UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA DE AZEVEDO PASQUALINI

SUBSÍDIOS PARA O ESTABELECIMENTO E CULTIVO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro: ESTUDOS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS E ASPECTOS MORFOANATÔMICOS

CURITIBA

2019

ANA PAULA DE AZEVEDO PASQUALINI

SUBSÍDIOS PARA O ESTABELECIMENTO E CULTIVO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro: ESTUDOS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS E ASPECTOS MORFOANATÔMICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal - Agronomia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Marguerite Quoirin
Coorientador: Dr. Luiz Antonio Biasi
Coorientador: Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga

CURITIBA

2019

P284s

Pasqualini, Ana Paula de Azevedo
Subsídios para o estabelecimento e cultivo in vitro de *Bambusa oldhamii* Munro: estudos de microrganismos associados e aspectos morfoanatômicos / Ana Paula de Azevedo Pasqualini. - Curitiba, 2019.
123 p.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - (Produção Vegetal).
Orientadora: Marguerite Quoirin
Coorientador: Luiz Antonio Biasi
Coorientador: Hugo Pacheco De Freitas Fraga

1. Bambu. 2. Plantas - Propagação in vitro. 3. Organogênese. 4. Fungos na agricultura. I. Quoirin, Marguerite (Orientadora). II. Biasi, Luiz Antonio (Coorientador). III. Fraga, Hugo Pacheco De Freitas (Coorientador). IV. Título. V. Universidade Federal do Paraná.

CDU 633.584.5

Sistema de Bibliotecas/UFPR, Biblioteca de Ciências Agrárias
Paula Carina de Araújo - CRB9/1562

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA PAULA DE AZEVEDO PASQUALINI** intitulada: **SUBSÍDIOS PARA O ESTABELECIMENTO E CULTIVO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro: ESTUDOS DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS E ASPECTOS MORFOANATÔMICOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 12 de Fevereiro de 2019.

MARGUERITE GERMAINE GHISLAINE QUOIRIN
Presidente da Banca Examinadora

ROSETE PESCADOR
Avaliador Externo (UFSC)

GIOVANA BONFIM DE ALCANTARA
Avaliador Externo (UFPR)

VANIA APARECIDA VICENTE
Avaliador Externo (UFPR)

JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO
Avaliador Interno (UFPR)

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Augusto Pasqualini e
ao meu filho Antonio Giuseppe Pasqualini, com amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Marguerite Quoirin pelo auxílio e oportunidades durante esses quatro anos; pela confiança, orientação, disponibilidade, dedicação na correção dos trabalhos, conhecimentos transmitidos e por acreditar que seria possível concretizar esse projeto.

Ao meu coorientador professor Luiz Antonio Biasi, pela orientação e precioso tempo que dedicou para discutir e propor ideias que tanto ajudaram no meu desenvolvimento acadêmico.

Ao meu coorientador professor Hugo Pacheco de Freitas Fraga pelos conhecimentos transmitidos, colaboração no planejamento dos experimentos e redação dos trabalhos, estímulo nos momentos difíceis e por elevar minha estima quando as incertezas inerentes à pesquisa me fizeram desanimar.

À professora Cleusa Bona, pelos ensinamentos e orientações nas atividades relacionadas à morfoanatomia de plantas.

Às professoras Vania Aparecida Vicente e Juliana Vitoria Messias Bittencourt, pelo apoio nas análises moleculares.

Ao professor Carlos Roberto Sanquetta, por disponibilizar o material vegetal para a pesquisa.

Ao professor Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos, pelo auxílio na obtenção das imagens através de microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Miguel Pedro Guerra, pela iniciativa do projeto Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável da Cadeia Produtiva do Bambu no Sul do Brasil - macro e micropropagação e conservação *in vitro* de germoplasma de bambu.

À Universidade Federal do Paraná, aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela dedicação e estruturas que permitiram que o trabalho fosse realizado.

Aos funcionários da UFPR: Carlos Eduardo Piemonte Maduro, Nilson Belém Filho, pela amizade e ajuda nas análises laboratoriais e Lucimara Antunes, por sempre colaborar nas atividades administrativas.

Aos estagiários Konrado Broetto Cruz, Eric Lopes, Ana Paula Neves, Daniel Savi, Valéria Cristina Holtman, Carlos Guilherme do Nascimento, Jacquelini Romero Pereira e Michele Batista que auxiliaram nas atividades laboratoriais.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À minha mãe Alzira Matias Carneiro Hubert e às minhas irmãs Cassia Matias de Azevedo e Silvia de Azevedo Gonçalvez, pelo amor e amizade.

Aos meus irmãos Carlos Roberto de Azevedo, Cassiano Ricardo de Azevedo e Nilton Cezar de Azevedo, por me acolherem em seus lares, pela ajuda nas coletas dos brotos de bambus, momentos de conversa e apoio.

À minha sogra Rosecler Pistum Pasqualini, por ter sido avó e mãe em tantos momentos que estive ausente e também pela revisão ortográfica e gramatical deste estudo.

Às minhas cunhadas Paola Pasqualini, Tatiana Pasqualini Catossi e Graciela Pasqualini Propst, pela amizade e por tornarem minha vida em Ponta Grossa mais feliz.

Aos meus sobrinhos, pelas alegrias que me proporcionam por ser tia.

Aos amigos João Henrique Delfrate Padilha, Mariana Franca, Cintia Fagundes e Fabrícia Lorrane Rodrigues Oliveira, pelo apoio durante as atividades, ombro amigo nas dificuldades e pelos momentos de descontração.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa e para a conquista do título de Doutor em Ciências área de concentração Biotecnologia Vegetal e Morfogênese de Plantas.

"Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena."

Fernando Pessoa

RESUMO

Bambusa oldhamii Munro é uma espécie promissora de bambu, que apresenta diversas aplicações na indústria madeireira e alimentícia, porém seu uso como matéria-prima no Brasil tem sido limitado pela falta de mudas que deem suporte a plantios comerciais. Sendo assim, a micropropagação a partir de segmentos nodais mostra-se como uma alternativa propícia na obtenção de mudas sadias, de alta qualidade, em um curto espaço de tempo. Entretanto, a aplicação dessa técnica de propagação vegetativa é dificultada pela incidência de microrganismos endofíticos, especialmente quando se utiliza como fonte de explantes, matrizes cultivadas no campo. Neste sentido, os objetivos desse trabalho foram micropropagar, identificar contaminantes associados e caracterizar estruturas morfoanatômicas desenvolvidas a partir de segmentos nodais de brotações laterais de matrizes de *B. oldhamii* cultivadas no campo. Os estudos realizados permitiram desenvolver uma técnica de desinfestação de brotos maduros de *B. oldhamii* originados do campo, utilizando imersão em tiofanato-metílico, álcool 70%, cloreto de mercúrio, hipoclorito de sódio e cultivo submerso em meio Murashige e Skoog líquido, acrescido de 4 mL L^{-1} de Plant Preservative Mixture (PPM^{TM}). As análises moleculares de microrganismos isolados de segmentos nodais cultivados *in vitro* possibilitaram identificar a presença de bactéria endofítica agrupada filogeneticamente com *Ralstonia pickettii* e fungos associados, com sequencias similares a *Wojnowiciella leptocarpi*, *Diaporthe* sp., *Diaporthe novem, Phaeosphariaceae* sp., *Leptosphaeria* sp., *Phoma herbarum, Fusarium* sp., *Fusarium graminearum, Arthrinium kogelbergense* e *Arthrinium.* Os estudos de organogênese mostraram que o maior número de brotos por segmento nodal é obtido em explantes de 2 cm de comprimento e 5-7 mm de diâmetro, após cinco subcultivos na presença de 4,4 µM de TDZ e que o uso do BAP no meio de cultura reduz o desenvolvimento de brotos. As análises morfoanatômicas dos explantes possibilitaram caracterizar o sistema de revestimento, córtex, feixes vasculares e medula e também a presença de zonas meristemáticas, com brotos pré-formados potencialmente aptos ao desenvolvimento. Deste modo, os resultados obtidos fornecem subsídios para o estabelecimento *in vitro* de *B. oldhamii* a partir de segmentos nodais de matrizes cultivadas no campo.

Palavras-chave: Bambus. BAP. Endofíticos. Morfoanatomia. PPM^{TM}. TDZ.

ABSTRACT

Bambusa oldhamii Munro is a promising species of bamboo, presenting several applications for timber and food industry. However, in Brazil, its use as a raw material has been limited by the lack of seedlings for commercial plantations. The micropropagation through nodal segments is a promising alternative in obtaining healthy seedlings of high quality, in a short time. However, the application of this vegetative propagation technique is hindered by the incidence of endophytic microorganisms, especially when using explants from matrices cultivated in the field. The aims of this study were to micropropagate, identify associate contaminants and characterize morphoanatomic structures developed from nodal segments of lateral shoots of *B. oldhamii* matrices grown in the field. The studies carried out allowed the development of a disinfestation technique of mature shoots of *B. oldhamii* from the field using thiophanate methyl, 70% ethanol, sodium hypochlorite, mercuric chloride and immersion in Murashige e Skoog liquid culture medium, plus 4 $mL.L^{-1}$ of Plant Preservative Mixture (PPM^{TM}). The molecular analyzes of microorganisms isolated from nodal segments cultured *in vitro* allowed to identify the presence of endophytic bacteria phylogenetically grouped with *Ralstonia pickettii* and several fungi with sequences similar to *Wojnowiciella leptocarpi*, *Diaporthe* sp., *Diaporthe novem, Phaeosphariaceae* sp., *Leptosphaeria* sp., *Phoma herbarum, Fusarium* sp., *Fusarium graminearum, Arthrinium kogelbergense* and *Arthrinium arundinis*. Organogenesis studies showed that the highest number of shoots per nodal segment is obtained in explants of 2 cm in length and 5-7 mm in diameter in the presence of 4.4 µM of TDZ after five subcultures and that the use of BAP in the culture medium reduces shoot development. The morpho-anatomical analysis of the explants allowed to characterize the coating system, cortex, vascular bundles and pith, as well as the presence of meristematic zones with preformed buds potentially suitable for development. The results obtained provide support for the *in vitro* establishment of *B. oldhamii* from nodal segments of matrices cultivated in the field.

Key words: Bamboos. BAP. Endophytic. Morphoanatomy. PPM^{TM}. TDZ.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EXEMPLAR DE *Bambusa oldhamii* MUNRO, COM NOVE ANOS DE IDADE, LOCALIZADA NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL CANGUIRI DA UFPR, NO MUNICÍPIO DE PINHAIS, NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA/PR. DEZEMBRO DE 2018. 19

FIGURA 2 - BROTOS FORMADOS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Bambusa oldhamii* APÓS 21 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BENZILAMINOPURINA (BAP). A) MÉDIA DE EXPLANTES COM BROTOS POR TRATAMENTO (MEBT). B) COMPRIMENTO MÉDIO DOS BROTOS (CMB). 36

FIGURA 3 - EFEITO DO PPM^{TM} NA MÉDIA DE EXPLANTES COM BROTOS NOVOS POR TRATAMENTO E CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, EM SEGMENTOS NODAIS DE *Bambusa oldhamii* APÓS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA MS. A) MÉDIA DE EXPLANTES COM BROTOS POR TRATAMENTO (MEBT). B) PERCENTUAL DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (CB). C) PERCENTUAL DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA (CF). D) CONTAMINAÇÃO MICROBIANA TOTAL (CT). 36

FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIA DE UM EXPLANTE DE *Bambusa oldhamii* OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. A) GEMA AXILAR. AS LETRAS B, C E D NA IMAGEM INDICAM OS LOCAIS APROXIMADOS QUE FORAM AMPLIADOS NAS PRÓXIMAS IMAGENS. B) HIFAS FÚNGICAS (SETAS) ALOJADAS NO INTERIOR DAS CÉLULAS (ESTRELA). C E D) HIFAS FÚNGICAS (SETAS) ASSOCIADAS AOS TRICOMAS (ESTRELA) (C) E SOBRE A EPIDERME (D). 39

FIGURA 5 - TRATAMENTOS UTILIZADOS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii*. 48

FIGURA 6 - EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* INDICANDO CRESCIMENTO (A) BACTERIANO E (B) FÚNGICO APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS DE ASSEPSIA E CULTURA *IN VITRO* POR 21 DIAS. BARRA: 1 cm. 50

FIGURA 7 - EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* VISUALMENTE LIVRES DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA E/OU FÚNGICA AOS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*. 51

FIGURA 8 - CRESCIMENTO FÚNGICO (SETA) NA REGIÃO NODAL EM EXPLANTE DE *Bambusa oldhamii* DESCONTAMINADO POR IMERSÃO EM 2 g L^{-1} DE TIOFANATO-METÍLICO POR 24 h, ÁLCOOL 70% POR 30 s, 0,1% DE $HgCl_2$ POR 10 min, 1% DE NaOCl POR 10 min E CULTIVADO POR 21 DIAS EM MEIO MS SEMISSÓLIDO ACRESCIDO DE 4 mL L^{-1} DE PPM^{TM}. BARRA: 1 mm. 53

FIGURA 9 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADO DE *Ralstonia* sp (T7), OBTIDO DE EXTRATO DE BROTAÇÕES DE *Bambusa oldhamii*. RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO DETERMINADO PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA. * ESPÉCIE DE REFERÊNCIA. ( ) NÚMERO DO ACESSO NO NCBI. 56

FIGURA 10 - ISOLADOS DE *Ralstonia* sp (T7) SUBMETIDOS AO TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) DE PPM^{TM}. A) 1 mL L^{-1}; B) 2 mL L^{-1}; C) 4 mL L^{-1}; D) 6 mL L^{-1} e E) 8 mL L^{-1}..... 57

FIGURA 11 - SEGMENTOS NODAIS DE 1, 2 E 3 cm DE COMPRIMENTO E 2-3, 3-5 E 5-7 mm DE DIÂMETRO UTILIZADOS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii*. 64

FIGURA 12 - EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* DE DIFERENTES COMPRIMENTOS (VERTICAL) E DIÂMETROS (HORIZONTAL) CULTIVADOS EM MEIO MS POR 21 DIAS. 66

FIGURA 13 - SEGMENTOS NODAIS DE *Bambusa oldhamii* DE 2 cm DE COMPRIMENTO E 5-7 mm DE DIÂMETRO. 70

FIGURA 14 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS DE *Bambusa oldhamii*. CORTES TRANSVERSAIS NO ENTRENÓ EM EXPLANTE DE 2 mm (A), 3 mm (B) E 5 mm DE DIÂMETRO (C). D) CORTE TRANSVERSAL NA REGIÃO NODAL EM EXPLANTE DE 5 mm DE DIÂMETRO. BARRA: 1mm. 71

FIGURA 15 - CORTES ANATÔMICOS NA REGIÃO NODAL EM SEGMENTOS CAULINARES DE *Bambusa oldhamii*. 72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O EFEITO DO BAP E DO PPM^{TM} EM EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS POR 21 DIAS. 34

TABELA 2 - EFEITO DA BENZILAMINOPURINA (BAP) EM EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* APÓS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA MS ACRESCIDO DE 4 mL L^{-1} DE PPM^{TM} 38

TABELA 3 - ISOLADOS DE FUNGOS OBTIDOS A PARTIR DE EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* CULTIVADOS *IN VITRO*. 40

TABELA 4 - EFEITO DE TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *Bambusa oldhamii* NO CRESCIMENTO BACTERIANO, FÚNGICO E TOTAL, E COMPRIMENTO DAS BROTAÇÕES NOVAS. 52

TABELA 5 - SOBREVIVÊNCIA (%) EM EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* DE DIFERENTES COMPRIMENTOS E DIÂMETROS, APÓS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS. 67

TABELA 6 - SEGMENTOS NODAIS DE *Bambusa oldhamii* SOBREVIVENTES QUE EMITIRAM BROTOS LATERAIS (%), APÓS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS. 68

TABELA 7 - SOBREVIVÊNCIA, MÉDIA DE BROTOS POR GEMA E COMPRIMENTO MÉDIO DO MAIOR BROTO DE EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* DE DIFERENTES COMPRIMENTOS E DIÂMETROS, APÓS CINCO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS ACRESCIDO DE 4,4 µM DE TDZ. ... 69

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - Ácido indolacético

ANOVA – Análise de variância

BAP – 6-Benzilaminopurina

BDA – Meio de cultura composto por batata, dextrose e ágar

BLAST - *Basic local alignment search tool*

BOD - Estufa incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

CA – Carvão ativado

CV – Coeficiente de variação

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

FAA70 – Formaldeído, ácido acético, álcool 70%

$HgCl_2$ - Cloreto de mercúrio

ITS - *Internal transcribed spacer*

MS – Meio desenvolvido por Murashige e Skoog (1962)

NaOCl - Hipoclorito de sódio

PCR - *Polymerase chain reaction*

PNMCB - Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu

PPM™ – *Plant Preservative Mixture*

PVP – Polivinilpirrolidona

TDZ - Thidiazuron

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BAMBUS 17
2.2 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO DOS BAMBUS 19
2.3 MICROPROPAGAÇÃO 20
2.3.1 Assepsia 21
2.3.2 *Plant Preservative Mixture* (PPM™) 21
2.3.3 Meios de cultura e reguladores vegetais 22
2.4 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS 23
2.5 MORFOANATOMIA 25
CAPÍTULO 1 - CULTURA *IN VITRO* E DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *Bambusa oldhamii* 26
1 INTRODUÇÃO 29
2 MATERIAL E MÉTODOS 30
2.1 Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental 30
2.2 Análise estatística 31
2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 31
2.4 Identificação dos contaminantes fúngicos 32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
4 CONCLUSÃO 41
CAPÍTULO 2 - ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro A PARTIR DE MATRIZES CULTIVADAS A CAMPO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA 43
1 INTRODUÇÃO 46
2 MATERIAL E MÉTODOS 47
2.1 Material vegetal e estabelecimento *in vitro* 47
2.2 Isolamento e caracterização molecular de bactérias associadas 48
2.3 Sensibilidade das estirpes bacterianas ao PPM™ 49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
3.1 Estabelecimento *in vitro* 50
3.2 Identificação de bactéria associada 55
4 CONCLUSÃO 57
CAPÍTULO 3 - ORGANOGÊNESE *IN VITRO* E MORFOANATOMIA DE *Bambusa oldhamii* 58

1 INTRODUÇÃO 61
2 MATERIAL E MÉTODOS 63
2.1 Material vegetal 63
2.2 Tamanho dos segmentos nodais, subcultivos na presença de TDZ e antioxidantes 63
2.3 Análises morfoanatômicas 65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65
3.1 Efeito do comprimento e diâmetro do segmento nodal 65
4 CONCLUSÃO 73
CONCLUSÕES 75
CONSIDERAÇÕES FINAIS 76
REFERÊNCIAS 78
APÊNDICE 1 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CULTIVO *IN VITRO* E DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *Bambusa oldhamii* 89
APÊNDICE 2 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS: ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro A PARTIR DE MATRIZES CULTIVADAS A CAMPO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA 107
APÊNDICE 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA: ORGANOGÊNESE *IN VITRO* E MORFOANATOMIA DE *Bambusa oldhamii* 112

1 INTRODUÇÃO

Bambus correspondem a diversas espécies que diferem em relação ao centro de origem, porte, anatomia, morfologia, fisiologia, comportamento reprodutivo, resistência a variações climáticas, *habitat*, entre outras características. Segundo Tombolato et al. (2012), o termo genérico bambu está relacionado a inúmeras espécies que compõem a subfamília Bambusoideae, da família Poaceae.

Os bambus são provenientes principalmente de florestas tropicais e regiões subtropicais do mundo e consistem em aproximadamente 1.575 espécies, sendo que destas, em torno de 60%, são encontradas na Ásia (SINGH et al., 2013). No Brasil são conhecidas 224 espécies de bambus (14% das espécies catalogadas) e destas, 149 são lignificadas e 75 são herbáceas (TEIXEIRA et al., 2007).

O bambu, recurso natural renovável, de crescimento rápido e elevada produtividade florestal, leve e durável, apresenta diversas aplicações comerciais. De acordo com Sathitsuksanoh et al. (2009) e Santi (2015), o bambu é utilizado na construção civil, fabricação de móveis, produção de alimentos, fabricação de papel e celulose, indústria têxtil, artesanato e também cultivado como planta ornamental (bambu mossô).

Em países asiáticos o uso do bambu como matéria-prima fibrosa é milenar, porém, no Brasil, seu uso comercial é pouco explorado. Com o intuito de desenvolver a cadeia produtiva do bambu, no ano de 2011, foi criada a Lei n.º 12.484/2011, que dispõe sobre a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB), objetivando motivar produtores rurais a destinar terras ao cultivo desse vegetal. O país, entretanto, ainda não dispõe de estrutura para expandir o cultivo e o processamento de bambu (SANTI, 2015).

Entre os fatores limitantes do desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu no Brasil, está a falta de mudas para abastecer plantios comerciais. Atualmente, a produção de mudas no país ainda é realizada por um pequeno número de produtores, restrita a poucas espécies e através de métodos tradicionais de propagação (sementes, divisão de touceiras e estaquia do colmo), que apresentam baixa produtividade e alto custo. Conforme Gielis; Oprins (2002), os métodos tradicionais de propagação de bambus não são capazes de fornecer mudas suficientes à propagação em larga escala ou em massa, gerando um entrave para o cultivo do bambu como matéria-prima fibrosa. A estaquia de ramos é citada

na literatura como uma alternativa de baixo custo para propagação de bambus *ex vitro*, como mostrado por Islam et al. (2011), na propagação clonal de *Bambusa vulgaris*, porém esta metodologia ainda não é utilizada na propagação massal devido ao baixo porcentual de enraizamento das estacas e desempenho no campo de mudas obtidas por este método.

Diante deste cenário, a micropropagação surge como uma técnica promissora que permite a multiplicação rápida de plantas, propagação de novos híbridos e obtenção de matrizes livres de patógenos, porém sua aplicação para obtenção de mudas de bambus em escala comercial ainda é limitada (SINGH et al., 2013). Entre os desafios encontrados na micropropagação do bambu está a contaminação endógena, oxidação dos explantes ou brotos durante a multiplicação, instabilidade da taxa de multiplicação, variações somaclonais, albinismo de plantas, baixa porcentagem de enraizamento e sobrevivência limitada das plantas durante a aclimatização e transferência para o campo (SINGH et al., 2013).

Na micropropagação de plantas, a origem do material vegetal é crucial para o sucesso do estabelecimento de culturas *in vitro*. Em bambus, esses materiais podem ser obtidos de sementes germinadas *in vitro*, mudas cultivadas em casas de vegetação ou de plantas cultivadas no campo. Este último tipo de material é uma via importante quando se busca propagar genótipos de interesse, mas também constitui um grande desafio porque estes materiais apresentam altos índices de contaminação microbiana, tornando-se um obstáculo no estabelecimento de protocolos de micropropagação. Outra dificuldade encontrada na propagação de bambus está relacionada ao uso de materiais adultos, devido à baixa capacidade de resposta destes a estímulos fisiológicos, quando comparados a materiais jovens com alta atividade meristemática.

Considerando o bambu como uma espécie de grande apelo comercial e a necessidade do estabelecimento de protocolos de microprogagação comercialmente viáveis, com o intuito dar suporte tecnológico ao desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu no Brasil, os objetivos do presente estudo foram obter protocolo de micropropagação, identificar microrganismos endofíticos e caracterizar estruturas morfoanatômicas, a partir de segmentos nodais de brotações laterais de matrizes de *Bambusa oldhamii* Munro cultivadas no campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BAMBUS

A família Poaceae apresenta grande importância econômica sendo representada por cereais e forrageiras (LONGHI-WAGNER, 2012). Esta família botânica abrange cerca de 800 gêneros e 10.000 espécies em todo o mundo (WATSON et al., 1992) e pode ser subdividida nas subfamílias Anomochlooideae, Puelioideae, Pharoideae, Panicoideae, Arundinoideae, Chloridoideae, Centothecoideae, Aristidoideae, Micrairoideae, Danthonioideae e Ehrartoideae, Pooideae e Bambusoideae (LONGHI-WAGNER, 2012).

A subfamília Bambusoideae é uma das maiores da família das Poaceae (ZHANG et al., 2011), constituída por aproximadamente 60 a 70 gêneros e 1.200 espécies (GPWG, 2001). A circunscrição atual de Bambusoideae compreende as tribos Olyreae, Bambuseae e Arundinarieae, que correspondem respectivamente aos grupos informais “bambus herbáceos”, "bambus lignificados" e “bambus lignificados de clima temperado” (SUNGKAEW et al., 2009).

Os "bambus herbáceos" apresentam altura normalmente menor que 2 m, ramificação simples e colmo herbáceo, flores unissexuadas dispostas em espiguetas estaminadas e pistiladas, diferentes em forma e tamanho, florescimento policárpico e não são tolerantes à exposição direta ao sol. Já os "bambus lignificados" apresentam altura de 1 a 35 m, ramificação complexa, colmo lenhoso e com folhas, de entrenós ocos ou sólidos, flores bissexuadas, florescimento monocárpico e são tolerantes à exposição solar (FILGUEIRAS; SANTOS-GONCALVES, 2004).

No grupo dos “bambus herbáceos”, a floração é sazonal, enquanto no grupo dos lignificados, ela é cíclica e oscila entre três e 120 anos para as diferentes espécies (SCHMIDT; LONGHI-WAGNER, 2009). Durante este período, as plantas crescem vegetativamente, depois florescem gregária e simultaneamente, produzem sementes e geralmente morrem (SCHMIDT; LONGHI-WAGNER, 2009).

Em relação à estrutura do rizoma e sistema de ramificação, os bambus podem ser classificados como paquimorfos, leptomorfos ou anfimorfos e de ramificação complexa, com colmos desde eretos até escandentes (SODERSTROM; ELLIS, 1986; TOMBOLATO et al., 2012). As espécies de rizoma paquimorfo ou simpodial são classificadas como entouceirantes; mais comumente encontradas nas

regiões tropicais, as de rizoma leptomorfo ou monopodial como alastrantes e ocorrem predominantemente em regiões de clima temperado (STAPLETON, 1997; TOMBOLATO et al., 2012); enquanto as classificadas como anfimorfas possuem rizomas paquimorfos e leptomorfos no mesmo sistema.

No Brasil os bambus estão representados por 34 gêneros (16 herbáceos e 18 lenhosos) e 230 espécies (75 herbáceas e 155 lenhosas), sendo que 45 espécies de Olyreae e 129 de Bambuseae são endêmicas (FILGUEIRAS; SANTOS-GONCALVES, 2004; FERREIRA et al., 2009). Aproximadamente 65% das espécies de bambu são encontradas na Mata Atlântica, 26% na Amazônia e 9% no Cerrado. Os cinco gêneros mais representativos do bioma brasileiro são Merostachys (53 espécies), Chusquea (40 espécies), Olyra (18 espécies), Pariana (18 espécies) e Guadua (16 espécies) (FILGUEIRAS; SANTOS-GONÇALVES, 2004).

Embora haja tantas espécies de bambus nativos do Brasil, os mais frequentemente encontrados, cultivados nos jardins e beiras de estradas, são exóticos (TOMBOLATO et al., 2012). Entre os bambus exóticos das espécies alastrantes mais comuns estão o *Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz, *Pseudosasa japonica* (Siebold & Zucc. ex Steud.) Makino ex Nakai, *Phyllostachys aurea* Rivière & C. Rivière, *Phyllostachys bambusoides* Siebold & Zucc. Já entre os entouceirantes estão o *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult.f.) Baker ex K.Heyne, *Drepanostachyum falcatum* (Nees) Keng f., *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.*C.Wendl., Bambusa vulgaris Schrad. ex J.C.Wendl. var. vittata Rivière, Bambusa tuldoides* Munro e *Bambusa multiplex* (Lour.) Raeusch (TOMBOLATO et al., 2012).

A espécie *Bambusa oldhamii* Munro, originária do sul da China, Mianmar (DRANSFIELD; WIDJADJA, 1995) e Taiwan (SHOULIANG et al., 2007) foi introduzida no Brasil entre os anos de 1950 e 1960 pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), por meio da antiga Seção de Botânica Econômica (TOMBOLATO et al., 2012). Atualmente é encontrada na coleção de bambus da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Fazenda Experimental da Ressacada (GRECO, 2013), na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Fazenda Canguiri (MOGNON, 2015), e em propriedades particulares, plantadas isoladamente sem vantagem comercial.

B. oldhamii é um bambu entouceirante, de 10 a 15 m de altura, rizoma paquimorfo, colmos eretos, minimamente arqueados no ápice, com ramificações desde a base até o ápice e entrenós com 4 a 8 cm de diâmetro (GRECO, 2013). O

ciclo de florescimento dessa espécie é de 48 anos (DRANSFIELD; WIDJADJA, 1995) e ela apresenta bom desenvolvimento em solos arenosos, tolerância à exposição direta ao sol e a baixas temperaturas (-9 ºC) (CUSACK, 1999).

FIGURA 1 - EXEMPLAR DE *Bambusa oldhamii* MUNRO, COM NOVE ANOS DE IDADE, LOCALIZADA NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL CANGUIRI DA UFPR, NO MUNICÍPIO DE PINHAIS, NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA/PR. DEZEMBRO DE 2018.

2.2 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO DOS BAMBUS

Convencionalmente, os bambus são propagados através de sementes e vegetativamente por rizomas e estacas do colmo (SINGH et al., 2013). No entanto, a propagação seminífera é dificultada pela floração esporádica, longos ciclos de floração, produção de sementes recalcitrantes (com viabilidade de 3-6 meses), formação de mudas altamente heterogêneas e, em muitos casos (quando a floração é gregária), as plantas morrem depois de florescerem (SANDHU et al., 2017).

Da mesma forma, o volume e a disponibilidade limitada de propágulos, as dificuldades de transporte em longas distâncias, a baixa taxa de sobrevivência e o enraizamento limitado dos propágulos são as maiores restrições aos métodos vegetativos (SINGH et al., 2013). Azzini e Salgado (1993) salientam que a propagação vegetativa do bambu por meio da subdivisão das touceiras ou no plantio de pedaços de colmos não se mostra adequada a plantios comerciais, pois as mudas constituídas por rizomas, raízes e parte basal dos colmos têm que ser desmembradas da touceira matriz, promovendo sua destruição total ou parcial.

Neste caso ocorre uma escassez na produção de mudas para o plantio de bambu, tornando-se um gargalo no processo de reflorestamento devido à ineficácia das técnicas de propagação convencionais. Uma alternativa aos métodos clássicos de propagação de bambus é a micropropagação, uma técnica valiosa usada tanto para fins de conservação do germoplasma quanto para a produção de mudas, oferecendo vantagens substanciais sobre técnicas tradicionalmente utilizadas (SINGH et al., 2013), tais como a obtenção massal de mudas sadias, de alta qualidade e num curto intervalo de tempo.

A expectativa é que a propagação *in vitro* possa resolver a maior parte dos problemas observados com a propagação tradicional (SANDHU et al., 2017). No entanto, sua aplicação comercial tem sido restrita devido às altas taxas de mortalidade das plantas quando transferidas para condições *ex vitro* ou naturais (SINGH et al., 2013).

2.3 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação tem sido identificada como uma alternativa adequada para a produção rápida de plantas em larga escala e conservação de germoplasma *in vitro* (YASODHA et al., 2008; SINGH et al., 2013). Outra vantagem deste método clonal é a redução da variação inerente à população de sementes, porém a presença de microrganismos endofíticos, a hiperhidricidade e a instabilidade das taxas de multiplicação afetam o fluxo do cultivo *in vitro* (MUDOI et al., 2013).

O primeiro estágio da micropropagação consiste no estabelecimento *in vitro* do material vegetal, tal como, segmentos nodais, internodais, cotiledonares (PAIVA; ALOUFA, 2009), gemas adventícias ou axilares (LYYRA et al., 2006), livres de contaminação (GEORGE et al., 2008), oriundos de tecidos jovens ou adultos, cultivados em locais protegidos ou no campo (MUDOI et al., 2013). Em bambus também é comum o uso de embriões imaturos e maduros, mesocótilo, bainha foliar, folhas e raízes como explantes (GOYAL; SEN, 2016).

Para o estabelecimento *in vitro* do material vegetal, é necessária a desinfestação dos explantes, sem deteriorar o tecido. Nesta etapa da micropropagação, a alta incidência de contaminação superficial e sistêmica tem sido uma das principais razões para o fracasso no estabelecimento *in vitro* de bambus,

especialmente quando a fonte dos explantes são bambus adultos cultivados no campo (OPRINS et al., 2004).

2.3.1 Assepsia

Os agentes antissépticos geralmente utilizados na cultura de tecidos são: o etanol 70%, o hipoclorito de sódio (NaOCl) e o cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), sendo que o tipo de agente esterilizante, a concentração e os tempos de exposição são escolhidos em função da origem do explante e da espécie estudada (GOYAL; SEN, 2016).

Na introdução *in vitro* de *Bambusa nutans*, Yasodha et al. (2008) obtiveram resultados eficientes após tratar mudas oriundas de estacas do colmo, de matrizes com 10 anos de idade, com fungicida carbendazim (Bavistin®) (0,1% e 0,05% respectivamente), 20 dias antes da coleta dos brotos que deram origem aos segmentos nodais, os quais foram submetidos a ação de Tween 20 (5 min), seguido de solução de 0,01% de estreptomicina e 0,05% de canamicina (10 min), 0,3% de cloreto de mercúrio (10 min) e finalmente enxaguados quatro vezes com água destilada esterilizada.

Jiménez et al. (2006) obtiveram resultados satisfatórios na introdução *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth a partir de segmentos nodais, de plantas mantidas em casa de vegetação, tratados com detergente Extran® (10 min), solução de sulfato de estreptomicina (Agri-mycin®) e metil-benzimidazol-carbamato (Benomyl®) (2 g L^{-1} cada) (10 min) e NaOCl (1,5%) (10 min) e cultivados em meio MS acrescido de 2 mL L^{-1} PPM™. Na assepsia, os explantes de *Bambusa tulda* Roxb., foram tratados com fungicida, mergulhados em álcool etílico 70% (20 seg) e submetidos a 0,1% de cloreto de mercúrio (10 min) (MISHRA et al., 2008). Para *Bambusa oldhamii* Munro, os segmentos nodais de plantas de 1 ano foram expostos ao álcool 95% (30 seg) e ao hipoclorito de sódio (NaOCl) (15 min) seguidos de tríplice lavagem e apresentaram 20% de contaminação microbiana (THIRUVENGADAM et al., 2011).

2.3.2 *Plant Preservative Mixture* (PPM™)

O *Plant Preservative Mixture* (PPM™) é um biocida estável ao calor que, com base na dosagem utilizada, previne ou reduz a contaminação microbiana na cultura

de tecidos vegetais (PLANT CELL TECHNOLOGIES, 2018). Os ingredientes ativos do PPM™ incluem metilisotiazolinona, cloreto de magnésio, nitrato de magnésio, benzoato de sódio e sorbato de potássio, que juntos atuam na inibição de enzimas fundamentais específicas no ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de elétrons (COMPTON; KOCH, 2001).

O PPM™ é capaz de eliminar bactérias e fungos, além de evitar a germinação de esporos e, em concentrações mais elevadas, pode eliminar a contaminação endógena em explantes (PLANT CELL TECHNOLOGIES, 2018). Estudos têm mostrado um efeito positivo do PPM™ para controlar a contaminação durante o cultivo *in vitro*, sendo a concentração adequada dependente de cada espécie de planta (HUH et al., 2015).

O uso de PPM™ em concentrações relativamente altas pode induzir efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento do tecido vegetal (HUH et al., 2015). Thomas et al. (2017), durante o cultivo *in vitro* de *Carica papaya*, observaram que a adição de PPM™ no meio de cultura reduziu substancialmente a frequência e intensidade da contaminação microbiana, no entanto afetou a sobrevivência dos explantes.

2.3.3 Meios de cultura e reguladores vegetais

Outros fatores, tais como composição do meio de cultivo e uso de reguladores do crescimento, também são considerados importantes para o sucesso da micropropagação de plantas e variam de acordo com a espécie. Entre os meios de cultura básicos mais utilizados para lenhosas nas diferentes fases da propagação *in vitro* estão: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995), WHITE (WHITE, 1943), B5 (GAMBORG et al., 1968), QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977) e WPM (LLOYD; McCOWN, 1980).

O meio MS tem sido o mais relatado na micropropagação de diferentes espécies de bambu (SINGH et al., 2013). Este meio de cultura acrescido de 8,87 µM de BAP (6-benzilaminopurina) foi eficiente na emissão de brotações em segmentos nodais de *Bambusa vulgaris* 'Striata' (RAMANAYAKE et al., 2006). Para *Bambusa tulda* Roxb., o estabelecimento da cultura por meio de segmentos nodais se deu em meio MS semissólido (0,8%) suplementado com 10 µM BAP + 0,1 µM de AIA (ácido indolacético) (MISHRA et al., 2008).

Geralmente, o ágar é utilizado como agente gelificante do meio de cultura, porém muitos pesquisadores relataram taxas mais elevadas de multiplicação de brotações em meio líquido em comparação com meio semissólido e, para bambus, em alguns casos, foi observada a presença de brotações vitrificadas na cultura em meio líquido (SINGH et al., 2013).

Para a contínua multiplicação de brotações, é necessária a adição de citocinina ao meio de cultura, e geralmente a concentração utilizada na fase de indução é suficiente para permitir o crescimento contínuo das brotações (KRUL; MOWBRAY, 1984). Para *Bambusa nutans*, o meio MS com 2,22 µM de BAP foi eficiente no estabelecimento e multiplicação de brotações (YASODHA et al., 2008). Na multiplicação contínua de *Bambusa vulgaris* "Striata", Ramanayake et al. (2006) utilizaram MS + 17,74 µM de BAP. Da mesma forma, Jiménez et al. (2006) relatam o uso de MS + 13,31 µM de BAP para *Guadua angustifolia* Kunt e, na multiplicação de *Dendrocalamus giganteus*, o uso 30 µM de BAP foi eficiente (RAMANAYAKE et al., 2008).

Assim, a cultura de tecidos *in vitro* se mostra como uma técnica promissora para a propagação e conservação genética de bambu, todavia muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas para que a técnica venha a ser utilizada comercialmente. Nos últimos anos, muitos artigos sobre a cultura *in vitro* de bambu foram publicados, entretanto alguns protocolos não se mostraram eficientes ou não se aplicavam a outros bambus, ou apresentavam ambas as situações (MUDOI et al., 2013). Além disso, outro grande desafio desta técnica está relacionado ao uso de matrizes adultas cultivadas no campo como fonte de explantes, devido à presença de microrganismos endofíticos que são limitantes para o estabelecimento de culturas *in vitro* (OPRINS et al., 2004).

2.4 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Microrganismos endofíticos são fungos, bactérias e/ou actinomicetos que, durante todo ou parte de seu ciclo de vida, invadem os tecidos das plantas vivas e causam infecções inaparentes e assintomáticas inteiramente dentro dos tecidos da planta, mas não causam sintomas da doença (WILSON, 1995). Isso os diferencia dos microrganismos fitopatogênicos (SANTOS e VARAVALLO, 2011).

Os endófitos que vivem associados aos vegetais desempenham papéis importantes, tais como a proteção das plantas contra agentes bióticos e abióticos (GARCIA et., 2015). Além disso, muitos são capazes de produzir compostos bioativos, fato que tem despertado o interesse da comunidade científica na exploração desses microrganismos para o desenvolvimento de novos produtos (NAIR e PADMAVATHY, 2014).

Na cultura de tecidos, os endófitos são geralmente considerados como contaminantes, pois o objetivo final desta técnica consiste em desenvolver plantas axênicas (NAIR e PADMAVATHY, 2014). Ao se estabelecer no meio de cultura, o contaminante compete com o material vegetal pelos nutrientes, produzindo em alguns casos substâncias tóxicas e inibindo o desenvolvimento do explante, ocasionando sua morte (SOUSA et al., 2013).

Embora os explantes sejam esterilizados superficialmente para serem utilizados na micropropagação, após alguns dias de cultivo é possível observar o crescimento de microrganismos a partir do tecido ou do explante cultivado (NAIR e PADMAVATHY, 2014). Estes microrganismos podem ser endofitícos, para os quais a esterilização de superfície é ineficiente e, se não forem controlados, podem inviabilizar o uso da técnica. Neste contexto, muitos agentes biocidas, tais como antibióticos e fungicidas, têm sido utilizados em solução para a imersão dos explantes antes do estabelecimento *in vitro* ou adicionados ao meio de cultura (ESPOSITO-POLESI, 2011).

No entanto, nem sempre tais microrganismos são prejudiciais às plantas micropropagadas (ALMEIDA et al., 2005), sendo que a eliminação de endófitos pode levar a perdas em vigor e surgimento de outros efeitos colaterais em plantas derivadas de cultura de tecidos, tais como a dificuldade das plantas micropropagadas em combater pragas e doenças em condições de campo (AZEVEDO, 1998). Nair e Padmavathy (2014) consideram que os principais fatores que influenciam na capacidade de regeneração de plantas através da cultura de tecidos são a presença de endófitos, o genótipo das plantas e as condições de cultivo. Por essa razão, é muito importante estudar a presença de endófitos naturais no cultivo *in vitro* numa perspectiva positiva (ESPOSITO-POLESI, 2011).

2.5 MORFOANATOMIA

A morfoanatomia vegetal é uma área da Botânica que estuda as estruturas externas e internas dos organismos vegetais, sendo o estudo das estruturas internas da planta objeto da anatomia (CORTEZ et al., 2016). Por meio de análises anatômicas é possível identificar estruturas em plantas, estabelecer relações destas estruturas com suas funções, assim como compreender seus mecanismos fisiológicos.

Os conhecimentos de anatomia vegetal se destacam em estudos de micropropagação, uma vez que o sucesso deste método depende das estruturas escolhidas e de sua competência na regeneração de tecidos vegetais (SILVA et al., 2005). Nesta técnica de propagação vegetativa, os estudos histológicos também são importantes para confirmar os meios de regeneração *in vitro* e para determinar a origem de embriões somáticos ou brotos (GLORIA et al., 1999).

CAPÍTULO 1

CULTURA *IN VITRO* E DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *Bambusa oldhamii*

CULTURA *IN VITRO* E DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *Bambusa oldhamii*

RESUMO

Bambusa oldhamii Munro é uma espécie de bambu lignificado de crescimento rápido e com forte apelo comercial. No Brasil, o uso dessa espécie é limitado, devido, principalmente, à baixa disponibilidade de mudas para plantios comerciais. A micropropagação é uma técnica de produção de mudas em larga escala, porém protocolos de estabelecimento de culturas assépticas são dificultados pela presença de contaminação endofítica. Sendo assim, os objetivos do estudo foram o desenvolvimento de um protocolo de estabelecimento *in vitro* de *B. oldhamii*, assim como a classificação macroscópica e identificação molecular da microbiota fúngica associada aos explantes, visando otimizar os protocolos de desinfestação. Segmentos nodais de plantas adultas cultivadas a campo foram utilizados como explantes. Esse material foi submetido a dois experimentos distintos avaliando o efeito da 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação e do Plant Preservative Mixture (PPM^{TM}) na desinfestação. No primeiro foram utilizadas concentrações de BAP de 10, 15 ou 20 µM combinadas com 1, 2 ou 3 mL L^{-1} de PPM^{TM} e, no segundo, 0; 2,5; 5 ou 7,5 µM de BAP com 4 mL L^{-1} de PPM^{TM}, ambos adicionados ao meio de cultura MS. Após 21 dias de cultivo, o uso de 4 mL L^{-1} de PPM^{TM} inibiu o crescimento bacteriano e reduziu a contaminação fúngica. A presença de BAP no meio de cultura acima de 10 µM inibiu a formação e o crescimento de brotos novos, enquanto as concentrações inferiores a 7,5 µM não tiveram efeito. A identificação molecular dos fungos endofíticos isolados durante a cultura *in vitro* indicou a presença de inúmeras espécies fúngicas, ampliando o conhecimento sobre a diversidade de fungos associados ao bambu.

PALAVRAS-CHAVE: Assepsia. 6-benzilaminopurina. PPM^{TM}.

IN VITRO CULTURE AND DIVERSITY OF ENDOPHYTIC FUNGI IN *Bambusa oldhamii*

ABSTRACT

Bambusa oldhamii Munro is a fast-growing species of woody bamboo of strong commercial appeal. In Brazil, the use of this species is limited, mainly due to the low availability of seedlings for commercial plantations. Micropropagation is a technique used for large scale production of seedlings, but protocols for the establishment of aseptic cultures are hampered by the presence of endophytic contamination. Therefore, the aims of this study were the development of an *in vitro* establishment protocol for *B. oldhamii*, as well as the macroscopic classification and molecular identification to characterize the fungal microbiota associated with the explants used. Nodal segments of adult plants grown in the field were used as explants. Two experiments were carried out to evaluate the effect of Plant Preservative Mixture (PPM^{TM}) as a biocide and of 6-benzylaminopurine (BAP) on multiplication. In the first one, 10, 15 or 20 µM of BAP was combined with 1, 2 or 3 mL L^{-1} PPM^{TM}; while in the second one, we used BAP (0, 2.5, 5 or 7.5 µM) and 4 mL L^{-1} of PPM^{TM}, both added to MS culture medium. After 21 days of culture, the use of 4 mL L^{-1} of PPM^{TM} inhibited bacterial growth and reduced fungal contamination. The addition of BAP to the culture medium above 10 µM inhibited new shoot formation and growth; while addition up to 7,5 µM did not affect these processes. The molecular identification of the endophytic fungi isolated during *in vitro* culture of *B. oldhamii* indicated the presence of numerous fungal species, increasing the current knowledge about the diversity of fungi associated with bamboo.

KEY WORDS: Asepsis. 6-benzylaminopurine. PPM^{TM}.

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do bambu é expressiva em diversos países, mas no Brasil a sua utilização é muito baixa, considerando suas potencialidades. A fim de estimular o uso desse importante recurso florestal, a Lei nº 12.484/2011 instituiu a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu - PNMCB, com o objetivo de desenvolver a cultura do bambu por meio de ações governamentais e de empreendimentos privados. Entretanto, os métodos tradicionais de propagação de bambu são incapazes de fornecer mudas em quantidades necessárias para o estabelecimento de plantios clonais para dar suporte a uma cadeia produtiva sustentada. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos eficientes de obtenção de propágulos por meio da cultura *in vitro* (SHIRIN; RANA, 2007).

Entre as espécies de bambus que apresentam potencial econômico, encontra-se *Bambusa oldhamii* Munro, espécie semitropical, nativa de Taiwan e do sul da China, que apresenta colmos eretos, de 6-12 m de altura, 3-9 cm de diâmetro, entrenós semelhantes e sem espinhos (SHOULIANG et al., 2007). Estas características favorecem seu uso na geração de produtos relacionados à madeira e na produção de brotos comestíveis (LIN et al., 2007).

A micropropagação de *B. oldhamii* tem sido relatada através de embriogênese somática (YEH; CHANG, 1986), cultura de meristemas (LIN et al., 2007) e segmentos nodais (THIRUVENGADAM et al., 2011), porém protocolos de estabelecimento *in vitro* a partir de segmentos nodais originários de plantas adultas cultivadas no campo são escassos (MUDOI; BORTHAKUR, 2009). Na cultura de tecidos das espécies de *Bambusa*, especialmente no caso de segmentos nodais, o maior problema encontrado é a presença de microrganismos endofíticos (ABDULMINAM et al., 2009) que dificulta o estabelecimento de culturas assépticas devido à alta diversidade de fungos associados a essas espécies (TYAGI et al., 2017).

Na assepsia de explantes de bambu, os agentes esterilizantes mais utilizados são o etanol, o hipoclorito de sódio (NaOCl) e o cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) (GOYAL; SEN, 2016). Além disso, para o controle do crescimento de microrganismos, a adição ao meio de cultura de antibióticos (ABDULMINAM et al.,

2009; NADHA et al., 2012), fungicidas (MISHRA et al., 2008; TYAGI et al., 2017) e biocidas (TORRES et al., 2016) tem sido relatada.

O conhecimento sobre a diversidade de microrganismos associados ao tecido vegetal permite a otimização de protocolos de assepsia visando à redução das taxas de contaminação e aumento das taxas de sobrevivência *in vitro*. Em contrapartida, dados sobre isolamento e identificação de fungos de bambus ainda são limitados (TYAGI et al., 2017). Neste sentido, estudos de microscopia eletrônica de varredura e técnicas moleculares são ferramentas que auxiliam na visualização e identificação de contaminantes endofíticos.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer *in vitro* segmentos nodais, obtidos de brotações maduras de *B. oldhamii* cultivados em campo, e identificar fungos endofíticos associados a essa espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

Brotações laterais de *B. oldhamii* foram coletadas de touceiras com nove anos de idade, não manejadas, localizadas na Estação Experimental Canguiri da UFPR, no município de Pinhais, na região metropolitana de Curitiba/PR (25°23'11.8"S 49°07'33.9"W), plantadas de forma experimental (MOGNON, 2015). O clima da região é classificado como Cfb (KOPPEN, 1918), com temperatura média de 21°C no verão e 12°C no inverno, precipitação anual média de 1500 mm e umidade relativa anual média de 87,5% (NITSCHE et al., 2019). As brotações foram colhidas em fevereiro e agosto de 2017 e utilizadas em dois experimentos distintos.

As brotações tiveram o ápice e a bainha foliar removidos e foram cortadas em segmentos nodais de 2-3 cm de comprimento, contendo uma gema dormente. Os explantes foram imersos em solução aquosa composta de 2 g L^{-1} de Cercobin® (tiofanato metílico) por 24 h e, a seguir, desinfestados com álcool 70% (1 min), $HgCl_2$ 0,1% (10 min) e NaOCl 1% (15 min), enxaguados por três vezes com água esterilizada e tiveram suas extremidades excisadas.

O meio de cultura basal continha sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e 3% de sacarose. No primeiro experimento, o meio basal foi suplementado com 0; 10; 15 ou 20 µM de BAP, combinado com 0; 1; 2 ou 3 mL L^{-1}

de *Plant Preservative Mixture* (PPM^{TM}) (PLANT CELL TECHNOLOGIES, 2017) em esquema fatorial composto por 16 tratamentos, com três repetições tendo oito explantes cada (o experimento foi realizado primeiro em setembro de 2016 e repetido em fevereiro de 2017). No segundo experimento, o meio basal foi acrescido de 0; 2,5; 5 ou 7,5 µM de BAP e 4 mL L^{-1} de PPM^{TM} em delineamento inteiramente casualizado composto por 4 tratamentos, com cinco repetições contendo oito explantes cada.

O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,8 antes da adição de 6 g L^{-1} de ágar (Synth®). Os meios foram vertidos em tubos de ensaio (10 mL) vedados com tampa plástica e autoclavados a 120ºC por 20 min. Todos os componentes do meio de cultura, inclusive o PPM^{TM}, foram adicionados antes da autoclavagem.

Após a inoculação dos explantes no meio de cultura, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 ºC na ausência de luz por 10 dias e em seguida transferidos sob luz branca fluorescente com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente 30 µmol.m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo de 16 h de luz.

2.2 Análise estatística

Após 21 dias da instalação dos experimentos, foram analisados os seguintes parâmetros: média de explantes com brotos por tratamento (MEBT), número médio de brotos por explante (NMB) e comprimento médio dos brotos (CMB) e também as porcentagens de contaminação bacteriana (CB), contaminação fúngica (CF), contaminação microbiana total (CT) e de explantes sobreviventes (SBV). Explantes com contaminação microbiana foram considerados na composição das variáveis MEBT, NMB e CMB desde que estes se apresentassem verdes e visualmente não danificados pela contaminação. Os dados de porcentagem foram transformados por $\operatorname{arc\,sen}\sqrt{(x/100)}$ para homogeneidade das variâncias, submetidos ao teste de Bartlett, seguido de análise de variância (ANOVA) e analisados por regressão polinomial com auxílio do software ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2016).

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram utilizados três explantes de aproximadamente 0,5 cm de comprimento. As amostras foram fixadas em FAA (solução de folmaldeído 47%, ácido acético e etanol 70%, 1:1:18 v/v) (JOHANSEN, 1940). As amostras foram desidratadas em etanol e posteriormente secas em ponto crítico com CO_2 (Bal-Tec CPD 030). Após metalização com ouro em metalizador (Balzers Union FL 9496 SCD 030), as imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Jeol (JSM 6360 LV), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

2.4 Identificação dos contaminantes fúngicos

Após 28 dias de cultivo *in vitro,* foi realizada a identificação dos contaminantes fúngicos dos segmentos nodais do segundo experimento. Amostras de tubos de ensaio contendo contaminação fúngica foram selecionadas e previamente classificadas por similaridade em função da forma, textura, pigmentos e coloração das colônias. Os fungos foram isolados e as colônias purificadas em meio de cultura seletivo do tipo BDA (batata + dextrose + ágar) autoclavado e cultivados em incubadora do tipo BOD, com fotoperíodo de 12 h, a 25ºC por 15 dias. As culturas foram também depositadas na coleção da Universidade Tecnológica do Paraná – Campus Ponta Grossa/PR e mantidas nas Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense – CMRP, localizado no Departamento de Patologia e Parasitologia, da Universidade Federal do Paraná.

O DNA genômico total de isolados representativos de cada morfotipo foi extraído de acordo com o protocolo de Vicente et al. (2008). A qualidade e integridade do DNA foram avaliadas após eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para a reação de amplificação (PCR) do 18S rDNA utilizou-se oligonucleotídeos (ITS1 e ITS4), com volume final de reação de 25 µL nas seguintes condições: 35 ciclos de 95°C por 5 min, 94°C por 45 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 2 min e 72°C por 7 min. Os produtos de amplificação por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% (70 v por 30 min) e corados com brometo de etídio, e visualizados em transiluminador.

Os produtos da PCR foram sequenciados através do sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems), pela empresa Myleus Biotechnology (www.myleus.com) e os produtos obtidos tratados pelo software Bioedit version 7.0

(HALL, 1999). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) visando à associação das amostras por similaridade com as sequências contidas no banco de dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da análise de variância dos dados do primeiro experimento composto pelos fatores BAP (0, 10, 15 ou 20 µM) e PPM^{TM} (0, 1, 2 ou 3 mL L^{-1}). Para nenhuma das variáveis testadas houve interação significativa entre os fatores, exceto para a taxa de explantes sobreviventes.

TABELA 1 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O EFEITO DA BAP E DO PPM^{TM} EM EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS POR 21 DIAS.

FONTES DE VARIAÇÃO	G. L.	QUADRADO MÉDIO		
		MEBT (%)	NMB	CMB (cm)
BAP	3	0,2395**	0,1389^{NS}	0,8809**
PPM^{TM}	3	0,1374*	0,0833^{NS}	0,0310^{NS}
BAP x PPM^{TM}	9	0,0742^{NS}	0,1389^{NS}	0,2414^{NS}
Resíduo	32	0,0361	0,1110	0,1145
CV (%)		36,15	38,08	47,67

FONTES DE VARIAÇÃO	G. L	QUADRADO MÉDIO			
		CB(%)	CF (%)	CT (%)	SBV (%)
BAP	3	0,0981^{NS}	0,1870**	0,0667^{NS}	0,0492^{NS}
PPM^{TM}	3	0,3565**	0,0877*	1,1930**	1,1012**
BAP x PPM^{TM}	9	0,0689^{NS}	0,0369^{NS}	0,0774^{NS}	0,0895*
Resíduo	32	0,0352	0,0286	0,0373	0,0353
CV (%)		37,31	22,20	17,19	43,04

Média de explantes com brotos por tratamento (MEBT), número médio de brotos por explante (NMB), comprimento médio dos brotos (CMB), porcentagens de contaminação bacteriana (CB), contaminação fúngica (CF), contaminação microbiana total (CT) e de explantes sobreviventes (SBV). NS = não significativo. G.L = graus de liberdade. CV = coeficiente de variação. **significativo a 1% de probabilidade. *significativo a 5% de probabilidade. Dados percentuais transformados por $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$.

As variáveis, média de explantes com brotos por tratamento (MEBT), comprimento médio dos brotos (CMB) e porcentagem de contaminação fúngica (CF) apresentaram diferenças significativas para as concentrações de BAP (0, 10, 15 ou 20 µM) (Tabela 1). Destas variáveis, apenas a média de explantes com brotos por tratamento e o comprimento médio dos brotos mostraram comportamento linear na análise de regressão (Figura 1). A variação significativa para contaminação fúngica (CF), em relação à BAP, não significa que o regulador tenha efeito sobre o crescimento microbiano, mas é possível inferir que o estresse fisiológico causado ao explante devido à presença da BAP, no meio de cultura, tenha tornado o explante mais suscetível ao desenvolvimento de fungos. Em relação à variável número médio de brotos por explante (NMB), não houve diferença significativa entre os tratamentos na análise da variância (Tabela 1).

É possível inferir que a suplementação do meio de cultura com 20 µM de BAP inibiu o desenvolvimento dos brotos em relação ao tratamento controle (sem a adição de BAP), pois o percentual médio de explantes com brotos foi reduzido de 40% para 22% (Figura 1A) e o comprimento médio dos brotos de 1,0 cm para 0,4 cm (Figura 1B). Além disso, a adição de BAP no meio de cultura nas concentrações testadas não induziu o desenvolvimento de múltiplas brotações, pois em nenhum dos tratamentos o número médio de brotos por explante foi superior a um.

A BAP tem sido utilizada amplamente na propagação *in vitro* de diferentes espécies de bambu como *Dendrocalamus asper* (ARYA; ARYA, 1997), *Bambusa ventricosa* (HUANG; HUANG, 1995), *Bambusa nutans* e *Dendrocalamus membranaceous* (YASODHA et al., 1997), *Bambusa bambos* (ARYA; SHARMA, 1998), *Bambusa glaucescens* Willd (SHIRIN; RANA, 2007), *Bambusa balcooa* Roxb. (MUDOI; BORTHAKUR, 2009), *Dendrocalamus hamiltonii* (ARYA et al., 2012) e *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) (GOYAL et al., 2015).

Prutpongse e Gavinlertvatana (1992), ao avaliarem o efeito da BAP na multiplicação *in vitro* de 54 espécies de bambu, entre elas *B. oldhamii*, sugerem que brotos podem ser obtidos diretamente a partir de segmentos nodais contendo gemas axilares jovens e utilizando meio de cultura suplementado com 22 µM dessa citocinina. Esse resultado difere do obtido no presente estudo possivelmente porque os autores utilizaram em seu estudo material juvenil, enquanto neste foram utilizadas brotações colhidas de matrizes adultas cultivadas no campo. É importante observar que a citocinina, neste caso a BAP, é um dos fatores que influencia o desenvolvimento de brotos *in vitro*, sendo que as diferentes respostas obtidas entre os estudos podem estar relacionadas também a outros fatores, como genéticos e ambientais, inerentes ao tecido vegetal utilizado como fonte dos explante.

Em relação às concentrações de PPM^{TM}, apenas as variáveis número médio de brotos por explante (NMB) e comprimento médio dos brotos (CMB) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos na análise da variância e regressão linear (Tabela 1) (Figura 2A a D). O tratamento com 3 mL L^{-1} de PPM^{TM}, comparado ao tratamento controle, mostrou o maior percentual médio de explantes com brotos por tratamento (MEBT) (Figura 2A), reduziu a contaminação bacteriana (CB) visual de 44 para 16% (Figura 2B), a contaminação fúngica (CF) de 58 para 38% (Figura 2C) e a contaminação microbiana total (CT) de 99 para 53% (Figura 2D).

FIGURA 2 - BROTOS FORMADOS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Bambusa oldhamii* APÓS 21 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BENZILAMINOPURINA (BAP). A) MÉDIA DE EXPLANTES COM BROTOS POR TRATAMENTO (MEBT). B) COMPRIMENTO MÉDIO DOS BROTOS (CMB).

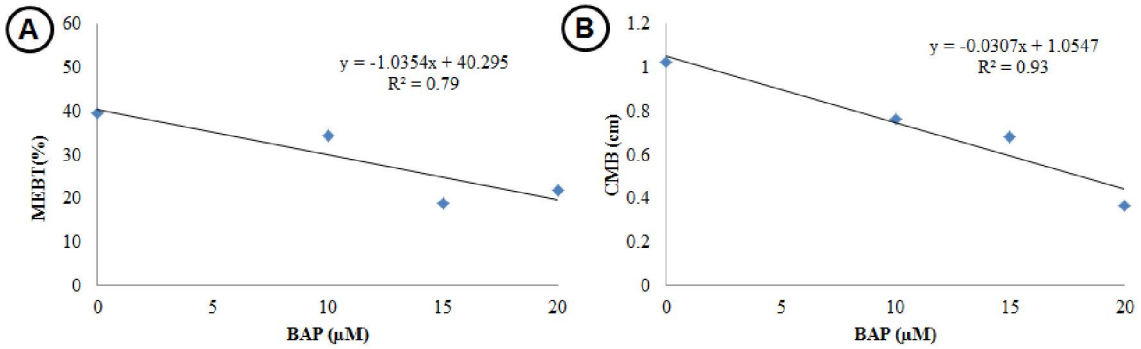
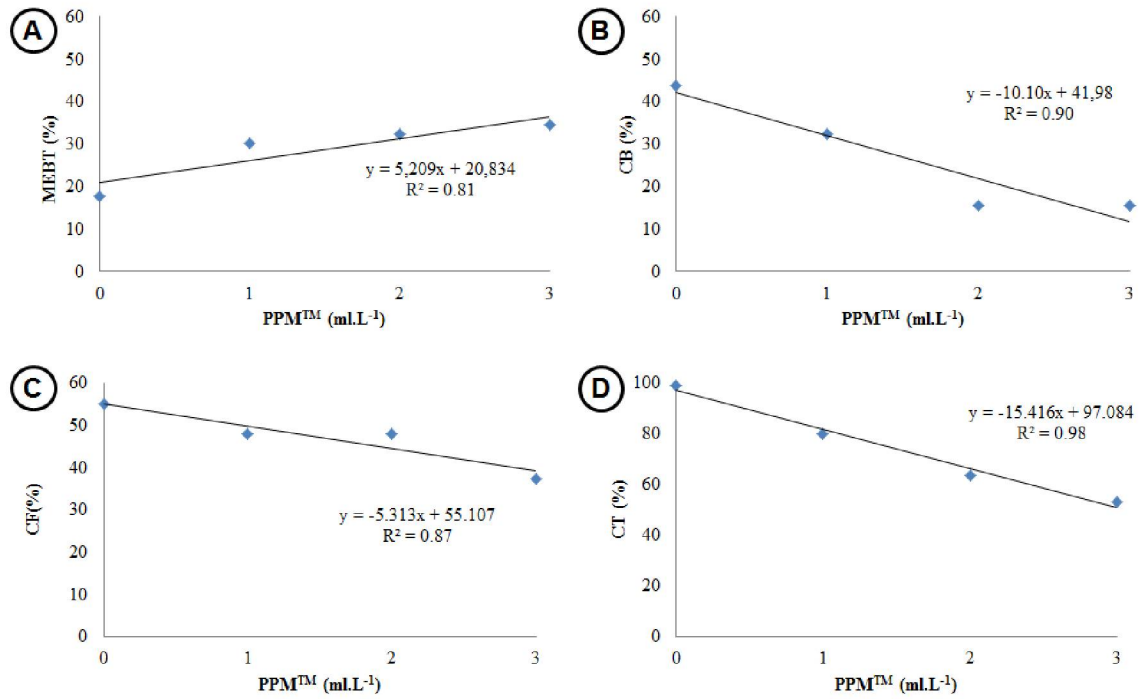


FIGURA 3 - EFEITO DO PPM^{TM} NA MÉDIA DE EXPLANTES COM BROTOS NOVOS POR TRATAMENTO E CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, EM SEGMENTOS NODAIS DE *Bambusa oldhamii* APÓS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA MS. A) MÉDIA DE EXPLANTES COM BROTOS POR TRATAMENTO (MEBT). B) PERCENTUAL DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (CB). C) PERCENTUAL DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA (CF). D) CONTAMINAÇÃO MICROBIANA TOTAL (CT).



Na micropropagação de *Bambusa oldhamii* Munro, o estabelecimento *in vitro* de culturas assépticas é uma tarefa extremamente árdua, principalmente quando se utiliza como fonte dos explantes segmentos nodais de brotações laterais de matrizes

adultas cultivadas no campo. Tal dificuldade também foi observada na micropropagação de *Bambusa balcooa*, onde a presença do contaminante endofítico impediu o sucesso do estabelecimento de culturas *in vitro* e os usos de tratamentos rigorosos com compostos antifúngicos e suplemento antimicrobiano comercial não foram totalmente eficazes (TYAGI et al., 2017).

No presente estudo, na maior concentração de PPM^{TM} utilizada foi constatada uma redução considerável da contaminação bacteriana, mas não a inibição total do desenvolvimento de fungos, que levam os explantes à morte. O uso do PPM^{TM} para o controle de contaminantes microbianos durante o cultivo *in vitro* tem sido evidenciado em diversas publicações realizadas nas duas últimas décadas, dando destaque ao uso do biocida no estabelecimento de culturas assépticas. No entanto, a existência de endofíticos tolerantes foi observada no estabelecimento *in vitro* de explantes de *Carica papaya* originários do campo (THOMAS et al., 2017).

Tal como acontece com qualquer composto antimicrobiano, existe o risco do PPM^{TM} afetar o crescimento e/ou desenvolvimento do tecido vegetal durante o estabelecimento e a manutenção da cultura *in vitro* e *in vivo* (RIHAN et al., 2012). Neste experimento, o uso do PPM^{TM} não foi prejudicial ao crescimento e/ou desenvolvimento dos explantes, pois na presença de 3 mL L^{-1} de PPM^{TM}, observou-se o maior percentual médio de explantes com brotos por tratamento (MEBT) (Figura 2A) e, para as variáveis número médio de brotos por explante (NMB) e comprimento médio dos brotos (CMB), não houve diferenças significativas quando comparadas ao tratamento controle (sem PPM^{TM}) (Figuras 2B a D). A concentração ideal de PPM^{TM} a ser utilizada depende da espécie, uma vez que seu uso em concentração relativamente alta pode ter efeitos negativos sobre o desenvolvimento do tecido vegetal (RIHAN et al., 2012).

No segundo experimento, a análise de variância não mostrou diferença significativa entre os tratamentos em relação às concentrações de BAP (0, 2,5, 5 e 7,5 µM) para as variáveis analisadas (Tabela 2). Na ausência de BAP, a média de explantes com brotos por tratamento (MEBT) foi de 68%, número médio de brotos por explante (NMB) de 1,3 e o comprimento médio dos brotos (CMB) de 3,1 cm. Já no primeiro experimento a média de explantes com brotos por tratamento (MEBT) foi de 40%, número médio de brotos por explante (NMB) de 1,0 e o comprimento médio dos brotos (CMB) de 1,0 cm. Este fato pode estar relacionado à época de coleta dos explantes e também à presença de 4 mL L^{-1} de PPM^{TM} no meio de cultura, no

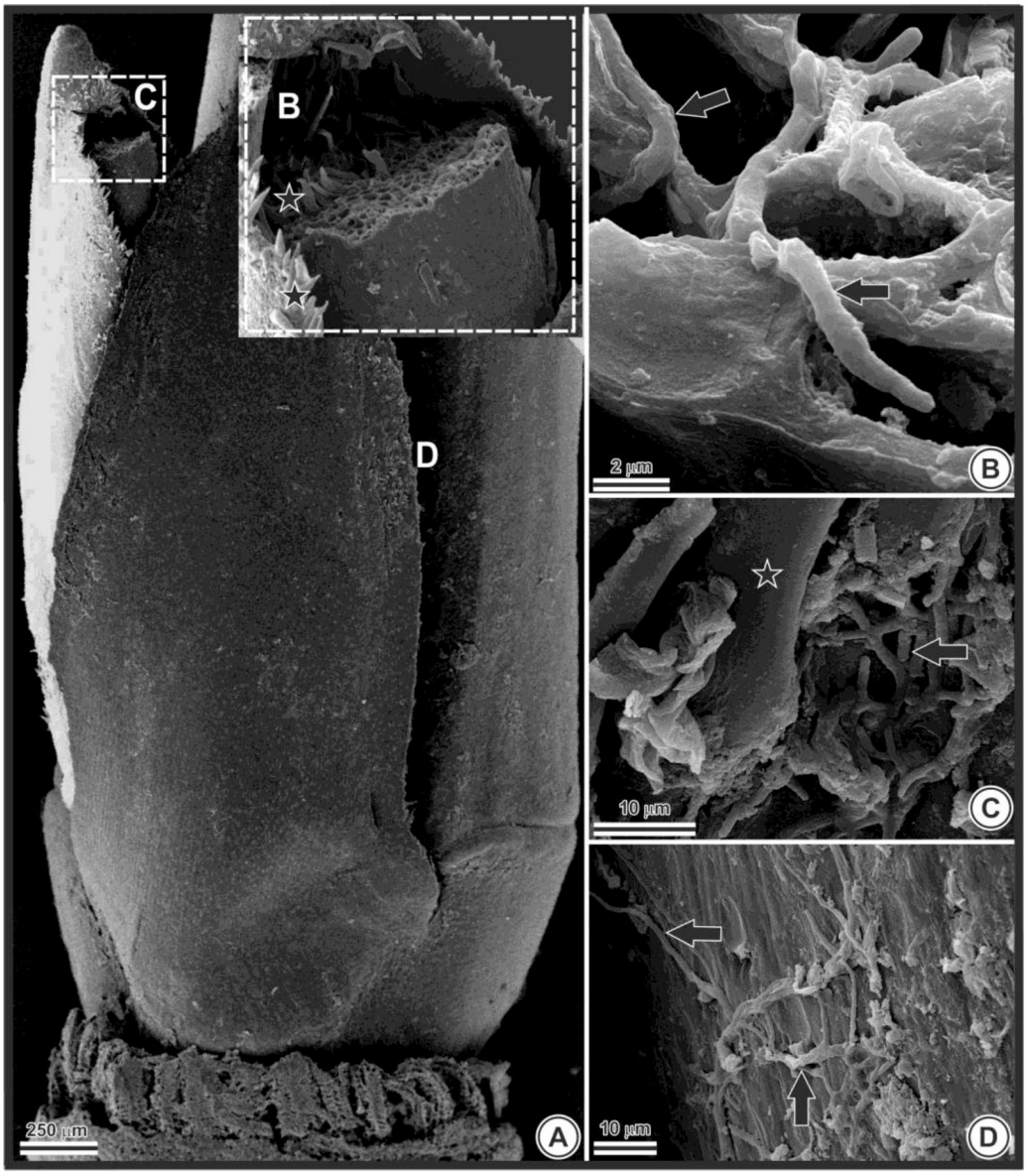
segundo experimento, que reduziu o crescimento bacteriano e propiciou um melhor desenvolvimento de brotos. Com a adição de 4 mL L^{-1} de PPM™ ao meio de cultura, não houve contaminação bacteriana, e a fúngica (determinada visualmente) foi de 49% (Tabela 2). O PPM™ é um biocida de amplo espectro que contém em sua formulação cloro-metil isotiazolinona e metil isotiazolinona (COMPTON; KOCH, 2001), indicado para eliminar células fúngicas, evitar a germinação de esporos e, em altas concentrações, eliminar a contaminação endógena em explantes numa concentração de 2 mL L^{-1} para plantas lenhosas (Plant Cell Technologies, 2018). Os dados do presente estudo indicam que o uso de 4 mL L^{-1} de PPM™ no meio de cultura semissólido, apesar de visualmente eficiente no controle do crescimento bacteriano, não apresentou a mesma eficiência no controle do crescimento fúngico.

TABELA 2 - EFEITO DA BENZILAMINOPURINA (BAP) EM EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* APÓS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA MS ACRESCIDO DE 4 mL L^{-1} DE PPM™. MÉDIA DE EXPLANTES COM BROTOS POR TRATAMENTO (MEBT), NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR EXPLANTE (NMB), COMPRIMENTO MÉDIO DOS BROTOS (CMB), PORCENTAGENS DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA (CF). NOTA: DADOS PERCENTUAIS NÃO TRANSFORMADOS.

TRATAMENTOS	MÉDIAS			
BAP (µM)	MEBT (%)	NMB	CMB (cm)	CF (%)
0	68	1,3	3,1	43
2,5	33	1,1	3,0	55
5	60	1,2	3,3	55
7,5	55	1,2	3,4	45
Médias	54	1,2	3,2	49
CV	26,29	16,87	23,99	29,83

Ao utilizar microscópio eletrônico de varredura, observou-se hifas fúngicas nas gemas axilares (Figura 3A) tanto interna (Figuras 3B e C) quanto externamente (Figura 3D). A presença de estruturas fúngicas nos espaços intercelulares dificulta a descontaminação do tecido vegetal, diminuindo a eficácia dos protocolos de desinfestação utilizados para o controle do desenvolvimento de microrganismos *in vitro*.

FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIA DE UM EXPLANTE DE *Bambusa oldhamii* OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. A) GEMA AXILAR. AS LETRAS B, C E D NA IMAGEM INDICAM OS LOCAIS APROXIMADOS QUE FORAM AMPLIADOS NAS PRÓXIMAS IMAGENS. B) HIFAS FÚNGICAS (SETAS) ALOJADAS NO INTERIOR DAS CÉLULAS (ESTRELA). C E D) HIFAS FÚNGICAS (SETAS) ASSOCIADAS AOS TRICOMAS (ESTRELA) (C) E SOBRE A EPIDERME (D).



Considerando que, mesmo com o acréscimo de 4 mL L^{-1} de PPM^{TM} ao meio de cultura, o nível de contaminação fúngica permaneceu muito expressivo, optou-se pela identificação molecular dos contaminantes visando caracterizar a microbiota fúngica, para dar suporte ao desenvolvimento de protocolos de descontaminação mais eficazes.

Neste contexto, após 28 dias de cultivo, os explantes coletados em agosto de 2017, que apresentaram crescimento fúngico, foram categorizados em 17

morfotipos com base na distinção da colônia. Após a purificação das colônias, foi possível diferenciar 11 isolados, que foram identificados através de sequenciamento de DNA utilizando as sequências da região ITS do rDNA (Tabela 3).

TABELA 3 - ISOLADOS DE FUNGOS OBTIDOS A PARTIR DE EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* CULTIVADOS *IN VITRO*.

AMOSTRA	ESPÉCIE	N.° DO ISOLADO NA COLEÇÃO	ACESSO NO NCBI
1	*Wojnowiciella leptocarpi*	CMRP3289	NR 155973.1
2	*Diaporthe* sp.	CMRP3300	KU212356.1
3	*Diaporthe novem*	CMRP3294	MG655176.1
4	*Phaeosphariaceae* sp.	CMRP3303	MH178702.1
5	*Leptosphaeria* sp.	CMRP3291	HM042314.1
6	*Phoma herbarum*	CMRP3287	KU710251.1
7	*Fusarium* sp.	CMRP3297	HQ696071.1
8	*Fusarium graminearum*	CMRP3301	MH231314.1
9	*Arthrinium kogelbergense*	CMRP3302	MG098297.1
10	*Arthrinium kogelbergense*	CMRP3304	MG098297.1
11	*Arthrinium arundinis*	CMRP3292	MH211222.1

Atualmente, o gênero *Wojnowiciella* compreende sete espécies isoladas de manchas foliares e galhos de diferentes hospedeiros e, apesar de estarem associados a sintomas da doença, sua patogenicidade precisa ser comprovada (MARIN-FELIX et al., 2019). No entanto, as espécies do gênero *Diaporthe (Phomopsis)* têm sido frequentemente relatadas como patógenos de plantas, endófitos não patogênicos ou sapróbios, comumente isolados de uma ampla gama de hospedeiros (GOMES et al., 2013).

O isolamento de fungos endofíticos de bambus *Phyllostachys* spp. e *Sasa* spp. permitiu identificar onze estirpes da ordem Pleosporales, com vários gêneros de referência, entre eles *Leptosphaeria*, *Paraphaeosphaeria* e *Phoma* (MORAKOTKARN et al., 2007). *Phaeosphaeriaceae* é uma família grande e importante na ordem Pleosporales, que inclui patógenos de plantas economicamente importantes que podem ser endófitos ou sapróbios em hospedeiros vegetais, especialmente em monocotiledôneas como Poaceae (PHOOKAMSAK et al., 2014). Contida nesta ordem está a espécie *Phoma herbarum* Westend que em bambus está relacionada com a ocorrência de mancha foliar de phoma (MOHANAN, 1993) e a *Leptosphaeria* sp. associada aos sintomas da mancha-ocular da cana-de-açúcar (O'NEILL, 1996).

Fungos do genêro *Fusarium* e *Arthrinium* são comuns em bambus (MORAKOTKARN et al., 2007) e estão associados à ferrugem do bambu, doença

que leva à morte dos colmos (MOHANAN, 1997). No contexto de espécie, o fungo *Fusarium graminearum* tem sido relacionado a doenças no milho e no trigo, enquanto que *Arthrinium arundinis* como causador da doença da listra marrom do colmo em *Phyllostachys praecox* (CHEN et al., 2014).

Grande parte dos fungos isolados durante o cultivo *in vitro* de *B. oldhamii* são conhecidos como patógenos de plantas, entretanto os segmentos nodais foram obtidos de plantas do campo aparentemente saudáveis. Segundo Morakotkarn et al. (2007), a colonização de plantas de bambu por fungos endofíticos é extremamente frequente sendo que alguns podem atuar como patógenos latentes em partes do seu ciclo de vida.

A imersão prévia dos explantes em solução contendo 2 g L^{-1} de fungicida sistêmico Cercobin® (tiofanato metílico) por 24 h não foi eficiente no controle do crescimento dos fungos aqui descritos durante o estabelecimento *in vitro* de *B. oldhammi*. O tiofanato metílico é um metabólito terminal do carbendazim que apresenta poder residual de 7 a 15 dias (BALARDIN, 2018). Durante a micropropagação de *B. oldhamii,* o crescimento fúngico pôde ser observado após os primeiros 15 dias de cultivo, período onde o residual de tiofanato metílico diminuiu e a incidência de explantes com contaminação fúngica aumentou. O uso de fungicida carbendazim em diferentes concentrações e períodos de exposição também foi testado para a assepsia de explantes de bambu de *Bambusa balcooa* (TYAGI et al., 2017) e, assim como no presente estudo, a esterilização da superfície não conseguiu remover a contaminação.

4 CONCLUSÃO

No estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *B. oldhamii* provenientes de brotos adultos originários do campo, a adição de BAP ao meio de cultura, nas concentrações e condições do experimento, não induziram o desenvolvimento de múltiplas brotações.

A adição de 4 mL L^{-1} de PPM^{TM} ao meio de cultura é essencial para aumentar a sobrevivência dos explantes, inibir contaminação bacteriana e reduzir a contaminação fúngica.

Diversos fungos são associados a *B. oldhamii* e se desenvolvem durante o cultivo *in vitro* de segmentos nodais, entre eles: *Wojnowiciella leptocarpi*, *Diaporthe* sp*., Diaporthe novem, Phaeosphariaceae* sp., *Leptosphaeria* sp., *Phoma herbarum, Fusarium* sp., *Fusarium graminearum, Arthrinium kogelbergense* e *Arthrinium arundinis*. A identificação molecular destes microrganismos permitirá a indicação de fungicidas específicos que controlem o crescimento de fungos durante a micropropagação.

CAPÍTULO 2

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro A PARTIR DE MATRIZES CULTIVADAS A CAMPO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro A PARTIR DE MATRIZES CULTIVADAS A CAMPO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA

RESUMO

Durante a micropropagação de bambus, a etapa de estabelecimento de explantes *in vitro* é dificultada pela presença de microrganismos associados em tecidos oriundos de matrizes do campo. O objetivo do presente estudo foi identificar isolado bacteriano endofítico visando estabelecer um protocolo eficiente de assepsia de explantes de *Bambusa oldhamii* oriundos de plantas do campo. Os explantes foram expostos subsequentemente a álcool etílico 70%, 1% de hipoclorito de sódio (NaOCl), 0,1% de cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), tiofanato-metílico (Cercobin®) e digliconato de clorexidina (Riohex 2%®) em diferentes combinações, e introduzidos em meio MS acrescido ou não de 4 mL L^{-1} de *Plant Preservative Mixture* (PPM™), em sete tratamentos distintos. A assepsia e imersão dos explantes no meio de cultura líquido contendo 4 mL L^{-1} de PPM™ inibiram visualmente o crescimento de bactérias e fungos, permitiram o desenvolvimento de brotações com comprimento médio de 2,2 cm e posteriores subcultivos. O sequenciamento do 16S rDNA possibilitou identificar o isolado bacteriano como *Ralstonia* com 100% de similaridade para o gênero, e as análises filogenéticas o agruparam com *Ralstonia pickettii.* Além disso, a bactéria se mostrou sensível a 4 mL L^{-1} de PPM™ pelo teste de concentração mínima inibitória. Conclui-se que culturas assépticas de *B. oldhamii*, podem ser estabelecidas a partir de segmentos nodais, oriundos de plantas do campo, em meio MS líquido acrescido de 4 mL L^{-1} de PPM.

PALAVRAS-CHAVE: Assepsia. Bambu. PPM™; *Ralstonia*.

IN VITRO ESTABLISHMENT OF *Bambusa oldhamii* Munro EXPLANTS FROM FIELD TREES AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA

ABSTRACT

During the micropropagation of bamboos, the establishment stage is hampered by the presence of microorganisms in plant tissues derived from field conditions. Thus, the aim of the present study was to identify endophytic bacteria and to establish an efficient protocol of disinfection for *Bambusa oldhamii* explants from field plants. The explants were exposed to 70% ethyl alcohol, 1% sodium hypochlorite (NaOCl), 0.1% mercuric chloride ($HgCl_2$), thiophanate-methyl (Cercobin®) and chlorhexidine digluconate (Riohex 2%®) in different combinations and introduced into MS culture medium supplemented or not with 4 mL L^{-1} of Plant Preservative Mixture (PPM™), totaling seven different treatments. Asepsis and immersion of the explants in the liquid culture medium containing 4 mL L^{-1} of PPM™ visually inhibited bacterial and fungal growth, allowed the development of shoots with a mean length of 2.2 cm and posterior subcultures. The sequencing of 16S rDNA allowed to identify the bacterial isolate as *Ralstonia* with 100% similarity to the genus and the phylogenetic analyzes grouped it with *Ralstonia pickettii*. The bacterial isolate was sensitive to 4 mL L^{-1} of PPM™, confirmed by the test of minimum inhibitory concentration. We conclude that aseptic cultures of *B. oldhamii* nodal segments can be established from field plants, in liquid MS medium plus 4 mL L^{-1} PPM.

KEY WORDS: Asepsis. Bamboo. PPM™. *Ralstonia*.

1 INTRODUÇÃO

Bambus são gramíneas da família Poaceae, subfamília Bambusoideae, que inclui cerca de 1.575 espécies distribuídas principalmente em países tropicais e subtropicais (SINGH et al., 2013). De crescimento rápido e folhas perenes, são amplamente utilizados como recursos renováveis com diversos fins comerciais, tais como construção civil, indústria de papel e celulose, têxtil, alimentos e produção de bioenergia (SANDHU et al., 2017). Entre as espécies de bambus cultivados, encontra-se *Bambusa oldhamii* Munro que se destaca pela resistência à seca, além de produzir brotos comestíveis e colmos lenhosos que correspondem a 75% da proporção da biomassa do total da planta (SANQUETTA et al., 2015).

Os bambus são propagados por sementes e também vegetativamente por rizomas e estacas do colmo (SINGH et al., 2013). No entanto, a propagação seminífera é dificultada pelos longos ciclos de florescimento, baixa viabilidade das sementes, comportamento gregário da planta, além da formação de mudas altamente heterogêneas (AZZINI; ARANHA, 1982; SINGH et al., 2013). A dificuldade da propagação vegetativa por rizomas e estaquia do colmo está relacionada ao desmantelamento da touceira e ao custo para obtenção de mudas de estacas adultas. Para a propagação massal (> 500.000 plantas por ano), as técnicas clássicas são em grande parte insuficientes e ineficientes, e a cultura de tecidos figura como uma excelente alternativa para a obtenção de mudas em grande escala (GIELIS; OPRINS, 2002).

Thiruvengadam et al. (2011), durante a micropropagação de segmentos nodais de *B. oldhamii* de um ano de idade, em meio MS líquido acrescido de 4,4 µM de BAP, obtiveram múltiplas brotações durante a fase de multiplicação e 85% dos brotos regenerados foram enraizados em meio MS com a metade da concentração salina adicionado de 9,84 µM de ácido indol-3-butírico e 2,69 µM de ácido α-naftalenoacético. Todavia um protocolo de micropropagação a partir de explantes de plantas adultas ainda não foi descrito para essa espécie. A contaminação endógena é um dos principais desafios para o cultivo *in vitro* destes tecidos, especialmente quando se utilizam explantes oriundos diretamente do campo (GIELIS et al., 2001; OPRINS et al., 2004). Esse tipo de explante apresenta grandes espaços intercelulares e cavidades, permitindo que agentes contaminantes, como bactérias e

fungos, se instalem profundamente, não sendo eliminados pelos tratamentos de assepsia (SANDHU et al., 2017).

Para o controle do crescimento de bactérias e fungos no estabelecimento de plantas *in vitro*, o uso do agente biocida *Plant Preservative Mixture*^{TM} (PPM^{TM}) tem sido indicado, em concentrações variáveis por espécie, tais como, 3,5 mL L^{-1} para *Ilex paraguariensis* e 2 mL L^{-1} para *Ficus carica* (PLANT CELL TECHNOLOGIES, 2018).

O desenvolvimento de protocolos de estabelecimento *in vitro* de plantas adultas se faz necessário, uma vez que indivíduos superiores com características desejáveis podem ser encontrados em estado natural. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi a caracterização molecular de bactéria associada ao tecido vegetal e o estabelecimento de um protocolo de descontaminação eficiente de explantes de brotações primárias de plantas adultas de *B. oldhamii* oriundos do campo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e estabelecimento *in vitro*

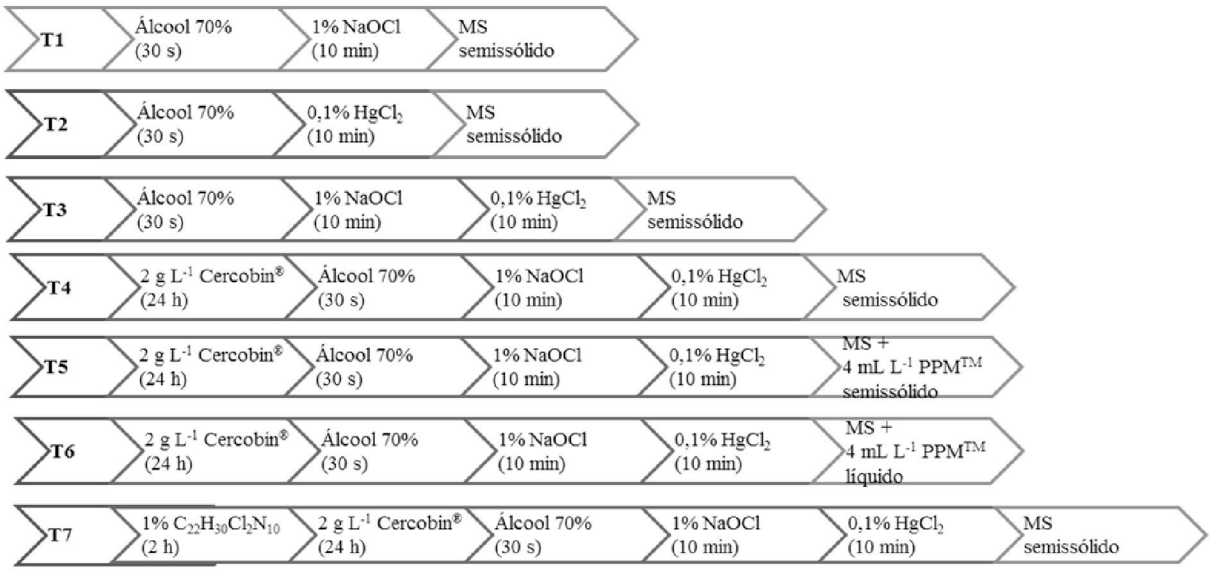
Brotações primárias de plantas adultas de *B. oldhamii,* coletadas em dezembro de 2017 na Estação Experimental da UFPR, localizada em Pinhais, PR, Brasil (25°23'11.8"S 49°07'33.9"W), foram utilizadas como fonte dos explantes. As brotações tiveram o ápice excisado e a superfície descontaminada com algodão embebido em álcool 70%. Os brotos de 2-7 cm de diâmetro foram excisados em segmentos nodais de 3 cm de comprimento, contendo um nó cada, expostos a sete tratamentos, utilizando diferentes combinações no uso de álcool 70% (30 s), 1% de hipoclorito de sódio (NaOCl) (10 min), 0,1% de cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) (10 min), 2 g L^{-1} de tiofanato-metílico (24 h) e 1% de digliconato de clorexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) (Riohex 2%®) (2 h) (Figura 4). Após a assepsia, os explantes foram enxaguados três vezes com água esterilizada.

O meio de cultura foi composto por sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g L^{-1} de sacarose e, nos tratamentos T5 e T6, foi suplementado com 4 mL L^{-1} de Plant Preservative Mixture (PPM^{TM}). O pH foi ajustado em 5,8 e 6 g L^{-1} de ágar (Synth®) foi adicionado, exceto no tratamento T6 (meio líquido). A seguir,

foram vertidos 10 mL de meio de cultura em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) e os tubos autoclavados a 120°C por 20 minutos.

As unidades experimentais foram organizadas em delineamento inteiramente casualizado, composto por sete tratamentos, com quatro repetições de seis tubos de ensaio cada. Após 21 dias de cultivo *in vitro,* foi avaliado o percentual de explantes que apresentaram crescimento bacteriano, fúngico e microbiano total, emissão de brotações, número médio de brotos por explante e comprimento das brotações neoformadas. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ para homogeneidade das variâncias, e submetidos ao teste de Bartlett, à análise da variância e, quando significativos, comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do software Assistat® (SILVA; AZEVEDO, 2016).

FIGURA 5 - TRATAMENTOS UTILIZADOS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii*.



2.2 Isolamento e caracterização molecular de bactérias associadas

A fim de validar a eficiência dos tratamentos de assepsia no controle do crescimento bacteriano associado, 100 mg de brotações de explantes visualmente assépticas e obtidas *in vitro* foram destacadas dos explantes, esmagadas, solubilizadas em solução salina 0,85% de NaCl e mantidas refrigeradas por 24h. Em seguida, alíquotas de 1 mL deste extrato foi inoculado em meio de cultura LB (SAMBROOK et al., 1989), incubado a 29°C por 24h e o crescimento bacteriano

avaliado. Os isolados obtidos foram plaqueados em meio ágar nutriente (composto por extrato de carne, peptona, extrato de levedura, cloreto de sódio e ágar bacteriológico), incubados a 29°C por 24h e, em seguida, purificados, utilizando a técnica de esgotamento de alça por estriamento.

A extração do DNA bacteriano total foi realizada por meio do kit comercial *UltraClean® Microbial DNA Isolation*, e o DNA extraído foi avaliado quali-quantitativamente mediante a eletroforese em gel de agarose a 1% e espectrofotômetro Nanodrop 1000, respectivamente.

A reação de amplificação (PCR) do 16S rDNA foi feita utilizando os oligonucleotídeos 27F (5′AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3′) e 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') e teve volume final de 25 µL, sendo realizada nas condições a seguir: 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 40 s, 55°C por 2 min e 72°C por 1 min, e 72°C por 10 min (KLINDWORTH et al., 2013). As reações de PCR foram purificadas em Sephadex G-50 fine (GE Healthcare) e, a seguir, tanto o produto da amplificação quanto o da purificação, foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,6%.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* v 3.1 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante, e submetidas ao sequenciamento em ABI PRISM® 3700 DNA (GOMES et al., 2016). A partir dos dados obtidos, as sequências foram editadas, utilizando o software Bioedit version 7.0 (HALL, 1999). Foram submetidas a similaridade no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) para caracterização em nível de gênero. A seguir, foram alinhadas com auxílio do software MAFFT version 7 (KATOH et al., 2017) e submetidas a análises filogenéticas no software MEGA7 (KUMAR et al., 2016) pelo Método da Máxima Verossimilhança com 1.000 repetições de *bootstrap* implementadas no modelo evolutivo de Kimura (1980).

2.3 Sensibilidade das estirpes bacterianas ao PPM™

Os isolados foram inoculados em meio Ágar-Nutriente líquido e colocados sob agitação a 120 rpm por 24 h. Após o período de crescimento foi preparada a suspensão bacteriana de 1,5 x 10^6 células mL^{-1}, de acordo com padrões estabelecidos na escala McFarland. Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana

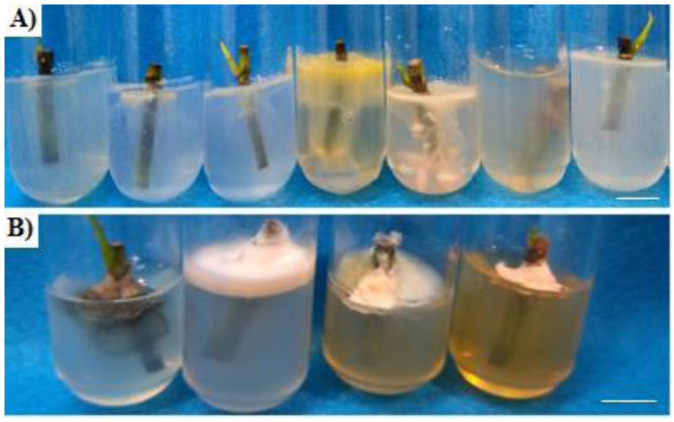
foram inoculados em Ágar-Nutriente acrescido de 1, 2, 4, 6 e 8 mL L^{-1} de PPM™ e as placas incubadas a 29 °C por 24 h. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada como a menor concentração de PPM™ que inibiu o crescimento bacteriano visível.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento *in vitro*

Os explantes obtidos de ramos primários de plantas adultas cultivadas no campo apresentaram crescimento bacteriano e fúngico quando cultivados *in vitro*, ocasionando a sua morte (Figura 5). Porém, a redução da taxa de contaminação visual pôde ser obtida com o uso do $HgCl_2$ (T2) e do biocida PPM™ (T5 e T6) (Tabela 4).

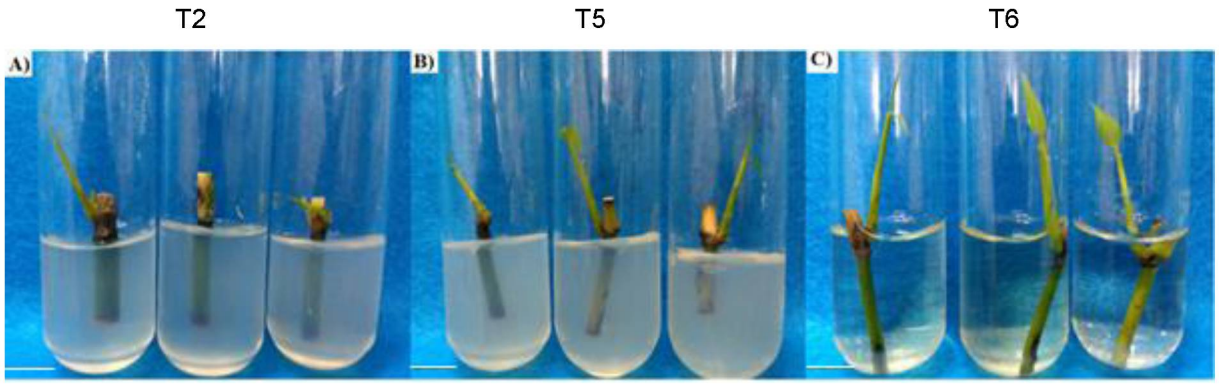
FIGURA 6 - EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* INDICANDO CRESCIMENTO (A) BACTERIANO E (B) FÚNGICO APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS DE ASSEPSIA E CULTURA *IN VITRO* POR 21 DIAS. BARRA: 1 cm.



Após 21 dias de cultivo, 56% dos segmentos nodais introduzidos *in vitro* emitiram em média um broto sem diferença estatística entre os tratamentos para as variáveis percentual de explantes que emitiram brotos e número médio de brotos por explante (dados não mostrados). As menores taxas de crescimento microbiano foram observadas nos explantes dos tratamentos T2, T5 e T6, não diferindo entre si (Tabela 4). Destes, os explantes dos tratamentos T5 e T6 formaram novos brotos

com maior comprimento e diferença significativa em comparação com T2 (Tabela 4) (Figura 6).

FIGURA 7 - EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* VISUALMENTE LIVRES DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA E/OU FÚNGICA AOS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*.



A) T2. Imersão em álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min. B) e C) T5 e T6. Imersão em 2 g L^{-1} de tiofanato-metílico por 24 h, álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min, 1% de NaOCl por 10 min. T2 em meio MS e T5 e T6 em MS acrescido de 4 mL L^{-1} de PPM^{TM}. T6 líquido e os demais semissólidos. Barra: 1 cm.

No tratamento T2 (Figura 6A), a contaminação microbiana total foi de 12% e o comprimento médio das brotações de 0,8 cm (Tabela 4), sendo considerado eficiente no controle da contaminação; no entanto, o uso de 0,1% de $HgCl_2$ por 10 min nesse tratamento teve efeito tóxico ao tecido vegetal, pois o comprimento de brotações foi menor quando comparado ao dos tratamentos T5 e T6 (Tabela 4). No tratamento T2 foi possível observar os efeitos do $HgCl_2$ nos explantes, visto que apenas neste tratamento este biocida foi utilizado de forma isolada, após a imersão em álcool 70%.

Na fase inicial do cultivo *in vitro* de *Bambusa balcooa*, o uso de 0,1% de $HgCl_2$ por 10 min juntamente com antibióticos e fungicidas se mostrou eficiente e as taxas de contaminação foram reduzidas em 80% (RAY et al., 2017), resultado semelhante ao obtido neste estudo, onde a contaminação microbiana total foi reduzida em 88% (Tabela 4 – T2).

TABELA 4 - EFEITO DE TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *Bambusa oldhamii* NO CRESCIMENTO BACTERIANO, FÚNGICO E TOTAL, E COMPRIMENTO DAS BROTAÇÕES NOVAS.

TRATAMENTO	CRESCIMENTO BACTERIANO (%)	CRESCIMENTO FÚNGICO (%)	CRESCIMENTO MICROBIANO TOTAL (%)	COMPRIMENTO DOS BROTOS NEOFORMADOS (cm)
T1	17 B	46 A	63 AB	1,4 AB
T2	8 B	4 B	12 C	0,8 B
T3	8 B	25 AB	33 BC	1,4 AB
T4	58 A	0 B	58 AB	1,1 B
T5	0 B	13 B	13 C	2,3 A
T6	4 B	0 B	4 C	2,2 A
T7	75 A	8 B	83 A	1,4 AB
CV(%)	6,72	6,73	6,83	8,69

T1. Imersão em álcool 70% por 30 s, 1% de NaOCl por 10 min. T2. Imersão em álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min. T3. Imersão em álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min, 1% de NaOCl por 10 min. T4, T5 e T6. Imersão em 2 g L^{-1} de tiofanato-metílico por 24 h, álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min, 1% de NaOCl por 10 min. T7. Imersão em 1% de digliconato de clorexidina por 2 h, 2 g L^{-1} de tiofanato-metílico por 24 h, álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min, 1% de NaOCl por 10 min.
Tratamentos T1, T2, T3, T4 e T7 em meio MS e T5 e T6 em MS acrescido de 4 mL L^{-1} de PPM^{TM}, sendo T6 líquido e os demais semissólidos. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O $HgCl_2$ é um sal de mercúrio inorgânico solúvel em água que penetra nos tecidos por lipossolubilidade (MICARONI et al., 2000). Em plantas, a toxidade do mercúrio está relacionada com sua capacidade de substituir o magnésio na molécula de clorofila, afetando diretamente as reações de fotossíntese; também pode inibir o transporte de água na via transcelular, visto que muitas aquaporinas são sensíveis a esse metal (PATRA; SHARMA, 2000; GASPAR, 2011). Devido à sua toxidade e acúmulo na cadeia alimentar, os resíduos de mercúrio devem ser acondicionados corretamente e encaminhados a empresas de reciclagem licenciadas pelos órgãos ambientais competentes para que seja realizado o descarte correto.

O $HgCl_2$ é utilizado com frequência como agente biocida em explantes de bambu, sendo a concentração e o tempo de exposição variáveis de acordo com a espécie. Choudhary et al. (2017) testaram $HgCl_2$ no estabelecimento *in vitro* de culturas assépticas de *Bambusa balcooa* e obtiveram as menores taxas de contaminação e maiores taxas de sobrevivência (87%) com o uso de 0,1% de $HgCl_2$ por 6,5 min. A exposição dos explantes ao $HgCl_2$, nesta mesma concentração, foi eficiente para a descontaminação em *Dendrocalamus strictus* (NADGIR et al., 1984), *Bambusa tulda* (MISHRA et al., 2008) e *Dendrocalamus asper* (BANERJEE et al., 2011). Outras concentrações de $HgCl_2$ e tempos de exposição têm sido citados, tais

como 0,3% por 10 min para *Dendrocalamus giganteus* (RAMANAYAKE; YAKANDAWALA, 1997) e 0,1% por 20 min para *Bambusa vulgaris* (NDIAYE et al., 2006).

O tratamento T5 foi visualmente eficaz no controle do crescimento bacteriano, não apresentando nenhum explante contaminado (Figura 6B). O sucesso deste tratamento no controle da contaminação bacteriana, aparentemente, não se deve ao protocolo de desinfecção superficial, já que este foi o mesmo utilizado no tratamento T4, no qual a contaminação microbiana total foi de 58% e não diferiu estatisticamente dos tratamentos que apresentaram maiores taxas de contaminação microbiana total (T1 e T7). O efeito benéfico observado no tratamento T5 se deve à presença de 4 mL L^{-1} de PPM^{TM} suplementado ao meio de cultura semissólido. Segundo Jiménez et al. (2006), o acréscimo de concentrações menores (2 mL L^{-1}) de PPM^{TM} ao meio de cultura semissólido não permitiu o controle da contaminação *in vitro* durante a fase de estabelecimento a partir de explantes de plantas cultivadas no campo de *Guadua angustifolia*.

O êxito encontrado no controle da contaminação pela presença do PPM^{TM} no tratamento T5 é limitado, visto que esse biocida inibe o crescimento bacteriano no meio de cultura, mas não o desenvolvimento de contaminação fúngica na região do nó, posicionada acima da superfície do meio de cultura, e que frequentemente pode ser observado após os primeiros 15 dias de cultivo e culmina na morte dos explantes (Figura 7). Torres et al. (2016) também acrescentaram PPM^{TM} (2 mL L^{-1}) ao meio de cultura semissólido no estabelecimento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* e não observaram diferença significativa entre os tratamentos com ou sem PPM^{TM} no controle da contaminação fúngica.

FIGURA 8 - CRESCIMENTO FÚNGICO (SETA) NA REGIÃO NODAL EM EXPLANTE DE *Bambusa oldhamii* DESCONTAMINADO POR IMERSÃO EM 2 g L^{-1} DE TIOFANATO-METÍLICO POR 24 h, ÁLCOOL 70% POR 30 s, 0,1% DE $HgCl_2$ POR 10 min, 1% DE NaOCl POR 10 min E CULTIVADO POR 21 DIAS EM MEIO MS SEMISSÓLIDO ACRESCIDO DE 4 mL L^{-1} DE PPM^{TM}. BARRA: 1 mm.

No tratamento T6 (Figura 6C), 4% dos explantes apresentaram crescimento bacteriano e nenhuma contaminação fúngica. Neste tratamento, os explantes foram submetidos à mesma assepsia do tratamento T4, e introduzidos em meio de cultura líquido acrescido de 4 mL L^{-1} de PPM™, onde permaneceram submersos por 21 dias. A imersão completa dos explantes nas condições supracitadas possibilitou o contato do PPM™ com a superfície total do tecido vegetal, inibindo o desenvolvimento de bactérias (4% de contaminação) e fungos (0%), após 21 dias de cultivo (Tabela 4). Este tratamento permitiu o desenvolvimento das gemas e a obtenção de brotações de comprimento médio de 2,2 cm (Tabela 4) e posteriores subcultivos em meio de cultura acrescido de 4 mL L^{-1} de PPM™, sendo considerado o mais indicado para o estabelecimento *in vitro* de *B. oldhamii*.

O PPM™ é um biocida/fungicida de amplo espectro para uso na cultura de tecidos vegetais (PLANT CELL TECHNOLOGY, Inc., USA). Entre os compostos ativos que constituem a formulação do PPM™ estão a cloro-metil isotiazolinona e a metil isotiazolinona (COMPTON; KOCH, 2001; HUH et al., 2015). As isotiazolinonas são biocidas eletrofílicos que inibem a atividade de enzimas desidrogenases que atuam no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons, impedindo funções metabólicas como respiração celular e geração de ATP (WILLIAMS, 2007).

A ineficiência do tratamento T7 no estabelecimento *in vitro* foi confirmada pela presença de crescimento bacteriano no meio de cultura LB inoculado com extrato de brotos de *B. oldhamii*, de segmentos nodais visualmente descontaminados, ou seja, no tratamento T7, os brotos visualmente assépticos mantinham a contaminação bacteriana endofítica mesmo depois dos procedimentos de assepsia. A presença de bactérias endofíticas em material vegetal aparentemente descontaminado pode ser explicada pelo fato destes contaminantes

estarem localizados nos espaços intercelulares onde a penetração e a concentração dos biocidas podem ser reduzidas com o conteúdo aquoso do tecido, dificultando a sua erradicação (MIYAZAKI et al., 2010).

Além disso, no tratamento T7, 75% das amostras se encontravam visualmente contaminadas com bactérias, enquanto que nos demais a porcentagem de contaminação bacteriana foi igual ou inferior a 58% (Tabela 4). A diferença do procedimento de desinfestação utilizado no tratamento T7 em relação aos tratamentos T5 e T6 está no uso de 1% do tensoativo digliconato de clorexidina por duas horas e este não foi eficiente no controle da contaminação. Este fato provavelmente ocorre devido à incompatibilidade do digliconato de clorexidina com cloretos, que levou à inibição de outros biocidas presentes no protocolo ($HgCl_2$ e NaOCl), elevando o porcentual de crescimento bacteriano no meio de cultura. O digliconato de clorexidina é um antisséptico químico, antifúngico e bactericida, que se mostra menos eficaz com os microrganismos Gram-negativos (HIGIOKA; BARZOTTO, 2013).

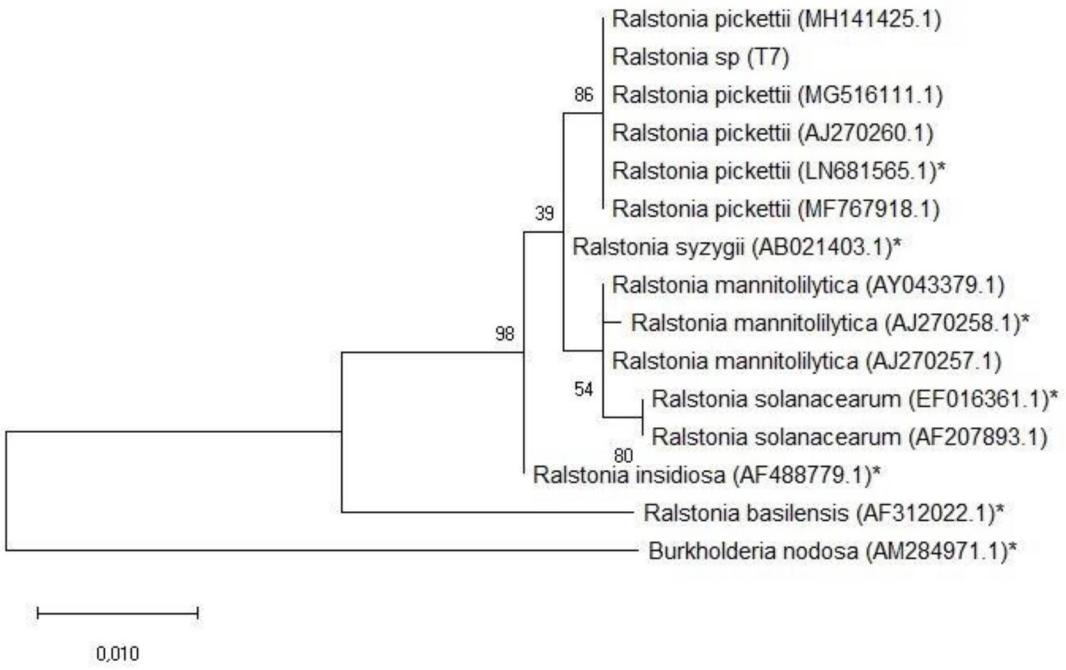
Bactérias que colonizam os tecidos das plantas sadias sem causar sintomas óbvios ou danos evidentes ao hospedeiro são definidas como endofíticas (BACON; HINTON, 2007) e podem permanecer localizadas no ponto de entrada ou se espalhar por toda a planta (HALLMANN et al., 1997). Esses microrganismos têm sido isolados de espécies tais como carvalho, pereira, beterraba, milho (LODEWYCKX et al., 2002) e também em bambus (YUAN et al., 2015; RAY et al., 2017). No isolamento das referidas bactérias, um protocolo comum consiste na esterilização superficial dos tecidos da planta seguida de maceração e plaqueamento em meio de cultura nutritivo (EEVERS et al., 2015).

3.2 Identificação de bactéria associada

Com base na análise da região 16S rDNA, o isolado obtido no tratamento T7 (imersão em 1% de digliconato de clorexidina por 2 h, 2 g L^{-1} de tiofanato-metílico por 24 h, álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min, 1% de NaOCl por 10 min) foi identificado como pertencente ao gênero *Ralstonia* com 100% de similaridade, a partir de análises geradas pelo banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information). Este gênero é composto de duas sublinhagens, sendo uma delas a linhagem de *Ralstonia pickettii* formada por *R. pickettii*, *R.*

mannitolilytica, *R. solanacearum* e a linhagem de *R. eutropha* formada por *R. eutropha*, *R. gilardii*, *R. paucula*, *R. oxalatica*, *R. taiwanensis*, *R. basilensis*, *R. metallidurans* e *R. campinensis* (COENYE et al., 2003). A taxonomia intraespecífica de *Ralstonia* sofreu um processo de revisão que tem permitido o estudo do seu relacionamento filogenético, evolutivo e da variabilidade (SILVEIRA et al., 2005).Na árvore filogenética (Figura 8), o isolado bacteriano obtido do tratamento T7, denominado neste estudo como *Ralstonia* sp (T7), ficou agrupado juntamente com *Ralstonia pickettii*, indicando caracterização molecular em nível de espécie. *Ralstonia pickettii* é um bacilo aeróbio, Gram negativo, oxidase-positivo, não fermentativo, encontrado na água e no solo (GILLIGAN et al., 2003). Estudos filogenéticos de isolados bacterianos também identificaram similaridade de *Ralstonia pickettii* (NR_114126) com endofíticas em sorgo doce cv. FS501 (FRETES et al., 2018). Entretanto, há necessidade de análises moleculares utilizando outros *primers* a fim de validar os dados da literatura e de outros genes já previamente analisados.

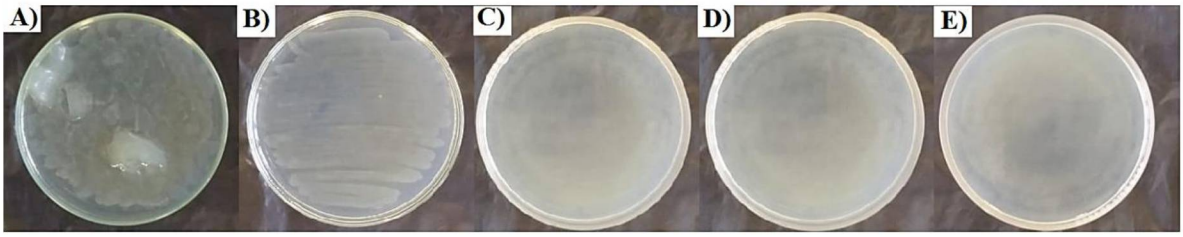
FIGURA 9 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ISOLADO DE *Ralstonia* sp (T7), OBTIDO DE EXTRATO DE BROTAÇÕES DE *Bambusa oldhamii*. RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO DETERMINADO PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA. * ESPÉCIE DE REFERÊNCIA. ( ) NÚMERO DO ACESSO NO NCBI.



O isolado de *Ralstonia pickettii* foi submetido ao teste de MIC para PPM^{TM} nas concentrações de 1, 2, 4, 6 e 8 mL L^{-1}, e 99,9% da população bacteriana teve

seu crescimento inibido por concentrações ≥ a 4 mL L^{-1} (Figura 9). A mesma concentração inibiu o desenvolvimento de bactérias no meio de cultura durante o cultivo *in vitro*.

FIGURA 10 - ISOLADOS DE *Ralstonia* sp (T7) SUBMETIDOS AO TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) DE PPM^{TM}. A)1 mL L^{-1}; B) 2 mL L^{-1}; C) 4 mL L^{-1}; D) 6 mL L^{-1} e E) 8 mL L^{-1}.



4 CONCLUSÃO

Segmentos nodais de *B. oldhamii* obtidos a partir de brotações primárias de plantas adultas originárias do campo podem ser eficientemente estabelecidos *in vitro*, após assepsia (imersão em 2 g L^{-1} de tiofanato-metílico por 24 h, álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min, 1% de NaOCl por 10 min) e cultivo submerso em meio MS líquido, acrescido de 4 mL L^{-1} de PPM^{TM}. Essa técnica possibilita a obtenção de brotações livres de contaminações por fungos e bactérias após 21 dias de cultivo.

B. oldhamii apresenta contaminação com bactéria endofítica agrupada filogeneticamente com *Ralstonia pickettii*, que se mostrou sensível a 4 mL L^{-1} de PPM^{TM}.

CAPÍTULO 3

ORGANOGÊNESE *IN VITRO* E MORFOANATOMIA DE *Bambusa oldhamii*

ORGANOGÊNESE *IN VITRO* E MORFOANATOMIA DE *Bambusa oldhamii*

RESUMO

Diversos fatores influenciam o cultivo *in vitro* de bambus. Dentre eles podem ser mencionados os aspectos genéticos e ambientais relacionados à planta matriz e aos explantes, como a posição na planta doadora, tipo e tamanho. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho de segmentos nodais de *Bambusa odhamii* Munro de diferentes comprimentos e diâmetros no desenvolvimento de brotações laterais durante o cultivo *in vitro* e caracterizar suas estruturas morfoanatômicas. Explantes assépticos com 1, 2 e 3 cm de comprimento e 2-3, 3-5 e 5-7 mm de diâmetro foram combinados em esquema fatorial e cultivados por 21 dias em meio de cultura MS líquido e posteriormente subcultivados em MS acrescido de 4,4 µM de thidiazuron (TDZ). Explantes de 2 e 3 cm de comprimento e 2-3 mm de diâmetro apresentaram 100% de sobrevivência e em média uma brotação de 1,1 cm de comprimento, após 21 dias de cultivo. Na presença de 4,4 µM de TDZ no meio de cultura, explantes de 2 cm de comprimento e 5-7 mm de diâmetro formaram em média quatro brotos vigorosos, de 2,73 cm de comprimento, por segmento nodal, após 35 dias. As análises anatômicas dos explantes mostraram tecidos completamente desenvolvidos e zonas meristemáticas na região nodal, com gemas pré-formadas, além de compostos fenólicos, ligninas e grãos de amido. Em conclusão, o comprimento e o diâmetro dos segmentos nodais influenciam diretamente a formação de brotações novas e as análises anatômicas mostram a presença de tecidos meristemáticos e diferenciados que comprovam a competência dos explantes para a micropropagação.

PALAVRAS-CHAVE: Bambu. Tamanho dos explantes. TDZ.

ORGANOGENESIS AND MORPHOANATOMICAL STUDIES IN *Bambusa oldhamii*

ABSTRACT

Several factors affect *in vitro* cultivation of bamboos. Among them the genetic and environmental aspects related to the matrix plant and the explants, such as the position in the donor plant, type and size can be mentionned. In this context, the aim of the present study was to evaluate the development of lateral shoots from nodal segments of *Bambusa odhamii* Munro of different lengths and diameters during the *in vitro* culture and characterize their morpho-anatomical structures. Aseptic explants 1, 2 and 3 cm in length and 2-3, 3-5 and 5-7 mm in diameter were combined in a factorial scheme, cultured for 21 days in a liquid MS culture medium and subcultured five times for 35 days in MS plus 4.4 µM thidiazuron (TDZ), liquid and semi-solid, alternately. The explants 2 and 3 cm in length and 2-3 mm in diameter showed 100% survival and had an average of one shoot per bud, of 1.1 cm in length, after 21 days of culture. In the presence of 4.4 µM TDZ in the culture medium, explants of 2 cm in length and 5-7 mm in diameter formed a mean of four vigorous shoots, of 2.73 cm in length, by nodal segment, after 35 days. The anatomical analyzes of the explants showed fully developed tissues and meristematic zones in the nodal region, with neoformed buds, the presence of phenolic compounds, lignins and starch grains. In conclusion, the length and diameter of the nodal segments directly affect the formation of new shoots and the anatomical analyzes show the presence of meristematic and differentiated tissues that proves the competence of the explants for micropropagation.

KEY WORDS: Bamboo. Explant size. TDZ.

1 INTRODUÇÃO

Existem cerca de 1500 espécies de bambus, em 87 gêneros, encontradas em diversas regiões tropicais, subtropicais e temperadas ao redor do mundo (ZACHARIAH et al., 2016). Entre essas espécies destaca-se *Bambusa oldhamii* (sin. *Leleba oldhamii*, *Dendrocalamopsis oldhamii*), pertencente à família Poaceae, de rizoma simpodial e amplamente cultivada em Taiwan (HSIEH et al., 2010; YEH et al., 2013). Conhecida popularmente como "bambu-gigante", apresenta colmos eretos e resistentes, de aproximadamente 20 m de altura e 10 cm de diâmetro, sendo indicada para uso na construção civil, barreiras acústicas, quebra-vento, além de produzir brotos comestíveis de excelente sabor (MULATU et al., 2016).

Os métodos tradicionais de propagação de bambus por estaquia e via seminífera são limitados, sendo o segundo dificultado principalmente pelos longos e imprevisíveis ciclos de floração. Neste sentido torna-se necessário uma abordagem alternativa para o desenvolvimento de protocolos eficientes e reprodutíveis de propagação (ANAND et al., 2013). A micropropagação oferece vantagens substanciais sobre as técnicas clássicas quando se objetiva a propagação de bambus de forma clonal e em larga escala (SINGH et al., 2013).

A cultura de tecidos *in vitro* pode ser realizada por diversas vias, como por exemplo, a partir de segmentos nodais (PUROHIT et al., 2011). Este tipo de explante apresenta grande potencial para organogênese em bambus devido à intensa atividade celular, pois o segmento nodal, além do meristema lateral presente no nó, contém meristemas intercalares, localizados na base das folhas em monocotiledôneas (DODSWORTH, 2009).

O processo de organogênese *in vitro* é influenciado por vários fatores genéticos e ambientais (HUSAINI et al., 2011), tais como genótipo, estágio fisiológico da planta doadora, fonte do explante, posição do explante na planta doadora, densidade de explantes presentes no meio de cultivo e tamanho do explante (YILDIZ, 2012). De acordo com Sandhu et al. (2017), em bambus, o diâmetro dos explantes desempenha um papel expressivo na indução e no crescimento de brotações.

As respostas obtidas durante o cultivo *in vitro* também podem estar relacionadas aos níveis endógenos de hormônios vegetais presentes em diferentes tecidos da planta. Entre estes estão as citocininas, que afetam muitos processos

fisiológicos e de desenvolvimento (KUMAR; REDDY, 2011). As citocininas estimulam a divisão celular e regulam o tamanho de brotos, número de primórdios foliares, desenvolvimento de folhas e podem influenciar tanto a diferenciação quanto o crescimento das gemas axilares (LE BRIS, 2017).

O thidiazuron (TDZ) é um derivado sintético da fenilureia capaz de estimular tanto atividades do tipo citocinina quanto auxina durante a morfogênese *in vitro* (LOMIN et al., 2012; OSUGI; SAKAKIBARA, 2015). A sua vantagem, em comparação com as citocininas de aminopurinas, é a maior eficiência na superação dos hábitos de crescimento monopodial, estimulando o desenvolvimento de brotações axilares (NOVIKOVA; ZAYTSEVA, 2018).

As citocininas desencadeiam respostas fisiológicas principalmente por meio da regulação da expressão gênica, onde um sistema de dois componentes, formado por proteínas receptoras transmembranas do tipo histidina quinase realizam autofosforilação e iniciam uma série de reações de fosfotransferência para fatores de transcrição. Este processo conduz a transdução do sinal da citocinina para os genes-alvo, em resposta a estímulos ambientais (OSUGI; SAKAKIBARA, 2015). O grupo tiadiazol do TDZ ocupa o mesmo sítio de ligação em histidina quinase que as citocininas naturais. Neste caso, a porção fenil do tiadiazol liga-se ao receptor imitando o anel de adenina e estabelecendo interações polares muito similares àquelas observadas nos complexos do tipo adenina (HOTHORN, 2012).

Análises histológicas, morfológicas e ultraestruturais também podem auxiliar na caracterização do processo de regeneração do tecido *in vitro*, para que as melhores condições de crescimento possam ser estabelecidas, permitindo o desenvolvimento de protocolos eficientes para a indução e produção de plantas (CARVALHO et al., 2014).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho de segmentos nodais de *B. odhamii* Munro de diferentes comprimentos e diâmetros no desenvolvimento de brotos laterais durante o estabelecimento *in vitro* e caracterizar suas estruturas morfoanatômicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As amostras foram coletadas na Estação Experimental Canguiri, localizada em Pinhais, PR, Brasil (25°23'11.8"S 49°07'33.9"W), no mês de fevereiro de 2018. Os explantes utilizados nos experimentos foram obtidos de brotos primários de colmos do ano, de diferentes touceiras adultas de *B. oldhamii* com dez anos de idade, cultivadas no campo, em plantio experimental conduzido por Mognon (2015).

Os brotos foram processados no Laboratório de Micropropagação, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade da UFPR, onde tiveram o ápice e a bainha foliar descartados. Em seguida, foram descontaminados com algodão embebido em álcool 70%, seccionados em segmentos nodais, contendo uma gema dormente e submetidos à assepsia através da imersão em álcool 70% por 30s e hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% acrescido de três gotas de Tween 20 por 10 min e enxaguados três vezes em água destilada esterilizada.

Para o cultivo *in vitro,* utilizou-se formulação salina e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG; 1962) suplementada com 30 g L^{-1} de sacarose, 4 mL L^{-1} de PPM^{TM} (Plant Preservative Mixture) e o pH foi ajustado para 5,8. O meio de cultura foi vertido em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) (10 mL por tubo), vedados com tampa plástica e autoclavados a 120 ºC por 20 minutos.

2.2 Tamanho dos segmentos nodais, subcultivos na presença de TDZ e antioxidantes

Segmentos nodais de 1, 2 e 3 cm de comprimento e 2-3, 3-5 e 5-7 mm de diâmetro, contendo um nó cada (Figura 10) foram combinados fatorialmente em nove tratamentos, com quatro repetições de oito tubos de ensaio cada, e totalmente submersos em meio de cultura basal líquido. As culturas foram realizadas por 21 dias em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 ºC, sob luz fluorescente de tipo branco com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente 30 µmol.m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo de 16h.

FIGURA 11 - SEGMENTOS NODAIS DE 1, 2 E 3 cm DE COMPRIMENTO E 2-3, 3-5 E 5-7 mm DE DIÂMETRO UTILIZADOS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii*.

A seguir, os explantes sobreviventes foram transferidos para meio de cultura basal suplementado com 4,4 µM de thidiazuron (TDZ), 1 g L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP) e geleificado com 2,5 g L^{-1} de Gelrite™ ou mantido líquido (sem adição de Gelrite™) alternadamente, a cada sete dias, por cinco subcultivos de sete dias cada. A concentração de 4,4 µM de TDZ foi determinada em experimentos prévios.

O estudo da ação dos antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de 2 cm de comprimento e 3-5 mm de diâmetro fez-se mediante o acréscimo de cisteína (50 mg L^{-1}), solução antioxidante (250 mg L^{-1} de ácido ascórbico, 25 mg L^{-1} de ácido cítrico e 1 g L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP)), apenas PVP (1 g L^{-1}) ou carvão ativado (1, 2 e 4 g L^{-1}) no meio de cultura MS acrescido de 4,4 µM de TDZ.

No experimento com explantes de diferentes tamanhos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado e, aos 21 dias de cultivo, os seguintes parâmetros foram avaliados: porcentagem média de explantes sobreviventes, explantes com contaminação microbiana e explantes sobreviventes que emitiram brotos. Em relação ao efeito do TDZ no desenvolvimento de brotos, após 56 dias de

cultivo, as variáveis avaliadas foram: explantes sobreviventes, média de brotos por segmento nodal e comprimento médio do maior broto. Os dados obtidos foram transformados por $\sqrt{(x+1)}$ para homogeneidade das variâncias, submetidos ao teste de Bartlett, análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos, quando significativas, comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% com auxílio do software ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2016).

2.3 Análises morfoanatômicas

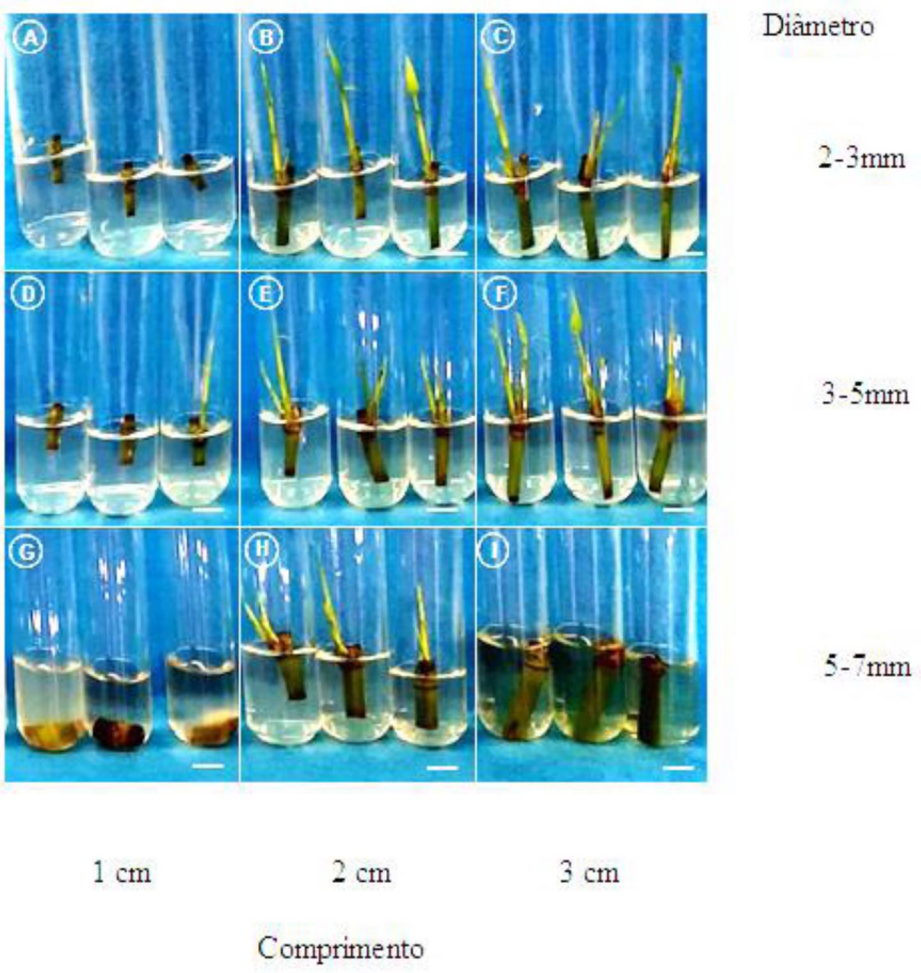
Para os estudos morfoanatômicos utilizaram-se segmentos nodais de 2-3, 3-5 e 5-7 mm de diâmetro. Amostras da região nodal, de cerca de 3 mm de espessura foram fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940), desidratadas em etanol 70% e incluídas em Historesina (Leica®), conforme instruções do fabricante. Os segmentos nodais foram seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo de rotação, com cerca de 5 µm de espessura. As lâminas foram tratadas com azul de toluidina e montadas de forma permanente com o uso de verniz vitral incolor (Acrilex®) (PAIVA et al., 2006). Amostras de materiais frescos da região nodal, cortadas a mão livre, foram submetidas a testes com cloreto férrico e lugol (ROTH, 1964) e montadas de acordo com Kaiser (1880). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX41, com câmera digital SC30-Olympus acoplada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do comprimento e diâmetro do segmento nodal

Após 21 dias do estabelecimento *in vitro*, explantes de 2 e 3 cm de comprimento e 2-3 e 3-5 mm de diâmetro (Figura 11B, 11C, 11E e 11F) e explantes de 2 cm de comprimento e 5-7 mm de diâmetro (Figura 11H) apresentaram coloração esverdeada, com brotos vigorosos, e visualmente superiores aos dos demais tratamentos. As dimensões das estacas estão relacionadas com suas condições nutricionais, sendo a quantidade de reserva energética necessária para o desenvolvimento do explante variável de acordo com o tamanho do material utilizado (PIZZATTO et al., 2011).

FIGURA 12 - EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* DE DIFERENTES COMPRIMENTOS (VERTICAL) E DIÂMETROS (HORIZONTAL) CULTIVADOS EM MEIO MS POR 21 DIAS.



Amostras A, B, C, D, E, F e H subcultivadas em meio semissólido. G) e I) Mostrados para efeito ilustrativo da contaminação (G) e escurecimento do meio de cultura (I). Barra: 1 cm.

Os fatores avaliados apresentaram interação significativa para as variáveis porcentagens médias de explantes sobreviventes, explantes com contaminação microbiana e explantes sobreviventes que emitiram brotos (Tabelas 5 e 6). A média de brotos por segmento nodal e o comprimento médio do maior broto não diferiram significativamente entre os tratamentos no cultivo inicial.

Todos os explantes sobreviveram, exceto parte dos de 1, 2 e 3 cm de comprimento e 5-7 mm de diâmetro (42, 79 e 96%) (Tabela 5). A oxidação fenólica também foi observada pelo escurecimento do meio de cultura, principalmente em explantes de maiores diâmetros (Figura 11- I). A exsudação de compostos fenólicos é um grande problema associado ao cultivo *in vitro* de bambu durante o início ou em fase de subcultivos (MUDOI et al., 2013), sendo indicado, como prevenção ou

redução, o uso de antioxidantes no meio cultural, tal como o PVP (KOUASSI et al., 2017).

Os maiores percentuais de contaminação microbiana foram obtidos em explantes de 1 cm de comprimento e 5-7 mm de diâmetro (58%), fato que levou à menor taxa de sobrevivência (42%) (Tabela 5). Nas condições testadas observou-se que quanto menor o comprimento e maior o diâmetro dos explantes, maiores foram as taxas de contaminação das amostras *in vitro*. Para este tipo de explante, a presença do biocida PPM^{TM} no meio de cultura não impediu o desenvolvimento dos microrganismos. Este resultado está possivelmente relacionado ao fato de explantes de maior diâmetro e mais maduro terem um maior tempo de exposição às condições ambientais, permitindo o desenvolvimento dos microrganismos endofíticos, limitando a eficácia dos métodos de desinfestação.

O sucesso da técnica de micropropagação tem como seu ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento *in vitro* com o maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos (oxidação) e com maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes (FERMINO Jr. et al., 2009).

TABELA 5 - SOBREVIVÊNCIA (%) EM EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* DE DIFERENTES COMPRIMENTOS E DIÂMETROS, APÓS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS.

DIÂMETRO DO EXPLANTE	COMPRIMENTO DO EXPLANTE		
	1 cm	2 cm	3 cm
2-3 mm	100aA	100 aA	100 aA
3-5 mm	92 aA	100 aA	100 aA
5-7 mm	42 bC	79 bB	96 aA
CV		1,5%	

Médias não transformadas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As maiores médias percentuais de segmentos nodais sobreviventes que emitiram brotos foram observadas em explantes de 2-3 mm de diâmetro e de 2 e 3 cm de comprimento (75 e 67% respectivamente) e estes não diferiram entre si (Tabela 6). Em bambus, o diâmetro da haste diminui ao longo da brotação primária, sendo que explantes mais finos, normalmente estão posicionados próximos à região apical. O crescimento de explantes *in vitro* pode ser afetado pelo local de onde são retirados (YILDIZ, 2012). Estacas caulinares colhidas próximas à região apical do ramo têm menor grau de lignificação, células meristemáticas com metabolismo mais

ativo e ausência ou menor quantidade de compostos fenólicos, o que facilita a emissão de brotos (HARTMANN et al., 2004).

TABELA 6 - SEGMENTOS NODAIS DE *Bambusa oldhamii* SOBREVIVENTES QUE EMITIRAM BROTOS LATERAIS (%), APÓS 21 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS.

DIÂMETRO DO EXPLANTE	COMPRIMENTO DO EXPLANTE (cm)		
	1	2	3
2-3 mm	13 aB	75 aA	67 aA
3-5 mm	17 aA	38 bA	42 aA
5-7 mm	0 aB	29 bA	4 bAB
CV		5,85%	

Médias não transformadas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nos primeiros 21 dias de cultivo *in vitro*, o meio de cultivo basal não continha reguladores de crescimento em sua formulação e o desenvolvimento de brotos estava relacionado diretamente à capacidade de resposta dos explantes, às reservas energéticas e também aos níveis endógenos de fitorreguladores. As citocininas produzidas nas raízes das plantas são normalmente transportadas via xilema para outras regiões. Desta forma, o tecido vegetal isolado *in vitro* é incapaz de sintetizar estas substâncias para sustentar o crescimento, sendo frequentemente necessária a suplementação de citocinina ao meio de cultura (GEORGE et al., 2008). Neste sentido optou-se pelo acréscimo de TDZ durante os subcultivos, visando dar continuidade aos processos de micropropagação.

O efeito do TDZ no desenvolvimento de brotos em explantes de diferentes comprimentos e diâmetros, sobreviventes do primeiro cultivo (21 dias), foi avaliado após 35 dias em meio de cultura basal, acrescido de 4,4 µM de TDZ e 1 g L^{-1} de PVP, semissólido e líquido, alternadamente, por cinco subcultivos. O acréscimo de PVP e os subcultivos contínuos a cada sete dias visaram reduzir os efeitos da oxidação fenólica.

Nestas condições, explantes de 2 e 3 cm de comprimento e 2-3 mm de diâmetro apresentaram sobrevivência acima de 50% e os resultados não diferiram significativamente entre si (Tabela 7). Nestes explantes, as gemas apresentaram aproximadamente dois brotos de comprimento médio de 3,2 cm (Tabela 7).

Explantes de 2 cm de comprimento e 5-7 mm de diâmetro, apesar de apresentarem baixas taxas de sobrevivência nos subcultivos (25%), emitiram em média quatro brotos vigorosos, de 2,7 cm de comprimento, mostrando serem potencialmente promissores para a multiplicação *in vitro* (Tabela 7) (Figura 12A).

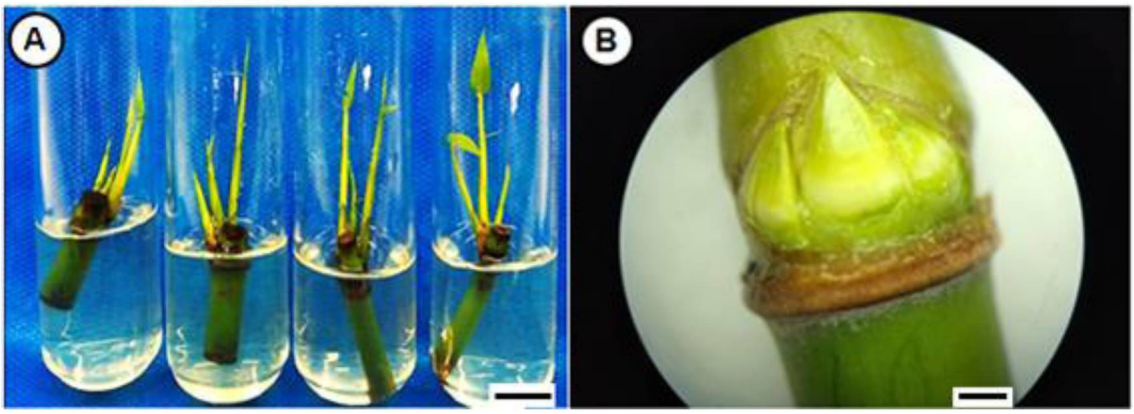
A média de brotos por segmento nodal está relacionada ao número de gemas formadas na região nodal e não é possível afirmar através deste estudo que seja unicamente uma resposta ao uso do TDZ no meio de cultura, pelo fato de que explantes de 5-7 mm de diâmetro apresentavam em média três gemas desenvolvidas, antes do estabelecimento *in vitro* (Figura 12B) e não emitiram múltiplas brotações, mesmo em contínuos subcultivos. Para compreender melhor o efeito do TDZ na emissão de brotos de *Bambusa oldhamii*, sugere-se que seja identificado antes do cultivo *in vitro* o número médio de gemas pré-formadas por segmento nodal em função do diâmetro.

TABELA 7 - SOBREVIVÊNCIA, MÉDIA DE BROTOS POR SEGMENTO NODAL E COMPRIMENTO MÉDIO DO MAIOR BROTO DE EXPLANTES DE *Bambusa oldhamii* DE DIFERENTES COMPRIMENTOS E DIÂMETROS, APÓS CINCO SUBCULTIVOS EM MEIO DE CULTURA MS ACRESCIDO DE 4,4 µM DE TDZ.

	SOBREVIVÊNCIA (%)		
DIÂMETRO DO EXPLANTE (mm)	COMPRIMENTO DO EXPLANTE (cm)		
	1	2	3
2-3	13 aB	67 aA	50 aA
3-5	17 aA	33 bA	38 aA
5-7	10 aB	25 bA	14 bB
CV		4,9%	
	MÉDIA DE BROTOS POR SEGMENTO NODAL		
DIÂMETRO DO EXPLANTE (mm)	COMPRIMENTO DO EXPLANTE (cm)		
	1	2	3
2-3	1,3 aA	1,6 bA	1,9 abA
3-5	1,3 aA	2,1 bA	2,2 aA
5-7	0,0 bB	4,1 aA	1,0 bA
CV		14,32%	
	COMPRIMENTO MÉDIO DO MAIOR BROTO (cm)		
DIÂMETRO DO EXPLANTE (mm)	COMPRIMENTO DO EXPLANTE (cm)		
	1	2	3
2-3	2,5 Aa	3,2 aA	3,2 aA
3-5	1,4 aA	2,3 aA	2,3 aA
5-7	0,0 bB	2,7 aA	0,8 bB
CV		13,39%	

Médias não transformadas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURA 13 - SEGMENTOS NODAIS DE *Bambusa oldhamii* DE 2 cm DE COMPRIMENTO E 5-7 mm DE DIÂMETRO.



A) EXPLANTES APÓS DOIS SUBCULTIVOS EM MEIO MS BASAL ACRESCIDO DE 4,4 µM DE TDZ (Barra: 1cm). B) REGIÃO NODAL CONTENDO TRÊS GEMAS FORMADAS (Barra: 1mm).

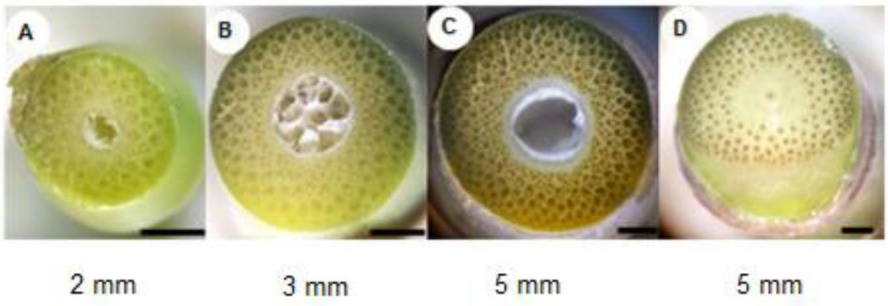
O uso do TDZ tem sido citado na literatura como capaz de induzir brotações em bambus. Hsu et al. (2000) utilizaram 0,45 µM de TDZ para a multiplicação de brotos durante os subcultivos de plântulas de *Bambusa edulis* obtidas por embriogênese somática. Lin et al. (2007) usaram esta mesma concentração no cultivo inicial de meristemas de *Bambusa oldhamii* e relatam que, nesta concentração, durante os subcultivos, a multiplicação foi lenta, as folhas tornaram-se amarelas e exibiram sintomas de murcha. Wei et al. (2015) também testaram o uso de 0,45 µM de TDZ durante o estabelecimento *in vitro* de *Bambusa ventricosa* e obtiveram aproximadamente 40% de gemas axilares brotadas. Lin e Chang (1998) conseguiram múltiplas brotações em segmentos nodais de *Bambusa edulis* utilizando de 0,045 a 27,3 µM de TDZ, com uma média de 3 a 4 brotos a cada subcultivo de 21 dias, sendo que, na presença de 27,3 µM, houve uma redução do tamanho dos brotos e incidência de vitrificação.

Outro desafio da organogênese *in vitro* de *Bambusa oldhamii* Munro é a exsudação de compostos fenólicos pelos explantes no meio de cultura. Durante o cultivo *in vitro* de segmentos nodais, o meio escurece rapidamente devido à exsudação de compostos fenólicos e exige a troca frequente dos explantes para um meio fresco, sendo ainda mais intensa em segmentos nodais de maior diâmetro. Na presença da cisteína, solução antioxidante ou carvão ativado no meio de cultura, após 21 dias de cultivo, a contaminação fúngica foi de aproximadamente 100%, o que leva a inferir que a cisteína pode ter sido degradada formando piruvato, e o ácido cítrico presente na solução antioxidante forneceu mais substrato para citrato-sintetase. Neste caso, ambos favoreceram o ciclo do ácido cítrico e

consequentemente reduziram a eficácia do PPM^{TM}; porém o carvão ativado adsorveu o biocida, fatos que ocasionaram o aumento dos níveis de contaminação, tornando-se o PVP a única, entre as alternativas testadas, que se manteve viável.

Os brotos primários de *B. oldhamii* utilizados como explantes neste estudo são eretos, com nós bem delimitados, gemas ativas, cobertas por bainha foliar, sendo ocas nos entrenós (Figuras 13A, 13B e 13C) e cheias na região nodal (Figura 13D).

FIGURA 14 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS DE *Bambusa oldhamii*. CORTES TRANSVERSAIS NO ENTRENÓ EM EXPLANTE DE 2 mm (A), 3 mm (B) E 5 mm DE DIÂMETRO (C). D) CORTE TRANSVERSAL NA REGIÃO NODAL EM EXPLANTE DE 5 mm DE DIÂMETRO. BARRA: 1mm.



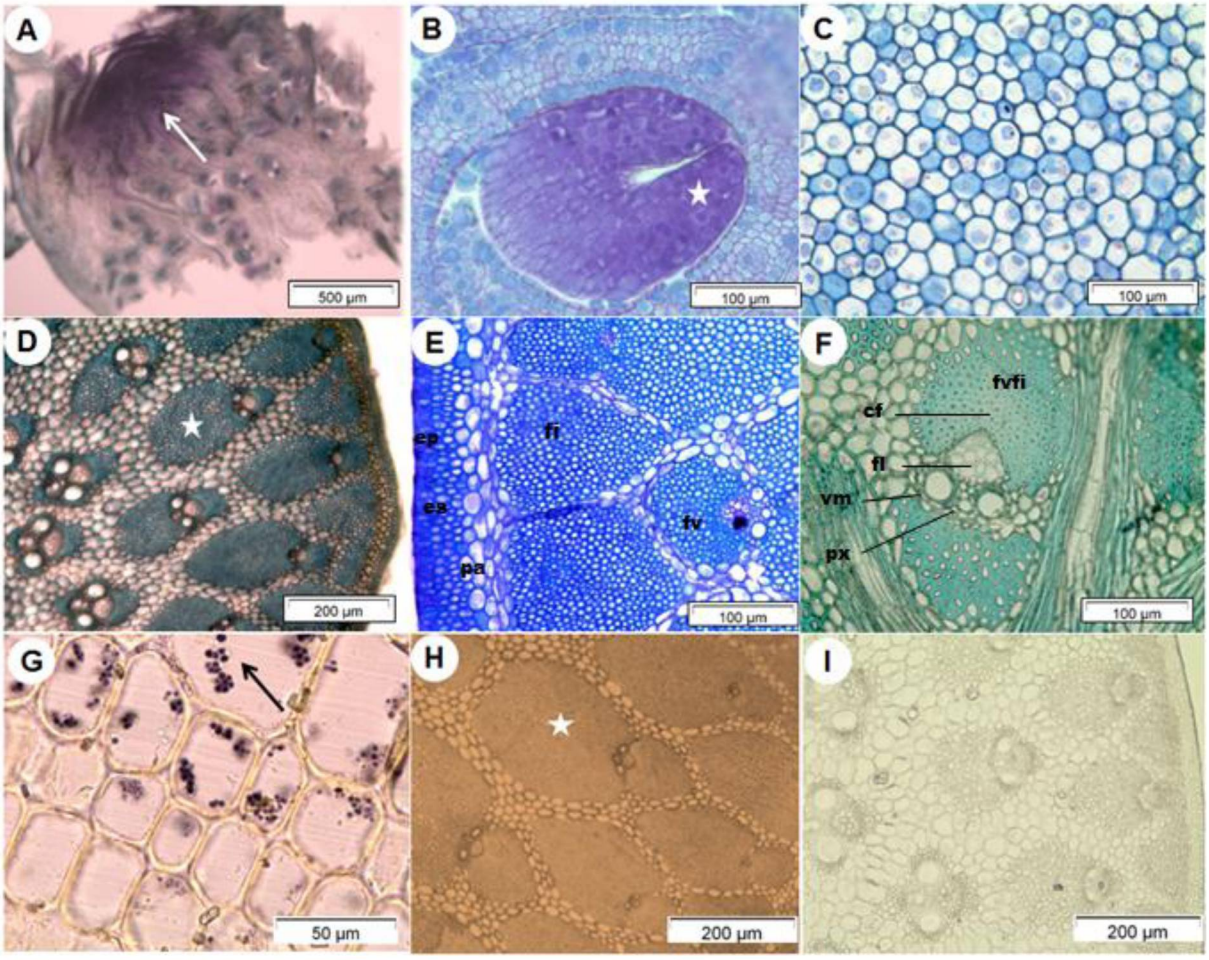
Seções transversais e longitudinais na região nodal mostram a presença de gemas envoltas em bainhas foliares (Figura 14A). Nessa região são visíveis os ápices meristemáticos ativos das gemas envolvidos por bainhas jovens constituídas de tecido em diferenciação (Figura 14B). Na organogênese, o meristema do broto desempenha duas funções: produz células para a formação de primórdios de órgãos e tecidos diferenciados do caule e, ao mesmo tempo, se mantém produzindo células indiferenciadas (JURGENS, 2003), sendo seu desenvolvimento ativo fundamental para dar origem a todas as partes aéreas do corpo da planta (CHENG et al., 2013). A medula é delimitada e constituída por células parenquimáticas com paredes primárias (Figura 14C). A epiderme do colmo é altamente lignificada e o tecido fundamental é parenquimático (Figura 14D). Na região do entrenó, a epiderme é seguida internamente por 3-4 camadas de esclerênquima e camadas de parênquima que revestem o tecido vascular (Figura 14E).

O tecido vascular é formado de feixes vasculares colaterais protegidos, na região do floema e xilema, por amplas calotas de esclerênquima (Figura 14D e

Figura 14F). Na porção mais periférica ocorrem feixes de fibras isolados (Figura 14E). Na região do entrenó, o tecido é mais lignificado, apresenta menor quantidade de parênquima e grandes feixes de fibras, que não aparecem na região nodal (dado não mostrado).

Grãos de amido foram evidenciados no parênquima (Figura 14G) e compostos fenólicos nas paredes das fibras e no parênquima (Figura 14H), nos explantes de diferentes diâmetros.

FIGURA 15 - CORTES ANATÔMICOS NA REGIÃO NODAL EM SEGMENTOS CAULINARES DE *Bambusa oldhamii*.



A) Corte longitudinal na gema axilar mostrando meristema apical (seta), em explante de 5-7 mm de diâmetro. Cortes transversais: B) Gema axilar mostrando os primórdios foliares (estrela) envoltos pelas bainhas em diferenciação e C) Medula, em explante de 3-5 mm de diâmetro. D) Feixes vasculares mais densos na região periférica e dispersos internamente, protegidos por calotas de esclerênquima (estrela), em explante de 2-3 mm de diâmetro. E) Epiderme (ep), seguida por esclerênquima (es), parênquima (pa), feixes de fibras (fi) e feixes vasculares (fv), em explante de 3-5 mm de diâmetro. F) Feixe vascular envolvido por fibras (fvfi): calota de fibras do floema (cf), floema (fl), vaso do metaxilema (vm), protoxilema (px), em explante de 5-7 mm de diâmetro. G) Presença de grãos de amido mostrada em reação com lugol (seta), em explante de 3-5 mm de diâmetro. H) Feixes

vasculares em reação com cloreto férrico (estrela), em explante de 5-7 mm de diâmetro. l) Amostra sem reação (controle).

O amido é uma importante substância de reserva e fonte de glicose no metabolismo dos carboidratos, sendo o produto desta via metabólica essencial ao Ciclo de Krebs, durante a respiração celular. Neste sentido, a presença de grãos de amido observada em explantes de todos os tamanhos pode estar relacionada com o suporte energético necessário para o desenvolvimento de brotos, fato essencial para o sucesso do protocolo de micropropagação.

No presente estudo, segmentos nodais de 5-7 mm de diâmetro, com 1 cm de comprimento apresentaram alta taxa de contaminação. Microestacas de 2 cm de comprimento tiveram o maior número de brotos por explantes (4,1) e aquelas de 3 cm apresentaram em média apenas um broto e liberaram compostos fenólicos no meio de cultura. Essa exsudação resulta no escurecimento dos explantes e envolve muitos compostos tóxicos que reduzem o crescimento e desenvolvimento e, eventualmente, podem levar à necrose celular (MURATA et al., 2001, KHOSROUSHAHI et al., 2011; KOUASSI et al., 2017).

Na região nodal, o colmo é altamente lignificado; no entanto, pode-se notar que nas gemas o tecido cortical é predominantemente parenquimático e as próprias folhas que envolvem a gema parecem ter uma estrutura delicada.

4 CONCLUSÃO

Ao estabelecer segmentos nodais de *Bambusa oldhamii in vitro,* o comprimento e o diâmetro dos explantes influenciam diretamente o desenvolvimento de brotos, sendo as maiores taxas de sobrevivência e de gemas brotadas obtidas em explantes de 2 e 3 cm de comprimento e 2-3 mm de diâmetro.

É possível obter múltiplas brotações em segmentos nodais de 2 cm de comprimento e 5 a 7 mm de diâmetro, durante os subcultivos em meio MS acrescido de 4,4 µM de TDZ.

Por meio das análises morfoanatômicas dos explantes é possível caracterizar o sistema de revestimento, córtex, feixes vasculares e medula e também a presença de zonas meristemáticas, com brotos pré-formados potencialmente aptos ao desenvolvimento. A presença de grãos de amido parece ser um fator importante no desenvolvimento de gemas, uma vez que segmentos nodais de maior sucesso na

emissão de brotos em subcultivos foram os de maior diâmetro e consequentemente com maior quantidade de reserva disponível.

CONCLUSÕES

O estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *B. oldhamii* livres de contaminações por fungos e bactérias pode ser realizado a partir de brotações primárias de plantas adultas originárias do campo, após assepsia (imersão em 2 g L^{-1} de tiofanato-metílico por 24 h, álcool 70% por 30 s, 0,1% $HgCl_2$ por 10 min, 1% de NaOCl por 10 min) e 21 dias de cultivo.

Segmentos nodais de *B. oldhamii* apresentam microrganismos associados, entre eles a bactéria endofítica agrupada filogeneticamente com *Ralstonia pickettii* e fungos com sequências gênicas similares a *Wojnowiciella leptocarpi*, *Diaporthe* sp., *Diaporthe novem, Phaeosphariaceae* sp., *Leptosphaeria* sp., *Phoma herbarum, Fusarium* sp., *Fusarium graminearum, Arthrinium kogelbergense* e *Arthrinium arundinis*.

As análises morfoanatômicas mostram o sistema de revestimento, córtex, feixes vasculares, medula e também a presença de zonas meristemáticas, comprovando a inexistência de barreiras anatômicas e a potencialidade dos explantes no desenvolvimento de brotos durante a micropropagação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na micropropagação de *Bambusa oldhamii* Munro, as dificuldades na obtenção de culturas esterilizadas comprometem o estabelecimento, a manutenção e o avanço da pesquisa para as etapas de multiplicação e enraizamento *in vitro*. Assim os experimentos realizados neste estudo, visando ao controle do crescimento microbiano, com o uso de diferentes concentrações e tempos de exposição a biocidas, são de grande relevância para a obtenção de culturas assépticas.

A micropropagação de *B. oldhamii* através de segmentos nodais é uma técnica promissora, no entanto o protocolo de cultivo ainda precisa ser otimizado. Nossos resultados mostram que a contaminação bacteriana pode ser superada com 4 mL L^{-1} de PPM^{TM}, já a eliminação dos fungos apresenta maior dificuldade, dependendo da origem do material e da época de coleta. Neste caso, a realização de novos estudos relacionados à adição de fungicidas no meio de cultura são alternativas para o controle do crescimento fúngico.

Ainda neste contexto, as análises moleculares se mostraram essenciais para a identificação de microrganismos endofíticos de *Bambusa oldhamii* Munro permitindo a realização de protocolos de desinfestação mais eficazes. Porém, estudos complementares de filogenia dos isolados fúngicos são necessários para uma identificação mais acurada. Além disso, os métodos moleculares podem auxiliar na bioprospecção de microrganismos capazes de produzir substâncias bioativas com interesse comercial e aplicações industriais.

Vencido o obstáculo da contaminação microbiana para o estabelecimento de segmentos nodais de *B. oldhamii*, outro desafio consiste na definição do tipo de explante a ser utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*. Os experimentos realizados comprovaram a influência do comprimento e do diâmetro dos segmentos nodais no desenvolvimento de brotos laterais e índices de sobrevivência, fato importante quando se busca uma maior eficiência dos cultivos.

Em bambus, a manutenção das culturas e o avanço da pesquisa na etapa de multiplicação *in vitro* também apresentam gargalos que precisam ser superados. Mostramos em nossos estudos a inexistência de barreiras anatômicas que dificultassem a emissão de brotações axilares durante a organogênese. Esse fato nos permite inferir que o desenvolvimento de multiplas brotações está relacionado aos níveis de hormônios e reguladores vegetais, das reservas energéticas dos

explantes, além ao número de gemas pré-formadas na região nodal. Sendo assim, no sentido de avançar no desenvolvimento dos protocolos de multiplicação das gemas, sugere-se a realização de novos estudos, utilizando reguladores de crescimento, buscando obter múltiplas brotações e o enraizamento *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABDULMINAM, A. H.; NIRMALA. C.; SHARMA, M. L. Control of *in vitro* contamination in bamboos. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v.10, n. 3 e 4, p. 119 – 124, 2009.

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.

ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In vitro* propagation of an edible bamboo *Bambusa bambos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 2, n. 4, p. 257 – 261, 2013.

ARYA, I. D.; ARYA, S. *In vitro* culture and establishment of exotic bamboo *Dendrocalamus asper*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 11, p. 1252 – 1255, 1997.

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.

ARYA, S.; SHARMA, S. Micropropagation technology of *Bambusa bambos* through shoot proliferation. **The Indian Forest**, v. 124, n. 9, p. 725 – 731, 1998.

AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA, Jaguariuna, 1998. p. 117-137.

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

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

BACON, C. W.; HINTON, D. M. Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. In: GNANAMANICKAM SS, editor. **Plant Associated Bacteria**, v.1. Dordrecht: Springer, 2007. p. 155 – 194.

BALARDIN, R. **Fungicidas sistêmicos: benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas.** Disponível em: <https://phytusclub.com/materiais-didaticos/fungicidas-sistemicos-benzimidazois-triazois-e-estrobilurinas/>. Acesso em: 30 jun. 2018.

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

BRASIL. Decreto-lei n.º 12.484, de 8 de setembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 set. 2011.

CARVALHO, M. A. F. et al. Induction and morpho - ultrastructural analysis of organogenic calli of a wild passionfruit. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n.6, p. 851-859, 2014.

CHEN, K. et al. First report of brown culm streak of *Phyllostachys praecox* caused by *Arthrinium arundinis* in Nanjing, China. **Plant Disease**, v. 98, n. 9, p. 274 – 1274, 2014.

CHEN, Y. et al. Identification of a NAP-like transcription factor BeNAC1 regulating leaf senescence in bamboo (*Bambusa emeiensis'Viridiflavus'*). **Physiologia Plantarum**, v. 142, n.4, p. 361 – 371, 2011.

CHENG, Z. J. et al. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. **Plant Physiology**, v. 161, p. 240 – 251, 2013.

CHOUDHARY, A. K.; PRIYANKA, K.; ASHISH, R. Refinement of protocol for rapid clonal regeneration of economical bamboo, *Bambusa balcooa* in the agroclimatic conditions of Bihar, India. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n.10, p. 450 – 462, 2017.

COENYE, T. et al. Classification of *Ralstonia pickettii-like* isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1075 – 1080, 2003.

COMPTON, M. E.; KOCH, J. M. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. **In vitro Cellular & Developmental Biology** – Plant, v. 37, p. 259 – 261, 2001.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

CORTEZ, P. A.; SILVA, D. DA C.; CHAVES, A. L. F. **Manual prático de morfologia e anatomia vegetal**. Editus, Ilhéus, 2016, 92 p.

CUSACK, V. **Bamboo world: the growing and use of clumping bamboos**. Sydney: Kangaroo Press, 1999, 224p.

DODSWORTH, S. A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. **Developmental Biology**, v. 336, p. 1 – 9, 2009.

DRANSFIELD, S.; WIDJADJA, E. Bamboos, nº 7. In: DRANSFIELD, S.; WIDJADJA, E. **Plant resources of South-East Asia**. Leiden: Backhuys, 1995, 189p.

EEVERS, N. et al. Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. **Microbial Biotechnology**, v. 8, p. 707 – 715, 2015.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

FERMINO Jr., P. C. P.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Ocidental. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 84, p. 427 – 435, 2009.

FERREIRA, F. M.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bambusoidae (Poaceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade São Paulo**, v. 27, n. 2, p. 203 – 218, 2009.

FILGUEIRAS, T. S.; SANTOS-GONCALVES, A. P. S. A checklist of the basal grasses and bamboos (Poaceae) in Brazil. **Bamboo science & culture.** Albany: American Bamboo Society, vol 18, p. 7 – 18, 2004.

FRETES, C. E. et al. Diversity of endophytic bacteria in sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) and their potential for promoting plant growth. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 11, n. 11. p. 1 – 10, 2018.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell research**, n.50, p.151 – 158, 1968.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p. 1-9, 2015.

GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.34, n.4, p.481 – 491, 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. The Background. The Netherlands: Springer, 2008, p. 205 – 226.

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

GIELIS, J.; OPRINS, J. Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos-from biotechnological dream to commercial reality. In: **Bamboo for sustainable development**. Proceedings of the V International Bamboo Congress and the VI International Bamboo Workshop, San Jose, Costa Rica, 2002. p. 333 – 344.

GILLIGAN, P. H. et al. Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, Pandoraea and Acidovorax. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A. & YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM, 2003. p. 729-748.

GLORIA, B. A. DA; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of in vitro organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.11, p.2007-2013, 1999.

GOMES, R. R. et al. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, n.1, p. 1 – 41, 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. **Biotech**, v. 5, p. 473 – 482, 2015.

GOYAL, A. K.; SEN, A. *In vitro* regeneration of bamboos, the "Green Gold": An overview**. Indian Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 9 – 16, 2016.

GPWG [Grass Phylogeny Working Group]. Phylogeny and subfamilia classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, vol. 88, p. 373-457, 2001.

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

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p. 95 – 98, 1999.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895 – 914, 1997.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: Principles and Practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2004. 880p.

HIGIOKA, A. S.; BARZOTTO, I. L. M. Desenvolvimento e controle físico-químico de sabonete líquido com digluconato de clorexidina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n.4, p. 537 – 543, 2013.

HSIEH, L. S. et al. Cloning and expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene (BoPAL2) from *Bambusa oldhamii* in Escherichia coli and Pichia pastoris. **Protein Expression and Purification**, v.71, p. 224 – 230, 2010.

HSU, Y. H. et al. A sensitive method for detecting bamboo mosaic virus (BaMV) and establishment of BaMV-free meristem-tip cultures. **Plant Pathology**, v. 49, p. 101–107, 2000.

HUANG, L. C.; HUANG, B. L. Loss of the species distinguishing trait among regenerated *Bambusa ventricosa* McClure plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, n. 1, p. 109 – 111, 1995.

HUH, Y. S. et al. Effect of biocide addition on plantlet growth and contamination occurrence during the *in vitro* culture of blueberry. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 42, p. 111 – 116, 2015.

HUSAINI, A. M. et al. Review of factors affecting organogenesis, somatic embryogenesis and *agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of strawberry. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 5, n. 1, p. 1 – 11, 2011.

ISLAM, M. S. et al. Clonal propagation of *Bambusa vulgaris* by leafy branch cuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 22, n. 3, p. 387 – 392, 2011.

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.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. London: McGraw-Hill Book Company, 1940.

JURGENS, G. Growing up green: cellular basis of plant development. **Mechanisms of Development**, v. 120, p. 1395 – 1406, 2003.

KAISER, E. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Botanisch zentralb**, p. 25 – 26, 1880.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 30, p. 1 – 7, 2017.

KHOSROUSHAHI, A. Y.; NADERI-MANESH, H.; SIMONSEN, H. T. Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. **BioImpacts**, v. 1, n. 1, p. 37 – 45, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences**. Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n.2, p.111 – 120, 1980.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n.1, 2013.

KOUASSI, K. M. et al. Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa [*Theobroma cacao* (L.)]. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n.1, p.25 – 31, 2017.

KRUL, W.R.; MOWBRAY, G.H. Grapes. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Macmillan Publishing Company, cap. 6, p 396 – 434, 1984.

KUMAR, N.; REDDY, M. P. *In vitro* plant propagation: a review. **Journal of Forest Science**, v. 27, n. 2, p. 61 – 72, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870 – 1874, 2016.

LE BRIS, M. Hormones in growth and development. IN: ROITBERG, B. D. R. **Reference Module in Life Sciences**, Burnaby, BC, Canada: Elsevier, 2017.

LIN, C. et al. Improving multiple shoot proliferation in bamboo mosaic virus-free *Bambusa oldhamii* Munro propagation by liquid culture. **Hortscience**, v. 42, n. 5, p. 1243 – 1246, 2007.

LIN. C. S.; CHANG, W. C. Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 617 – 620, 1998.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, Seattle, v.30, p.421 – 427, 1980.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583 – 606, 2002.

LOMIN, S. N. et al. Receptor properties and features of cytokinin signaling. **Acta naturae**, v. 4, n. 3, p. 31 – 45, 2012.

LONGHI-WAGNER, H. M. Poaceae: an overview with reference to Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n.1, p. 089 – 100, 2012.

LYYRA, S.; LIMA, A.; MERKLE, S. A. *In vitro* regeneration of *Salix nigra* from adventitious shoots. **Tree Physiology**, v.26, p. 969 – 975, 2006.

MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 2. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 47 – 133, 2019.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487 – 495, 2000.

MISHRA, Y. et al. A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. **Scientia Horticulturae**, v. 115, p. 315 – 318, 2008.

MIYAZAKI, J.; TAN, B. H.; ERRINGTON, S. G. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPM^{TM}). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 365 – 372, 2010.

MOGNON, F. **Avaliação comportamental do crescimento, biomassa e estoque de carbono em espécies de bambu**. 80 f. Tese (Doutorado em Manejo florestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

MOHANAN, C. **Diseases of bamboos in Asia - An illustrated manual**. International Network for Bamboo and Rattan, New Delhi, 1997. p. 106.

MORAKOTKARN, D.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, n. 1, p. 10 – 19, 2007.

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

MUDOI, K. D.; BORTHAKUR, M. *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field grown culms and scope for upscaling. **Current Science**, v. 96, n.7, p. 962 – 966, 2009.

MULATU, Y.; ALEMAYEHU, A.; TADESSE, Z. **Bamboo species introduced in Ethiopia**. Ethiopian Environment and Forest Research Institute (EEFRI), 2016.

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

MURATA, M. et al. A transgenic apple callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, n. 65383 – 388, 2001.

NADGIR, A. L. et al. Rapid multiplication of bamboo by tissue culture. **Silvae Genetica**, v. 33, p. 219 – 223, 1984.

NADHA, H. K. et al. Identification and elimination of bacterial contamination during in vitro propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n.30, p. 93 – 97, 2012.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The ScientificWorld Journal**, v. 2014, p. 1-11.

NDIAYE, A. et al. In vitro regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 13, p. 1245 – 1248, 2006.

NITSCHE, P. R. et al. **Atlas Climático do Estado do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2019.

NOVIKOVA, T. I.; ZAYTSEVA, Y. G. TDZ - Induced morphogenesis pathways in woody plant culture. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. **Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator**. Springer, Singapore, 2018. p. 61 – 94.

O'NEILL, N. R. Miscanthus blight, a new foliar disease of ornamental grasses and sugarcane incited by *Leptosphaeria sp.* and its anamorphic state *Stagonospora sp.* **Plant Disease**, v. 80, n. 9, p. 980 – 987, 1996.

OPRINS, J. et al., Micropropagation: a general method for commercial bamboo production. In: **7th World Bamboo Congress**, New Delhi, 2004.

OSUGI, A.; SAKAKIBARA, H. Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? **BMC Biology**, v. 13, n. 102, 2015.

PAIVA et al. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, 2006.

PATRA, M.; SHARMA, A. Mercury Toxicity in Plants. **The Botanical Review**, v. 66, p. 379 – 422, 2000.

PHOOKAMSAK, R. et al. Revision of Phaeosphaeriaceae. **Fungal Diversity**, n. 68, p. 159 - 238, 2014.

PIZZATTO, M. et al. Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. **Ceres**, v. 58, n. 4, p. 487 - 492, 2011.

Plant Cell Technologies. **PPM™ - Plant Preservative Mixture Product Information**. Available in: <http://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information>. Access in: 01 mai. 2018.

PRUTPONGSE, P.; GAVINLERTVATANA, P. *In vitro* micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. **Hortscience**, v. 27, n. 5, p. 453 - 454, 1992.

PUROHIT, S. D.; SILVA, J. A. T.; HABIBI, N. Current approaches for cheaper and better micropropagation technologies. **International Journal of Plant Developmental Biology**, vol. 5, n. 1, p. 1 - 36, 2011.

QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P. Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.78, p.437 - 442, 1977.

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

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'). **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 109 - 113, 2006.

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

RAY, S. S. et al. Elimination and molecular identification of endophytic bacterial contaminants during in vitro propagation of *Bambusa balcooa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, 2017.

RIHAN, H. Z.; AL-ISSAWI, M.; AL-SWEDI, F.; FULLER, M. P. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. **Scientia Horticulturae**, v. 141, p. 47 – 52, 2012.

ROTH, I. **Microtecnica vegetal**. Caracas: Universidade Central da Venezuela, 1964.
SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

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. 55, 2017.

SANQUETTA, C. R. et al. Biomassa individual de *Bambusa oldhamii* Munro e *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl. **Cerne**, v. 21, n. 1, p. 151-159, 2015.

SANTI, T. Bambu para toda obra. **O Papel**. Reportagem especial, v. 4, p. 22 - 33, 2015.

SANTOS, T. T. DOS; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SATHITSUKSANOH, N. et al. Bamboo saccharification through cellulose solvent-based biomass pretreatment followed by enzymatic hydrolysis at ultra-low cellulase loadings. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 1 - 4, 2009.

SCHMIDT, R.; LONGHI-WAGNER, H.M. A tribo Bambuseae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, p. 71 - 128, 2009.

SHIRIN, F.; RANA, P. K. In vitro plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. **Plant Biotechnology Reports**, v. 1, p. 141 - 147, 2007.

SHOULIANG, C. et al. Flora of China, Poaceae. **Systematic Biology**, v. 56, n. 2, p. 365 - 367, 2007.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733 - 3740, 2016.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SILVEIRA, J. R. P. et al. Caracterização de estirpes de Ralstonia solanacearum isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n.6, p. 615 - 622, 2005.

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.

SODERSTROM, T. R.; ELLIS, R. P. The position of bamboo genera and allies in a system of grass classification. In: SODERSTROM, T.R. et al. **Grass Systematics and Evolution.** Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1986. p. 225 - 238.

SOUSA, G. C. et al. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5,n. 1, p. 405-407, 2007.

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

TEIXEIRA, R. G.; CARNIELLO, M. A.; GUARIM NETO, G.; SOUZA, F. P. Poaceae – subfamília Bambusoideae: espécies catalogadas para o estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1086-1088, 2007.

THIRUVENGADAM, M.; REKHA, K. T.; CHUNG, I. M. Rapid *in vitro* micropropagation of *Bambusa oldhamii* Munro. **Philippines Agricultural Scientist**, v. 94, n. 1, p. 7 - 13, 2011.

THOMAS, P.; AGRAWAL, M.; BHARATHKUMAR, C. B. Use of plant preservative mixture^{TM} for establishing *in vitro* cultures from field plants: experience with papaya reveals several PPM^{TM} tolerant endophyticbacteria. **Plant Cell Reports**, v. 36, p. 1717 - 1730, 2017.

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

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

TYAGI, B.; TEWARI, S.; DUBEY, A. Biochemical characterization of fungus isolated during *in vitro* propagation of *Bambusa balcooa*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 52, p. S775 - S779, 2017.

VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p.137 - 144, 2008.

WATSON, L.; MACFARLANE, T.D.; DALLWITZ, M.J. **The grass genera of the world:** descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. Disponível em: < https://www.delta-intkey.com/grass/index.htm#citation>. Acesso em: 02 jan. 2019.

WEI, Q. et al. Establishment of an efficient micropropagation and callus regeneration system from the axillary buds of *Bambusa ventricosa.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 1, p. 1 - 8, 2015.

WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster: Jacques Cattel, 1943, 277 p.

WILLIAMS, T. M. The mechanism of action of isothiazolone biocides. **PowerPlant Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 14 - 22, 2007.

WILSON, D. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definiti. **Oikos**, v. 73, n. 2, p. 274-276, 1995.

YASODHA, R. et al. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. **Scientia Horticulturae**, n. 116, p. 113 – 116, 2008.

YASODHA, R. et al. Genetic enhancement and mass production of quality propagules of *Bambusa nutans* and *Dendrocalamus membranaceous*. **Indian Forest**, v. 123, n. 4, p.303 – 306, 1997.

YEH, M. L.; CHANG, W. C. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 73, v. 2, p. 161 - 163, 1986.

YEH, S. H. et al. Identification of genes differentially expressed during the growth of *Bambusa oldhamii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 63, p. 217 - 226, 2013.

YILDIZ, M. **The prerequisite of the success in plant tissue culture**: high frequency shoot regeneration. In: LEVA, A.; RINALDI, L. Recent advances in plant in vitro culture. London: IntechOpen, 2012. p. 63–90.

YUAN, Z.; LIU, F.; ZHANG, G. Isolation of culturable endophytic bacteria from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and 16S rDNA diversity analysis. **Archives of Biological Sciences**, v. 67, n. 3, p. 1001 - 1008, 2015.

ZACHARIAH, E. J. et al. Carbon dioxide emission from bamboo culms. **Plant Biology**, n.18, p. 400 – 405, 2016.

ZHANG, Y. J.; MA, P. F.; LI, D. Z. High-throughput sequencing of six bamboo chloroplast genomes: phylogenetic Implications for temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Plos One**, v. 6, n. 5, p. 1-16, 2011.

APÊNDICE 1 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS: CULTIVO *IN VITRO* E DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *Bambusa oldhamii*

ASSISTAT - TESTE DE BARTLETT
http://www.assistat.com

- Porcentagens de média de explantes com brotos por tratamento (MEBT)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

Tratamento	Média	Variância
1	0.55679	0.04578
2	0.46060	0.02954
3	0.34907	0.09139
4	0.12046	0.04353
5	0.61087	0.02285
6	0.65602	0.01714
7	0.24091	0.04353
8	0.70117	0.00532
9	0.78540	0.00000
10	0.65906	0.00000
11	0.56875	0.00612
12	0.21969	0.14479
13	0.74328	0.07386
14	0.69813	0.03881
15	0.46952	0.00877
16	0.56875	0.00612

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2): 119.43952
Valor crítico (alfa = 5%): 24.99580
Valor crítico (alfa = 1%): 30.57795

$X^2 > X^2(1\%)$ H0 foi rejeitada $p < 0.01$
VarMax = 0.14 VarMin = 0.00 Rvar = 13041146920

- Número médio de brotos por explante (NMB)
  - Dados originais

Tratamento	Média	Variância
1	1.00000	0.01000
2	1.00000	0.01000
3	0.66667	0.33333
4	0.33333	0.33333
5	1.00000	0.01000
6	1.00000	0.01000
7	0.66667	0.33333
8	1.00000	0.01000
9	1.00000	0.01000
10	1.00000	0.01000
11	1.00000	0.01000
12	0.66667	0.33333

13	0.66667	0.33333
14	1.00000	0.01000
15	1.00000	0.01000
16	1.00000	0.01000

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2):	35.65480
Valor crítico (alfa = 5%):	24.99580
Valor crítico (alfa = 1%):	30.57795

$X^2 > X^2(1\%)$ H0 foi rejeitada $p < 0.01$

VarMax = 0.33 VarMin = 0.01 Rvar = 33.33

- Comprimento médio dos brotos (CMB)
  - Dados originais

Tratamento	Média	Variância
1	1.33333	0.16583
2	0.97778	0.24148
3	0.30000	0.07750
4	0.23333	0.16333
5	0.95000	0.12250
6	0.65278	0.07961
7	0.63333	0.30333
8	0.50556	0.02565
9	1.10000	0.14250
10	0.58889	0.00593
11	0.89444	0.09343
12	0.06667	0.01333
13	0.71111	0.00176
14	0.84722	0.26294
15	0.90000	0.12250
16	0.66111	0.00954

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2):	17.98896
Valor crítico (alfa = 5%):	24.99580
Valor crítico (alfa = 1%):	30.57795

$X^2 < X^2(5\%)$ H0 não foi rejeitada $p > 0.05$

VarMax = 0.30 VarMin = 0.00 Rvar = 172.42

- Porcentagens de contaminação bacteriana (CB)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

Tratamento	Média	Variância
1	0.61087	0.02285
2	0.91174	0.00000
3	0.43633	0.15992
4	0.83055	0.03919
5	0.65602	0.01714

6	0.65602	0.01714
7	0.46952	0.00877
8	0.61390	0.00612
9	0.41544	0.00877
10	0.29499	0.07184
11	0.46952	0.00877
12	0.29499	0.07184
13	0.12046	0.04353
14	0.51467	0.02222
15	0.24091	0.04353
16	0.51467	0.02222

H0: As variâncias são homogêneas
Estatística do teste (X^2): 64.48634
Valor crítico (alfa = 5%): 24.99580
Valor crítico (alfa = 1%): 30.57795

$X^2 > X^2$ (1%) H0 foi rejeitada p < 0.01
VarMax = 0.16 VarMin = 0.00 Rvar = 72023438870

- Porcentagens de contaminação fúngica (CF)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

Tratamento	Média	Variância
1	0.95993	0.02285
2	0.65906	0.00000
3	1.08931	0.17786
4	0.74025	0.03919
5	0.69813	0.03881
6	0.65602	0.01714
7	1.10128	0.00877
8	0.61390	0.00612
9	0.74328	0.00532
10	0.78540	0.00000
11	0.78540	0.01596
12	0.74328	0.02128
13	0.61390	0.00612
14	0.64405	0.07590
15	0.78540	0.01596
16	0.56875	0.00612

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2): 121.52845
Valor crítico (alfa = 5%): 24.99580
Valor crítico (alfa = 1%): 30.57795

$X^2 > X^2$(1%) H0 foi rejeitada p < 0.01
VarMax = 0.18 VarMin = 0.00 Rvar = 16020333353

- Porcentagens de contaminação total (CT)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

Tratamento	Média	Variância
1	1.57080	0.00000
2	1.57080	0.00000
3	1.45034	0.04353
4	1.57080	0.00000
5	1.17658	0.12114
6	1.05612	0.02222
7	1.57080	0.00000
8	0.95689	0.00612
9	0.91174	0.00000
10	0.91478	0.01714
11	1.00204	0.00612
12	0.86962	0.00532
13	0.65602	0.01714
14	1.00204	0.28027
15	0.87266	0.03881
16	0.83055	0.03919

H0: As variâncias são homogêneas
Estatística do teste (X^2): 273.23640
Valor crítico (alfa = 5%): 24.99580
Valor crítico (alfa = 1%): 30.57795

$X^2 > X^2(1\%)$ H0 foi rejeitada $p < 0.01$
VarMax = 0.28 VarMin = 0.00 Rvar = 12622323486

- Porcentagens de explantes sobreviventes (SBV)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

Tratamento	Média	Variância
1	2.00000	1.00000
2	2.00000	1.00000
3	4.12046	0.04353
4	2.00000	1.00000
5	4.39422	0.12114
6	4.51467	0.02222
7	2.00000	1.00000
8	4.61391	0.00612
9	4.65906	0.00010
10	4.65602	0.01714
11	4.56875	0.00612
12	4.70117	0.00532
13	4.91478	0.01714
14	4.56875	0.28027
15	4.69813	0.03881
16	4.56875	0.00612

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2):	53.30538
Valor crítico (alfa = 5%):	24.99580
Valor crítico (alfa = 1%):	30.57795

$X^2 > X^2(1\%)$ H0 foi rejeitada $p < 0.01$

VarMax = 1.00 VarMin = 0.00 Rvar = 10000.00

ASSISTAT - EXPERIMENTO FATORIAL
http://www.assistat.com

- Porcentagens de média de explantes com brotos por tratamento (MEBT)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

EXPERIMENTO FATORIAL
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	3	0.41217	0.13739	3.8063	*
Fator2(F2)	3	0.71844	0.23948	6.6346	**
Int. F1xF2	9	0.66810	0.07423	2.0566	ns
Tratamentos	15	1.79871	0.11991	3.3221**	
Resíduo	32	1.15505	0.03610		
Total	47	2.95376			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	32	2.9014	3.8063	0.0193
3	32	4.4604	6.6346	0.0012
9	32	2.1890	2.0566	0.0648
15	32	2.6556	3.3221	0.0021

Fator 1 = PPM
Fator 2 = BAP

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	0.37173	b
2	0.55224	ab
3	0.55822	ab
4	0.61992	a

dms = 0.20992

Médias do fator 2

1	0.67408	a
2	0.61845	a
3	0.40706	b
4	0.40252	b

dms = 0.20992

MG = 0.52553 CV% = 36.15

Ponto médio = 0.52360

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.88992	0.00030	Não

- Número médio de brotos por explante (NMB)
  - Dados originais

EXPERIMENTO FATORIAL
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	3	0.25000	0.08333	0.7505	ns
Fator2(F2)	3	0.41667	0.13889	1.2508	ns
Int. F1xF2	9	1.25000	0.13889	1.2508	ns
Tratamentos	15	1.91667	0.12778	1.1507	ns
Resíduo	32	3.55333	0.11104		
Total	47	5.47000			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	32	0.071	0.7505	0.5301
3	32	2.9014	1.2508	0.3077
9	32	2.189	1.2508	0.3007
15	32	1.9922	1.1507	0.3557

Fator 1 = PPM
Fator 2 = BAP

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 2

1	0.91667 a
2	1.00000 a
3	0.83333 a
4	0.75000 a

dms = 0.36819

MG = 0.87500 CV% = 38.08

Ponto médio = 0.55000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.56213	0.00000	Não

- Comprimento médio dos brotos (CMB)
  - Dados originais

EXPERIMENTO FATORIAL
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	3	0.09291	0.03097	0.2706	ns
Fator2(F2)	3	2.64273	0.88091	7.6971	**
Int. F1xF2	9	2.17265	0.24141	2.1093	ns
Tratamentos	15	4.90829	0.32722	2.8591	**
Resíduo	32	3.66231	0.11445		
TOTAL	47	8.57060			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	P
3	32	0.071	0.2706	0.8461
3	32	4.4604	7.6971	0.0005
9	32	2.189	2.1093	0.0584
15	32	2.6556	2.8591	0.0061

Fator 1 = PPM
Fator 2 = BAP

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 2

1	1.02361	a
2	0.76667	a
3	0.68194	ab
4	0.36667	b

-----dms = 0.37379

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

MG = 0.70972 CV% = 47.67

Ponto médio = 0.90000

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.96678	0.18910	Sim

- Porcentagens de contaminação bacteriana (CB)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

EXPERIMENTO FATORIAL
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	3	1.06946	0.35649	10.1157	**
Fator2(F2)	3	0.29438	0.09813	2.7845	ns
Int. F1xF2	9	0.62009	0.06890	1.9551	ns
Tratamentos	15	1.98394	0.13226	3.7531	**
Resíduo	32	1.12771	0.03524		
TOTAL	47	3.11165			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	32	4.4604	10.1157	<.0001
3	32	2.9014	2.7845	0.0567
9	32	2.189	1.9551	0.0791
15	32	2.6556	3.7531	0.0008

Fator 1 = ppm
Fator 2 = bap

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	0.69737	a
2	0.59887	a
3	0.36874	b
4	0.34768	b

dms = 0.20742

MG = 0.50316 CV% = 37.31

Ponto médio = 0.52360

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.92263	0.00369	Não

- Porcentagens de contaminação fúngica (CF)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

EXPERIMENTO FATORIAL
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	3	0.26323	0.08774	3.0693 *
Fator2(F2)	3	0.56089	0.18696	6.5401 **
Int. F1xF2	9	0.33166	0.03685	1.2891 ns
Tratamentos	15	1.15578	0.07705	2.6953 **
Resíduo	32	0.91479	0.02859	
TOTAL	47	2.07057		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	32	2.9014	3.0693	0.0417
3	32	4.4604	6.5401	0.0014
9	32	2.189	1.2891	0.2808
15	32	2.6556	2.6953	0.009

Fator 1 = PPM
Fator 2 = BAP

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	0.86214	a
2	0.76733	ab
3	0.76434	ab
4	0.65303	b

dms = 0.18681

Médias do fator 2

1	0.75381	ab
2	0.68613	b
3	0.94035	a
4	0.66655	b

dms = 0.18681

MG = 0.76171 CV% = 22.20

Ponto médio = 0.96608

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.88670	0.00024	Não

- Porcentagens de contaminação fúngica (CF)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

EXPERIMENTO FATORIAL
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	3	3.57899	1.19300	31.9733	**
Fator2(F2)	3	0.20007	0.06669	1.7874	ns
Int. F1xF2	9	0.69655	0.07739	2.0742	ns
Tratamentos	15	4.47562	0.29837	7.9967 **	
Resíduo	32	1.19399	0.03731		
TOTAL	47	5.66961			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	32	4.4604	31.9733	<.0001
3	32	2.9014	1.7874	0.1694
9	32	2.189	2.0742	0.0626
15	32	2.6556	7.9967	<.0001

Fator 1 = ppm
Fator 2 = bap

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	1.54068 a
2	1.19010 b
3	0.92455 c
4	0.84032 c

dms = 0.21343

MG = 1.12391 CV% = 17.19

Ponto médio = 1.04720

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.84461	0.00002	Não

- Porcentagens de explantes sobreviventes (SBV)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}$

EXPERIMENTO FATORIAL
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	3	3.30373	1.10124	31.2453	**
Fator2(F2)	3	0.14773	0.04924	1.3972	ns
Int. F1xF2	9	0.80502	0.08945	2.5378	*
Tratamentos	15	4.25648	0.28377	8.0512	**
Resíduo	32	1.12784	0.03525		
TOTAL	47	5.38432			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	32	4.4604	31.2453	<.0001
3	32	2.9014	1.3972	0.2616
9	32	2.189	2.5378	0.0252
15	32	2.6556	8.0512	<.0001

Fator 1 = ppm
Fator 2 = bap

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	0.03011	c
2	0.38070	b
3	0.64625	a
4	0.68760	a

dms = 0.20743

Médias do fator 2

Médias de Interação

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B1	B2	B3	B4
A1	0.0000 cA	0.0000 bA	0.1205 bA	0.0000 bA
A2	0.3942 bcAB	0.5147 aA	0.0000 bB	0.6139 aA
A3	0.6591 abA	0.6560 aA	0.5688 aA	0.7012 aA
A4	0.9148 aA	0.5688 aA	0.6981 aA	0.5688 aA

dms para colunas =0.4149 dms para linhas=0.4149
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.43617 CV% = 43.04
Ponto médio = 0.52360

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.83989	0.00001	Não

SIGLAS E ABREVIAÇÕES

FV = Fonte de variação
GL = Graus de liberdade
SQ = Soma de quadrado
QM = Quadrado médio
F = Estatística do teste F
MG = Média geral
CV% = Coeficiente de variação em %
dms = Diferença mínima significativa

- Porcentagens de média de explantes com brotos por tratamento (MEBT)
  - Dados originais
  - BAP

REGRESSÃO NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - INT.CASUALIZADO
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Reg.linear	1	2835.93750	2835.93750	11.5460	**
Reg.quadra	1	208.33333	208.33333	0.8482	ns
Reg.cúbica	1	510.41667	510.41667	2.0781	ns
Tratamentos	3	3554.68750	1184.89583	4.8241	
Resíduo	44	10807.29167	245.62027		
TOTAL	47	14361.97917			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	P
1	44	7.2495	11.546	0.0014
1	44	0.001	0.848193	0.3619
1	44	4.0619	2.0781	0.1564

Eq. de regressão: y = a + b.x + c.x^2 + d.x^3 + e.x^4 + f.x^5
x = Tratamentos y = Médias dos tratamentos

a = 40.29761905
b = - 1.03571429
c = 0.00000000
d = 0.00000000
e = 0.00000000
f = 0.00000000

Coeficiente de correlação: r = 0.89002848
Coeficiente de determinação: R^2 = 0.79215070

Tratamento	Valor ou nível	Médias de trat.	Médias estimadas
1	0.00000	39.58333	40.29762
2	10.00000	34.37500	29.94048
3	15.00000	18.75000	24.76190
4	20.00000		19.58333
		21.87500	
Médias	11.25000	28.64583	28.64583

MG = 28.64583

CV% = 54.71

Ponto médio = 37.50000

- Comprimento médio dos brotos (CMB)
  - Dados originais
  - BAP

REGRESSÃO NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - INT.CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Reg.linear	1	2.53519	2.53519	18.8176	**
Reg.quadra	1	0.01021	0.01021	0.0758	ns
Reg.cúbica	1	0.09734	0.09734	0.7225	ns
Tratamentos	3	2.64273	0.88091	6.5386	
Resíduo	44	5.92787	0.13472		
TOTAL	47	8.57060			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05) ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
1	44	7.2495	18.8176	<.0001
1	44	0.001	0.075772	0.7842
1	44	0.001	0.722497	0.3998

Eq. de regressão: y = a + b.x + c.x^2 + d.x^3 + e.x^4 + f.x^5 x = Tratamentos y = Médias dos tratamentos

a = 1.05472221
b = - 0.03066667
c = 0.00000000
d = 0.00000000
e = 0.00000000
f = 0.00000000

Coeficiente de correlação: r = 0.96650635
Coeficiente de determinação: R^2 = 0.93413452

TRATAMENTOS	Valor ou nível	Médias de trat.	Médias estimadas
1	0.00000	1.02361	1.05472
2	10.00000	0.76667	0.74806
3	15.00000	0.68194	0.59472
4	20.00000	0.36667	0.44139
MÉDIAS	11.25000	0.70972	0.70972

MG = 0.70972 CV% = 51.72

Ponto médio = 0.90000

- Número médio de brotos por explante (NMB)
  - Dados originais
  - BAP

REGRESSÃO NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - INT.CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Reg.linear	1	0.50417	0.50417	4.2254	*
Reg.quadra	1	0.18750	0.18750	1.5714	ns
Reg.cúbica	1	0.03750	0.03750	0.3143	ns
Tratamentos	3	0.72917	0.24306	2.0370	--
Resíduo	44	5.25000	0.11932		
TOTAL	47	5.97917			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
1	44	4.0619	4.2254	0.0458
1	44	4.0619	1.5714	0.2165
1	44	0.001	0.314286	0.5778

Eq. de regressão: y = a + b.x + c.x^2 + d.x^3 + e.x^4 + f.x^5 x = Tratamentos y = Médias dos tratamentos

a = 0.98809524
b = - 0.01190476
c = 0.00000000
d = 0.00000000
e = 0.00000000
f = 0.00000000

Coeficiente de correlação: r = 0.71428571
Coeficiente de determinação: R^2 = 0.51020408

TRATAMENTO	Valor ou nível	Médias de trat.	Médias estimadas
1	0.00000	0.91667	0.98810
2	10.00000	1.00000	0.86905
3	15.00000	0.83333	0.80952
4	20.00000	0.66667	0.75000
MÉDIAS	11.25000	0.85417	0.85417

MG = 0.85417 CV% = 40.44

Ponto médio = 0.50000

- Porcentagens de contaminação bacteriana (CB)
  - Dados originais
  - PPM

REGRESSÃO NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - INT.CASUALIZADO
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Reg.linear	1	6125.65104	6125.65104	28.5514	**
Reg.quadra	1	393.88021	393.88021	1.8359	ns
Reg.cúbica	1	287.10938	287.10938	1.3382	ns
Tratamentos	3	6806.64063	2268.88021	10.5752	--
Resíduo	44	9440.10417	214.54782		
Total	47	16246.74479			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05) ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
1	44	7.2495	28.5514	<.0001
1	44	4.0619	1.8359	0.1822
1	44	4.0619	1.3382	0.2534

Eq. de regressão: y = a + b.x + c.x^2 + d.x^3 + e.x^4 + f.x^5 x = Tratamentos
y = Médias dos tratamentos

a = 41.97916667
b = - 10.10416667
c = 0.00000000
d = 0.00000000
e = 0.00000000
f = 0.00000000

Coeficiente de correlação: r = 0.94865809
Coeficiente de determinação: R^2 = 0.89995217

Tratamento	Valor ou nível	Médias de trat.	Médias estimadas
1	0.00000	43.75000	41.97917
2	1.00000	32.29167	31.87500
3	2.00000	15.62500	21.77083
4	3.00000	15.62500	11.66667
Médias	1.50000	26.82292	26.82292

MG = 26.82292 CV% = 54.61
Ponto médio = 37.50000

- Porcentagens de contaminação fúngica (CF)
  - Dados originais
  - PPM

REGRESSÃO NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - INT.CASUALIZADO
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Reg.linear	1	1693.35938	1693.35938	5.5287	*
Reg.quadra	1	29.29688	29.29688	0.0957	ns
Reg.cúbica	1	188.15104	188.15104	0.6143	ns

Tratamentos	3	1910.80729	636.93576	2.0795 --
Resíduo	44	13476.56250	306.28551	
TOTAL	47	15387.36979		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
1	44	4.0619	5.5287	0.0232
1	44	0.001	0.095652	0.7584
1	44	0.001	0.6143	0.4372

Eq. de regressão: y = a + b.x + c.x^2 + d.x^3 + e.x^4 + f.x^5
x = Tratamentos y = Médias dos tratamentos

a = 55.10416667
b = - 5.31250000
c = 0.00000000
d = 0.00000000
e = 0.00000000
f = 0.00000000

Coeficiente de correlação: r = 0.94138250
Coeficiente de determinação: R² = 0.88620101

TRATAMENTO	Valor ou nível	Médias de trat.	Médias estimadas
1	0.00000	55.20833	55.10417
2	1.00000	47.91667	49.79167
3	2.00000	47.91667	44.47917
4	3.00000	37.50000	39.16667
Médias	1.50000	47.13542	47.13542

MG = 47.13542 CV% = 37.13
Ponto médio = 56.25000

- Porcentagens de contaminação total (CT)
  - Dados originais
  - PPM

REGRESSÃO NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - INT.CASUALIZADO
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Reg.linear	1	6125.65104	6125.65104	28.5514	**
Reg.quadra	1	393.88021	393.88021	1.8359	ns
Reg.cúbica	1	287.10938	287.10938	1.3382	ns
Tratamentos	3	6806.64063	2268.88021	10.5752	
Resíduo	44	9440.10417	214.54782		
Total	47	16246.74479			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05) ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
1	44	7.2495	28.5514	<.0001
1	44	4.0619	1.8359	0.1822
1	44	4.0619	1.3382	0.2534

Eq. de regressão:y = a +
b.x + c.x^2 + d.x^3 + e.x^4 + f.x^5
x = Tratamentos y = Médias dos tratamentos

a = 41.97916667
b = - 10.10416667
c = 0.00000000
d = 0.00000000
e = 0.00000000
f = 0.00000000

Coeficiente de correlação: r = 0.94865809
Coeficiente de determinação: R² = 0.89995217

Tratamento	Valor ou nível	Médias de trat.	Médias estimadas
1	0.00000	43.75000	41.97917
2	1.00000	32.29167	31.87500
3	2.00000	15.62500	21.77083
4	3.00000	15.62500	11.66667
Médias	1.50000	26.82292	26.82292

MG = 26.82292

CV% = 54.61

Ponto médio = 37.50000

- Porcentagens de média de explantes com brotos por tratamento (MEBT)
  - Dados originais
  - PPM

REGRESSÃO NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - INT.CASUALIZADO
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Reg.linear	1	1627.60417	1627.60417	5.8017 *
Reg.quadra	1	325.52083	325.52083	1.1603 ns
Reg.cúbica	1	65.10417	65.10417	0.2321 ns
Tratamentos	3	2018.22917	672.74306	2.3980
Resíduo	44	12343.75000	280.53977	
Total	47	14361.97917		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05) ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	P
1	44	4.0619	5.8017	0.0202
1	44	4.0619	1.1603	0.2871
1	44	0.001	0.232068	0.6322

Eq. de regressão: y = a + b.x + c.x^2 + d.x^3 + e.x^4 + f.x^5
x = Tratamentos y = Médias dos tratamentos

a = 20.83333333
b = 5.20833333
c = 0.00000000
d = 0.00000000
e = 0.00000000
f = 0.00000000

Coeficiente de correlação: r = 0.89802651
Coeficiente de determinação: R^2 = 0.80645161

Tratamento	Valor ou nível	Médias de trat.	Médias estimadas
1	0.00000	17.70833	20.83333
2	1.00000	30.20833	26.04167
3	2.00000	32.29167	31.25000
4	3.00000	34.37500	36.45833
Médias	1.50000	28.64583	28.64583

MG = 28.64583 CV% = 58.47

Ponto médio = 37.50000

SIGLAS E ABREVIAÇÕES
FV = Fonte de variação
GL = Graus de liberdade
SQ = Soma de quadrado
QM = Quadrado médio
F = Estatística do teste F
MG = Média geral
CV% = Coeficiente de variação em %

APÊNDICE 2 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS: ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro A PARTIR DE MATRIZES CULTIVADAS A CAMPO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA

ASSISTAT - TESTE DE BARTLETT
http://www.assistat.com

- Percentual de crescimento bacteriano (CB)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x+1)}$

TRATAMENTO	MÉDIA	VARIÂNCIA
1	1.07874	0.00399
2	1.04006	0.00214
3	1.04006	0.00214
4	1.25365	0.01559
5	1.02003	0.00161
6	1.00000	0.00667
7	1.32099	0.00665

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2): 5.50179
Valor crítico (alfa = 5%): 12.59158
Valor crítico (alfa = 1%): 16.81187

$X^2 < X^2(5\%)$ H0 não foi rejeitada p > 0.05
VarMax = 0.02 VarMin = 0.00 Rvar = 9.71

- Percentual de crescimento fúngico (CF)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x+1)}$

Tratamento	Média	Variância
1	1.20629	0.00428
2	1.02003	0.00161
3	1.11741	0.00185
4	1.00000	0.00667
5	1.00000	0.00667
6	1.05619	0.01263
7	1.04006	0.00214

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2): 4.78306
Valor crítico (alfa = 5%): 12.59158
Valor crítico (alfa = 1%): 16.81187

$X^2 < X^2(5\%)$ H0 não foi rejeitada p > 0.05

VarMax = 0.01 VarMin = 0.00 Rvar = 7.87

- Percentual de crescimento microbiano total(CT)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x+1)}$

TRATAMENTO	MÉDIA	VARIÂNCIA
1	1.27267	0.00707
2	1.06009	0.00161
3	1.15357	0.00349
4	1.25365	0.01559
5	1.02003	0.00161
6	1.05619	0.01263
7	1.35331	0.00253

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2):	6.88583
Valor crítico (alfa = 5%):	12.59158
Valor crítico (alfa = 1%):	16.81187

$X^2 < X^2(5\%)$ H0 não foi rejeitada $p > 0.05$

VarMax = 0.02 VarMin = 0.00 Rvar = 9.71

- Comprimento médio das brotações neoformadas (cm)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x+1)}$

Tratamento	Média	Variância
1	1.56059	0.01109
2	1.34651	0.03256
3	1.53416	0.01292
4	1.44927	0.01617
5	1.80680	0.03897
6	1.78034	0.01551
7	1.55066	0.00394

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2):	4.01132
Valor crítico (alfa = 5%):	12.59158
Valor crítico (alfa = 1%):	16.81187

$X^2 < X^2(5\%)$ H0 não foi rejeitada $p > 0.05$

VarMax = 0.04 VarMin = 0.00 Rvar = 9.89

ASSISTAT - ANÁLISE DA VARIÂNCIA

http://www.assistat.com

- Percentual de crescimento bacteriano (CB)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x+1)}$

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0.38427	0.06405	11.5617 **
Resíduo	21	0.11633	0.00554	
TOTAL	27	0.50060		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
6	21	3.8117	11.5617	<.0001

MÉDIAS E MEDIDAS
Médias de tratamento

1	1.07874	b
2	1.04006	b
3	1.04006	b
4	1.25365	a
5	1.02003	b
6	1.00000	b
7	1.32099	a

dms = 0.17108

MG = 1.10765 CV% = 6.72

Ponto médio = 1.15711

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o **Teste de Tukey** ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.85743	0.00133	Não

- Percentual de crescimento fúngico (CF)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x+1)}$

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0.13539	0.02257	4.4074 **
Resíduo	21	0.10752	0.00512	
TOTAL	27	0.24291		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	P
6	21	3.8117	4.4074	0.0049

Médias de tratamento

1	1.20629	A
2	1.02003	B
3	1.11741	Ab
4	1.00000	B
5	1.00000	b
6	1.05619	ab
7	1.04006	b

dms = 0.16447

MG = 1.06285 CV% = 6.73

Ponto médio = 1.09550

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.90727	0.01700	Não

- Percentual de crescimento microbiano total(CT)
  - Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x+1)}$

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0.39550	0.06592	10.3666 **
Resíduo	21	0.13353	0.00636	
TOTAL	27	0.52903		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 < p < .05)
não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	P
6	21	3.8117	10.3666	<.0001

Médias de tratamento

1	1.27267	ab
2	1.06009	c
3	1.15357	bc
4	1.25365	ab
5	1.02003	c
6	1.05619	c
7	1.35331	a

dms = 0.18329

MG = 1.16707 CV% = 6.83

Ponto médio = 1.20711

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.90001	0.01145	Não

- Comprimento médio das brotações neoformadas (cm)

Dados transformados $\text{arc sen}\sqrt{(x+1)}$

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0.66552	0.11092	5.9196 **
Resíduo	21	0.39350	0.01874	
TOTAL	27	1.05902		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 < p < .05)
não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
6	21	3.8117	5.9196	0.0009

Médias de tratamento

1	1.56059	ab
2	1.34651	b
3	1.53416	ab
4	1.44927	b
5	1.80680	a
6	1.78034	a
7	1.55066	ab

dms = 0.31464

MG = 1.57547 CV% = 8.69

Ponto médio = 1.63707

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.98006	0.85176	Sim

OBSERVAÇÕES
Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer. O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário. Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise.

SIGLAS E ABREVIAÇÕES
FV = Fonte de variação
GL = Graus de liberdade
SQ = Soma de quadrado
QM = Quadrado médio
F = Estatística do teste F
MG = Média geral
CV% = Coeficiente de variação em %
dms = Diferença mínima significativa

APÊNDICE 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA: ORGANOGÊNESE *IN VITRO* E MORFOANATOMIA DE *Bambusa oldhamii*

ASSISTAT
http://www.assistat.com

- **Percentual de sobrevivência (%) em explantes de *Bambusa oldhamii* de diferentes comprimentos e diâmetros, após 21 dias de cultivo *in vitro*.**
  - Dados transformados $\sqrt{(x+1)}$

TESTE DE BARTLETT

Tratamento	Média	Variância
1	1.41421	0.00007
2	1.41421	0.00007
3	1.41421	0.00007
4	1.38432	0.00045
5	1.41421	0.00007
6	1.41421	0.00007
7	1.19005	0.00060
8	1.33797	0.00199
9	1.39928	0.00045

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2): 19.36390
Valor crítico (alfa = 5%): 15.50731
Valor crítico (alfa = 1%): 20.09016

$X^2 < X^2(1\%)$ H0 não foi rejeitada p > 0.01

VarMax = 0.00 VarMin = 0.00 Rvar = 29.80

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	2	0.08080	0.04040	95.1700	**
Fator2(F2)	2	0.04114	0.02057	48.4562	**
Int. F1xF2	4	0.05381	0.01345	31.6863	**
Tratamentos	8	0.17575	0.02197	51.7497	**
Resíduo	27	0.01146	0.00042		
Total	35	0.18721			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	P
2	27	5.4881	95.17	<.0001
2	27	5.4881	48.4562	<.0001
4	27	4.1056	31.6863	<.0001
8	27	3.2558	51.7497	<.0001

Fator 1 = diametro
Fator 2 = comprimento

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	1.41421 a
2	1.40425 a
3	1.30910 b

dms = 0.02083

Médias do fator 2

	1
	1.32953 b
2	1.38880 a
3	1.40924 a

dms = 0.02083

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B1	B2	B3
A1	1.4142 aA	1.4142 aA	1.4142 aA
A2	1.3843 aA	1.4142 aA	1.4142 aA
A3	1.1900 bC	1.3380 bB	1.3993 aA

dms para colunas = 0.0361 dms para linhas = 0.0361
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 1.37585 CV% = 1.50

Ponto médio = 1.29841

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.63500	0.00000	Não

- **Segmentos nodais de *Bambusa oldhamii* sobreviventes que emitiram brotos laterais (%), após 21 dias de cultivo *in vitro*.**
  - Dados transformados $\sqrt{(x+1)}$

TESTE DE BARTLETT

Tratamento	Média	Variância
1	1.05984	0.00232
2	1.32165	0.00432
3	1.28867	0.00798
4	1.07905	0.00310
5	1.17200	0.00190
6	1.18760	0.00837
7	1.00000	0.00667
8	1.13499	0.00462
9	1.02032	0.00082

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2): 5.18016
Valor crítico (alfa = 5%): 15.50731
Valor crítico (alfa = 1%): 20.09016

$X^2 < X^2(5\%)$ H0 não foi rejeitada p > 0.05

VarMax = 0.01 VarMin = 0.00 Rvar = 10.23

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	2	0.17731	0.08866	19.9011 **
Fator2(F2)	2	0.17122	0.08561	19.2172 **
Int. F1xF2	4	0.06138	0.01534	3.4445 *
Tratamentos	8	0.40991	0.05124	11.5018 **
Resíduo	27	0.12028	0.00445	
Total	35	0.53019		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
   ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	P
2	27	5.4881	19.9011	<.0001
2	27	5.4881	19.2172	<.0001
4	27	2.7278	3.4445	0.0212
8	27	3.2558	11.5018	<.0001

Fator 1 =diâmetro
Fator 2 = comprimento

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1 1.22339 a
2 1.14622 b
3 1.05177 c
dms = 0.06748

Médias do fator 2
1 1.04630 b
2 1.20955 a
3 1.16553 a
dms = 0.06748

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

	B1	B2	B3
A1	1.0598 aB	1.3217 aA	1.2887 aA
A2	1.0790 aA	1.1720 bA	1.1876 aA
A3	1.0000 aB	1.1350 bA	1.0203 bAB

dms para colunas = 0.1169 dms para linhas = 0.1169
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 1.14046 CV% = 5.85
Ponto médio = 1.15711

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95910	0.20161	Não

➢ **Sobrevivência, média de brotos por gema e comprimento médio da maior brotação de explantes de Bambusa oldhamii de diferentes comprimentos e diâmetros, após cinco subcultivos, em meio de cultura MS acrescido de 4,4 µM de TDZ.**

➢ **Sobrevivência (%)**

- Dados transformados $\sqrt{(x+1)}$

TESTE DE BARTLETT

Tratamento	Média	Variância
1	1.06066	0.00007
2	1.29085	0.00052
3	1.22421	0.00174
4	1.07905	0.00310
5	1.15318	0.00469
6	1.17016	0.00765
7	1.00000	0.00667
8	1.11733	0.00209
9	1.02032	0.00082

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2):15.14610
Valor crítico (alfa = 5%): 15.50731
Valor crítico (alfa = 1%): 20.09016

$X^2 < X^2(5\%)$ H0 não foi rejeitada p > 0.05

VarMax = 0.01 VarMin = 0.00 Rvar = 114.71

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	2	0.12979	0.06489	21.3740	**
Fator2(F2)	2	0.12218	0.06109	20.1214	**
Int. F1xF2	4	0.04028	0.01007	3.3170	*
Tratamentos	8	0.29226	0.03653	12.0323	**
Resíduo	27	0.08198	0.00304		
TOTAL	35	0.37423			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
2	27	5.4881	21.374	<.0001
2	27	5.4881	20.1214	<.0001
4	27	2.7278	3.317	0.0246
8	27	3.2558	12.0323	<.0001

Fator 1 = diametro
Fator 2 = comprimento

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	1.19191	a
2	1.13413	b
3	1.04588	c

dms = 0.05571

Médias do fator 2

1	1.04657	b
2	1.18712	a
3	1.13823	a

dms = 0.05571

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

	B1		B2		B3	
A1	1.0607	aB	1.2908	aA	1.2242	aA
A2	1.0790	aA	1.1532	bA	1.1702	aA
A3	1.0000	aB	1.1173	bA	1.0203	bB

dms para colunas = 0.0965 dms para linhas = 0.0965

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 1.12397 CV% = 4.90

Ponto médio = 1.11144

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95731	0.17736	sim

- **Média de brotos por gema**
  - Dados transformados $\sqrt{(x+1)}$

TESTE DE BARTLETT

TRATAMENTO	MÉDIA	VARIÂNCIA
1	1.52200	0.02246
2	1.61871	0.00267
3	1.70595	0.00855
4	1.49791	0.11948
5	1.76762	0.01924
6	1.76684	0.07473
7	1.00000	0.00667
8	2.26058	0.00120
9	1.35355	0.22386

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2): 26.66789
Valor crítico (alfa = 5%): 15.50731
Valor crítico (alfa = 1%): 20.09016

$X^2 > X^2(1\%)$ H0 foi rejeitada p < 0.01

VarMax = 0.22 VarMin = 0.00 Rvar = 187.32

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F	
Fator1(F1)	2	0.11710	0.05855	1.1004	ns
Fator2(F2)	2	1.76478	0.88239	16.5847	**
Int. F1xF2	4	1.87871	0.46968	8.8277	**
Tratamentos	8	3.76059	0.47007	8.8351	**
Resíduo	27	1.43654	0.05321		
Total	35	5.19713			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
2	27	3.3541	1.1004	0.3472
2	27	5.4881	16.5847	<.0001
4	27	4.1056	8.8277	<.0001
8	27	3.2558	8.8351	<.0001

Fator 1 = diametro
Fator 2 = comprimento

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	1.61555	a
2	1.67745	a
3	1.53804	a

dms = 0.23320

Médias do fator 2

1	1.33997	c
2	1.88230	a
3	1.60878	b

dms = 0.23320

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

	B1		B2		B3	
A1	1.5220	aA	1.6187	bA	1.7059	abA
A2	1.4979	aA	1.7676	bA	1.7668	aA
A3	1.0000	bB	2.2606	aA	1.3536	bB

dms para colunas = 0.4039 dms para linhas = 0.4039

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 1.61035 CV% = 14.32

Ponto médio = 1.60470

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.94186	0.05804	sim

- **Comprimento médio da maior brotação**

Dados transformados $\sqrt{(x+1)}$

TESTE DE BARTLETT

Tratamento	Média	Variância
1	1.86957	0.05070
2	2.04946	0.00108
3	2.06449	0.00606
4	1.50778	0.12435

5	1.82050	0.00327
6	1.80542	0.08952
7	1.00000	0.00667
8	1.92718	0.01836
9	1.30621	0.16954

H0: As variâncias são homogêneas

Estatística do teste (X^2): 24.95077
Valor crítico (alfa = 5%): 15.50731
Valor crítico (alfa = 1%): 20.09016

$X^2 > X^2(1\%)$ H0 foi rejeitada p < 0.01

VarMax = 0.17 VarMin = 0.00 Rvar = 156.96

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	2	2.04257	1.02128	19.5760 **
Fator2(F2)	2	1.35087	0.67544	12.9468 **
Int. F1xF2	4	0.77740	0.19435	3.7253 *
Tratamentos	8	4.17084	0.52135	9.9934 **
Resíduo	27	1.40859	0.05217	
TOTAL	35	5.57943		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
2	27	5.4881	19.576	<.0001
2	27	5.4881	12.9468	0.0001
4	27	2.7278	3.7253	0.0153
8	27	3.2558	9.9934	<.0001

Fator 1 = diametro
Fator 2 = Comprimento

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	1.99451	a
2	1.71123	b
3	1.41113	c

dms = 0.23092

Médias do fator 2

1	1.45912	b
2	1.93238	a
3	1.72537	a

dms = 0.23092

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2

(AxB)

	B1		B2		B	
A1	1.8696	aA	2.0495	aA	2.0645	aA
A2	1.5078	aA	1.8205	aA	1.8054	aA
A3	1.0000	bB	1.9272	aA	1.3062	bB

dms para colunas = 0.4000 dms para linhas = 0.4000

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 1.70562 CV% = 13.39

Ponto médio = 1.53685

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.82687	0.00006	Não

OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer.

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima, mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise.

SIGLAS E ABREVIAÇÕES

FV = Fonte de variação
GL = Graus de liberdade
SQ = Soma de quadrado
QM = Quadrado médio
F = Estatística do teste F
MG = Média geral
CV% = Coeficiente de variação em %
dms = Diferença mínima significativa

REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September. DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). Comparison of means of agricultural experimentation data through different tests using the software Assistat.

Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(37), pp. 3527-3531, 15 September. DOI: 10.5897/AJAR2016.11523.