ESTUDO DA MORFOGÊNESE EM CALOS DE
Phyllostachys bambusoides Sieb. & Zucc.

YURIKA HELENA KOMATSU

-Engenheiro Agrônomo-

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de Concentração: Solos
e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 1995

Dados internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Divisão de Biblioteca e Documentação - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Komatsu, Yurika Helena

Estudo da morfogênese em calos de Phyllostachys bambusoides Sieb. &
Zucc. Piracicaba, 1995.
105p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Bambu - Propagação "in vitro" 2. Calo de bambu - Morfogênese
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.587

ESTUDO DA MORFOGÊNESE EM CALOS DE
Phyllostachys bambusoides Sieb. & Zucc.

YURIKA HELENA KOMATSU

Aprovada em: 03/05/1995

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves	- ESALQ/USP
Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate de Couto	- ESALQ/USP
Prof. Dr. Marcílio de Almeida	- ESALQ/USP
Prof. Dr. Oswaldo Galvão Brasil	- IB/UNESP
Prof. Dr. Isaac Stringueta Machado	- Agronomia / FCA/UNESP

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves
- Orientador -

"O sábio observa no bambu um modelo de constância e permanência. Em seu paciente fluir é posto à prova pelos ventos, pela chuvas, pela nevada, pelo abrasador calor, mas sempre se acomoda suavemente, sem resistir, e mantém sua integridade. Como o sábio, o bambu age sem ação e ensina sem palavras"

*O TAO DA MÚSICA
-Carlos D. Fregtman (1986)-*

A Deus,

**por conceder constantemente força infinita
na condução e término de mais esta
etapa da minha vida**

**Aos meus pais Chikara e Yoko
razão da minha existência**

A minha irmã Sônia e à avó Tomi

DEDICO

**Ao Professor Antonio Natal Gonçalves
cuj a orientação tornou possível
a realização deste trabalho**

meu agradecimento especial

AGRADECIMENTOS

- . Ao Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da E.S.A. "Luiz de Queiroz", por esta grande oportunidade de aprimoramento.
- . Ao Professor Dr. Geraldo Victorino de França, Coordenador do Curso de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela oportunidade oferecida.
- . Ao Departamento de Ciências Florestais e IPEF pelos recursos materiais fornecidos para o desenvolvimento do trabalho.
- . À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelas bolsas de estudo concedidas.
- . Aos pesquisadores do Instituto Agrônomo de Campinas, Dr. Anísio Azzini, Dr. Antonio Salgado, Dr. Dirceu Ciaramello e Dr. Armando Pettinelli Jr., pela contribuição proporcionada na fase inicial deste trabalho e fornecimento de material vegetal.
- . Ao Professor Dr. Marcilio de Almeida pela atenção, pelas facilidades proporcionadas na execução e interpretação das análises histológicas.
- . Ao Professor Dr. José Otávio Brito pelas sugestões e facilidades proporcionadas.
- . Ao Professor Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto, pelo apoio à execução da análise estatística e interpretação dos dados experimentais.
- . Ao Edson Namita Higashi, Valmir Antonio Costa, Sônia Shigueyo Komatsu e Ilze Helena C. de Gáspari das Neves pela colaboração e incentivo em todas as etapas do curso de pós-graduação.
- . Aos técnicos de laboratório, José Roberto Romanini, Renato Coletti Junior, Heraldo Negri de Oliveira, Milton Cesar Ribeiro e Udemilson Luiz Ceribelli, por todo auxílio prestado durante o desenvolvimento dos trabalhos.
- . Às bibliotecárias, Eliana M.G. Sabino e Kátia M. de Andrade Ferraz, pelo constante apoio, colaboração e amizade.
- . Aos colegas do curso pela amizade, estímulo e colaboração
- . A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTAS DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO	xviii
SUMMARY.....	xix
 1 - INTRODUÇÃO	 1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Considerações sobre a cultura do bambu	2
2.1.1. Aspectos da cultura.....	2
2.1.2. Importância da cultura	3
2.1.3. Principais problemas da cultura	4
2.1.4. Caracterização da espécie.....	5
2.2. Aspecto da micropropagação	5
2.2.1. Microprogação do bambu	7
2.2.2. Fonte de carboidrato.....	20
2.2.3. Uso de prata e cobalto no controle da morfogênese.....	21
2.2.4. Avaliação do crescimento <i>in vitro</i>	22
3 - MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Explante	24
3.2. Desinfestação dos explantes.....	24
3.3. Meios de cultura	26
3.4. Condições de cultura	28
3.5. Indução de calo.....	28
3.6. Manutenção e multiplicação do calo	28
3.7. Indução à morfogênese.....	28
3.7.1. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso	 29
3.7.1.1. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso na presença de luz	 30
3.7.1.2. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso na ausência de luz	 32

3.7.2. Efeito de diferentes concentrações de BA e ANA na morfogênese de calo amarelo globoso	34
3.7.2.1. Efeito de concentrações baixas de BA e ANA.....	34
3.7.2.2. Efeito de concentrações altas de BA e ANA	36
3.7.3. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos em calo branco friável na presença de luz	36
3.7.4. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na morfogênese de calo branco friável.....	37
3.7.4.1. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram.....	37
3.7.4.2. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram	39
3.7.5. Efeito da glutamina e caseína hidrolisada na presença e na ausência de ácido ascórbico na morfogênese de calo branco friável.....	40
3.8. Avaliação do crescimento de calo amarelo globoso <i>in vitro</i>	41
3.9. Análises histológicas	42
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Indução de calos (explante secundário).....	43
4.2. Efeito de diferentes tratamentos na morfogênese de calo amarelo globoso.....	46
4.2.1. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso	46
4.2.1.1. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso na presença de luz.....	46
4.2.1.2. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso na ausência de luz	54
4.2.2. Efeito de concentrações de BA e ANA na morfogênese de calo amarelo globoso.....	59
4.2.2.1. Efeito de diferentes concentrações baixas de BA e ANA na morfogênese de calo amarelo globoso.	59
4.2.2.2. Efeito de diferentes concentrações altas de BA e ANA na morfogênese de calo amarelo globoso.	66

4.3. Efeito de diferentes tratamentos na morfogênese de calo branco friável	71
4.3.1. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos em calo branco friável.....	71
4.3.2. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram na morfogênese de calo branco friável.....	74
4.3.2.1. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram na morfogênese de calo branco friável.....	74
4.3.2.2. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram em calo branco friável	78
4.3.3. Efeito da glutamina e da caseína hidrolisada na presença e na ausência de ácido ascórbico.....	83
4.4. Avaliação do crescimento de calo amarelo globoso <i>in vitro</i>	85
4.5. Análise histológica	88
5. CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representação esquemática do desenvolvimento celular. I - Fase de indução, II - Fase de transição, III - Fase exponencial, IV - Fase de desaceleração do crescimento, V - Fase estacionária, VI - Fase de declínio. (Fonte: DIAS, 1982).....	22
2. Muda de <i>Phyllostachys bambusoides</i> sob condições de telado.....	25
3. Calo de <i>Phyllostachys bambusoides</i> induzido a partir de bainha foliar.....	44
4. Tipos de calos induzido a partir de bainha foliar de <i>Phyllostachys bambusoides</i> : a) amarelo globoso com pigmentação vermelho-purpúreo; b) branco friável e c) mucilaginoso.....	44
5. Calo amarelo globoso <i>Phyllostachys bambusoides</i> em meio MS complementado com Picloram	45
6. Calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> em meio MS complementado com Picloram.....	45
7. Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença sacarose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura	47
8. Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de frutose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura	47
9. Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura	48
10. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.	50
11. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de frutose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.	50
12. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de glicose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura	51

13. Formação de centros meristemáticos em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.....	51
14. Formação de centros meristemáticos em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de frutose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.....	52
15. Formação de centros meristemáticos em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.....	53
16. Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.....	55
17. Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de frutose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura	56
18. Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura	56
19. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.....	57
20. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de frutose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.....	58
21. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de glicose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.....	58
22. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de concentrações baixas de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.....	62
23. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	62
24. Formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de concentrações baixas de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	65

25. Formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.....	65
26. Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de concentrações altas de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	68
27 Formação de raiz em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.....	69
28. Formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de concentrações altas de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	71
29. Formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.....	71
30. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura	73
31. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de frutose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura	74
32. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.	74
33. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> em relação as concentrações de AgNO_3 na presença de Picloram 1,0 mg/l sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura	76
34. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> em relação as concentrações de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram 1,0 mg/l sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura	77
35. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> em relação às concentrações de AgNO_3 na ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.....	79
36. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> em relação às concentrações de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.....	80

37. Efeito das diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram em calo branco friável, aos 49 dias	82
38. Efeito das diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram em calo branco friável, aos 49 dias	82
39. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> em relação à presença de ácido ascórbico sob fotoperíodo de 16/8horas por 49 dias de cultura	84
40. Cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> em relação à ausência de ácido ascórbico sob fotoperíodo de 16/8horas por 49 dias de cultura	84
41. Efeito da glutamina, caseína hidrolisada, BA e Picloram na presença e ausência de ácido ascórbico aos 48 dias de cultura	85
42. Peso da matéria fresca (PMF) e peso da matéria seca (PMS) de calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> no decorrer de 42 dias de cultura.....	86
43. Porcentagem de matéria seca produzida (MSP%) de calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> no decorrer de 42 dias de cultura	87
44. Taxa de crescimento relativo (R%) de calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> no decorrer de 42 dias de cultura	87
45. Aspecto do calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> apresentando raízes e centros meristemáticos	88
46. Corte longitudinal de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> mostrando estruturas com características embriônicas: a) meristema apical, b) meristema radicular e c) cilindro central (procâmbio) obtido em meio de cultura MS na ausência de Picloram	89
47. Corte longitudinal de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> mostrando estruturas com características embriônicas (glicose na concentração 4%): a) meristema apical, b) meristema radicular e c) cilindro central (procâmbio) obtido em meio de cultura MS na ausência de Picloram	90
48. Corte transversal de raiz. a) raiz CT normal, b) raiz CT anormal, c) centro meristemático, d) células pequenas (alta RNP) e e) células grandes	91

49. Corte transversal de calo de <i>Phyllostachys bambusoides</i> onde se observa a formação de uma estrutura embriônica anormal com intensa ramificação de raízes e centros meristemático: a) estrutura embriônica anormal, b) raízes em formação, c) centros meristemático	92
50. Corte transversal de calo de <i>Phyllostachys bambusoides</i> mostrando estruturas primárias e embriogênese secundária. a) estrutura embriônica mostrando a chanfradura dando origem à formação do escutelo caracterizando a formação de embrião. b) embriogênese secundária	93
51. Corte transversal de raiz normal (a) e anormal mostrando a desorganização estrutural (b).	94
52. Corte longitudinal de uma neoformação foliar: a) estrutura achatada dorsiventralmente, b) mesofilo diferenciado em parênquima clorofiliano e c) feixe vascular	95
53. Detalhe do mesolifo evidenciando os cloroplastos: a) cloroplastos	96

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Quadro resumido relacionando autores, espécies de bambu, fonte de explantes, desenvolvimento, meio de cultura, reguladores de crescimento e aditivos.....	16
2. Composição do meio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962), suplementado com vitaminas para a cultura do bambu.....	26
3. Reguladores de crescimento e açúcares adicionados ao meio MS nas diferentes etapas do experimento.....	27
4. Tratamentos referentes a fonte de carboidrato.....	29
5. Tratamentos com concentrações baixas de BA e ANA.....	35
6. Tratamentos com concentrações altas de BA e ANA.....	36
7. Tratamentos com AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram (1,0 mg/l).....	38
8. Tratamentos com AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram.....	39
9. Tratamento com glutamina e caseína hidrolisada na presença e ausência de ácido ascórbico.....	40
10. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.....	46
11. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação da raiz, oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo 16/8 horas por 56 dias de cultura.....	49
12. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de centro meristemático no calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.....	52

13. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz, oriundos de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.....	55
14. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz nos calos oriundos de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.....	57
15. Valores de F para a formação de raiz, em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de BA e ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	60
16. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz no calo oriundo de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.....	61
17. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz em calos oriundos de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.....	61
10. Valores de F para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de BA e ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	63
19. Valores médios para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> , na presença de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	63
20. Valores médios para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	64
21. Valores de F para a formação de raiz, em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de BA e ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	66
22. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz em calos oriundos de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	67

23. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz em calos oriundos de calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	67
24. Valores de F para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de BA e ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	69
25. Valores médios para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> , na presença de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura	70
26. Valores médios para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.....	70
27. Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.....	72
28. Valores de F para a avaliação de cor do calo friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de AgNO_3 e de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram 1,0 mg/l sob de fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.....	75
29. Resultados da análise de variância para cada época (dias) para a variável cor do calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de AgNO_3 e Picloram 1,0 mg/l sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura	76
30. Resultados da análise de variância para cada época (dias) para a variável cor do calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Picloram 1,0 mg/l sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.....	77
31. Valores de F para a avaliação de cor do calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de AgNO_3 e de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura de cultura.....	78

32. Resultados da análise de variância para cada época (dias) para a variável cor do calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de AgNO ₃ e ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura	78
33. Resultados da análise de variância para cada época (dias) para a para a variável cor do calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença de CoCl ₂ .6H ₂ O e ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura	80
34. Resultados das análises de variância para cor do calo oriundo de calo branco friável de <i>Phyllostachys bambusoides</i> na presença e ausência de ácido ascórbico sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.....	83
35. Avaliação do crescimento de calo oriundo de calo amarelo globoso para peso de matéria fresca (PMF), peso de matéria seca (PMS), matéria seca produzida (MSP) e taxa de crescimeno relativo (R%) por época.....	86

LISTA DE ABREVIATURA

- ABA = Ácido abcísico
AgNO₃ = Nitrato de prata
AIA = Ácido 3 - indolacético
AIB = Ácido 3 - indolbutírico
ANA = Ácido naftalenoacético
B5 = meio de cultura GAMBORG *et al* (1968)
BA = 6 - Benzilaminopurina
CH = Caseína hidrolisada
CoCl₂.6H₂O = Cloreto de cobalto hexahidratado
2,4 - D = Ácido 2,4 - diclorofenoxiacético
FAA = Formaldeído - ácido acético-etanol
GLT = Glutamina
KIN = Cinetina
MS = Meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG, (1962)
MSP = Matéria seca produzida
N6 = meio de cultura NITSCH & NITSCH, (1969)
PICL = Picloram = ácido 4 amino-3,5 ,6-tricloropicolínico
PMF = Peso da matéria fresca
PMS = Peso da matéria seca
PVP = Polivinilpirrolidona
R% = Taxa de crescimento relativo
RNP = Relação núcleo plasmática

ESTUDO DA MORFOGÊNESE EM CALOS DE
Phyllostachys bambusoides Sieb. & Zucc.

Autora: YURIKA HELENA KOMATSU

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

Explantos de bainha foliar de *Phyllostachys bambusoides* foram utilizados para o estabelecimento da cultura, indução e manutenção da cultura de calo com Picloram (8,0 e 1,0 mg/l respectivamente), avaliação do crescimento de calo e do controle da morfogênese com o uso de: sacarose, frutose e glicose (0,0; 2,0; 4,0 e 6,0%), BA (0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/l), ANA (0,0, 0,25, 0,5 e 1,0 mg/l), AgNO₃ (0,0; 5,0 e 10,0 mg/l), CoCl₂.6H₂O (0,0; 3,6 e 7,1 mg/l), glutamina (450 mg/l), caseína hidrolisada (450 mg/l), ácido ascórbico (100 mg/l) e Picloram (0,0 e 1,0 mg/l) em meio MS sólido com avaliações semanais que variaram de 35 a 56 dias de cultura.

As culturas foram mantidas em tubo de ensaio com tampão de algodão em câmara de crescimento com $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, fotoperíodo de 16/8 horas, intensidade luminosa de 1000 lux e/ou escuro.

A análise dos resultados permitiu concluir: a) o uso de Picloram permitiu a obtenção de calo branco friável e amarelo globoso; b) o uso de sacarose, frutose, glicose, BA e ANA na ausência de Picloram permitiu a obtenção de raízes, centros meristemáticos, folha e embriões somáticos a partir do calo amarelo globoso; c) o uso de sacarose, frutose, glicose, AgNO₃, CoCl₂.6H₂O, caseína hidrolisada, glutamina, ácido ascórbico e Picloram não mostrou resposta morfogênica em calo branco friável e d) a análise histológica revelou que houve excesso de tempo e/ou estímulo na indução da morfogênese.

STUDY OF MORPHOGENESIS IN CALLI OF

Phyllostachys bambusoides Sieb. & Zucc.

Author: YURIKA HELENA KOMATSU

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

Leaf sheath explants from *Phyllostachys bambusoides* shoots were utilised to establish the culture, callus induction and culture maintenance with Picloram at (8.0 and 1.0 mg/l, respectively), evaluation of callus growth and the control of morphogenesis with the use of: sucrose, fructose, glucose (0.0, 2.0, 4.0 and 6.0%), BA (0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 mg/l), NAA (0.0, 0.25, 0.5 and 1.0 mg/l), AgNO₃ (0.0, 5.0 and 10.0 mg/l), CoCl₂.6H₂O (0.0, 3.6 and 7.1 mg/l), glutamine (450 mg/l), hydrolized casein (450 mg/l), ascorbic acid (100 mg/l) and Picloram (0.0 e 1.0 mg/l) in the solid MS medium with weekly evaluations for 35 to 56 days.

The cultures were maintained in test tubes with cotton plug in growth chamber with $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperature, photoperiod of 16/8 h, light intensity of 1000 lux and/or dark.

The analysis of the results allowed to draw the following conclusions:

a) The use of Picloram allowed to obtain two types of callus, white friable and yellow globous; b) the use of sucrose, fructose, glucose, BA and NAA without Picloram allowed to obtain roots, meristematic centers, leaf and somatic embryos from the yellow globous callus; c) the use of sucrose, fructose, glucose, AgNO₃, CoCl₂.6H₂O, hydrolized casein, glutamine, ascorbic acid and Picloram did not show morphogenic answer from the white friable callus e d) the histological analysis revealed that there was excessive stimulus and/or time for the morphogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do bambu vem despertando grande interesse devido a sua multiplicidade de aplicações, principalmente, em construções civis, alimentação, paisagismo e como matéria-prima industrial (SODERSTROM & CALDERÓN, 1979; GRAÇA, 1988; SALGADO *et al.*, 1992). Assim, do ponto de vista tecnológico, os colmos de bambu podem ser utilizados como matéria-prima na produção de celulose, álcool etílico, amido e alimento.

Os bambus são encontrados nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, predominantemente no sudeste da Ásia (VELA GÁLVEZ *et al.*, 1982), compreendendo cerca de 75 gêneros, segundo SODERSTROM & CALDERÓN (1979) e mais de 1200 espécies (UCHIMURA, 1978). Trata-se de uma gramínea de crescimento rápido, apresentando um ciclo de rotação de 5 a 6 anos no primeiro corte e de 2 a 4 anos nos cortes seguintes. Esse crescimento rápido constitui um importante fator para sua potencialidade como alternativa economicamente viável de fonte de matéria-prima para indústria nacional de celulose e papel.

Para a grande maioria das espécies de bambu o florescimento ocorre irregularmente e a intervalos que variam de 12 a 120 anos, portanto, o método mais empregado na propagação do bambu é o desmembramento das touceiras, apesar de ser um método oneroso, trabalhoso e de baixo rendimento.

No Brasil, em plantios comerciais, utiliza-se o processo de estaquia do colmo, inviável para todas as espécies destinadas à exploração comercial.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de protocolo para micropropagação de *Phyllostachys bambusoides* através de:

1. Estabelecimento da cultura, indução e manutenção de calo com Picloram a partir de explante secundário de bainha foliar.
2. Controle da morfogênese através do uso de:
 - a). diferentes fontes e doses de carboidrato
 - b). diferentes concentrações de BA e ANA
 - c). diferentes concentração de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - d). caseína hidrolisada, glutamina e ácido ascórbico.
3. Avaliação do crescimento do calo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações sobre a cultura do bambu

2.1.1. Aspectos da cultura

Os bambus devido a sua grande diversidade de uso tem sido objeto de vários estudos. Largamente utilizados nos países orientais destacam-se como matéria prima na construção civil, na indústria de papel e na alimentação.

Taxonomicamente, os bambus são classificados em: Reino: Metafita; Divisão Spermatophyta; Classe: Liliopsida; Ordem: Cyperales; Família: Poaceae e Tribo: Bambuseae (CRONQUIST, 1988).

A planta apresenta a parte aérea (colmos com ramos e folhas) e a região subterrânea representada pelo rizoma em função do qual tem-se dois tipos de desenvolvimento: crescimento monopodial, alastrante ou leptomorfo e simpodial, entouceirante ou paquinomorfo (UEDA, 1960; VELA GÁLVEZ *et al.*, 1982; SALGADO *et al.*, 1992).

Segundo UCHIMURA (1978), florestas de bambu localizam-se na faixa de 15 a 25° N e S do equador (Sudeste da Ásia), com seus 14 milhões de hectares correspondendo a 80% das reservas mundiais. Na região ocidental ocorrem grupos de bambu até o limite de 40° S (países latinos, Moçambique). A latitude, altitude e a precipitação pluviométrica entre 1200 e 4000 mm/ano são fatores importantes na distribuição geográfica dos bambus; acima da latitude de 30° N e S e altitude elevada predominam os bambus de crescimento monopodial, e na faixa de 30° N e S e em altitude de baixa a média os de crescimento simpodial. Os bambus pertencentes ao gênero *Arundinaria* são encontrados em altitudes de 2800 a 3000 metros (Nepal) e *Chusquea* a mais de 5000 metros (Cordilheira dos Andes). A grande maioria das espécies desenvolve-se em temperaturas que variam entre 8,8 a 36°C, com exceção de algumas espécies que toleram temperaturas de 40 a 50°C (Índia), e *Phyllostachys nigra* var. *hedonis* sobrevivendo a -18°C (Japão), porém, segundo UEDA (1960), bambus do gênero *Phyllostachys* não se adaptam à temperatura inferior à 15°C.

Os bambus são encontrados em todos os continentes, exceto na Europa (FAO, 1958; UCHIMURA, 1978; SODERSTROM & CALDERÓN, 1979). No

Brasil, o projeto RADAMBRASIL, através de imagens de satélites identificou uma área, no Estado do Acre, de bambu em associação com floresta nativa, ocupando uma área de 85.000 km² (CORREA *et al.*, 1977).

2.1.2. Importância da cultura

A potencialidade do bambu como matéria-prima industrial se deve principalmente as suas características agrônômicas e tecnológicas. Do ponto de vista industrial, os colmos de bambu podem ser utilizados como matéria-prima para produção ou obtenção de celulose e papel, álcool etílico, amido, alimento, carvão, artesanato, produtos farmacêuticos e no controle da erosão.

Referências sobre as dimensões das fibras de espécies de bambu, propriedades físicas e químicas dos colmos (umidade, densidade, peso específico e constituição química) são citados por MEDINA & CIARAMELLO, 1962; AZZINI *et al.*, 1977; GOMIDE *et al.*, 1982; GOMIDE *et al.*, 1988; MONTALVÃO FILHO, 1984; GOMIDE, 1986; AZZINI *et al.*, 1987; TOMAZELLO FILHO & AZZINI, 1987; TOMAZELLO FILHO & AZZINI, 1988; AZZINI *et al.*, 1972; GRAÇA, 1988; SALGADO *et al.*, 1992)

AZZINI & SALGADO (1992) observaram ampla variação com relação ao comprimento das fibras de *B. vulgaris* (3,4 mm) e *Guadua spinosa* var. *vulgaris* (1,6 mm); nas dimensões e no peso dos colmos de bambu verificaram variação entre espécies e dentro de uma mesma espécie em função do tipo de solo, clima, sistema de colheita e adubação.

O bambu, como fonte alternativa para a produção de álcool, apresenta vantagens devido aos altos teores de amido e celulose presente em sua composição (estimada em 70-85% do colmo), que transformados em álcool representam teoricamente rendimento de 250 a 380 litros por tonelada de bambu (MENEZES & AZZINI, 1981).

A produção conjunta de fibras celulósicas e etanol a partir de *Bambusa vulgaris* foram desenvolvidas por AZZINI *et al.* (1987), demonstrando este estudo a viabilidade técnica de um novo processo de utilização do bambu.

Outras pesquisas foram desenvolvidas demonstrando o emprego dos colmos de bambu para a geração de energia, carvão, briquetes, carvão ativado (BRITO *et al.*, 1987); para a alimentação humana brotos do gênero *Dendrocalamus* destacaram-se pelas suas características organolépticas (FERREIRA *et al.*, 1986) e *Guadua flabellata* para obtenção de amido (AZZINI *et al.*, 1981).

Na construção civil, o bambu devido as suas características físico-mecânicas pode ser utilizado nas estruturas de teto, paredes, moirões de cercas, e pisos (SALGADO *et al.*, 1986, 1992; GRAÇA, 1988). Centros de pesquisa no Brasil e no exterior têm divulgado as qualidades do bambu como material estrutural, destacando-se a substituição do ferro pelo bambu em concretos, denominando-se bambucreto (GRAÇA, 1988, SALGADO *et al.*, 1992).

No Brasil, o bambu como matéria prima industrial tem sido pouco utilizado e estudado, entretanto, nos últimos anos já vem ganhando importância econômica, principalmente para a produção de fibras longas nas regiões Norte e Nordeste do país (SALGADO *et al.*, 1992).

Com as pesquisas desenvolvidas com o bambu pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) três registros de patentes foram concedidas para processos de produção de álcool e um relacionado com o processo de extração do amido.

2.1.3. Principais problemas da cultura

Muitas espécies de bambu consideradas de grande importância econômica e social, apresentam dificuldades na sua multiplicação pois, o florescimento e produção de sementes são irregulares. Após o florescimento os bambus comportam-se diferentemente (UCHIMURA, 1978).

Segundo AHMED & DAS (1986) para *Bambusa vulgaris* apenas alguns colmos dentro da touceira e apenas algumas touceiras dentro da população florescem. Por outro lado, FILGUEIRAS (1988) observou florescimento de *Phyllostachys aurea* em Brasília (DF) com produção de flores normais, porém sem formação de sementes e nem morte dos colmos floridos. Explicações para fenômenos como este, onde as flores eram normais e os colmos floridos não morreram, são dificilmente justificadas, tornando o florescimento como um fenômeno intrigante na fisiologia do bambu.

A produção de sementes é irregular porque na maioria das espécies o florescimento ocorre esporadicamente (NADGAUDA *et al.* 1990). Muitas espécies de bambu por serem monocárpicas morrem após o florescimento (McCLURE, 1966) e devido a baixa viabilidade das sementes (NADGIR *et al.*, 1984).

Segundo FILGUEIRAS (1988), o caráter monocárpico dos bambus é considerado uma característica genética; o florescimento das touceiras ocorre

simultaneamente, mesmo daquelas que tenham sido transplantadas em diferentes localidades (cidades, países e continentes).

2.1.4. Caracterização da espécie

Phyllostachys bambusoides Sieb. & Zucc. é nativa da China, e muito cultivada no Japão. Pertence ao grupo dos bambus alastrantes, seus colmos atingem cerca de 18 a 20 metros de altura e 10 cm de diâmetro.

São usados para estacas de plantas hortícolas, sustentação de frutíferas, para ripados, artefatos de mobília, como matéria-prima para fabricação de papel, para alimentação e em substituição ao ferro em mourões de concreto (SALGADO *et al.*, 1992) e em estruturas de concreto denominado de bambuceto (GRAÇA, 1988). Segundo UEDA (1968), citado por MENEZES & AZZINI (1981), no combate à erosão verificou-se que a extensão rizomatosa de *P. bambusoides* atingiu 560 km/ha.

Quanto ao florescimento espécies de *Phyllostachys* florescem raramente e após o florescimento a recuperação é lenta podendo levar à morte das plantas (SUNSET, 1985). *Phyllostachys reticulata* morre após o florescimento e produz poucas sementes com baixa viabilidade (UCHIMURA, 1978). CHEN (1973) verificaram 95% de mortalidade dos colmos de *P. bambusoides* após o florescimento, em Alabama.

Segundo SODERSTROM & CALDERÓN (1979) e FILGUEIRAS (1988), *Phyllostachys bambusoides* apresenta o ciclo mais longo de florescimento (120 anos) entre as espécies de bambu. Por outro lado, Kawamura (1927) citado por McCLURE (1966) concluiu em seus estudos que o ciclo de florescimento do gênero *Phyllostachys*, inclusive *P. bambusoides* foi de 60 anos.

2.2. Aspecto da micropropagação

A técnica da micropropagação utiliza-se meio de cultura no qual propágulos (explantes) são cultivados em condições assépticas tendo como desvantagem os problemas relacionados a contaminação na fase de isolamento dos materiais procedentes do campo (GONÇALVES, 1982 e GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). A taxa de multiplicação é elevada. Apesar da possibilidade de se utilizar diversas fontes de explantes, tem a outra desvantagem dos materiais propagados a partir de calos apresentarem variação somaclonal.

O autor cita o esquema padrão proposto por Murashige (1974) para sistemas de micropropagação que compreende:

Estágio I: seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

Estágio II: multiplicação dos propágulos através de sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação;

Estágio III: transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo.

O esquema proposto permite alterações conforme as peculiaridades da espécie em estudo; desta maneira, em relação ao explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida de três maneiras: a) multiplicação através da proliferação de gemas axilares; b) multiplicação através da indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo) e, c) multiplicação através de embriogênese somática.

A embriogênese somática definida como o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, segundo SCHULTHEIS *et al.* (1990), compreende duas maneiras de ocorrência: a) embriogênese direta (ED), onde os embriões originam-se diretamente dos tecidos (sem proliferação de calos) e b) embriogênese indireta (EI), neste caso a produção de embriões ocorre mediante proliferação de calos.

A maioria dos sistemas de embriogênese somática ocorre pela via indireta. Portanto, calos embriogênicos são induzidos e mantidos ao longo da multiplicação e os embriões somáticos são induzidos e formados na superfície do calo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), a perda da capacidade embriogênica das células é um fator que limita este processo de multiplicação contínua de algumas plantas, pois, as células podem perder gradativamente este potencial de regeneração de plantas após algumas subculturas.

A organogênese é definida como a formação de estruturas a partir de tecidos e/ou células, pode ocorrer de maneira direta pela regeneração de plantas provenientes de tecidos não meristemáticos, sem passar pela fase de calos apresentando alta fidelidade genética e de forma indireta quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo. A partir de células do calo surgem gemas adventícias capazes de desenvolverem novas partes aéreas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

2.2.1. Micropropagação do bambu

Os primeiros estudos *in vitro* com bambu foram realizados por ALEXANDER & RAO (1968), alcançando nos últimos anos um grande avanço na área da micropropagação. As pesquisas estão sendo desenvolvidas principalmente via embriogênese entre as espécies pertencentes aos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Pylostachys* e obtenção de protoplastos viáveis para *Bambusa multiplex* e *B. oldhamii* (HUANG, 1988; HUANG *et al.*, 1989a; 1990).

A obtenção de protoplastos viáveis para *B. multiplex* e *B. oldhamii* foi com sucesso, obtida por HUANG (1988) e HUANG *et al.* (1989a, 1990).

Na maioria das espécies, em estudos de regeneração, os pesquisadores utilizaram como explantes sementes e inflorescências de bambu (ALEXANDER & RAO, 1968; METHA *et al.*, 1982; MUKUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992; NADGIR *et al.*, 1984; PRUTPONGSE & GAVINLERTVATANA, 1992; CHAMBERS *et al.*, 1991; NADGAUDA *et al.*, 1990; RAO *et al.*, 1985; SAXENA, 1990; TSAY *et al.*, 1990; WOODS *et al.*, 1992; YEH & CHANG, 1986a; YEH & CHANG, 1986b e YEH & CHANG, 1987); e para poucas espécies outras partes da planta adulta como gemas apicais e/ou laterais, rizomas, nós (CHATURVEDI *et al.*, 1993; EL-HASSAN & DEBERGH, 1987; HUANG & MURASHIGE, 1983; HUANG *et al.*, 1989b; NADGIR *et al.*, 1984; PRUTPONGSE & GAVINLERTVATANA, 1992; RAO *et al.*, 1986 e ZAMORRA, 1988).

Para GRATAPAGLIA & MACHADO (1990), o meio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962) com suas modificações e diluições foi satisfatório para diversas espécies (herbáceas e lenhosas); para o bambu, o meio MS modificado e complementado com diferentes concentrações de citocininas (cinetina e BA principalmente), auxinas (ANA, 2,4-D, Picloram, AIB) e água de côco constituíram o meio de cultura para a grande maioria das pesquisas envolvendo as diferentes espécies de bambu.

Os meios de cultura para a micropropagação do bambu baseiam-se também nos meios de White para o desenvolvimento de embriões (ALEXANDER & RAO, 1968), germinação de sementes e enraizamento (NADGAUDA *et al.*, 1990; NADGIR *et al.*, 1984), e meio B5 para desenvolvimento de embrióides e plantas (RAO *et al.*, 1985, 1986; WOODS *et al.*, 1992; EL-HASSAN & DEBERGH, 1987; SAXENA, 1990; ZAMORA & CRUEZO, 1990).

Através da indução de calos foram obtidos calos para diversas espécies de bambu, destacando-se o trabalho de HUANG & MURASHIGE (1983). Estes

autores obtiveram calos de *Bambusa oldhamii*, *Bambusa multiplex* e *Phyllostachys aurea*, a partir de gemas apicais (3 a 6 mm de altura), em meio MS contendo 3 mg/l de 2,4-D e 0,1 mg/l de BA. Verificaram que as auxinas 2,4-D e Picloram foram satisfatórias para a indução de calos para as 4 espécies, sendo que para *P. aurea*, o Picloram foi mais efetivo do que o 2,4-D, enquanto que os calos induzidos com AIA ou ANA apresentaram-se marrom e geralmente necrosados. A presença de citocinina foi desnecessária para a indução de calos para as 4 espécies, constatando-se que em concentração de 0,03 a 3,0 mg/l de BA a porcentagem de calos de *B. oldhamii* diminuiu. As duas vitaminas críticas para a cultura de calos de bambu foram a tiamina, cuja exclusão resultou na redução da produção e necrose, e o ácido nicotínico, que causou deterioração com consequente escurecimento e necrose dos calos. O crescimento de calo foi favorecido com sacarose nas concentrações de 1,5-3,0%, sendo reprimido progressivamente a 4,5-10,5%. Glicose nas concentrações de 1,5 a 4,5% foi tão efetiva quanto a sacarose, porém a 6% inibiu o crescimento do calo. O período de aumento de peso fresco dos calos de *B. oldhamii* ocorreu durante as primeiras 2-4 semanas, continuando a aumentar em menor razão até 8 semanas quando o crescimento cessou. Os autores verificaram que em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz houve redução de 25% no peso.

Em relação à indução de calo, as 2 espécies de *Bambusa* produziram calos com textura lisa e friável, aspecto úmido e coloração creme esbranquiçado; os calos de *B. oldhamii* apresentaram linhagens diferentes em relação ao crescimento em calos da mesma planta e explante; e, em relação a *B. multiplex* foram isoladas 3 linhagens de calos creme esbranquiçado, verde e marrom, as quais não diferiram no crescimento. Os calos das espécies *Sasa* e *Phyllostachys* apresentaram coloração creme amarelado e textura granular a nodular, porém, os calos de *Phyllostachys aurea* mantidos na presença de luz tornaram-se vermelho-purpúreo. Os autores sugeriram para a cultura de calos de bambu, o meio MS adaptado (mg/l): sacarose (3000), tiamina HCl (1), ácido nicotínico (0,5), piridoxina HCl (0,5), glicina (2), i-inositol (100), 2,4-D (3) e agar TC (8000); sendo os calos repicados a cada 4 semanas e mantidos no escuro.

GRUEZO *et al.* (1987) verificaram que dentre os 96 diferentes meios de cultura para a indução de calos de bambu, nos quais combinaram concentrações de sais de MS, sacarose, 2,4-D e BA, os melhores resultados para a indução de calos de bambu foi obtido com o meio MS complementado com 40 g/l de sacarose, 1 a 25 ppm de 2,4-D e na presença ou ausência de BA.

Suspensão de células foram obtidas por HUANG *et al* (1988) para *B. oldhamii*, *B. multiplex*, *P. aurea* e *S. pyramae*, que consideraram adequada a concentração de 3 mg/l de 2,4-D para as culturas de células em suspensões de bambu

estudadas, com exceção de *S. pymaea* que foi de 1 mg/l. Na presença de Picloram *B. oldhamii* apresentou produção máxima de peso fresco na concentração de 0,3 mg/l, enquanto que para o 2,4-D a concentração ótima foi de 3,0 mg/l. Porém, em relação ao 2,4-D, Picloram apresentou redução no crescimento das células. As células de *B. multiplex* em suspensão morreram com sucessivas subculturas na presença de Picloram em concentrações baixas. A adição de 1 a 3 mg/l de caseína hidrolisada favoreceu o rendimento das células de bambu, sendo estabelecido para cultura em suspensão 500mg/l de células.

MEHTA *et al.* (1982) obtiveram calos a partir de sementes de *Bambusa arundinaceae* inoculadas em meio básico N₆, suplementado com meso-inositol, sacarose, ágar, BA e PVP, obtendo-se calos em presença de 3×10^{-5} M de 2,4-D. Os embriões somáticos diferenciaram-se de células livres e do interior do calo, desenvolveram plantas e foram transferidas para o campo.

RAO *et al.* (1985) obtiveram dois tipos de calos (friável e compacto, de branco a amarelo creme), a partir da germinação de embriões e formação de plântulas de *D. strictus*, inoculados no meio líquido B5 (metade da concentração) suplementados com sacarose (2%), AIB (5×10^{-7} M) e ANA (10^{-7} M), sendo que 67% das culturas de calos formaram embrióides somáticos bem diferenciados e verdes.

YEH & CHANG (1986 a, b) regeneraram plantas através da embriogênese somática a partir de inflorescências jovens de *Bambusa oldhamii* (YEH & CHANG, 1986a) e *Bambusa beecheyana* var. *beecheyana* (YEH & CHANG, 1986b). Os explantes foram inoculados em meio básico MS suplementados com mio-inositol, ácido nicotínico (100 mg/l), ácido nicotínico (0,5 mg/l), piridoxina (0,5 mg/l), tiamina (0,1 mg/l), glicina (2mg/l), caseína hidrolisada (1000 mg/l), sacarose (60000 mg/l), ágar (7000 mg/l) e 3 mg/l de 2,4-D e 2 mg/l de cinetina. Após 3-7 dias, desenvolveram-se três tipos de calos: embriogênicos (calos compactos semelhantes a nódulos, de coloração branco a amarelo, e brilhante úmido); não embriogênicos (calos friáveis, consistindo de células filamentosas que produziram raízes adventícias com pêlos) e tipo intermediário: calo gelatinoso com características dos tipos citados anteriormente. Os autores verificaram que calos embriogênicos podem ser subcultivados e mantidos no mesmo meio, ou no meio livre de auxina por mais de 16 meses sem perder a totipotência. Os calos não embriogênicos produziram muitas raízes adventícias, que em meio MS contendo 3 mg/l de 2,4-D e 2 mg/l de cinetina produziram calos com estruturas nodulares, surgindo eventualmente embrióides que se desenvolveram em plântulas.

YEH & CHANG (1987) obtiveram calos de *Sinocalamus latiflora* a partir de sementes, em meio básico MS suplementado com ácido nicotínico, piridoxina,

tiamina, glicina, sacarose, ágar, cinetina, contendo 6 mg/l de 2,4-D, 3 mg/l de cinetina, 50 g/l de sacarose e 250 mg/l de PVP, mantidas no escuro. Os calos em meio MS suplementado com 6% de ágar, 3 mg/l de 2,4-D e 2 mg/l de cinetina, desenvolveram-se em plântulas.

EL-HASSAN & DEBERG (1987) obtiveram dois tipos de calos de *Phyllostachys viridis* em meios de cultura contendo os macronutrientes de MS, os micronutrientes de NITCH & NITCH (exceto o Fe) e complementados com 2,4-D (9×10^{-6} M); do total de explantes, 27 a 47% produziram 83,4% de calos embriogênicos, após 4-5 semanas. Calos embriogênicos (E) foram descritos como compactos, opacos, de coloração branca, apresentando corpos globulares brilhantes comparáveis a embriões zigóticos; e os calos não embriogênicos (NE) de coloração amarelo. Nos dois tipos de calos, não se observou desenvolvimento dos embrióides, em meios líquido e sólido contendo 2,4-D, entretando, calos embriogênicos e eventualmente não embriogênicos desenvolveram plântulas em 2 semanas quando mantidos em meio MS na ausência do hormônio. As plântulas foram transferidas para meio de enraizamento e posteriormente para a casa de vegetação e campo.

ZAMORA *et al.* (1988) a partir de segmentos nodais de *D. latiflorus* observaram formação de calos no meio de cultura MS (metade da concentração) suplementado com 1 mg/l de BA, 1 mg/l de 2,4-D e 40 g/l de sacarose. Observou-se que 0,1 mg/l de 2,4-D induziram calos em somente 20% dos explantes. Na ausência de BA, a concentração ótima variou entre 1 a 25 mg/l de 2,4-D e a formação de calos foi entre 58 a 71% dos explantes. A porcentagem de calos em meio contendo 1 mg/l de 2,4-D não foi afetada pela adição de 1, 2 e 5 mg/l de BA. Estruturas semelhantes a brotos foram originados de calos compactos.

Em continuidade ao trabalho desenvolvido por HUANG & MURASHIGUE (1983), HUANG *et al.* (1989a e b) desenvolveram metodologia usando como explantes culturas de calos estoques e ápices de gemas laterais de colmos jovens.

HUANG *et al.* (1989a) verificaram que o desenvolvimento de calos embriogênicos ocorreu para gemas apicais em meio suplementado com combinações de ANA e BA, originando calos (verdes, nodular ou granular), que foram mantidos indefinidamente em meio de cultura contendo ANA e BA. A auxina AIA foi ineficiente em promover algum crescimento em combinações com citocininas, enquanto que calos obtidos em meio com 2,4-D ou Picloram apresentaram as mesmas características. Os autores verificaram que a indução de calos tem sido limitada a meristemas normais de gemas ou primórdios de gemas.

HUANG *et al.* (1989b) obtiveram calos, a partir de meristema apical em meio suplementado com 3 mg/l de 2,4-D, semelhantes aos descritos por HUANG & MURASHIGE (1983); obtiveram organogênese em espécies de *Bambusa* em meios contendo diferentes concentrações de 2,4-D ou Picloram (0,03 a 0,3 mg/l) e BA na concentração de 0,01 a 1 mg/l e diferenciação de raízes a níveis baixos de citocinina em *P. aurea* e *S. pygmaea*. Para as 4 espécies, aumento de citocinina ou decréscimo de auxina reduziram o crescimento de calos e intensificaram coloração marrom e necroses. Para *B. oldhamii* verificaram que, embora a maioria dos explantes tornou-se marrom e morreu, os que sobreviveram produziram calos granular a nodular em meio suplementado com ANA e BA. Outra cultura desse mesmo material resultou na emergência de grupos de gemas. Devido à alta mortalidade e variabilidade entre culturas, uma adequada combinação de ANA e BA para organogênese não pôde ser imediatamente estabelecida com essa espécie. Esta coloração marrom e a morte prematura foram sérios problemas com cultura primária de todas as espécies, e em algumas foram mais severas e estenderam-se em subculturas. A coloração marrom foi intensificada com o aumento de BA. Ápices de gemas cortadas de *B. multiplex* e *P. aurea* mostraram uma tendência para descoloração ou morte e manifestaram organogênese mais consistentemente do que as outras. Culturas primárias de *B. multiplex* sugerem uma combinação ótima de 1 mg/l de ANA e 1 mg/l de BA para iniciação de calos nodulares, e para *P. aurea*, de 1 mg/l de ANA e 10 mg/l de BA. Número elevado de gemas adventícias e produção de calos embriogênicos de *B. multiplex* foram obtidos com 1 mg/l ANA e 0,3 -3,0 mg/l BA. Similarmente, número elevado de gemas de *P. aurea* resultaram com 10 mg/l de BA. Embora o experimento revele que ANA não foi requerido por *P. aurea*, a concentração de 1 mg/l conservou a manutenção de calos organogênicos. Para *Bambusa oldhamii*, verificou-se a indução de calos embriogênicos e formação de gemas adventícias na concentração de 1 mg/l de ANA e 1-3 mg/l de BA (mesma concentração para *B. multiplex*); calos granulares e gemas adventícias de *S. pygmaea* foram também obtidos pelo cultivo de ápices em meio suplementado com 1 mg/l de ANA e 1 mg/l de BA.

SAXENA (1990) observou que 70-80% das sementes de *B. tulda* germinaram em meio de cultura MS suplementado com 2% de sacarose e 3×10^{-6} a 6×10^{-6} M de BA. A concentração ótima para a multiplicação de gemas foi de 8×10^{-6} M de BA, 4×10^{-6} M de cinetina, e, para o enraizamento foi adicionado cumarina na concentração de 6×10^{-5} M em conjunto com 6×10^{-6} M ou 10^{-5} M de AIA, posteriormente as plantas foram transferidas para o solo.

TSAY *et al.* (1990) induziram calos, embrióides e regeneração de plantas a partir de explantes de inflorescências de *Sinocalamus latiflora* inoculadas no

meio de cultura MS ou N₆ suplementado com BA, carvão ativado em diferentes combinações de sacarose e reguladores de crescimento. Foi observado que após 50 a 60 dias no meio de cultura N₆ suplementado com 1 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de BA, 2 g/l de carvão ativado, 9% de sacarose e 0,8% de ágar, induziram 2 tipos de calos: embriogênico (compacto, opaco, branco) e não -embriogênico (friável e amarelo).

ZAMORA & GRUEZO (1990) utilizaram dois tipos de explantes de *Dendrocalamus strictus* (sementes inteiras e embriões excisados), em meio de cultura MS contendo 2,4-D (10µM) e sacarose (2%), e no meio de cultura B₅ com 2,4-D (10 e 30 µM). Verificaram pouco estabelecimento de sementes inteiras, devido à alta taxa de contaminação (acima de 83%) em comparação a embriões excisados (5 a 10%). Calos formados de sementes inteiras foram geralmente do tipo frouxo e de coloração caramelo, entretanto, quando subcultivados no meio com 2,4-D por 30 dias, produziram calos compactos. A porcentagem de formação de calos no meio B₅ contendo 30 µM 2,4-D foi maior que no meio MS. Contudo, 59% dos calos formados no meio MS, contendo 10µM de 2,4-D se mostraram compactos de aparência creme-amarelado e globular. A sobrevivência dos calos, após 30 dias, foi maior no meio B₅ com 30µM de 2,4-D, mas a porcentagem de calos compactos foi maior no meio MS com 10 µM de 2,4-D.

PRUTPONGSE & GAVINLERTVATANA (1992) relacionam 54 espécies de bambu propagadas *in vitro*, entre elas citam *P. bambusoides*. Os diferentes meios de cultura basearam-se em MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de ANA, BA e 2,4-D, água de côco e 88µM de sacarose. Várias espécies produziram múltiplos brotos a partir de gemas axilares ou brotos novos do nó do colmo, quando colocadas no meio de cultura contendo 22 µM de BA em 30 dias. Outras citocininas e água de côco foram inferiores a BA, o mesmo ocorrendo com ANA. Verificou-se que no meio contendo ANA entre 2,7 a 5,4 µM, dependendo da espécie e da duração do tempo dos brotos na cultura, as gemas enraizaram. Todas as espécies formaram calos de secções de folhas colocados no meio de cultura contendo 13,5 a 27 µM de 2,4-D. A presença de carvão, BA ou caseína hidrolisada reduziu a formação de calos. Gemas foram regeneradas somente de calos foliares de *Bambusa flexicosa*. Calos podem ser produzidos de inflorescências imaturas de *B. oldhamii*, *D. latiflorus* e *D. asper* cultivadas no meio de cultura contendo 13,5 a 27 µM de 2,4-D. Gemas foram regeneradas destes tecidos de calos no meio contendo 22 a 8,8 µM de BA e 1,4 a 5,4 µM de ANA a uma razão de 2:1. Os autores recomendaram a micropropagação de bambu através de segmentos nodais jovens de colmos não floridos, em meio de cultura MS contendo 22 µM de BA, e enraizamento em meio de cultura MS com 5,4 µM de ANA.

WOODS *et al.* (1992) obtiveram embriões somáticos e regeneraram calos de *Otatea acuminata aztecorum* a partir de sementes inoculado em meio MS e B₅ (Gamborg). Conduziram três experimentos, o primeiro, com o objetivo de otimizar protocolos para embriogênese somática e regeneração de plantas, os explantes foram mantidos em quatro meios de indução de calos e no escuro. Houve formação de 4 tipos básicos: macio, liso e cremoso; creme a branco e friável; radicoso; e cremoso, composto e nodular. As culturas, geralmente, apresentaram uma mistura desses tipos de calos, mas somente calos nodulares desenvolveram embriões somáticos. A embriogênese somática ocorreu somente no meio contendo 2,4-D, considerando-se que ANA e Picloram foram fontes de auxinas ineficientes. Três tipos de embriões somáticos foram obtidos sendo que a maioria das plantas desenvolveram-se de embriões em forma de vaso denteado. Em meio para germinação, os embriões se desenvolveram e enraizaram, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação. O segundo experimento, definiu o seguinte meio de cultura para a embriogênese somática MS, com 2% de sacarose, 3 mg/l de 2,4-D e 0,5 mg/l de BA e sem adição de caseína hidrolisada. BA foi testada na presença e ausência de caseína hidrolisada, nos meios básicos MS e B₅ e favoreceu a produção de calos embriogênicos. O terceiro experimento, consistiu em observar o efeito das variações dos meios de cultura utilizados no segundo experimento, para estabelecimento de calos embriogênicos do experimento um. Os resultados demonstraram que o meio básico MS foi superior ao meio B₅, e que o meio MS contendo 0,5 mg/l de BA, 250 mg/l de caseína hidrolisada e 2% de sacarose, destacou-se por produzir maior número de embriões somáticos e regenerar plantas.

NADGIR *et al.* (1984) utilizaram sementes de *Dendrocalamus strictus* e segmentos nodais de ramos laterais com idade entre 10 a 15 anos de *D. strictus*, *Bambusa arundinaceae* e *B. vulgaris*. Foram observados, pelos autores, que 80% dos segmentos nodais das três espécies desenvolveram de 2 a 3 brotos entre 3 a 4 semanas em meio MS, suplementado com 0,2 ppm de cinetina, 0,5 ppm de BA e 10% de água de côco. As sementes de *D. strictus* germinaram em meio básico de White contendo 2% de sacarose, e quando as plântulas atingiram de 40-50 mm (15 a 20 dias) foram transferidos para meio de cultura MS com diferentes concentrações de cinetina, BA, ANA, AIA e água de côco; os melhores resultados para a multiplicação das gemas foram no meio líquido MS suplementado com 5% de água de côco e 0,2 ppm de BA, a 120 rpm, sob iluminação contínua, com formação de 8-10 brotos entre 6-7 semanas; o enraizamento foi obtido em 40% dos brotos que receberam tratamento com AIB (0,1 mg/l) por 48 horas, no escuro e transferidos para meio líquido MS (metade da concentração).

CHATURVEDI *et al.* (1993) inocularam segmentos nodais *D. strictus*, com 10 anos de idade, em meio MS modificado suplementado com 0,5 mg/l de AIA e 15 mg/l de sulfato de adenina (Ads); o meio de cultura para o enraizamento constou do MS contendo 10 mg/l de l-arginina-HCl, 0,1 mg/l de d-biotina e 15 mg/l de sulfato de adenina.. O acréscimo de BA, GA₃, caseína hidrolisada (200 e 500 mg/l) adicionados ao meio de cultura não favoreceu a sobrevivência das gemas desenvolvidas. A presença de 1 mg/l de AIB ou 1 mg/l de ANA favoreceu a formação de 3 gemas e quando em combinação obtiveram-se em média 4 gemas por explante. O enraizamento dos segmentos nodais (30%) ocorreu em meio S contendo AIB, ANA, 2,4-D e foroglucinol, e as plantas formadas foram transferidas para o solo.

JULLIEN & TRAN THANH VAN (1994) obtiveram calos de *Bambusa glaucencens* a partir de gemas dormentes em meio MS suplementado com sacarose (30 g/l), caseína hidrolisada (250 mg/l), água de côco (40 ml), PVP (500 mg/l), 2,4-D 18 µM, AIA (1,114-2,85 µM), BA (0,22-2,2 µM) e ABA (0,6µM). Obtiveram calos friáveis, mucilaginosos e compactos (branco amarelo pálido) a partir de seções transversais de folhas jovens cortadas dos brotos. Com a redução de 2,4-D para 9 µM e adição de 2,85 µM de AIA e 0,88 µM de BA, na presença de luz, estruturas semelhantes a pró-embriões foram observadas em 5% dos calos, e após 2 semanas essas estruturas apenas tornaram-se verdes e nenhum desenvolvimento foi observado.

O florescimento *in vitro* foram relatados para as espécies do gênero *Bambusa* e *Dendrocalamus* por NADGAUDA *et al.* (1990), CHAMBER *et al.* (1991) e PRUTPONGESE & GAVINLERTVATANA (1992).

NADGAUDA *et al.* (1990) obtiveram flores e sementes *in vitro* de *B. arundinacea* e *D. brandisii*, a partir de segmentos do coleótilo que desenvolveram de gemas, as quais foram individualizadas e transferidas para meio MS suplementado com 2% de sacarose, 0,5 ppm de BA e 5% de água de côco. Neste meio foram obtidas de 15 a 20 gemas, por recipiente de cultura, e após 3 subcultivos ocorreu o florescimento precoce em 70% dos explantes de *B. arundinacea* e 40% de *D. brandisii* e em relação à formação de sementes verificou-se que *B. arundinacea* produziu cerca de 10 vezes mais que *D. brandisii*.

CHAMBERS *et al.* (1991) observaram florescimento em *D. hamiltonii* a partir de tecido do hipocótilo e epicótilo de sementes germinadas *in vitro* (MS + 3% sacarose). O florescimento foi induzido em meio MS suplementado com citocinina nas concentrações de 2,2 µM e 4,4 µM BA para epicótilo e 4,4 µM e 22,2 µM para hipocótilo.

Segundo PRUTPONGESE & GAVINLERTVATANA (1992) das 54 espécies pesquisadas o florescimento esporádico ocorreu *in vitro* nas espécies: *Bambusa nana*, *B. arundinacea*, *B. glaucescens*, *B. multiplex*, *B. brandisii*, *D. membranaceus* e *Cephalostachyum pergracile*; todas estas espécies morreram após o florescimento, exceto *B. multiplex*.

MUKUNTHAKUMAR & MATHUR (1992) a partir de calos compactos com estrutura branco esverdeado de *Dendrocalamus strictus*, induzido em meio MS suplementado com 3 mg/l de 2,4 D e 0,5 g/l de cinetina, obtiveram embriões somáticos. Os autores obtiveram melhor desenvolvimento para os calos embriogênicos em meio contendo 1,0 mg/l de ANA e 0,5 mg/l mg/l de cinetina e foram encapsulados com soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio em combinação com 1,0 mg/l de ANA e 0,5 mg/l de cinetina para a obtenção de sementes sintéticas.

A tabela 1 estão relacionados os principais autores que desenvolveram trabalhos com espécies de bambu através de cultura *in vitro*, tipos de explantes, meio de cultura, reguladores de crescimento e aditivos utilizados.

Tabela 1 - Quadro resumo relacionando autores, espécies de bambu, fonte de explantes, desenvolvimento, meio de cultura, reguladores de crescimento e aditivos.

AUTORES	ESPÉCIES	FONTE DE EXPLANTE	DESENVOLVIMENTO	MEIO BÁSICO E CARBOIDRATO	REGULADORES DE CRESCIMENTO	ADITIVOS
ALEXANDRE & RAO (1968)	<i>Bambusa sp.</i>	embrião	cultura de embrião	WHITE sacarose 2%		
METHA et al. (1982)	<i>B. arundinacea</i>	semente	embriogênese somática	N6 sacarose 5%	BA 5×10^{-6} M 2,4-D 3×10^{-5} M	PVP 250 mg/l
HUANG & MURASHIGE (1983)	<i>B. oldhamii</i> <i>B. multiplex</i> <i>S. pignaea</i> <i>P. aurea</i>	gema apical	cultura de calo	MS sacarose 1,5-3% glicose 1,5 a 4,5%	ALA ANA BA 0,1 mg/l 2,4-D 3,0mg/l PICL 0,3 mg/l	
NADGIR et al. (1984)	<i>D. strictus</i> <i>B. arundinacea</i> <i>B. vulgaris</i>	semente segmento nodal	multiplicação de gemmas	WHITE e MS sacarose 2%	AIB 0,1 ppm BA 0,2 e 0,5 ppm cinetina 0,2 ppm	água de côco 5 e 10%
RAO et al. (1985)	<i>D. strictus</i>	semente	embriogênese somática	B5 sacarose 2%	AIB 5×10^{-7} M ANA 10^{-7} M 2,4-D 10^{-5} M e 3×10^{-5} M	
RAO et al. (1986)	<i>D. strictus</i>	cariopse folhas rizomas	embriogênese somática	B5	2,4-D 3×10^{-5} M	

YEH & CHANG (1986b)	<i>B. beecheyana</i>	inflorescência	embriogênese somática	MS sacarose 3-6%	2,4-D 3mg/l cinetina 2mg/l	CH 1000mg/l
YEH & CHANG (1986a)	<i>B. oldhamii</i>	inflorescência	embriogênese somática	MS sacarose 3-6%	2,4-D 3mg/l cinetina 2mg/l	CH 1000mg/l
YEH & CHANG (1987)	<i>S. latiflora</i>	semente	embriogênese somática	MS sacarose 3,5 e 6%	2,4-D 6mg/l cinetina 3mg/l	PVP 250mg/l
GRUEZO et al. (1987)	Espécies de bambu	tecido internodal	indução calo	MS sacarose 2 e 4%	BA 0, 1, 5 e 10 ppm	
EL-HASSAN & DEBERGH (1987)	<i>P. viridis</i>	gemas	embriogênese	MS NITC & NITC sacarose 2%	2,4-D 9×10^{-6} M	
HUANG (1988)	<i>B. multiplex</i> <i>B. oldhamii</i>		protoplasto			
HUANG et al. (1988)	<i>B. oldhamii</i> <i>B. multiplex</i> <i>Sasa pygmaea</i> <i>P. aurea</i>		suspensão líquida	MS sacarose 3%	2,4-D 1-3 mg/l PICL 0,3 mg/l	CH 1-3 mg/l
ZAMORA et al. (1988)	<i>D. latiflorus</i>	seções nodais	indução calo regeneração de planta	MS e 1/2 MS sacarose 2 e 4%	BA 1ppm 2,4-D 0,1 ppm	
HUANG et al. (1989a)	<i>B. multiplex</i> <i>B. oldhamii</i>		protoplasto			
HUANG et al. (1989b)	<i>B. oldhamii</i> <i>B. multiplex</i> <i>Sasa pygmaea</i> <i>P. aurea</i>	gema apical	organogênese adventícia	MS sacarose 3%	ANA BA 0,01-1,0 mg/l 2,4-D 3mg/l PICL 0,03-0,3 mg/l	

HUANG <i>et al.</i> (1990)	<i>B. multiplex</i> <i>B. oldhamii</i>		protoplasto	WHITE e MS sacarose 2%	BA 0,5 ppm	água de côco 5%
NALGAUDA <i>et al.</i> (1990)	<i>B. arundinaceae</i> <i>D. brandisii</i>	semente hipocótilo	florescimento	WHITE, MS e B5 sacarose 2%	AIA 2×10^{-6} M; 10^{-5} M AIB ANA 2×10^{-6} M BA 8×10^{-6} M cinetina 4×10^{-6} M 2-ip	
SAXENA (1990)	<i>B. tulda</i>	semente	multiplicação de gemas e regeneração de plantas			
TSAY <i>et al.</i> (1990)	<i>S. latiflora</i>	antera	embriogênese	MS e N6 sacarose 3, 6 e 12%	ANA 3 e 5 mg/l BA 1,0 mg/l 2,4-D 1,0 mg/l	carvão 0,2%
ZAMORA & CRUEZO (1990)	<i>D. strictus</i>	sementes e embrião	cultura de calo	MS e B5 sacarose 2%	2,4-D 10 e 30 μ M	água de côco 15%
CHAMBERS <i>et al.</i> (1991)	<i>D. hamiltonii</i>	semente, hipocótilo e epicótilo	florescimento	MS sacarose 2 e 3%	BA 4,4; 22,2; 44,4M	
MUKUNTHAKU MAR & MATHUR (1992)	<i>D. strictus</i>	semente	semente artificial	MS sacarose 3%	ANA 1,0 mg/l 2,4-D 3,0 mg/l cinetina 0,5 mg/l	alginate de cálcio

PRUTPONGSE & GAVINLERTVAT ANA (1992)	18 gêneros	semente gema segmento nodal folha inflorescência	calo regeneração de planta	MS sacarose 88mM	ANA 1,4 a 5,4 μ M BA 8,8 a 22 μ M 2,4-D 13,5 e 27 μ M	CH água de côco 10 e 20% carvão
WOODS <i>et al.</i> (1992)	<i>O. acuminata</i> <i>aztecorum</i>	semente embrião	embriogênese somática	MS e B5 sacarose 2%	ANA 0,5 mg/l BA 0,5 mg/l 2,4-D 3,0 mg/l PICL 0,5 mg/l	CH 250 mg/l ác. ascórbico 100 mg/l
CHATURVEDI <i>et al.</i> (1993)	<i>D. strictus</i>	segmento nodal	organogênese	MS sacarose 2%	ALA 0,5 mg/l AIB 1,0 mg/l ANA 1,0 mg/l 2,4-D 0,5 mg/l GA3	l-arginina- HCl 10 mg/l d-biotina 0,1 mg/l Ads 15 mg/l CH 200 e 500 mg/l
JULLIEN & TRAN THANH VAN (1994)	<i>B. glaucescens</i>	gema	embriogênese	MS sacarose 3% 15 mg/l	ALA 2,85 μ M ANA 20 μ M BA 0,88 μ M 2,4-D 20 μ M	CH 250 mg/l água de côco 40 ml PVP 500 mg/l

2.2.2. Fonte de carboidrato

A cultura *in vitro* depende de carboidratos que fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de polissacarídeos estruturais, assim como qualquer tipo de composto orgânico necessário ao crescimento das células (CALDAS *et al.*, 1990). Entre os carboidratos a sacarose é a mais utilizada em plantas cultivadas *in vitro*, e considerada como a melhor fonte para o crescimento e diferenciação.

Estudos recentes têm sugerido que carboidratos podem atuar diferentemente em relação à morfogênese de tecidos *in vitro*. Em cultura de anteras de trigo (ORSHINSKY *et al.*, 1990) e na indução de embriões somáticos de alfafa (STRICKLAND *et al.*, 1987), os autores relataram que nos tratamentos com maltose houve melhor desenvolvimento de embriões e obtenção de plântulas, quando comparados à sacarose.

CHU *et al.* (1990) a partir de pólen de *Triticum aestivum*, em meio de cultura contendo sacarose, glicose, frutose, manitol e uma mistura de glicose, verificaram que os monossacarídeos foram efetivos em promover a indução de embriões, e a glicose mais eficiente na regeneração de plantas.

TREMBLAY & TREMBLAY (1991) verificaram que diferentes espécies de *Picea* têm comportamento diferenciado em relação à fonte de carboidratos para o desenvolvimento de embriões somáticos. Para *Picea rubens*, observaram-se diferenças significativas entre sacarose, frutose e glicose, com 6% de frutose houve maior número de embriões, enquanto que para *P. mariana* não houve diferenças significativas para as três fontes de açúcares.

KINNERSLEY & HANDERSON (1988) suplementaram o meio de cultura glicose e maltose, e verificaram que houve estímulo na embriogênese somática de *Daucus carota*, em relação ao meio contendo sacarose.

Também, THENGANE *et al.* (1994) observaram embriogênese em girassol, com diferentes concentrações de sacarose (20, 40, 60 e 80 g/l) e 2,4-D (1,0 e 2,0 mg/l), verificaram que 40 g/l de sacarose apresentou o melhor resultado; constataram que com aumento na concentração de sacarose houve um decréscimo na resposta a embriogênese, sendo reduzida drasticamente na concentração de 80g/l.

FUENTE (1993) ao substituir a sacarose por três fontes alternativas de carbono verificou que a frutose aumentou significativamente a produção de embriões somáticos em dois dos genótipos estudados, enquanto que a maltose favoreceu o terceiro genótipo em estudo.

Em relação a multiplicação e alongação de segmentos nodais, YU & REED (1993) obtiveram os melhores resultados para a multiplicação e alongação de segmentos nodais de avelã (*Corylus avellana* L.) em meio de cultura contendo 3% de glicose, em relação as cinco fontes de carbono utilizados (frutose, galactose, lactose, glucose e sacarose).

Em relação à cultura do bambu, o carboidrato utilizado é a sacarose em diferentes concentrações visando suprir o meio de cultura; porém ALEXANDER & RAO (1968) verificaram o desenvolvimento de embriões de *Bambusa* sp. em meio de cultura White em quatro concentrações de sacarose (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0%); em todos os tratamentos os embriões germinaram, sendo na concentração de 2% de sacarose o desenvolvimento da plântula foi satisfatório.

2.3. Uso de prata e cobalto no controle da morfogênese

As espécies vegetais produzem etileno quando cultivadas *in vitro* e seu acúmulo no interior dos frascos de cultura é consequência da vedação dos recipientes, podendo inibir o crescimento e desenvolvimento de calos. HUXTER *et al.* (1979) demonstraram que produção de etileno se correlaciona com a taxa de crescimento de calos de fumo.

WILLIAMS *et al.* (1990) relataram que a presença de nitrato de prata ao meio de cultura estimulou o crescimento de calos e a regeneração de *Brassica oleraceae*. Assim também, o nitrato de prata estimulou a regeneração de parte aérea em *Brassica campestris* (CHI & PUA, 1989), *Triticum aestivum* e *Nicotina plumbaginifolia* (PURNHAUSER *et al.*, 1987).

WANN *et al.* (1987) demonstraram que a produção de etileno em *Picea abies* foi muitas vezes maior em cultura de calos não embriogênicos do que nos calos embriogênicos. Os mesmos autores sugeriram que a taxa de produção do etileno pode ser utilizada como um marcador de embriogênese somática em calos.

Em cultura de embriões imaturos de *Zea mays*, estudos verificaram aumento significativo na produção de calos embriogênicos e na capacidade regenerativa dos mesmos com a adição de AgNO₃ (SONGSTAD *et al.*, 1988; VAIN *et al.*, 1989a; VAIN *et al.*, 1989b e SONGSTAD *et al.*, 1991).

FUENTE (1993) obteve embriões a partir de folhas de *Coffea canephora* na presença de 5 a 10 mg/l de AgNO₃, verificando declínio na produção de embriões nas concentrações de 25 e 50 mg/l.

Os efeitos dos íons Co^{++} e Ni^{++} sobre a produção de etileno e a embriogênese somática em cultura de células de cenouras foram estudados por ROUSTAN *et al.* (1989). Observaram que concentrações de 10 a 50 μM de CoCl_2 inibem a produção de etileno e proporcionalmente estimulam a produção de embriões.

2.2.4. Avaliação do crescimento *in vitro*

A avaliação do crescimento *in vitro* de culturas baseia-se em, verificar o desenvolvimento celular até o esgotamento do meio de cultura. A Figura 1 expressa a evolução da biomassa da cultura (gramas de matéria seca/unidade de volume de meio de cultura).

Figura 1 - Representação esquemática do desenvolvimento celular. I- Fase de indução, II - Fase de transição, III - Fase exponencial, IV.-Fase de desaceleração do crescimento, V.- Fase estacionária, VI - Fase de declínio.

(Fonte: Dias, (1982) citado por CORREIA (1993)).

O crescimento da célula caracteriza-se pela fase I que expressa o intervalo de tempo necessário para a multiplicação da massa, e a fase II relacionada à velocidade específica do crescimento celular e dependente da temperatura, pH, concentração de nutrientes e de inibidores, e do estado de agitação da cultura (Dias, 1982, citado por CORREIA (1993)).

Quando a velocidade específica de crescimento celular é constante, esta representa um crescimento exponencial ou logarítmico que se mantém constante enquanto o meio de cultura for favorável ao desenvolvimento da cultura.

Para o crescimento de árvores no campo, INGESTAD (1991) propõe a aplicação de doses menores e repetitivas de fertilizantes, em períodos de tempo reduzidos. Desta maneira, a taxa adicional relativa de nutrientes é igual à taxa de absorção relativa de nutrientes pela planta. Enquanto houver este equilíbrio, a taxa de crescimento relativo permanece linear.

Assim, o controle do crescimento das culturas *in vitro* pode ser alcançado com acréscimos periódicos de meio de cultura.

Na avaliação do crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *Eucalyptus* spp no meio de cultura GONÇALVES (1980) modificado e JADS, (CORREIA, 1993) observou: variações entre clones para PMF, PMS e R%; diferenças no comportamento entre clones em meios de cultura sólido, líquido e bifásico, e aumento de R%, PMF, PMS até o 14^o dia e cultura com estabilização até o 21^o dia e redução até 42^o dia de cultura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho com a espécie *Phyllostachys bambusoides*, fornecida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas (SP), foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Campus Piracicaba.

A muda foi transplantada inicialmente para recipientes com capacidade de 18 litros e posteriormente transferido para caixa de amianto com capacidade de 100 litros (Figura 2). A muda recebeu tratamento fitossanitário (Benlate/500 mg/l) e adubação (10 - 6 - 10 + micronutrientes) a cada 15 dias, durante 3 meses (janeiro a março/1992), e mantidos sob condições de telado (casa de sombra).

3.1. Explante

Os explantes utilizados foram segmentos nodais (explante primário) e bainha foliar (explante secundário).

Segmentos nodais de 10 a 15 mm de comprimento contendo uma gema dormente foram seccionados dos ramos secundários, desinfestados e inoculados *in vitro*. As gemas se desenvolveram e foram segmentadas e inoculadas em meio de cultura para a indução de calos.

3.2. Desinfestação dos explantes

Os segmentos nodais foram lavados superficialmente com uma solução de detergente doméstico durante 5 minutos, e posteriormente enxaguados em água corrente. A seguir, foram mantidos em solução de bicloreto de mercúrio (500 mg/l) durante 15 minutos, procedendo se quatro lavagens sucessivas com água destilada e esterilizada (em câmara de fluxo laminar).

Figura 2 - Muda de *Phyllostachys bambusoides* sob condições de telado.

3.3 Meios de cultura

O meio de cultura básico utilizado foi o descrito por MURASHIGE & SKOOG (1962), suplementado com vitaminas e hormônios. A composição do meio de cultura encontra-se na Tabela 2, e na Tabela 3 os reguladores de crescimento, açúcares e demais componentes adicionados ao meio MS.

Tabela 2 - Composição do meio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962).

Componentes	mM	mg/l
NH ₄ NO ₃	20,6	1650
KNO ₃	18,8	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,0	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	370
KH ₂ PO ₄	1,25	170
KI	0,005	0,83
H ₃ BO ₃	0,1	6,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,1	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,03	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,001	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0001	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0001	0,025
Na ₂ EDTA	0,1	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1	27,8
Inositol	0,55	100,0
Ácido nicotínico	0,004	0,5
Piridoxina HCl	0,0024	0,5
Tiamina HCl	0,0003	0,1
Glicina	0,026	2,0
Sacarose	58,4	20.000
Ágar		5.000

O pH do meio foi ajustado ao valor de 5,8 antes da autoclavagem por 15 minutos a 121°C e 15 psi.

Tabela 3 - Reguladores de crescimento e açúcares adicionados ao meio básico MS nas diferentes etapas do experimento.

Etapas do experimento	Componentes adicionados	mM	mg/l
Desenvolvimento de explante	Cinetina	0,001	0,2
	BA	0,002	0,5
Indução de calos	Picloram	0,03	8,0
Manutenção de calo	Picloram	0,004	1,0
Indução de morfogênese	Sacarose	58,4	20.000
		116,8	40.000
		175,2	60.000
	Frutose	111,0	20.000
		222,0	40.000
		333,0	60.000
	Glicose	111,0	20.000
		222,0	40.000
		333,0	60.000
	ANA	0,001	0,25
		0,002	0,50
		0,004	1,00
	BA	0,001	0,25
		0,002	0,50
		0,004	1,00
		0,008	2,00
		0,016	4,00
		0,032	8,00
	CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,015	3,60
		0,03	7,10
	Ag NO ₃	0,03	5,00
		0,06	10,00
	Glutamina	0,68	450,00
	Caseína hidrolisada		450,00
	Ácido ascórbico	0,56	100,00
	Picloram	0,004	1,00

3.4. Condições de cultura

Os explantes e os calos utilizados no experimento foram inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura, enquanto os calos em multiplicação e/ou manutenção foram repicados e transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm) com 15 ml de meio. Os tubos foram vedados com tampão de algodão, e mantidos na sala de crescimento (Temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas), intensidade luminosa de 1000 lux ou escuro em câmara adaptada.

3.5. Indução de calo

Os explantes primários foram inoculados em meio de cultura MS (Tabela 2) contendo 0,5 mg/l BA. Após 4 a 5 semanas, estes foram repicados em explantes secundários e inoculados em meio de cultura MS contendo 8,0 mg/l de Picloram.

3.6. Manutenção e multiplicação do calo

Os calos de *Phyllostachys bambusoides* foram mantidos em meio de cultura MS (Tabela 2) para a multiplicação e manutenção dos calos. Como o crescimento destes calos foi lento, a primeira repicagem foi feita aos 6 meses.

A partir de dezembro de 1992, iniciou-se a multiplicação do calo. Para multiplicação e manutenção, os calos foram transferidos para o MS com 1,0 mg/l de Picloram.

3.7. Indução à morfogênese

A indução de morfogênese a partir dos calos de *Phyllostachys bambusoides* foi realizada com os dois tipos de calos: amarelo globoso e branco friável envolvendo os seguintes experimentos:

3.7.1. Efeito de diferentes fontes e dose de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso

Foram testados dois tipos de calos, amarelo globoso e branco friável, em meio MS (Tabela 2) contendo 3 fontes de carboidratos em 3 diferentes concentrações, apresentada na tabela 4.

Tabela 4- Tratamentos referentes a fonte de carboidrato.

TRATAMENTO	FONTE DE CARBOIDRATO	CONCENTRAÇÃO (%)		
		%	mM	mg/l
1	testemunha	0,0	0,0	0.0
2	sacarose	2,0	58,4	20.000
3	sacarose	4,0	116,8	40.000
4	sacarose	6,0	175,2	60.000
5	frutose	2,0	111,0	20.000
6	frutose	4,0	222,0	40.000
7	frutose	6,0	333,0	60.000
8	glicose	2,0	111,0	20.000
9	glicose	4,0	222,0	40.000
10	glicose	6,0	333,0	60.000

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada parcela foi composta por 6 tubos de ensaio.

As avaliações foram realizadas semanalmente com o auxílio de microscópio estereoscópico observando se coloração dos calos, formação de estruturas morfológicas, número de raízes e a presença ou ausência de centros meristemáticos.

3.7.1.1. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidrato, na morfogênese de calo amarelo globoso na presença de luz

Calo amarelo globoso apresentando pigmentação vermelho-purpúreo mantido em subcultura até dezembro de 1993 foi inoculado em meio MS (Tabela 2) segundo os tratamentos descritos no Tabela 4, com 4 repetições e 6 tubos por parcela.

O experimento foi mantido nas condições da sala de crescimento, à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e foperíodo de 16/8 horas durante 56 dias. Foram realizados 8 avaliações semanais, observando-se a formação de estruturas morfogênicas e a coloração do calo, caracterizada pelas seguintes escalas:.

a) Escala de avaliação para a formação de raiz (número)

- 01 - ausência de raiz
- 02 - presença (1 a 2)
- 03 - presença (3 a 5)
- 04 - presença (6 a 10)
- 05 - presença (11 a 15)

b) Escala de avaliação para a formação de centro meristemático:

- 01 - ausência
- 02 - presença

c) Escala de avaliação para cor do calo:

- 01 - branco, amarelo claro, vermelho purpúreo(1)
- 02 - branco, amarelo claro, vermelho purpúreo(2)
- 03 - branco, amarelo claro, vermelho purpúreo(3)
- 04 - branco, amarelo claro, vermelho purpúreo(4)
- 05 - amarelo claro, vermelho purpúreo(1)
- 06 - amarelo claro, vermelho purpúreo(2)
- 07 - amarelo claro, vermelho purpúreo(3)
- 08 - amarelo claro, vermelho purpúreo(4)
- 09 - branco, amarelo-verde, vermelho purpúreo(1)
- 10 - branco, amarelo-verde, vermelho purpúreo(2)
- 11 - branco, amarelo-verde, vermelho purpúreo(3)
- 12 - branco, amarelo-verde, vermelho purpúreo(4)

- 13 - amarelo-verde, vermelho purpúreo(1)
- 14 - amarelo-verde, vermelho purpúreo(2)
- 15 - amarelo-verde, vermelho purpúreo(3)
- 16 - amarelo-verde, vermelho purpúreo(4)
- 17 - amarelo, caramelo claro, vermelho purpúreo(1)
- 18 - amarelo, caramelo claro, vermelho purpúreo(2)
- 19 - amarelo, caramelo claro, vermelho purpúreo(3)
- 20 - amarelo, caramelo claro, vermelho purpúreo(4)
- 21 - caramelo claro, vermelho purpúreo(1)
- 22 - caramelo claro, vermelho purpúreo(2)
- 23 - caramelo claro, vermelho purpúreo(3)
- 24 - caramelo claro, vermelho purpúreo(4)
- 25 - amarelo-verde, vermelho purpúreo(1)
- 26 - amarelo-verde, vermelho purpúreo(2)
- 27 - amarelo-verde, vermelho purpúreo(3)
- 28 - amarelo-verde, vermelho purpúreo(4)
- 29 - amarelo-verde, caramelo, vermelho purpúreo(1)
- 30 - amarelo-verde, caramelo, vermelho purpúreo(2)
- 31 - amarelo-verde, caramelo, vermelho purpúreo(3)
- 32 - amarelo-verde, caramelo, vermelho purpúreo(4)
- 33 - caramelo claro, vermelho purpúreo(1)
- 34 - amarelo (>80%), caramelo (5), vermelho purpúreo (1)
- 35 - amarelo (>80%), caramelo(5), vermelho purpúreo (2)
- 36 - amarelo (>80%), caramelo(5), vermelho purpúreo(4)
- 37 - amarelo (>80%), caramelo(6), vermelho purpúreo(1)
- 38 - amarelo (>80%), caramelo(6), vermelho purpúreo(2)
- 39 - amarelo (>80%), caramelo(6), vermelho purpúreo(4)
- 40 - amarelo (>80%), verde, caramelo(5), vermelho purpúreo(1)
- 41 - amarelo (>80%), verde, caramelo(5), vermelho purpúreo(2)
- 42 - amarelo (>80%), verde, caramelo(5), vermelho purpúreo(4)
- 43 - amarelo (>80%), verde, caramelo(6), vermelho purpúreo(1)
- 44 - amarelo (>80%), verde, caramelo(6), vermelho purpúreo(2)
- 45 - amarelo (>80%), verde, caramelo(6), vermelho purpúreo(4)
- 46 - amarelo (<80%), caramelo (5), vermelho purpúreo (1)
- 47 - amarelo (<80%), caramelo (5), vermelho purpúreo (2)
- 48 - amarelo (<80%), caramelo (5), vermelho purpúreo (4)

- 49 - amarelo (<80%), caramelo (7), vermelho purpúreo (1)
- 50 - amarelo (<80%), caramelo (7), vermelho purpúreo (2)
- 51 - amarelo (<80%), caramelo (7), vermelho purpúreo (4)
- 52 - amarelo (<80%), verde, caramelo (5), vermelho purpúreo (1)
- 53 - amarelo (<80%), verde, caramelo (5), vermelho purpúreo (2)
- 54 - amarelo (<80%), verde, caramelo (5), vermelho purpúreo (4)
- 55 - amarelo (<80%), verde, caramelo (6), vermelho purpúreo (1)
- 56 - amarelo (<80%), verde, caramelo (6), vermelho purpúreo (2)
- 57 - amarelo (<80%), verde, caramelo (6), vermelho purpúreo (4)
- 58 - caramelo
- 59 - caramelo escuro
- 60 - preto

Observação:

Purpúreo(1): ausência de pigmentação purpúreo

Purpúreo(2): presença de pigmentação , traços no calo

Purpúreo(3): presença de pigmentação, inferior a 5% no calo

Purpúreo(4): presença de pigmentação, entre 5 e 10% no calo

Caramelo(5): presença de cor caramelo, inferior a 5% no calo

Caramelo(6): presença de cor caramelo, entre 5 e 10% no calo

Caramelo(7): presença de cor caramelo, superior a 10% no calo

3.7.1.2. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso na ausência de luz

Calo amarelo globoso apresentando pigmentação vermelho-purpúreo mantido em cultura até dezembro de 1993 foi inoculado em meio MS (Tabela 2) segundo os tratamentos da Tabela 4, com 4 repetições e 6 tubos de ensaio por parcela.

O experimento foi mantido na ausência de luz, em câmara adaptada (caixa de madeira revestida com folha de isopor e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ controlado por termostato), durante 56 dias. Foram realizadas 8 avaliações semanais (Épocas (dias)) observando-se a formação de estruturas morfogênicas e a coloração do calo, caracterizadas pelas seguintes escalas:

a) Escala de avaliação para a formação de raiz(número de raízes):

- 01 - ausência de raiz
- 02 - presença (até 5)
- 03 - presença (6 a 10)
- 04 - presença (> 10)

b) Escala de avaliação para cor de calo:

- 01 - branco (< 20%), amarelo claro (50 a 95%), vermelho purpúreo (1)
- 02 - branco (< 20%), amarelo claro (50 a 95%), vermelho purpúreo (2)
- 03 - branco (< 20%), amarelo claro (50 a 95%), vermelho purpúreo (3)
- 04 - branco (< 20%), amarelo claro (50 a 95%), vermelho purpúreo (4)
- 05 - amarelo claro (75 a 100%), vermelho purpúreo (1)
- 06 - amarelo claro (75 a 100%), vermelho purpúreo (2)
- 07 - amarelo claro (75 a 100%), vermelho purpúreo (3)
- 08 - amarelo claro (75 a 100%), vermelho purpúreo (4)
- 09 - amarelo claro, caramelo
- 10 - caramelo
- 11 - amarelo(80 a 90%), caramelo (<20%), marrom (<10%), vermelho purpúreo (1)
- 12 - amarelo (80 a 90%), caramelo (<20%), marrom (<10%), vermelho purpúreo (2)
- 13. - amarelo(80 a 90%), caramelo (<20%), marrom (<10%), vermelho purpúreo (3)
- 14 - amarelo (80 a 90%), caramelo (<20%), marrom (<10%), vermelho purpúreo (4)
- 15 - amarelo (80 a 90%), caramelo (<20%), marrom (10 a 20%), vermelho purpúreo (1)
- 16 - amarelo (80 a 90%), caramelo (<20%), marrom (10 a 20%), vermelho purpúreo (2)
- 17 - amarelo (80 a 90%), caramelo (<20%), marrom (10 a 20%), vermelho purpúreo (3)
- 18 - amarelo (80 a 90%), caramelo (<20%), marrom (10 a 20%), vermelho purpúreo (4)
- 19 - amarelo (10 a 20%), caramelo (>80%), marrom (10%), vermelho purpúreo (1)
- 20 - amarelo (10 a 20%), caramelo (>80%), marrom (10%), vermelho purpúreo (2)
- 21 - amarelo (10 a 20%), caramelo (>80%), marrom (10%), vermelho purpúreo (3)
- 22 - amarelo (10 a 20%), caramelo (>80%), marrom (10%), vermelho purpúreo (4)
- 23 - amarelo (10 a 20%), caramelo (>80%), marrom (10% a 20%), vermelho purpúreo (1)
- 24 - amarelo (10 a 20%), caramelo (>80%), marrom (10% a 20%), vermelho purpúreo (2)
- 25 - amarelo (10 a 20%), caramelo (>80%), marrom (10% a 20%), vermelho purpúreo (3)
- 26 - amarelo (10 a 20%), caramelo (>80%), marrom (10% a 20%), vermelho purpúreo (4)
- 27 - amarelo
- 28 - marrom

Observação:

Purpúreo(1): ausência de pigmentação purpúreo

Purpúreo(2): presença de pigmentação , traços no calo

Purpúreo(3): presença de pigmentação, inferior a 5% no calo

Purpúreo(4): presença de pigmentação, entre 5 e 10% no calo

3.7.2 Efeito de diferentes concentrações de BA e ANA na morfogênese de calo amarelo globoso

Foram conduzidos dois experimentos com calo tipo amarelo globoso submetidos a concentrações de BA (baixa e alta) e ANA, em diferentes combinações e mantidos por 35 dias de cultura.

3.7.2.1. Efeito de concentrações baixas de BA e ANA

Os calos tipo amarelo-globoso foram inoculados em 10 ml de meio de cultura MS (Tabela 2) contendo 2% de glicose e suplementados com diferentes concentrações de BA e ANA. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 tubos por parcela. Na Tabela 5 estão apresentados os tratamentos com diferentes concentrações de BA e ANA.

Tabela 5 - Tratamentos com concentrações baixas de BA e ANA.

Tratamentos	BA (mg/l)	ANA (mg/l)
1	0,0	0,0
2	0,0	0,25
3	0,0	0,50
4	0,0	1,0
5	0,25	0,0
6	0,25	0,25
7	0,25	0,50
8	0,25	1,0
9	0,50	0,0
10	0,50	0,25
11	0,50	0,50
12	0,50	1,0
13	1,0	0,0
14	1,0	0,25
15	1,0	0,50
16	1,0	1,0

Foram realizadas 5 avaliações semanais observando-se com o auxílio de microscópio estereoscópico a formação de estruturas morfogênicas, conforme as escalas:

a) Escala de avaliação para formação de raiz:

01 - ausente

02 - presente

b) Escala de avaliação para formação de centros meristemáticos:

01 - ausente

02 - presente

3.7.2.2. Efeito de concentrações de BA e ANA na presença de luz

O procedimento foi o mesmo descrito para o experimento anterior (3.7.2.1), suplementado com concentrações altas de BA. Na Tabela 6 estão apresentados os tratamentos com diferentes concentrações de ANA e BA.

Tabela 6 - Tratamentos com concentrações altas de BA e ANA.

Tratamentos	BA (mg/l)	ANA (mg/l)
1	0,0	0,0
2	0,0	0,25
3	0,0	0,50
4	0,0	1,0
5	2,0	0,0
6	2,0	0,25
7	2,0	0,50
8	2,0	1,0
9	4,0	0,0
10	4,0	0,25
11	4,0	0,50
12	4,0	1,0
13	8,0	0,0
14	8,0	0,25
15	8,0	0,50
16	8,0	1,0

As avaliações basearam-se no mesmo procedimento descrito anteriormente (3.7.2.1)

3.7.3. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos em calo branco friável na presença de luz

Calo branco friável mantido em cultura até outubro de 1994, foram inoculados em meio MS (Tabela 2), segundo os tratamentos da Tabela 4. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 tubos por parcela.

O experimento foi mantido durante 49 dias sob as condições da sala de crescimento, à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas. Foram realizadas 7 avaliações

semanais (Épocas (dias)) observando-se a formação de estruturas morfogênicas e a coloração do calo, caracterizada pela seguinte escala:

Escala de avaliação para cor do calo:

- 01 - branco
- 02 - branco-amarelo claro
- 03 - amarelo claro
- 04 - amarelo claro e caramelo claro
- 05 - caramelo claro
- 06 - amarelo esverdeado
- 07 - amarelo
- 08 - amarelo e caramelo claro
- 09 - caramelo
- 10 - caramelo escuro

3.7.4. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na morfogênese de calo branco friável

Foram conduzidos dois experimentos com diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, na presença e na ausência de Picloram para calo tipo branco friável mantido em cultura até outubro de 1994. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições e 4 tubos por parcela.

3.7.4.1. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram

Os tratamentos constituíram-se basicamente do meio MS (Tabela 2) suplementado com 2% de sacarose, 1.0 mg/l de Picloram e diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, conforme Tabela 7.

Tabela 7 - Tratamentos com AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram (1,0 mg/l).

Tratamento	AgNO_3 (mg/l)	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)
A1	0,0	0,0
A2	0,0	3,6
A3	0,0	7,1
A4	5,0	0,0
A5	5,0	3,6
A6	5,0	7,1
A7	10,0	0,0
A8	10,0	3,6
A9	10,0	7,1

O experimento foi mantido durante 49 dias sob condições da sala de crescimento, à 27°C e fotoperíodo de 16/8 horas. Foram realizadas 7 avaliações semanais (Época (dias)) com auxílio de microscópio esteoscópio observando-se a formação de estruturas morfogênicas e a coloração dos calos, caracterizado pela seguinte escala:

Escala de avaliação para cor do calo:

- 01 - branco
- 02 - branco e amarelo claro
- 03 - branco (calos brancos em crescimento)
- 04 - branco a amarelo
- 05 - branco a caramelo claro
- 06 - amarelo claro a caramelo claro
- 07 - amarelo claro e caramelo
- 08 - caramelo e branco (crescimento)
- 09 - caramelo claro e caramelo escuro
- 10 - caramelo e caramelo escuro
- 11 - caramelo
- 12 - caramelo escuro

3.7.4.2. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram

O procedimento foi o mesmo descrito para o experimento anterior (3.7.4.1) com exceção do Picloram que foi excluído do meio de cultura.

Na Tabela 8 encontram-se os tratamentos com diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Tabela 8 - Tratamentos com AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram.

Tratamento	AgNO_3 (mg/l)	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)
B1	0,0	0,0
B2	0,0	3,6
B3	0,0	7,1
B4	5,0	0,0
B5	5,0	3,6
B6	5,0	7,1
B7	10,0	0,0
B8	10,0	3,6
B9	10,0	7,1

Foram realizadas 7 avaliações semanais observando-se a formação de estruturas morfogênicas e a coloração dos calos, caracterizado pela seguinte escala:

Escala de avaliação para cor do calo:

- 01 - branco
- 02 - branco-amarelo
- 03 - branco e caramelo claro
- 04 - amarelo claro
- 05 - amarelo e caramelo claro
- 06 - amarelo e caramelo
- 07 - caramelo claro
- 08 - caramelo e caramelo claro
- 09 - caramelo
- 10 - caramelo e caramelo escuro
- 11 - caramelo escuro
- 12 - marrom
- 13 - preto

3.7.5. Efeito da glutamina ou caseína hidrolisada na presença e na ausência de ácido ascórbico na morfogênese de calo branco friável.

O experimento foi conduzido em meio de cultura MS (Tabela 2) suplementado com 2% de glicose, a glutamina ou caseína hidrolisada em combinação com BA e Picloram, conforme os tratamentos expressos na Tabela 9. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 tubos por parcela.

Tabela 9 - Tratamentos com glutamina ou caseína hidrolisada na presença e ausência de ácido ascórbico.

Tratamentos	GLT	CH	BA	PICL	ÁC.ASCÓRBICO
mg/L					
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	450,0	0,0	0,5	0,0	100,0
3	0,0	450,0	0,5	0,0	100,0
4	450,0	0,0	0,0	1,0	100,0
5	0,0	450,0	0,0	1,0	100,0
6	450,0	0,0	0,5	0,0	0,0
7	0,0	450,0	0,5	0,0	0,0
8	450,0	0,0	0,0	1,0	0,0
9	0,0	450,0	0,0	1,0	0,0

Os calos brancos friáveis mantidos em cultura até outubro de 1994, foram inoculados nos diferentes meios e mantidos sob condições da sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas.

Foram realizadas 7 avaliações semanais com o auxílio de microscópio esterioscópico observando-se a presença de estruturas morfogênicas e a evolução da coloração do calo, caracterizada pela seguinte escala:

Escala de avaliação para cor do calo:

- 01 - branco
- 02 - branco e caramelo claro
- 03 - branco e caramelo
- 04 - branco e caramelo escuro
- 05 - amarelo claro
- 06 - amarelo escuro
- 07 - amarelo-caramelo

- 08 - caramelo claro
- 09 - caramelo
- 10 - caramelo claro e caramelo escuro
- 11 - caramelo escuro
- 12 - caramelo escuro e preto
- 13 - preto

3.8. Avaliação do crescimento de calo amarelo globoso *in vitro*

Os calos amarelos globosos mantidos em cultura até fevereiro de 1994, foram avaliados quanto ao peso fresco (PMF), ao peso seco (PMS), à matéria seca produzida (MSP) e à taxa de crescimento relativo (R%).

Os calos amarelos globosos provenientes da cultura em manutenção foram repicados e mantidos nas condições da sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas, durante 42 dias.

As avaliações do peso da matéria fresca (PMF), foi conduzida no Laboratório de Energia, Celulose e Papel do Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP, semanalmente procedendo-se a transferência dos calos para cadinhos de filtro de vidro, lavados com água destilada e filtrado à vácuo para drenagem do excesso de água e meio de cultura. A seguir pesados e deixados para secagem em estufa à $100 \pm 3^\circ\text{C}$, por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, após atingir peso constante os calos foram pesados para avaliação do peso da matéria seca (PMS). Foram avaliados 40 calos semanalmente durante 7 semanas totalizando 280 calos.

A taxa de crescimento relativo (R%) foi avaliada pela equação segundo HUNT (1982).

$$\text{Taxa de Crescimento Relativo} = \left(\frac{\ln \text{PMS2} - \ln \text{PMS1}}{T2 - T1} \right) \times 100$$

onde:

$\ln$ = logaritmo neperiano

PMS2 = Produção de matéria seca no período de tempo final

PMS1 = Produção de matéria seca no período de tempo inicial

T2 = Tempo final

T1 = Tempo inicial

3.9. Análises histológicas

Avaliações histológicas foram realizadas para a identificação de possíveis estruturas presentes nos calos amarelos globosos, apresentados na Figura 45, que também foram visíveis em meio de cultura contendo BA e ANA. Amostras dos tratamentos referentes aos testes com sacarose, frutose e glicose, nas concentrações 2, 4 e 6% na presença de fotoperíodo de 16-8 horas foram segundo metodologia descrita por ALMEIDA (1994), fixadas em FAA-50 (formaldeído-ácido acético-etanol), desidratado em série terciária de álcool butílico e embebido em parafina. Após a emblocagem, o material foi cortado em micrótomo para parafina, obtendo-se cortes com 10 a 12 micrometros de espessura, os quais foram corados com safranina e verde rápido (SASS, 1951), e montados em lâminas histológicas. O material foi observado e caracterizado em microscópio óptico e fotomicrografados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Indução de calos (explante secundário)

Calo de *Phyllostachys bambusoides* foi obtido a partir de bainha foliar do explante secundário no meio de cultura MS (Tabela 2) suplementado com 8 mg/l de Picloram. Após 5 semanas, houve a formação de calos em 4 explantes secundários, 3 originaram-se do explante primário 8 e um do explante primário 17.

Dos 4 calos obtidos da indução, apenas o calo originado do explante secundário sobreviveu (Figura 3), e por meio de sucessivas multiplicações forneceu todo o material para a condução dos experimentos visando a indução de morfogênese. Na Figura 4 encontram-se os 3 tipos de calos que foram induzidos de *Phyllostachys bambusoides*: calo amarelo globoso (textura compacta, com pigmentação vermelho-púrpureo na parte superior dos glóbulos) que desapareceu aproximadamente após 18 meses de cultura, o calo branco friável (textura granular, com aspecto brilhante) e calo mucilaginoso. Estes tipos de calos obtidos de *P. bambusoides* são semelhantes aos descritos por YEH e CHANG (1986a, b) METHA *et al.* (1982), HUANG e MURASHIGE (1983), ZAMORRA *et al.* (1988); HUANG *et al.* (1989 b); TSAY *et al.* (1990); ZAMORRA & GRUEZO (1990) e JULLIEN & TRAN THAN VAN (1994).

Quanto à multiplicação, observou-se visualmente que o crescimento dos calos amarelos globosos foi mais rápido do que os calos brancos friáveis, nas culturas de manutenção e multiplicação dos mesmos. As Figuras 5 e 6 mostram o aspecto dos calos amarelo globoso e branco friável mantido respectivamente, até julho de 1994, em meio MS com 1 mg/l de Picloram.

Os experimentos conduzidos com calo tipo amarelo globoso apresentaram raízes com pilosidade, formação de centros meristemáticos e alteração na cor. Os calos brancos friáveis não apresentaram desenvolvimento de estruturas, contudo mostraram alterações na coloração.

Dentre os vários trabalhos de cultura de tecido de bambu, o uso de bainha para a indução de calo não é comum. Contudo, HASSAN & DEBERG (1987), alcançaram sucesso na indução de calo em primórdios foliares de *Phyllostachys viridis*, em que obtiveram dois tipos de calos: um embriogênico branco, compacto e opaco e outro

não embriogênico e amarelado com produção ocasional de embriões. JULLIEN & TRAN THANH VAN (1994) também obtiveram sucesso na indução de calo a partir de secções transversais de folhas interiores de gemas de *Bambusa glaucescens*. Estes autores conseguiram 3 tipos de calos, sendo um não-embriogênico, um intermediário e outro embriogênico branco-amarelo claro, liso e compacto. Os tipos de calos dependiam da posição do explante inicial. De alguma forma, parece que as características globoso, branco-amarelado do calo estão associados à sua capacidade morfogênica.

Figura 3 - Calo de *Phyllostachys bambusoides* induzido a partir de bainha foliar

Figura 4 - Tipos de calos induzidos a partir de bainha de *Phyllostachys bambusoides*: a) amarelo globoso com pigmentação vermelho-purpúreo; b) branco friável e c) mucilaginoso.

Figura 5 - Calo Amarelo-globoso de *Phyllostachys bambusoides* em meio MS complementado com Picloram.

Figura 6 - Calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* em meio MS complementado com Picloram.

4.2. Efeito de diferentes tratamentos na morfogênese de calo amarelo globoso

4.2.1. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso.

4.2.1.1. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso na presença de luz

Em todos os tratamentos foram observados variação na cor dos calos (Tabela 10), a formação de raízes (Tabela 11) e de centros meristemáticos (Tabela 12). As estruturas observadas foram semelhantes aos da Figura 45.

Tabela 10 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides*, na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

TRAT	Épocas (dias)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
1	3,79 b	3,71 b	33,00 a	33,00 a	58,00a	59,00 a	59,00 a	59,00 a
2	3,79 b	7,42 ab	9,21 b	25,00 c	51,42 ab	51,42 ab	51,42abc	52,87abc
3	5,21 ab	7,67 ab	9,67 b	25,25 bc	49,12 ab	49,12 ab	49,12 bc	49,12 bc
4	4,67 ab	9,46 ab	10,17 b	26,62 bc	48,00 ab	49,79 ab	50,42 bc	50,42 bc
5	5,04 ab	11,12 a	12,42 b	26,83 bc	47,83 ab	47,83 b	56,58 ab	58,42 a
6	4,08 ab	9,50 ab	11,79 b	29,12abc	54,37 ab	54,37 ab	54,37 ab	54,37 ab
7	5,21 ab	10,25 a	10,37 b	24,87 c	48,33 ab	49,46 ab	49,46 bc	49,46 bc
8	5,00 ab	12,46 a	12,46 b	28,62abc	50,29 ab	51,42 ab	52,00abc	52,00abc
9	5,08 ab	12,75 a	12,75 b	29,62 ab	55,17 ab	55,17 ab	55,17 ab	55,17 ab
10	5,92 a	12,42 a	12,71 b	27,87 bc	44,75 b	45,25 b	45,25 c	45,25 c
CV	15,79	26,26	17,84	6,57	9,06	8,39	6,74	6,08
F	3,37	4,95	34,00	7,77	3,08	3,43	5,30	7,19
Pr > F	0,0068	0,0006	0,001	0,0001	0,0113	0,0062	0,0003	0,0001
Média	4,78	9,67	13,45	27,68	50,73	51,28	52,28	52,61
Geral								

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Os calos mantidos em meio MS, contendo as três fontes de carboidratos nas concentrações 0, 2, 4 e 6%, apresentaram aos 7 dias coloração variando de branco amarelo claro e pigmentado a amarelo claro. A partir dos 35 dias, os calos apresentaram regiões verdes (centros meristemáticos), e coloração amarelo, caramelo (e com traços de pigmentação), estabilizando-se para sacarose (Figura 7), frutose com exceção da concentração 2% (Figura 8) e glicose (Figura 9).

Figura 7 - Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

Figura 8 - Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de frutose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

Figura 9 - Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* a presença de glicose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

No 56º dia de cultura, observou-se que existe diferença entre alguns tratamentos. Os tratamentos com sacarose, frutose e glicose (na concentração de 2%) e os tratamentos com frutose e glicose à 4% não diferiram estatisticamente da testemunha, apresentando as maiores médias na escala de cores. Foram semelhantes entre si as médias dos tratamentos com sacarose nas três concentrações, frutose e glicose com 4 e 6%; dos tratamentos com sacarose nas três concentrações, frutose com 6% e glicose 2 e 4% (Tabela 10).

A formação de raízes foi crescente até o 21º dia de cultura para sacarose e glicose, enquanto que para frutose foi até o 28º dia. Após estas épocas, ocorreu a estabilização na formação de raízes (Figuras 10, 11 e 12)

Ao nível de 99% de confiança, não apresentaram diferenças entre si: os tratamentos com frutose e glicose nas três concentrações (2, 4 e 6%); os tratamentos com frutose (2, 4 e 6%), glicose (4 e 6%) e sacarose 6%; os tratamentos com frutose e glicose (4 e 6%) e sacarose (2 e 4%); os tratamentos que receberam sacarose (2, 4 e 6%) e frutose (2%); e os tratamentos sacarose (2 e 4%) e a testemunha, segundo a análise estatística. Porém, para a testemunha não foi observado formação de raiz (Tabela 11).

Tabela 11 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz, no calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações 0, 2, 4, e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

TRAT	Épocas (dias)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
1	1,00	1,00 d	1,00 d	1,00 e	1,00 e	1,00 e	1,00 d	1,00 e
2	1,00	1,83bcd	2,54bcd	2,46cde	2,42 cde	2,42 cde	2,37 bcd	2,37 cde
3	1,00	1,29cd	1,54 cd	1,92 de	1,92 de	1,92 de	1,92 cd	1,92 de
4	1,00	1,42 cd	2,79bcd	2,79bcde	2,79bcde	3,00 bcd	3,00 bcd	3,00 bcd
5	1,00	3,42 ab	4,00 ab	4,37 ab	4,37 ab	4,33 ab	4,33 ab	4,33 ab
6	1,00	2,54bcd	3,04 bc	3,58bcd	3,62 bcd	3,62 bcd	3,62 abc	3,62abcd
7	1,00	3,62 ab	3,96 ab	4,12abc	4,08 abc	4,08 abc	4,08 ab	4,08 abc
8	1,00	4,96 a	5,42 a	5,54 a	5,50 a	5,5 a	5,5 a	5,5 a
9	1,00	3,17abc	3,92 ab	4,17 abc	4,25 ab	4,25 ab	3,96 ab	4,08 abc
10	1,00	3,25abc	4,08 ab	4,12 abc	4,21 abc	4,21 abc	4,21 ab	4,21 abc
CV	0,0	31,01	24,36	22,63	21,87	21,60	24,19	23,06
F	99999,9	9,38	11,23	12,27	13,17	13,13	10,46	11,55
Pr > F	0,0	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média	1,0	2,65	3,23	3,41	3,42	3,43	3,40	3,41
Geral								

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Figura 10 - Número de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

Figura 11 - Número de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de frutose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

Figura 12 - Número de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de glicose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

A formação de centros meristemáticos (Tabela 12) ocorreu após o 28º dia de cultura para as três fontes de carboidratos (Figuras 13, 14, e 15), com exceção da testemunha. Não houve diferença significativa entre as 3 fontes de carboidratos.

Figura 13 - Formação de centros meristemáticos em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

Tabela 12 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de centro meristemático no calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachy bambusoides* na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

TRAT	Épocas (dias)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
1	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 b	1,00 b	1,00 c	1,00 c
2	1,00 a	1,12 a	1,00 a	1,00 a	1,92 a	1,96 a	1,96 ab	1,96 ab
3	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,87 a	1,87 a	1,87 ab	1,87 ab
4	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,79 a	1,92 a	1,96 ab	1,92 ab
5	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,58 ab	1,62 a	2,00 ab	2,00 ab
6	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	2,00 a	2,00 a	2,00 ab	2,00 ab
7	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,71 a	1,83 a	1,83 ab	1,83 ab
8	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,75 a	1,87 a	1,96 ab	1,96 ab
9	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,96 a	1,96 a	2,29 a	2,29 a
10	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,50 ab	1,58 a	1,58 b	1,58 bc
CV	0,0	7,81	0,0	0,0	14,79	11,69	12,94	13,37
F	99999,9	1,00	99999,9	99999,9	5,48	8,58	8,33	7,79
Pr>F	0,0	0,46	0,0	0,0	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001
Média	1,0	1,01	1,0	1,0	1,71	1,76	1,85	1,84
Geral								

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Figura 14 - Formação de centros meristemáticos em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de frutose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas de por 56 dias de cultura.

Figura 15 - Formação de centros meristemáticos em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% sob fotoperíodo de 16/8 horas por 56 dias de cultura.

No 35º dia, a testemunha não diferiu dos tratamentos frutose 2% e glicose 6%, que por sua vez não diferiram dos demais tratamentos. No tratamento glicose 4%, observou-se um progressivo escurecimento da cor, dificultando a visualização dos centros meristemáticos.

Em todos os tratamentos foram observados somente raiz e centro meristemático como estruturas organogênicas nos calos. Entretanto, o número de raiz variou entre os tratamentos e épocas de avaliação como mostra a Tabela 11.

Entre os tratamentos, o de glicose 4% apresentou o maior número de raízes (11 a 15 raízes por calo) em todas as épocas de avaliação. Porém, pelo teste de Tukey ($p > 0,5$), as médias não diferiram entre si, estatisticamente, aos 14, 21, 35 e 49 dias nos tratamentos com frutose 2 e 6%, glicose 4 e 6% e aos 49 e 56 dias com os tratamentos frutose 2, 4 e 6% e glicose 4 e 6%. A testemunha não apresentou raízes até o final das avaliações.

Das fontes de carboidratos, os tratamento com sacarose apresentaram menor número de raízes em relação aos tratamentos com frutose e glicose.

A rizogênese nas três fontes de carboidratos encontra-se representadas separadamente nas Figuras 10, 11 e 12, respectivamente para sacarose, frutose e glicose. Pela Figura 10, o tratamento com 6% de sacarose mostrou o maior número de raízes (3 a 5 raízes). A partir do 28º dia, não houve um crescimento significativo até os 56 dias, para todas as concentrações testadas. Em relação a frutose,

Figura 11, a concentração de 2% apresentou o maior número de raízes (6 a 10) até o 28º, porém não havendo diferença para as três concentrações do 28º ao 56º dia. Para a glicose, Figura 12, a menor concentração (2%) apresentou o maior número de raízes (11 a 15) em relação as concentrações de 4 e 6%. A formação de raízes estabilizou-se ao 28º dia para todos os tratamentos.

O aparecimento de centros meristemáticos ocorreu a partir do 35º dia para todos os tratamentos, com exceção da testemunha.

4.2.1.2. Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos na morfogênese de calo amarelo globoso na ausência de luz

Em todos os tratamentos, foram observados variação na cor dos calos (Tabela 13) e a formação de raízes (Tabela 14). As estruturas observadas foram semelhantes aos da Figura 45.

Até o 21º dia de cultura, nenhum tratamento apresentou variação significativa na cor que compreendeu o intervalo de branco, amarelo-claro, purpúreo a amarelo-claro purpúreo. Entre o 21º e 28º dia, a cor intensificou-se em todos os tratamentos, estabilizando-se com exceção da testemunha (Figuras 16, 17 e 18).

A partir do 28º dia de cultura, observaram-se diferenças entre os tratamentos ao nível de 99% de confiança. A cor dos calos variaram de amarelo, caramelo, marrom a amarelo, caramelo, marrom, vermelho-purpúreo, sendo que a testemunha apresentou na escala de cor, o maior valor. Aos 56 dias não houve diferença estatísticas entre os tratamentos que apresentaram coloração amarelo, caramelo, marrom e/ou vermelho-purpúreo, exceto para a testemunha.

Tabela 13 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável cor do calo oriundo de calos amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.

TRAT	Épocas (dias)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
1	4,67 a	4,79 a	4,79 a	9,00 c	7,00 b	21,00 a	21,00 a	21,00 a
2	3,75 a	6,66 a	3,79 a	13,96abc	14,83 a	14,83 b	14,83 bc	14,83 bc
3	5,00 a	5,17 a	5,00 a	18,08 a	17,75 a	17,75 ab	17,75abc	17,75abc
4	5,17 a	5,04 a	5,04 a	18,29 a	17,87 a	17,83 ab	18,17 ab	18,17 ab
5	5,25 a	5,04 a	5,00 a	13,54abc	15,17 a	15,17 b	15,17 bc	15,17 bc
6	6,04 a	6,08 a	6,04 a	14,67 ab	14,04 ab	14,04 b	14,04 bc	14,04 bc
7	5,12 a	5,08 a	5,08 a	16,00 ab	16,00 a	16,00 ab	15,75abc	15,75abc
8	5,08 a	5,04 a	5,00 a	15,08 ab	14,71 a	14,96 b	14,95 bc	14,96 bc
9	4,17 a	4,17 a	4,17 a	12,08 bc	12,42 ab	12,42 b	12,42 c	12,42 c
10	5,21 a	5,17 a	5,08 a	15,75 ab	15,54 a	15,54 ab	15,54abc	15,54abc
CV	22,11	21,87	21,41	14,74	15,92	14,38	14,42	14,42
F	1,33	1,42	1,29	6,53	4,86	4,34	4,43	4,43
Pr > F	0,2675	0,2297	0,2863	0,0001	0,0006	0,0014	0,0012	0,0012
Média	4,94	4,92	4,90	14,64	14,73	15,95	15,96	15,96
Gral								

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Figura 16 - Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % na ausência de luz por 56 dias de cultura.

Figura 17 - Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de frutose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % na ausência de luz por 56 dias de cultura.

Figura 18 - Cor do calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de glicose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % na ausência de luz por 56 dias de cultura.

Tabela 14 - Resultados da análise de variância médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz nos calos oriundos de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações 0, 2, 4, e 6% na ausência de luz por 56 dias.

TRAT	Épocas (dias)							
	7	14	21	28	35	42	49	56
1	1,00 a	1,00 d	1,00 d	1,00 e	1,00 e	1,00 d	1,00 e	1,00 d
2	1,00 a	3,33 a	3,87 a	4,00 ab	4,04 ab	4,04 ab	4,04 ab	4,67 ab
3	1,00 a	2,37abc	3,75 ab	3,83abc	3,92 ab	3,92 ab	3,92 ab	4,17 abc
4	1,00 a	2,46ab	3,87 a	4,25 a	4,25 a	4,25 a	4,25 a	4,87 ab
5	1,00 a	1,37bcd	2,87abc	3,37abcd	3,58 abc	3,58abc	3,79abc	3,00 a
6	1,00 a	1,83bcd	3,21abc	3,37abcd	3,50abcd	3,50abc	3,50abcd	3,87abc
7	1,00 a	1,33bcd	2,17cd	2,37 d	2,37 d	2,37 c	2,38 d	2,37 cd
8	1,00 a	1,17cd	2,21cd	2,54 cd	2,67 cd	2,67 b	2,67 cd	3,08bcd
9	1,00 a	1,67bcd	2,92abc	3,29abcd	3,21abcd	3,25abc	3,46abcd	3,75abc
10	1,00 a	1,79bcd	2,50bc	2,75bcd	2,87bcd	2,83 bc	2,83bcd	2,83 bcd
CV	0,00	27,19	18,17	17,31	15,62	15,85	15,61	25,57
F	99999,9	8,16	12,49	12,86	15,57	15,18	15,18	9,13
Pr > F	0,0	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média	1,00	1,83	2,84	3,08	3,14	3,14	3,18	3,66
Geral								

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

De um modo geral, para todos os tratamentos, exceto para a testemunha na qual não se formaram raízes, houve intensa formação de raízes do 21º ao 28º dia de cultura. Após esse período, a taxa de formação de raízes foi menos acentuada, sendo retomada após o 49º dia de cultura exceto para frutose e glicose na concentração de 6% (Figuras 19, 20 e 21).

Figura 19 - Formação de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.

Figura 20 - Formação de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de frutose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.

Figura 21 - Formação de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de glicose nas concentrações 0, 2, 4 e 6% na ausência de luz por 56 dias de cultura.

No 56º dia de cultura, diferenças foram observadas entre alguns tratamentos. As médias dos tratamentos foram semelhantes entre si: sacarose (2, 4 e 6%), frutose (2 e 4%) e glicose (4%); sacarose e glicose nas três concentrações e frutose (4%); sacarose (4%), frutose (4 e 6%) e glicose (2, 4 e 6%); testemunha, frutose (6%) e glicose (2 e 6%), (Tabela 14). Os tratamentos que receberam sacarose apresentaram mais de 10 raízes, enquanto que na presença de frutose (2 e 4%) e glicose (2 e 4%) a quantidade de raízes variou de 6 a 10. Para os meios contendo 6% de frutose ou de glicose, o número de raízes foi inferior a 5.

O uso de diferentes fontes e doses de carboidratos objetivava a melhoria da morfogênese do calo amarelo globoso. De um modo geral na literatura sobre a micropropagação e a morfogênese de bambu, sacarose de 2,0 a 3,0% tem sido a fonte mais utilizada de carboidrato (ALEXANDER & RAO, 1968; CHATURVEDI *et al.*, 1993; EL-HASSAN & DEBERGH, 1987; GRUEZO *et al.*, 1987; HUANG e MURASHIGE, 1983; HUANG *et al.*, 1988; HUANG *et al.*, 1989b; NADGAUDA *et al.*, 1990; NADGIR *et al.*, 1984; RAO *et al.*, 1985; SAXENA, 1990; ZAMORA *et al.*, 1988 e ZAMORA *et al.*, 1990).

A frutose e a glicose, independente das concentrações 2, 4 e 6% mostraram-se melhores fontes de carboidrato do que a sacarose na resposta morfogênica, na indução e número de raízes e na indução de centros meristemáticos em calo amarelo globoso de *P. bambusoides*. Estudos recentes têm sugerido que carboidratos podem atuar diferentemente em relação à morfogênese *in vitro* para diversas espécies (ORSHINSKY, 1990; CHU *et al.*, 1990; THENGANE *et al.*, 1994; FUENTES, 1993).

4.2.2. Efeito de diferentes concentrações de BA e ANA na morfogênese de calo amarelo globoso na presença de luz

Para as diferentes concentrações de BA e ANA em calo amarelo globoso foram observadas estruturas semelhantes aos da Figura 45.

4.2.2.1. Efeito de diferentes concentrações baixas de BA e ANA na morfogênese de calo amarelo globoso na presença de luz

Os calos amarelos globosos inoculados no meio MS contendo diferentes concentrações de BA e ANA apresentaram formação de raiz até o 21º dia de cultura.

Na Tabela 15, encontram-se os valores de F para a variável raiz de calo amarelo globoso na presença de BA e ANA.

Tabela 15 - Valores de F para a formação de raiz, em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de BA e ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias.

Causa de variação	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
BA	12,14	12,81	13,85	13,09	13,79
ANA	4,04	5,59	8,45	8,26	8,29
BA x ANA	1,95	1,18	1,51	1,57	1,53
CV	21,47	22,30	20,78	20,79	20,81
F	3,97	3,95	4,96	4,83	4,94
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	1,26	1,38	1,46	1,47	1,48

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

A maior concentração de BA levou à menor formação de raízes. Em qualquer época, sempre houve maior formação de raízes na testemunha do que nos tratamentos que continham BA (Tabela 16, Figura 22).

Não houve diferença significativa para as concentrações de 0,5 e 0,25 mg/l de BA, as quais diferiram da concentração 1,0 mg/l de BA que foi menor aos 21 dias e estabilizando-se até a última época.

O inverso ocorreu para ANA, onde os tratamentos com 0,5 e 1,0 mg/l de ANA induziram a formação de maior número de raízes. A partir do 21º dia, a formação de raiz praticamente se estabilizou. Verificando-se que aos 35 dias não houve diferença significativa entre as concentrações de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/l de ANA; que somente a concentração de 0,25 mg/l de ANA não diferiu da testemunha que apresentou menor quantidade de raiz.

Tabela 16 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz no calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

BA (mg/l)	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
0,0	1,58 a	1,74 a	1,80 a	1,81 a	1,83 a
0,25	1,21 b	1,32 bc	1,43 b	1,45 b	1,45 b
0,50	1,22 b	1,37 b	1,48 b	1,50 b	1,50 b
1,0	1,02 b	1,07 c	1,11 c	1,13 c	1,13 c
F	12,14	12,81	13,85	13,09	13,79
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	1,26	1,38	1,46	1,47	1,48

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C. V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Tabela 17 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz, em calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

ANA (mg/l)	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
0,0	1,14 a	1,18 b	1,19 b	1,20 b	1,20 b
0,25	1,13 a	1,27 ab	1,36 ab	1,40 ab	1,41 ab
0,50	1,38 a	1,52 a	1,62 a	1,63 a	1,65 a
1,0	1,36 a	1,54 a	1,65 a	1,67 a	1,67 a
CV	21,47	22,30	20,78	20,79	20,81
F	4,04	5,59	8,45	8,26	8,29
Pr > F	0,0126	0,0024	0,0001	0,0002	0,0002
Média Geral	1,26	1,38	1,46	1,47	1,48

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Figura 22 - Número de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de concentrações baixas de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

Figura 23 - Número de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias.

Os valores de F para a variável formação de centros meristemáticos de calo amarelo globoso na presença de BA e ANA, encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores de F para a formação de centro meristemático, em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de BA e ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

C. variação	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
BA	9,64	3,00	4,40	7,38	9,62
ANA	8,55	6,27	4,42	3,82	3,10
BA x ANA	3,16	1,61	1,01	0,86	1,05
CV	20,11	24,56	25,50	23,22	22,33
F	4,79	2,66	2,43	3,07	3,52
Pr > F	0,0001	0,0040	0,0081	0,0012	0,0003
Média Geral	1,15	1,30	1,41	1,49	1,53

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Tabela 19 - Valores médios para a formação de centro meristemático, em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

BA (mg/l)	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
0,0	1,42 a	1,49 a	1,66 a	1,79 a	1,86 a
0,25	1,06 b	1,24 b	1,37 ab	1,42 b	1,43 bc
0,50	1,07 b	1,31 ab	1,42 ab	1,53 ab	1,59 ab
1,0	1,04 b	1,17 b	1,20 b	1,23 b	1,24 c
CV	20,11	24,56	25,50	23,22	22,33
F	9,64	3,00	4,40	7,38	9,62
Pr > F	0,0001	0,0403	0,0085	0,0004	0,0001
Média Geral	1,15	1,30	1,41	1,49	1,53

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Tabela 20 - Valores médios para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

ANA (mg/l)	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
0,0	1,02 bc	1,25 ab	1,36 ab	1,41 ab	1,45 ab
0,25	1,00 c	1,06 b	1,18 b	1,30 b	1,36 b
0,50	1,22 ab	1,35 ab	1,48 ab	1,58 ab	1,62 ab
1,0	1,35 a	1,54 a	1,62 a	1,68 a	1,69 a
CV	20,11	24,56	25,50	23,22	22,33
F	8,55	6,27	4,42	3,82	3,10
Pr > F	0,0001	0,0012	0,0083	0,0160	0,0360
Média Geral	1,15	1,30	1,41	1,49	1,53

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Do mesmo modo como para a formação de raízes, não houve interação entre BA e ANA ao nível de 95% de probabilidade. A maior concentração de BA levou à menor formação de centros meristemáticos. Aos 35 dias de cultura, observou-se que não houve diferença significativa entre a testemunha e a concentração 0,5 mg/l de BA (Tabela 19, Figura 24). Para as concentrações de ANA, verificou-se formação de centros meristemáticos em todos os tratamentos. Não houve diferença significativa para as concentrações 1,0 e 0,5 mg/l de ANA em relação a testemunha e das concentrações 0,5 e 0,25 em relação a testemunha (Tabela 12, Figura 25).

Figura 24 - Formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de concentrações baixas de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

Figura 25 - Formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

4.2.2.2. Efeito de diferentes concentrações altas de BA e ANA na morfogênese de calo amarelo globoso na presença de luz

Em todos os tratamentos houve a formação de raízes (Tabela 22) e de centros meristemáticos (Tabela 23). Na Tabela 21 encontram-se os valores de F obtidos para a variável raiz na presença de BA e ANA.

Tabela 21 - Valores de F para a formação de raiz, em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de BA e ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
BA	0,50	1,00	1,04	0,76	0,76
ANA	1,45	7,75	9,43	10,19	10,19
BA x ANA	1,86	2,33	2,06	1,90	1,90
CV	12,37	12,59	13,93	14,47	14,47
F	1,32	2,72	2,83	2,83	2,83
Pr > F	0,2230	0,0033	0,0024	0,0024	0,0024
Média Geral	1,05	1,09	1,11	1,11	1,11

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

C.V. = coeficiente de variação experimental (%).

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Tabela 22 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz em calo oriundos de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

BA(mg/l)	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
0,0	1,07 a	1,07 a	1,11 a	1,12 a	1,12 a
2,0	1,03 a	1,05 a	1,05 a	1,06 a	1,06 a
4,0	1,06 a	1,12 a	1,13 a	1,13 a	1,13 a
8,0	1,08 a	1,11 a	1,13 a	1,13 a	1,13 a
CV	12,37	12,59	13,93	14,47	14,47
F	0,50	1,00	1,04	0,76	0,76
Pr > F	0,6832	0,3998	0,3832	0,5243	0,5243
Média Geral	1,05	1,09	1,11	1,11	1,11

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade; CV = coeficiente de variação experimental (%); F = valor do teste F; Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Tabela 23 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável formação de raiz, em calo oriundos de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas.

ANA (mg/l)	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
0,0	1,01 a	1,01 b	1,01 b	1,01 b	1,01 b
0,25	1,04 a	1,05 b	1,06 b	1,06 b	1,06 b
0,50	1,06 a	1,07 b	1,08 b	1,08 b	1,08 b
1,00	1,10 a	1,23 a	1,28 a	1,30 a	1,30 a
CV	12,37	12,59	13,93	14,47	14,47
F	1,45	7,75	9,43	10,19	10,19
Pr > F	0,2400	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	1,05	1,09	1,11	1,11	1,11

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Aos 35 dias, verificou-se que nas concentrações 2, 4 e 8 mg/l de BA, a formação de raízes não diferiu da testemunha (Tabela 22, Figura 26). A concentração de 1,0 mg/l de ANA induziu maior formação de raízes, diferindo estatisticamente das concentrações 0,25 e 0,50 mg/l de ANA e a testemunha (Tabela 23, Figura 27).

A formação de centro meristemático ocorreu até o 21º dia para todos os tratamentos. Verificando-se que aos 35 dias não houve diferença significativa para as concentrações de 0,0, 2,0 e 4,0 mg/l de BA que diferiram da concentração 8,0 mg/l de BA (Tabela 25, Figura 28).

Com relação a ANA, verificou-se que, aos 35 dias, não diferiram entre si as concentrações 0,0; 0,25 e 1,0 mg/l de ANA; e 0,0; 0,25 e 0,50 mg/l de ANA (Tabela 26, Figura 29).

Figura 26 - Número de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de concentrações altas de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

Figura 27 - Número de raiz em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

Tabela 24 - Valores de F para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de BA e ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

C. de variação	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
BA	1,36	4,86	5,90	5,90	5,90
ANA	0,85	3,07	3,34	3,34	3,34
BA x ANA	0,97	2,52	2,90	2,90	2,90
CV	38,36	19,49	19,69	19,69	19,69
F	0,94	2,84	3,15	3,15	3,15
Pr > F	0,5353	0,0023	0,0009	0,0009	0,0009
Média Geral	1,89	1,26	1,30	1,30	1,30

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Tabela 25 - Valores médios para a formação de centro meristemático, em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

BA (mg/l)	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
0,0	1,08 a	1,11 b	1,14 b	1,14 b	1,14 b
2,0	1,10 a	1,18 ab	1,19 b	1,19 b	1,19 b
4,0	1,19 a	1,33 ab	1,38 ab	1,38 ab	1,38 b
8,0	1,37 a	1,41 a	1,47 a	1,47 a	1,47 a
CV	38,36	19,49	19,69	19,69	19,69
F	1,36	4,86	5,90	5,90	5,90
Pr > F	0,2668	0,0052	0,0017	0,0017	0,0017
Média Geral	1,89	1,26	1,30	1,30	1,30

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Tabela 26 - Valores médios para a formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

ANA (mg/l)	Épocas (dias)				
	7	14	21	28	35
0,0	1,13 a	1,23 a	1,27 ab	1,27 ab	1,27 ab
0,25	1,07 a	1,19 a	1,23 ab	1,23 ab	1,23 ab
0,50	1,31 a	1,20 a	1,22 b	1,22 b	1,22 b
1,0	1,23 a	1,42 a	1,47 a	1,47 a	1,47 a
CV	38,36	19,49	19,69	19,69	19,69
F	0,85	3,07	3,34	3,34	3,34
Pr > F	0,4721	0,0372	0,0273	0,0273	0,0273
Média Geral	1,89	1,26	1,30	1,30	1,30

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Figura 28 - Formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de concentrações altas de BA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias.

Figura 29 - Formação de centro meristemático em calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* na presença de ANA sob fotoperíodo de 16/8 horas por 35 dias de cultura.

Esperava-se que a presença de ANA e de BA na luz aumentasse a resposta morfogênica do calo amarelo globoso, como tem ocorrido para outras espécies e gêneros de bambu (CHAMBERS *et al.*, 1991; GRUEZO *et al.*, 1987; JULLIEN & THAN THANH VAN, 1994; PRUTPONGSE & GAVINLER TVATANA, 1992 e ZAMORA, 1988).

Contudo, ANA favoreceu a indução de raiz; BA aumentou a frequência de centros meristemáticos e a interação ANA x BA não permitiu a regeneração de plantas.

4.3. Efeito de diferentes tratamentos na morfogênese de calo branco friável

4.3.1 Efeito de diferentes fontes e doses de carboidratos em calo branco friável na presença de luz

Os resultados demonstraram que calo branco friável na presença das três fontes de carboidratos apresentaram variação na cor (Tabela 27) e não foram observados formação de raízes e de centros meristemáticos.

Tabela 27 - Resultados da análise de variância, médias obtidas para cada época (dias) para a variável cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0, 2, 4 e 6% fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

Tratamentos	Épocas (dias)						
	7	14	21	28	35	42	49
1	1,87 c	2,50 c	3,87 c	3,62 b	5,37 bc	4,00 b	4,00 b
2	2,62 c	4,87 bc	6,00abc	7,69 a	8,31 ab	9,31 a	9,37 a
3	3,62 abc	5,37abc	6,25abc	7,25 a	7,87 ab	8,81 a	9,81 a
4	2,50 c	4,19 bc	4,19 bc	4,12 b	4,31 c	4,94 b	4,94 a
5	4,94 ab	6,75 ab	7,50 a	7,87 a	8,44 ab	8,50 a	8,56 a
6	5,12 a	8,56 a	8,19 a	9,81 a	9,81 a	9,81 a	9,87 a
7	3,81 abc	7,00 ab	8,12 a	8,56 a	8,56 ab	8,75 a	8,87 a
8	2,62 c	5,62abc	6,56abc	7,62 a	8,19 ab	8,37 a	8,94 a
9	3,06 bc	6,00 ab	6,00abc	7,81 a	8,25 ab	8,31 a	8,62 a
10	2,75 c	5,25 bc	7,12ab	7,87 a	8,25 ab	8,19 a	8,44 a
CV	25,14	24,24	19,88	16,96	18,59	11,60	11,52
F	6,69	5,89	5,39	9,65	5,12	16,95	17,59
Pr > F	0,0001	0,0002	0,0003	0,0001	0,0004	0,0001	0,0001
Média Geral	3,29	5,61	6,38	7,22	7,74	7,90	8,04

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Os tratamentos sacarose (2 e 4%) apresentaram aumento na intensidade da cor no decorrer das épocas. Enquanto, o tratamento sacarose 6% teve sua cor estabilizada dos 14 aos 35 dias, retomando pequeno incremento dos 35 a 42 dias e estabilizando-se até os 49 dias (Figura 30). Os tratamentos que receberam frutose comportaram-se semelhantemente, a cor dos calos aumentou em intensidade até 28 a 35 dias, e estabilizou-se até 49 dias (Figura 31). O comportamento dos tratamentos que receberam glicose tiveram valores de cor mais acentuado até os 28 dias, a partir de então os aumentos na intensidade foram pequenas (Figura 32).

Na Tabela 27, observa-se que aos 49 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação às três fontes de carboidratos e as três concentrações (2, 4 e 6%) que diferiram da testemunha; sendo que a cor do calo correspondeu ao intervalo de amarelo-claro e caramelo-claro a caramelo-escuro. A testemunha apresentou coloração mais clara (amarelo claro e caramelo claro), diferindo dos demais tratamentos os quais por sua vez não diferiram entre si.

Figura 30 - Cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de sacarose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

Figura 31 - Cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de frutose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

Figura 32 - Cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de glicose nas concentrações de 0, 2, 4, e 6 % sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

Esperava-se que com o uso de sacarose, frutose e glicose a 2, 4 e 6% na presença de luz pudesse ocorrer mudanças na resposta morfogênica do calo branco friável de acordo com JULLIEN & TRAN THANH VAN (1994). Isto poderia ocorrer através da seleção de células embriogênicas contidas no calo branco friável. Contudo, independente da fonte de carboidrato e da dose, simplesmente houve intensificação da

cor, esta ficou mais escura e tendeu para o caramelo escuro. Não houve qualquer resposta morfogênica, não induziu raiz e/ou centro meristemático.

4.3.2. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram na morfogênese de calo branco friável

4.3.2.1. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram na morfogênese de calo branco friável

Observou-se que para todos os tratamentos não houve formação de estruturas, verificando-se alterações na cor dos calos. Na Tabela 28 encontram-se os valores de F para a variável cor.

Tabela 28 - Valores de F para avaliação de cor do calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de AgNO_3 e de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram (1,0 mg/l) sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

C. de variação	Épocas (dias)						
	7	14	21	28	35	42	49
AgNO_3	17,83	21,89	23,16	20,85	30,85	48,82	34,67
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,59	17,94	17,17	19,28	38,69	69,24	41,80
$\text{AgNO}_3 \times \text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,50	15,24	19,19	20,73	7,86	62,65	36,55
CV	22,48	22,47	24,96	27,24	17,44	8,64	10,82
F	6,23	11,65	12,68	13,08	15,01	38,98	24,00
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	1,94	2,24	2,61	2,84	4,32	4,77	4,86

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

A partir do 28º dia, as concentrações 5,0 e 10,0 mg/l de nitrato de prata não diferiram entre si. Porém, ambas diferiram da testemunha (Tabela 29, Figura 33). A cor do calo passou do intervalo de branco, amarelo claro para branco a caramelo e amarelo-claro, aos 49 dias.

Tabela 29 - Resultados das análises de variância para cada época (dias) para a variável cor do calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de AgNO_3 e Picloram (1,0 mg/l) sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

AgNO_3 (mg/l)	Épocas (dias)						
	7	14	21	28	35	42	49
0,0	1,45 b	1,65 c	1,83 c	1,87 b	3,12 b	3,97 b	4,00 b
5,0	2,40 a	2,87 a	3,45 a	3,67 a	4,95 a	5,10 a	5,17 a
10,0	2,00 a	2,20 b	2,52 b	3,07 a	5,17 a	5,50 a	5,67 a
CV	22,48	22,47	24,96	27,24	17,44	8,64	10,82
F	17,83	21,89	23,16	20,85	30,85	48,82	34,67
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	1,94	2,24	2,61	2,84	4,32	4,77	4,86

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Figura 33 - Cor do calo oriundo do calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* em relação as concentrações de nitrato de prata na presença de Picloram 1,0 mg/l sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

De um modo geral, a concentração de 7,1 mg/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ proporcionou maiores valores para cor. A testemunha apresentou os menores valores, fato este mais notado a partir do 35º dia (Tabela 30, Figura 34).

Tabela 30 - Resultados das análises de variância para cada época (dias) para a variável cor do calo branco-friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e Picloram 1,0 mg/l sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)	Épocas (dias)						
	7	14	1	28	35	42	49
0,0	1,77 b	1,88 b	2,12 b	2,17 b	3,22 b	4,03 c	4,17 c
3,6	1,92ab	2,08 b	2,45 b	2,80 b	4,72 a	4,97 b	5,00 b
7,1	2,25 a	3,02 a	3,60 a	3,92 a	5,37 a	5,60 a	5,67 a
CV	22,48	22,47	24,96	27,24	17,44	8,64	10,82
F	4,59	17,94	17,17	19,28	38,69	69,24	41,80
Pr > F	0,0189	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	1,94	2,24	2,61	2,84	4,32	4,77	4,86

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Figura 34 - Cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* em relação as concentrações de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de Picloram (1,0 mg/l) sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

4.3.2.2. Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram em calo branco friável

Observou-se que para todos os tratamentos não houve formação de estruturas, verificando-se alterações na cor dos calos. Na Tabela 31 encontram-se os valores de F para a variável cor.

Tabela 31 - Valores de F para a avaliação de cor do calo branco-friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de AgNO_3 e de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

	Épocas (dias)						
C. de variação	7	14	21	28	35	42	49
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,15	4,40	3,01	2,34	2,06	2,93	14,97
$\text{AgNO}_3 \times$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,94	9,21	4,66	4,07	2,27	1,74	1,31
CV	19,23	16,42	13,29	11,83	7,99	6,96	5,59
F	2,41	10,92	7,20	6,66	6,13	8,16	9,09
Pr > F	0,0236	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	4,74	6,57	8,12	9,00	9,00	10,07	10,45

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Tabela 32 - Resultados das análises de variância para cada época (dias) para a variável cor do calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de AgNO_3 e ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

	Épocas (dias)						
AgNO_3 (mg/l)	7	14	21	28	35	42	49
0,0	5,18 a	6,18 b	7,10 b	7,80 b	8,98 b	9,33 b	9,66 c
5,0	4,85 ab	8,53 a	9,80 a	10,67 a	11,03 a	11,37 a	11,43 a
10,0	4,27 b	4,98 c	7,45 b	8,50 b	9,38 b	9,52 b	10,25 b
CV	19,23	16,42	13,29	11,83	7,99	6,96	5,59
F	3,41	42,08	27,77	29,02	28,84	38,63	35,65
Pr > F	0,0456	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	4,74	6,57	8,12	9,00	9,00	10,07	10,45

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

A partir do 14º dia de cultura, a concentração de 5 mg/l de AgNO_3 foi superior as outras duas concentrações. Do 21º dia de cultura a concentração 0,0 mg/l não diferiu da concentração 10,0 de AgNO_3 , sendo que no 49º dia de cultura pode-se notar diferença entre estas (Tabela 32, Figura 35)

Figura 35 - Cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* em relação as concentrações de nitrato de prata na ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

Para o $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, não houve diferença entre as concentrações até o 42º dia. Apenas na última época, aos 49 dias a concentração de 3,6 mg/l diferiu das demais (Tabela 33, Figura 36). Aos 49 dias, verificou-se que a cor do calo situou-se no intervalo de caramelo a caramelo-escuro.

Tabela 33 - Resultados das análises de variância para cada época (dias) para a variável cor do calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* na presença de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ausência Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias.

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)	Épocas (dias)						
	7	14	21	28	35	42	49
0,0	4,75 a	6,00 b	7,63 a	8,58 a	9,67 a	10,28 a	10,87 a
3,6	4,83 a	7,17 a	8,60 a	9,12 a	9,60 a	9,72 a	9,78 b
7,1	4,65 a	6,53 ab	8,12 a	9,35 a	10,13 a	10,22 a	10,70 a
CV	19,23	16,42	13,29	11,83	7,99	6,96	5,59
F	0,15	4,40	3,01	2,34	2,06	2,93	14,97
Pr > F	0,8598	0,0205	0,0635	0,1126	0,1437	0,0679	0,0001
Média Geral	4,74	6,57	8,12	9,00	9,00	10,07	10,45

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Figura 36 - Cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* em relação as concentrações de cloreto de cobalto na ausência de Picloram sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

O uso de inibidores de etileno para melhorar a resposta morfogênica tem sido na prática comum na regulação da morfogênese, HUXTER (1979), SONGSTAD *et al* (1988), WILLIAMS *et al.* (1990), FUENTES (1993) e outros. A produção de etileno está correlacionada com a taxa de crescimento e a estresses. O uso de inibidores ou antagonistas de etileno levaria a redução ou paralização das células em crescimento ou determinados para o crescimento e não para a diferenciação, o que

favoreceria as células determinadas para a diferenciação e consequentemente melhoria da resposta morfogênica.

Os resultados dos testes revelaram que na presença do Picloram os calos cresceram e apresentaram coloração mais claros; na ausência de Picloram, AgNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ independente da concentração, levou a redução do crescimento dos calos e ao escurecimento da cor, de branco tendendo para caramelo escuro. Não houve qualquer resposta morfogênica no período observado (Figuras 37 e 38).

Figura 37 - Efeito das diferentes concentrações de AgNO₃ e CoCl₂.6H₂O na presença de Picloram em calo branco friável aos 49 dias de cultura.

Figura 38 - Efeito das diferentes concentrações de AgNO₃ e CoCl₂.6H₂O na ausência de Picloram em calo branco friável aos 49 dias de cultura.

4.3.3. Efeito da glutamina e da caseína hidrolisada na presença e ausência de ácido ascórbico

Os resultados obtidos com os tratamentos glutamina e caseína hidrolisada, BA e Picloram na presença e ausência de ácido ascórbico encontram-se na Tabela 34.

Tabela 34 - Resultados da análise de variância para cor do calo oriundo de calo branco oriundo de *Phyllostachys bambusoides* na presença e ausência de ácido ascórbico sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

TRAT	Épocas (dias)						
	7	14	21	28	35	42	49
T1	5,00 b	5,00 c	6,00 c	6,00 b	7,00 bc	8,13 c	8,62 bc
T2	5,62 b	7,00 b	8,54 b	9,08 a	9,12 ab	10,17 ab	10,17 ab
T3	8,21 a	8,92 a	9,92 ab	10,08 a	10,50 a	11,08 a	11,75 a
T4	4,62 b	4,96 c	5,21 c	5,37 bc	5,71 c	6,71 c	7,46 c
T5	1,58 c	1,25 d	1,25 d	1,54 d	1,29 d	1,29 d	1,29 d
T6	8,54 a	9,04 a	10,71 a	10,96 a	10,96 a	11,83 a	11,96 a
T7	8,46 a	8,51 ab	9,29 ab	10,17 a	10,62 a	11,12 a	11,17 a
T8	1,04 c	1,04 d	1,29 d	1,29 d	1,42 d	1,46 d	1,46 d
T9	1,42 c	1,54 d	2,79 d	3,54 cd	5,17 c	7,37 c	7,38 c
CV	16,56	12,63	14,12	15,82	16,83	13,89	13,32
F	56,30	100,41	74,06	54,94	42,78	55,96	59,91
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Média Geral	4,94	5,25	6,11	6,45	6,86	7,68	7,92

Nota: Médias seguidas por alguma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CV = coeficiente de variação experimental (%)

F = valor do teste F.

Pr > F = probabilidade da tabela do teste F.

Os tratamentos que receberam caseína hidrolisada mais Picloram na presença de ácido ascórbico e glutamina mais Picloram na ausência de ácido ascórbico apresentaram colorações menos intensas, o que ficou mais evidente a partir do 35º dia. Os tratamentos que apresentaram maiores escurecimentos foram os tratamentos com caseína hidrolisada mais BA na presença e na ausência de ácido ascórbico, glutamina mais BA na presença e ausência de ácido ascórbico. Porém, o tratamento glutamina mais BA não diferiu estatisticamente do grupo intermediário formado pela testemunha e pelo tratamento contendo caseína hidrolisada mais Picloram, que apresentaram coloração não tão intensa (Tabela 34, Figura 39 e 40).

Figura 39 - Cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* em relação à presença de ácido ascórbico sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

Figura 40 - Cor do calo oriundo de calo branco friável de *Phyllostachys bambusoides* em relação à ausência de ácido ascórbico sob fotoperíodo de 16/8 horas por 49 dias de cultura.

De modo geral, o uso de fontes orgânicas de nitrogênio, como caseína hidrolisada, glutamina e aminoácidos tem sido utilizadas no controle da morfogênese de plantas.

Na cultura de tecido de bambu, a caseína hidrolisada tem sido mais frequentemente usada nas concentrações de 200-500 mg/l para a obtenção de embriogênese somática e regeneração de plantas *in vitro* (CHATURVEDI *et al.*, 1993; JULLIEN & TRAN THANH VAN, 1994; HUANG *et al.*, 1988; PRUTPONGSE &

GRAVINLERTVATANA, 1992; WOODS *et al.*, (1992); YEH & CHANG, 1986a; YEH & CHANG, 1986b)

Os resultados não revelaram qualquer resposta morfológica, na Figura 41 observa-se o aspecto dos calos aos 49 dias de cultura.

4.4. Avaliação do crescimento de calo amarelo globoso *in vitro*

A avaliação do crescimento do calo baseou-se na determinação do peso da matéria fresca (PMF), peso da matéria seca (PMS), matéria seca produzida (MSP) e taxa de crescimento relativo (R%) os resultados encontram-se na Tabela 35, e a representação gráfica nas Figuras 42, 43 e 44.

Figura 41 - Efeito da glutamina, caseína hidrolisada, BA e Picloram na presença e ausência de ácido ascórbico aos 49 dias de cultura.

Tabela 35 - Avaliação do crescimento de calo oriundo de calo amarelo globoso para peso de matéria fresca (PMF), peso de matéria seca (PMS), matéria seca produzida (MSP) e taxa de crescimento relativo (R%) por época.

Épocas (dias)	PMF (mg)	PMS (mg)	MSP (%)	R (%)
0	110,27	8,21	7,44	0,00
7	128,78	15,51	12,22	11,27
14	146,12	14,27	9,69	- 1,53
21	211,28	24,62	11,80	8,24
28	226,6	26,31	11,94	0,9
35	274,15	34,37	11,97	3,7
42	247,23	40,00	11,72	2,29

Figura 42 - Peso da matéria fresca (PMF) e peso da matéria seca (PMS) de calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* no decorrer de 42 dias de cultura.

Figura 43 - Porcentagem de matéria seca produzida (MSP%) de calo oriundo de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* no decorrer de 42 dias de cultura.

Figura 44 - Taxa de crescimento relativo (R %) de calo oriundo do tipo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* no decorrer de 42 dias de cultura.

Análise da avaliação de PMF, PMS, MSP e R% pode revelar que o MS é um meio de cultura não adequado para *P. bambusoides*, devido às drásticas reduções ocorridas no 14º e 28º dia. Essas alterações podem ter ocorrido devido a desequilíbrio nas relações, na disponibilidade de nutrientes minerais e variações no pH do meio, (CORREIA, 1993; INGESTAD, 1991). Contudo, pode-se observar que a taxa de

crescimento relativo máxima ocorreu no 7º dia e que houve estabilização do crescimento a partir do 21º dia de cultura.

Seria indicado o ajuste de um meio de cultura adequado para que o *P. bambusoides* apresentava taxas de crescimentos relativos máximos e crescimento ótimo e máximo segundo INGESTAD (1991) e CORREIA (1993).

Os dados indicam que para a manutenção e a multiplicação de calo amarelo globoso, as transferências deveriam ser feitas entre o 14º e o 21º dia de cultura.

4.5. Análise histológica

Os calos amarelos globosos mantidos em meio MS contendo 1,0 mg de Picloram quando cultivados na ausência de Picloram com carboidratos e/ou com BA e ANA apresentaram estruturas semelhantes ao da Figura 45.

Figura 45 - Aspectos do calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* apresentando: a) centros meristemáticos e b) raízes.

As análises histológicas em calos que receberam sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0% mostraram a ocorrência de órgãos diferenciados como centros meristemáticos, folhas, raízes em grande quantidade e embrião somático endógeno. Nas Figuras 46 e Figura 47, pode-se observar a polarização das regiões distal (a) e proximal (b) conectadas pelo cilindro vascular (c).

Figura 46 - Corte longitudinal de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* mostrando estruturas com características embriônicas: a) meristema apical, b) meristema radicular e c) cilindro central (procâmbio) obtido em meio de cultura MS na ausência de Picloram (|____| 0,09cm).

Figura 47 - Corte longitudinal de calo amarelo globoso de *Phyllostachys bambusoides* mostrando estruturas com características embriônicas (glicose na concentração 4%) a) meristema apical, b) meristema radicular e c) cilindro central (procâmbio) obtido em meio de cultura MS na ausência de Picloram (|____| 0,09cm).

Na Figura 48, pode-se observar em corte transversal a estrutura de duas raízes normais (a), de uma raiz anormal (b), presença de centro meristemático (c), células pequenas isodiamétricas com alta RNP (d) e células grandes (e).

Figura 48 - Corte transversal de raiz. a) raiz CT normal, b) raiz CT anormal, c) centro meristemático, d) células pequenas (alta RNP) e e) células grandes (|____| 0,09cm).

A possível formação inicial de embrião somático que teve o desenvolvimento paralizado e modificando-se em raízes pode ser observada na Figura 49.

Figura 49 - Corte transversal de calo onde se observa a formação de uma estrutura embriônica anormal com intensa ramificação de raízes e centros meristemáticos: a) estrutura embriônica anormal, b) raízes em formação, c) centros meristemáticos ([_____] 0,23cm).

A Figura 50 mostra a embriogênese somática secundária (b), a presença de chanfradura típica (a) e como descrito por CUTTER, (1988). Por outro lado verifica-se intensa formação e desorganização estrutural de raízes na Figura 51

Figura 50 - Corte transversal de calo *Phyllostachys bambusoides* mostrando estruturas embriônicas primárias e embriônicas secundárias. a) estrutura embriônica mostrando a chanfradura dando origem à formação do escutelo caracterizando a formação de embrião. b) embriogênese secundária (|____| 0,23 cm).

Figura 51 - Corte transversal de raiz normal (a) e anormal mostrando a desorganização estrutural (b). (|____| 0,23 cm).

Na Figura 52, verifica-se a formação de folha via organogênese, apresentando estrutura achatada dorsiventral com mesófilo diferenciado em parenquima clorofilano e feixes vasculares contidos por epiderme. A Figura 53 o detalhe do mesófito evidenciando cloroplastos.

Figura 52 - Corte longitudinal de uma neoformação foliar: a) estrutura achatada dorsiventralmente, b) mesófilo diferenciado em parênquima clorofilano e c) feixe vascular (|____| 0,09cm).

Figura 53 - Detalhe do mesófilo evidenciando os cloroplastos: a) cloroplastos (|____| 0,23cm).

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos sobre o estabelecimento da cultura, indução, manutenção e crescimento de calos, e controle da morfogênese de *Phyllostachys bambusoides* e as condições em que foi conduzido o presente trabalho permitiram concluir:

1. O uso de Picloram permitiu a obtenção de calo branco friável e amarelo globoso a partir de explantes secundários de bainha foliar em meio de cultura MS.

2. O uso de sacarose, frutose e glicose a 2, 4 e 6% e de BA (0,0-8,0 mg/l) e ANA (0,0-1,0 mg/l) na ausência de Picloram permitiu a obtenção de raízes, centros meristemáticos, folhas e embriões somáticos a partir do calo amarelo globoso.

3. O uso de sacarose, frutose, glicose, AgNO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, caseína hidrolizada, glutamina e ácido ascórbico não mostrou resposta morfogênica em calo branco friável.

4. O meio de cultura MS não mostrou ser o mais adequado para o crescimento máximo do calo amarelo globoso de *P. bambusoides*.

5. A análise histológica revelou que houve excesso de tempo e/ou estímulo na indução da morfogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, F.U. & DAS, S. Flowering in *Bambusa vulgaris* Schrad. **Indian Forester**, Dehra Dun, **112**:275-6, 1986.
- ALEXANDER, M.P.; & RAO, T.C.R. *In vitro* culture of bamboo embryos. **Current Science**, Bangalore, **37**(14):415, 1968.
- ALMEIDA, M. de. Emprego da cultura *in vitro* para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.). Palmae. São Paulo, 1994. 79 p. (Doutorado - Instituto de Biociências/USP).
- AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; SALGADO, A.L.B.; TOMAZELLO, FILHO, M. Densidade básica do colmo e fibras celulósicas em progênies de *Bambusa tuldooides* MUNRO. **Bragantia**, Campinas, **47**(2):239-46, 1988.
- AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; NAGAI, V. Celulose de bambu. In: CONVENÇÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO TÉCNICA BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL, 5., São Paulo, 1972. **Anais**. São Paulo, ABCP, 1972. .p.195-201.
- AZZINI, A.; SALGADO, A.L.B.; TEIXEIRA, J.P.F.; MORAES, R.M. Obtenção de amido a partir do colmo de bambu. **Bragantia**, Campinas, **40**(7):211-16, 1981.
- AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; NAGAI, V. Densidade básica e dimensões das fibras em bambus do gênero *Guadua*. **Bragantia**, Campinas, **36**:I-V, 1977.(Nota, 1).
- AZZINI, A.; ARRUDA, M.C.Q.; CIARAMELLO, D.; SALGADO, A.L.B.; TOMAZELLO FILHO, M. Produção conjunta de fibras celulósicas e etanol a partir do bambu. **Bragantia**, Campinas, **46**(1): 17-25, 1987.
- BRITO, J.O.; TOMAZELLO FILHO, M.; SALGADO, A.L.B. Produção e caracterização do carvão vegetal de espécies e variedades de bambu. **IPEF**, Piracicaba, **36**: 13-7, 1987.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 37-70.

- CHAMBERS, S.M.; HEUCH, J.H.; PIRRIE, A. Micropropagation and *in vitro* flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **27**(1): 45-8, 1991.
- CHATURVEDI, H.C.; SHARMA, M.; SHARMA, A.K. In vitro regeneration of *Dendrocalamus strictus* Nees through nodal segments taken from field-grown culms. **Plant Science**, Limerick, **91**:97-101, 1993.
- CHEN, M.Y. Gigant timber Bamboo in Alabama. *Journal of Forestry*, Washington, **71**(12):777, 1973. Apud **Bamboos**, Farnham Royal, (F15):5, 1973-1977. (Resumo).
- CHI, G.L. & PUA, E.C. Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (chinese cabbage) *in vitro*. **Plant Science**, Limerick. **64**:243-50. 1989.
- CHU, C.C.; HILL, R.D.; BRULE-BABEL, A.L. High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. **Plant Science**, Limerick. **66**:255-62, 1990.
- CORRÊA, A.A.; LUZ, C.N.R. & FRAZÃO, F.J.L. Características papeleiras dos bambus da região do Acre da Amazônia. In: CONGRESSO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL, 10, São Paulo, p.97-112, 1977.
- CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido. Piracicaba, 1993. 113 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CUTTER, E.G. **Anatomia Vegetal**: Experimentos e Interpretação - Parte II: Órgãos. Trad. G.V.M.C. Catenas, São Paulo, Roca, 1987. 336 p.
- EL-HASSAN, A.A. & DEBERGH, P. Embryogenesis and plantlet development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (young) McClure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **10**(1):73-7, 1987.
- FAO Bamboo forest. **Tropical Silviculture**, Rome, **1**(13):151-62, 1958.
- FERREIRA, V.L.D.; AZZINI, A.; FIGUEREDO, I.B.; SALGADO, A.L.B.; BARBIERI, M.K. Avaliação do broto de espécies de bambu na alimentação humana. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **16**: 23-6, 1986.
- FILGUEIRAS, T.S. A floração dos bambus e seu impacto ecológico. **Eugeniana**, Nova Friburgo, **15**: 1-8, 1988.

- FUENTES, S.R.L. Efeito de um inibidor do etileno (nitrato de prata) e diferentes fontes de carbono sobre a embiogênese somática do cafeeiro (*Coffea canephora*). Londrina, 1993. 77p. (Mestrado - Universidade Estadual de Londrina).
- GOMIDE, J.L. Estudos sobre a constituição química do *Bambusa vulgaris*, visando a produção de polpa celulósica. **O Papel**, São Paulo, **47**(10): 64-8, 1986.
- GOMIDE, J.L.; COLODETTE, J.L.; OLIVEIRA, R.C. Estudos das potencialidades do *Bambusa vulgaris* para produção de papéis do tipo kraft. **O Papel**, São Paulo, **43**(7):38-42, 1982.
- GOMIDE, J.L.; VIVONE, R.R.; GALA, P.A.M. Bambu: uma alternativa para o déficit de celulose de fibra longa no Brasil? In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL DA ABCP, 21., São Paulo, 1988. **Anais**. São Paulo, ABCO, 1988. p.1-16
- GONÇALVES, A, N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake *in vitro*. Piracicaba, 1982. 97 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GRAÇA, V.L. **Bambu**; técnicas para o cultivo e suas aplicações. São Paulo, Icone, 1988. 124p.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., (eds). **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-200.
- GRUEZO, S.S.; DAMASCO, O.P.; ZAMORA, A.B. On going research on the tissue culture of bamboo. **The Philippine Journal of Crop Science**, Laguna, **12**(1): 42, 1987.
- HIDALGO LOPES, O. **Bambu**; su cultivo y aplicaciones en: fabricacion de papel construcción arquitetura ingenieira. Cali, Estudos Técnicos Colombianos, 1974. 318p.
- HUANG, L.C. Protoplast preparation from suspension cultured bamboo cells *Bambusa multiplex* and *Bambusa oldhamii*. **In vitro Cellular & Development Biology**, Rockville, **24**(3, pt.2): 33A, 1988.
- HUANG, L.C.; CHEN, W.L.; HUANG, B.L. Tissue culture investigations of bamboo. II. Liquid suspension cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa* cells. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, **29**(3):177-82, 1988.
- HUANG, L.C.; CHEN, W.L.; HUANG, B.L. Tissue culture investigation of bamboo. III. A method for viable protoplast isolation from *Bambusa* cells of liquid suspension culture. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, **30**(1):49-57, 1989a.

- HUANG, L.C.; HUANG, B.L.; CHENG, W.L. Tissue culture investigation of bamboo. IV. Organogenesis leading to adventitious shoot and plants in excised shoot apices. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, **29**(3):307-15, 1989 b.
- HUANG, L.C.; HUANG, B.L.; CHEN, W.L. Tissue culture investigation of bamboo. V. Recovery of callus from protoplasts of suspension-cultured *Bambusa* cells. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, **31**(1):29-34, 1990.
- HUANG, L.C. & MURASHIGE, T. Tissue culture investigation of bamboo. I. Callus cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, **24**(1):31-52, 1983.
- HUNT, R. Concepts in plant growth analysis. In: ----- **Plant growth curves; the functional approach to plant growth analysis**. London, Edward Arnold, 1982. p. 14-46.
- HUXTER, T.J.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Ethylene production by tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **46**:374-80, 1979.
- INGESTAT, T. Nutrition and growth of forest trees. **Tappi Journal**, Uppsala, 55-62, 1991.
- JULLIEN, F & TRAN THANH VAN, K. Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* "Golden goddess". **Plant Science**, Limerick, **98**: 199-207, 1994.
- KINNERSLEY, A.M. & HENDERSON, W.E. Alternative carbohydrates promote differentiation of plant cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **15**: 3-16, 1988.
- McCLURE, F.A. **The bamboo; a fresh perspective**. Cambridge, Harvard University Press, 1966. 347 p.
- MEDINA, J.C. & CIARAMELLO, D. Dimensões das fibras em bambusáceas. **Bragantia**, Campinas, **19**: CLXV-CLXXI, 1962. (Nota, 33).
- MEHTA, U.I.; RAO, V.R.; RAM, H.Y.M. Somatic embryogenesis in bamboo. In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE AND CELL CULTURE. 5., Tokyo, 1982. **Proceedings**, p.109-10.
- MENEZES, T.J.B. & AZZINI, A. O bambu, uma nova matéria-prima, para produção de etanol. **Boletim do ITAL**, Campinas, **18**(2): 145-54, 1981.
- MONTALVÃO FILHO, A.; GOMIDE, J.L.; CONDÉ, A.R. Variabilidade da constituição química e das características dimensionais das fibras do *Bambusa vulgaris*. **Revista Árvore**, Viçosa, **8**(1):12-27, 1984.

- MUKUNTHAKUMAR, S. & MATHUR, J. Artificial seed in male bamboo *Dendrocalamus strictus* L. **Plant Science**, Limerick, **87**: 109-13, 1992.
- MURASHIGE, T & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **15**: 475-97, 1962.
- NADGAUDA, R.S. ; PARASHARAMI, V.A.; MASCARENHAS, A.F. Precocious flowering and seeding behaviour in tissue cultured bamboo. **Nature**, London, **344**(6264):335-6, 1990.
- NADGIR, A.L.; PHADKE, C.H.; GUPTA, P.K.; PARSHARAMI, V.A.; NAIR, S.; MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of bamboo by tissue culture. **Silvae Genetica**, Frankfurt, **33**(6):219-23, 1984.
- ORSHINSKY, B.R.; MCGREGOR, L.J.; JOHNSON, G.I.E.; HUCL, P.; KARTHA, K.K. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **9**:365-9, 1990.
- PRUTPONGSE, P. & GAVINLERTVATANA, P. *In vitro* micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. **Hortscience**, St. Joseph, **27**(5):453-4, 1992.
- PURNAUSER, L.; MEDGYESY, P.; CZAKO, M.; DIX, P.J.; MARTON, L. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana glauca* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **6**:1-4, 1987.
- RAO, I.U.; RAO, I.V.R.; NARANG, V. Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **4**(4):191-4, 1985.
- ROUSTAN, J.P.; LATCHE, A.; FALLOT, J. Stimulation of *Daucus carota* a somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **8**:182-5, 1989.
- SALGADO, A.L.B.; CIARAMELLO, D.; AZZINI, A. Bambu como reforço estrutural em moirões de cerca. **O Agrônomo**, Campinas, **38**(2):127-37, 1986.
- SALGADO, A.L.B.; AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; MACEDO, E.L.; SALGADO, A.L. Instruções técnicas sobre o bambu. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, **(143)**:1-43, 1992.
- SAXENA, S. *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb) through shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **9**(8):431-4, 1990.

- SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 227-49.
- SCOTT, P. & LYNE, R. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **36**:129-3, 1994.
- SODERSTROM, T.R. & CALDERÓN, C.E. A commentary on the bamboos (Poaceae: *Bambusoideae*). **Biotropica**, St. Louis, **11**(3):161-72, 1979.
- SONGSTAD, D.D.; ARMSTRONG, C.L.; PETERSEN, W.L. AgNO₃ increases type II callus production from immature embryos of maize inbred b73 and its derivatives. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **9**:699-702, 1991.
- SONGSTAD, D.D.; DUNCAN, D.R.; WIDHOLM, M. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **7**:262-5, 1988.
- STRICKLAND, S.G.; NICHOL, J.W.; MCCALL, C.M.; STUART, D.A. Effect of carbohydrate source on alfafa somatic embryogenesis. **Plant Science**, Limerick, **48**:113-21, 1987.
- SUNSET new western garden book. Menlo Park, Lane Publishing, 1985. 12 p.
- THENGANE, S.R.; JOSHI, M.S.; KHUSPE, S.S.; MASCARENHAS, A.E. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction plant regeneration. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **13**: 222-6, 1994.
- TOMAZELLO FILHO, M. & AZZINI, A. Estrutura anatômica, dimensões das fibras e densidade básica de colmos de *Bambusa vulgaris* Schrad. **IPEF**, Piracicaba, **36**:43-50, 1987.
- TOMAZELLO FILHO, M. & AZZINI, A. Variação e estrutura dos colmos de bambu (*Bambusa vulgaris* Schrad). **O Papel**, São Paulo, **49**(12):155-61, 1988.
- TREMBLAY, L. & TREMBLAY, F.M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **27**: 95-103, 1991.
- TSAY, H.S.; YEH, C.C.; HSU, J.Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture of bamboo (*Sinocalamus latiflora* (Munro) McClure). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **9**(7):349-51, 1990.

- UCHIMURA, E. Ecological studies on cultivation of tropical bamboo forest in the Philippines. **Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute**, Tsukuba, (301):79-118, 1978.
- UEDA, K. Studies on the physiology of bamboo with reference to practical application. **Bulletin of the Kyoto University Forests**, Kyoto, 30:1-167, 1960.
- VAIN, J.; FLAMENT, P.; SOUDAIN, P. Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 135:537-40, 1989a.
- VAIN, J.; YEAN, J.; FLAMENT, P. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 18:143-51, 1989b.
- VELA GÁLVEZ, L.; BOYÁS DELGADO, J.; GARCÍA SÁNCHEZ, F. Los bambues. **Boletín Técnico INIF**, Mexico City, (50):1-38, 1982.
- WANN, S.R.; JOHNSON, M.A.; NOLAND, T.L.; CARLSON, J.A. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, 6:39-42, 1987.
- WILLIAMS, J. PINK, D.A.C.; BIDDINGTON, N.L. Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. gemnifera. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 21:61-6, 1990.
- WOODS, S.H.; PHILLIPS, G.C.; WOODS, J.E.; COLLINS, G.B. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo explants in mexican weeping bamboo, *Oateata acuminata aztecorum*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, 11:257-61, 1992.
- YEH, M.L. & CHANG, W.C. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhami* Munro). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 73(2):161-3, 1986a.
- YEH, M.L. & CHANG, W.C. Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescence callus of *Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, 5(6):409-11, 1986b.
- YEH, M.L. & CHANG, W.C. Plant regeneration via somatic embryogenesis in mature embryo-derived callus culture of *Sinocalamus latiflora* (Munro) McClure. **Plant Science**, Limerick, 51(1):93-6, 1987.

- YU, X. & REED, B.M. Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, **12**:256-9, 1993.
- ZAMORA, A.B. & GRUEZO, S.S. Embryo culture of bambu (*Dendrocalamus strictus* Nees). **Philippine Agriculturist**, Los Baños, **73**(2):199-206, 1990.
- ZAMORA, A.B.; GRUEZO, S.S.; DAMASCO, O.P. Callus induction and plant regeneration from internode tissues of bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* cv. machiku). **Philippine Agriculturist**, Los Baños, **71**(1):76-84, 1988.