

Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios

Jênifer Silva Nogueira⁽¹⁾, Frederico Henrique da Silva Costa⁽²⁾, Paulo Arthur Almeida do Vale⁽³⁾, Zanderluce Gomes Luis⁽⁴⁾, Jonny Everson Scherwinski-Pereira^{(5)}*

⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de Brasília. 70910-900, Brasília, DF.
E-mail: jeniferbio@gmail.com

⁽²⁾ Universidade Federal do Acre, Campus Universitário. 69920-900, Rio Branco, AC. E-mail: frederico@ufac.br

⁽³⁾ Fundação de Tecnologia do Estado do Acre (Funtac). 69920-175, Rio Branco, AC. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte de Pós-Graduação. Rio Branco, AC. E-mail: paulo.vale@ac.gov.br

⁽⁴⁾ Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA). Cidade Universitária, campus III, Avenida dos Ipês s/n, Cidade Jardim, Marabá, PA, 68500-000, Brasil. E-mail: zanbio@hotmail.com

⁽⁵⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Avenida W5 Norte (final), PqEB, 70770-917, Brasília, DF.
E-mail: jonny.pereira@embrapa.br

*Autor para correspondência.

Resumo – Os bambus são plantas predominantemente tropicais e subtropicais, perenes, renováveis, de rápido crescimento e com alta produção de biomassa. Entretanto, uma limitação dessas espécies quanto ao seu uso racional tem sido o deficiente processo de multiplicação. O primeiro aspecto a considerar é o seu florescimento, que geralmente é um fenômeno raro. Além disso, as sementes apresentam baixa viabilidade, o que dificulta sua propagação sexuada. Assim, bambus são propagados vegetativamente por divisão de touceiras, partes de rizomas ou, ainda, seções de colmos que, embora eficientes quanto à sobrevivência, apresentam limitações, sobretudo pela capacidade de produzir um número limitado de mudas. Diante disso, estratégias biotecnológicas, notadamente aquelas associadas às técnicas da cultura *in vitro*, são ferramentas de grande importância para a reprodução vegetativa de bambus, pois, uma vez dominadas, podem possibilitar a produção em larga escala de novas plantas. Neste capítulo, são apresentados e discutidos os princípios, as estratégias e as limitações do uso da cultura de tecidos de plantas para a micropropagação dos bambus. São abordadas e descritas diferentes técnicas, que incluem o uso de meios líquidos, embriogênese somática e biorreatores de imersão temporária, indicando suas vantagens e desvantagens.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: POACEAE, BAMBUSOIDEAE, EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA, MEIO LÍQUIDO, MICROPROPAGAÇÃO DE BAIXO CUSTO.



Large-scale micropropagation of bamboo: principles, strategies and challenges

Abstract – Bamboos are predominantly tropical and subtropical plants. They are also perennials, renewable, fast growing and have high biomass production. However, a limitation for the rational use of these species has been the deficient propagation process. The first aspect to consider is its flowering, which is usually a rare phenomenon. Furthermore, the seeds exhibit low viability, which makes it difficult for the sexual propagation. Thus, bamboos are propagated vegetatively through the division of clumps, parts of rhizomes, or even culm sections, which, while efficient in terms of survival, also present limitations, particularly in their ability to produce a limited number of plantlets. Therefore, biotechnological strategies, notably those associated with the *in vitro* culture techniques, are very important tools for vegetative reproduction of bamboos, since, once mastered, they may allow the production of new plants in large-scale. This chapter presents and discusses the principles, strategies and limitations of using plant tissue culture for the micropropagation of bamboos. Different techniques are addressed and described, including the use of liquid media, somatic embryogenesis and temporary immersion systems, indicating the advantages and disadvantages of each.

INDEX TERMS: POACEAE, BAMBUSOIDEAE, SOMATIC EMBRYOGENESIS, TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS, LIQUID MEDIUM, LOW-COST MICROPROPAGATION.

Introdução

Os bambus pertencem à família Poaceae (Gramineae), subfamília Bambusoideae, distribuídos em cerca de 90 gêneros e 1400 espécies (Lin et al., 2012; Yang et al., 2008; Kelchner, 2013). São plantas distribuídas predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, de ciclo perene, renováveis, de rápido crescimento e com alta produção de biomassa. Por tratar-se de uma planta rústica, renovável e que produz anualmente, sem a necessidade de replantios, o bambu tem grande potencial agrícola e pode ser competitivo em relação a outros tipos de matérias-primas, também em razão da velocidade de crescimento e de aproveitamento por área (Fialho et al., 2005).

Embora seja um mercado em expansão, no Brasil, devido basicamente à falta de tradição da cadeia produtiva do bambu e, também, às lacunas de conhecimentos e tecnologias que poderiam permitir utilizar as diferentes espécies,



o uso do bambu, com raras exceções, tem se limitado a pequenos negócios, basicamente ao artesanato e à ornamentação (Fialho et al., 2005; Afonso, 2011).

Por outro lado, o país dispõe de clima favorável e grande extensão de áreas, incluindo as degradadas e inaptas para outros cultivos, mas adequadas ao plantio de diversas espécies de bambu de valor comercial. Além disso, florestas nativas de bambus arborescentes do gênero *Guadua* ocupam milhares de hectares contínuos, principalmente no sudoeste da Amazônia, e ainda são praticamente inexploradas do ponto de vista botânico, ecológico e/ou de uso como recursos genéticos (Afonso, 2011; Singh et al., 2013).

Acredita-se que a produção de bambu represente uma alternativa inovadora e interessante para o agronegócio brasileiro (Fialho et al., 2005) e, assim, tornam-se fundamentais os avanços nos programas de pesquisa e desenvolvimento de tecnologias capazes de gerar conhecimentos científicos que garantam inovação tecnológica, sustentabilidade e potencialização da utilização dessa matéria-prima, de modo a maximizar seus benefícios socioeconômicos e ambientais.

Uma limitação importante para o desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu refere-se ao seu deficiente processo de multiplicação. Seu florescimento é geralmente raro e, dependendo da espécie, pode levar dezenas ou até centenas de anos (Gillis et al., 2007; Singh et al., 2013). Além disso, as sementes dos bambus apresentam baixa viabilidade, o que dificulta sua propagação sexuada. Por esta razão, os bambus são propagados vegetativamente, principalmente por técnicas como transplantio direto (desdobramento de touceiras) ou enraizamento de estacas e pedaços de colmos (Fonseca, 2007) que, embora relativamente eficientes quando se quer pouca quantidade de mudas, apresentam limitações, especialmente para aqueles casos em que se deseja um número elevado de plantas.

Diante dessas dificuldades, a micropropagação é uma alternativa possível para a multiplicação dessas espécies (Mudoj et al., 2013; Singh et al., 2013), pois pode possibilitar a produção em larga escala de mudas a partir de tecidos e órgãos de plantas doadoras, com a vantagem de manter a identidade genética do material propagado e poder ser direcionada para plantas matrizes, acessos ou mesmo espécies de alto valor agrônômico ou comercial onde os outros processos de propagação são menos vantajosos.

Nesse contexto e devido à reduzida disponibilidade de literatura atualizada sobre o tema, o presente capítulo apresenta e discute os princípios, as estratégias e as limitações do uso da cultura de tecidos de plantas para a micropropagação dos bambus, tanto sob a ótica das técnicas convencionais quanto das mais avançadas.

Material e métodos

TÉCNICAS CONVENCIONAIS APLICADAS À PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO BAMBU -

Embora estudos de cultura de tecidos de plantas tenham sido extensivamente desenvolvidos em outras espécies de gramíneas, os bambus vêm recebendo atenção relativamente limitada, à exceção de autores da Ásia, onde os bam-

Tabela 1. Protocolos recentes de organogênese desenvolvidos para a produção de mudas de espécies de bambu por micropropagação convencional

Espécie	Explante	Composição do meio de cultura	
<i>Thamnocalamus falconeri</i> , Hook.f. ex Munro	Estabelecimento: segmento nodal (1,5-2 cm em comprimento). Multiplicação; e enraizamento: aglomerados de 3-4 brotos.	Estabelecimento: MS + sacarose (3%) + BAP (5 mg.L ⁻¹), pH 5,6; ou combinado a Cinetina (1,0 ou 2,0 mg.L ⁻¹). Multiplicação: MS + sacarose (3%) + BAP (5 mg.L ⁻¹) + AIB (2 mg.L ⁻¹), pH 5,6. Enraizamento: MS (50%) + sacarose (3%) + IBA (5 mg.L ⁻¹), pH 5,6.	
<i>Bambusa ventricosa</i>	Estabelecimento: segmento nodal (1,5 cm de comprimento) com uma gema axilar	Estabelecimento: MS + sacarose (3%) + 6-BA (22,2 µM) + Ágar (2,5 g.L ⁻¹), pH 5,8. Indução de múltiplos brotos: MS + sacarose (3%) + 6-BA (26,6 µM) + Ágar (2,5 g.L ⁻¹), pH 5,8. Enraizamento de brotos: MS + sacarose (3%) + 6-BA (4,4 µM) + ANA (2,7 µM) + AIB (4,9 µM) + Ágar (2,5 g.L ⁻¹), pH 5,8.	
<i>Bambusa tulda</i> ; <i>Melocanna baccifera</i>	Estabelecimento: Segmento nodal (1,5-2 cm) com uma gema axilar Multiplicação: aglomerados de 3 a 5 brotos	Estabelecimento: MS + sacarose (3%) + BAP (3 mg.L ⁻¹) Multiplicação: MS + sacarose (3%) + BAP (3 mg.L ⁻¹) + Cinetina (2 mg.L ⁻¹) Enraizamento e formação de rizoma: MS(1/2) + sacarose (3%) + AIB (3 mg.L ⁻¹) + Coumarin (10 mg.L ⁻¹) + BAP (0,05 mg.L ⁻¹).	
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad. Ex Wendl	Estabelecimento: segmento nodal com gema axilar, obtido de matrizes mantidas em casa de vegetação. Multiplicação: aglomerados de três brotos com duas folhas expandidas.	Estabelecimento (brotação): MS + sacarose (3%) + BAP (6 µM). Após 20 dias: MS + sacarose (3%) + BAP (12 µM) + Vitrofuril (116 mg.L ⁻¹), pH 6,0. Multiplicação: MS + sacarose (3%) + 6-BA (12 µM) + Vitrofuril1 (116 mg.L ⁻¹), pH 6,0 (transferidos após 20 dias de estabelecimento <i>in vitro</i>).	
<i>Dendrocalamus strictus</i> (Roxb.) Nees – Nativo da Índia	Estabelecimento: segmentos nodais, coletados de plantas em condições de floresta. Multiplicação: não informado. Enraizamento: Aglomerados de três brotos.	Estabelecimento e multiplicação: MS + Sacarose (3%) + BAP (4 mg.L ⁻¹) + Ágar (0,8%), pH 5,7. Enraizamento <i>in vitro</i> : MS + Sacarose (3%) + ANA (3 mg.L ⁻¹) + Ágar (0,8%), pH 5,7.	

bus são tradicionalmente mais valorizados quanto ao seu uso. Nos últimos anos, porém, com o aumento da importância do bambu no mercado mundial, o número de trabalhos que utilizam técnicas da cultura de tecidos voltadas para a propagação de espécies aumentou consideravelmente e um bom número de trabalhos descrevendo protocolos completos ou partes deles já pode ser encontrado na literatura (tabelas 1 e 2).

Sistema de cultivo	Conclusões	Instituição/ País	Referência
Estabelecimento: meio líquido estacionário, com uso de ponte de papel. Multiplicação: meio líquido estacionário, a intervalos de 30 dias.	O estabelecimento foi mais efetivo com BAP, com 90% de formação de brotos, e 8,9 brotos/explante; enquanto a maior taxa de multiplicação foi 6,55±0,25. O meio semissólido reduziu o crescimento e a taxa de multiplicação. O percentual de enraizamento <i>in vitro</i> e sobrevivência <i>ex vitro</i> foi de 100%.	Forest Research Institute, India.	Bakshi et al. (2015)
Sistema convencional (meio gelificado)	Nas etapas de estabelecimento e multiplicação, a indução e proliferação de brotos (84%) foram melhores com 6-BA. Os brotos tiveram alta taxa de enraizamento, sendo mais efetivo com ANA.	Nanjing Forestry University, China.	Wei et al. (2015)
Líquido estacionário (todas as etapas). Na fase de multiplicação, transferências a cada 10 dias para meio fresco.	A quebra da dominância apical e indução de brotos foram eficientes com BAP (3 mg.L ⁻¹). Na fase de multiplicação, a combinação de BAP e Cinetina teve efeito sinérgico na taxa de multiplicação e qualidade dos brotos. Plantas foram aclimatizadas com sucesso (70,3% a 81,8%). A fidelidade clonal foi comparada com plantas matrizes e confirmada por genotipagem. Plantas micropropagadas foram 80% monomórficas.	Institute of Bioresources and Sustainable Development, India. Manipur University, India. The University of Burdwan, India. University of Yaoundé I, Cameroon.	Waikhom e Louis (2014)
Estabelecimento: líquido estacionário (10 mL/ tubo de ensaio). Multiplicação: 70 mL de meio líquido estacionário (Magenta™), subcultivos a 3 semanas.	O estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> foram conduzidos com sucesso. O material produzido foi utilizado apenas para experimentos em biorreatores tipo Rita®.	Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.	García-Ramírez et al. (2014)
Sistema convencional (meio gelificado), em todas as etapas.	A contaminação por fungos e bactérias foi uma limitação no estabelecimento <i>in vitro</i> . Maior produção de brotos (3,68±0,7, brotos/explante), foi obtida em meio MS + BAP (4 mg.L ⁻¹). Marcadores moleculares, RAPD e ISSR, confirmaram a fidelidade clonal. As plantas foram aclimatizadas e plantadas em campo.	University of North Bengal, India. Sikkim State Council of Science and Technology, India. Bodoland University, India.	Goyal et al. (2014)

Continua

Espécie(s)	Explante	Composição do meio de cultura	
<i>Bambusa balcooa</i>	Estabelecimento: segmento nodal simples (3-4 cm de comprimento). Multiplicação; Enraizamento: aglomerados de 4-5 brotos	Estabelecimento: MS + sacarose (2%) + Ágar (0,8%), pH 5,75. Proliferação de brotos: MS + sacarose (1%) + BAP (4,4 µM) + ANA (0,53 µM) + Ágar (0,8%), pH 5,75. Enraizamento: MS + sacarose (2%) + ANA (16,11 µM) + Gelrite™ (0,2%), pH 5,75.	
<i>Dendrocalamus brandisii</i> Kurz	Estabelecimento: segmento nodal (1,5-2 cm de comprimento) Multiplicação: Aglomerados de 2-6 brotos. Enraizamento: Aglomerados de 2-3 brotos (de 3-4 cm de comprimento).	Estabelecimento: MS + sacarose (3%) + TDZ (0,25 mg.L ⁻¹) + ANA (0,25 mg.L ⁻¹) + Ácido ascórbico (25 mg.L ⁻¹) + Ácido cítrico e Cisteína (12,5 mg.L ⁻¹) + Ácido glutâmico (50 mg.L ⁻¹), pH 6,2. Multiplicação (2 semanas): MS + ANA (0,25 mg.L ⁻¹) + BAP (2,5 mg.L ⁻¹). Enraizamento: MS (50%) + aditivos + ANA (1 mg.L ⁻¹)	
<i>Bambusa arundinacea</i> Retz. Willd	Estabelecimento: sementes. Iniciação de brotos: segmento nodal de plântulas com 20 dias de cultivo. Multiplicação: cluster de brotos.	Germinação: MS (50%) + sacarose (3%) + Ágar (7 g.L ⁻¹), pH 5,7; em condições de escuro. Iniciação de brotos: MS + BAP (2,0 mg.L ⁻¹) + sacarose (3%) + Ágar (7 g.L ⁻¹), pH 5,7. Multiplicação: MS + BAP (3,0 mg.L ⁻¹) + sacarose (3%) + Ágar (7 g.L ⁻¹), pH 5,7.	
<i>Dendrocalamus asper</i>	Estabelecimento: segmento nodal (2-3 cm) Multiplicação: brotações	Estabelecimento: MS + sacarose (3%) + Ágar (0,7%) Multiplicação: MS + BAP (3 mg.L ⁻¹) + Sulfato de adenina (50 mg.L ⁻¹) Enraizamento: MS líquido + IBA (1,0 mg.L ⁻¹).	
<i>Dendrocalamus hamiltonii</i> Nees et Arn. ex Munro	Estabelecimento: segmento nodal. Multiplicação:	Estabelecimento: MS + TDZ (3,0 µM). Proliferação de brotos: MS + TDZ (1,5 µM) + Ácido ascórbico (56 µM). Enraizamento: MS (50%) + AIB (25,0 µM) + cloreto de colina (36,0 µM). Todos os meios foram suplementados com açúcar cristal (3%), Ágar (0,8%), pH 5,8.	
<i>Dendrocalamus hamiltonii</i> Nees et Arn. ex Munro	Estabelecimento: segmento nodal (2,5-3 cm de comprimento) e uma gema axilar. Multiplicação e enraizamento: Aglomerados (4-6 brotos) (3-5 cm).	Estabelecimento: MS + TDZ (3,0 µM). Proliferação de brotos: MS + TDZ (1,5 µM) + Ácido ascórbico (56 µM). Enraizamento: MS (50%) + AIB (25,0 µM) + cloreto de colina (36,0 µM). Todos os meios foram suplementados com açúcar cristal (3%), Ágar (0,8%), pH 5,8.	
<i>Bambusa nutans</i> Wall.	Estabelecimento: segmento nodal (3-4 cm).	Estabelecimento e multiplicação: MS + sacarose (3%) + BAP (2 mg.L ⁻¹) + Ágar (0,8%).	
<i>Bambusa nutans</i> G.C. Wall Ex Munro	Estabelecimento: sementes. Multiplicação: plântulas com raízes excisadas.	Estabelecimento: MS + Gelrite™ (2,5 g.L ⁻¹), pH 5,8. Multiplicação: MS + TDZ (0,2 mg.L ⁻¹); ou BAP (10 mg.L ⁻¹) + Gelrite™ (2,5 g.L ⁻¹), pH 5,8. Enraizamento: MS + AIB (2 mg.L ⁻¹) + Gelrite™ (2,5 g.L ⁻¹), pH 5,8.	

Sistema de cultivo	Conclusões	Instituição/ País	Referência
Sistema convencional (gelificado)	O meio MS, adicionado de BAP (4,4 µM) e ANA (0,53 µM) produziu 19,8±1,4 brotos/explante, com 3,44±0,23 cm. Plantas <i>in vitro</i> tiveram maior conteúdo relativo de água (72,7%), menor índice de área foliar, maior conteúdo de açúcares solúveis e amido, e menor conteúdo de lignina comparado às plantas aclimatizadas. Marcadores RAPD e ISSR confirmaram a estabilidade genética das plantas micropropagadas.		Brar et al. (2014)
Líquido estacionário; gelificado (todas as etapas)	Maior eficiência na micropropagação foi observada em meio líquido contendo TDZ e ANA (1-6 brotos) comparada ao semissólido (1-3). As brotações foram enraizadas e aclimatizadas com sucesso.	Rai Technology University, India. Dayananda Sagar College of Engineering & Centre for R & D in Life Sciences, India.	Kavitha e Kiran (2014)
Sistema convencional (meio gelificado)	O percentual de germinação foi 95%, com formação de brotos com 2-3 nós. BAP foi mais efetivo na indução de brotos (88,5% e 4,8 brotos/explante). Marcadores RAPD confirmaram a estabilidade genéticas das plantas micropropagadas.	Periyar University, India. Universiti Sains Malaysia (USM), Malasia.	Kalaiaarasi et al. (2014)
Estabelecimento: Sistema convencional (meio gelificado) Multiplicação: líquido estacionário	O tipo e concentração de regulador de crescimento influenciaram a diferenciação e o número de brotações. BAP foi mais efetivo comparado a Cinetina. A taxa de multiplicação é 5-10 vezes maior em meio líquido com BAP e sulfato de adenina. Plantas albinas foram regeneradas após longo período de multiplicação. Houve 90% de sobrevivência das plantas aclimatizadas.	Birla Institute of Technology, India. Birsa Agricultural University, India.	Kumar e Banerjee (2014)
Sistema convencional (meio gelificado)	Marcadores moleculares – RAPD, ISSR, AFLP e SSR, confirmaram a fidelidade clonal de plantas regenerantes do 3º (terceiro) ao 30º subcultivo, validando o protocolo de micropropagação.	Centre for Plant Biotechnology, India. Kurukshetra University, India.	Singh et al. (2013)
Sistema convencional (meio gelificado)	A coleta de explantes é mais efetiva no início do verão. 98,8% dos explantes estabelecidos brotaram (5,23 brotos/explante). Subcultivos de 21 dias, em meio MS + TDZ + ácido ascórbico, são condições efetivas para a micropropagação. Cluster (8-10 brotos) foram mais efetivos na multiplicação. Houve alta porcentagem de enraizamento (89%). A sobrevivência das plantas foi de 79,76% (aclimatização) e 85% em campo.	Kurukshetra University, India. Centre for Plant Biotechnology, India.	Singh et al. (2012)
Sistema convencional (meio gelificado)	Menor contaminação foi obtida em meses com menor precipitação pluviométrica. Máximo número de brotos (11) foi observado com 2 mg.L ⁻¹ de BAP.	Council of Scientific & Industrial Research, India.	Mehta et al. (2011)
Sistema convencional (meio gelificado)	A germinação foi de 70% aos 15 dias de cultivo. TDZ foi mais efetivo na fase de multiplicação comparado ao BAP. BAP (3 mg.L ⁻¹) produziu brotações mais alongadas, capazes de individualização. Para enraizamento, brotos provenientes de TDZ e BAP (10 mg.L ⁻¹) necessitaram de cultivo em meio sem regulador.	Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Brasil.	Oliveira et al. (2009/2012)

Tabela 2. Protocolos utilizando embriogênese somática desenvolvidos para produção de mudas micropropagadas de bambu

Espécie	Explante	Composição do meio de cultura	
<i>Bambusa beecheyana</i> Munro var. beecheyana	Segmentos (2-5 mm) de flores jovens obtidas de inflorescências jovens (0,5-1,0 cm de comprimento); raízes adventícias.	Indução de calos: MS + sacarose (6%) + caseína hidrolisada (1,0 mg.L ⁻¹) + 2,4-D (3,0 mg.L ⁻¹) + Cinetina (2,0 mg.L ⁻¹) + Ágar (0,7%), pH 5,7.	
<i>Bambusa oldhamii</i> Munro	Segmentos de 2-5 mm excisados de inflorescências jovens (0,5-1 cm); e segmentos de raízes adventícias.	Indução de calos: MS + sacarose (6%) + 2,4-D (3,0 mg.L ⁻¹) + Cinetina (2,0 mg.L ⁻¹) + Caseína hidrolisada (1,0 mg.L ⁻¹) + Ágar (0,7%), pH 5,7.	
<i>Bambusa vulgaris</i> ; <i>Dendrocalamus giganteus</i> ; e <i>Dendrocalamus strictus</i>	Explantos excisados de embriões zigóticos, e segmentos nodais (1,0-1,5 cm) com uma gema, obtidos de plântulas com 10 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	Indução de calos: MS + sacarose (3%) + Cinetina (0,25 mg.L ⁻¹) + 2,4-D (3,0 mg.L ⁻¹) + Ágar (0,8%). Subcultivo/manutenção de calos: meio de indução; ou meio de regeneração composto de MS (50%) + sacarose (3%) + Cinetina (0,5 mg.L ⁻¹) + 2,4-D (2,0 mg.L ⁻¹) + sulfato de adenina (10 mg.L ⁻¹) + Ágar (0,8%). Subcultivos a intervalos de quatro semanas. Enraizamento: MS (50%) + sacarose (2%).	
<i>Dendrocalamus hamiltonii</i> Nees et Arn. Ex Munro	Obtenção de culturas assépticas: segmentos nodais de 2-4 cm de comprimento e 0,4-0,8 cm em diâmetro. Indução de calos: segmentos de 4-5 mm obtidos de brotos com 3-4 cm.	Obtenção de brotos: MS (50%) + sacarose (3%) + Ágar (0,8%). Indução de calos: MS (50%) + BA, 2,4-D e ANA (2 mg.L ⁻¹). Proliferação/manutenção de calos: MS + BA e 2,4-D (1 mg.L ⁻¹). Subcultivos a cada 4 semanas. Diferenciação de embrioides: MS (50%) + BA (2,5 mg.L ⁻¹). Maturação e germinação/formação de brotos: MS + BA e 2,4-D (1,0 mg.L ⁻¹) + GA3 (0,5 mg.L ⁻¹). Os meios foram adicionados de sacarose (3%) e Ágar (0,8%), pH 5,7	
<i>Bambusa edulis</i>	Segmentos (nós e internódios) de 2 mm de comprimento, obtidos de brotos cultivados <i>in vitro</i> .	Indução: sacarose (1,5-4,5%) + TDZ (0,455 µM). Subcultivos a intervalos de dois meses, por seis meses. Manutenção de calos: sacarose (4,5%) + Cinetina (9,2 µM) + 2,4-D (13,6 µM) + água de coco verde (0,1%). Germinação dos embriões somáticos (e.s.): sacarose (3%) + TDZ (0,046 ou 0,455 µM). Nas etapas, foi usado o meio MS + Gelrite (2,2 g L ⁻¹), pH 5,7.	
<i>Bambusa balcooa</i> Roxburgh	Pseudoespiguetas	Indução de calos: sacarose (3%) + 2,4-D (4,5 µM), por 4 semanas. Multiplicação/regeneração: BAP (5 mg.L ⁻¹), com redução para 1 mg.L ⁻¹ nos últimos subcultivos. Nas etapas, foi usado o meio MS + Gelrite (0,16%), pH 5,7.	
<i>Bambusa multiplex</i>	Espiguetas; Embrião zigótico	Indução: NB e N6 + 2,4-D (4 mg.L ⁻¹), para espiguetas e embriões. Enraizamento: MS + ANA (2 mg.L ⁻¹).	

Conclusões	Instituição/ País	Referência
Linhas embriogênicas foram formadas a partir de calos brancos a amarelados, com estruturas nodulares, compactos, e células com citoplasma rico em grãos de amido. O potencial embriogênico de tecidos de calos compactos e organizados foi mantido por mais do que 16 meses. Embrioides foram obtidos a partir de estruturas nodulares e germinaram espontaneamente em meio com ou sem reguladores de crescimento. Análises de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura revelaram embrioides com escutelo, meristema apical do broto, coleóptilo e coleorriza. As plantas foram aclimatizadas com sucesso, e transplantadas para solo sem aclimatização.	Academia Sinica, China.	Yeh e Chang (1986a)
Inflorescências jovens apresentam alta capacidade de indução de calos e regeneração de embriões somáticos. Calos embriogênicos podem ser subcultivados e mantidos por até 16 meses sem perda de totipotência. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura caracterizaram embrioides com coleóptilo e um escutelo. Estruturas nodulares foram obtidas de segmentos de raízes, porém houve a formação de plantas albinas.	Academia Sinica, China.	Yeh e Chang (1986)
A obtenção de embriões somáticos foi eficiente nas espécies estudadas. Foi obtida alta porcentagem (95-98%) de conversão em plantas normais, que foram aclimatizadas com 95% de sobrevivência. A ocorrência de plantas albinas foi observada. O florescimento <i>in vitro</i> foi induzido.	Regional Plant Resource Centre, India.	Rout e Das (1994)
Apenas calos compactos, nodulares e amarelados diferenciaram em embriões somáticos. Análises histológicas mostraram que embrioides foram originados de meristemoides do parênquima xilemático. Calos embriogênicos podem ser mantidos por períodos de dois anos sem perda de potencial embriogênico.	Institute of Himalayan Bioresource Technology, India.	Godbole et al. (2002)
TDZ foi eficiente para indução da embriogênese somática e germinação dos e.s., que apresentaram alta (>80%) taxa de germinação. Plantas <i>in vitro</i> floresceram, porém, o pólen foi estéril. Não foram observadas plantas albinas.	Taichung Health and Management University, China. Chung-Shan Medical University, China. Academia Sinica, China	Lin et al. (2003)
40% de regeneração em quatro meses. Plantas regeneradas foram uniformes e com estabilidade genética (AFLP) e de ploidia (citometria de fluxo). Comparado a micropropagação convencional, a redução nos custos foi de 57%.	Oprins Plant NV, Bélgica. Ghent University, Bélgica.	Gillis et al. (2007)
Meio NB e N6 induziram 87,30% e 76,27% de calos. Aproximadamente 8% das plantas foram albinas, e mosaicos foram ocasionalmente observados. Plantas enraizadas foram aclimatizadas com 70% de sucesso.	Research Institute of Subtropical Forestry, China.	Yuan et al. (2009)

Continua

Espécie	Explante	Composição do meio de cultura
<i>Dendrocalamus hamiltonii</i>	Embrião zigótico	Indução de calos: MS + 2,4-D (1,0-3,0 mg.L ⁻¹) Iniciação, diferenciação e desenvolvimento de broto: MS + BA (3 mg.L ⁻¹) + Cinetina (3 mg.L ⁻¹). Diferenciação: MS + BA (2 mg.L ⁻¹) + Cinetina e ANA (1 mg.L ⁻¹). Enraizamento: MS (50%) sacarose (3%) + AIB (5 mg.L ⁻¹) + Gelrite (0,25%).
<i>Bambusa nutans</i> Wall.	Estabelecimento: segmento nodal (3-4 cm) Indução de calo embriogênico: tecidos (4-5 mm), excisados da base de brotações. Enraizamento: brotos individuais e clusters de 3-4 brotos.	Estabelecimento e multiplicação: MS+sacarose (3%) + BAP (2 mg.L ⁻¹) Ágar(0,8%). Indução de calos: MS + 2,4-D (5 mg.L ⁻¹). Maturação/conversão: MS+BAP e 2,4-D (1 mg L ⁻¹)+Ác. Ascórbico (20 mg.L ⁻¹)+ Glicose (2%).
<i>Dendrocalamus farinosus</i> (Keng et Keng f.) Chia et H.L. Fung	Embriões zigóticos e secções de 1 mm de espessura, obtidos de sementes maduras e brotos jovens.	Indução: MS + sacarose () + 2,4,5-T (2,0 mg.L ⁻¹) + Cinetina (0,2 mg.L ⁻¹) + AIB (0,4 mg.L ⁻¹). Regeneração/elongação/proliferação de brotos: MS + Cinetina (2,5 mg.L ⁻¹) + AIA (0,5 mg.L ⁻¹). Enraizamento de brotos (3-4 cm): MS + AIB (0,4 mg.L ⁻¹) + AIA (0,25 mg L ⁻¹), por 15 dias. Todos os meios foram suplementados com sacarose (3%) e Ágar (0,7%), pH 5,8.
<i>Dendrocalamus hamiltonii</i> Nees et Arn. Ex Munro	Estabelecimento: segmento nodal contendo gema axilar Indução de calos: segmentos transversais de brotos assépticos (cerca de 5 mm)	Estabelecimento: MS (50%) sem reguladores de crescimento. Indução e manutenção de calos: MS + sacarose (2%) + PhytageITM (0,2%) + BAP (5 µM) + 2,4-D (5 µM); fotoperíodo de 16h.
<i>Dendrocalamus latiflorus</i> Munro	Anteras	Indução de calos: sais do meio M8 + ANA (5,37 µM) + BA (1,33 µM) + APA (110,17 µM), pH 5,8; pré-tratamento de 3 dias a 4 °C. Aditivos: nitrato de prata, prolina, glutamina, caseína hidrolisada, maltose. Diferenciação: M8 + Cinetina (2,32 µM) + BA (8,89 µM) + ANA (1,08 µM) + APA (110,17 µM). Enraizamento: MS (50% dos macronutrientes e ferro), micronutrientes e vitaminas de B5 + sacarose (3%) + Gelrite (0,25%).
<i>Moso bamboo</i> [<i>Phyllostachys heterocycla</i> var. <i>pubescens</i> (Mazel ex J. Houz.) Ohwi]	Embrião zigótico	Indução de calos: MS + 2,4-D (4 mg.L ⁻¹) + Zeatina (0,1 mg.L ⁻¹). Os meios foram suplementados com aminoácidos, glutamina e caseína hidrolisada, pH 5,8, Ágar (8 g.L ⁻¹). Proliferação de calos: MS + 2,4-D (0,5-2,0 mg.L ⁻¹), subcultivo de 15 dias, por 4 meses. Regeneração de plantas: MS + Zeatina (5-7 mg.L ⁻¹) Enraizamento: MS + sacarose (3%) + ANA (2 mg.L ⁻¹) + Zeatina (0,2 mg.L ⁻¹) + Ágar (10 g.L ⁻¹).



Conclusões	Instituição/ País	Referência
Calos embriogênicos resultaram em 59,7% de desenvolvimento de brotos e germinação de embriões somáticos. Análises histológicas demonstraram que ambos embriogênese somática e organogênese foram induzidos durante a iniciação, diferenciação de brotos, e desenvolvimento de plantas. A razão de plantas regeneradas via organogênese e embriogênese foi de 48:17.	Zhejiang Agriculture and Forestry University, China.	Zhang et al. (2010)
Menor contaminação foi obtida em meses com menor precipitação pluviométrica. Máximo número de brotos (11) foi observado com 2 mg.L ⁻¹ de BAP. A substituição de sacarose por glicose (2%) favoreceu a manutenção em longo prazo das culturas e conversão em plantas. Análises histológicas de estruturas nodulares revelaram a presença de meristemóides e embriões somáticos. Entre os regenerantes, 98,8% foram monomórficos por análise AFLP, 1,2% foram off-type. A sobrevivência <i>ex vitro</i> das plantas foi de 90%.	Council of Scientific & Industrial Research, India.	Mehta et al. (2011)
A indução a partir de explantes obtidos de brotos jovens foi baixa (21 a 29,7%), e os calos obtidos oxidaram e morreram após duas semanas de cultivo. A embriogênese somática foi eficiente a partir de embriões zigóticos maduros, com frequência de 95%. Brotos albinos foram observados. Plantas regeneradas foram enraizadas e aclimatizadas com 90,1% de sobrevivência.	Southwest University of Science and Technology, China.	Hu et al. (2011)
Análises histológicas confirmaram a organização bipolar (eixo coleóptilo-coleorriza) dos embriões somáticos. Explantes provenientes de plantas matrizes com 10 anos de idade apresentam maiores resposta a embriogênese somática. Plantas regeneradas possuem características fisiológicas e morfológicas semelhantes, ou superiores, as plantas matrizes em campo.	Pant Institute of Himalayan Environment and Development, India. Sikkim University, India. University of Mississippi, USA.	Bag et al. (2012)
A maior taxa de calogênese foi 5,08±0,61%, e 28,3±4,29% de diferenciação. Análise de citometria de fluxo demonstrou que a maioria (96/100) das plantas regeneradas foram dodecaploides, três hexaploides, e uma triploide. Plantas dodecaploides tiveram maior conteúdo de clorofila. As plantas tiveram 90% de enraizamento e 95% de sobrevivência <i>ex vitro</i> .	Chinese Academy of Forestry, China.	Qiao et al. (2013)
Maior indução (50%) e formação de calo embriogênico (15%) ocorreram em meio MS aos 10-20 dias de cultivo. Calos embriogênicos mantiveram sua capacidade de regeneração após 12 meses de subcultivo. A regeneração em plantas foi cerca de 5%. As plantas regeneradas foram aclimatizadas.	Chinese Academy of Forestry, China.	Yuan et al. (2013)

De maneira geral, a propagação *in vitro* ou micropropagação de bambu – que chamaremos aqui de convencional – não foge dos procedimentos básicos realizados para outras espécies: consiste basicamente em multiplicar propágulos vegetativos em laboratório, sob condições de total assepsia, em meio nutritivo específico e condições artificiais de luminosidade e temperatura (Singh et al., 2013). Para isso, o processo convencional é constituído essencialmente de etapas distintas, porém dependentes e que podem ser assim organizadas: i) Seleção das plantas matrizes; ii) estabelecimento *in vitro* de cultivos; iii) multiplicação/proliferação de brotos; iv) enraizamento e; v) aclimatização.

Seleção de plantas matrizes - A escolha das plantas matrizes de onde são retirados os propágulos para o cultivo constitui a primeira etapa da micropropagação do bambu. É nesta etapa que a espécie, planta-modelo ou planta-matriz que se quer propagar é escolhida. Ainda nessa etapa, o estado fisiológico, nutricional e sanitário das matrizes deve ser considerado, pois poderá exercer influência negativa nas etapas posteriores da micropropagação.

A depender do propágulo a ser utilizado, o ideal é dispor sempre de matrizes em bancos ativos de germoplasma (BAG), coleções de trabalho, ou melhor, jardins clonais, mantidos preferencialmente em casa de vegetação, nas quais é possível que se realizem práticas fitossanitárias nas plantas antes do processo de estabelecimento *in vitro* dos propágulos. Plantas em campo, apesar de também poderem servir como fontes de propágulos, estão expostas a condições ambientais naturais, o que pode ocasionar níveis altos de contaminação no momento do estabelecimento *in vitro*.

Como um dos fatores primordiais do sucesso da técnica reside na obtenção inicial de propágulos vegetativos livres de contaminação, o estabelecimento de microbrotos com pelo menos uma gema lateral pode ser facilitado quando as plantas matrizes são pulverizadas uma vez por semana com fungicidas sistêmicos de amplo espectro, como Carbendazim (10 mL/10 L de água), em condições de casa de vegetação, por pelo menos duas semanas, antes da coleta do material para o estabelecimento.

Estabelecimento *in vitro* - Entende-se por explante qualquer fragmento de célula, tecido ou órgão oriundo de partes vegetativas ou reprodutivas de uma planta (chamada de planta-matriz) utilizado como material vegetal inicial ao cultivo *in vitro*. Assim como para as demais espécies, em princípio qualquer tipo de propágulo vegetativo, desde que vivo, pode ser empregado para iniciar a propagação *in vitro* do bambu. Porém, na prática, utilizam-se as partes



vegetativas da planta-matriz que contêm os pontos ativos de crescimento da planta, ou seja, com porção de tecido meristemático, o que ocorre principalmente a partir de propágulos obtidos de brotações mais novas.

Para a micropropagação de bambus, vários tipos de propágulos têm sido empregados para o início do cultivo, sendo os mais utilizados aqueles provenientes da germinação de sementes, ápices caulinares e microestacas com gemas axilares, neste último caso necessariamente obtidos de brotações jovens coletadas da planta-matriz adulta (veja a figura 1 e a tabela 1).

Recomenda-se que a coleta seja realizada preferencialmente no mesmo dia do estabelecimento *in vitro* para evitar a desidratação dos tecidos, que no caso do bambu é rápida e pode prejudicar a viabilidade dos explantes. Nesta fase, deve-se considerar também a estação do ano, que pode interferir não apenas nas taxas de contaminação do material, mas também nos níveis hormonais e na concentração de polifenóis das plantas. Um correto estudo sobre a época do ano mais favorável à coleta do material pode melhorar os índices de estabelecimento, além de facilitar o planejamento das coletas, a organização das etapas de cultivo e o uso da mão de obra no laboratório.

Como os vários tipos de propágulos podem ser empregados para o início do cultivo, diversos protocolos voltados à desinfestação dos propágulos vegetativos podem ser utilizados. Todos eles têm o objetivo de eliminar as contaminações microbianas presentes no material, especialmente fungos, bactérias e leveduras, e permitir que o material propagativo escolhido possa ser estabelecido para o início do cultivo *in vitro*.

A assepsia dos propágulos vegetativos de bambu tem início a partir da coleta de brotações jovens (5-10 cm) de plantas matrizes em casa de vegetação, removendo-se parte das folhas, ainda em ambiente externo. As brotações obtidas são então levadas para o laboratório, onde as folhas e bainhas (que recobrem o broto) são retiradas no sentido da base para o ápice, de modo a obter somente a haste ou talo caulinar, contendo as gemas e/ou o ápice caulinar. Em seguida, com o auxílio de tesoura ou bisturi, as brotações são cortadas em tamanhos menores (0,5 a 1,0 cm), deixando-se pelo menos uma gema lateral, quando então são preparadas para a desinfestação em câmara de fluxo laminar.

O tempo de exposição dos explantes às substâncias desinfestantes, assim como a concentração a ser utilizada, depende do material em questão. Por tratar-se de material lenhoso (no caso de microestacas) e resistente (no caso de sementes), no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LCTII/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), o protocolo de desinfestação utilizado consiste na imersão dos propágulos (tanto sementes como microestacas) em álcool etílico (70%) por um



Figura 1. Aspectos da propagação *in vitro* de bambu

- (A) sementes de bambu como fonte de propágulos; (B) semente de bambu germinada *in vitro*; (C) planta de bambu originária de germinação; (D) Planta-matriz de bambu em casa de vegetação; (E) Microestacas coletadas de plantas matrizes como fonte de propágulo; (F) Microestaca estabelecida *in vitro*; (G) Microestaca estabelecida *in vitro* apresentando contaminação

minuto, seguido de 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo), e/ou, cinco minutos em bicloreto de mercúrio (HgCl₂) (0,1%) e 60 minutos em solução fúngica (Carbendazim 1,0 mL/L). Um tempo maior de exposição ou o uso de concentrações mais elevadas dos produtos pode ocasionar a “queima” dos explantes ou causar injúrias às sementes, assim como aumentar a possibilidade de oxidação dos tecidos *in vitro*, inviabilizando o desenvolvimento posterior dos propágulos. Para a retirada do excesso dos produtos, tanto as brotações como as sementes são lavadas em água destilada e esterilizada por pelo menos três vezes. Em se utilizando microestacas com gema axilar, promove-se imediatamente o corte das extremidades destas afetadas pelos produtos desinfestantes (até 3 mm), sendo as mesmas individualmente transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm) preenchidos com 10mL de meio de MS (Murashige & Skoog, 1962) para desenvolvimento.

Multiplicação/proliferação de brotos - Terminado o período de estabelecimento *in vitro*, que pode variar de quatro a oito semanas, os propágulos vegetati-



Figura 1 (continuação). Aspectos da propagação *in vitro* de bambu (H) Frascos com brotações de bambu sob multiplicação *in vitro*; (I) Aspecto de frascos de cultura líquida cultivados com bambu apresentando fraca, moderada ou forte oxidação fenólica; (J) Brotos de bambu apresentando folhas com coloração amarelada e meio de cultura oxidado, evidenciando culturas velhas; (K-L) biorreator R.I.T.A.® com propágulos de bambu sob multiplicação; (M) Calo primário induzido em bambu durante a indução da embriogênese somática, gênero *Guadua*; (N) Aspecto de calo embriogênico induzido em *Guadua* sp.; (O) Plantas de bambu provenientes da micropropagação aclimatizadas em casa de vegetação; (P) Aspecto de planta de bambu micropropagada em casa de vegetação apresentando perfilhamento

vos livres de contaminação e com brotações aparentes e bem desenvolvidas são transferidos para meio de multiplicação, no qual, após quatro a 12 semanas, a depender da espécie, formam-se novas brotações a partir de múltiplas brotações axilares. Estas, por sua vez, podem ser novamente subcultivadas para obtenção de mais material propagativo. De fato, nesta etapa, inúmer

ros subcultivos podem ocorrer até se atingir o número desejado de plantas que, por serem multiplicadas vegetativamente por meio de tecido somático, garantem a obtenção de indivíduos com idêntica composição genética da planta-matriz (clone).

A etapa de multiplicação ocorre a partir do momento em que os explantes são inoculados em meio de cultura contendo citocininas, como 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), tiadizuron (TDZ) ou metatopolina (mT), podendo ser combinadas ou não com auxinas em baixas concentrações, como ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido indol-3-acético (AIA), dependendo da espécie e do tipo de explante utilizado (vide tabela 1).

No LCTII/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, os cultivos *in vitro* têm sido desenvolvidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, intensidade luminosa de $52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo. Por vezes com algumas variações, o meio de cultura básico utilizado para a multiplicação tem sido o de Murashige e Skoog (1962), de consistência líquida, acrescido de BAP ($3,0$ a $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$) ou mT ($1,5$ a $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$). O pH é ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização do meio de cultura, a qual é realizada por autoclavagem (121 °C por 20 minutos e sob $1,5$ atm). Em razão do vigoroso crescimento, nesta etapa utilizam-se frascos de maior capacidade em volume (600 a 800 mL) que os usados convencionalmente (250 mL), com os frascos preenchidos com 50 a 100 mL de meio de cultura.

Após geralmente quatro a oito semanas, os explantes primários e as brotações produzidas (agregados de brotos ou multibrotações) são individualizados ou divididos (sempre que possível) em agregados menores e/ou microestacas (dependendo da espécie), submetidos a uma poda das folhas (evitando a retirada completa) e raízes (deixando cerca de $1,0$ cm), além da retirada do excesso de porções oxidadas, e transferidos para novo meio de cultura, até que os mesmos procedimentos sejam novamente demandados. Sucessivas transferências das brotações para novo meio de mesma constituição são conhecidas como subcultivos, repicagens ou ciclos de multiplicação, os quais podem ter uma duração média de quatro, oito ou até dezesseis semanas, a depender da espécie trabalhada.

Os subcultivos são também necessários devido ao esgotamento dos constituintes do meio de cultura (carboidrato, sais minerais e vitaminas), além do acúmulo de compostos como o etileno e os polifenóis, que podem ser deletérios à cultura. Sugere-se que os subcultivos sejam limitados entre seis e oito para evitar ou reduzir a possibilidade de aparecimento de plantas atípicas e que, por segurança, o material vegetal seja renovado pelo menos uma vez por ano com novo estabelecimento de material do campo.

Mesmo que não haja contaminação aparente durante o estabelecimento do material vegetal *in vitro*, bactérias podem se desenvolver em subcultivos mais avançados de multiplicação. Por isso, para evitar que o trabalho de vários subcultivos seja prejudicado ou perdido com o aparecimento de contaminantes, testes simples de indexação dos materiais são indicados. Além de ser um indicativo da eficiência ou não do protocolo de descontaminação, a indexação do material após determinado período de estabelecimento e nos subcultivos é importante para indicar a fonte da contaminação, uma vez que o aparecimento de contaminantes durante o subcultivo pode ser um indicativo da manipulação inadequada do material pelos operadores (Camara et al., 2010).

Para a detecção dos contaminantes, recomenda-se o uso de meios de cultura enriquecidos, nos quais são semeadas ou cultivadas amostras do material em estudo. Partindo-se de material aparentemente asséptico e já estabelecido, a parte interna recém-dividida do explante no subcultivo é suavemente tocada com uma alça de platina ou com a lâmina do bisturi. Em seguida, a alça ou a lâmina é cuidadosamente colocada em contato com a superfície do meio de cultura escolhido para o teste, promovendo, assim, a semeadura de possíveis contaminantes. É possível também que essa semeadura seja feita de forma direta, tocando-se com a superfície do explante recém-cortado o meio de cultura enriquecido. Sinais de crescimento microbiano neste meio após alguns dias da semeadura são um indicativo de que o material está contaminado, embora em meio de estabelecimento ou de multiplicação esse aspecto possa não ser evidente (Scherwinski-Pereira & Alterthum, 2010).

Por outro lado, é possível fazer a indexação das plantas durante os subcultivos por meio de partes do explante. Este método consiste em cultivar as extremidades dos explantes no momento em que estes são subcultivados para um novo meio de cultura, preferencialmente enriquecido. Este método é mais confiável que o anterior pelo fato de que, havendo presença de contaminantes, estes se desenvolvem próximo ao explante, eliminando possíveis dúvidas sobre a origem da contaminação.

Enraizamento dos brotos - Durante a fase de multiplicação, o uso frequente de citocininas no meio de cultura, com o objetivo de incrementar as taxas de multiplicação, resulta muitas vezes em brotações de tamanho reduzido, desprovidas ou com poucas raízes e, não raramente, com raízes pouco funcionais, devido ao efeito cumulativo do regulador de crescimento. Assim, é sempre recomendável que uma fase intermediária de enraizamento seja realizada durante a micropropagação do bambu, uma vez que a obtenção de um

sistema radicular bem formado e funcional vai favorecer a sobrevivência e o crescimento *ex vitro* das plantas, evitando possíveis perdas por morte durante a aclimatização.

Em bambu, a maioria dos trabalhos de micropropagação tem realizado o enraizamento das brotações utilizando a formulação básica do meio de Murashige e Skoog (1962), com a suplementação do meio com auxinas exógenas, como ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB). Em alguns casos, a redução de 50% dos sais do meio de MS, bem como o uso do meio desprovido de auxinas também tem sido reportada.

Como regra geral, raízes curtas são mais desejáveis, pois, além de facilitarem seu manuseio no momento do plantio, normalmente estão numa fase de crescimento ativo, o que facilita a sobrevivência da planta. Por isso, discutem-se também os efeitos do tempo de permanência das brotações no meio de enraizamento com auxinas sobre a eficiência do enraizamento e posterior sobrevivência das plantas durante a aclimatização (Agnihotri & Nandi, 2009), uma vez que o aumento do tempo de permanência das raízes em meio de cultura pode proporcionar um rápido envelhecimento nas mesmas, tornando-as menos funcionais.

Entende-se que a etapa de enraizamento é uma etapa realizada classicamente sob condições *in vitro*, fato que, sem dúvida, aumenta o processo de manipulação e o tempo de permanência do cultivo *in vitro*, com conseqüente aumento dos custos de produção. Assim, embora pouco relatado na literatura, o enraizamento *ex vitro* diretamente em substrato pode ser uma alternativa para algumas espécies de bambu que apresentem facilidade de enraizamento e sobrevivência em casa de vegetação. Salienta-se, contudo, que o uso desta técnica de propagação vegetativa é altamente dependente do tipo de auxina ou substância indutora do enraizamento, do substrato a ser utilizado e das condições ambientais do local, os quais devem ser previamente definidos antes do início dos trabalhos (Scherwinski-Pereira & Fortes, 2004; Fermino Júnior et al., 2011).

Transplântio e aclimatização - A etapa de transplântio e aclimatização compreende a transferência das plantas produzidas em condições do cultivo *in vitro* para um ambiente externo (casa de vegetação) para seu crescimento e desenvolvimento. Trata-se de uma das etapas mais importantes do processo e deve ser feita com cuidado para evitar perdas significativas. Para laboratórios que produzem milhares de plantas micropropagadas regularmente, a otimização da fase de aclimatização é de fundamental importância para evitar esse prejuízo.

Durante as etapas *in vitro*, brotações e plantas de bambu se desenvolvem sob condições controladas e totalmente artificiais (temperatura 25 ± 2 °C; radiação luminosa em torno de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 16 horas). Então, quando são aclimatizadas, ficam sujeitas a forte estresse ambiental, que pode levar à morte. Além da baixa atividade fotossintética, as plantas produzidas *in vitro* apresentam modificações qualitativas e quantitativas em sua composição anatômica, ficando sensíveis a grandes perdas de água por transpiração, o que pode ocasionar baixa sobrevivência no transplantio. Assim, o sucesso final da micropropagação em bambu depende não apenas da correta condução das fases *in vitro*, mas, sobretudo, da capacidade das plantas produzidas em superar sua transferência para condições *ex vitro* (Valero-Aracama et al., 2007; Yokota et al., 2007).

Outro aspecto a ser considerado na fase de aclimatização refere-se ao padrão de crescimento. Ao sofrer mudança abrupta de ambiente, normalmente as plantas cessam ou reduzem o crescimento até que se adaptem às novas condições. Por outro lado, o rápido crescimento na aclimatização pode contribuir significativamente para que mudas micropropagadas sejam disponibilizadas aos interessados de forma mais rápida e barata. Para tanto, é fundamental otimizar as condições ambientais *in vitro* e *ex vitro*, cuidar do momento do transplantio, manejar corretamente e escolher adequadamente os substratos e recipientes (Scherwinski-Pereira et al., 2001a,b,c).

No caso dos substratos, suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem facilitar ou limitar a sobrevivência, a formação de novas raízes e o crescimento das plantas. Além disso, a escolha dos materiais deve observar também seu custo e disponibilidade.

Para o bambu, o processo de aclimatização consiste basicamente na remoção das plantas dos frascos de cultivo, lavagem das raízes em água corrente para remoção do resíduo de meio de cultivo aderido, individualização das plantas, poda das raízes, transplantio para recipientes (tubetes ou bandejas coletivas) contendo substrato adequado e transferência para casa de vegetação ou telado. No LCTII/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o substrato utilizado para a aclimatização tem sido a mistura de um substrato comercial (Bioplant®) e areia lavada, em volumes que variam de 1:1 a 3:1 v/v. Adicionalmente, antes de seguirem para a casa de vegetação, as mudas são pré-aclimatizadas por pelo menos duas a quatro semanas em câmaras de crescimento com temperatura, fotoperíodo e radiação controlados (25 ± 1 °C; $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 12 horas, respectivamente).

Em alguns casos, pode ser feita uma pré-aclimatização das mudas anteriormente ao transplantio pela abertura dos frascos ainda na sala de cresci-

mento por algumas horas ou mesmo dias, ou, ainda, pela utilização da luz solar ou natural na fase de enraizamento *in vitro* (Talavera et al., 2005). Tais práticas podem proporcionar bons resultados quanto à rusticificação¹ das plantas ainda *in vitro*.

TÉCNICAS AVANÇADAS PARA A PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE BAMBU EM LARGA ESCALA - A metodologia tradicional de micropropagação do bambu, descrita acima, baseia-se em cultivos realizados em pequenos recipientes e, a depender do protocolo utilizado, demanda grande mão-de-obra. Assim, parece evidente que tais métodos são ainda limitados técnica e economicamente quando se pensa em propagação comercial e produção em massa de mudas. É imprescindível, portanto, que se avance nos trabalhos sobre a propagação *in vitro* de bambu pelo aprofundamento das questões de viabilidade de tais protocolos para produção de mudas em larga escala, utilizando-se para isso técnicas como cultivo em suspensão e meios de cultura de consistência líquida, biorreatores e embriogênese somática.

Meios de consistência líquida - Na busca da maior eficiência no processo de propagação de plantas em laboratório, pesquisadores têm testado a substituição do meio gelificado pelo meio líquido. Apesar de meios líquidos serem citados desde os primórdios da cultura de tecidos de plantas com os trabalhos de Haberlandt (1902), as discussões sobre o uso de meios de consistência líquida para a rápida propagação de plantas tiveram início na década de 1970, quando Ben-Jaacov e Langhans (1972) estimaram que o uso de meios líquidos e cultivos em suspensão em crisântemo poderiam proporcionar a produção anual de até 100 mil novas plantas, partindo-se de um único propágulo estabelecido *in vitro*. De fato, o uso de meios líquidos pode proporcionar incrementos significativos na taxa de multiplicação vegetal, a depender da espécie desejada, uma vez que nem todas elas podem ser adaptadas ao sistema líquido.

A utilização dos meios líquidos pode reduzir os custos de produção de plantas *in vitro*, além de permitir a automação (Alvard et al., 1993). O meio líquido oferece condições uniformes às culturas, podendo ser facilmente renovado sem alterar o recipiente. Além disso, também facilita o uso de um maior volume de meio – possibilitando o uso de recipientes maiores do que quando se usa meios gelificados – e reduz o tempo de transferência dos propágulos nos subcultivos, já que não há necessidade de posicionar o explante

¹ Prática ou conjunto de práticas para tornar as plantas mais resistentes às diferentes condições de estresse que podem ocorrer no pós-plantio.



de maneira vertical, apenas colocá-lo em contato com o meio. Note-se também que várias espécies apresentam melhor desempenho propagativo quando cultivadas em meio líquido, devido ao maior contato dos explantes com o meio de cultura e, portanto, a maior disponibilidade de nutrientes para os cultivos (Berthouly & Etienne, 2005; García-Ramírez et al., 2011).

Apesar dos resultados promissores, o uso de sistemas utilizando meios líquidos ainda não é uma técnica rotineira para a propagação de espécies de maior interesse econômico, embora para a cultura de bambu já seja uma realidade, com protocolos bastante adiantados quanto ao seu uso (vide tabela 1).

Embriogênese somática - Embriogênese somática, adventícia ou assexual é o processo pelo qual embriões se desenvolvem a partir de tecidos somáticos, com estrutura genética semelhante ao material de origem (Williams & Maheswaran, 1986). Uma particularidade dos embriões somáticos é a similaridade com os embriões zigóticos encontrados naturalmente – aliada à sua bipolaridade (estrutura constituída de ápice caulinar e radicular), essa característica os difere dos propágulos obtidos por organogênese e torna-os capazes de originar plantas completas (Dodeman et al., 1997).

De fato, a embriogênese somática é uma das técnicas de micropropagação mais promissoras dos últimos tempos (Saleh & Scherwinski-Pereira, 2016). Uma vez dominada para a espécie que se quer trabalhar, a técnica apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação *in vitro*, entre as quais se pode destacar a possibilidade de multiplicação em larga escala de plantas-matrizes selecionadas, a produção de um elevado número de propágulos (embriões somáticos) em pequenos espaços físicos, a possibilidade de armazenamento dos propágulos por médio-longo período de tempo via manutenção de coleções *in vitro* e criopreservação e a sincronização da produção das mudas, além da possibilidade de um alto grau de automatização do processo pelo uso, por exemplo, de biorreatores (Von Arnold, 2008; Zimmermann, 2014).

Em bambu, a produção de embriões somáticos e regeneração destes em plantas utilizando-se propágulos, como embriões zigóticos maduros e imaturos, anteras, inflorescências, folhas e sementes já foram descritas na literatura (tabela 2). Portanto, a escolha de um ou outro explante para o início dos trabalhos pode depender não somente da espécie a ser trabalhada, mas também da disponibilidade de materiais que servirão como propágulos. Explantes provenientes de sementes e inflorescências, por exemplo, apesar de serem responsivos para trabalhos de embriogênese somática, podem ser limitantes em razão da baixa disponibilidade de acesso.

Como diferentes tipos de propágulos podem ser utilizados para a indução da embriogênese somática, a literatura também é farta quanto aos protocolos utilizados. No entanto, basicamente os processos de indução, multiplicação, diferenciação e regeneração dos embriões somáticos são realizados em meios de cultura específicos para cada etapa.

Durante as diferentes fases do processo embriogênico, podem ser utilizados diferentes meios nutritivos de cultivo, como o de MS, N6, ou ainda o B5. No entanto, o meio de MS parece ser o mais utilizado, proporcionando respostas positivas nas diferentes fases do processo. Vale notar que cada etapa é dependente do coerente balanço de reguladores de crescimento – calos embriogênicos em bambu são induzidos, usualmente, em meio de cultura com auxinas (como 2,4-D, picloram e dicamba) em concentrações variadas, a depender da espécie e do tipo de propágulo utilizado. Assim como na maioria dos trabalhos que utilizam a embriogênese somática para a propagação de plantas, os estágios posteriores de multiplicação, diferenciação e regeneração de bambus são geralmente alcançados com a redução das concentrações de auxinas e o aumento de citocininas no meio de cultura. No LCTII/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a indução de calos primários e embriogênicos em espécies do gênero *Guadua* tem sido obtida com o uso do meio de MS adicionado de picloram e 2,4-D, cujas concentrações são diminuídas no decorrer das etapas.

Finalmente, é importante ressaltar que, apesar do potencial de utilização e da grande aplicabilidade futura da técnica, os trabalhos de embriogênese somática em bambu ainda estão engatinhando quanto ao seu uso e aplicação em nível comercial. Faz-se necessária reforçada carga de pesquisa científica para que novos e mais eficientes protocolos sejam desenvolvidos.

Uso de biorreatores - Embora seja um termo facilmente identificável por profissionais da área, o termo “biorreatores” é difícil de ser conceituado precisamente. Seu uso parte da tentativa de se aperfeiçoar a produção de plantas *in vitro*, uma vez que sua grande vantagem como sistema de propagação é a possibilidade de reduzir a necessidade de manipulação dos cultivos e os custos de mão-de-obra, além de permitir a semiautomatização de etapas da produção. Essas estruturas utilizam meios nutritivos de consistência líquida e podem ser de imersão temporária ou permanente (Teisson et al., 1995).

Os biorreatores foram originalmente desenvolvidos para o cultivo de células vivas e microrganismos visando à fermentação e à produção de metabólitos secundários para fins industriais. Um dos primeiros relatos sobre o uso de biorreatores foi feito por Takayama e Misawa (1981) na propagação *in*



vitro de begônias. Desde então, vem crescendo a utilização de biorreatores na produção de mudas em larga escala de diversas espécies vegetais.

Diversas vantagens são atribuídas ao uso de biorreatores na micropropagação de plantas, destacando-se: o aumento do controle das condições de cultivo *in vitro*; a possibilidade de renovação da atmosfera das culturas; a redução da quantidade de recipientes utilizados e do espaço laboratorial necessário; a facilidade de manipulação das culturas; a facilidade de as culturas absorverem nutrientes pelo contato quase constante de toda superfície do explante com o meio nutritivo, aumentando as taxas de crescimento e de biomassa dos cultivos; a estimulação do crescimento das plantas pelo espaço maior proporcionado pelo sistema; e a possibilidade de mudança e adequação do meio de cultura, de acordo com o estágio de desenvolvimento (Teixeira & Cid, 2014).

A maioria dos trabalhos existentes baseia-se no uso de biorreatores de imersão temporária, que podem se apresentar em diversas formas e modelos. Apesar das importantes vantagens, o número de trabalhos com biorreatores para a cultura do bambu ainda é ínfimo – o que sugere ser este um campo a ser explorado.

Conclusões

A literatura tem sido farta em mostrar as vantagens e limitações do uso de técnicas de micropropagação para a reprodução vegetativa de um grande número de espécies de plantas. Em bambu, diversos protocolos básicos referentes à propagação *in vitro* também vêm sendo publicados, e seu desafio é tornar a técnica eficiente para a produção de mudas em larga escala, atingindo milhares de plantas por ano. Dado que as técnicas clássicas são pouco produtivas, a micropropagação é, entre as técnicas conhecidas, possivelmente a única capaz de permitir que o bambu seja propagado em tal escala para atender a demanda de um negócio cada vez mais exigente quanto à quantidade e qualidade de mudas. Assim, parece evidente que o aperfeiçoamento de etapas dos protocolos de micropropagação convencionais, sobretudo a de estabelecimento *in vitro*, o uso de meios líquidos e o desenvolvimento de protocolos para a propagação por embriogênese somática, associados ao uso de biorreatores, parecem ser o caminho estratégico para que a cultura seja produzida em escala comercial.

Agradecimentos

Ao CNPq (Processo nº. 458151/2013-0), pelo apoio financeiro e concessão de bolsas de estudo envolvidas no projeto.

Referências bibliográficas

- AFONSO, D. G. Bambu nativo (*Guadua* spp.): Alternativa de desenvolvimento econômico e sustentável para o Estado do Acre. Tese de Mestrado, UFPR, Curitiba – PR, 2011.
- AGNIHOTRI, R. K.; NANDI, S. K. *In vitro* shot cut: a high frequency multiplication and rooting method in the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. **Biotechnology**, v.8, n.2, p.259-263, 2009.
- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micropropagation: effect of temporary immersion of explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.55-60, janeiro 1993.
- BAG, N.; PALNI, L. M. S.; CHANDRA, S.; NANDI, S. K. Somatic embryogenesis in ‘maggar’ bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii*) and field performance of regenerated plants. **Current Science**, v.102, n.9, p.1279-1287, maio 2012.
- BAKSHI, M.; TIWARI, C.; RAZVI, S. Conservation of an important montane bamboo *Thamnochlamus falconeri*, Hook.f. ex Munro through axillary bud proliferation. **Journal of Forestry Research**, v.26, n.1, p.179-185, março 2015.
- BEN-JAACOV, J.; LANGHANS, R. W. Rapid multiplication of Chrysanthemum plants by stem-tip proliferation. **HortScience**, n.7, p.289-290, 1972.
- BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: Hvoslef-Eide A.K.; Preil W. (ed.). **Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation**. Dordrecht: Springer, p.165-195, 2005.
- BRAR, J.; SHAFI, A.; SOOD, P.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* propagation, biochemical studies and assessment of clonal fidelity through molecular markers in *Bambusa balcooa*. **Journal of Tropical Forest Science**, v.26, n.1, p.115-124, janeiro, 2014.
- CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. Microrganismos assintomáticos do cultivo *in vitro*: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In: Scherwinski-Pereira, J. E. (Org.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.1, p. 221-260.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, n.14, p.335- 345, abril, 1981.
- DODEMAN, V. L.; DUCREX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal Experimental Botany**, v.48, p.1493-1509, agosto, 1997.
- FIALHO, E. D.; DA SILVA, A. L. P.; TONHOLO, J. Desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu: uma oportunidade para empreender. In: **XI Seminário Ibero-Latinoamericano de Gestión Tecnológica**, Salvador, Bahia, p.1-10, 2005.
- FONSECA, F. K. P. Produção de mudas de bambu *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) por propagação vegetativa. Rio Largo, AL. Dissertação de Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal. Universidade Federal de Alagoas, 2007.



- GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; GONZÁLES, M. G.; MENDOZA, E. Q.; SEIJO, M. F.; CÁRDENAS, M. L. O.; MORENO-BERMÚDEZ, L. J.; RIBALTA, O. H. Effect of BA treatments on morphology and physiology of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p.205-211, janeiro, 2014.
- FERMINO JR, P. C. P.; RAPOSO, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de teca (*Tectona grandis* L.). **Floresta**, v.41, p.79-86, 2011.
- GILLIS, K.; GIBLIS, J.; PEETERS, H.; DHOOGHE, E.; OPRINS, J. Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.91, p.115-123, novembro, 2007.
- GODBOLE, S.; SOOD, A.; THAKUR, R.; SHARMA, M.; AHUJA, P. S. Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. **Current Science**, v.83, n.7, p.885-889, outubro, 2002.
- GOYAL, A. K.; PRADHAN, S.; BASISTHA, B. C.; SEM, A. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. 3 **Biotech**, v.5, n.4, p.473-482, agosto, 2015.
- HU, S.; ZHOU, J.; CAO, Y.; LU, X.; DUAN, N.; REN, P.; CHEN, K. *In vitro* callus induction and plant regeneration from mature seed embryo and young shoots in a giant sympodial bamboo, *Dendrocalamus farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et H.L. Fung. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.16, p.3210-3215, abril, 2011.
- KALAIARASI, K.; SANGEETHA, P.; SUBRAMANIAM, S.; VENKATACHALAM, P. Development of an efficient protocol for plant regeneration from nodal explants of recalcitrant bamboo (*Bambusa arundinacea* Retz. Willd) and assessment of genetic fidelity by DNA markers. **Agroforestry Systems**, v.88, p.527-537, junho, 2014.
- KAVITHA; B. M.; KIRAN, S. An efficient technique for *in vitro* propagation of *Dendrocalamus brandisii* Kurz using nodal segments. **Global Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.2, n.1, p.1-10, 2014.
- KELCHNER, S. A. & BAMBOO PHYLOGENY GROUP. Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.67, p. 404-413, maio, 2013.
- KUMAR, V.; BANERJEE, M. Albino regenerants proliferation of *Dendrocalamus asper* *in vitro*. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.10, n.1, p.09-13, 2014.
- LIN X.; HUANG, L.; FANG W. (2012). Bamboo regeneration via embryogenesis and organogenesis. In: Sato, K. I. (Org). Embryogenesis. 1ed. Rijeka: **Intech**, 2012, v.1, p.359-372.
- LIN, C.; LIN, C.; CHANG, W. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p.75-82, janeiro, 2004.
- MEHTA, R.; SHARMA, V.; SOOD, A.; SHARMA, M.; SHARMA, R. K. Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of *in vitro*-derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall., using AFLP markers. **European Journal of Forest Research**, v.130, p.729-736, setembro, 2011.
- MUDOI, K. D.; SAIKIA, S. P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.20, p. 2770-2785, maio, 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, julho, 1962.

- OLIVEIRA, J. F.; LEMOS, E. E. P.; REZENDE, L. P. Desenvolvimento de métodos de micropropagação para produção de mudas de Bambu – *Bambusa nutans* G.C. Wall Ex Munro. **Ciência Agrícola**, v.10, n.1, p.25-29, 2012.
- QIAO, G.; LI, H.; LIU, M.; JIANG, J.; YIN, Y.; ZHANG, L.; ZHUO, R. Callus induction and plant regeneration from anthers of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. **In Vitro Cellular Development Biology** – Plant, v.49, p.375-382, agosto, 2013.
- ROUT, G. R.; DAS, P. Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of 3 species of bamboo. **Plant Cell Reports**, v.13, p.683-686, setembro, 1994.
- SALEH, E. O. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Advances in somatic embryogenesis of palm trees (Arecaceae): fundamentals and review of protocols. In: Mujib, A. (Org.). Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications. 1ed. **New Delhi: Springer**, 2016, v.1, p.231-254.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Baixa temperatura para explantes do porta-enxerto de macieira Marubakaido *in vitro* durante a aclimatização. **Scientia Agrícola**, v.58, n.2, p. 401-405, abril-junho 2001a.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Efeito da baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.1, p. 89-95, janeiro 2001b.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Crescimento de plantas micropropagadas de macieira em casa de vegetação com aplicações de ácido giberélico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.6, p.881-886, junho 2001c.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Produção de mudas pré-básicas de batatas por estaquia a partir de plantas micropropagadas. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.2, p.186-192, abril-junho, 2004.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; ALTERTHUM, F. Detecção, isolamento e preservação de microrganismos contaminantes da cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: Jonny Everson Scherwinski-Pereira. (Org.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.1, p. 163-185.
- SINGH S. R.; SINGH R.; SANJAY KALIA S.; DALAL S. DHAWAN A. K.; KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo – a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.19, n.1, p. 21-41, janeiro 2013.
- SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Seasonal influences on *in vitro* bud break in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. Ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale shoot multiplication and plantlet regeneration. **Indian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.1, p.9-21, 2012.
- SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, K.; KALIA, R. K. Ascertaining clonal fidelity of micropropagated plants of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro using molecular markers *In Vitro Cellular and Development Biology* – **Plant**, v.49, p.572-583, novembro, 2013.
- TAKAYAMA S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. **Plant Cell Physiology**, v.22, n.3, p.461-467, maio, 1981.
- TALAVERA, C.; CONTRERAS, F.; ESPADAS, F.; FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J. M. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, n.3, p.287-292, dezembro, 2005.



- TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J. V.; ETIENNE, H. *In vitro* culture by temporary immersion: a new device. **Plantations, Recherche, Developpement**, v.2, n.5, p.32-33, outubro, 1995.
- TEIXEIRA, J. B.; CID, L. P. B. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. edição, Embrapa Informação Tecnológica: Brasília - DF, p.159-178.
- VALERO-ARACAMA, G.; WILSON, S. B.; KANE, M. E.; PHILMAN, N. L. Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy - and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.43, n.3, p.237-246, junho, 2007.
- VON ARNOLD, S. Somatic embryogenesis. In: GEORGE, E. F, HALL, M. A, DE KLERK, G. J. (eds.). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Springer, Dordrecht, p.335-354, 2008.
- WAIKHOM, S. D.; LOUIS, B. An effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melocanna baccifera*) through nodal culture. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-8, maio, 2014.
- WEI, Q.; GAO, J.; QIAN, W.; XU, M.; LI, Z.; DING, Y. 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, julho, 2015.
- WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, n.4, p.443-462, abril, 1986.
- YANG, H. Q.; YANG, J. B.; PENG, Z. H.; GAO, J.; YANG, Y. M.; PENG, S.; LI, D. Z. A molecular phylogenetic and fruit evolutionary analysis of the major groups of the paleotropical woody bamboos (Gramineae: Bambusoideae) based on nuclear ITS, GBSSI gene and plastid trnL-F DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.48, n.3, p. 809-824, setembro, 2008.
- YEH, M.; CHANG, W. Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescence callus of *Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana*. **Plant Cell Reports**, v.5, n.6, p.409-411, dezembro, 1986a.
- YEH, M.; CHANG, W. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro). **Theoretical and Applied Genetics**, v.73, n.2, p.161-163, dezembro, 1986b.
- YOKOTA, S.; KARIM, M. Z.; AZAD, M. A. K.; RAHMAN, M. M.; EIZAWA, J.; SAITO, Y.; ISHIGURI, F.; IIZUKA, K.; YAHARA, S.; YOSHIZAWA, N. Histological observation of changes in leaf structure during successive micropropagation stages in *Aralia elata* and *Phellodendron amurense*. **Plant Biotechnology**, v.24, n.2, p.221-226, dezembro, 2007.
- YUAN, J.-L.; GU, X.-P.; LI, L. B.; YUE, J. J.; YAO, N.; GUO, G. P. Callus induction and plantlet regeneration of *Bambusa multiplex*. **Scientia Silvae Sinicae**, v.45, n.3, p.35-39, 2009.
- YUAN J.-L.; YUE, J.-J.; WU, X.-L.; GU, X.-P. Protocol for callus induction and somatic embryogenesis in moso bamboo. **PLoS ONE**, v.8, n.12, e81954, dezembro, 2013.
- ZHANG, N.; FANG, W.; SHI, Y.; LIU, Q.; YANG, H.; GUI, R.; LIN, X. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, n.3, p. 325-332, dezembro, 2010.
- ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3ª edição, Embrapa Informação Tecnológica: Brasília - DF, p.69-103.