi realizada em autoclave à 121° C, 1,1 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas por sete dias em ausência de luz e após esse período transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h.

O parâmetro avaliado após a introdução foi a taxa de germinação de cada tratamento de tempo de desidratação, e foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram a emissão da radícula ou coleóptilo.

**5.3.2 Conservação das sementes:** A conservação *ex situ* foi realizada em quatro condições diferentes de temperatura, sendo as seguintes: sala de crescimento ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), refrigerador ( $6^{\circ}\text{C}$ ), freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Todas as sementes utilizadas foram desidratadas de acordo com os resultados da curva de desidratação, realizada previamente.

A conservação das sementes de *C. mimosa* teve delineamento inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos, cada tratamento contou com 12 repetições de 30 sementes separadas em triplicatas de 10 repetições e 30 sub-repetições para o armazenamento, totalizando 360 sementes por tratamento e 1080 sementes ao todo. As sementes permaneceram armazenadas em microtubos estéreis, sob  $-20$ ,  $6$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ , e na criopreservação, as sementes foram acondicionadas em criotubos estéreis que foram presos à canisters, e em seguida imersos em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . O descongelamento das amostras submetidas as temperaturas de ( $-196$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ ) foi realizado em água na temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. Todos os tratamentos foram submetidos a estas diferentes condições de armazenamento, com avaliações periódicas aos 0, 2, 4 e 6 meses.

**5.3.3 Solução crioprotetora PVS3:** Na criopreservação, além da desidratação em sílica gel, foi realizada uma curva de regressão de tempos em imersão no crioprotetor PVS3 (50% Glicerol 2M, 50% sacarose 0,4M), sendo esses: 0, 30, 60, 120 e 180 minutos, uma testemunha sem adição de PVS3 e um controle sem adição de PVS3 e sem criopreservação utilizando-se como referência o protocolo adaptado de Heringer et al., (2013). Após o armazenamento por 24 h, todos os tratamentos foram submetidos ao teste de germinação *in vitro*.

A desinfestação foi realizada com adaptações nos protocolos já definidos (ORNELLAS, 2017; ORNELLAS et al., 2019). E assim como o meio de cultura utilizado na inoculação, foram realizados de acordo com o descrito no tópico 5.3.1 do texto. O descongelamento das amostras foi realizado em água na temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos.

O parâmetro avaliado foi a taxa de germinação de cada tratamento, onde foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram a emissão da radícula ou coleóptilo. As sementes foram observadas a cada dois dias após a inoculação, e a

avaliação se iniciou após o início da germinação com o objetivo de verificar a viabilidade das sementes, obtendo a taxa de germinação.

**5.3.4 Análises estatísticas:** Os dados binários de germinação e contaminação foram avaliados inicialmente com a verificação dos pressupostos da análise de variância por meio do teste Shapiro-Wilk, para normalidade dos resíduos, e teste Bartlett para homogeneidade das variâncias. Em seguida foi realizada a análise de variância e o teste de separação de médias por Duncan à 5%.

Na análise de regressão da curva de tempos de PVS3 foram realizadas verificações dos pressupostos, de acordo com as outras análises, com aplicação do teste Shapiro-Wilk para normalidade dos resíduos e teste Bartlett para homoscedasticidade. Nesta análise foram utilizadas 5 sub repetições por repetição, totalizando 4 repetições por tratamento.

## 5.4 Resultados e discussão

**5.4.1 Curva de desidratação:** Na análise da perda de umidade, para definir a tolerância das sementes, aquelas que foram desidratadas por 72 horas em sílica gel, apresentaram 16,3% de umidade, e demonstraram melhor percentual regenerativo *in vitro*, do que as sementes desidratadas por 0, 6, 12, 24, 48 e 96 horas (Figura 3).

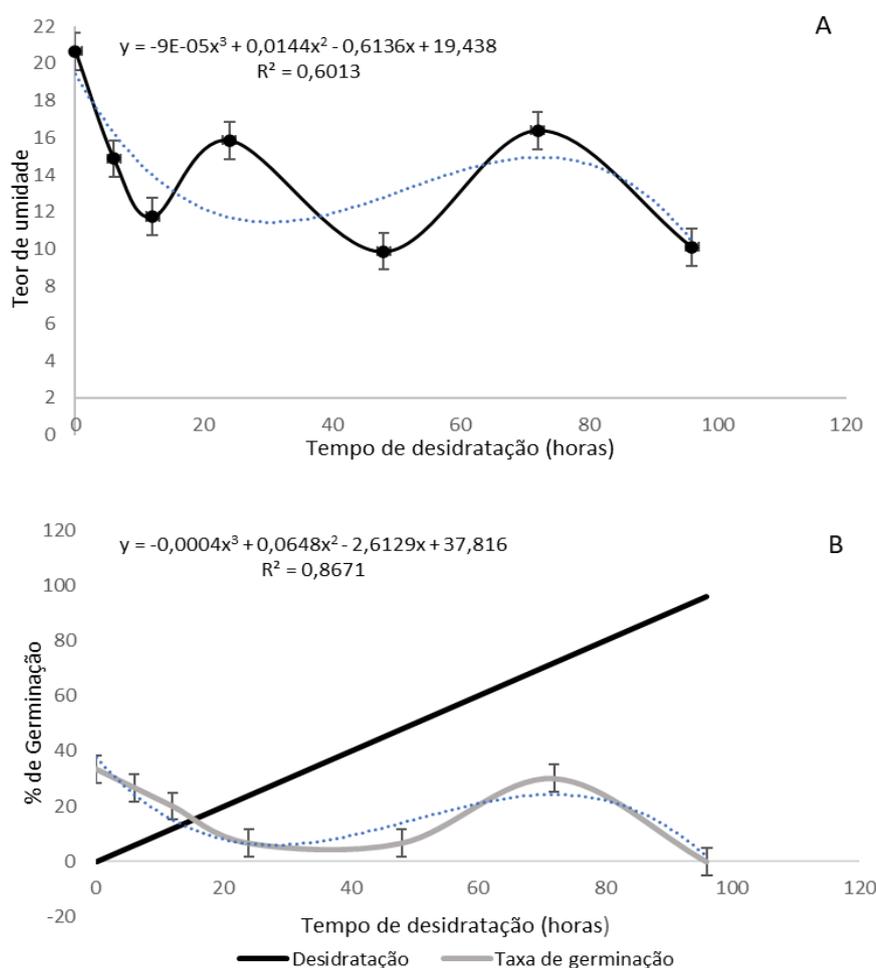
A utilização da sílica gel se mostrou benéfica, apresentando uma redução de 4,3% na umidade, que inicialmente era de 20,6%, e resultando em taxa de 30% de germinação, valor aproximado do obtido no tratamento testemunha. Esses valores são similares aos reportados em outros trabalhos, entre eles o de Nogueira, (2018), com sementes de *Dendrocalamus asper*, onde a perda de umidade foi de 5,6% e as sementes sendo conservadas na faixa de 13 a 15% de umidade.

Durante o armazenamento de sementes de *Bambusa tulda* observou-se que sementes com umidade de 10,2% e 6,6% apresentaram 57% e 70% de germinação, respectivamente, depois de um período de 12 meses. Por outro lado, quando as sementes do *B. tulda* foram armazenadas com umidade superior a 14%, Thapliyal et al., (1991), observaram reduções drásticas da germinação e até mesmo degradação das sementes, fato este que não ocorreu no presente trabalho.

Foi possível observar em outros trabalhos com bambu que a redução de 1% de umidade aumentou mais a viabilidade das sementes do que a redução de 1°C na temperatura de armazenamento (RAWAT E THAPLIYAL, 2003). De fato,

independentemente do método utilizado nos diferentes trabalhos, consegue-se constatar a importância no estabelecimento de um ponto ótimo de desidratação para aliar as técnicas de resfriamento para a conservação de sementes de bambus.

O efeito da temperatura de armazenamento das sementes no aumento da longevidade foi entendido mais claramente quando sua relação foi quantificada. É evidente pelas curvas de sobrevivência do estudo, que quanto mais raso o gradiente, maior foi a variação entre as sementes no período de viabilidade, onde em temperaturas mais altas o gradiente foi mais acentuado, resultando na rápida deterioração das sementes, aspecto esse anteriormente mencionado por RAWAT e THAPLIYAL (2003).



**Figura 3** - Teor de umidade (A) e porcentagem de germinação (B) de sementes de *Chusquea mimosa* em função da desidratação por sílica gel por até 96 horas.

**5.4.2 Conservação *ex situ*:** Sementes submetidas à solução PVS3 por 60 minutos apresentaram 80% taxa de regeneração *in vitro* após a criopreservação (Figura 5). Por sua vez, o tratamento por 30 minutos resultou em taxa de germinação de 45% e os tratamentos de 120 e 180 minutos resultaram em taxa de germinação de 60%. A testemunha sem o uso de crioprotetores resultou em 35 % de germinação.

As sementes de *C. mimosa* apresentaram diferenças na porcentagem de germinação após os dois primeiros meses de conservação. O tratamento de 24 horas de criopreservação das sementes e a testemunha apresentaram o mesmo percentual de germinação, que foi de 66%. Após dois meses apesar da redução na taxa de germinação em todos os tratamentos de temperatura, a criopreservação demonstrou resultados superiores aos demais tratamentos, apresentando 33% de germinação, seguido das sementes que foram armazenadas na geladeira e sala de crescimento com temperatura controlada, e freezer, com 20% de germinação.

Aos quatro meses de conservação observou-se redução na taxa de germinação das sementes armazenadas em sala de crescimento, geladeira e freezer, enquanto, nas sementes criopreservadas houve um aumento na porcentagem de germinação, com cerca de 50% sementes germinadas, valor que se aproximou ao observado após a conservação por 24 h em NL. As sementes que foram armazenadas na geladeira, sala de crescimento e freezer, apresentaram respectivamente 33,3%, 13,3% e 10% de germinação.

A última análise foi realizada após seis meses e manteve a tendência da avaliação anterior, onde as sementes criopreservadas mostraram percentual de germinação superior aos demais tratamentos, mantendo os 50% de germinação, e as sementes que foram armazenadas na geladeira, sala de crescimento e freezer, apresentaram respectivamente 30,3%, 10% e 6,6% de germinação.

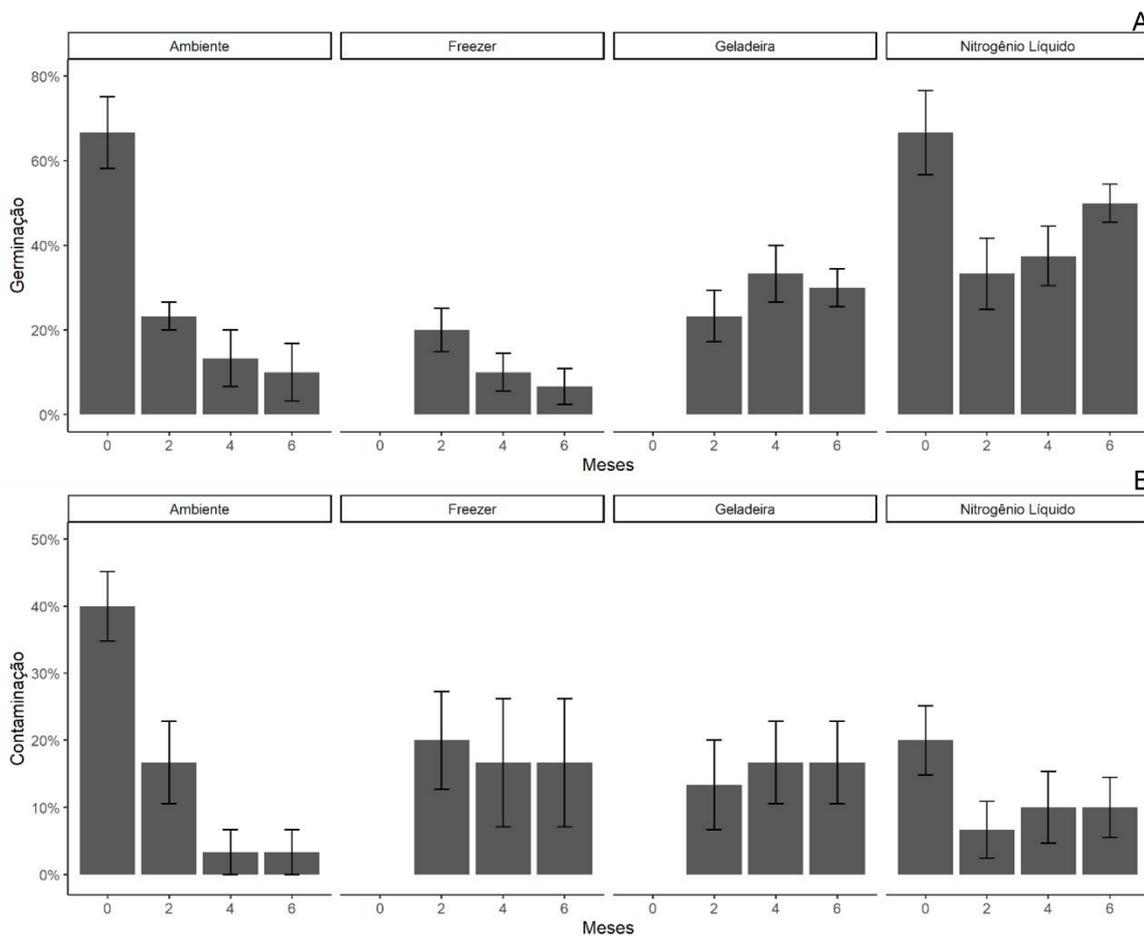
As sementes criopreservadas também apresentaram melhores características morfológicas durante o desenvolvimento *in vitro* do que os demais tratamentos que foram submetidos as baixas temperaturas. Apenas as sementes conservadas em temperatura de sala de crescimento (~25°C) apresentaram desenvolvimento aproximado ao da criopreservação (Figura 6).

As sementes são a forma mais comum de conservação *ex situ*, por serem a unidade de propagação natural das espécies de plantas superiores. O fato é que nem todas as plantas produzem sementes ortodoxas, que são àquelas com capacidade de desidratação até 5% para a conservação em temperaturas ultrabaixas, fator que acaba limitando a longevidade das sementes ao longo de gerações (SANTOS, 2000). No

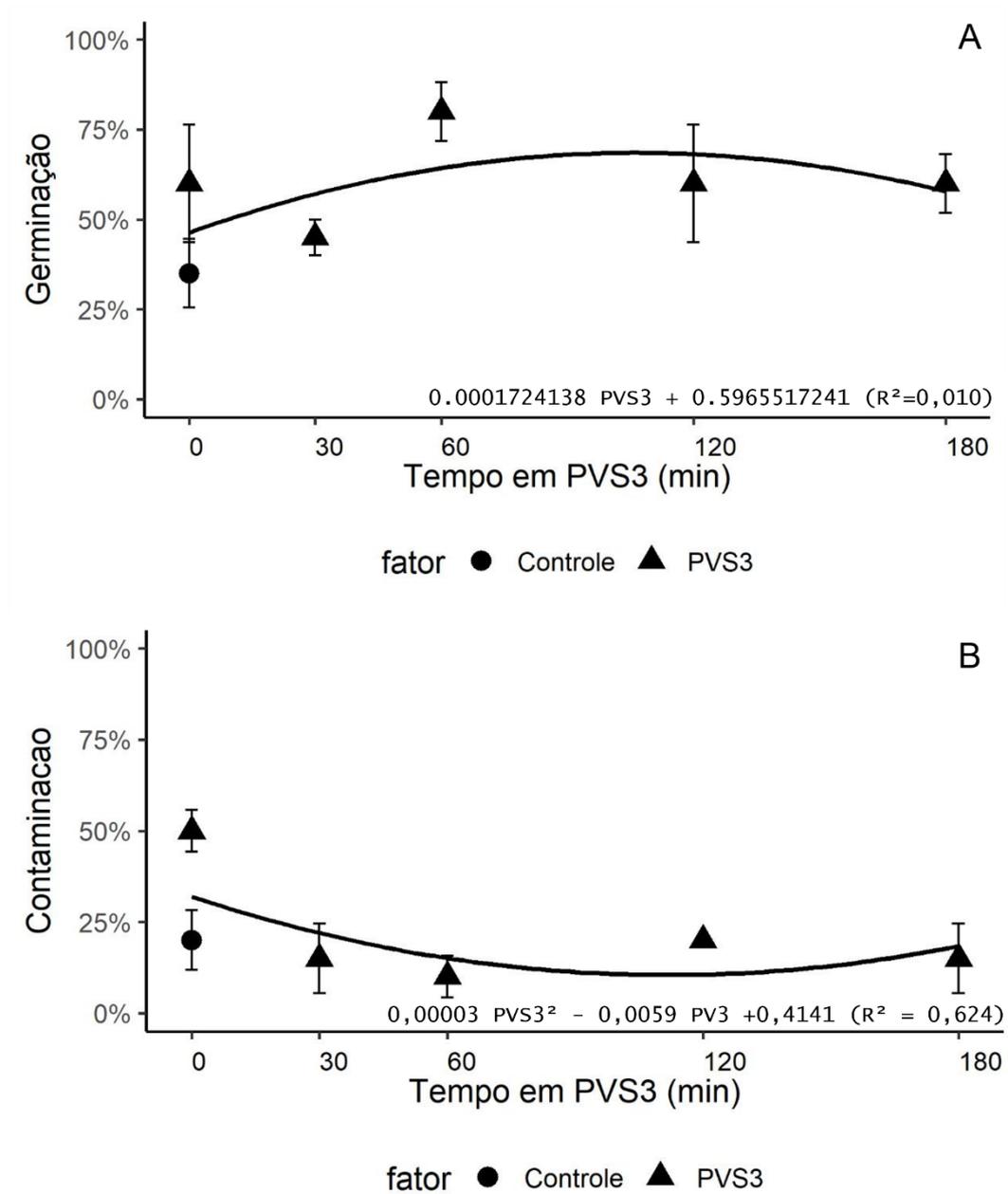
presente trabalho confirmou-se essa premissa, uma vez que as sementes desta espécie demonstraram viabilidade expressiva em resposta à desidratação e criopreservação.

Na conservação de *Arundinaria alpina*, em temperaturas de aproximadamente 22° C por um ano, observou-se uma diminuição de 43% na taxa de germinação (Bahru et al., 2015). Esses dados são coerentes com aqueles obtidos no presente trabalho onde em condições de temperatura de aproximadamente 25° C, obteve-se cerca de 56% de diminuição na taxa de germinação após 6 meses de avaliação.

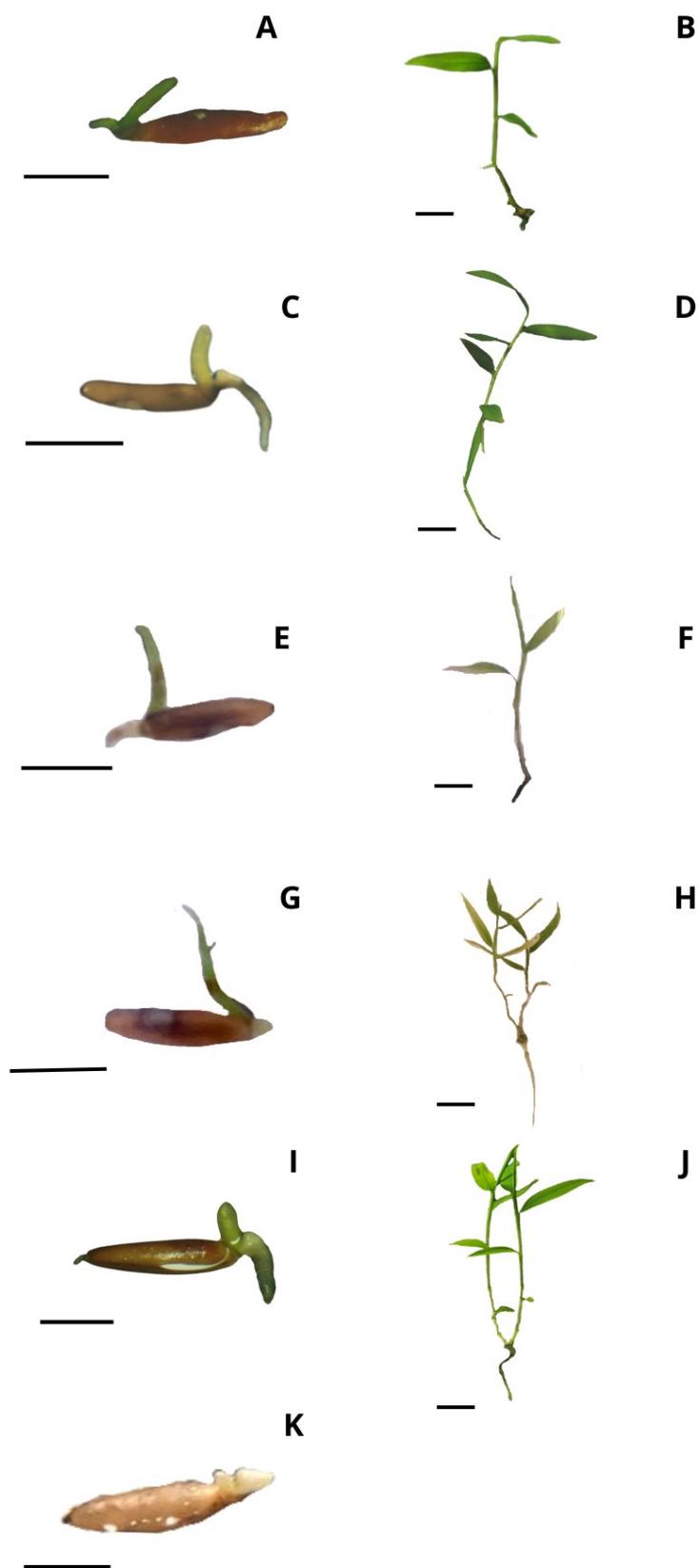
No presente trabalho observou-se oscilações e diminuição na taxa de germinação das sementes ao longo do tempo nos tratamentos em temperatura ambiente, refrigeração a 6°C e congelamento a -20°C, principalmente após o primeiro ano de conservação, enquanto as sementes criopreservadas apresentaram uma taxa de germinação constante ao longo dos dois anos de experimento (NOGUEIRA, 2018). Algumas dessas oscilações também foram observadas no presente trabalho, e de acordo com estudos de diversidade genética, essa heterogeneidade nos lotes poderia ser explicada devido a variabilidade genética das sementes dentro de uma mesma população (SILVA, 2019). Esses diferentes níveis de diversidade podem variar de acordo com o tamanho populacional e o fluxo gênico entre os indivíduos (LOWE et al., 2005 e VRANCKX et al., 2014), e quando se consideram as populações de bambus, essa variação pode ser ainda mais expressiva devido aos eventos esporádicos de florescimento (SILVEIRA, 2001).



**Figura 4** - Percentual de germinação (A) e contaminação (B) *in vitro* em sementes de *Chusquea mimosa*, após conservação em diferentes temperaturas de armazenamento ao longo de seis meses. Pontos: (1) Tempo 0, após a coleta; (2) Após 2 meses; (3) Após 4 meses; e (4) após 6 meses de conservação.



**Figura 5** - Percentual de germinação (A) e contaminação (B) *in vitro* de sementes de *Chusquea mimosa*, submetidas a diferentes tempos de imersão no crioprotetor PVS3.



**Figura 6** - Germinação de sementes de *Chusquea mimososa* McClure & L. B. Sm. (A) e Colmo desenvolvido *in vitro* (B) após a coleta a campo; Germinação da semente (C) e

Colmo desenvolvido *in vitro* (D) após 6 meses de conservação em sala de crescimento a aproximadamente 25° C; Germinação da semente (E) e Colmo desenvolvido *in vitro* (F) após 6 meses de conservação em geladeira a 6° C; Germinação da semente (G) e Colmos desenvolvidos *in vitro* (H) após 6 meses de conservação em freezer a -20° C; Germinação da semente (I) e Colmos desenvolvidos *in vitro* (J) após 6 meses de criopreservação em NL a - 196° C; e semente oxidada após introdução *in vitro* (K). Barras: A, C, E, G, I, K: 2 mm; B, D, F, H, J: 5 mm.

### 5.5 Conclusão

Sementes de *C. mimosa* toleram a desidratação em sílica gel por 72 horas, mantendo a taxa de germinação das sementes em no mínimo 30%.

Também possível concluir, apesar da ausência de estudos com bambus, em específico com *C. mimosa*, que o comportamento das sementes desta espécie se mostrou mais semelhante ao ortodoxo, permitindo a desidratação e conservação em NL, com subsequente regeneração de plantas *in vitro*, por pelo menos 6 meses após a criopreservação.

Sementes de *C. mimosa* tratadas com a solução crioprotetora PVS3 por 60 min apresentaram taxa de 60% de germinação *in vitro* após serem submetidas à criopreservação por 24 horas.

Sementes de *C. mimosa* apresentaram 50% de germinação *in vitro*, após seis meses em criopreservação. Sementes mantidas em geladeira, sala de crescimento e freezer apresentaram 30,3, 10,0% e 6,6%, respectivamente de taxa de germinação *in vitro* após esse período.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z; DING, Y; SHAHZAD, A. **Biotechnological Advances in Bamboo**. Springer Singapore, cap 12. 2021.

ATAIDE, G.M. et al. Alterations in seed reserves of *Dalbergia nifgra* ((Vell.) Fr All. Ex Benth) during hydration. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 1, p. 56-63, 2013.

AZZINI, A; ARANHA, C; PIO, R. M. Florescimento e frutificação em bambu. **Bragantia**, v. 41, n. 18, p. 175-180, 1982.

BAHRU, T; MULATU, Y; KIDANE, B. Germination ecology of *Arundinaria alpina* (K. Schum.) and *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich.) Munro seeds: indigenous bamboo species in Ethiopia. **International Journal of Biodiversity**. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 399p. 2009.

CARBONARI, G. et al. Bambu–O aço vegetal. **Mix Sustentável**, v. 3, n. 1, p. 17-25, 2017.

CLARK, L.G. et al. *Chusquea in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB13106>>. Acesso: abr. 2022

ENGELMANN F. *In vitro* conservation methods. In: Callow JA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (eds.) **Biotechnology and Plant Genetic Resources. Cab International** p 119-161, 1997.

ENGELS, J. M. M.; ENGELMANN, F. Botanic gardens and agricultural genebanks: building on complementary strengths for more effective global conservation of plant genetic resources. **Annals. Fifth international botanic gardens conservation congress, Kirst-Enbosch, South Africa**, p.14-18. 1998.

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

GOOGLE, 2022. Porto. [s.l.]: Google Maps. <<https://www.google.com.br/maps/place/28%C2%B023'36.0%22S+49%C2%B031'23.0%22W/@28.4081538,49.597603,16z/data=!4m5!3m4!1s0x0:0xbe529b255790eb1d!8m2!3d-z28.3933333!4d49.5230556>>.

HERINGER, A. S. et al. Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. **Protoplasma**, v. 250, n. 5, p. 1185-1193, 2013.

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

LIN, X; HUANG, L; FANG, W. Bamboo regeneration via embryogenesis and organogenesis. In: **Embryogenesis**. In Tech, 2012.

LOWE, A. J. et al. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, n. 95, p. 255–273, 2005.

MCCLURE, F.A. & Smith, L.B., Flora Ilustrada Catarinense: Gramíneas, Bambúseas: 1-78, 1967. **Obra Original** Clark, L.G., Brittonia, 44(4): 387-422, 1992.

Ministério do Meio Ambiente – MMA. Portaria n. 443, de 17 de dezembro de 2014. Diário Oficial da União, 18/12/2014, Seção 1, p. 110-121, 2014.

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

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

NISHIZAWA, S. et al. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 67-73, 1993.

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

NOGUEIRA, J. S. Estratégias para a conservação ex situ de *Dendrocalamus asper* e micropropagação de espécies do gênero *Guadua* (Bambusoideae, Poaceae). Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2018.

O'BRIEN, T.P; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

ORTHEY, A. L. Uso do bambu industrializado no Brasil e sua aplicação no design de móveis: estudo de caso da empresa Oré Brasil. p, 28-35. 2015.

ORNELLAS, T. S. Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2017.

ORNELLAS, T. S. et al. Micropropagação de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 2019.

RAWAT, M. M. S. THAPLIYAL, R. C. Storage behaviour of bamboo (*Dendrocalamus membranaceus*) seeds. **Seed science and technology**, v. 31, n. 2, p. 397-403, 2003.

SANTI, T. O potencial do bambu: desafios e oportunidades da fibra na produção de celulose e papel e as novas pesquisas sobre seu uso para fins energéticos e geração de biomateriais. **Revista de tecnologia em celulose e papel**. Ano lxxvi nº, v. 4, 2015.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, (Edição Especial), p.70- 84, 2000.

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.

SILVA, S. M. M. Diversidade genética e estrutura populacional de duas espécies de bambu do gênero *Guadua* na região sul-ocidental da Amazônia. **Embrapa Acre-Tese/dissertação (ALICE)**, 2019.

SILVEIRA, M. A floresta aberta com bambu no sudoeste da amazônia: padrões e processos em múltiplas escalas. 2001. 127f. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2001.

SINGH, S. R. et al. 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.

THAPLIYAL, M., JOSHI, G., BEHERA, F. Bamboo: Flowering, seed germination and storage. **KAUSHIK, S.; SINGH, YP; KUMAR, D. THAPLIYAL, M**, p. 89-108, 2015.

VRANCKX, G. et al, O. Tree density and population size affect pollen flow and mating patterns in small fragmented forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). **Forest Ecology and Management**, n. 328, p. 254–261, 2014.

CAPÍTULO III:  
MICROPROPAGAÇÃO

## 7. Micropropagação de *Chusquea mimosa*

### 7.1 Resumo

*Chusquea mimosa*, é um bambu nativo lignificado e de ocorrência endêmica no bioma Mata Atlântica do Brasil, mais especificamente nas formações florestais ciliares dos ecossistemas Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Mista. Bambus normalmente apresentam longos intervalos de tempo para a floração e a produção de sementes, podendo levar mais de 100 anos dependendo da espécie. Assim, sua propagação convencional é preferencialmente assexuada e os métodos empregados são pouco eficientes, demorados e caros. Técnicas de cultura de tecidos vegetais permitem a micropropagação em larga escala de mudas uniformes e livres de pragas e doenças. O presente trabalho objetivou desenvolver um protocolo de micropropagação de *C. mimosa* a partir de explantes obtidos de plântulas germinadas *in vitro*. Numa primeira etapa foi realizado um experimento retirando a pálea e a lema das sementes, constatando-se que a retirada dessas estruturas aumentou em 40% a taxa de germinação em relação às que tiveram todas as estruturas mantidas, além de contribuir na redução de 20% da taxa de contaminação nas fases de introdução e estabelecimento das culturas. Na etapa de multiplicação foram testadas diferentes concentrações das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e Metatopolina (mT) e a concentração de 20  $\mu\text{M}$  de mT resultou na maior taxa regenerativa, do que a testemunha em 30 dias de cultivo. De forma geral o uso das citocininas aumentaram a taxa de multiplicação de brotos de *C. mimosa* em todos os tratamentos, quando comparado à testemunha, sem uso de fitorreguladores. Conclui-se que o presente trabalho possibilitou a realização da introdução e multiplicação *in vitro* de *C. mimosa* utilizando citocinas como aliadas no aumento da taxa de multiplicação de colmos.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, micropropagação, fitorreguladores, organogênese.

## 7.2 Introdução

O bambu *Chusquea mimosa* (tribo Bambuseae), é uma espécie nativa e endêmica do Brasil, popularmente conhecido como caraá, cará-mimoso, cará-de-vara e carajá. Essa espécie engloba os bambus lignificados de clima tropical, no sul do Brasil se encontra na mata atlântica em formações florestais ciliares ou de Galeria, da Floresta Estacional Semidecidual, e da Floresta Ombrófila Mista (CLARK et al., 2022), e apresenta distribuição na região sudeste e sul (SCHMIDT, 2008).

As touceiras de *C. mimosa* podem ter colmos sólidos que chegam a 1,6 metros de altura, e 1 a 3 cm de diâmetro (SCHMIDT, 2009). Os bambus têm reconhecida importância econômica, social e ambiental. Contudo, a disponibilidade de colmos de *C. mimosa* é cada vez mais reduzida em consequência do constante desmatamento, degradação do meio ambiente, expansão das fronteiras agrícolas e às dificuldades e limitações legais para a sua exploração em ecossistemas naturais.

Os bambus apresentam o potencial de usos muito variados, com destaque para construção civil onde é conhecido como o “aço vegetal”, demonstrando em testes de resistência à tração e compressão pela densidade, pode ser mais eficiente que concreto (CARBONARI et al., 2017). Na indústria moveleira e design é um dos nichos onde o bambu tem grande espaço, justamente pela sustentabilidade que vem embutida ao seu uso na fabricação das peças (ORTHEY, 2015). Além de outras áreas como na alimentação com a produção de biomassa e outros produtos alimentícios, no paisagismo e artesanatos, entre outros (FILGUEIRAS & GONÇALVES, 2006; SANTI, 2015).

Apesar de todos os benefícios e multifuncionalidades do bambu, um dos gargalos que a cultura apresenta é relacionado aos métodos convencionais de propagação vegetativa, sendo esses por: divisão de touceiras, divisão do rizoma, segmentação de colmos ou por meio de sementes. E as principais dificuldades relacionadas a estes fatores são a falta de uniformidade e logística devido ao volume e peso do material vegetal (GIELIS et al., 2001), e no caso das sementes, a disponibilidade devido ao ciclo de reprodução imprevisível, tornando a ocorrência do florescimento, logo, produção de sementes, variável dentro de cada espécie (THAPLIYAL, 2015).

Decorrente das limitações da propagação convencional de bambus, destacam-se as ferramentas biotecnológicas associadas à micropropagação, o que possibilita a produção de genótipos de elite, uniformes, com garantias fitossanitárias e em grande

escala para diferentes espécies (GUERRA et al., 1999; JIMÉNEZ et al., 2006; RAMANAYAKE et al., 2006; ORNELLAS, 2017; ORNELLAS et al., 2019).

Um protocolo padrão de micropropagação de bambus ocorre em cinco principais estágios: 1) Seleção de plantas matrizes e explantes; 2) Introdução e estabelecimento *in vitro*; 3) Multiplicação de touceiras; 4) Enraizamento e; 5) Aclimatização (NOGUEIRA et al., 2017).

A introdução *in vitro* é caracterizada pela desinfestação e inoculação do material vegetal até o seu estabelecimento em condições assépticas. A etapa de multiplicação é feita em meios de cultura suplementados com fontes de carbono, vitaminas, fitorreguladores e agente geleificante, buscando disponibilizar as condições adequadas à proliferação dos brotos. O enraizamento é uma etapa não obrigatória, pois muitas espécies apresentam o desenvolvimento de raízes desde a multiplicação, sem necessidade de uma etapa exclusiva para a indução do sistema radicular (ARYA et al. (2012).

Fitorreguladores tais como o 6-benzilaminopurina (BAP) e a Metatopolina (mT) são amplamente utilizados para a micropropagação de bambus para o aumento da taxa de multiplicação de colmos (ARYA et al., 1999; SINGH et al., 2012). Estas citocininas têm o potencial de estimular brotações laterais nas touceiras de bambus *in vitro* (MUDOI, 2013; SANDHU 2018 e JIMÉNEZ, 2007).

O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo de micropropagação para *C. mimosa*, utilizando explantes originados de sementes germinadas *in vitro*.

### 7.3 Material e métodos

**7.3.1 Introdução *in vitro* de sementes:** A introdução *in vitro* do *C. mimosa* foi se deu por meio de sementes, sendo realizado teste de germinação para verificação da influência da pálea e a lema no processo de emergência das sementes. O experimento teve delineamento inteiramente casualizado, com 2 tratamentos, sendo: sementes íntegras e sementes com a pálea e a lema removidas manualmente. Cada tratamento teve 40 repetições, e 5 sub repetições, onde cada repetição foi representada por um tubo de ensaio com uma semente, e cada sub repetição foi composta por 8 tubos com uma semente.

A desinfestação das sementes foi realizada com base nos protocolos já definidos por (ORNELLAS, 2017; ORNELLAS et al., 2019) com *D. asper* e *G. chacoensis*, iniciando com limpeza das sementes em água corrente por 5 minutos. Posteriormente,

em câmara de fluxo laminar (CFL) as sementes foram imersas em solução de biocida Kasumin<sup>®</sup> (2 mL L<sup>-1</sup>) e Tween<sup>®</sup> 20 (1 gota/100 ml de solução) por 20 minutos, álcool 70° GL por 1 minuto, e então imersas em solução de hipoclorito de sódio (2 % de cloro ativo) acrescido de Tween<sup>®</sup> 20 (1 gota/100 ml de solução) por 15 minutos. Em seguida, foi realizada tríplex lavagem com água deionizada autoclavada e as sementes foram então transferidas para um papel absorvente estéril para a retirada do excesso de água. Em seguida as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 mm X 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura cada.

O meio de cultura utilizado foi o MS/2 (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951), sacarose à 1,5% (p/v), e gelificado pela adição de Phytigel<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi aferido para 5,8 e a esterilização foi realizada em autoclave à 121° C, 1,1 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas por sete dias em ausência de luz e após esse período transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h.

O parâmetro avaliado foi o percentual de germinação de cada tratamento, onde foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram a emissão da radícula ou coleóptilo. As sementes foram observadas a cada dois dias após a inoculação, e a avaliação se iniciou após o início da germinação.

**7.3.2 Multiplicação:** A multiplicação do *Chusquea mimos*a foi realizada a partir de uma curva de regressão de doses das citocininas BAP e mT nas concentrações de 0, 10, 20 e 30 µM. Foram utilizados colmos provenientes de touceiras estabelecidas da introdução *in vitro* de sementes.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 12 repetições e 5 sub repetições por tratamento, representada por um tubo de ensaio com um colmo e cada sub repetição foi representada com 4 tubos de ensaio, cada um com 1 colmo, totalizando, 48 plantas no experimento.

O meio de cultura utilizado foi o MS/2 (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951), sacarose à 1,5% (p/v), e gelificado pela adição de Phytigel<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) e em dois tratamentos adicionadas doses de 10, 20 ,30 µm de BAP e mT mais um tratamento sem adição de fitorreguladores. O pH do meio foi aferido para 5,8 e a esterilização foi realizada em autoclave à 121° C, 1,1 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h.

Após 30 dias, os parâmetros avaliados foram o número de colmos, altura de colmos, número de raízes e comprimento de raízes, com objetivo de avaliar a diferença do potencial de multiplicação das diferentes concentrações de BAP e mT em comparação com o efeito em uma testemunha sem uso de fitorreguladores.

**7.3.3 Análises estatísticas:** Para os dados de diferentes concentrações de BAP e mT foram realizadas análises separadamente, onde verificou-se a normalidade dos resíduos por meio do teste de Shapiro Wilk. Também foi verificada a homogeneidade das variâncias por meio do teste de Bartlett.

#### 7.4 Resultados e discussão

**7.4.1 Introdução *in vitro*:** A retirada da pálea e a lema das sementes resultou em 60% de germinação, taxa essa superior àquela onde esse procedimento não foi realizado, a qual resultou em 20% de germinação. Além da germinação, a retirada da pálea e da lema contribuiu para a diminuição das perdas por contaminação na introdução *in vitro* (10%). Já, as sementes que não foram submetidas a esse procedimento apresentaram 30% de contaminação.

Apesar da micropropagação ser uma técnica utilizada para a produção de mudas de bambus, a maior parte das espécies não possuem um protocolo próprio, principalmente pela dificuldade no estabelecimento *in vitro*, tendo como principais fatores a oxidação dos colmos e a contaminação por fungos e bactérias, pois a própria anatomia desse grupo de plantas contribui para a presença de microrganismos. (SINGH et al., 2013 e ARAÚJO, 2020). Durante as etapas do estabelecimento, com intuito de diminuir a contaminação, se usam técnicas em condições de total assepsia (SINGH et al., 2013), e é comum o uso de soluções como fungicidas e bactericidas sistêmicos a fim de reduzir a contaminação nas estruturas externas do material vegetal que vai ser introduzido *in vitro* (JIMÉNEZ et al., 2006).

No presente trabalho, foi utilizado uma adaptação do método de desinfestação do protocolo de Ornellas (2017) desenvolvido para o *Guadua chacoensis*, e a retirada da pálea e da lema das sementes. Essa prática aliada ao uso de agentes desinfestantes como o hipoclorito de sódio e o Kasumin<sup>®</sup>, demonstrou resultados promissores, diminuindo a contaminação sem diminuir a taxa de germinação e estabelecimento *in vitro*.

**7.4.2 Multiplicação:** Comparativamente à testemunha, as citocininas utilizadas promoveram aumentos da taxa de multiplicação de colmos, e essa taxa aumentou até um determinado ponto, estabilizou, e depois a tendência foi de queda (Figura 2A). Ou seja, tanto o BAP quanto a mT tiveram uma concentração ótima, e que após ultrapassada, resultou em diminuição na taxa de multiplicação.

O tratamento que mostrou melhor taxa de multiplicação de colmos foi a concentração de 20  $\mu\text{M}$  de mT (Figura 2A). Em relação à altura dos colmos, os tratamentos contendo 10 e 30  $\mu\text{M}$  de BAP e mT apresentaram uma redução maior em relação a testemunha do que as demais concentrações das CKs avaliadas (Figura 2B).

O número de raízes foi negativamente afetado pela mT em todas as concentrações. Observou-se que quanto maior a concentração, menor a taxa de indução de raízes. Nos tratamentos com BAP, o número de raízes foi menor na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Já nas concentrações de 20 e 30  $\mu\text{M}$ , o número médio de raízes foi similar ao observado na testemunha (Figura 2D).

O comprimento de raízes seguiu a mesma tendência da taxa de multiplicação de colmos (Figura 2C), onde a adição das CKs no meio de cultura teve relação direta com o aumento no comprimento de raízes.

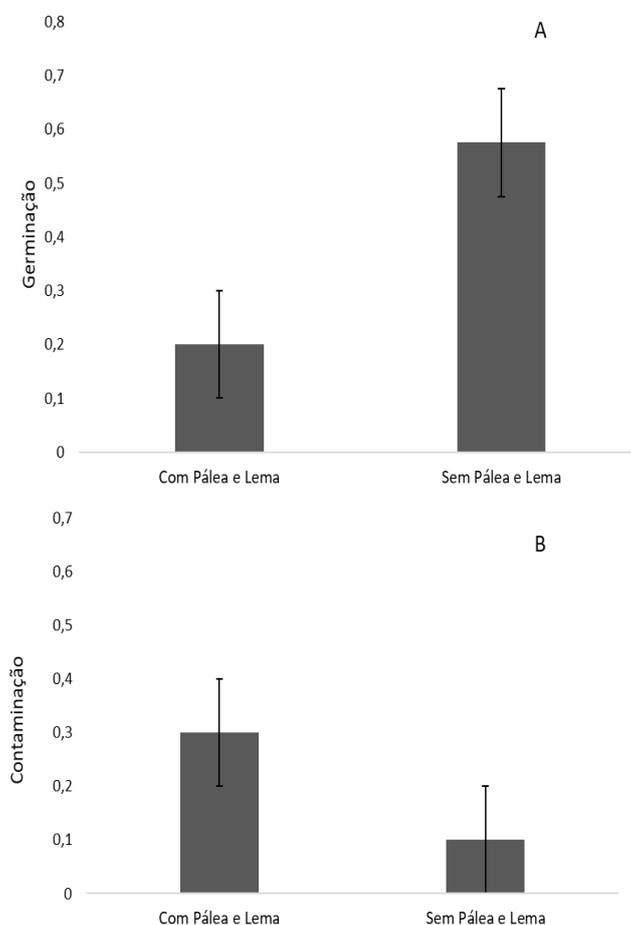
O uso de citocininas na etapa de multiplicação é usual por estimularem as brotações laterais e por estarem relacionadas ao rejuvenescimento dos tecidos vegetais (MUDOI, 2013; SANDHU 2018 e JIMÉNEZ, 2007). Outros autores, tais como Arya et al., (1999), Ornellas, (2017), Ornellas et al., (2019) e Nogueira, (2018) evidenciaram o potencial do aumento na taxa de multiplicação utilizando CKs, como a BAP e mT em diferentes concentrações nas culturas *in vitro* de *D. asper*, *G. chacoensis* e *G. magna*, respectivamente.

Estes mesmos autores, em seus trabalhos relataram a ocorrência de modificações morfológicas, tais como a hiperhidricidade durante o período de exposição do material vegetal aos fitorreguladores. Essas que podem estar relacionadas a adição das CKs no meio de cultura (SOUSA, 2006 e REIS, 2004), com ou sem a combinação de outros reguladores de crescimento, uma vez que isso podem resultar em desequilíbrios fisiológicos e nutricionais levando a mudanças na morfologia das plantas (DE CASTRO TORRES, 2017), o que também foi observado também no presente trabalho.

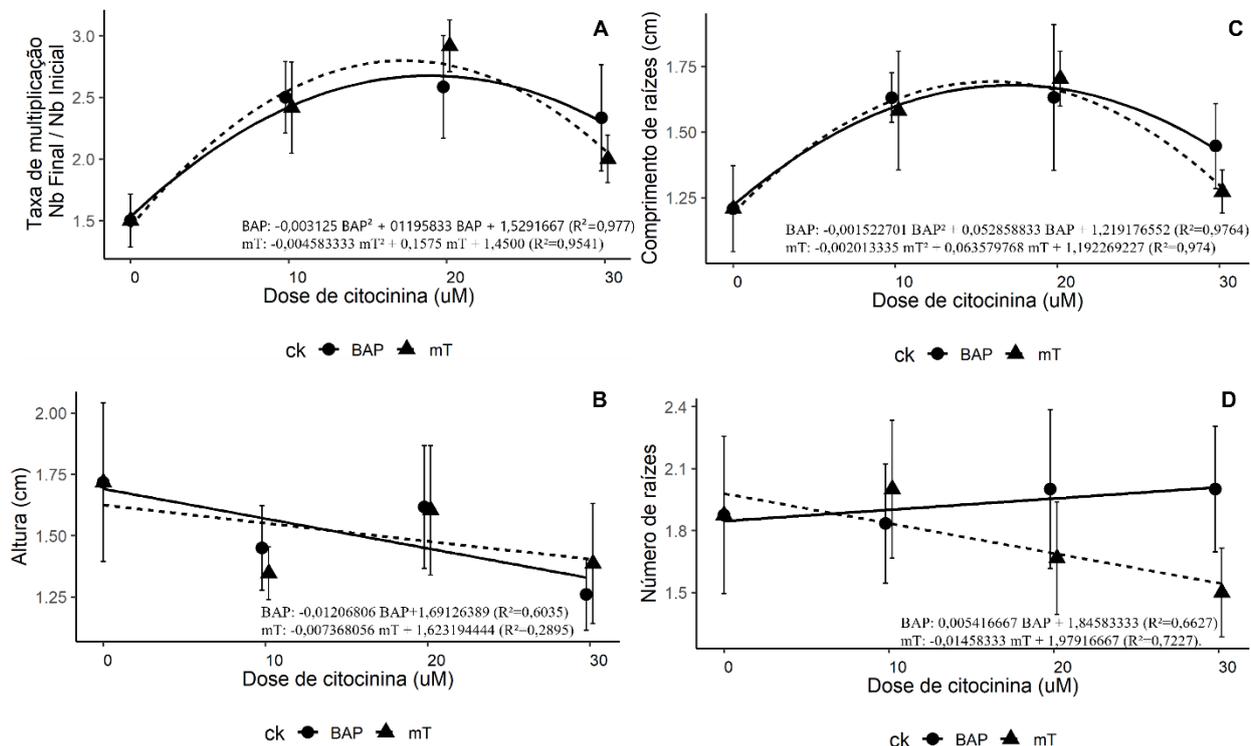
Durante a multiplicação das touceiras de *C. mimosa*, foi observada a ocorrência de hiperhidricidade em todos os tratamentos. Os colmos apresentaram aspecto quebradiço e translúcido (Figura 3C), e em seguida ocorreu a oxidação dos colmos,

comportamento este, também relatado em trabalhos de outros autores como o de Arya (2012).

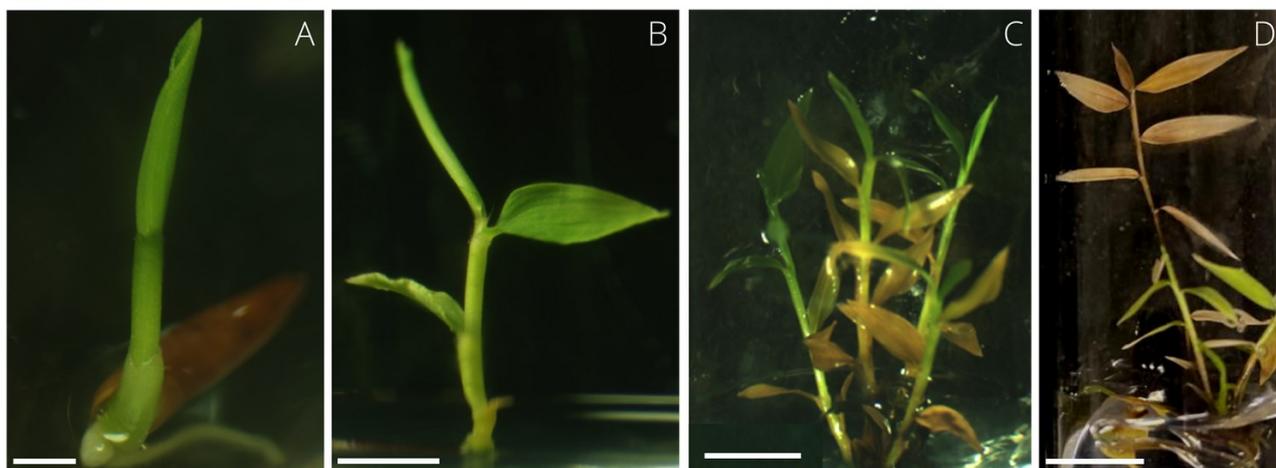
Trabalhos feitos na área de micropropagação de plantas têm enfatizado de forma crescente os fatores que interferem na qualidade das plantas durante os ciclos de multiplicação. De acordo com Vasconcelos et al. (2012) a hiperhidricidade é um estado fisiológico em que a planta apresenta um acúmulo anormal de água no interior das células, resultando nas folhas e brotos o aspecto translúcido com aparência frágil como vidro. Os sintomas da hiperhidricidade em folhas, podem também incluir a ocorrência de alongamento e turgidez e esses distúrbios fisiológicos são variáveis de acordo com a cultura e podem ocorrer em graus diferentes de severidade, sendo normalmente um processo reversível (RESENDE, 2012). Cultivos *in vitro* que apresentam sintomas de hiperhidricidade sofrem redução nas taxas de transpiração e fotossíntese, e então os tecidos são facilmente danificados pela dessecação, diminuindo a taxa de sobrevivência na aclimatização.



**Figura 1-** Percentual de germinação (A) e contaminação (B) *in vitro* em sementes de *Chusquea mimosa* no teste de germinação com e sem a retirada das estruturas pálea e lema.

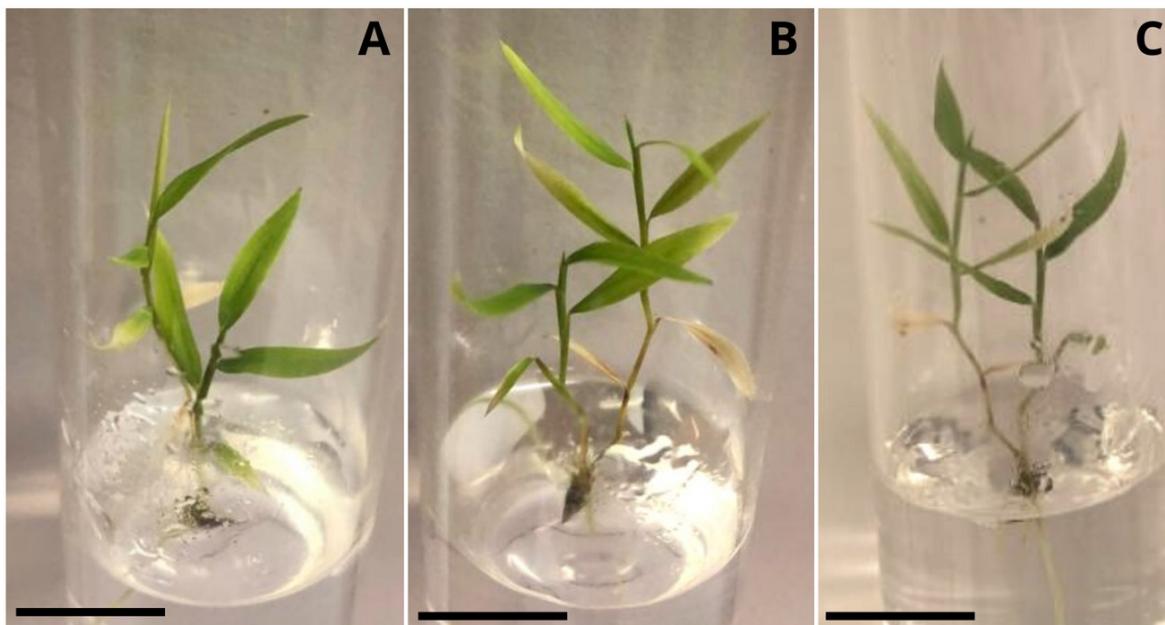


**Figura 2-** Percentual de multiplicação *in vitro* de *Chusquea mimosa*, com o uso de BAP e mT em diferentes concentrações. Verificou-se a normalidade dos resíduos por meio do teste de Shapiro Wilk. A homogeneidade das variâncias foi realizada pelo teste de Bartlett. E por meio da análise de regressão temos as equações e  $R^2$  nas figuras A, B, C e D.



**Figura 3.** *Chusquea mimosa* após a introdução *in vitro*. A: Colmo com primeira folha desenvolvida após 15 dias; B: Colmo após 30 dias; C: Touceira após 60 dias, com sinais de

hiperhidricidade e D: Touceira com colmo inicial oxidado e desenvolvimento de brotações laterais. Barras: A: 1mm; B, C e D: 2mm.



**Figura 4.** Touceiras de *Chusquea mimosa* após 30 dias em diferentes concentrações de BAP e mT. A: Testemunha; B: Tratamento BAP 10  $\mu$ M; C: Tratamento mT 20  $\mu$ M. Barras: 2mm.

### 7.5 Conclusões

A retirada da pálea e lema das sementes de *C. mimosa* resultou em *aumento* de 40% da taxa de germinação *in vitro* comparativamente às sementes intactas.

A retirada da pálea e lema das sementes *C. mimosa* resultou em redução de 20% da taxa de contaminação nas fases de introdução e estabelecimento *in vitro*.

As citocininas BAP e mT aumentaram a taxa de multiplicação de brotos de *C. mimosa* em todos os tratamentos, quando comparado à testemunha e o maior incremento de brotos ocorreu em resposta à 20  $\mu$ M de mT.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, Fernanda Duarte. Micropropagação, dinâmica da metilação e micorrização de *Dendrocalamus asper* (Poaceae: Bambusoideae). 2020. Dissertação - Curso de Pós-Graduação na Universidade de Brasília para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais, área de concentração: Conservação da natureza.

ARYA, S. et al. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. *Plant Cell Reports*, Dehra Dun-India, v. 18, p. 879–882, 1999.

ARYA, I. D.; KAUR, B; ARYA, S. Rapid and mass propagation of economically important Bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. **Indian Journal of Energy**, v. 1, n. 1, p. 11-16, 2012

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

CARBONARI, G. et al. Bambu—O aço vegetal. **Mix Sustentável**, v. 3, n. 1, p. 17-25, 2017.

CLARK, L.G. MACHADO, E.P.; VIDAL, K.V.A. MOTA, A.C. OLIVEIRA, R.P. *Chusquea* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB13106>>. Acesso: abr. 2022

DE VASCONCELOS, A. G. V. et al. Hiperhidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, 2012.

DE CASTRO TORRES, G. R; DE ABREU, G. P. Multiplicação *in vitro* de *Guadua angustifolia* kunth. em meio de cultura suplementado com n<sup>6</sup>-benzilaminopurina de forma isolada ou conjunta com ácido 2, 4-diclorofenoxiacético. **2º Congresso de engenharia ambiental do sul do Brasil**, 2017.

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

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

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

JIMÉNEZ, V. M. et al. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.86, p. 389–395, 2006.

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

MCCLURE, F.A. & SMITH, L.B., Flora Ilustrada Catarinense: Gramíneas, Bambúseas: 1-78, 1967. **Obra Original** Clark, L.G., Brittonia, 44(4): 387-422, 1992.

Ministério do Meio Ambiente – MMA. Portaria n. 443, de 17 de dezembro de 2014. Diário Oficial da União, 18/12/2014, Seção 1, p. 110-121, 2014.

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

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

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

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

NOGUEIRA, J. S. Estratégias para a conservação ex situ de *Dendrocalamus asper* e micropropagação de espécies do gênero *Guadua* (Bambusoideae, Poaceae). 2018.

ORTHEY, A. L. Uso do bambu industrializado no Brasil e sua aplicação no design de móveis: estudo de caso da empresa Oré Brasil. p, 28-35. 2015.

ORNELLAS, T.S. Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. 2017.

ORNELLAS, T.S. et al. Micropropagação de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 2019.

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

REIS, C. V; SOUSA, C, M; CARVALHO, R. M. M. Efeitos do tipo de explante e diferentes balanços de auxina e citocinina na regeneração *in vitro* de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON. **Agrografia**, Seropédica, v. 38, n. 1, p. 93-97, 2004.

RESENDE, C. F. **Avaliação do metabolismo oxidativo em *Pitcairnia encholirioides* L. B. SM. (Bromeliaceae) *In vitro* e *ex vitro* e sob desidratação**. 2012. 127 p. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo de Conservação de Recursos Naturais. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

SANDHU, M; WANI, S. H. JIMÉNEZ, Víctor M. In vitro propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 132, n. 1, p. 27–53, 2018.

SANTI, T. O potencial do bambu: desafios e oportunidades da fibra na produção de celulose e papel e as novas pesquisas sobre seu uso para fins energéticos e geração de biomateriais. **Revista de tecnologia em celulose e papel. Ano lxxvi nº**, v. 4, 2015.

SCHMIDT, R. A tribo Bambuseae Nees (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. 2008.

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. et al. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo-a plant with extraordinary qualities. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, Haryana, India, v. 19, n. 1, p. 21–41, 2013.

SOUSA, C; MIRANDA, R. M. Otimização do balanço entre auxina e citocinina para multiplicação *in vitro* de gerbera jamesonni var. ‘ornela’. **Agronomia**, v. 40, 2006.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 103-116, 2007.

THAPLIYAL, M., JOSHI, G., BEHERA, F. Bamboo: Flowering, seed germination and storage. **KAUSHIK, S.; SINGH, YP; KUMAR, D. THAPLIYAL, M**, p. 89-108, 2015.