

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
ANDREI CHUDZIKIEWICZ

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro E MULTIPLICAÇÃO
IN VITRO DE *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño**

Curitibanos

2019

ANDREI CHUDZIKIEWICZ

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro E MULTIPLICAÇÃO
IN VITRO DE *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño**

Trabalho de Conclusão do Curso de graduação em Agronomia do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.
Orientador: Prof. Dr. Lírío Luiz Dal Vesco

Curitibanos

2019

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

Chudzikiewicz, Andrei

ESTABELECIMENTO IN VITRO DE *Bambusa oldhamii*
Munro E MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE *Guadua chacoensis*
(Rojas) Londoño / Andrei Chudzikiewicz ;
orientador, Lírio Luiz Dal Vesco, 2019.
40 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos,
2019.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Agronomia. 3. Biotecnologia. 4.
Micropropagação. 5. Bambu. I. Dal Vesco, Lírio Luiz.
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2176 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

ANDREI CHUDZIKIEWICZ

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Bambusa oldhamii* Munro E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 28 de junho de 2019.

Prof. Dra. Elis Borcioni
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lirio Luiz Dal Vesco
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Adriana Terumi Itako
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

O bambu é uma gramínea perene de rápido crescimento e alta resiliência. Usada na construção civil, fabricação de móveis, alimentação humana e animal, dentre outras aplicações com grande potencial agrícola. É uma planta propagada por estacas ou desdobramento de touceiras e é restrito o número de brotos gerados pelo método de multiplicação convencional, sendo assim, faz-se necessário o uso de alternativas, como por exemplo, as técnicas de cultura de tecidos para produção de grande número de mudas. Para tanto, é necessário estabelecer protocolos para introdução, estabelecimento e proliferação de explantes. Este trabalho teve como objetivo testar diferentes métodos de desinfestação de gemas na introdução *in vitro* *Bambusa. oldhamii* e avaliar o efeito do uso de fitorreguladores na multiplicação *in vitro* de *Guadua chacoensis*. Gemas de colmos jovens de *B. oldhamii* foram submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação utilizando um esquema fatorial de 2x3 com seis tratamentos, onde se testou diferentes doses e tempos de exposição em álcool 70%; Hipoclorito de sódio-NaClO (0,5 e 1,5%); fungicidas: Metiltiofan (0,6 g L⁻¹) + Captan (0,6 g L⁻¹). Em seguida, após a excisão do tecido matriz e exposição das gemas, os explantes foram inoculados em meio de cultura MS sem ou com carvão ativado (1,5 g L⁻¹). Posteriormente as gemas que não apresentaram contaminação foram subcultivadas em meio de cultura MS-Murashige e Skoog com presença de 5,0 µM de 6-benzilaminopurina-BAP com ou sem *plant preservative mixture*-PPM (2 ml L⁻¹). Para a multiplicação do *G. chacoensis* foi utilizado um esquema fatorial de 2x3 com seis tratamentos com duas doses de ácido 1-naftaleno acético-ANA (0,0 e 0,1 µM) combinadas com três doses de Thidiazuron-TDZ (0,0; 0,1; 1,0 µM) suplementados ao meio de cultura MS. Os resultados de todos os tratamentos não foram estatisticamente diferentes. O uso de carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de *B. oldhamii* não promoveu redução na oxidação. Gemas de *B. oldhamii* desinfestadas e estabelecidas em meio de cultura MS com ou sem carvão ativado, quando subcultivadas em novos meios e suplementados com 5,0 µM de BAP, com ou sem a adição de PPM resultam na indução e alongamento dos brotos. A suplementação de TDZ ao meio de cultura MS independente da concentração e combinação com ANA, para a multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis* não interferiram na formação de novas estruturas morfológicas para o período de 29 dias de cultivo.

Palavras-chave: Bambu. Cultivo de tecidos. Agentes de desinfestação. Micropropagação.

ABSTRACT

Bamboo is a perennial grass of fast growth and high resilience. Used in construction, furniture manufacturing, human and animal feeding, among other applications with great agricultural potential. It is a plant propagated by cuttings or unfolding of clumps and the number of shoots generated by the conventional multiplication method is restricted, so it is necessary to use alternatives such as tissue culture techniques to produce large number of plantlets. However, it is necessary to establish protocols for the introduction, establishment and proliferation of explants. This work aimed to test different methods of bud disinfection in the *in vitro* introduction *Bambusa oldhamii* and to evaluate the effect of the use of plant regulators in the *in vitro* multiplication of *Guadua chacoensis*. Buds extracted from young sprouts of *B. oldhamii* were submitted to different disinfection treatments using a 2x3 factorial scheme with six treatments, where different doses and times of exposure in 70% alcohol were tested; NaClO (0.5 and 1.5%); fungicides: Methylthiophan (0.6 g L⁻¹) + Captan (0.6 g L⁻¹). Then, after excision of the matrix tissue and exposure of the buds, the explants were inoculated in MS culture medium without or with activated charcoal (1.5 g L⁻¹). Subsequently, the non-contaminated bud was subcultured in MS-Murashige and Skoog culture media containing 5.0 µM 6-benzylaminopurine-BAP with or without plant preservative mixture-PPM (2 ml L⁻¹). For the multiplication of *G. chacoensis*, a 2x3 factorial scheme was used with six treatments with two doses of 1-naphthalene acetic acid-NAA (0.0 and 0.1 µM) combined with three doses of Thidiazuron-TDZ (0.0, 0.1, 1.0 µM) supplemented with the MS culture medium. The results of all treatments were not statistically different. The use and activated charcoal in the *in vitro* establishment of *B. oldhamii* did not promote reduction in the oxidation. *B. oldhamii* bud disinfested and established in MS medium with or without activated carbon, when subcultured in new media and supplemented with 5.0 µM of BAP, with or without the addition of PPM result in induction and elongation of shoots. TDZ supplementation to the MS culture medium independent of concentration and combination with ANA for the *in vitro* multiplication of *G. chacoensis* did not interfere in the formation of new morphological structures for the period of 29 days of cultivation.

Keywords: Bamboo. Tissue culture. Disinfection agent. Micropropagation.

LISTA DE ABREVIATURAS

μM – micromolar

ABA - ácido abscísico

ANA – Ácido 1-naftaleno-acético

ANOVA – análise de variância

AUX - auxinas

BAP – 6-benzilaminopurina

CKs - citocininas

cm – centímetro

ETL - etileno

Gas - giberelinas

mg - miligrama

mm – milímetros

MS- Murashige; Skoog

NaOCl – hipoclorito de sódio

PPM - plant preservative mixture

TDZ - thidiazuron

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	JUSTIFICATIVA	10
1.2	OBJETIVOS	10
1.2.1	Objetivo Geral	10
1.2.2	Objetivos específicos.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	BAMBU, IMPORTANTE CONTRIBUINTE ECONÔMICO E AMBIENTAL	11
2.2	MORFOLOGIA.....	14
2.3	PROPAGAÇÃO VEGETATIVA.....	15
2.3.1	Micropropagação de plantas	16
2.4	ASSEPSIA E DESINFESTAÇÃO	16
2.5	ANTIOXIDANTES.....	18
2.6	HORMÔNIOS VEGETAIS.....	18
2.6.1	Auxinas	19
2.6.2	Giberelinas	20
2.6.3	Citocininas.....	20
2.6.4	Etileno.....	21
2.6.5	Ácido abscísico	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	LOCALIZAÇÃO E ORIGEM DOS EXPLANTES	22
3.2	INTRODUÇÃO E ESTABELECIMENTO IN VITRO DE <i>B. oldhamii</i>	22
3.3	INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE <i>B. oldhamii</i>	24
3.4	MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE <i>G. chacoensis</i>	25
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	28
4.1	INTRODUÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i>	28
4.2	INDUÇÃO DE BROTO	29
4.3	MULTIPLICAÇÃO DE <i>G. chacoensis</i>	31
5	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS	34
	ANEXOS	38

1 INTRODUÇÃO

O bambu é uma gramínea pertencente à família Poaceae e subfamília Bambusoideae que se divide em duas tribos, uma herbácea conhecida como Olyrae e outra tribo com características lenhosas chamados de Bambuseae (LONDOÑO, 2001). Dentro dos 90 gêneros, já estão catalogados em torno de 1400 espécies, as quais são encontradas em todos os continentes onde as maiores concentrações se localizam nas regiões subtropicais e tropicais. No Brasil, já foram descritos 34 gêneros e 232 espécies nativas de ocorrências, principalmente, na Mata Atlântica e Amazônia (JUDZIEWICZ et al., 1999; FILGUEIRAS; GONÇALVES, 2004).

Os bambus são gramíneas perenes com característica de rápido crescimento, algumas espécies reproduzem-se facilmente sem a necessidade de replantio e alcançam um alto volume de biomassa em pouco tempo. Além disto, tem alta capacidade de resiliência, sendo assim, torna-se uma planta com grande potencial de uso agrícola, pode competir com matérias-primas já existente na produção de biomassa vegetal (FIALHO et al., 2005).

Atualmente, há uma crescente demanda de matéria-prima para suprir as necessidades humanas, em algumas destas necessidades o produto do bambu pode se destacar como na construção civil, na fabricação de móveis, em materiais de higiene pessoal, na alimentação humana e animal, na extração de celulose para a indústria papeleira, fabricação de chapas laminadas, na industrialização de tecidos, dentre outras aplicações (SALGADO; GODOY Jr, 2002). Segundo Wadt et al., (2003), também há possibilidade do seu uso em locais onde ocorre há degradação do solo, um fator de alto impacto na agricultura. Esta planta é uma alternativa para proteger e promover condições de reestruturação onde o solo está erodido e adaptam-se bem em diferentes ambientes, possuem sistema radicular extenso e produz grande quantidade de colmos que formam uma tela e desaceleram a água superficial das enxurradas. A gramínea produz uma alta quantidade de folhas que formam uma cobertura adensada na superfície do solo que resulta na absorção do impacto da gota, mantém a umidade e evitam a desagregação das partículas do solo.

As espécies de bambu raramente florescem, é propagado vegetativamente através do desdobramento das touceiras, dos ramos ou pedaços de colmos, apesar desta planta ter facilidade de se alastrar e emitir novos brotos, mesmo assim, o método de remoção das touceiras não é suficiente para suprir grandes cultivos (RAMANAYAKE, 2006).

Uma alternativa para resolver este problema é utilizar métodos de propagação que tenham possibilidade de produzir grande quantidade de mudas em um espaço reduzido,

controlado e que resulte em explantes com ótimas características fitossanitárias, alta qualidade e que causem o mínimo de impacto ambiental. (MACHADO; GRATAPAGLIA, 1998).

Existe a possibilidade do uso de técnicas de micropropagação que resultam na produção em larga escala de clones idênticos de plantas doadoras, a qual mantém a genética da planta matriz e suas características fenotípicas. Esta técnica consiste em propagar plantas com pequenas partes de seus tecidos, isto é possível devido a capacidade de totipotência das células vegetais. Na técnica são introduzido pequenos explantes em tubos de ensaios com meios de cultura nutritivos, onde são trabalhados em condições assépticas (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006).

Para obter sucesso na introdução de uma espécie utilizando esta técnica é necessário selecionar bons explantes, efetuar o processo de desinfestação e procedimentos assépticos de manipulação e incubação das culturas (CID, 2001). A hipótese é de que pequenos explantes de bambu, retirados de seus brotos de plantas matrizes, e tratados com álcool 70% e hipoclorito de sódio com diferentes tempos e concentrações conseguem eliminar microrganismos superficiais e estabelecer as culturas *in vitro*.

1.1 JUSTIFICATIVA

Existe uma forte demanda de biomassa vegetal na industrialização de vários produtos e o bambu é uma gramínea de rápido crescimento, alta resiliência e possui ótimas propriedades mecânicas. A dificuldade está em propagar grande volume de mudas, pois o bambu é propagado por estacas. Uma alternativa para este problema é a micropropagação, através dessa técnica é possível que pequenos fragmentos vegetais de tecido vivo cultivados em meio adequado e asséptico darão origem a uma nova planta. O entrave desta técnica é a contaminação microbiana, portanto, este trabalho busca uma forma de eliminar ou reduzir os fitopatógenos de segmentos nodais de *Bambusa oldhamii* Munro e *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño que impedem sua introdução no cultivo *in vitro*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes métodos de desinfestação de explantes na introdução *in vitro* de *Bambusa oldhamii* e a multiplicação *in vitro* de *Guadua chacoensis*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Testar diferentes produtos e concentrações na desinfestação de segmentos nodais de *B. oldhamii*;
- Promover o estabelecimento *in vitro* de gemas de *B. oldhamii* em diferentes meios de cultura;
- Avaliar a multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis* com suplementação de TDZ ao meio de cultura MS.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BAMBU, IMPORTANTE CONTRIBUINTE ECONÔMICO E AMBIENTAL

No intuito de atender as necessidades de sobrevivência humana, a demanda de matérias energéticas tendem a se tornar cada vez mais alta com o passar dos tempos, pois, estas são exploradas de fontes finitas e necessitam ser renovadas com maior velocidade para suprir as necessidades das próximas gerações (CURCIO et al., 2018)

O homem provoca mudanças na paisagem natural, alterando a estrutura e o equilíbrio geodinâmico do solo. O excesso de utilização da terra e a falta de manejo podem ocasionar índices de erosão muito altos a níveis de impossibilitar a continuidade do uso, sendo assim, a cobertura e reestruturação do solo deve ser iniciada para evitar a perda da camada cultivável (CURCIO et al., 2018).

Existe um interesse de procurar por novas espécies vegetais que possam ser utilizadas como fonte de energia, que tenham alta resiliência e possam ser exploradas por produtores de forma mais rápida e com menor impacto ambiental. Buscar materiais que possam ser responsivos em áreas que já foram degradadas, diminuindo o impacto sofrido pelo solo e restaurando-o, ainda assim, aproveitar um retorno econômico e ambiental. (JUDZIEWICZ et al., 1999).

Um dos materiais de interesse que pode ser utilizado é o bambu, segundo Londoño, (2001), é uma gramínea perene encontrada em todos os continentes, somente a Europa não

possui espécies endêmicas, as espécies que ali habitam são exóticas, portanto, também tem condições de se desenvolverem nesta região.

Os bambus pertencem a família Poaceae e subfamília Bambusoideae, que se dividem em duas tribos, uma herbácea conhecido como Olyrae e outro com características lenhosas chamados de Bambuseae. Os Olyrae estão reunidos em uma só tribo, agrupado em 21 gêneros, enquanto os lenhosos estão divididos em 9 subtribos e dentro dessas subtribos são encontrados ainda 67 gêneros (ROJAS; AÑAZCO, 2015).

As espécies endêmicas encontradas no Brasil estão concentradas na região do estado da Bahia, esta região condensa a maior diversidade de bambus da América Latina, dentre os países das Américas, o México possui 37 espécies das lenhosas, seguido da Costa Rica com 39, Equador com 42, Venezuela com 60, Colômbia com 72 e o Brasil com a maior diversidade são encontradas 141 espécies (ROJAS; AÑAZCO, 2015).

São plantas de ciclo perene, renováveis, com alta velocidade de crescimento e com grande produção de biomassa. Tem ótima produção anual, rusticidade e não necessita de replantios o que nos indica uma alta potencialidade agrícola relacionado a obtenção de outras matérias-primas (FIALHO et al., 2005).

A utilidade do bambu é bastante variada, podendo ser utilizado na construção civil em colunas de sustentação, vigas, portas, escoras, andaimes, pisos e paredes. Também é utilizado na fabricação de móveis como cadeiras, mesas, vasos e estantes. Pode ser usado como base na higiene pessoal na forma de creme dental, sabonetes e cosméticos, como também na alimentação humana, no consumo de brotos e animal através de forragem. Ainda temos a obtenção da celulose para indústria do papel, fibras para fabricação de chapas laminadas e tecidos, dentre outras aplicações. Todas estas opções são possíveis devido a variabilidade do bambu e seus manejos específicos, conforme as características de sua espécie, como também, as formas que cada região o trabalha (UBIDIA, 2001). Segundo Chaowana (2013) é considerada a “madeira do futuro”, por apresentar diversos usos e aplicações.

O país que tem a maior tradição do uso é a China, segundo a CNBRC (2010). Ela superou um valor de 8 bilhões de dólares em produtos à base do bambu e possui uma área cultivada de 7 milhões de hectares, o que representa 32% de toda a área plantada no mundo. Segundo Carvalho, Silva e Medeiros (2006), o Brasil tem grandes extensões de áreas que podem ser aproveitadas com o plantio do bambu, já que dispõe de clima favorável e não é muito exigente no seu cultivo e aceita bem solos que já estão degradados.

Na região Norte do país há uma floresta nativa de bambu coberta com cerca de 160000 km² do gênero *Guadua sp.*, localizada nas fronteiras do Peru, Bolívia e Brasil, considerada a

maior do mundo (MCMICHAEL; PALACE; GOLIGHTLY, 2014). Originário da América do Sul este gênero é considerado o mais importante economicamente, seu uso está associado a produção de lenha, construção civil, móveis, proteção de fontes de água e solo. Algumas espécies atingem com seus colmos até 30 metros de altura e com diâmetro de até 20 centímetros. (MARULANDA; GUTIERREZ; MARQUEZ, 2005).

O *Guadua chacoensis* é perene, de grande porte, atinge uma altura de 20 metros e seus colmos tem diâmetro de até 13 cm, com paredes espessas chegam aos 3 centímetros de largura. A alta resistência mecânica proporciona seu uso em construções de casas e galpões, como também na fabricação de móveis, ferramentas e artesanatos (LONDOÑO; PETERSON, 1992).

O *Bambusa oldhamii* é originário da China, alcança até 20 metros de altura e 8 cm de diâmetro, possui característica de alta resistência mecânica, rápido crescimento e se adapta em locais onde ocorrem baixas temperaturas de até 9 °C negativos. (MENDOZA; HERNÁNDEZ; GUERRERO, 2012).

Apesar das condições favoráveis economicamente e das ótimas propriedades físicas e mecânicas desta planta, ainda no Brasil há pouco uso do bambu como matéria prima. Brasil e China estão promovendo um incentivo para pesquisa e conhecimento sobre as nativas e exóticas espécies de bambu. Esta cooperação é conjunta do Ministério de Ciência e Tecnologia da República Popular da China e do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), também participa a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Acre). O projeto tem como intuito auxiliar e consolidar a cadeia produtiva do bambu no Brasil (DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

Figura 1 - Planta matriz de *Bambusa oldhamii*, UFSC/Campus de Curitibanos.



Fonte: O autor

Fialho et al., 2005, acredita que produzir os bambus é uma alternativa interessante para o agronegócio brasileiro, mas para que isso ocorra deve-se fundamentar-se em pesquisas e desenvolvimento de tecnologias para agregar conhecimento científico, potencializar o uso da matéria prima e como resultado obter os incentivos para sua produção e obter os benefícios socioambientais deste produto.

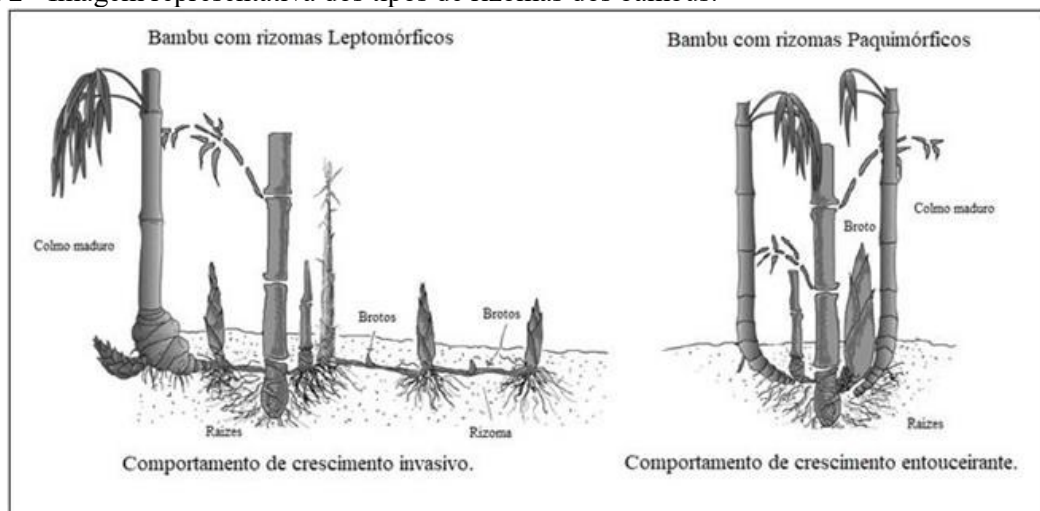
2.2 MORFOLOGIA

O bambu é uma gramínea constituída em sua parte superior ao solo de colmos, estes são segmentados por nós, entrenós, folhas, bainhas e brotos (Figura 1) e na parte inferior do solo se encontram os rizomas (Figura 2), os brotos do rizoma e as raízes (KIGOMO, 2007). Os colmos apresentam variada morfologia, podem ser sólidos, fistulosos ou medulosos, eretos, arqueados, apoiantes ou escandentes. O diâmetro pode variar desde poucos milímetros até dezenas de centímetros (DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

A maioria tem forma cilíndrica, mas podem ser sulcados ou achatados, a cor varia de tons de verde, vinho, castanho e amarelo. Também existe variação na distância entre os nós e suas ramificações, sendo útil na identificação das espécies (DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

A parte rizomatosa que se encontra abaixo do solo pode ser de dois tipos, paquimorfo de crescimento simpodial, ou leptomorfo, com crescimento monopodial. O primeiro se organiza em forma de touceiras, enquanto o segundo já é de espécies alastrantes, este último não é conhecido no Brasil como espécie nativa. Ainda pode aparecer dois padrões de ramificação na mesma planta, neste caso é denominado anfipodial (LIESE, 1998).

Figura 2 - Imagem representativa dos tipos de rizomas dos bambus.



Fonte: Adaptado de <https://www.pullupstumps.com.au/bamboo-removal/>

As folhas dos bambus se constituem de bainha e lâmina, apresentam também uma lígula na região de transição. Na tribo Bambuseae em sua maioria ocorre dimorfismo foliar, as folhas de colmo possuem a lâmina foliar menos desenvolvida que a bainha, esta tem função principal de proteção ao colmo jovem, e as folhas de ramo, cuja função principal é respiração, transpiração e fotossíntese (DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

As flores de bambu são muito pequenas, se apresentam reunidas em inflorescências chamadas de espiguetas, estas são compostas por brácteas basais e antécios. A composição da bráctea é de pálea e lema que compõe um antécio. A flor possui um ovário súpero uniovulado, com estigmas plumosos ou barbados, podem ter de dois até 40 estames (JUDZIEWICZ et al., 1999).

Segundo Judzikieiwicz (1999), as eflorescências no bambu continuam sendo uma incógnita para determinar a época de seu aparecimento. Ainda não foi descoberta alguma relação genética, climática, de estações do ano ou algum período específico que apareçam as flores. Existem registros do florescimento em intervalos longos que podem acontecer dentro de 10 ou até 50 anos, sem que apresente alguma influência externa específica para relacionar o florescimento. Devido à demora na floração, a aquisição de sementes é difícil e quando se obtém apresenta um baixo índice de germinação, portanto, a propagação do bambu é realizada por fragmentos de suas estruturas, que possuem uma alta capacidade de diferenciação celular.

2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

O bambu é uma planta que floresce raramente, portanto, é propagado vegetativamente através do desdobramento das touceiras, dos ramos ou pedaços de colmos (SALGADO et al., 1992). Apesar da planta ter facilidade de se alastrar e emitir novos brotos, ainda assim, o método de remoção das touceiras não é suficiente para suprir grandes cultivos. Provoca a destruição de parte da planta, causa revolvimento do solo e é muito dispendioso, sendo que essa forma de propagação é utilizada para áreas muito pequenas onde é necessário poucas mudas (SALGADO; GODOY, 2002).

Segundo Banik (1995), uma alternativa para evitar a remoção de touceiras, seria utilizar os ramos secundários do colmo principal, pois se tem abundância de material e boa capacidade de enraizamento. Uma outra alternativa é da utilização do colmo para não destruir a touceira, porque este método é 15 vezes mais eficiente que a propagação por rizomas. Além disto, a sobrevivências dos propágulos podem chegar até a 80% e que, o ganho do estabelecimento se dá pela estrutura do colmo possuir amido armazenado, uma reserva energética que aumenta o

estabelecimento da muda (AHLAWAT; HARIDASAN; HEDGE, 2002). Fonseca (2007) afirma que existem limitações quando é necessário um grande número de plantas, então a melhor alternativa é o uso da micropropagação, que possibilita produzir em larga escala clones idênticos de plantas doadoras, mantendo a genética da planta mãe.

2.3.1 Micropropagação de plantas

A técnica de propagar plantas com pequenas partes de tecido vegetal em frascos de vidros é chamada de micropropagação *in vitro*, são utilizados tubos de ensaios ou outros similares compartimentos onde são trabalhados os explantes em condições assépticas, em meios nutritivos e com controle dos fatores ambientais, como temperatura e luz (CID, 2001). Esta técnica se consolida devido a capacidade de totipotência das células vegetais através da organogênese e da embriogênese somática em um meio de cultivo que compõe as condições favoráveis ao seu desenvolvimento (CARVALHO, 1999).

O meio de cultivo tem função de suprir o explante com umidade e nutrientes, portanto traz em sua composição básica a água, sais minerais, macronutrientes, micronutrientes, açúcar, como fonte de carbono, vitaminas, dentre outros componentes orgânicos. Também pode dar condições de sustentação quando em sua composição traz alguma substância gelificante. O meio de cultura mais conhecido e amplamente utilizado é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que desde então vem sendo aperfeiçoado ao longo do tempo. Ainda dentro do meio há a possibilidade de adição de reguladores endógenos que são substâncias químicas, não nutricionais, mas com capacidade sinalizadora que atuam diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas, as mais conhecidas e utilizadas são as citocininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (PASQUAL; HOFFMANN; RAMOS, 1997). Todos esses fatores só serão levados em consideração no momento em que se trabalha com explantes livres de contaminações, os meios de cultivos e os explantes devem estar livres de patógenos para obter sucesso em seu estabelecimento, pois contaminantes no microambiente podem causar danos aos tecidos, consumir o meio e inibir o crescimento e desenvolvimento (CARVALHO, 1999).

2.4 ASSEPSIA E DESINFESTAÇÃO

Para obter sucesso no cultivo *in vitro* é necessário que se tenha cuidado com a assepsia no local de trabalho, com equipamentos e com os explantes, pois o meio nutritivo também é

apropriado para o desenvolvimento de fungos e bactérias. Se houver contaminação, irá resultar na perda do material que está se estabelecendo. Para evitar estas contaminações, as culturas devem ficar isoladas em frascos de vidro fechados, pois o contato com o ar pode transmitir agentes de contaminação e levar a morte do tecido vegetal (TORRES; TEIXEIRA, 1998).

Existem ferramentas de trabalho que possibilitam evitar o contato do ar contaminado com o meio de cultura, uma delas é o uso da Câmara de Fluxo Laminar ou Capela de Fluxo Laminar, neste local o ar é filtrado por um filtro de alta eficiência (HEPA) capaz de reter 99,97% das partículas de 0,3µm de diâmetro e 99,99% das partículas maiores. São equipamentos que protegem o que está sendo manipulado, ou seja, protege o produto, não o operador. Nestas cabines não há recirculação do ar, o fluxo do ar que entra passa por um filtro e sai do em outra abertura do equipamento (SABATINO, 2016).

Os frascos e o meio de cultura devem estar descontaminados de qualquer tipo de agente patogênico, portanto é previamente fechado e autoclavado por 15 a 20 minutos em uma pressão de 1,2 atm., por esse tempo e pressão é suficiente para degradar qualquer tipo de microrganismo (ANVISA, 2010).

A planta matriz de onde é obtido os explantes devem estar em boas condições nutricionais, de sanidade e acondicionadas em lugares com menor influência possível do clima (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006). Plantas matrizes carregam em suas estruturas microrganismos que podem ser nocivos aos materiais propagativos, portanto, para evitar a contaminação microbiana que ocorre durante a propagação *in vitro* é necessário o uso de agentes químicos como álcool etílico 70% e hipoclorito de sódio para obter sucesso na descontaminação dos explantes (NADHA et al., 2012).

O uso de fungicidas e bactericidas tem se mostrado eficiente em alguns casos de desinfestação, pode-se utilizar diretamente na planta matriz, na solução desinfestante ou dentro do meio de cultura em doses pequenas (TEIXEIRA, 2001). No trabalho de Zayed e El-Sharabasy (2018), utilizaram os bactericidas gentamicina e cloranfenicol com doses de até 200 mg/L e obtiveram 100% de descontaminação bacteriana e 100% de sobrevivência dos meristemas apicais de palmeira *Phoenix dactylifera*. No mesmo trabalho os testes com fungicidas também obtiveram taxas altas de descontaminação fúngica com uso de carbendazin e benomyl com doses de até 1000 mg/L.

Além dos agentes desinfestantes, adjuvantes como o tween 20[®] podem ser adicionado as soluções de desinfestações, por ser um detergente purificado que ajuda diminuindo a tensão superficial da água e em consequência aumentam o contato dos agentes com os explantes (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006). Também o uso de biocidas como relatam Jimenez

et al., (2006) adicionado ao meio de cultura pode ajudar a diminuir a contaminação durante o processo de desinfestação. O PPM (Plant Preservative Mixture) é um biocida de amplo espectro que colabora nos processos de desinfestação em meios de cultura utilizados na micropropagação.

No estudo executado por Ramirez (2013), no qual, avaliou-se diferentes tratamentos de desinfecção para o estabelecimento *in vitro* com segmentos nodais de *Guadua angustifolia*, onde os explantes foram imersos em álcool por 2 minutos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 2 % por 5, 10 e 15 minutos e hipoclorito sódio a 3% durante 5, 10 e 15 minutos. Relatou apenas presença de bactérias, com menor percentagem de infestação conforme aumento do tempo exposto ao agente desinfestante.

2.5 ANTIOXIDANTES

No cultivo *in vitro* quando utilizado explantes com segmentos lenhosos há liberação de compostos fenólicos como a cutina, lignina e suberina nos locais de excisão. Estes compostos sofrem oxidação por enzimas polifenases resultando em substâncias tóxicas que na maioria das vezes são prejudiciais ao explante. Alguns compostos podem provocar obstrução da passagem dos metabólitos resultando assim na morte do explante (WINKLE et al., 2003).

Para diminuir a oxidação no momento do preparo anterior a inoculação, é importante que os explantes permaneçam em água para mantê-los hidratados e para ocorrer lixiviação dos compostos fenólicos. Também pode-se fazer uso de antioxidantes como o ácido cítrico, ácido ascórbico e carvão ativado. A luz também é um fator que potencializa a oxidação de fenóis, portanto, manter os explantes no escuro reduz a formação de compostos nocivos (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

2.6 HORMÔNIOS VEGETAIS

O crescimento e desenvolvimento das plantas são induzidos por substâncias químicas sinalizadoras conhecidas como hormônios e enzimas. Estas substâncias podem aparecer como resposta da programação genética natural da planta ou atuam em resposta das diferentes condições do ambiente. De modo geral, suas funções principais são de divisão celular, expansão celular e diferenciação celular. Controlam processos já conhecidos como o tropismo de caules e raízes, germinação e dormência de sementes, taxa de divisão celular, alongamento celular, florescimento, maturação e abscisão foliar (FREITAS, 2009).

Os hormônios podem agir individualmente ou em combinação, isso resulta em uma forma integrada de cooperação entre diferentes hormônios, para esta condição é definido um conceito de que “hormônios são considerados como substâncias químicas que atuam de forma integrada na regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, operando coordenadamente para manutenção da homeostase vegetal” (TAIZ et al., 2017).

Os hormônios dependem de quatro componentes principais, como a concentração associada ao tipo de tecido ou órgão vegetal, o estágio de desenvolvimento, a sensibilidade diferencial e a interação com outros hormônios (FREITAS, 2009).

Em relação a concentração associada ao tipo de tecido ou órgão, existe uma faixa considerada ótima para melhor eficiência do hormônio, quando a concentração está fora desta faixa não se percebe resposta fisiológica ou apresenta inibição. No caso de estágio de desenvolvimento as respostas são diferentes dependendo da fase em que a planta se encontra, a ação do mesmo hormônio no estágio de embrião é diferente da fase adulta reprodutiva. A sensibilidade diferencial depende da quantidade de receptores em células alvo estarão prontos para tradução, estes receptores levam à amplificação do sinal hormonal ou à produção de mensageiros secundários que por sua vez levarão à resposta fisiológica. Em relação a interação, pode acontecer de três modos. No modo I os hormônios interagem regulando um conjunto comum de genes alvo. No modo II há uma interação na transcrição do sinal, onde o hormônio atua na sua via de sinalização e ainda interfere na via de sinalização do outro hormônio. No modo III há interação na biossíntese, onde a taxa de produção de um hormônio é alterada em resposta de um segundo hormônio (FREITAS, 2009).

Os hormônios atualmente conhecidos segundo Taiz et al., (2017), são as auxinas (AUXs), giberelinas (Gas), citocininas (CKs), etileno (ETL), ácido abscísico (ABA), brassinosteroides, jasmonatos, ácido salicílico e estrigolactonas. Segundo Freitas, 2009, podem ser divididos em classes principais, onde entrariam nessa classe os AUXs. Gas, CKs, ETL e ABA, e na classe de hormônios novos os brassinosteroides, jasmonatos, ácido salicílico e estrigolactonas.

2.6.1 Auxinas

A sinalização da auxina é essencial ao crescimento vegetal, sua denominação deriva do grego *auxein*, que significa “aumentar” ou “crescer” e atua em praticamente todos os aspectos do desenvolvimento das plantas. Foi o primeiro hormônio a ser estudado em um trabalho de Darwin em 1881, onde utilizaram a *Phalaris canariensis* para estudar a curvatura de bainhas

de folhas jovens e os hipocótilos de plântulas de outras espécies em resposta à luz unidirecional. Chegaram à conclusão que um sinal produzido no ápice se deslocava para baixo, fazendo as células inferiores crescerem mais rapidamente no lado sombreado do que no lado iluminado. Após esta análise demonstraram que o sinal era uma substância química que podia se difundir em blocos de gelatina (TAIZ et al., 2017).

As auxinas conhecidas mais utilizadas são o ácido indol-3-butírico (AIB), muito utilizado no enraizamento de estacas, o ácido 3-indolacético (AIA) como a auxina vegetal primária, o ácido 4-cloro-3-indolacético (4-cloro-AIA) e o ácido fenilacético que são auxinas naturais. Sua estrutura é relativamente simples e puderam ser sintetizadas e resultaram de alguns compostos, como o ácido 1-naftaleno-acético (ANA), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba), são auxinas amplamente utilizadas como reguladores do crescimento e herbicidas na agricultura (TAIZ et al., 2017).

2.6.2 Giberelinas

As Gas foram isoladas na década de 1930 como produtos naturais do fungo *Gibberella fujikuroi*, conhecido nos dias de hoje como *Fusarium fujikuroi*, do qual os hormônios derivam seu nome. Os cientistas perceberam que indivíduos do arroz infectados com *F. fujikuroi* tinham crescimento excessivo e puderam ser reproduzido pela aplicação de Gas em plântulas de arroz não infectadas. O fungo produz várias Gas diferentes e a mais abundante é conhecida como ácido giberélico (GA_3), que pode ser obtido comercialmente para uso e agrônômico, um de seus usos é na produção de uvas de mesa onde sua aplicação sobre videiras tem como resultado uvas maiores e sem sementes (FREITAS, 2009).

2.6.3 Citocininas

Na década de 1940, Skoog e um grupo de colaboradores demonstraram que um extrato de fungo em conjunto com uma auxina estimulavam a divisão de células vegetais do tecido parenquimático medular do tabaco em cultura, então a molécula indutora da divisão celular foi denominada cinetina, derivada da palavra citocinese que em grego significa divisão celular. O grupo conseguiu isolar a primeira citocinina a partir de DNA de arenque, pois as citocininas são encontradas em outros organismos desde bactérias até animais, musgos e fungos, e as citocininas naturais são encontradas no malte, água de coco e em outras plantas (FREITAS, 2009)

Seus efeitos ocorrem em muitos processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo a senescência foliar, dominância apical, a formação e a atividade dos meristemas apicais, o desenvolvimento gametofítico, a promoção da atividade de fonte-dreno, o desenvolvimento vascular e a quebra da dormência da gema. Ainda atuam na interação das plantas com fatores bióticos e abióticos, como excesso de sal, seca e relações simbióticas com bactérias e fungos (TAIZ et al., 2017).

Uma substância sintética que não ocorre naturalmente e possui o efeito das citocininas é o thidiazuron (TDZ), uma feniluréia utilizada como desfolhante na cultura do algodão e como estimulante de crescimento em fruticultura, mais especificamente aplicado na cultura das videiras onde o resultado observado é o aumento do tamanho das bagas das uvas devido promover a divisão celular (TAIZ et al., 2017).

2.6.4 Etileno

O etileno se apresenta na forma gasosa com uma estrutura química simples, foi inicialmente identificado como um regulador de crescimento vegetal, quando demonstrou a capacidade de modificar o crescimento de plântulas de ervilha estioladas em laboratório. É produto natural sintetizado por tecidos vegetais, muito utilizado na maturação de frutos climatéricos, consegue regular uma ampla gama de respostas em plantas, incluindo a germinação da semente e o crescimento da plântula, a expansão e a diferenciação celular, a senescência e a abscisão foliar e floral, além de respostas aos estresses bióticos e abióticos (TAIZ et al., 2017).

2.6.5 Ácido abscísico

Identificado na década de 1960, o ácido abscísico é encontrado em todas as partes das plantas vasculares e também já foi encontrado em musgos, fungos fitopatogênicos e em uma ampla gama de metazoários. É um composto que inibe o crescimento, a maturação e favorece a dormência de sementes aos estresses ambientais como, frio, falta de água e alta salinidade. O ABA é necessário para induzir a síntese de proteínas de reserva e lipídios nas sementes, bem como para o estabelecimento da dormência e aquisição da tolerância à dessecação, isso promove capacitação a planta de se manter viva em momentos de estresse. Esse hormônio apresenta efeitos contrários dos outros hormônios, somente em poucos processos este ácido promove interação positiva (TAIZ et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO E ORIGEM DOS EXPLANTES

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus de Curitibanos, no Laboratório de Biotecnologia e Genética. O material vegetal do *B. oldhamii* foi obtido de plantas matrizes, mantidas na área sede do Campus da UFSC de Curitibanos. O material vegetal de *G. chacoensis* utilizado nos experimentos vieram de brotações provenientes de sucessivas multiplicações de explantes que já se encontravam no Laboratório de Biotecnologia e Genética da UFSC de Curitibanos, em meio de cultura MS suplementado com 6-benzilaminopurina-BAP (15 μ M).

3.2 INTRODUÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *B. oldhamii*

Colmos de brotações jovens de *B. oldhamii* foram coletados e submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação para permitir o estabelecimento *in vitro*. O desenho experimental utilizado foi num esquema fatorial, 2x3 com seis tratamentos: Meio de cultura MS com a adição de carvão ativado (0,0 e 1,5 g L⁻¹) combinação com três diferentes agentes desinfestantes e tempo de exposição (Tabela 1). Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaio com um explante por tubo e com três repetições completamente casualizadas.

Tabela 1 – Distribuição dos tratamentos (T) de desinfestação dos explantes de *B. oldhamii*.

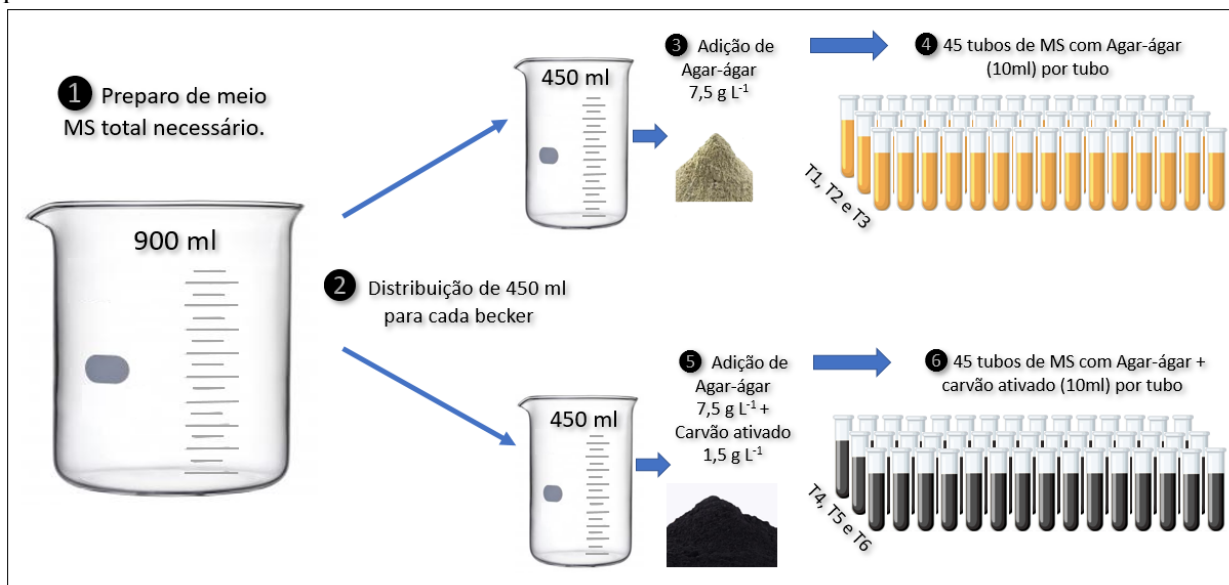
Tratamentos	Concentração dos agentes desinfestantes (Tempo em minutos)			
	Álcool 70%	NaOCl 1,5%	NaOCl 0,5%	Metiltiofan (0,6 g L ⁻¹) Captan (0,6 g L ⁻¹)
	Meio MS sem carvão ativado			
T1	2	15	-	-
T2	2	-	30	-
T3	2	-	30	20
	Meio MS com carvão ativado (1,5 g L ⁻¹)			
T4	2	15	-	-
T5	2	-	30	-
T6	2	-	30	20

Fonte: O autor

O meio de cultura utilizado foi composto pela formulação salina e vitamina MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sacarose (30 g L⁻¹), Agar-ágar (7,5 g L⁻¹) ou phytigel (2 g L⁻¹).

¹), como agentes gelificante. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, a 1,2 atm., por 15 minutos. O processo de inoculação das culturas foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. E as culturas foram mantidas em ambiente com temperatura de 25 °C ± 2 °C, e fotoperíodo de 16 horas. A representação da etapa de elaboração dos meios de cultura pode ser observada no esquema da Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática de elaboração e distribuição de seis diferentes meios utilizados para o cultivo de *Bambusa oldhamii*.



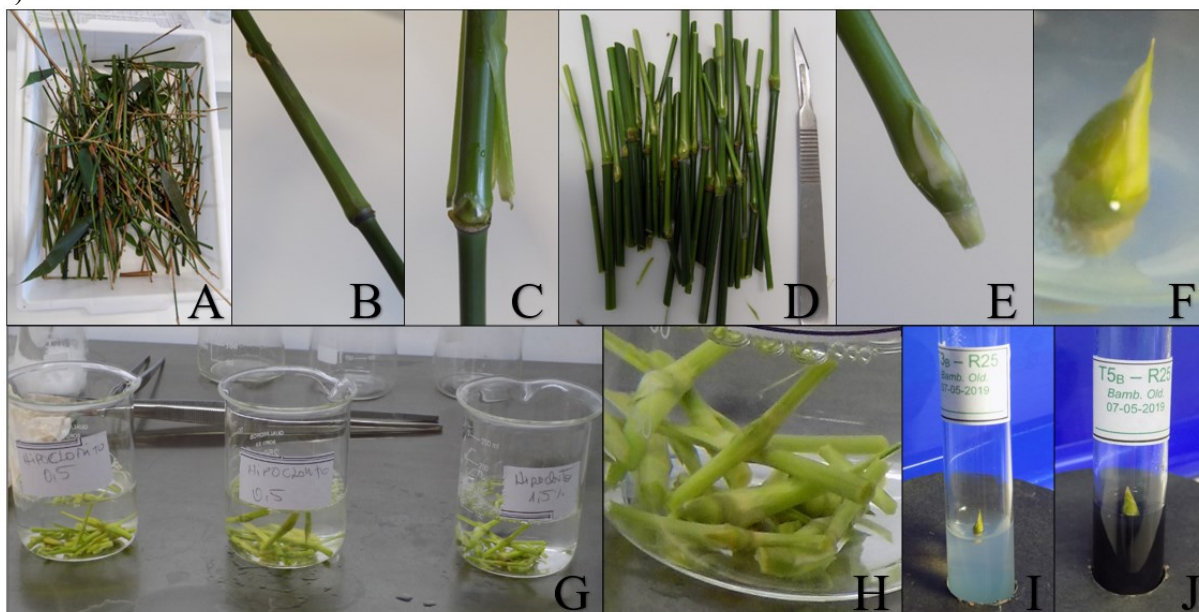
Fonte: O autor

Em laboratório, os brotos (Figura 4A) foram cortados em torno de 5 cm distante das gemas para ambos os lados e foram submetidos a uma prévia limpeza com algodão embebido em álcool etílico 70% para remoção de fuligens e umidade do ambiente natural antes da remoção das bainhas (Figura 4B). Removidas às bainhas (Figura 4C e D), as gemas foram expostas. Após, foram raspadas com bisturi na parte de baixo e ao redor para evitar lóculos de possíveis agentes infestantes (Figura 4E). O interesse de preparo dos explantes foi de diminuir ao máximo o tecido lignificado, expor a gema e manter o mínimo possível de broto ao redor da gema. Estes explantes recortados permaneceram em torno de seis horas em uma solução antioxidante contendo ácido ascórbico (250mg/L) e ácido cítrico (150mg/L) aguardando o início dos tratamentos. Em câmara de fluxo laminar foram submetidos a um processo de desinfestação, sob agitação, com diferentes doses e tempos de exposição.

Após cada ação dos agentes desinfestantes, os segmentos foram enxaguados por 3 vezes em água autoclavada. Antes da inoculação os explantes foram excisados nas suas extremidades e houve retirada de tecido lignificado em torno da gema mantendo aproximadamente 2 mm

(Figura 4F). Detalhes destes processos também podem ser observados, tal como, explantes desinfestados (Figura 4G) e anteriormente a inoculação (Figura 4H) e inoculação em meio de cultura MS sem a adição de carvão ativado (Figura 4I) e em meio MS com carvão (Figura 4J). Dados de porcentagem de oxidação e contaminação foram coletados após 15 dias em cultivo.

Figura 4 - Processo de preparo e inoculação dos explantes de *Bambusa oldhamii*: A) Brotações coletadas; B) Broto com a bainha fechada; C) Bainha exibindo a gema; D) Estacas com bainhas removidas; E) Gema exposta com a base raspada; F) Gema isolada e inoculada; G) Explantes desinfestados; H) Detalhe dos explantes antes da inoculação; I) Inoculação em meio MS sem carvão e; J) em meio MS com carvão.



Fonte: O autor

3.3 INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE *B. oldhamii*

Para promover a regeneração de brotações, as gemas sobreviventes, do ensaio de introdução *in vitro*, que não apresentaram contaminações visíveis, após os 15 dias de inoculação, foram subcultivadas em novos meios de cultura MS suplementado com BAP (5,0 μM), com ou sem a adição de PPM e mantendo o tratamento de origem, com ou sem carvão ativado (Tabela 2).

O delineamento experimental foi um completamente ao acaso com quatro tratamentos: T1) Meio sem a adição de PPM e origem do meio com carvão; T2) Com a adição de PPM (2,0 ml L^{-1}) e meio de origem com carvão; T3) Meio sem a adição de PPM e origem do meio sem carvão; T4) Com a adição de PPM (2,0 ml L^{-1}) e meio de origem sem carvão. Cada unidade experimental foi constituída de dois, no mínimo, tubos de ensaio com um explante por tubo e com três repetições.

Tabela 2 - Distribuição dos tratamentos (T) após transferência das gemas de *Bambusa oldhamii*, para novo meio de cultura MS suplementado com BAP (5,0 μM) e com PPM (0; 2,0 ml L^{-1}).

TRATAMENTOS	Meio de origem	Meio de subcultivo
	CARVÃO (g L^{-1})	PPM (ml L^{-1})
T1	1,5	0,0
T2	1,5	2,0
T3	0,0	0,0
T4	0,0	2,0

Fonte: O autor

As gemas ainda passaram por uma nova excisão dos tecidos oxidados para remoção dos exsudados desobstruindo o material oxidado para diminuir a atividade toxica dos polifenóis (Figura 5). Após a inoculação as culturas foram mantidas no escuro por sete dias para reduzir os efeitos da oxidação. Dados de porcentagem de contaminação e altura (mm) dos brotos foram coletados após 15 dias em cultivo.

Figura 5 – Processo de limpeza da gema de *Bambusa oldhamii* no momento da troca do meio.



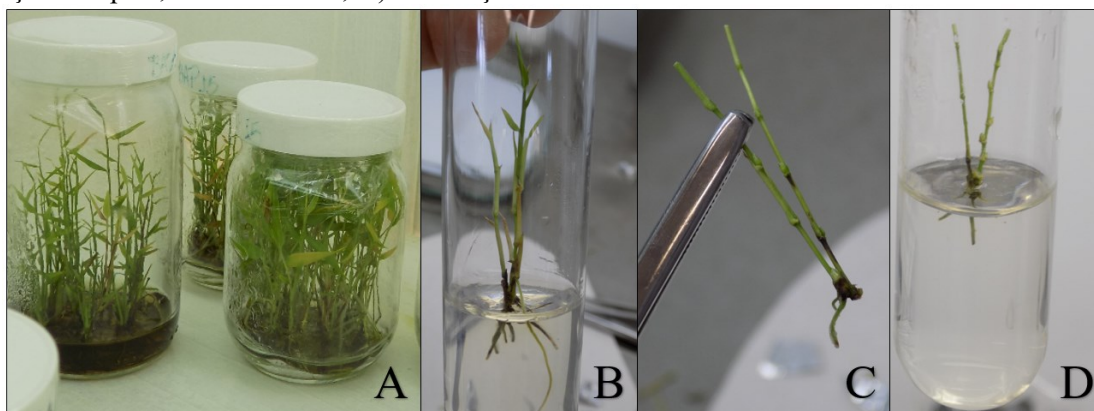
Fonte: O autor

3.4 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *G. chacoensis*

Brotões provenientes de sucessivas multiplicações, em meio de cultura MS suplementado com BAP (15 μM), estabelecidas e multiplicadas por Ornellas (2017) e mantidas no Laboratório de Biotecnologia e Genética, foram selecionadas e repicadas para novos meios,

mantendo explantes com dois brotos cada (Figura 6). Efetuou-se a remoção das folhas, ápice senescente e, a excisão das raízes, mantendo no máximo 5,0 mm de comprimento e foram introduzidos nos novos tratamentos. Os brotos selecionados serviram de fonte de explantes para avaliar o efeito do Thidiazuron-TDZ na proliferação do *G. chacoensis*. Após 15 dias efetuou-se novas observações quanto a presença de contaminação e início de desenvolvimento de brotos.

Figura 6 – Multiplicação *in vitro* de *Guadua chacoensis* e B) brotações em sucessivos cultivos; C) remoção do ápice, folhas e raízes; D) introdução nos novos tratamentos.



Fonte: O autor

O delineamento experimental foi num esquema fatorial de 2x3, com seis tratamentos (Tabela 3): Duas doses de ácido naftaleno acético-ANA (0,0 e 0,1 μM) combinadas com três doses de Thidiazuron-TDZ (0,0; 0,1 e 1,0 μM) suplementadas ao meio de cultura básico MS, gelificado com phytigel (2g L⁻¹). Cada unidade experimental foi constituída de quatro tubos de ensaio com um explante de dois brotos por tubo e três repetições disposta ao acaso.

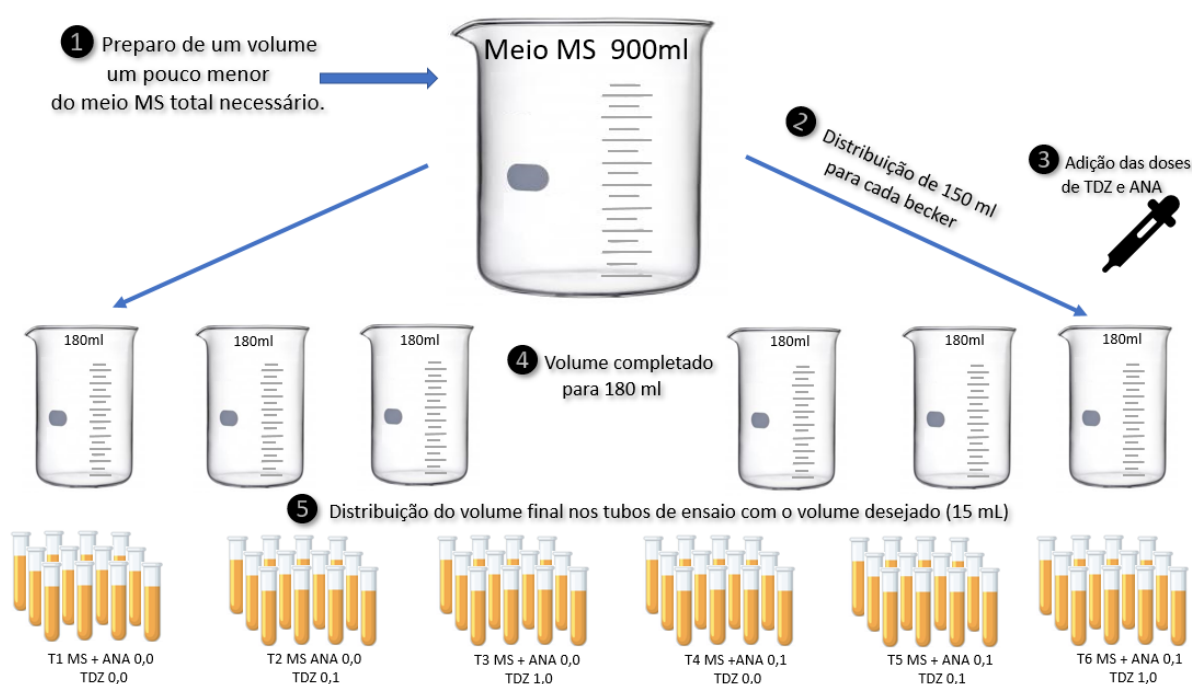
Tabela 3 - Distribuição dos tratamentos (T) referentes aos meios de cultura MS suplementação com TDZ (0,0; 0,1 e 1,0 μM) combinado com ANA (0,0 e 0,1 μM).

Tratamentos	Fitorreguladores	
	ANA (μM)	TDZ (μM)
T1	0,0	0,0
T2	0,0	0,1
T3	0,0	1,0
T4	0,1	0,0
T5	0,1	0,1
T6	0,1	1,0

Fonte: O autor

O volume total de meio (MS) de cultura preparado para o experimento do *Guadua chacoensis* foi de 1080 ml, dividido em 6 (seis) partes de 180 ml. Cada parte recebeu anteriormente as alíquotas de TDZ conforme esquema da Figura 7. Após isto, o pH foi ajustado para 5,8. Foram fechados com folhas de alumínio duplas e lacrados com plástico filme, estando todos prontos iniciou-se a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos a uma pressão de 1,2 atm.

Figura 7 – Representação esquemática de elaboração do meio de cultura MS suplementado com TDZ (0,0; 0,1 e 1,0 μM) combinado com ANA (0,0 e 0,1 μM) para a multiplicação *in vitro* de *Guadua chacoensis*.



Fonte: O autor

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

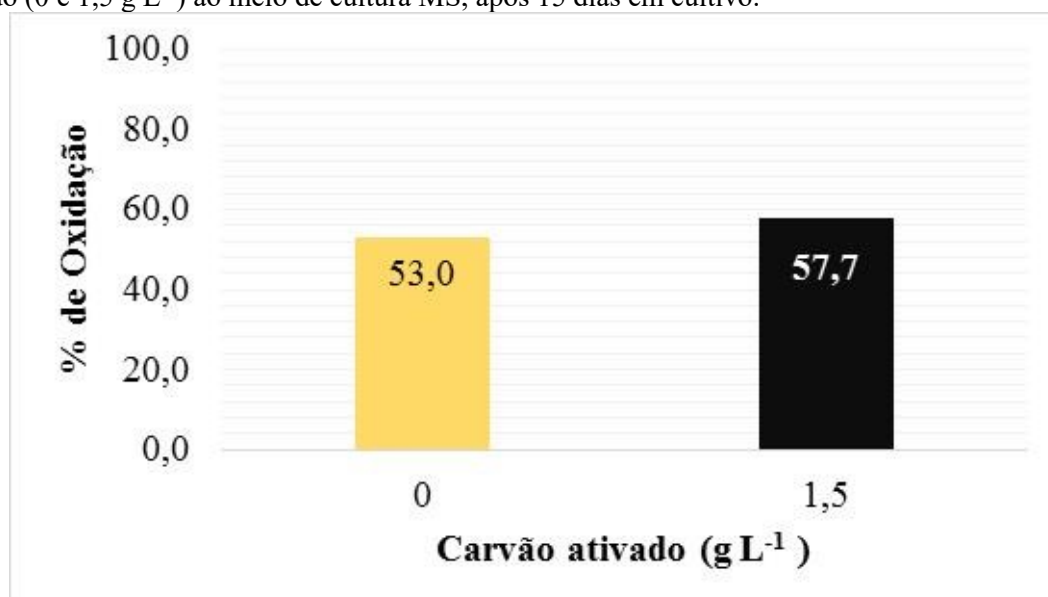
Os dados coletados de cada parâmetro foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de separação de médias quando necessário, utilizando o Programa PAST versão 3.24.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 INTRODUÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

A porcentagem (%) média de oxidação das gemas de *B. oldhamii* foi de 55,3 %, após 15 dias em cultivo no meio de cultura MS com (57,7%) ou sem (53,0%) a adição de carvão ativado (Figura 8). O resultado estatístico da análise de variância demonstrou que as médias dos tratamentos não foram diferentes ($p=0.7779$) e obteve um alto coeficiente de variação de 35,4%. No trabalho de Costa et. al. (2006) o nível de oxidação de brotos de bananeira foi menor comparado ao meio onde não havia adição de carvão, mas não diferiu estatisticamente.

Figura 8 - Porcentagem (%) média de oxidação das gemas de *B. oldhamii* em relação a adição de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) ao meio de cultura MS, após 15 dias em cultivo.



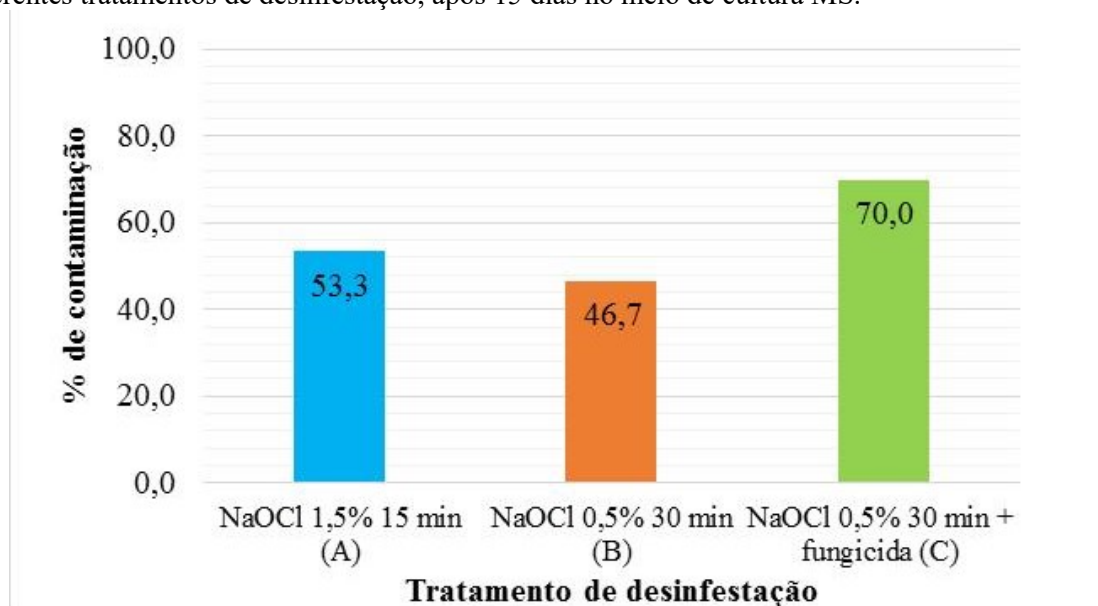
Fonte: O autor

Em relação à contaminação das gemas, observou-se, no presente trabalho que, os diferentes tratamentos de desinfestação, também não diferiram estatisticamente entre si (Figura 9). Esta não significância ($p=0,5464$), provavelmente, está relacionada ao alto coeficiente de variação (41,6%). Da mesma forma, esperava-se que a exposição dos explantes em um tempo maior e em conjunto com o uso dos fungicidas, resultasse em uma porcentagem menor de contaminação. De acordo com Guerra et. al., (2014) quando cultivaram segmentos de *Xylopiia sericea* ST. HILL., com a adição do fungicida Cercobin 700 WP[®] observaram um decréscimo na contaminação, conforme aumentaram as doses do fungicida, na desinfestação. Da mesma forma, Pasqualini et al., (2019) observaram que o uso do fungicida Cercobin a 2 g L⁻¹ por 24 h,

somente promove a inibição de fungos e bactérias nos explantes de *B. oldhamii*, quando associação de vários compostos de desinfestação.

No presente trabalho, observou-se um aumento da contaminação com o uso do fungicida no processo de desinfestação, provavelmente, este fator, está relacionado a algum erro de procedimento e/ou de manipulação das culturas.

Figura 9 - Porcentagem (%) média de contaminação das gemas de *Bambusa oldhamii* em relação aos diferentes tratamentos de desinfestação, após 15 dias no meio de cultura MS.



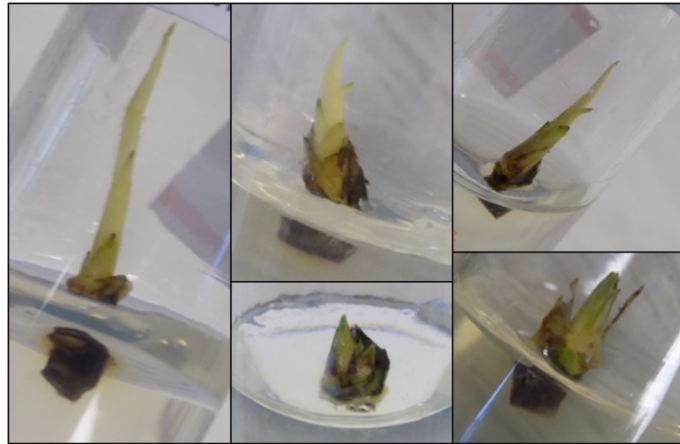
Fonte: O autor

4.2 INDUÇÃO DE BROTOS

Na fase de proliferação dos brotos foram selecionados os explantes que apresentaram alguma resposta morfológica. A única resposta observada aos 15 dias de cultivo foi indução de novas brotações (Figura 10) que, permitiu a determinação da altura (cm) dos brotos (Figura 11). Os resultados demonstraram que as médias não diferenciaram estatisticamente entre si, apesar de apresentar uma melhor tendência para o subcultivo dos brotos de *B. oldhamii* em meio de cultura MS sem a adição carvão ativado (2,08 cm), porém, suplementado com 5,0 μ M de BAP (Figura 11).

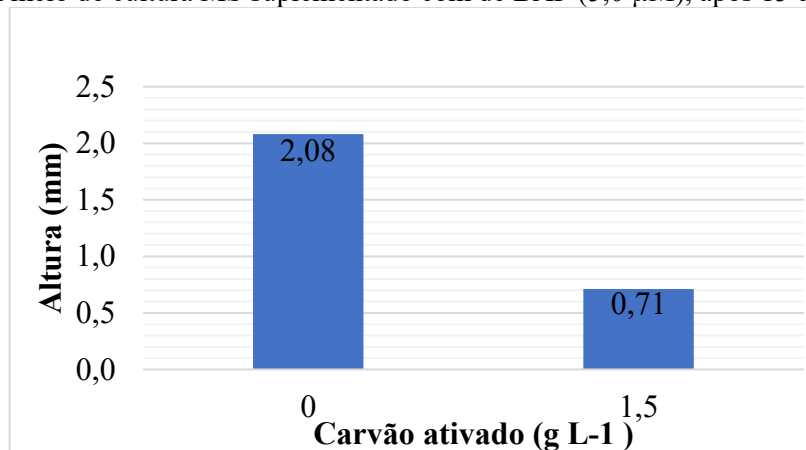
Houve resposta positiva no caso das brotações, pois 39,47% das amostras conseguiram emitir brotos. Essa resposta se deve a adição da benzilaminopurina ao meio de cultura, que segundo Pasqualini et al., (2017), doses menores que 10 μ M induzem a brotação do *B. oldhamii* e doses maiores que 10 μ M podem ser fitotóxicas.

Figura 10 – Indução de brotos *in vitro* a partir de gemas extraídas de plantas matrizes de *Bambusa oldhamii* e subcultivadas em meio de cultura MS suplementado com de BAP ($5,0 \mu\text{M}$), 15 dias em cultivo.



Fonte: O autor

Figura 11 - Altura média (mm) dos brotos de *Bambusa. oldhamii* em relação a adição de carvão ativado ($0; 1,5 \text{ g L}^{-1}$) em meio de cultura MS suplementado com de BAP ($5,0 \mu\text{M}$), após 15 dias em cultivo.



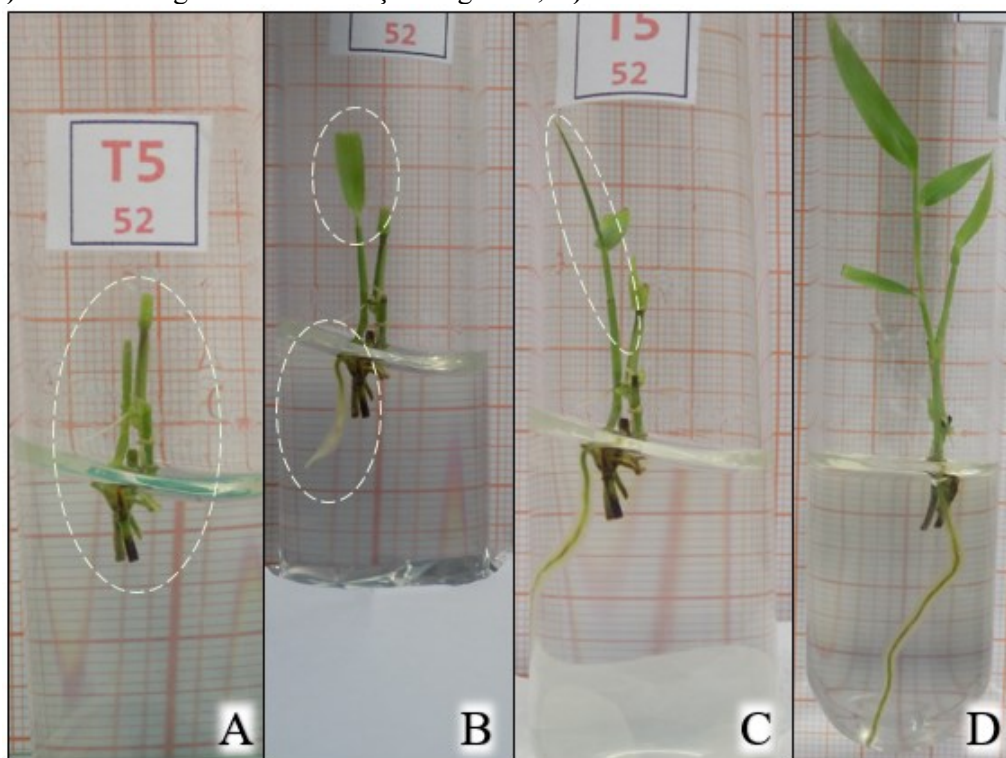
Fonte: O autor

Foi também avaliado neste experimento se a presença de PPM ao meio de cultura poderia inibir alguma contaminação posterior a reinoculação, e os resultados não apresentaram diferenças estatística dentre as médias observadas, apesar da média ter sido menor para os meios que tinham PPM que foi de 9,72% e 13,89 para o meio sem PPM. Entretanto, Pasqualini et. al. (2019), observaram que com o uso de 4 mL L^{-1} de PPM adicionado ao meio de cultura líquido promoveu a inibição do crescimento de bactérias e fungos nos explantes e em novos subcultivos, também, permitiu o desenvolvimento de brotações de *B. oldhamii*.

4.3 MULTIPLICAÇÃO DE *G. chacoensis*

O experimento com *G. chacoensis* foi avaliado até os 29 dias após implantação dos brotos e as médias foram registradas pela diferença de tamanho que apresentaram e as novas estruturas morfológicas que se desenvolveram. Foram avaliados números de folhas, brotos e raízes e também a altura de brotos e incremento em altura, como pode ser observado na Figura 12 os detalhes de cada estrutura avaliada.

Figura 12 - Multiplicação de brotos em *Guadua chacoensis*, cultivado em meio de cultura T5-MS com ANA (0,1 μM): **A**) Detalhe do explante inicial; **B**) 14 dias de cultivo apresentando emissão de raiz e de folha; **C**) Detalhe alongamento da brotação original e; **D**) Broto aos 29 dias de cultivo.

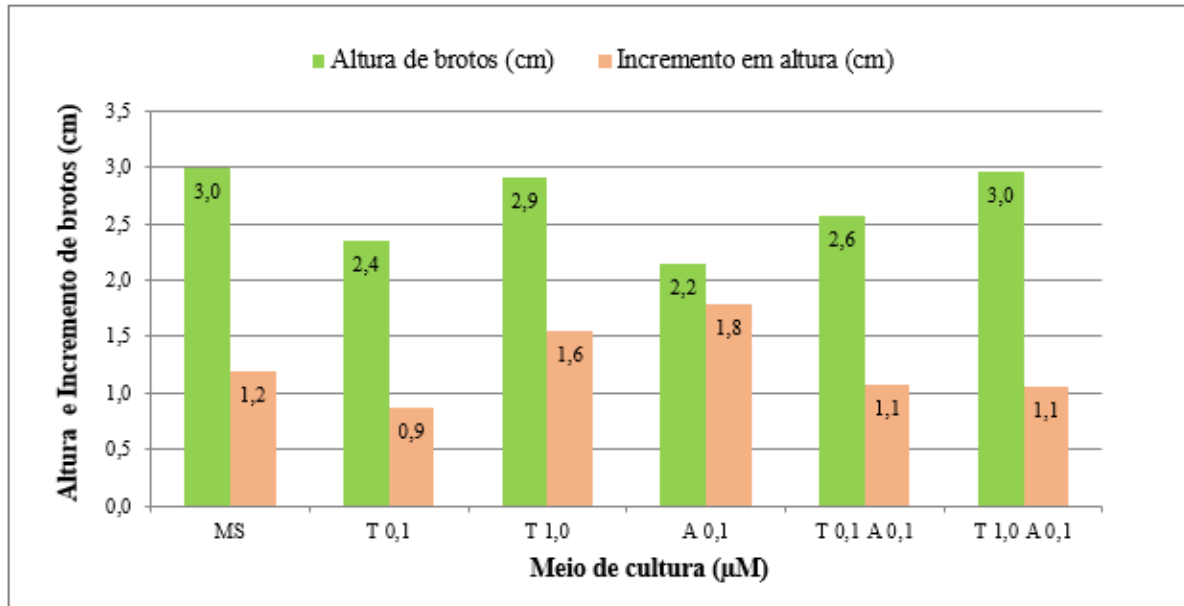


Fonte: O autor

A altura média e o incremento de brotos (em cm), não apresentaram diferenças estatísticas e entre os diferentes meios de cultura MS, isento de fitorreguladores ou com a suplementação das diferentes concentrações de ANA e TDZ (Figura 13). Da mesma forma, para os parâmetros número de brotos, de folhas e de raízes (Figura 14). Resultados semelhantes foram observados por Lin et al., (2007) na proliferação de brotos de *B. oldhamii*. Estes autores relataram que maiores e significativos números de brotos foram obtidos com o uso de 2,27 μM de TDZ, diferindo, do uso das doses de 0,45 ou 4,54 μM . Sendo estas duas últimas doses testadas foram estatisticamente iguais, porém, resultaram em taxas de proliferação inferiores,

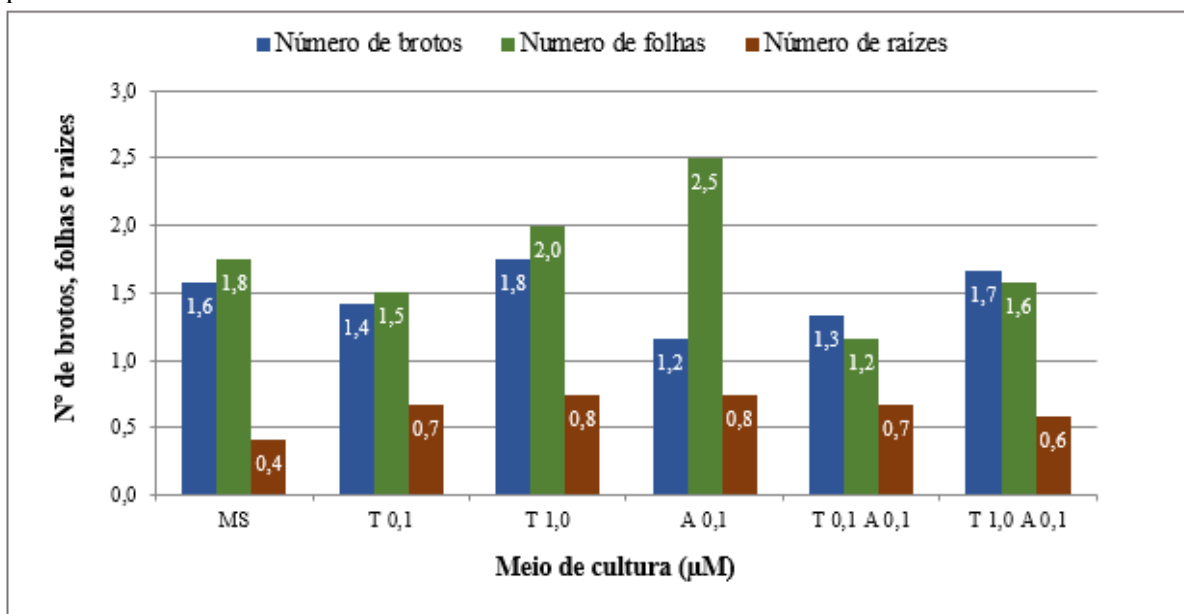
aos 21 e 42 dias de cultivo. Entretanto, na multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis*, Ornellas (2017) obteve 1,73 brotos por touceira, após 30 dias de cultivo, quando utilizou 15 μM de BAP suplementado ao meio de cultura MS.

Figura 13 – Altura e incremento (cm) dos brotos de *Guadua chacoensis* em relação ao cultivo em diferentes meios e cultura MS suplementado com TDZ (0; 0,1 e 1,0 μM) em combinação com ANA (0 e 0,1 μM), após 29 dias de cultivo *in vitro*.



Fonte: O autor

Figura 14 - Número de brotos, folhas e raízes de *Guadua chacoensis* em relação ao cultivo em diferentes meios e cultura MS suplementado com TDZ (0; 0,1 e 1,0 μM) em combinação com ANA (0 e 0,1 μM), após 29 dias de cultivo *in vitro*.



Fonte: O autor

5 CONCLUSÃO

Gemas extraídas de brotações jovens de *B. oldhamii* submetidas ao processo de desinfestação permitiu o estabelecimento *in vitro* quando cultivada em meio de cultura MS com ou sem carvão ativado.

O uso e carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de *B. oldhamii* não promoveu redução na oxidação.

O subcultivo em novos meios e suplementados com BAP (5,0 μ M), com ou sem a adição de PPM resultam na indução e alongamento dos brotos.

A suplementação de TDZ ao meio de cultura MS independente da concentração e combinação com ANA, para a multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis* não interferiram na formação de novas estruturas morfológicas, para o curto período avaliado.

REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, S. P.; HARIDASAN K.; HEDGE, S. N. **Field Manual for Propagation of bamboo in North East India**. Itanagar, 2002. 18 p. (SFRI Information Bulletin n. 14)
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Esterilização e garantia de esterilidade**. Abril, 2010. Disponível em <http://www.abrasp.org.br/fotos/CP+N%C2%BA+39+DIMCB.pdf> acesso em 18/09/2018 as 23:01 hrs.
- BANIK, R. L. **A manual for vegetative propagations of bamboos**. International Network for Bamboo and Rattan, 1995, 65 p.
- CARVALHO, J. M. F. C.; **Técnicas de Micropropagação**. Campina Grande: Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Algodão. 1999. 39 p. (Documentos n. 64)
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. e. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande-PB: EMBRAPA ALGODÃO, 2006, 28p. (Documentos nº 148)
- CHAOWANA, P. Bamboo: an alternative raw material for wood and wood-based composites. **Journal of Materials Science Research**. v. 2, n. 2, p. 90, 2013.
- CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**. v. 2, n.19, p.16-21, 2001.
- CNBRC – CHINA NATIONAL BAMBOO RESEARCH CENTER. **Bamboo technologies training course for developing countries**. Hangzhou, China, 2010
- CURCIO, G.R.; BONNET A. **A degradação do Solo e Algumas Implicações Funcionais Ecológicas**. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/86734/1/Gustavo-RPCS-ADegradacao.pdf>> Acesso em 09-09-2018.
- DRUMOND, P.M; WIEDMAN, G. (orgs). **Bambus no Brasil, da Biotecnologia à Tecnologia**. 1ª edição. Rio de Janeiro: ICH, 2017, 655p.
- FIALHO, E. D.; DA SILVA, A. L. P.; TONHOLO, J. Desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu: uma oportunidade para empreender. In: **Seminário Ibero-Latinoamericano de Gestión Tecnológica**. Nov, 2005. Salvador, Bahia. Altec, 2005. p.1-10.
- FILGUEIRAS, T. S., GONÇALVES, A. S. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **The journal of the American Bamboo Society**, v.18, n. 1, p. 7-18, 2004.
- FONSECA, F. K. P. da. **Produção de mudas de bambu *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) por propagação vegetativa**. 2007. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2007.
- FREITAS, H. B. **Desenvolvimento e hormônios vegetais**. 1ª ed.. Salvador: EDUFBA, 2009. 68p.

- GUERRA, C. de A., LAFETÁ, B. O., NUNES, D. M., RODRIGUES, R., PENIDO, T. M. A., SUGAWARA, M. T. Incidência de *Fusarium* sp. no estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares de *Xylopiya sericea* St. Hill (Annonaceae). In.: Forum Ensino Pesquisa e Extensão. Fepeg, 8, 2014. São João evangelista. **Anais...** São João evangelista: FAPEMIG/Unimontes, 2014. P.1-3.
- JIMENEZ, V. M., CASTILLO, J., TAVARES E., GUEVARA, E., MONTIEL, M. *In vitro* of propagation of the neo tropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* KUNT, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 86. p 387-396, 2006.
- JUDZIEWICZ, E. J.; CLARK, L. G.; LONDOÑO, X.; STERN, M. J. **American bamboos**. Washington, D.C, 1999. 392p.
- KIGOMO, B. **Guidelines for growing bamboo. Guideline, Series: n.4**. Kenya Forestry Research Institute – Kefri; Nairobi, Kenya. 2007
- LIESE, W. **The anatomy of bamboo culms**. INBAR – International Network for bamboo and rattan, China, 1998.
- Lin, C-S.; Kalpana, K.; Chang, W-C; Lin, N-S. Improving Multiple Shoot Proliferation in Bamboo Mosaic Virus-free *Bambusa oldhamii* Munro Propagation by Liquid Culture. **Hortscience**, v.42, n.5, p.1243–1246. 2007.
- LONDOÑO, X. **Evaluation of bamboo resource in latin America**. INBAR, Beijing, 2001.
- LONDOÑO, X.; PETERSON, P. M. *Guadua chacoensis* (Poaceae: Bambuseae), its taxonomic identity, morphology, and affinities. **Novon.**, v. 2, p. 41 – 47, 1992.
- MACHADO, M. A., GRATTAPPAGLIA, D. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. Vol.1, p.190-200.
- MARULANDA, M.L.; GUTIERREZ, L.G.; MARQUEZ, M.P. Micropropagacion de *Guadua angustifolia* Kunth. **Actualidades Biológicas**, v. 27, n.82, p. 5-15, 2005.
- McMICHAEL, C.H.; PALACE, M.W.; GOLIGHTLY, M. Bamboo-dominated forests and pre- -Columbian earthwork formations in south-western Amazonia. **Journal of Biogeography**, v.41, n.9, p.1733-1745, 2014
- MENDOZA, A. C., HERNÁNDEZ, J. J. V., GUERRERO, A. G. Components of net aerial primary production in a *Bambusa oldhamii* plantation. **Agrociencia** v. 46, p. 63-74, 2012.
- NADHA, H.K.; SALWAN, R.; KASANA, R.C.; ANAND, M. S. A. Identification and elimination of bacterial contamination during *in vitro* propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. Pharmacognosy. **Magazine**, v. 8, n. 30, p. 93-97, 2012.
- ORNELLAS, T.S. **Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson**. 2017. 66 f. Dissertação. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2017.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997.

PASQUALINI, A.P.A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M.P.; QUOIRIN, M. Estabelecimento in vitro de *Bambusa oldhamii* Munro. IN. Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 21 e Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 8, 2017, Bonito-MS. **Anais...**, Dourados: UFGD, 2017, p.161.

PASQUALINI, A.P.A.; SCHNEIDER, G.X.; FRAGA, H.P.F.; BIASI, L.A.; QUOIRIN, M. *In vitro* establishment of *Bambusa oldhamii* Munro from field grown matrices and molecular identification of endophytic bacteria. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.49, e53673, 2019. Special Supplement: Bamboo.

RAMANAYAKE, S. M. S. D. **Flowering in Bamboo: An Enigma!** Ceylon Journal of Science, 2006.

ROJAS, S., AÑAZCO M., **Estudio de la Cadena Desde la Producción Consumo Del Bambú em Ecuador com Ênfasis em la Especie *Guadua angustifolia***. INBAR, Equador – Quito, abril, 2015. 196 p.

SABATINO, A. **Manual de Biossegurança da Fiocruz Rondônia**. Fundação Oswaldo cruz - Fiocruz Rondônia. 2016. Disponível em <https://www.rondonia.fiocruz.br/sites/www.rondonia.fiocruz.br/downloads/cibio/bibliografia/ManualBiossegurancaFiocruzRO.pdf> Acesso em 19/09/18 as 00:49.

SALGADO, A. L. de B. et. al. **Instruções Técnicas sobre o Bambu**. Campinas: Boletim Técnico, 143. Instituto Agrônômico, 1992.

SALGADO, A. L. de B.; GODOY JUNIOR G. **O Bambu no Brasil: em nossa vida, nossa cultura, seu cultivo e utilização**. In: Seminário Internacional - Cursos e Mostra. O Uso do Bambu na Construção Civil. SEBRAE. Maceió, 2002. 39 p.

TAIZ L.; ZEIGER E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal, 6ª edição**. Porto Alegre – RS, 2017. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/374645489/Fisiologia-e-Desenvolvimento-Vegetal-Zair-6%C2%AAed>

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa/SPI/CNPH. Brasília, 1998. v.1, p. 183-260.

TORRES, A.C. TEIXEIRA, S.L.; **Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, 71-86.

UBIDIA, J. M. **Usos tradicionales y actuales del bambú em América Latina, com ênfasis em Colombia y Ecuador**. Guayaquil: Centro de Investigaciones Territoriales del Ecuador 2001. 192p.

WADT, P. G. S.; SOUZA C. B. C.; PEREIRA J. E. S.; GONÇALVES R. C.; ALVES L. S. **Práticas de Conservação do Solo e Recuperação de Áreas Degradadas.**, dezembro 2003. (Documentos 90, Embrapa).

WINKLE, S. V.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G.S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**. New York, v.21, p.1175-1182, 2003

ZAYED, Z. E. El-SHARABASY, S. **Silver Nanoparticles, Antibiotics and Fungicide to Control Microbial Activity During Establishment of Date Palm Explants In Vitro**. 2018. 10.15192/PSCP.SA.2018. 21.2.5763. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/322802487_Silver_Nanoparticles_Antibiotics_and_Fungicide_to_Control_Microbial_Activity_During_Establishment_of_Date_Palm_Explants_In_Vitro

ANEXOS

Anexo A - Análise da variância (ANOVA) da % de oxidação dos explantes, na introdução *in vitro* de *B. oldhamii*.

Several-sample tests — □

One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	938.278	5	187.656	0.4897	0.7779
Within groups:	4598.43	12	383.202		Permutation p (n=99999)
Total:	5536.7	17			0.7878

Anexo B - Análise da variância (ANOVA) da % de contaminação dos explantes na introdução *in vitro* de *B. oldhamii*.

One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	2333.33	5	466.667	0.84	0.5464
Within groups:	6666.67	12	555.556		Permutation p (n=99999)
Total:	9000	17			0.5629

Anexo C - Análise da variância (ANOVA) do número de brotos induzidos, na introdução *in vitro* de *B. oldhamii*.

Several-sample tests — □

One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	8.57489	3	2.8583	1.025	0.4312
Within groups:	22.2978	8	2.78723		Permutation p (n=99999)
Total:	30.8727	11			0.4563

Anexo D – Análise da variância (ANOVA) da % de contaminação dos explantes na indução *in vitro* de *B. oldhamii* com uso de PPM.

Several-sample tests — □

One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	109.958	3	36.6528	0.08226	0.9678
Within groups:	3564.67	8	445.583		Permutation p (n=99999)
Total:	3674.63	11			0.9584

Anexo E - Análise da variância (ANOVA) das médias das alturas de brotos dos explantes na multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis* com uso de TDZ.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	1,88917	5	0,377833	0,237	0,9386
Within groups:	19,1296	12	1,59413		Permutation p (n=99999)
Total:	21,0188	17			0,9353

Anexo F - Análise da variância (ANOVA) das médias do incremento em altura de brotos dos explantes na multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis* com uso de TDZ.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	1,88917	5	0,377833	0,237	0,9386
Within groups:	19,1296	12	1,59413		Permutation p (n=99999)
Total:	21,0188	17			0,9356

Anexo G - Análise da variância (ANOVA) das médias dos números de brotos dos explantes na multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis* com uso de TDZ.

Several-sample tests


One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,725694	5	0,145139	0,4139	0,8303
Within groups:	4,20833	12	0,350694		Permutation p (n=99999)
Total:	4,93403	17			0,8332

Anexo H - Análise da variância (ANOVA) das médias dos números de folhas dos explantes na multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis* com uso de TDZ.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	3,16667	5	0,633333	1,495	0,2626
Within groups:	5,08333	12	0,423611		Permutation p (n=99999)
Total:	8,25	17			0,259

Anexo I - Análise da variância (ANOVA) das médias dos números de raízes dos explantes na multiplicação *in vitro* de *G. chacoensis* com uso de TDZ.

 Several-sample tests

— □

One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
---------------	-----------	------------------	----------------	-----------------------	-----------------

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	<i>F</i>	<i>p</i> (same)
Between groups:	0,236111	5	0,0472222	0,6182	0,6888
Within groups:	0,916667	12	0,0763889		Permutation <i>p</i> (n=99999)
Total:	1,15278	17			0,7252