

CLONAGEM DE BAMBUS

NATIVOS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL



Na literatura, encontramos estudos de propagação *in vitro* com mais de 40 espécies de bambus dos gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus*. Entretanto, observa-se a carência de literatura que estabeleça protocolo da propagação *in vitro* para o gênero *Guadua*. Esse fato estimulou o autor deste livro a desenvolver estudos das estratégias biotecnológicas, notadamente aquelas associadas às técnicas da propagação *in vitro* do bambu, fato que possibilita a obtenção de mudas clonadas com características genéticas que atendam à demanda do mercado consumidor.

João Ricardo Avelino Leão

CLONAGEM DE BAMBUS

**NATIVOS DA AMAZÔNIA
SUL-OCIDENTAL**



João Ricardo Avelino Leão

CLONAGEM DE BAMBUS

NATIVOS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL

1ª Edição
Rio Branco
IFAC
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L433 Leão, João Ricardo Avelino.
Clonagem de bambus nativos da Amazônia sul-ocidental.
/ João Ricardo Avelino Leão. – Rio Branco: Editora IFAC,
2021.
184 p.
Inclui bibliografias.
E-book.

ISBN: 978-65-89055-05-1

1. Propagação in vitro. 2. Bambu. 3. Amazônia. I.
Título.

CDD – 371.33

Bibliotecária Responsável: Elisete Lopes Cassiano – CRB 9/1446

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS - A reprodução total ou parcial de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte. A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610/98), sendo crime estabelecido pelo artigo 184 do código penal.

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre - Ifac

Rosana Cavalcante dos Santos - Reitora

Maria Lucilene Belmiro de Melo Acácio - Pró-Reitora de Ensino

Jefferson Viana Alves Diniz - Pró-Reitor de Pesquisa, Inovação e Pós-Graduação

Fábio Storch de Oliveira - Pró-Reitor de Extensão

Ubiracy da Silva Dantas - Pró-Reitor de Desenvolvimento Institucional

José Claudemir Alencar do Nascimento - Pró-Reitor de Administração

Jefferson Bissat Amim - Chefe de Gabinete

Gírlen Nunes dos Santos - Assessora Especial

Leandro da Silva Costa - Diretor Sistêmico de Gestão de Pessoas

Edu Gomes da Silva - Diretor Sistêmico de Assistência Estudantil

Djameson Oliveira da Silva - Diretor Sistêmico de Gestão de Tecnologia da Informação

Evaldo Pereira Ribeiro - Diretor Sistêmico de Comunicação

Kelen Gleysse Maia Andrade - Diretora Sistêmica da Editora Ifac

Braulio de Medeiros Gonçalves - Diretor Geral do Campus Cruzeiro do Sul

Diones Assis Salla - Diretor Geral do Campus Sena Madureira

Paulo Roberto de Souza - Diretor Geral do Campus Rio Branco

Sérgio Guimarães da Costa Flório - Diretor Geral do Campus Rio Branco Avançado Baixada do Sol

Denis Borges Tomio - Diretor Geral do Campus Tarauacá

Joel Bezerra Lima - Diretor Geral do Campus Xapuri

Conselho Editorial

Rosana Cavalcante dos Santos

Jefferson Viana Alves Diniz

Kelen Gleysse Maia Andrade

Paulo Roberto de Souza

Diego Viana Melo Lima

William Pedrosa Maia

Cledir de Araújo Amaral

Denis Borges Tomio

Pedro Raimundo Soares de Souza

Italva Miranda da Silva

Edilene da Silva Ferreira

Pareceristas/Avaliadores

Valéria Polese

Maruzanete P. Melo

Samuel de Deus da Silva

Editora-Chefe da Editora

Kelen Gleysse Maia Andrade

Revisão técnica e normatização de texto

Kelen Gleysse Maia Andrade

Rúbia de Abreu Cavalcante

Projeto Gráfico, diagramação e tratamento de imagens

Ronaldo Cunha da Conceição

Edição

Editora Ifac

Reitoria - Rua Coronel Alexandrino, 310
Bosque - Rio Branco, AC - CEP 69.900-640

www.ifac.edu.br

Fone: (68) 3302-0825

edifac@ifac.edu.br

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO 6

PREFÁCIO 9

CAPÍTULO 1

IMPORTÂNCIA DOS BAMBUS NATIVOS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL 11

CAPÍTULO 2

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE BAMBUS 37

CAPÍTULO 3

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BAMBUS 78

CAPÍTULO 4

CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE BAMBUS 114

CAPÍTULO 5

MORFOMETRIA E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE BAMBUS 147

CAPÍTULO 6

TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE BAMBUS 167

APRESENTAÇÃO

A propagação *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica utilizada na cultura de tecidos vegetais para a propagação em massa de espécies de interesse florestal, agrônômico, medicinal e ornamental, aplicada em estudos da diversidade vegetal e conservação. O processo para obtenção de uma muda clonada ocorre em condições de laboratório, que reproduz um ambiente asséptico, livre de contaminações e com variáveis ambientais controladas.

A importância dessa técnica está relacionada com a disponibilização de mudas saudáveis, ou seja, livres de fungos, bactérias ou nematoides. Sua obtenção geralmente ocorre em menor tempo, em relação ao processo convencional, e com as mesmas características da planta matriz selecionada para clonagem.

Para a produção de mudas em laboratório, é necessário o planejamento de fases, como: a) escolha da planta que será utilizada como matriz; b) preparo do meio de cultivo; c) manipulação e inoculação do material vegetal (explante); d) incubação em sala de cultivo para multiplicação e enraizamento; e) pré-aclimatização em laboratório ou aclimatização em viveiro. Se necessário, as mudas oriundas do laboratório devem passar pela casa de vegetação para adaptação às condições ambientais.

O desafio de se clonar uma espécie florestal, na maioria das vezes, reside na recalcitrância, ou seja,

seus tecidos não respondem adequadamente aos estímulos empregados no cultivo *in vitro* e/ou pela contaminação por microrganismos, que pode ser de origem exógena ou endógena. Somado a esses fatos, existe a especificidade das plantas às técnicas de micropropagação.

O sucesso da micropropagação de qualquer espécie vegetal depende de vários fatores, que incluem desde a espécie, variedade ou cultivo utilizado, tipo de explante, época de coleta, insumos que são utilizados durante a execução dos experimentos, assim como os sais do meio de cultivo e hormônios vegetais utilizados.

Explante é qualquer parte da planta utilizada durante os estudos de propagação clonal, por exemplo, sementes, gemas apicais, segmentos nodais, folhas, raízes e partes do caule. O meio de cultivo usado na clonagem vegetal está relacionado, sobretudo, com o tipo de espécie escolhida para iniciar um estudo. Assim, para cada espécie é preciso adequar um protocolo e identificar a condição ideal para o seu desenvolvimento *in vitro*. As dosagens dos hormônios vegetais ou fito-hormônios podem ser alteradas e agem como moduladores do crescimento das plantas mantidas em laboratório, atuando no desenvolvimento do vegetal e promovendo a formação de ramos e raízes.

Este livro enfatiza a importância dos bambus nativos da Amazônia, bem como os aspectos práticos para a formação de mudas oriundas do processo de micropropagação. Os capítulos representam fases de

estudo em que o autor executou ao longo dos quatro anos de seu doutorado no Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia - Inpa. Quanto aos experimentos, todos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre e com auxílio financeiro do CNPq.

Estudos dessa natureza contribuem para ampliar o conhecimento da biodiversidade na Amazônia, promover a conservação e o uso sustentável das espécies, auxiliar programas de melhoramento genético e ainda fortalecer o desenvolvimento econômico da região.

Dra. Andréa Raposo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Gado de Corte

PREFÁCIO

Nos últimos anos, é crescente a preocupação com o aumento do desmatamento e com a degradação dos recursos naturais da Amazônia e, por isso, a sustentabilidade está cada vez mais presente nos diversos universos de interação humana. A busca do equilíbrio do uso e conservação dos recursos naturais tem estimulado estudos de cenários de uso de materiais e processos alternativos para os setores produtivos atuais. Tais estudos têm a finalidade de diagnosticar e indicar possíveis soluções estratégicas, tecnológicas, sociais, econômicas e ambientais para uma convivência mais sustentável e equilibrada entre os recursos naturais e as necessidades humanas.

O bambu possui importância cultural, social, ambiental e econômica no mundo. Caracteriza-se pelo rápido crescimento e pela alta produção de biomassa, utilizada na alimentação humana, geração de energia térmica e elétrica, construção civil, objetos de decoração, utensílios de cozinha, jardinagens e paisagismos. No mundo, milhões de pessoas fazem uso dessa planta e geram renda, que complementa suas necessidades. Atualmente, observa-se uma demanda crescente por produtos ecologicamente corretos e, como consequência, a valorização dos produtos, como a madeira dessa espécie.

Um dos principais fatores limitantes do cultivo de bambu em plantios comerciais é o uso de métodos inadequados para propagação vegetativa, pois

se baseia na subdivisão das touceiras ou no plantio de partes do colmo. Esses métodos são trabalhosos e de baixo rendimento, pois as mudas devem ser desmembradas da touceira matriz com sua destruição total ou parcial. Nesse contexto, as técnicas de propagação *in vitro* apresentam-se como uma alternativa eficaz e possibilitam a produção de um grande número de mudas.

Na literatura, encontramos estudos de propagação *in vitro* com mais de 40 espécies de bambus dos gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus*. Entretanto, observa-se a carência de literatura que estabeleça protocolo da propagação *in vitro* para o gênero *Guadua*. Esse fato estimulou o autor deste livro a desenvolver estudos das estratégias biotecnológicas, notadamente aquelas associadas às técnicas da propagação *in vitro* do bambu, fato que possibilita a obtenção de mudas clonadas com características genéticas que atendam à demanda do mercado consumidor.

O livro está estruturado em seis capítulos, nos quais são apresentados e discutidos os princípios, as estratégias e as limitações do uso da cultura de tecidos para a micropropagação dos bambus do gênero *Guadua spp.* São abordadas e descritas diferentes técnicas, que incluem estabelecimento e propagação *in vitro*, calogênese em explantes, morfometria e germinação *in vitro* e técnicas de cultivo *in vitro*.

Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Inpa

CAPÍTULO 1

IMPORTÂNCIA DOS BAMBUS NATIVOS DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL

1 INTRODUÇÃO

Os bambus são espécies que pertencem à família Poaceae e subfamília Bambusoideae, contém aproximadamente 50 gêneros e 1.300 espécies, que se distribuem nos trópicos e regiões temperadas. A maior ocorrência dos bambus se dá em zonas quentes e com chuvas abundantes de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América do Sul, crescendo naturalmente em todos os continentes, exceto na Europa (LOPEZ, 2003).

Segundo Filgueiras e Gonçalves (2004), o Brasil possui 34 gêneros de bambus, sendo 16 herbáceos

e 18 lenhosos, totalizando 232 espécies nativas. Os bambus lenhosos se caracterizam por possuírem rizomas fortes, bem desenvolvidos, brotos protegidos por folhas caulinares, completo sistema de ramificação, lâmina foliar decídua, florações cíclicas e monocárpicas e por se desenvolverem em locais abertos, além de serem polinizados pelo vento (LONDOÑO, 2004). Dentre os bambus lenhosos que ocorrem no Brasil, o gênero *Guadua* é considerado endêmico da Amazônia (Figura 1 A e B), possuindo 16 espécies (FILGUEIRAS e GONÇALVES, 2004).

Figura 1 - Aspecto das touceiras de bambu gigante no município de Porto Acre (A) e varas de *Guadua spp.* em Assis Brasil (B)



Foto A: Gonçalves, D. 2016. Foto B: Imbroisi, B.

Em todo o estado do Acre podem ser encontradas cinco espécies de bambu (DALY e SILVEIRA, 2008). Destas, *G. weberbaueri* e *G. sarcocarpa* são carac-

terizadas por possuírem ampla distribuição (OLIVIER e PONCY, 2009). As espécies *G. superba*, *G. latifolia* e *G. angustifolia* apresentam distribuição mais restrita (SILVEIRA, 2001), como pode ser observado no quadro 1.

Quadro 1 - Ocorrência de bambus do gênero *Guadua* spp. no estado do Acre

Espécie	Ocorrências no estado do Acre
<i>Guadua weberbaueri</i> ¹	Bujari, Cruzeiro do Sul, Santa Rosa do Purus, Tarauacá
<i>Guadua sarcocarpa</i> ¹	Acrelândia, Porto Walter, Sena Madureira, Santa Rosa do Purus, Tarauacá
<i>Guadua superba</i> ¹	Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Tarauacá
<i>Guadua paniculata</i> ¹	Tarauacá
<i>Guadua angustifolia</i> ²	Sena Madureira
<i>Guadua latifolia</i> ³	Assis Brasil

Fonte: 1- Daly e Silveira (2008); 2 - Miranda (2016);
3 - Leão *et al.* (2020).

Miranda (2016), ao estudar a anatomia dos entrenós de colmos de bambus que ocorrem no Acre, identificou cinco espécies de *Guadua* (*Guadua* sp.1, *Guadua* sp.2, *Guadua* sp.3, *Guadua* cf *angustifolia* e *Guadua latifolia*). A autora verificou que todas possuem grande potencial para construção civil, produção de energia, de compósitos e até mesmo de papéis porosos.

A vegetação da região é caracterizada pela ocorrência de florestas abertas, com bambus do gênero *Guadua*, conhecidos como tabocais no estado do

Acre, os quais cobrem áreas extensas com aproximadamente 161.500km² e possuem ciclo de vida estimado entre 27-28 anos (CARVALHO *et al.*, 2013).

De acordo com Ostapiv *et al.* (2008), a utilização racional desse recurso na região amazônica pode ajudar a preservar a floresta, diminuindo a pressão existente sobre o corte de espécies arbóreas e incentivando o manejo sustentável. Em países como Peru, Bolívia e, especialmente, na Colômbia e Venezuela, o *Guadua angustifolia* é muito utilizado para a construção civil.

De acordo com Pereira (2001), o bambu apresenta grande potencial agrícola, por se tratar de uma planta perene, renovável, que produz colmos anualmente sem a necessidade de replantio. Além disso, é eficiente no sequestro de carbono, pode ser utilizado para o reflorestamento de matas ciliares, tendo muitas aplicações, tanto ao natural, como após processamento adequado.

A propagação do bambu pode ocorrer: por reprodução sexuada, através de sementes, um método fácil e prático devido à esporadicidade de floração de muitos bambus (Figura 2 A), além da baixa viabilidade e vigor de suas sementes (Figura 2 B); ou por reprodução assexuada, através de partes vegetativas da planta, tais como ramos, gemas, colmos e rizomas. Cada espécie possui uma forma de propagação preferencial, devido às suas características ecológicas (CASTAÑO e MORENO, 2004; PEREIRA e BERALDO, 2010).

Figura 2 - Detalhe da inflorescência (A) e sementes de bambu *Guadua* spp (B)



Fotos: A - Silveira (2001); B - Silveira (2004).

De acordo com Pereira e Beraldo (2010), a principal vantagem da propagação vegetativa é a possibilidade de obtenção de plantas clonais com uniformidade genética e fenotípica. Para a maioria das espécies de *Guadua*, faltam estudos para definir o método mais adequado para sua propagação e para desenvolver um sistema de produção de mudas com elevadas taxas de sobrevivência.

Um dos principais fatores limitantes do cultivo de bambu é a falta de métodos adequados para sua propagação vegetativa, visando plantios industriais em grandes áreas. De acordo com Fonseca (2007), os métodos tradicionais de propagação vegetativa do bambu não são adequados, pois se baseiam na subdivisão das touceiras ou no plantio de partes do colmo.

Esses métodos são trabalhosos e de baixo rendimento, pois as mudas devem ser desmembradas da touceira matriz com sua destruição total ou parcial. Dentro desse contexto, as técnicas de propagação *in vitro* têm surgido como uma alternativa mais eficaz e confiável para a propagação das espécies da região do Acre.

Embora os bambus apresentem crescimento rápido e maturação precoce, sua natureza monocárpica tem sido um problema para os programas de melhoramento e para o manejo sustentável das espécies. O uso de sementes para propagação é de difícil obtenção por estarem relacionadas à baixa viabilidade, difícil armazenamento, alta taxa de contaminantes microbianos e, principalmente, pelo fato de as espécies de grande porte florescerem em intervalos muito longos, além da poliploidia de muitas delas (SAFE, 2004; SINGH *et al.*, 2013b). Segundo Richa e Nerru (2006), a baixa viabilidade das sementes de bambus armazenadas é ocasionada pelos baixos níveis de auxinas e ácido abscísico endógenos.

Em uma revisão sobre a importância da micropropagação para espécies de bambu, Mudo *et al.* (2013) citam que já existem estudos de propagação *in vitro* com mais de 40 espécies e que esses trabalhos se concentram nos gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus*, os mais cultivados no Brasil (Quadro 2). Os autores citam somente um trabalho para o gênero *Guadua* (JIMÉNEZ *et al.*, 2006). Esse fato demonstra que apesar de já existirem vários estudos de micropropagação com espécies de bambu, pesquisas de propagação *in vitro* com

o gênero *Guadua* são poucas e necessárias, por isso são de grande importância.

Quadro 2 - Lista das espécies de bambus mais cultivadas no Brasil e seus usos

Nome científico	Nome comum	Utilidade/Origem
<i>Bambusa blumeana</i>	-	Exótica
<i>B. dissemulator</i>	-	Exótica
<i>B. multiplex</i>	Bambu-folha-de-samambaia	Exótica
<i>B. tulda</i>	-	Exótica
<i>B. tuldoides</i>	-	Exótica
<i>B. ventricosa</i>	Bambu barrigudo	Exótica
<i>B. vulgaris</i>	Bambu, bambu comum	Produção de papel/Exótica
<i>Dendrocalamopsis beecheyana</i>	-	Exótica
<i>Dendrocalamus asper</i>	Bambu balde, bambu gigante	Exótica
<i>D. latiflorus</i>	-	Exótica
<i>D. strictus</i>	Bambu balde, bambu gigante	Exótica
<i>Gigantochloa apus</i>	-	Exótica
<i>Guadua angustifolia</i>	<i>Guadua</i>	Construção civil/Nativa

Fonte: adaptado de Manhães (2008).

O bambu possui importância cultural, social, ambiental e econômica. Em todo o mundo, são mais de 2,5 bilhões de pessoas que dependem economicamente dessa planta. Somado a esse fator, existe uma demanda crescente por produtos ecologicamente corretos e, como consequência, uma expectativa no au-

mento do uso de materiais produzidos por essas espécies (SINGH *et al*, 2013b), que se apresentam como plantas com extraordinárias qualidades que precisam ser cada vez mais estudadas (Quadro 3).

Quadro 3 - Limitações, progresso e prospecção da aplicação de ferramentas biotecnológicas e melhoramento de bambu

Usos	Limitações	Técnicas <i>in vitro</i>	Prospecção futura
Lenha e carvão	Doenças e pragas	Micropropagação	Estudos de taxonomia e filogenética
Comida e fibra industrial	Longo ciclo de florescimento	Sementes sintéticas	Transgênicos resistentes a doenças e pragas
Móveis e ornamentação	Florescimento esporádico e segregação	Conservação e criopreservação	Hibridização e cruzamento
Biodiversidade e conservação do solo	Curta viabilidade de sementes	Varição somaclonal	Análise da diversidade genética de populações
Construção e cercas	Coleta de sementes	Transformação e Transgenia	Comparação genômica
Energia renovável	Baixa germinação de sementes	Florescimento <i>in vitro</i>	Genômica funcional e mapeamento
Papel e polpa industrial	Delineamento taxonômica em baixos níveis	Performance no campo e teste de fidelidade genética	Plantios comerciais

Fonte: Singh *et al.* (2013)b.

Apesar da importância social, cultural, econômica e ambiental que os bambus apresentam no estado do Acre, seu uso ainda é pouco praticado devido à grande dificuldade em propagá-los convencional-

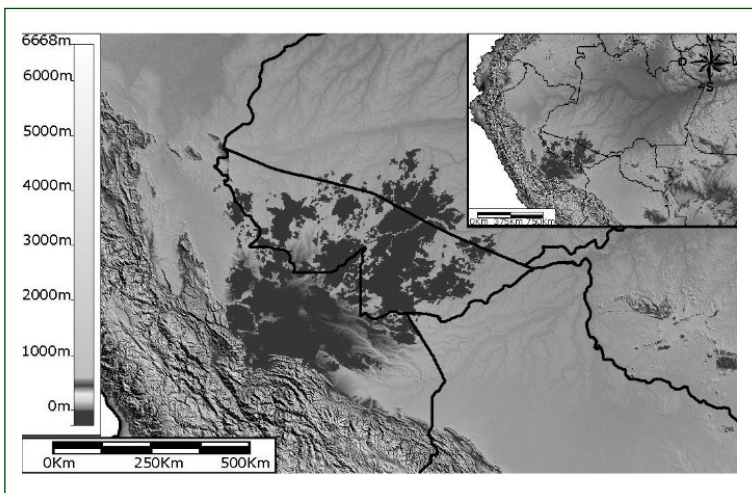
mente e também pela carência de estudos relacionados à planta. Tal fato demonstra a grande importância de trabalhos relacionados à propagação *in vitro* dessas espécies.

2 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *GUADUA* NA AMAZÔNIA

Segundo Londoño (2004), o gênero *Guadua* foi estabelecido em 1822, pelo botânico alemão Karl Sigismund Kunth, que utilizou o vocábulo indígena *Guadua*, termo empregado pelos índios da Colômbia e Equador. Esse gênero reúne aproximadamente 30 espécies, que se distribuem desde os 23° de latitude Norte em San Luis de Potosí, México até o 35° de latitude Sul na Argentina.

No sudoeste da América do Sul, encontra-se uma extensa floresta natural de bambus, com predominância de espécies do gênero *Guadua*, conhecida como tabocais no Brasil e Pacales no Peru, que ocupa uma área de, aproximadamente, 161.500km² no Brasil (Acre e Amazonas), no Peru e na Bolívia (CARVALHO *et al.*, 2013), como pode ser observado na figura 3.

Figura 3 – Ocorrência de bambus do gênero *Guadua* no Sudoeste da Amazônia



Fonte: Silveira (2006).

Segundo o ZEE (2006), as quatro tipologias nas quais o bambu é dominante representam 40,73% da cobertura florestal do Estado. E das 18 tipologias vegetais identificadas no Acre, oito (44,4%) apresentam o bambu no sub-bosque, como elemento principal ou secundário. Em termos de cobertura territorial, as tipologias vegetais com bambu recobrem 122.460km² (74,5%) dos 164.221km² da área do Estado.

As espécies do gênero *Guadua* são bambus lenhosos, que podem atingir 25-35m de altura, ocupam grandes clareiras e dominam o dossel das florestas, formando uma trama quase impenetrável de colmos com espinhos no sub-bosque. O ciclo de vida dessas espécies é estimado entre 29-32 anos (SILVEIRA, 1999),

após o qual florescem, morrem e depositam toneladas de material morto no solo em um espaço de tempo curto (TOREZAN e SILVEIRA, 2000). Formam touceiras e possuem alta produtividade com colmos maduros aos 3 anos e, se forem retirados de maneira adequada, aumentam a produção nos anos subsequentes.

2. 1 PROPAGAÇÃO SEMINAL E VEGETATIVA DE BAMBU

A propagação do bambu pode ocorrer por reprodução sexuada, através de sementes, o qual não é um método fácil e prático devido à esporadicidade de floração dos bambus, além da baixa viabilidade e vigor de suas sementes (SAFE, 2004). Além disso, plantas do gênero *Guadua* são consideradas como sendo de rara florescência e frutificação (Figura 4), o que dificulta sua propagação por sementes (FONSECA, 2007).

Figura 4 - Frutificação de *Guadua cf. superba*, Rio Purus



Foto: Miranda, E. (2014).

Já na forma vegetativa, a propagação dos bambus ocorre por técnicas, como desdobramento de touceiras, enraizamentos de estacas ou pedaços de colmos e ramos, porém esses processos são limitados, especialmente, para os plantios de grandes áreas onde o grande número de mudas é necessário (PEREIRA e BERALDO, 2010). Outra forma também empregada é a utilização de plântulas da regeneração natural (Figura 5). A técnica pode ser empregada para a multiplicação de plantas difíceis de serem propagadas por outros métodos, tanto para a produção comercial de

mudas quanto para a conservação de germoplasma (SOUZA e JUNGHANS, 2009).

Figura 5 - Mudanças de *Guadua cf. superba* de regeneração natural no Rio Purus

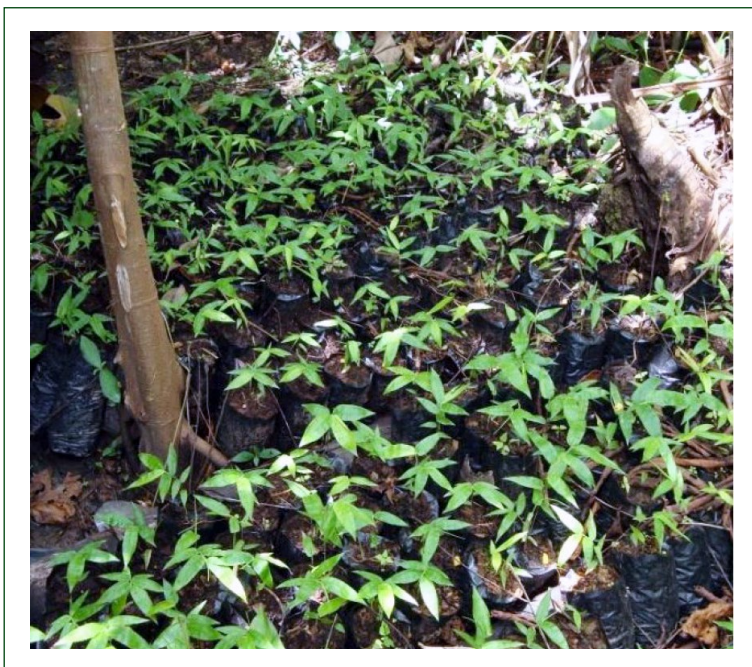


Foto: Miranda, E. (2014).

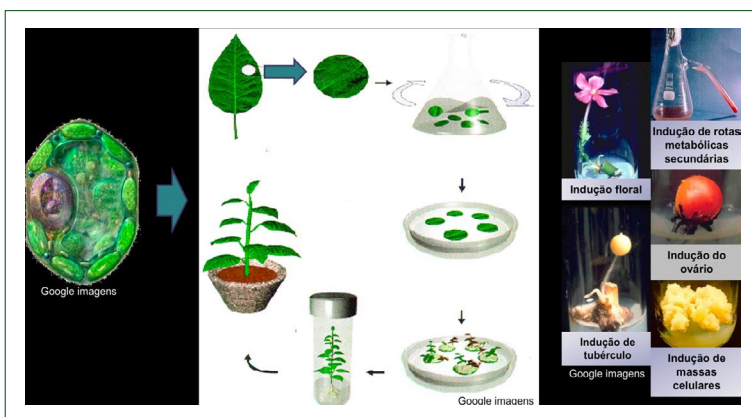
De acordo com Pereira e Beraldo (2010), a principal vantagem da propagação vegetativa é a possibilidade de obtenção de plantas clonais com uniformidade genética e fenotípica. Para a maioria das espécies de *Guadua*, faltam estudos para definir o método mais adequado para sua propagação e para

desenvolver um sistema de produção de mudas com elevadas taxas de sobrevivência (NADHA, *et al.*, 2012; DRUMOND e WIEDMAN, 2017).

2.2 PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BAMBU

A micropropagação é a aplicação mais conhecida da cultura de tecidos vegetais e permite o crescimento e a multiplicação *in vitro* de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, em um meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais controladas, como iluminação e temperatura (CARVALHO, 2006), conforme pode ser observado no esquema abaixo (Figura 6).

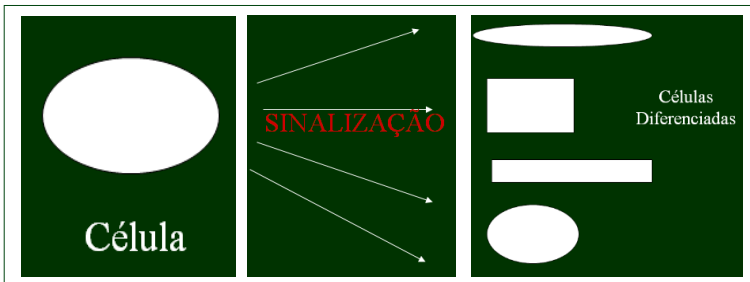
Figura 6 - Micropropagação e rotas de indução



Fonte: Aurora (2013).

Essa metodologia fundamenta-se na teoria da totipotência celular, segundo a qual cada célula de uma planta é capaz de regenerar uma planta inteira, tornando-se possível regenerar várias plantas a partir de uma unidade celular (SOUZA e JUNGHANS, 2007), ou seja, é o potencial de diferenciação de qualquer célula viva (GEORGE 1993), como pode ser observado no esquema abaixo (Figura 7).

Figura 7 - Representação do potencial de diferenciação de qualquer célula viva



Fonte: Fermino Jr (2013).

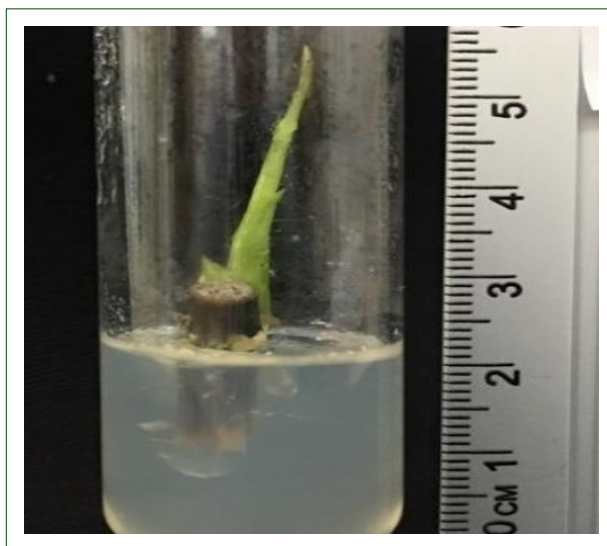
A cultura *in vitro* preserva as amostras trabalhadas por maior intervalo de tempo possível e evita a instabilidade genética. Porém, para que se tenha o êxito esperado, é necessário estabelecer protocolos eficientes para a desinfestação de explantes e a multiplicação de brotos (GENEROSO *et al.*, 2014).

Na cultura de tecidos vegetais, a contaminação pode ser um grande obstáculo para o estabelecimento e a propagação de clones (CID e TEIXEIRA, 2010).

Um dos maiores problemas diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica. Além dessas contaminações superficiais, são comuns contaminações presentes no interior dos tecidos, sendo mais frequentes em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (ABREU *et al.*, 2002).

A contaminação por bactérias em bambus (Figura 8) acontece, geralmente, devido à contaminação endógena dos explantes e plântulas (NADHA, *et al.*, 2012). A contaminação por fungos ocorre devido à deficiência na manipulação durante o subcultivo, à presença de esporos no ambiente onde o subcultivo é realizado, ou à infestação por ácaros (ABREU *et al.*, 2002).

Figura 8 - Contaminação bacteriana (setas) em cultivo *in vitro* de bambus nativos



Fonte: Leão (2017).

O método de propagação *in vitro* possui grande potencial para atender à demanda de material vegetal de bambu com as mesmas características da planta matriz. No entanto, além dos problemas apresentados com contaminação por fungos e bactérias, podem ocorrer necrose dos explantes ou brotos durante a multiplicação, variação somaclonal, baixa porcentagem de enraizamento e sobrevivência durante a fase de aclimatização (NEGI e SAXENA, 2011; SINGH *et al.*, 2013b).

Vários estudos, aliando cultura de tecidos e genética molecular, vêm contribuindo para a avaliação da fidelidade genética de microbrotos de bambus multiplicados em laboratório, pois verificam possíveis mutações genéticas que permitem selecionar apenas o material de boa qualidade para o campo (SINGH, *et al.*, 2013a; KALAIARASI, *et al.*, 2014; GOYAL, *et al.*, 2015).

Apesar de ser problemático e difícil o desenvolvimento de protocolos eficientes de produção de mudas micropropagadas de *Guadua spp.*, devido às altas taxas de contaminação microbiana do material vegetal, trabalhos de identificação e eliminação de contaminantes bacterianos durante a propagação *in vitro* são promissores (NADHA, *et al.*, 2012; DRUMOND e WIEDMAN, 2017).

Diversos tipos de antibióticos já foram empregados e testados com êxito no combate às bactérias que inviabilizam o sucesso dos estudos de micropropagação de bambus, como, por exemplo, canamicic

na e sulfeto de estreptomicina em *Guauda angustifolia* (NADHA, *et al.*, 2012) e sulfato de estreptomicina combinado com hidrócloro de tetraciclina em *Bambusa balcooa* (KHAN *et al.* (2014).

O uso de fungicidas em bambus foi relatado combinado com antibióticos e também de forma isolada. O antifúngico sistêmico Basvistin® é utilizado no controle de fungos em *Dendrocalamus asper*. Além disso, outras substâncias, como cloreto de mercúrio (HgCl₂), são amplamente usadas como agentes desinfestantes (SINGH, *et al.* 2012; KALAIARASI, *et al.*, 2014; GOYAL, *et al.*, 2015).

De acordo com Ribeiro *et al.* (2016), diferentes metodologias para sistemas de cultivo são empregadas na propagação *in vitro* de *Guadua*, como biorreator de imersão temporária (BIT), cultivo *in vitro* em meio líquido (MEL) e meio de cultura padrão. Ademais, Gutiérrez *et al.* (2016) relataram o uso com sucesso do biorreator denominado RITA® para a micropropagação de *Guadua angustifolia*.

A composição do meio de cultivo empregado na micropropagação de bambu, geralmente, tem sido descrita como o meio de Murashige e Skoog (1962), que, além de conter nutrientes necessários à sobrevivência da planta, é imprescindível para favorecer o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal. Constitui-se, basicamente, de sais minerais, macronutrientes e micronutrientes, para garantir o suprimento de elementos minerais, uma fonte de carbono, vitaminas e outros suplementos orgânicos.

Além disso, diversos estudos relatam o uso de reguladores de crescimento combinados entre si ou isoladamente na micropropagação de bambus, como as citocininas benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN) e as auxinas ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) (ARAÚJO *et al.* 2015; SAINI *et al.*, 2016). A definição correta das concentrações dos reguladores de crescimento é de fundamental importância, pois auxilia no sucesso da técnica de micropropagação e reflete no comportamento do explante *in vitro* quando expostos aos reguladores que podem ser de origem endógena ou exógena (Figura 9).

Figura 9 - Hormônios vegetais e seus principais efeitos

Fito-hormônios ¹	Principais efeitos
□ Auxinas	Estimula o alongamento do caule (em baixas concentrações), o crescimento radicular, a diferenciação celular e brotações. Regula o desenvolvimento do fruto, promove a dominância apical, regula o fototropismo e gravitropismo, promove a diferenciação do xilema, retarda a abscisão foliar
□ Citocininas	Afeta o crescimento da raiz, estimula a divisão celular e o crescimento, estimula a germinação, retarda a senescência
□ Giberelinas	Promove a germinação da semente e o desenvolvimento do embrião, a expansão celular, e o desenvolvimento da parte aérea, estimula o florescimento e o desenvolvimento do fruto, afeta o crescimento da raiz e a diferenciação
□ Etileno	Promove o amadurecimento dos frutos, efeito oposto ao de algumas auxinas, promove ou inibe o crescimento e desenvolvimento de raízes, folhas, e flores, dependendo da espécie
□ Ácido Abscísico	Inibe o crescimento, fecha os estômatos durante o estresse hídrico e promove a dormência do embrião

Fonte: Kende & Zeveart (1997).

Vários protocolos de propagação vegetativa *in vitro* foram publicados para diferentes tipos de bambus: *Bambusa edulis* (Lin *et al.*, 2005), *Bambusa nuntans* (Negi e Saxena, 2011; Mehta *et al.*, 2011), *Dracaena sanderiana* (Gradaille *et al.*, 2010), *Bambusa vulgaris* (Ndiaye *et al.*, 2006; Ribeiro, *et al.*, 2016), *Bambusa balcooa* (Mudoj e Borthakur, 2009), *Guadua angustifolia* (Jiménez, *et al.*, 2006; Mendoza, *et al.*, 2010; Nadha, *et al.*, 2012; Gutiérrez, *et al.*, 2016), *Dendrocalamus asper* (Singh, *et al.* 2012; Singh, *et al.* 2013a; Araújo, *et al.*, 2015), *Bambusa arundinacea* (Kalaiarasi, *et al.*, 2014), *Dendrocalamus strictus* (Goyal, *et al.*, 2015) e *Drepanos-tachyum falcatum* (Saini *et al.*, 2016).

Como visto na literatura, ainda são poucos os estudos de cultivo *in vitro* com pesquisas voltadas para o desenvolvimento de métodos adequados e sistemas de produção de mudas com elevadas taxas de sobrevivência para a produção de mudas de bambus do gênero *Guadua*, principalmente para os endêmicos da floresta amazônica.

REFERÊNCIAS

ABREU, L.A.; SANTOS, L. de F.; SOUZA, G. A. B. de; MENDES, R. A. **O uso de benomil em cultura de tecidos**. In: Encontro de Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Resumo dos Trabalhos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 28, 2002.

ARAUJO, C. H. P. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de duas espécies de bambu: *Dendrocalamus asper* (Schultes f.) Backer ex Heyne e *Bambusa oldhamii* Munro. Enciclopédia **Biosfera - Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 11 n. 22; p. 1117-1182, 2015.

CARVALHO, A. L.; NELSON, B. W.; BIANCHINI, M. C.; PLAGNOL, D.; KUPLICH, T. M.; DALY, D. C. Bamboo-dominated forests of the Southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.

CARVALHO, J. M. F. C. *et al.* Embriogênese somática. Campina Grande (Embrapa Algodão. Documentos, 152), p. 35, 2006.

CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos - cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia**. Bogotá, Colombia. 2004.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. **Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal**, in: **Cultivo *in vitro* de plantas**, editor técnico Cid L. P. B., Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, p. 51-66, 2010.

DALY, D. C.; SILVEIRA, M. Primeiro catálogo da flora do Acre, Brasil/First Catalogue of the flora of Acre, Brasil. Rio Branco: Ediufac, v. 1000. 2008, 555 p.

DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil: da biologia à biotecnologia**. Rio de Janeiro: ICH, 2017. 655 p.

FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. P. S. A. Checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). Bamboo science and culture. **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**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas. 58 pp. 2007.

GRADAILLE, M. D.; RODRÍGUEZ, D. P.; MÁZ, Y. L.; TORRIJO, F. S. Propagación *in vitro* de bambú chino (*Dracaena sanderiana* L.). **Ciencia y Tecnología**, v. 3, n. 1, p. 7-13, 2010.

GENEROSO, A. L. **Caracterização morfológica e cultivo *in vitro* de espécies de bambu, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Dissertação Mestrado**, p. 57, 2014.

GOYAL, A. K. *et al.* Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. **Biotech**. v. 5, p. 473-482, 2015.

GUTIÉRREZ, L. G.; LÓPEZ-FRANCO, R.; MORALES-PINZÓN, T. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA. **African Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 28, p.1503-1510, 2016.

JIMÉNEZ, V. M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** n. 86, p. 389-395, 2006.

Clonagem de Bambus Nativos da Amazônia Sul-Occidental

KHAN, H. R. *et al.* Effect of nutrient media and phytohormones on *in vitro* establishment of *bambusa balcooa* Roxb. **International Letters of Natural Sciences**. v. 12, n. 1, p. 1-11, 2014.

KALAIARASI, K. *et al.* Development of an efficient protocol for plant regeneration from nodal explants of recalcitrant bamboo (*Bambusa arundinacea* Retz. Willd) and assessment of genetic fidelity by DNA markers. **Agroforest Syst.** v. 88, p. 527-537, 2014.

LEÃO, J. R. A. **Propagação *in vitro* de *Guadua spp.* nativos da Amazônia Sul-Occidental, Acre, Brasil.** 2017. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências de Florestas Tropicais) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/36348/1/TESE_JOAO.pdf. Acesso em: 01 jul. 2021.

LEÃO, J. R. A.; RAPOSO, A.; SILVA, A. C. L. da; SAMPAIO, P. de T. B. Controle de contaminantes no estabelecimento *in vitro* de *Guadua latifolia*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [S. l.], v. 50, p. e63541, 2020. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/pat/article/view/63541>. Acesso em: 1 jul. 2021.

LIN, C. S.; LIN, C. C.; WEI-CHIN CHANG, W. C. Shoot regeneration, re-flowering and post flowering survival in bamboo inflorescence culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 243-249, 2005.

LONDOÑO, X. La Subtribu Guaduinae de América, SIMPOSIO INTERNACIONAL *GUADUA*; Pereira, Colômbia, 2004.

LOPEZ, O. H. **Bamboo: the gift of the God.** D´vinni Ltda., Bogotá, Colombia, 2003. 553 p.

MENDOZA, M. R. *et al.* Establecimiento de un protocolo para la multiplicación *in vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*): fase 1. **Tierra Tropical**. Costa Rica, v. 6, n. 2, p.191-199, 2010.

MEHTA, R.; SHARMA, V.; SOOD, A.; SHARMA, M.; SHARMA, R. K. Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of *in vitro* derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall. using AFLP markers. **European Journal of Forest Research**, v. 130, p. 729-736, 2011.

MIRANDA, A. F. A. de. **Estudo anatômico do entrenó de *Guadua Kunth* (Poaceae: bambusoideae) ocorrentes no estado do Acre-Brasil**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

MUDOI, K. D.; SAIKIA, S. P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D. BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.

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

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

NADHA, H.; SALWAN, R.; KASANA, R.; ANAND, M.; SOOD, 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.

NEGI, D.; SAXENA, S. *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. **Plant Biotechnology**, v. 5, p. 35-43, 2011.

NDIAYE, A.; DIALLO, M. S.; NIANG, D.; GASSAMA-DIA, Y. K. *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 13, p. 1245-1248, 2006.

Clonagem de Bambus Nativos da Amazônia Sul-Occidental

OLIVIER, J.; PONCY, O. A taxonomical revision of *Guadua weberbaueri* Pilg. and *Guadua sarcocarpa* Londoño & P. M. Peterson (Poaceae). **Candollea**, v. 64, n. 2, p. 171-178, 2009.

OSTAPIV, F.; SALUMON, C.; GONÇALVEZ, M. T. T. Cursos tecnológicos de Bambu *Guadua* no Acre – perspectivas sustentáveis e inovadoras. **Athena - Revista Científica de Educação**. v. 10, n. 10, p.26-38, 2008.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, SP: Canal 6 Editora, 2010. 240 p.

PEREIRA, M. A. R. **Bambu, espécies características e aplicações**. Bauru: UNESP, 2001, 58 p.

RICHA, S. M. L.; NERRU, B. Endogenous levels of plant growth substances in seeds of five bamboo species in relation to seed viability. **Indian J Plant Physiol**, v. 11, n. 4, p. 358, 2006.

RIBEIRO, A.; BRONDANI, G. E.; TORMEN, G. C. R.; FIGUEIREDO, A. J. R. de. Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação. **Nativa**, Sinop, v.4, n.1, p.15-18, 2016.

SAINI, H. *et al.* *In vitro* micropropagation of Himalayan weeping bamboo, *Drepanostachyum falcatum*. **American Journal of Plant Sciences**, v.7, p.1317-1324, 2016.

SAFE, S. **Bambus como recurso florestal** - suas aplicações, manejo, silvicultura, propagação, entomologia e a situação no DF. Monografia (Engenheiro Florestal), Brasília – DF, Universidade de Brasília, p. 50, 2004.

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

SINGH, S. R. *et al.* Evaluation of genetic fidelity of *in Vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA - based markers. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 35, p. 419-430, 2013a.

SINGH, S. R.; SINGH, R.; KALIA, S., DALAL, S.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo - a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 2013b.

SILVEIRA, M. **A floresta aberta com bambu no sudoeste da Amazônia: padrões e processos em múltiplas escalas**. Instituto de Ciências Biológicas, UNB. Tese de doutorado. Brasília - DF, Universidade de Brasília, p. 121, 2001.

SILVEIRA, M. Ecological aspects of bamboo-dominated forest in southwestern Amazonia: an ethnoscience perspective. **Ecotropica**, v. 5, p. 213-216, 1999.

SOUZA, A, da. S.; JUNGHANS, T. G. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 177 - 205.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à Micropropagação de plantas - Cruz das Almas**, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2007.

TOREZAN, J. M. D.; SILVEIRA, M. Biomass of *Guadua weberbaueri* Pilger (Poaceae: Bambusoideae) in bamboo-forest, southwestern of Amazon. **Ecotropica**, v. 6, p. 71-76, 2000.

ZONEAMENTO ECOLÓGICO ECONÔMICO - ZEE. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico Econômico do estado do Acre Fase II: escala 1:250.000. SEMA, Rio Branco, 2006. 356 p.

CAPÍTULO 2

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE BAMBUS

1 INTRODUÇÃO

Os bambus pertencem à família da Poaceae, contém aproximadamente 50 gêneros e 1.300 espécies, que se distribuem nos trópicos e regiões temperadas, com ocorrência prioritária nas zonas quentes e com chuvas abundantes das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América do Sul, crescem naturalmente em todos os continentes, exceto na Europa (LOPEZ, 2003).

Segundo Filgueiras e Gonçalves (2004), o Brasil possui 34 gêneros de bambus, 16 herbáceos e 18

lenhosos, havendo, no total, 232 espécies nativas. Os bambus lenhosos se caracterizam por possuírem rizomas fortes, bem desenvolvidos, brotos protegidos por folhas caulinares, completo sistema de ramificação, lâmina foliar decídua, florações cíclicas e monocárpicas, e, por se desenvolverem em locais abertos, são polinizados pelo vento (LONDOÑO, 2004). Dentre os bambus lenhosos que ocorrem no Brasil, o gênero *Guadua* é considerado endêmico da Amazônia, com aproximadamente 16 espécies (FILGUEIRAS e GONÇALVES, 2004).

Em todo o estado do Acre podem ser encontradas cinco espécies de bambus (SILVEIRA e DALY, 2008). Destas *G. weberbaueri* e *G. sarcocarpa* são caracterizadas por possuírem ampla distribuição (OLIVIER e PONCY, 2009). As espécies *G. superba*, *G. latifolia* e *G. angustifolia* apresentam distribuição mais restrita (SILVEIRA, 2001).

Miranda (2016), ao estudar a anatomia dos entrenós de colmos de bambus desta região identificou cinco espécies de *Guadua* (*Guadua* sp.1, *Guadua* sp.2, *Guadua* sp.3, *Guadua* cf *angustifolia* e *Guadua latifolia*). A autora verificou que todas as espécies possuem grande potencial para construção civil, produção de energia, compósitos e até mesmo de papéis porosos.

De acordo com Ostapiv *et al.* (2008), a utilização racional desse recurso na região amazônica pode ajudar a preservar a floresta, diminuindo a pressão existente sobre o corte de espécies arbóreas e incentivando o manejo sustentável. Em países como Peru,

Bolívia e, especialmente, na Colômbia e Venezuela o *Guadua* é muito utilizado para a construção civil.

O bambu apresenta grande potencial agrícola, por se tratar de uma planta perene renovável, que produz colmos anualmente sem a necessidade de replantio. Além disso, é eficiente no sequestro de carbono, podendo ser utilizado para o reflorestamento de matas ciliares, com inúmeras aplicações tanto ao natural como após processamento adequado (PEREIRA, 2001).

Embora apresentem crescimento rápido e maturação precoce, a natureza monocárpica do bambu tem sido um problema para os programas de melhoramento e para o manejo sustentável das espécies. O uso de sementes para a propagação também é difícil, por estar relacionado à baixa produção e pouca viabilidade, ao difícil armazenamento, à alta taxa de contaminantes microbianos e, principalmente, ao fato de as espécies de grande porte florescerem em intervalos muito longos, além da poliploidia de muitas espécies (SAFE, 2004; SINGH *et al.*, 2013).

Apesar da vasta gama de estudos relacionados com a utilização do bambu na construção civil, arquitetura, energia, biomassa, artesanato, papel e celulose, ainda não há na literatura metodologia que descreva o seu processo de propagação *in vitro*, principalmente, para as espécies endêmicas da Amazônia (SHARMA, *et al.*, 2014; CAEIRO, 2010; PEREIRA NETO *et al.*, 2009; FILGUEIRAS e GONÇALVES, 2004)

Em uma revisão sobre a importância da micropropagação para espécies de bambu, Mudo *et al.*

(2013) citam que já existem estudos de propagação *in vitro* com mais de 40 espécies, os quais se concentram nos gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus*, citando somente o trabalho de Jiménez *et al.*, (2006) para o gênero *Guadua*. Esse fato demonstra que, apesar de já existirem vários estudos de micropropagação com espécies de bambu, pesquisas de propagação *in vitro* com o gênero *Guadua* são de grande importância.

Os bambus do gênero *Guadua* são relatados na literatura científica como possuidores de bactérias endofíticas, ou seja, microrganismos que habitam o interior das plantas (espaços intracelulares) sem causar danos no hospedeiro. Segundo Guo *et al* (2008), a relação entre eles é uma simbiose. Para a espécie *G. angustifolia*, por exemplo, foi relatada a presença bacteriana de *Pantoea agglomerans* e *P. ananatis* endogenamente (NADJA, *et al.*, 2012).

Segundo Costa *et al.* (2010), é comum a contaminação do material vegetal durante o cultivo *in vitro* devido, especialmente, à existência de microrganismos endofíticos e/ou resistentes ao processo de desinfestação, fato prejudicial quando se trabalha com cultura de tecidos, por ocasionar redução do número final do material vegetal obtido.

Diversos autores relatam a utilização de substâncias pré-desinfestantes no combate às contaminações fúngicas ou bacterianas no cultivo *in vitro* de bambu, como hipoclorito de sódio, álcool 70%, cloreto de mercúrio e antibióticos, tais como a carnamicina e o fungicida Benomyl®(Ribeiro *et al.*, 2016). Mais recente-

mente, tem-se a utilização do PPM[®] (*Plant Preservative Mixture*), um biocida sintético, que contém ingredientes ativos que penetram na parede celular de fungos e bactérias, inibem a atividade de enzimas chaves do metabolismo de ciclos centrais, como a do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons, e, com isso, conseguindo neutralizar e impedir o crescimento destes microrganismos (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2015).

O capítulo teve como objetivo relatar os testes preliminares das pesquisas com o bambu do gênero *Guadua spp.* Esses estudos iniciais serviram de base para subsidiar a obtenção de um protocolo de micropropagação para a espécie. Os estudos de micropropagação dos bambus nativos do Acre, especificamente com *Guadua spp.*, vão contribuir para ampliar o conhecimento da biodiversidade amazônica, promover a conservação e o uso sustentável da espécie, podendo auxiliar futuros programas de domesticação e melhoramento genético e, ainda, fortalecer o desenvolvimento econômico da região.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Morfôgenese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, localizado na BR 364, km 14, em Rio Branco, Acre. Para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, foram

utilizados como fonte de explantes segmentos nodais e apicais de plantas de bambu (*Guadua spp.*) oriundas de plântulas recém germinadas coletadas no município acreano de Assis Brasil, na Reserva Extrativista Chico Mendes - S 10°43'02,2" W 69°24'06,5" (área limítrofe entre os municípios de Brasiléia e Assis Brasil, estado do Acre, no Igarapé Paciência, afluente do Rio Xapuri). As plantas foram colocadas em vasos, contendo uma mistura de terra, substrato comercial e esterco (1:1:1), foram mantidas em casa de vegetação a uma temperatura 30 °C, com 88% umidade relativa, e receberam pulverizações semanais contendo o fungicida sistêmico Amistar® (0,42g/L⁻¹). As coletas das seções caulinares foram realizadas 48 horas após a pulverização com o fungicida.

Em todos os experimentos, as amostras caulinares coletadas na casa de vegetação foram conduzidas ao laboratório, onde as gemas apicais e/ou laterais com cerca de 3cm a 5cm foram selecionadas. Posteriormente, procedeu-se a limpeza inicial dos explantes, com lavagem em água com detergente neutro por 10 minutos, e foram esfregados com escova de cerdas bem finas. Em seguida foram lavados por 10 minutos em água corrente, depois lavados por três vezes em água destilada e autoclavada e encaminhados para a câmara de fluxo laminar.

Os meios de cultura utilizados tiveram o pH ajustado para 5,8 e foram autoclavados por 15 minutos a 1,1kgf/cm² em temperatura de 121 °C. O preparo do material vegetal, meio de cultura e a inoculação foram feitos em condições assépticas. Após serem ino-

culadas, as culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($30\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas de luz.

2.1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Foram realizados 6 experimentos de estabelecimento *in vitro*. No primeiro, foi verificado qual o melhor tipo de explante; no segundo, foi avaliado como a retirada dos apêndices (espinhos) afeta os índices brotação e contaminação; no terceiro, foi verificado o tempo de exposição dos explantes na solução de pré-desinfestação; no quarto, a importância da utilização de solução de pré-desinfestação para redução dos agentes contaminantes no cultivo *in vitro*; no quinto e sexto, foram avaliados os meios de cultura WPM e MS e a utilização do PPM® (*Plant Preservative Mixture*).

2.1.1 TIPO DE EXPLANTE

Foram realizados dois experimentos, utilizando a metodologia descrita abaixo. Em um deles, foram utilizadas gemas apicais e no outro as gemas laterais de bambu (*Guadua sp.*).

Após a limpeza inicial as gemas laterais e apicais foram conduzidas à câmara de fluxo laminar, onde foi realizada a desinfestação. Os explantes foram imersos nas seguintes soluções de pré-desinfestação: a) Amistar® (0,34g/L⁻¹); b) cloreto de benzalcônio (0,5g/L⁻¹); e c) Amistar® (0,34g/L⁻¹) + cloreto de benzalcônio (0,5g/L⁻¹) por 15 minutos. Após, foram lavados em água destilada e autoclavada e imersos em álcool etílico a 70% (v/v), por um minuto, e depois em hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos, seguidos de uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios preenchidos com 10ml de meio de cultura MS, suplementado com sacarose (30 g/L⁻¹), solidificado com ágar (6g/L⁻¹), 2mg/L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e contendo diferentes concentrações de PPM® (2, 4, 6 e 8ml/L⁻¹) e na sua ausência.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 15 tratamentos num arranjo fatorial 3x5, composto de três soluções de pré-desinfestação e cinco concentrações de PPM® com 12 repetições cada, sendo um explante por parcela.

As avaliações foram realizadas 30 dias após a inoculação. Foram avaliados o número de brotos, os percentuais de contaminações por observação visual e a sobrevivência através na análise visual dos explantes sadios.

2.1.2 PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ESPINHO NO EXPLANTE

As amostras caulinares coletadas foram conduzidas ao laboratório e, com auxílio de um bisturi, as bainhas das gemas laterais foram retiradas, deixando-as expostas, e 50% do material teve seus espinhos laterais retirados. Após a limpeza inicial, as gemas foram conduzidas à câmara de fluxo laminar, onde foi realizada a desinfestação. O material foi mergulhado em solução de pré-desinfestação, composta por Amistar® (0,34 g/L⁻¹) e cloreto de benzalcônio (0,5g/L⁻¹) por 5 minutos. Em seguida, foi lavado em água destilada e autoclavada e imerso no álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto. Após este procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) por 10 minutos seguido por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Os explantes foram inoculados nos tubos de ensaios preenchidos com 10ml de meio de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30g/L⁻¹), solidificado com diferentes concentrações de ágar (4, 5 e 6g/L⁻¹), 3mg/L⁻¹ BAP e contendo diferentes concentrações de PPM® (3, 4 e 5ml/L⁻¹) e na sua ausência.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com doze tratamentos distribuídos em arranjo fatorial 2x3x4 (2 tipos de explantes x 3 concentrações de ágar x 4 concentrações de PPM®) com 12 repetições cada, sendo um explante por parcela. As

avaliações foram realizadas após 30 dias da inoculação. Foram avaliados o número de brotos, percentuais de contaminações por fungos e bactérias por observação visual e a sobrevivência através na análise visual dos explantes saudios.

2.1.3 TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO EXPLANTE À SOLUÇÃO DE DESINFESTAÇÃO

As gemas laterais coletadas foram conduzidas ao laboratório e tiveram seus espinhos e bainhas retirados. Com as gemas expostas, ocorreu a limpeza inicial e o material foi conduzido à câmara de fluxo laminar, onde foi mergulhado em solução de pré-desinfestação composta por Amistar® (0,34g/L⁻¹) e cloreto de benzalcônio (0,5g/L⁻¹) por 0, 5 e 10 minutos. Em seguida, foi lavado em água destilada e autoclavada e imerso em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto. Após este procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio 2,5% com 5 gotas de detergente neutro por 10 minutos, seguido por triplíce lavagem em água destilada e autoclavada.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios preenchidos com 10ml de meio de cultura MS suplementado com sacarose (30 g/L⁻¹), solidificado com ágar (6g/L⁻¹) e 2mg/L⁻¹ de BAP e contendo diferentes concentrações de PPM® (2 e 4ml/L⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com seis tratamentos com 24 repetições, sendo um explante por parcela. As avaliações foram realizadas após 30 dias da inoculação. Foram avaliados o número de brotos, os percentuais de contaminações por fungos e bactérias por observação visual e a sobrevivência através na análise visual dos explantes sadios.

2.1.4 USO DE SOLUÇÃO DE PRÉ-DESINFESTAÇÃO

Os segmentos nodais foram coletados em casa de vegetação e as gemas laterais selecionadas foram expostas pela remoção da bainha. Estas foram lavadas em água com detergente neutro por 10 minutos e esfregados com escova de cerdas bem finas, em seguida foram lavadas por 10 minutos em água corrente e então lavadas por 3 vezes em água destilada e autoclavada.

Em seguida, o material foi conduzido à câmara de fluxo laminar, onde foi realizada a desinfestação. Parte dos explantes foi mergulhada em solução de pré-desinfestação - cloreto de benzalcônio ($0,5\text{g/L}^{-1}$) e Amistar® ($0,34\text{g/L}^{-1}$) por 5 minutos e a outra parte ficou em água destilada. Após, foram lavados em água autoclavada e destilada e imersos em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto. E, então, mergulhados em hipoclorito de sódio a 10% (v/v) por um minuto.

clorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) com 5 gotas de detergente neutro por 10 minutos seguidos por uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios preenchidos com 10ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30g/L^{-1}), solidificado com ágar (6g/L^{-1}), BAP (2mg/L^{-1}) e *Plant Preservative Mixture* (PPM®) (2ml/L^{-1}) e na sua ausência

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos, cada um com 12 repetições, sendo um explante por parcela. As avaliações foram realizadas ao final de 30 dias com a quantificação do número de brotos, as contaminações foram determinadas por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante e a sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes sadios.

2.1.5 UTILIZAÇÃO DO MEIO WPM

Após a limpeza inicial, as gemas laterais foram conduzidas à câmara de fluxo laminar, onde foram mergulhadas em solução de pré-desinfestação composta por Amistar® ($0,34\text{g/L}^{-1}$) e cloreto de benzalcônio ($0,5\text{g/L}^{-1}$) por 10 minutos, lavadas em água destilada e autoclavada e imersas no álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto.

Após esse procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio, (contendo 2,5% de cloro ativo) com 5 gotas de detergente neutro por 10 minutos. Em seguida, foi realizada tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

O material foi inoculado em tubos de ensaios preenchidos com 10ml de meio de cultura WPM (Wood Plant Medium), elaborado por Loyd e Mccown, (1980) suplementado com sacarose (30g/L^{-1}), solidificado com ágar (6g/L^{-1}) e contendo diferentes concentrações de PPM[®] (0,5; 1 e 2ml/L^{-1}) e na sua ausência.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e com 12 repetições, totalizando 48 parcelas, sendo um explante por parcela. As avaliações foram realizadas ao final de 30 dias com a quantificação do número de brotos. As contaminações foram determinadas por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante, e a sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes sadios.

2.1.6 UTILIZAÇÃO DO MEIO MS

Após a limpeza inicial, as gemas laterais foram conduzidas à câmara de fluxo laminar, onde foram mergulhadas em solução de pré-desinfestação composta por Amistar[®] ($0,34\text{g/L}^{-1}$) e cloreto de benzalcônio ($0,5\text{g/L}^{-1}$) por 10 minutos, lavadas em água

destilada e autoclavada e imersas no álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto.

Após este procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo), com 5 algumas gotas de detergente neutro por 10 minutos, seguido por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Os explantes foram inoculados nos tubos de ensaios, preenchidos com 10ml de meio de cultura MS Murashige e Skoog, (1962), suplementado com sacarose (30g/L^{-1}), solidificado com ágar (6g/L^{-1}) e contendo diferentes concentrações (1; 2; 4; 6 e 8ml/L^{-1}) de *Plant Preservative Mixture*[®] e na sua ausência.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e com 12 repetições, sendo um explante por parcela. As avaliações foram realizadas ao final de 30 dias, com a quantificação do número de brotos, as contaminações foram determinadas por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante e a sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes sadios.

2.2 ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE BAMBU

Após a limpeza inicial, as gemas laterais foram conduzidas à câmara de fluxo laminar, onde foram mergulhadas em solução de pré-desinfestação composta por Amistar® (0,34g/L⁻¹) e cloreto de benzalcônio (0,5g/L⁻¹) por 10 minutos, lavadas em água destilada e autoclavada e imersas no álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto. Após este procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo), com 5 gotas de detergente neutro por 10 minutos, seguido por triplíc lavagem em água destilada e autoclavada.

Para a indução da multiplicação *in vitro*, os explantes foram inoculados nos tubos de ensaios preenchidos com 10ml de meio de cultura MS Murashige e Skoog, (1962), suplementado com sacarose (30g/L⁻¹), solidificado com ágar (6g/L⁻¹), contendo 2,0ml/L⁻¹ de PPM® e contendo diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; e 4,0mg/L⁻¹) da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e na sua ausência.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e com 12 repetições, com um explante por parcela. As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo, período em que foram observados números de brotos e presença de calos. As contaminações foram determinadas por

avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante. A sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes saudios.

Para a indução do enraizamento *in vitro*, os explantes foram então inoculados nos frascos de vidro preenchidos com 30ml de meio de cultura MS Murashige e Skoog (1962), suplementado com sacarose (30g/L⁻¹), solidificado com ágar (6g/L⁻¹), contendo 2,0ml/L⁻¹ PPM® e contendo diferentes concentrações (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1 e 2mg/L⁻¹) de ácido indolbutírico (AIB).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 repetições com 4 explantes por repetição. As avaliações foram realizadas após 30 dias, e as variáveis analisadas foram porcentagem de enraizamento, contaminação bacteriana e fúngica e sobrevivência de explantes.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e atendendo ao princípio da normalidade e homogeneidade dos dados. O programa estatístico usado foi o Assistat 7.7, desenvolvido pela UFCCG, Paraíba. Quando não significativo, foram apresentadas apenas as médias dos tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A micropropagação de espécies florestais tem sido um dos grandes desafios para a Biotecnologia, principalmente na fase inicial do estabelecimento do cultivo *in vitro*. Têm-se dificuldades na obtenção de tecidos livres de contaminações provocadas por fungos, bactérias e também por oxidação provocada pelos compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

3.1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

As células meristemáticas possuem capacidade de alta plasticidade, ou seja, são aptas a originar todos os tipos celulares que formam o corpo do organismo. A esse mecanismo chama-se de totipotência celular. Elas são encontradas nos meristemas apicais e laterais. Neste estudo, foi verificado que a utilização da gema apical de bambu é inviável, pois ocorreu 100% de contaminações em todos os tratamentos realizados e o material foi descartado. Possivelmente, isso aconteceu devido à maneira como a gema apical está protegida, envolta por inúmeras folhas jovens, que acumulam microrganismos em seu interior.

Para as gemas laterais, que se encontram nos segmentos nodais, verificou-se que a utilização de so-

lução de pré-desintestação composta por Amistar® e cloreto de benzalcônio, independentemente da dosagem de PPM® foi a que proporcionou maior número de explantes saudios, porém não foram observadas brotações (Tabela 1).

Tabela 1 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua sp.*) em diferentes combinações de Amistar® e cloreto de benzalcônio com presença de gema lateral

PPM® + SPD ml/L ¹ + g/L ⁻¹	Número de brotos	Cont. bacteriana (%)	Cont. fúngica (%)	Explantos saudios (%)
0+amistar	0	8,33	58,33	33,33
2+amistar	0	0	83,33	16,66
4+amistar	0	0	75	25
6+amistar	0	0	91,66	33,33
8+amistar	0	0	83,33	16,66
Média	0,00	1,66	75,00	25,00
0+cloreto	0	0	58,33	33,33
2+cloreto	0	0	50	33,33
4+cloreto	0	0	58,33	33,33
6+cloreto	0	0	100	33,33
8+cloreto	0	0	66,66	0
Média	0,00	0,00	75,00	26,66
0+A+C	0	0	8,3	81,66
2+A+C	0	0	0	81,66
4+A+C	0	0	0	100
6+A+C	0	0	33,33	16,66
8+A+C	0	0	0	100
Média	0,00	0,00	8,33	75,99

Fonte: Leão (2017).

SPD - Solução Pré-Desinfestante; A-Amistar®

C- Cloreto de Benzalcônio.

Os explantes de bambu que apresentavam espinhos não emitiram brotações. Eles permaneciam vivos, mas quiescentes. Verifica-se, na tabela 2, que a retirada dos espinhos parece induzir as brotações, mas, ao mesmo tempo, verifica-se que essa retirada também pode favorecer as contaminações devido à injúria mecânica aplicada ao explante no momento da remoção do espinho. As dosagens de PPM[®] utilizadas, combinadas com as concentrações de ágar, não foram eficientes na formação de brotações e no controle de microrganismos.

Tabela 2 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua sp.*) em diferentes concentrações de *Plant Preservative Mixture* (PPM[®]), consistência de Ágar e com remoção de espinhos

PPM+Ágar ml/L ⁻¹ /g/L ⁻¹	Número de brotos		Sobrevivência (%)		Cont. bacteriana (%)		Cont. fúngica (%)	
	SE*	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE
0/4	8,3	0	8,3	0	25	0	66,6	83,4
0/5	0	0	0	0	8,3	16,6	83,3	58,4
0/6	16,6	0	16,6	0	25	0	49,9	100
3/4	0	0	0	0	75	16,6	0	83,4
3/5	8,3	0	8,3	0	33,3	8,3	8,3	83,4
3/6	0	0	0	0	66,6	8,4	0	91,6
4/4	8,3	0	8,3	0	25	0	16,6	91,6
4/5	16,6	0	16,6	0	33,3	0	16,6	100
4/6	0	0	0	0	16,6	0	83,3	66,6
5/4	0	0	0	0	25	8,3	75	66,6
5/5	8,3	0	8,3	0	49,9	8,3	33,3	75
5/6	8,3	0	8,3	0	25	8,3	49,9	75
Média	6,23	0,00	6,23	0,00	33,33	0,00	25,00	87,50

Fonte: Leão (2017).

Nota: SE - Sem Espinho; CE - Com Espinho.

O tempo de exposição dos explantes às substâncias pré-desinfestantes foi eficiente na formação adventícia de brotos, no controle de microrganismos, sobrevivência e sanidade dos explantes. A utilização da solução de pré-desinfestação por 5 minutos e a dosagem de 4ml/L⁻¹ de PPM[®], inserida no meio de cultura, propiciou maior índice de sobrevivência (Tabela 3), porém foi a dosagem de 2ml/L⁻¹ de PPM[®] que possibilitou o maior número de brotações.

Tabela 3 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua sp.*) em diferentes tempos de exposição a soluções pré-desinfestante (SPD) e diferentes concentrações de *Plant Preservative Mixture* (PPM[®])

Tempo +PPM [®]	Número de brotos	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%)	Sobrevivência de explantes (%)
0 min./2	0	67	25	25
0 min./4	0	17	33	25
5 min./2	21	8	12	45
5 min./4	12	17	4	67
10 min./2	45	16	0	48
10 min./4	41	21	0	53
Média	19,83	24,33	12,33	48,83

Soluções Pré-Desinfestante (SPD): Amistar[®] e Cloreto de Benzalcônio. TE - Tempo de Exposição

A utilização dos componentes Amistar[®] e cloreto de benzalcônio na fase de pré-desinfestação possibilitou o incremento no número de brotos. Houve o controle das contaminações microbianas,

e 45% de explantes sobreviveram (Tabela 4), o que demonstra que esses componentes juntos são mais eficientes quando comparados com a sua não utilização durante a assepsia do material vegetal. O Amistar® é um antifúngico sistêmico bastante utilizado na agricultura, como atividade predominantemente preventiva, mas também na ação curativa e anti-esporulante. É usado em pulverização para o controle de contaminantes da parte aérea de várias culturas. O cloreto de benzalcônio é amplamente utilizado na indústria química como antimicrobiano, desodorizadores, desinfetantes, fungicidas, algicidas e conservantes.

Tabela 4 - Estabelecimento de explantes de segmentos nodais de bambu em meio MS na presença e ausência de substâncias pré-desinfestantes - SPD (Amistar® e cloreto de benzalcônio)

Tratamento	Número de brotos	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%)	Sobrevivência de explantes (%)
Sem desinfestação	0	67	25	25
Com desinfestação	21	9	11	45
Média	10,5	38	18	35

Fonte: Leão (2017).

A fase de estabelecimento de cultivo *in vitro* é de suma importância para o processo de micropropagação, pois um número elevado de microbrotos estabelecidos proporcionará material sadio para as

fases subsequentes. Com os experimentos anteriores, verificou-se: que é importante a utilização da solução de pré-desinfestação; que as gemas apicais devem ser evitadas para o início do cultivo; que os espinhos devem ser retirados dos segmentos nodais; e que as gemas laterais devem ter sua bainha retirada ficando expostas.

Com o intuito de aumentar a taxa de sobrevivência durante o estabelecimento e também fazer com que os explantes estabelecidos iniciassem o processo de emissão de brotos, foram realizados mais dois experimentos.

A utilização do meio de cultura WPM associado com o uso do PPM[®] não foi eficiente para controlar as contaminações por bactérias, o que apresentou altos percentuais (Tabela 5). Já a contaminação fúngica pode ser controlada com a associação dos tratamentos de assepsia e o uso do PPM[®]. Porém, não foi observada a emissão de brotações.

Tabela 5 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua sp.*) em diferentes concentrações do *Plant Preservative Mixture* (PPM[®]) em meio WPM

PPM [®] ml/L ⁻¹	Número de brotos	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%)	Sobrevivência de explantes (%)
0	0	91	0	9
0,5	0	59	0	41
1	0	81	8	9
2	0	68	8	25
Média	0	74,75	4	21

Fonte: Leão (2017).

O *Plant Preservative Mixture* (PPM®) é um biocida sintético que contém ingredientes ativos, os quais penetram na parede celular de fungos e bactérias, inibindo a atividade de enzimas chaves do metabolismo de ciclos centrais, como a do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons, e com isso consegue neutralizar e impedir o crescimento dos microrganismos (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2015).

Verifica-se que as dosagens utilizadas no experimento não foram suficientes para impedir o crescimento de bactérias. Em estudos de cultivo *in vitro* com *Guadua angustifolia*, Cruz *et al.* (2007) e Ramires *et al.* (2009) relatam que a fase de estabelecimento é crítica para esta espécie, por ocorrer muitas perdas devido a contaminações de origem bacteriana.

Problemas com contaminações fúngicas e/ou bacterianas são considerados uma das maiores desvantagens quando se trabalha com cultura de tecidos, por ocasionar redução do número final do material vegetal obtido (CALVETE e LESSA, 1995).

Segundo Costa *et al.* (2010), é comum a contaminação do material vegetal durante o cultivo *in vitro*, devido especialmente à existência de microrganismos endofíticos e/ou resistentes ao processo de desinfestação. Além disso, as substâncias desinfetantes geralmente utilizadas em protocolos de desinfestação para a micropropagação são capazes de eliminar apenas os microrganismos que estão na parte superficial do explante, mantendo intactos aqueles que estão em seu interior (OLIVEIRA, 2009).

Em se tratando da cultura do bambu, o aparecimento de contaminações de origem endógena (SILVA, 2006) tem sido um dos principais problemas no processo de estabelecimento *in vitro*, pois o sucesso para uma micropropagação de qualidade está em conseguir eliminar esses microrganismos por meio do desenvolvimento de um protocolo de desinfestação eficiente do explante a ser utilizado na inoculação.

Vários trabalhos relatam a utilização da pré-desinfestação para o estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares em várias espécies de bambu. Khan *et al* (2014) verificaram a utilização de solução contendo substâncias fungicidas e bactericidas em *Bambusa balcooa*. Os autores relatam problemas com as contaminações, mesmo após a re-esterilização do material e o desenvolvimento de plântulas *in vitro* não ter sido exitoso.

Foi realizado outro experimento de estabelecimento utilizando o meio de cultura MS e verifica-se na tabela 6 que a utilização de PPM[®] promoveu redução nas contaminações e que a dosagem de 8ml/L⁻¹ do biocida foi eficiente para controlar as contaminações tanto por bactérias, como por fungos e garantir a sobrevivência dos segmentos nodais de bambu *Guadua sp*. Apesar de vivos, os explantes mantiveram-se quiescentes e não emitiram brotações.

Tabela 6 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua sp.*) em meio MS com diferentes concentrações do *Plant Preservative Mixture* (PPM®)

PPM® ml/L ⁻¹	Número de brotos	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%)	Sobrevivência de explantes (%)
0	0	91	17	0
1	0	0	41	59
2	0	17	59	41
4	0	9	50	41
6	0	18	18	67
8	0	0	8	100
Média	0	22,5	44,17	51,33

Fonte: Leão (2017).

O PPM® é uma substância relativamente nova e o seu uso na cultura de tecidos vegetais tem sido satisfatório na eliminação dos contaminantes em várias espécies. Campton e Kock (2001), ao estudar o efeito de diferentes dosagens dessa substância na organogênese *in vitro* de melão, petúnia e tabaco, verificaram que dependendo da espécie as diferentes dosagens do biocida podem ou não afetar a regeneração *in vitro*, ou seja, cada espécie tem uma resposta morfogênética diferente.

Paredes *et al.* (2014) verificaram que ocorre altos índices de contaminações na propagação *in vitro* de bulbos de *Traubia modesta*, espécie endêmica do Chile, com a utilização de 1ml/L⁻¹ de PPM®, dados que corroboram com o presente estudo.

Miyazaki *et al.* (2010) verificaram que a infiltração a vácuo de 5ml/L⁻¹ de PPM® em gemas axilares

de *Petunia hybrida* é suficiente para eliminar os contaminantes bacterianos desta espécie quando cultivada *in vitro*. Pérez *et al.* (2012) verificaram que a utilização de 2ml/L⁻¹ de PPM[®] foi eficiente para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de cedro e mogno. Jiménez *et al.* 2006 observaram 52% de contaminações em segmentos nodais de *Guadua angustifolia*, utilizando esta mesma concentração de PPM[®].

Com relação a todos os experimentos de estabelecimento realizados, pode-se observar que os segmentos nodais, quando são inoculados, apresentam coloração verde, mas em pouco tempo vão escurecendo, até o ponto de se tornarem completamente marrons. Uma provável explicação é que, como os segmentos nodais são relativamente novos, são formados por camadas de folhas caulinares que protegem a gema, então o escurecimento observado é a necrose destas folhas e as brotações observadas surgem do local onde a gema ficou exposta (Figura 1A).

Figura 1 - Segmentos nodais de bambu com início de brotações em meio MS suplementado com sacarose, ágar, BAP e PPM®. Segmentos nodais escurecidos com 30 dias (A) e presença de folhas amarelas com 60 dias (B)

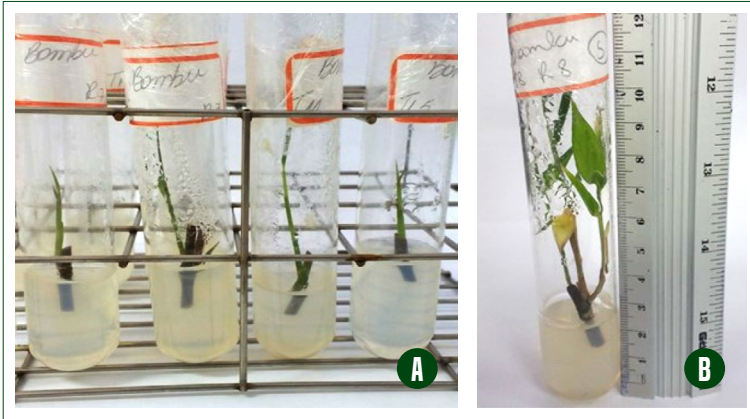


Foto: Raposo, A (2016).

Após as avaliações, os explantes que apresentavam início de brotações eram colocados por mais 30 dias em sala de crescimento, visando à obtenção de material para iniciar os experimentos de multiplicação, porém, estes começaram a apresentar alteração na coloração das folhas e as plântulas começaram a secar (Figura 1B). O mesmo fato foi verificado por Nandha *et al.* (2012) ao estudar a eliminação de bactérias *in vitro* na propagação de *Guadua angustifolia*.

Khan *et al.* (2014), ao estudar o estabelecimento *in vitro* de *Bambusa balcooa*, verificaram a ocorrência de secagem e morte de plântulas após o estabelecimento da cultura asséptica, dados estes que corroboram com o presente trabalho.

Com 60 dias de inoculação, o material foi transferido para novo meio de cultura, após o secamento das plântulas, e então o material foi enviado ao laboratório de Bromatologia da Embrapa Acre. Os resultados das análises bromatológicas foram comparados com dados da literatura e verificou-se que não estava ocorrendo deficiência nutricional nas plantas.

Não existe relato científico de fitotoxicidade em folhas de plantas cultivadas *in vitro* quanto ao uso de PPM®. Pelo exposto, a hipótese seria o aumento na concentração do gás etileno e CO₂ dentro do microambiente do recipiente motivado pela vedação hermética empregada no fechamento dos frascos. Segundo Erig e Shurch (2005), o ambiente *in vitro* proporciona menores trocas gasosas com o ambiente externo, alta umidade relativa, alta concentração de etileno e baixa concentração de CO₂. O etileno é um gás produzido pelos vegetais e pode influenciar no desenvolvimento das culturas *in vitro* e, quando em altas concentrações, promove a senescência e abscisão foliar.

3.2 ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE BAMBU

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são resultado da divisão e da diferenciação celular organizada, fatores regulados pela interação e balanço dos

reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). A interação entre esses reguladores de crescimento e as células vai indicar se o explante está ou não em um estágio responsivo. A organogênese diz respeito à diferenciação celular que ocorre nos explantes mediante a formação de um novo órgão pela adição de estímulos exógenos.

De acordo com Gutiérrez *et al.* (2016) e Manzur (1988), na micropropagação de *G. angustifolia*, as gemas laterais dos segmentos nodais são ativadas pelo uso de reguladores de crescimento e, então, ocorre o desenvolvimento intercalar do meristema com as raízes emergindo da parte basal dos nós, formando imediatamente o rizoma, que é a estrutura fundamental da micropropagação desta espécie.

Na multiplicação, esperou-se que o uso de reguladores de crescimento favorecesse a indução de múltiplas brotações. No presente trabalho, a citocinina utilizada para induzir as múltiplas brotações foi a BAP. Porém, conforme pode ser observado na tabela 7, em todos os tratamentos ocorreram altas taxas de contaminações, o que inviabilizou o experimento.

Tabela 7 - Multiplicação *in vitro* de brotos de bambu (*Guadua sp.*) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP)

BAP mg/L ⁻¹	Número de brotos	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%)
0	0	9	91
0,5	0	17	100
1	0	0	100
2	0	25	100
4	0	18	91
Média	0	13,8	96,4

Fonte: Leão (2017).

Vários protocolos de propagação vegetativa *in vitro* já foram publicados para diferentes tipos de bambu: *Bambusa edulis* (Lin *et al.*, 2005), *Dracaena sanderiana* (Gradaille *et al.*, 2010), *Bambusa nutans* (Mehta *et al.*, 2010), *Bambusa vulgaris* (Negi e Saxena, 2011), *Bambusa balcooa* (Mudoj e Borthakur, 2009). Para a espécie *Guadua angustifolia*, Jiménez *et al.* (2006) relatam que a utilização de 3mg/L⁻¹ de BAP proporcionou melhor taxa de multiplicação em meio semissólido e Gutiérrrez *et al* (2016) verificaram que a utilização de meio líquido, suplementado com 2,5mg/L⁻¹ de BAP, com imersão temporária e a não divisão dos microbrotos, proporcionou melhores taxas de multiplicação.

No enraizamento *in vitro*, o objetivo é promover a rizogênese da planta em estudo. A indução desse processo ocorre na presença de auxinas inseridas no meio de cultura. Na tabela 8, observam-se os resultados do experimento de enraizamento *in vitro*.

Ocorreram altos índices de contaminação por fungos e bactérias em todos os tratamentos. Apesar disso, nos tratamentos com 0 e 0,75mg/L⁻¹ de AIB, foi verificada a formação inicial de raízes.

Tabela 8 - Enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua sp.*) em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

AIB mg/L ⁻¹	Raízes (%)	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%)	Sobrevivência de explantes
0	32	16	82	16
0,25	15	33	100	0
0,5	15	15	100	0
0,75	50	15	66	15
1	0	33	100	0
2	0	17	100	0
Média	18,67	21,50	91,33	5,17

Fonte: Leão (2017).

Apesar de alguns explantes apresentarem início de emissão de radícula, estavam contaminados, o que inviabilizou a continuação do experimento. O material que não apresentou contaminação manteve-se estável, porém não respondeu positivamente às características observadas como brotações e emissão de raízes.

Mudoi *et al.* (2013) e Singh *et al.* (2013b) relatam que na micropropagação de bambus existem limitações quanto ao uso de técnicas biotecnológicas. Nas duas revisões, observa-se que para o gênero *Guadua* somente um trabalho foi realizado em 2006 (Jiménez *et al.*, 2006),

obtendo sucesso na rizogênese sem a necessidade de dosagem externa de auxina, pois as raízes surgiram espontaneamente a partir da fase de multiplicação.

Vários trabalhos têm relatado a utilização de auxinas no meio de cultura para o enraizamento em diversas espécies de bambu. Jiménez *et al.* (2006) observaram que, para a espécie *G. angustifolia*, não há a necessidade da utilização de reguladores de crescimento, pois as raízes surgem espontaneamente após 69 dias de cultivo *in vitro* em meio MS contendo 3mg/L^{-1} de BAP. Gutiérrez *et al.* (2016) verificaram que a utilização de meio líquido, suplementado com $2,5\text{mg/L}^{-1}$ de BAP, imersão temporária e a não divisão dos microbrotos, proporcionou melhores taxas de multiplicação *in vitro* para *G. angustifolia* (2,7 brotos por explante original) e o surgimento de raízes sem a necessidade da utilização de auxinas.

4 CONCLUSÃO

- Para trabalhos de propagação *in vitro* com bambu, devem ser utilizados segmentos nodais, com gemas laterais, e os espinhos devem ser retirados quando presentes;

- A retirada da bainha que cobre a gema lateral é indicada para o estabelecimento *in vitro*, pois facilita o contato com o meio nutritivo e com as substâncias desinfestantes;

- O microambiente do frasco de cultura possivelmente afeta o desenvolvimento foliar dos microbrotos;
- As contaminações endógenas provocam grandes perdas de material no estabelecimento *in vitro*;
- A utilização de solução pré-desinfestante e do biocida PPM® é essencial para diminuir os agentes contaminantes e promover o estabelecimento *in vitro* de bambu nativo (*Guadua spp.*).

REFERÊNCIAS

- CAEIRO, J. G. B. M., **Construção em bambu**. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Arquitetura, Lisboa, 2010.
- CALVETE, E. O.; LESSA, A. O. **Controle de fungos e Bactérias na Propagação *in vitro* de Dietes bicolor**. Disciplina de Tópicos Especiais em Floricultura –AGRP 67 do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 1995.
- CARVALHO, J. E. U.; NAZARÉ, R. F. R.; OLIVEIRA, W. M. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) com rendimento industrial superior. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Cruz das Almas, v. 25, p. 326-328, 2003.
- COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. **Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgão de plantas**, 17-59. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Ed.). Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 2010.
- COMPTON, M. E.; KOCH, J. M. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM®) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant**, v. 37, p. 259-261, 2001.
- CRUZ, M.; GARCÍA, Y.; SÁNCHEZ, C. ALVARADO, Y.; ACOSTA, M.; ROQUE, B.; LEIVA, M.; FREIRE, M. Identificación y control de *Bacillus sp.*, contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. **Biotechnol. Veg.** v. 7, p. 9-13 2007.

Clonagem de Bambus Nativos da Amazônia Sul-Occidental

ERIG, A.C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 961-965, 2005.

FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. P. S. A Checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **Bamboo Science and Culture. 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.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas. 2007, 58 p.

GRADAILLE, M. D.; RODRÍGEZ, D. P., MÁZ, Y. L., TORRIJO, F. S. Propagación *in vitro* de bambú Chino (*Dracaena sanderiana* L.). **Ciencia y Tecnología**, v. 3, n. 1, p. 7-13, 2010.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture.** Exegetics, Edington. v.1, 1996, 555 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture.** Eversley, Exegetics. 1984, 709 p.

GUO, B.; WANG, Y., SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 136-142, 2008.

GUSMÃO, E.; VIEIRA F. A.; FONSECA JUNIOR, E. M. F. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 84 -91, 2006.

GUTIÉRREZ, L. G.; LÓPEZ-FRANCO, R.; MORALES-PINZÓN, T. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA. **African Journal of Biotechnology**. v.15, n.28, p.1503-1510, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Diagnóstico Ambiental da Amazônia Legal** (CD-ROM). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro. 1997.

JIMÉNEZ, V. M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** n. 86, p. 389-395, 2006.

KHAN, H. R. *et al.* Effect of nutrient media and phytohormones on *in vitro* establishment of *bambusa balcooa* Roxb. **International Letters of Natural Sciences.** v.12, n.1, p.1-11, 2014.

LEÃO, J. R. A. **Propagação *in vitro* de *Guadua spp.* nativos da Amazônia Sul-Ocidental, Acre, Brasil.** 2017. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências de Florestas Tropicais) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/36348/1/TESE_JOAO.pdf. Acesso em: 01 jul. 2021.

LIN, C. S., LIN, C. C., WEI-CHIN CHANG, W. C. Shoot regeneration, reflowering and post flowering survival in bamboo inflorescence culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 82, p. 243-249, 2005.

LONDOÑO, X. La subtribu Guaduinae de América, SIMPOSIO INTERNACIONAL *GUADUA*; Pereira, Colômbia, 2004.

LONDOÑO, X. P. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambus del nuevo mundo. **Cespedezia.** v.19, p. 87-137, 1992.

LOPEZ, O. H. **Bamboo: the gift of the God.** D´vinni Ltda., Bogotá, Colombia, 2003. 553 p.

LOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MANZUR, D. Propagacion vegetativa de *Guadua angustifolia* Kunth. **Agronomia**, v.2 n. 3, p. 14-19, 1988.

MEHTA, R.; SHARMA, V.; SOOD, A.; SHARMA, M.; SHARMA, R. K. Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of *in vitro*-derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall. using AFLP markers. **European Journal of Forest Research**, n. 130, p. 729-736, 2011.

MIRANDA, A. F. A. de. **Estudo anatômico do entrenó de *Guadua Kunth* (Poaceae: bambusoideae) ocorrentes no estado do Acre-Brasil**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, 2016.

MIYAZAKI, J.; TAN, B. H.; ERRINGTON, S. G. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPM®). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 3, p. 365-372, 2010.

MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. **Establecimiento de cultivos de tecidos vegetales *in vitro***. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.) Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, CIAT. p. 19-40, 1991.

MUDOI, K. D.; SAIKIA, S. P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D. BORTHAKUR, M. Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 20, p. 2770-2785, 2013.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, n. 15, p. 473-497, 1962.

NADJA, H. K.; SALWAN, R.; KASANA, R. C.; ANAND, M.; SOOD, A. Identification and elimination of bacterial contamination during *in vitro* propagation of *Guaduaangustifolia* Kunth. **Pharmacognosy Magazine**. v. 8, n. 30, p.9 3-97, 2012.

NEGI, D.; SAXENA, S. *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. **Plant Biotechnology**, v. 5, p. 35-43, 2011.

PAREDES, K.; DELAVEAU, C.; CARRASCO, P.; BAEZA, C.; MORA, F.; URIBE, M. E. *In vitro* bulbing for the propagation of *Traubia modesta* (Amaryllidaceae), a threatened plant endemic to Chile. **Ciencia y Investigación Agraria**, Santiago, v. 41, n. 2, p. 207-214, 2014.

OLIVIER, J.; PONCY, O. A taxonomical revision of *Guadua weberbaueri* Pilg. and *Guadua sarcocarpa* Londoño & P. M. Peterson (Poaceae). **Candollea**, v. 64, n. 2, p. 171-178, 2009

OLIVEIRA, J. F. de; LEMOS, E. E. P. de; REZENDE, L. de P. Desenvolvimento de métodos de micropropagação para produção de mudas de bambu – *Bambusa nutan* G.C. Wall Ex Munro. **Ciência Agrícola**. v. 10, n. 1, p. 25-29, 2012.

OLIVEIRA, J. P. de. **Produção de mudas *in vitro* e ocorrência de microrganismos endofíticos em bananeiras da Amazônia Sul-Occidental**. Rio Branco, 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco-Acre, 2009.

OSTAPIV, F.; SALUMON, C.; GONÇALVEZ, M. T. T. Cursos tecnológicos de Bambu *Guadua* no Acre – perspectivas sustentáveis e inovadoras. **Athena - Revista Científica de Educação**. v.10, n.10, p. 26-38, 2008.

PLANT CELL TECHNOLOGY. Disponível em: <<http://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information>>. Acesso em: 05 maio 2015.

PEREIRA NETO, J. S.; MINAÁ, A. J. S.; FURTADO, D. A.; NASCIMENTO, J. W. B. Aplicação do bambu nas construções rurais. *Revista Educação Agrícola Superior, Brasília*, v. 24, n. 2, p. 67-77, 2009;

PEREIRA, M. A. R. **Bambu, espécies, características e aplicações**. UNESP/CAMPUS DE BAURU, 2001, 58 p.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, SP: Canal6 Editora, 2010, 240 p.

PRANCE, G. T. American tropical forest. Tropical rain forest ecosystem, biogeographical and ecological studies, Ecosystem of the world 14B, **Tropical forest ecosystem** (Ed by H. Lieth & M.J.A. Werger), New York, Elsevier Scientific Publications. p. 99-132. 1989.

RAMÍREZ, L. A.; CASTAÑO, S. M.; LÓPEZ, R. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. **Rev. Investig. Univ. Quindío**, v. 19, p. 151-158, 2009.

RIBEIRO, A.; BRONDANI, G. E.; TORMEN, G. C.R.; FIGUEIREDO, A. J. R. de. Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação. **Nativa**, Sinop, v.4, n.1, p.15-18, 2016.

SAFE, S. **Bambus como recurso florestal** - suas aplicações, manejo, silvicultura, propagação, entomologia e a situação no DF. Monografia (Engenheiro Florestal), Brasília - DF, Universidade de Brasília, p. 50, 2004.

SANTOS, H. R. B.; RIBEIRO, M. S.; MEDEIROS, D. B.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Morfometria de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Scientia Plena**, v. 8, p. 1-4, 2012.

SHARMA, P.; DHANWANTRI, K.; MEHTA, S. Bamboo as a building material

International Journal of Civil Engineering Research. v. 5, n. 3, p. 249-254, 2014.

SILVA, R. M. de C. O. Bambu no Brasil e no Mundo. In: ENCONTRO DA ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2006. 45 p.

SILVEIRA, M. **A floresta aberta com bambu no sudoeste da Amazônia: padrões e processos em múltiplas escalas**. Instituto de Ciências Biológicas, UNB. Tese de doutorado. Universidade Federal de Brasília, 2001, 121 p.

SILVEIRA, M. Ecological aspects of bamboo-dominated forest in southwestern Amazonia: an ethnosciences perspective. **Ecotropica**, v. 5, p. 213-216, 1999.

Clonagem de Bambus Nativos da Amazônia Sul-Occidental

SINGH, S. R., SINGH, R., KALIA, S., DALAL, S., DHAWAN, A. K., KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo - a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 2013.

TOREZAN, J. M. D, SILVEIRA, M. Biomass of *Guadua weberbaueri* Pilger (Poaceae: Bambusoideae) in bamboo-forest, southwestern of Amazon. **Ecotropica**, v. 6, p. 71-76, 2000.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, Rio de Janeiro. 1991.

CAPÍTULO 3

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BAMBUS

1 INTRODUÇÃO

Os bambus do gênero *Guadua* possuem importância significativa e são amplamente utilizados na construção civil, produção de carvão, indústria farmacêutica, papel e celulose, além de seu potencial uso na arquitetura (GONÇALVES, 2014). Devido às características agronômicas e tecnológicas, os bambus se tornam uma matéria-prima alternativa à madeira, capaz de fazer frente às demandas emergentes de diversos setores da indústria florestal (RIBAS, 2010; SHARMA e SARMA, 2011).

Sob o ponto de vista ambiental, sua principal função está relacionada à mitigação de problemas ambientais, uma vez que atua na recuperação de áreas degradadas, seus rizomas se mostram eficientes para promover a estabilização dos efeitos de degradação do solo, podendo reduzir a erosão em até 75% (SHARMA e SARMA, 2011; BARBOSA e DINIZ, 2010).

Além do papel ambiental de controlar a erosão do solo, o bambu é um ótimo sequestrador de carbono, mostrando-se como uma cultura renovável e ecologicamente correta (OSSE e MEIRELES, 2011). A Poaceae *Bambusa vulgaris*, por exemplo, possui mais de 51% de carbono no peso total de sua biomassa acima do solo e subterrânea (ANSELMO FILHO *et al.*, 2004).

Na Amazônia Brasileira existe uma extensa floresta natural de bambu, que ocupa uma área de aproximadamente 161.500km², compreendendo o estado do Acre e se estendendo até a fronteira com Peru e Bolívia (CARVALHO *et. al*, 2013).

Em todo o Estado, podem ser encontradas cinco espécies de bambus (SILVEIRA e DALY, 2008). Destas, as espécies *G. weberbaueri* e *G. sarcocarpa* são caracterizadas por possuírem ampla distribuição. Já as *G. superba*, *G. latifolia* e *G. angustifolia* apresentam distribuição mais restrita (SILVEIRA, 2001).

Miranda (2016), ao estudar a anatomia dos entrenós de colmos de bambus que ocorrem no Acre, identificou cinco espécies de *Guadua* (*Guadua* sp.1, *Guadua* sp.2, *Guadua* sp.3, *Guadua* cf *angustifolia* e *Guadua latifolia*). A autora verificou que todas

possuem grande potencial para construção civil, produção de energia, de compósitos e até mesmo de papéis porosos.

O bambu é uma planta monocárpica, ou seja, após a floração, morre. As sementes possuem pouca viabilidade, devido a baixos níveis de auxinas e ácido abscísico endógenos, além de serem espécies que florescem em intervalos muito longos. Esses fatores tornam a propagação sexuada extremamente difícil (RICHA e NERRU, 2006).

A reprodução assexuada pode ser realizada através das partes vegetativas da planta, tais como ramos, gemas, colmos e rizomas. Cada espécie possui uma forma de propagação preferencial, devido às suas características ecológicas (CASTAÑO e MORENO, 2004; PEREIRA e BERALDO, 2010). De acordo com Pereira e Beraldo (2010), a principal vantagem da propagação vegetativa é a possibilidade de obtenção de plantas clonais com uniformidade genética e fenotípica.

Para a maioria das espécies de *Guadua* faltam estudos para definir o método mais adequado para sua propagação e para desenvolver um sistema de produção de mudas com elevadas taxas de sobrevivência. De acordo com Fonseca (2007), os métodos tradicionais de propagação vegetativa do bambu não são adequados, são trabalhosos, caros e de baixo rendimento. Dentro desse contexto, as técnicas de propagação *in vitro* têm surgido como uma alternativa, visando obter métodos mais eficazes e confiáveis para a propagação das espécies.

A produção de mudas de bambu desse gênero em escala industrial e com o emprego da técnica de micropropagação é recente. Contudo, a contaminação microbiana ainda é o principal problema enfrentado na fase de estabelecimento dos cultivos *in vitro* (NADHA *et al.*, 2012).

Vários protocolos disponíveis na literatura científica descrevem a propagação *in vitro* de espécies de bambus exóticos, como *Bambusa edulis* (LIN *et al.*, 2005), *Bambusa nutans* (MEHTA *et al.*, 2011), *Dracaena sanderiana* (GRADAILLE *et al.*, 2010), *Bambusa vulgaris* (RIBEIRO, *et al.*, 2016), *Bambusa balcooa* (MUDOI e BORTHAKUR, 2009), *Dendrocalamus asper* (ARAÚJO, *et al.*, 2015), *Bambusa arundinacea* (KALAIARASI, *et al.*, 2014), *Dendrocalamus strictus* (GOYAL, *et al.*, 2015), *Drepanostachyum falcatum* (SAINI *et al.*, 2016).

Para o gênero *Guadua*, os trabalhos que descrevem metodologias com o uso da técnica de micropropagação se limitam à espécie *Guadua angustifolia* (JIMÉNEZ, *et al.*, 2006; MENDOZA, *et al.*, 2010; NADHA, *et al.*, 2012; GUTIÉRREZ, *et al.*, 2016). Todavia, estudos com bambus nativos na Amazônia acreana são inexistentes.

O bambu está se tornando uma importante cultura para a erradicação da pobreza e o desenvolvimento ambiental. Em todo o mundo, são mais de 2,5 bilhões de pessoas que dependem economicamente da planta (SINGH *et al.*, 2013). Somado a esse fato, tem-se a demanda por produtos ecologicamente corretos e, como consequência, uma expectativa no aumento do uso de materiais produzidos por essas espécies.

E, apesar da importância social, cultural e econômica dos bambus, a planta ainda é pouco difundida, devido à grande dificuldade em propagá-la convencionalmente. O fato demonstra a grande importância de trabalhos relacionados à propagação *in vitro* das espécies.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método de micropropagação de segmentos nodais de bambus nativos (*Guadua latifolia*) ocorrentes no estado do Acre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, localizado na Br 364, km 14, em Rio Branco Acre, nos anos de 2014 a 2017. Para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais de plantas de bambu (*Guadua latifolia*) oriundas de mudas coletadas na Reserva Extrativista Chico Mendes no município de Assis Brasil - AC, no dia 27 de agosto de 2014, coordenadas geográficas: S10°43'02.2" W 69°24'06.5". Estas foram colocadas em vasos, contendo uma mistura de terra, substrato comercial e esterco (1:1:1) e mantidas em casa de vegetação a uma temperatura 30 °C e com 88% umidade relativa, recebendo pulverizações semanais com fungicida sistêmico Amistar® (0,42g/L⁻¹). As co-

letas das seções caulinares foram realizadas 48 horas após a pulverização com o fungicida.

Os meios de cultura utilizados tiveram pH ajustado para 5,8 com auxílio das soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) e foram autoclavados por 15 minutos a 1,1kgf/cm² em temperatura de 121°C. O preparo do material vegetal, meio de cultura e a inoculação foram feitos em condições assépticas. Após serem inoculadas, as culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de 25 ± 2°C, com lâmpadas fluorescentes Philips TDL (30µmol. m². s⁻¹) e fotoperíodo de 16 horas de luz.

2.1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE BAMBU (FASE 0)

Os segmentos nodais coletados na casa de vegetação foram conduzidos ao laboratório para a seleção dos explantes que continham aproximadamente 3cm e possuíam uma gema axilar (Figura 1). Estes tiveram seus espinhos e bainhas retirados, deixando as gemas expostas. Então foram lavados em água corrente com detergente neutro por 5 minutos e esfregados com escova de cerdas finas e macias, logo após foram lavados por três vezes em água destilada.

Figura 1 - Microestacas de *Guadua latifolia* selecionados para estabelecimento *in vitro*. Gema lateral exposta, sem a presença de bainha caulinar e espinhos (seta).



Fonte: Leão (2017).

Em seguida, o material foi conduzido à câmara de fluxo laminar, onde esteve mergulhado em solução de pré-desinfestação de Amistar® (0,34g/L⁻¹) e cloreto de benzalcônio (0,5g/L⁻¹) por 10 minutos, então lavados em água destilada e autoclavada e imersos em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto. Após esse procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio (NaClO) com 2,5% de cloro ativo e contendo 3 gotas de detergente neutro por 10 minutos. Logo após, foi realizada tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Ainda na câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados em frascos de vidro (250ml de capacidade) preenchidos com 30ml de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semissólido suplementado com sacarose (30g/L^{-1}), solidificado com ágar (6g/L^{-1}), contendo 2mg/L^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP) e diferentes concentrações de *Plant Preservative Mixture* - PPM[®] (0, 2 e 3ml/L^{-1}).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos com 24 repetições, sendo quatro explantes por parcela (frasco). As avaliações foram realizadas após 15 dias da inoculação. As variáveis avaliadas foram os percentuais de contaminação por fungos e bactérias por meio de observação visual da formação de colônias bacterianas, número de brotações pela verificação da expansão da gema axilar, formando um broto e porcentagem de brotos vivos ao final do experimento.

2.2 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE BAMBU (FASE 1)

Após a escolha do melhor tratamento de desinfestação, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10ml de meio de cultura MS líquido, suplementado com sacarose (30g/L^{-1}), 2ml/L^{-1} de PPM[®] e contendo diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (0, 2, 4, 6 e 8mg/L^{-1}).

Após dois subcultivos consecutivos com 21 e 17 dias de duração, os experimentos foram avaliados. As variáveis analisadas foram número de brotações, altura do maior broto, número de folhas, presença de raiz, calo e taxa de multiplicação. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 24 repetições por tratamento, sendo que cada tubo de ensaio continha um explante.

2.3 ENRAIZAMENTO E PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO DE BAMBU (FASE 2 E 3)

Para o enraizamento brotos com aproximadamente 4cm de altura oriundos do experimento anterior foram removidos e inoculados em meio de cultura MS, suplementados com sacarose (15g/L^{-1}), com diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0 e $2,0\text{mg/L}^{-1}$) de ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 repetições por tratamento, cada tubo de ensaio representava uma parcela. A avaliação foi realizada após 30 dias. As variáveis analisadas foram porcentagem de enraizamento, número raízes, comprimento da raiz principal, número de folhas, comprimento da parte aérea e necrose.

A pré-aclimatização das plantas completas formadas *in vitro* foi previamente realizada em sala de crescimento (temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz), com a transferência das plantas para recipientes, medindo 10 centímetros de diâmetro e 8cm de profundidade (capacidade de 500ml) e contendo substrato comercial do tipo Plant-max[®] devidamente esterilizado em autoclave, com irrigações diárias de forma manual. Aos 25 dias de pré-aclimatização, foi verificado número de folhas, comprimento das mudas e número de novas brotações e taxa de sobrevivência.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados, utilizando-se a análise de variância (ANOVA), atendendo ao princípio da normalidade e homogeneidade dos dados. O programa estatístico usado foi o Assisat 7.7 desenvolvido pela UFCG, Paraíba.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE BAMBU (FASE 0)

Aos quatro dias após a inoculação dos segmentos nodais, em meio de cultura MS semissólido, foi observado o início da regeneração dos brotos de bambu que se desenvolveram até a finalização do experimento, o que ocorreu no décimo quinto dia (Figura 2). Após essa fase, o material estabelecido e sem contaminações aparentes foi transferido para um novo meio de cultura, no estado líquido para indução das múltiplas brotações.

Figura 2 - Brotação axilar de bambu (*Guadua latifolia*) após 15 dias de cultivo. Brotações em 2ml/L⁻¹ de PPM® (A). Brotações em 3ml/L⁻¹ de PPM® (B).



Fonte: Leão (2017).

Foi observado que após os primeiros quinze dias de cultivo *in vitro* as folhas dos brotos formados começam a ficar amareladas quase que completamente, apesar da alta qualidade das brotações. O mesmo fato foi verificado por Nadha *et al.* (2012) ao estudar a eliminação de bactérias *in vitro* na propagação de *Guadua angustifolia*.

Não existe relato científico de fitotoxicidade em folhas de plantas cultivadas *in vitro* quanto ao uso de PPM®. O fabricante recomenda a dosagem de 0,5 a 1,0ml/L⁻¹ para evitar o efeito tóxico às plantas (NIEZ, 1998). Pelo exposto, a hipótese seria o aumento na concentração do gás etileno e CO₂ dentro do microambiente do recipiente motivado pela vedação hermética empregada no fechamento dos frascos.

Um frasco de cultivo *in vitro* possui um microambiente que parece homogêneo, mas existem vários fatores, tais como a quantidade de meio de cultura, o tipo de frasco de vedação, que interferem na estabilidade desse microambiente e também podem influenciar o comportamento da planta *in vitro* (BANDEIRA *et al.*, 2007).

Segundo Erig e Shurch (2005), o ambiente *in vitro* proporciona menores trocas gasosas com o ambiente externo, alta umidade relativa, alta concentração de etileno e baixa concentração de CO₂. O etileno é um gás produzido pelos vegetais e pode influenciar no desenvolvimento das culturas *in vitro*. Quando produzido em altas concentrações, promove a senescência e abscisão foliar (ERIG e SCHUCH, 2005).

A análise bromatológica dos brotos micropropagados confirmou que as concentrações de macro e micronutrientes usados na composição do meio de cultura estava adequado à nutrição dos explantes, excluindo-se o fator deficiência nutricional das plantas como causa do amarelecimento das folhas (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise bromatológica de plântulas de bambu (*Guadua latifolia*) submetidas ao cultivo *in vitro*

(%)		Macronutrientes (g/kg)						Micronutrientes (g/kg)			
MS	N	Ca	Mg	P	K	Na	S	Cu	Fe	Mn	Zn
90,9	3,6	4,4	2,5	1,4	29,3	0,4	2,9	0	266,6	98	33,1

Fonte: Leão (2017).

Fonte: Embrapa Acre. MS - Matéria seca.

Para a espécie *Bambusa balcooa*, foi verificado o comportamento *in vitro* semelhante durante a fase de estabelecimento em que as plântulas tornavam-se secas e ocorria posterior necrose, dados que corroboram com este estudo (KHAN *et al.*, 2014).

O PPM® em cultura de tecidos tem sido empregado pelo amplo espectro de atuação do produto na eliminação de bactérias e fungos, apesar de não ser o agente desinfetante mais usado em espécies de bambu quando comparando aos antibióticos, fungicidas e outras substâncias químicas, conforme pode ser verificado na Tabela 2.

Tabela 2 - Utilização de diferentes agentes desinfestantes no estabelecimento *in vitro* de bambus comparado com o uso de PPM®

Espécies	Desinfestação	Referência
<i>Bambusa arundinacea</i>	bavistin, HgCl ₂ *	Kalaiarasi <i>et al.</i> (2014)
<i>B. oldhamii</i>	etanol, NaClO, estreptomicina	Araújo <i>et al.</i> (2015)
<i>B. vulgaris</i>	benomyl, etanol, NaClO**	Ribeiro <i>et al.</i> (2016)
<i>B. balcooa</i>	bavistin, estreptomicina, tetraciclina	Khan <i>et al.</i> (2014)
<i>Dendrocalamus strictus</i>	HgCl ₂ , etanol	Goyal <i>et al.</i> (2015)
<i>D. asper</i>	estreptomicina+tetraciclina, bavistin, HgCl ₂ , etanol	Singh <i>et al.</i> (2012)
<i>D. asper</i>	etanol, NaClO	Araújo <i>et al.</i> (2015)
<i>Drepanostachyum falcatum</i>	HgCl ₂ , etanol	Saini <i>et al.</i> (2016)
<i>Guadua angustifolia</i>	benomyl+estreptomicina, NaClO, etanol	Mendoza <i>et al.</i> (2010)
<i>G. angustifolia</i>	benomyl+agrimicina, NaClO, PPM®***	Jiménez <i>et al.</i> (2006)
<i>G. angustifolia</i>	etanol+NaClO	Correa (2013)
<i>G. angustifolia</i>	bavistin, HgCl ₂ e etanol	Nadha <i>et al.</i> (2012)
<i>G. latifolia</i>	amistar+cloreto de benzalcônio, etanol, NaClO e PPM®	Leão <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Leão (2017).

Nota: *Cloreto de Mercúrio, ** Hipoclorito de Sódio *** *Plant Preservative Mixture*.

Segundo a Tabela 2, apenas para o gênero *Guadua*, houve relato da utilização do PPM de acordo com a literatura científica levantada sobre micropropagação de bambus. Os estudos que citavam a utilização desse biocida como agente desinfestante para *G. angustifolia* foram na ordem de 25%, apesar de seu uso também ser descrito para outras espécies de forma exitosa.

No levantamento de outros trabalhos relacionados à desinfestação de explantes *in vitro*, foi observado que, para as espécies *Cucumis melo*, *Petunia hybrida*, *Nicotiana tabacum* e *Traubia modesta*, a utilização de PPM® está amplamente recomendada (COMPTON E KOCH, 2001; MIYAZAKI, *et al.*, 2010; PAREDES, *et al.* 2014).

O *Plant Preservative Mixture* (PPM) é uma mistura de metilcloroisotiazolinona (2,0 a 2,6g/L⁻¹) e metilisotiazolinona (0,6 a 0,8g/L⁻¹), pertencentes ao grupo das isotiazolonas, que são usadas na prevenção e redução do crescimento de contaminantes orgânicos no meio de cultura de plantas micropropagadas, atuando como eletrófilos na reação da cisteína e glutatona (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2015, patente n. 5750402).

Neste estudo, a atuação do biocida sintético não favoreceu o aumento do número de brotação, porém foi decisivo na eliminação e controle dos agentes contaminantes no meio de cultura e na sobrevivência das brotações, possibilitando o sucesso no estabelecimento do material vegetal em laboratório. A dosagem contendo 2ml/L⁻¹ foi eficiente na redução da porcentagem de contaminação bacteriana e fúngica, sendo, estatisticamente, similar à dosagem indicada pelo fabricante para plantas lenhosas que é de 3ml/L⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua latifolia*) após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS semissólido suplementado com 2mg/L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de PPM®

PPM® ml/L ⁻¹	Número de brotos	Contaminação por bactérias (%)	Contaminação por fungos (%)	Sobrevivência (%)
0	0,55 b	57,50 b	40,00 b	40,00 b
2	1,20 a	20,00 a	10,00 a	92,50 a
3	1,28 a	25,00 a	25,00 ab	77,50 a
CV%	8,22	13,17	16,83	5,81

Fonte: Leão (2017).

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); PPM®. *Plant Preservative Mixture*.

Neste estudo, houve redução da contaminação bacteriana e fúngica nos tratamentos onde havia a presença do biocida. Comparativamente, o tratamento controle apresentou estatisticamente resultados inferiores devido ao aumento na porcentagem de contaminação nas variáveis analisadas por causa da ausência da mistura preservativa no meio de cultura (Tabela 3).

A contaminação do material vegetal durante o cultivo *in vitro* é devida especialmente à existência de microrganismos endofíticos e resistentes ao processo de desinfestação (COSTA *et al.*, 2010). Além disso, as substâncias desinfetantes geralmente utilizadas em protocolos de desinfestação para a micropropagação são capazes de eliminar apenas os microrganismos que estão na parte superficial do explante, mantendo intactos aqueles que estão em seu interior (OLIVEIRA, 2009).

Para a propagação *in vitro* do gênero *Guadua*, o aparecimento de contaminações de origem endógena tem sido um dos principais problemas no processo de estabelecimento, pois o sucesso de uma micropropagação de qualidade está em conseguir eliminar esses microrganismos por meio do desenvolvimento de um protocolo de desinfestação eficiente (NADHA, *et al.*, 2012).

O agente desinfetante PPM[®] contém ingredientes ativos que penetram na parede celular de fungos e bactérias, inibindo a atividade de enzimas-chaves do metabolismo de ciclos centrais, como a do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons e, com isso, consegue neutralizar e impedir o crescimento de contaminantes como bactérias endógenas (COMPTON e KOCH, 2001).

O êxito na utilização de PPM[®] na cultura de tecidos também foi relatado por Jiménez *et al.* (2006). Ao estudarem o estabelecimento *in vitro* de *Guadua angustifolia*, verificaram que a concentração de 2mg/L⁻¹ era eficiente no controle de contaminações, reduzindo para 11% a contaminação fúngica e bacteriana quando a fonte de explante era de plantas de casa de vegetação.

A taxa de sobrevivência das brotações *in vitro* foi de aproximadamente 93% e 78% para as duas concentrações de PPM[®] testadas de 2 e 3ml/L⁻¹, respectivamente. Os tratamentos avaliados foram estatisticamente significativos e o tratamento controle apresentou somente 40% de sobrevivência (Tabela 3).

Altas concentrações de PPM® podem ser nocivas ao desenvolvimento dos explantes *in vitro* (dados não publicados).

Resultados de experimentos anteriores (dados não divulgados) descrevem que a utilização de BAP durante os ensaios de estabelecimento favorece o surgimento das brotações *in vitro*. O estudo de Jiménez *et al.* (2006) corrobora com a hipótese de que a responsividade dos brotos à dosagem exógena de BAP é positiva para as espécies do gênero *Guadua*, atuando na indução de múltiplas brotações. O mesmo trabalho também recomenda o meio de cultura MS semissólido como promotor de um ambiente adequado para a iniciação da cultura de bambu.

3.2 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE BAMBU (FASE 1)

A multiplicação *in vitro* foi realizada com os brotos regenerados do experimento de estabelecimento e ao todo foram realizados dois subcultivos consecutivos. As múltiplas brotações adventícias obtidas no primeiro subcultivo não foram individualizadas por apresentarem tamanho reduzido. Também foi observada a característica entoucerante das brotações formadas *in vitro*.

Durante a fase de multiplicação, não foi observada a presença de calos nos explantes, tampouco o surgimento de raízes espontâneas, como relatado por Jiménez *et al.* (2006), em seus estudos com

Guadua angustifolia. Além disso, o variável número de folhas não apresentou significância estatística.

Para a característica número de brotos, verificou-se que no subcultivo 1 e 2 houve significativo aumento no incremento médio de brotações de 2,89 para 3,92 no final do experimento. Os explantes multiplicados em meio de cultura MS líquido mostraram-se dependentes da fonte externa do regulador de crescimento BAP para o aumento no número de brotações independentemente da concentração utilizada (Tabela 4).

Tabela 4 - Multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua latifolia*) em meio de cultura MS líquido em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP)

BAP mg/L ⁻¹	Número de brotos*		Altura de brotos (cm)		Taxa de multiplicação
	Sub. 1	Sub. 2	Sub. 1	Sub. 2**	
0	1,65 b	1,86 b	2,69 b	4,43 a	1,76
2	2,91 a	4,13 a	3,71 a	4,29 a	3,35
4	3,08 a	3,68 a	3,07 ab	3,78 a	3,38
6	3,50 a	4,94 a	4,04 a	4,50 a	4,22
8	3,33 a	5,00 a	3,15 ab	3,50 a	4,17
CV%	44,76	44,06	37,08	38,47	

Fonte: Leão (2017).

* Valores foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$

**Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

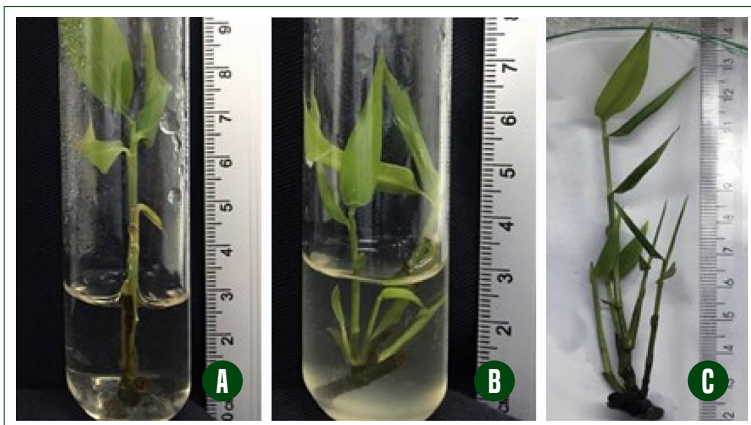
A ausência do regulador de crescimento BAP no tratamento controle afetou significativamente a

variável número de brotos, que apresentou a menor quantidade de brotações regeneradas nos dois subcultivos analisados.

Houve diferença de tempo na avaliação dos subcultivos consecutivos. O primeiro teve duração de 21 dias e o segundo, de 17 dias. Não existe relato científico a respeito do período ideal para a permanência do material *in vitro*. Dessa forma, o curto período de incubação também serviu como estratégia para evitar o amarelecimento das folhas verificadas na fase de estabelecimento, além de ocorrer o controle de contaminantes que eventualmente não foram eliminados na fase anterior.

Ao analisar a variável altura de brotos (Tabela 4), verificou-se que houve diferença estatística entre as concentrações testadas de BAP no subcultivo 1 (Figura 3 A e B). As maiores médias foram observadas nos tratamentos que possuíam 6 e 8mg/L⁻¹ do regulador testado. Ademais, para o subcultivo 2, não houve diferença estatística para o tamanho das brotações desenvolvidas *in vitro* (Figura 3 C). Contudo, essa característica, apesar de importante, não é determinante na multiplicação, pois, caso seja necessário, o alongamento das brotações é realizado na fase de enraizamento.

Figura 3 - Brotos regenerados de bambu (*Guadua latifolia*) após o subcultivo 1. Ausência de brotações em 0mg/L^{-1} de BAP (A). Brotações adventícias em 6mg/L^{-1} de BAP (B). Altura de brotos em 6mg/L^{-1} de BAP (C)



Fonte: Leão (2017).

Nos estudos de Gutiérrez *et al.* (2016), com a multiplicação *in vitro* de *Guadua angustifolia*, foi observado que 3mg/L^{-1} de BAP favoreceu tanto a característica número de brotos quanto altura das brotações, corroborando com os dados obtidos neste trabalho, que constatou a influência do BAP em concentrações de 2mg/L^{-1} ou maiores (Tabela 4).

De acordo com a taxa de multiplicação obtida para cada dosagem testada de BAP, ao final de um ciclo de 180 dias com 6 subcultivos, estimou-se a indução de mais de 5 mil brotos de bambu *Guadua latifolia* com a máxima dosagem testada (Tabela 5).

Tabela 5 - Estimativa da produção de brotos *in vitro* de bambu (*Guadua latifolia*) em seis subcultivos durante 180 dias em meio de cultura MS líquido em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP)

BAP mg/L ⁻¹	Subcultivos					
	1 mês	2 mês	3 mês	4 mês	5 mês	6 mês
0	1,76	3,1	5,45	9,6	16,89	29,72
2	3,35	11,22	37,6	125,94	421,91	1.413,41
4	3,38	11,42	38,61	130,52	441,15	1.491,08
6	4,22	17,81	75,15	317,14	1338,33	5.647,74
8	4,17	17,39	72,51	302,37	1260,9	5.257,95

Fonte: Leão (2017).

A multiplicação de brotos é um importante critério para o sucesso da micropropagação comercial. A citocinina BAP desempenhou papel importante na proliferação de brotos em bambus ao estimular o crescimento e as múltiplas brotações nos estudos de Jiménez *et al.*, (2006) com *G. angustifolia* na concentração de 2mg/L⁻¹. O uso do regulador de crescimento BAP e cinetina (CIN) na fase de multiplicação de *Bambusa balcooa* foi relatado por Gantait *et al.* (2016), com melhor performance para 4mg/L⁻¹. O meio líquido também foi relatado como ideal na fase de multiplicação dos explantes de *Drepanostachyum falcatum* (SAINI, *et al.*, 2016).

3.3 ENRAIZAMENTO E PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO DE BAMBU (FASE 2 E 3)

Neste estudo não houve a formação espontânea de raízes na fase de multiplicação *in vitro* como foi relatado por Jiménez *et al.*, (2006) na micropropagação de *G. angustifolia*, sendo necessária a realização da etapa de rizogênese. Também, não houve surgimento de calos, tampouco vitrificação dos brotos em meio líquido.

As brotações obtidas na fase de multiplicação foram submetidas à rizogênese na presença dos reguladores de crescimento AIA, AIB e ANA. Somente os tratamentos com presença de AIA apresentaram formação de raízes. Na concentração de $0,5\text{mg/L}^{-1}$, foi verificada, estatisticamente, a maior porcentagem de raízes formadas (Tabela 6, Figura 4 A e B). Os demais reguladores testados AIB e ANA não responderam satisfatoriamente, e as plântulas permaneceram quiescentes até a finalização do experimento.

Tabela 6 - Enraizamento *in vitro* de plântulas de bambu (*Guadua latifolia*) em meio de cultura MS líquido contendo diferentes concentrações de ácido indolacético (AIA)

Tratamentos AIA mg/L-1	% de raízes	Número de raízes*	Comprimento raiz (mm)*	Parte aérea (mm)*	Número de brotos*	Número de folhas*	Necrose de plantas*
0	0,0 b	0,0 a	0,0 a	25,47 a	0,17 a	0,33 a	33,33 a
0,5	83,33 a	1,0 a	7,25 a	39,10 a	0,33 a	2,33 a	16,67 a
1	16,67 b	0,33 a	2,25 a	29,53 a	0,33 a	2,33 a	0,00 a
2	33,33 ab	1,0 a	4,68 a	54,26 a	0,83 a	3,00 a	16,67 a
CV %	11,62	16,86	15,44	6,20	15,49	11,29	23,24

Fonte: Leão (2017).

* Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Figura 4 - Plântulas de bambu (*Guadua latifolia*) enraizadas *in vitro* após 30 dias de cultivo. Rizogênese em 0,5mg/L⁻¹ de AIA (A). Rizogênese em 2mg/L⁻¹ de AIA (B).

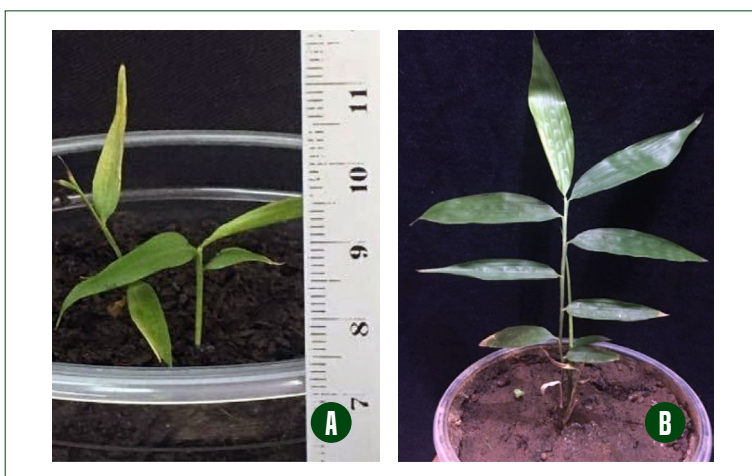


Fonte: Leão (2017).

As variáveis número de raízes, comprimento de raiz, parte aérea, número de brotos, folhas e necrose não demonstraram diferença estatística em nenhum dos tratamentos analisados.

Necessita-se de estudos complementares com foco na utilização de AIA para verificação de diferença quanto ao desempenho deste regulador nos demais parâmetros de enraizamento *in vitro*. A resposta apresentada com o uso deste regulador foi não convencional, se comparado aos demais indutores de rizogênese empregados em cultura de tecidos. Contudo, sua utilização foi decisiva na formação das raízes *in vitro* e possibilitou a formação de raízes e o sucesso na fase de pré-aclimatização e casa de vegetação (Figura 5 A e B).

Figura 5 - Plântulas de bambu (*Guadua latifolia*) pré-aclimatização em sala de crescimento (A). Muda em casa de vegetação com 60 dias (B).



Fonte: Leão (2017).

Os dados deste trabalho são corroborados por Lima Neto *et al.* (2009), que, ao estudarem o enraizamento de *Bambusa vulgares*, verificaram que a utilização de AIA promoveu um maior potencial de enraizamento nas estacas, ao passo que os reguladores ANA e AIB não promoveram uma satisfatória porcentagem de formação de raízes.

O ácido indolacético (AIA) regula todos os aspectos de diferenciação vascular em plantas. O transporte polar de AIA da parte aérea jovem para baixo, através do câmbio para as pontas das raízes, induz e controla a formação de novas raízes (ALONI *et al.*, 2006).

O ácido idolbutírico (AIB) e naftalenoacético (ANA) parecem não influenciar a formação de raízes nas concentrações utilizadas para essa espécie de bambu, apesar do AIB ser uma das auxinas mais utilizadas em cultura de tecidos e ser conhecida por promover enraizamento tanto *in vitro* quanto *ex vitro*.

A utilização de AIB também não favoreceu o desenvolvimento de raízes para a espécie *Guadua angustifolia*, em estudos de produção de mudas por propagação vegetativa (FONSECA, 2007). Porém, foi efetivo, ao aumentar a porcentagem de enraizamento de brotos para a espécie *Bambusa nutan* (OLIVEIRA, *et al.*, 2012).

De encontro aos resultados deste estudo, Gantait *et al.* (2016), ao estudarem o enraizamento de *Bambusa balcooa*, verificaram que a auxina AIB, na concentração de 1mg/L^{-1} , apresentou melhor desempenho na formação de raízes que à auxina AIA em todas as concentrações testadas (0, 1, 2, 3 mg/L^{-1}).

Existe relato do regulador de crescimento ANA atuando de forma positiva nos estudos de enraizamento *in vitro* com a espécie *Aechmea setigera*. Neste trabalho, o número de raízes obtidas foi superior a 10 raízes por explante (LEÃO, *et al.*, 2013).

Segundo Teale *et al.* (2006), as auxinas são controladas por uma família de transportadores de efluxo que se movimentam na membrana plasmática e cujo papel principal é estabelecer gradiente de concentração do regulador, atuando no crescimento de órgãos de forma assimétrica.

As plantas pré-aclimatizadas em sala de crescimento apresentaram média de três folhas expandidas, cinco centímetros de comprimento, um novo broto bem formado e 100% de taxa de sobrevivência, ao final de 25 dias de observação, o que possibilitou o sucesso do ciclo de micropropagação da espécie nativa.

Uma das fases mais críticas na micropropagação é a transição de um meio heterotrófico *in vitro* para o autotrófico *ex vitro*, podendo se ter grandes perdas de indivíduos. Por essa razão, é realizada a aclimação, processo em que as plântulas são expostas gradativamente às condições externas e onde são controladas a luminosidade e a umidade relativa (BATAGIN *et al.*, 2009). As plantas que crescem *in vitro* possuem folhas delgadas, tenras, fina camada de cera epicuticular, fotossinteticamente pouco funcionais, com baixa densidade estomática (AFREEN, 2004), que as tornam mal adaptadas às condições *ex vitro* (SUTTER, 1992), o

que causa perda de água e estresse hídrico nas primeiras horas de aclimatização (BELLINTANI *et al.*, 2007).

A aclimatização de *Bambusa balcooa* foi relatada com sucesso por Gantait *et al.* (2016), além da verificação do desempenho e o crescimento em campo da espécie produzida *in vitro*, comparada com plantas produzidas *in vivo* (macropropagação). Além da propagação *in vitro*, estudos que avaliam fidelidade genética na verificação de anomalias mutagênicas, em nível de DNA ou variação somaclonal, são descritos para os bambus *Dendrocalamus strictus* e *D. asper* como forma de verificar e comprovar a efetividade da micropropagação (GOYAL *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2012).

4 CONCLUSÃO

- O uso de 2mL/L^{-1} de PPM[®] na fase de estabelecimento *in vitro* de *Guadua latifolia* reduz a contaminação bacteriana e fúngica;

- A utilização de 2mg/L^{-1} do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) promove o aumento no número de brotos regenerados e taxa de multiplicação de 3,35 brotos por explante;

- Cada subcultivo deve ter duração de 20 dias, e a troca de meio de cultura deve ser realizada nesse período para evitar o aparecimento de folhas amarelas;

- A concentração de $0,5\text{mg/L}^{-1}$ do ácido indolacético (AIA) na fase de enraizamento favorece o desenvolvimento de raízes adventícias;

- Recomendam-se 25 dias de pré-aclimatização em sala de crescimento antes da retirada das mudas ao viveiro ou casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- FREEN, F. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants. In: KOZAI, T. *et al.* (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system.** Dordrecht: Springer, 2004. p. 59-87
- ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C. I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals... of Botany, Oxford*, n. 97, p. 883-893, 2006.
- ANSELMO FILHO, P.; BADR, O. Biomass resources for energy in North-Eastern Brazil. *Applied Energy*, v. 77, p. 51-67. 2004.
- ARAÚJO, C. H. P. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de duas espécies de bambu: *Dendrocalamus asper* (Schultes f.) Backer ex Heyne e *Bambusa oldhamii* Munro. Enciclopédia **Biosfera - Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.11 n. 22; p. 1117-1182, 2015.
- BANDEIRA, J. M.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A. R.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007.
- BARBOSA, A. C., DINIZ H. N. Controle de processo erosivo provocado por rompimento de adutora na Serra da Mantiqueira, SP, Brasil, *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 20, n. 4, p. 691-702, 2010.

BATAGIN, K. D.; ALMEIDA, C. V.; TANAKA, F. A. O.; ALMEIDA, M. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiro cv. IAC Gomo de Mel micropropagados e aclimatizados em diferentes condições luminosas. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, p. 85-92, 2009.

BELLINTANI, M. C. *et al.* Efeito da ventilação *in vitro* na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1098-1100, 2007.

CARVALHO, A. L.; NELSON, B. W.; BIANCHINI, M. C.; PLAGNOL, D.; KUPLICH, T. M.; DALY, D. C. Bamboo-dominated forests of the Southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves". **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.

CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos – cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia**. Bogotá, Colombia. 2004.

COMPTON, M. E.; KOCH, J. M. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM[®]) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant**, v. 37, p. 259-261, 2001.

CORREA, L. A. R. Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo *in vitro*. Universidad Nacional y a Distancia - UNAD. **Especialización en Biotecnología Agraria**, Bogotá, 2013, 59p.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. **Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgão de plantas**, 17-59. In: Scherwinski-Pereira, J.E. (Ed.). Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 2010.

DALY, D. C.; SILVEIRA, M. **Primeiro catálogo da flora do Acre, Brasil/First Catalogue of the flora of Acre, Brasil**. Rio Branco: Ediufac, v. 1000. 2008, 555p.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FONSECA, F. K. P. da. **Produção de mudas de bambu *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) por propagação vegetativa**. Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) - Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 58 f. 2007.

GANTAIT, S.; PRAMANIK, B. R.; BANERJEE, M. Optimization of planting materials for large scale plantation of *Bambusa balcooa* Roxb.: influence of propagation methods. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S1658077X15300734/1-s2.0-S1658077X15300734-main.pdf?_tid=e1ee2bd0-d6d7-11e7-b697-00000aacb35f&acdnat=1512161015_1d47bcad5530a68f37b118f7a2ce4b58>. Acesso em: 20 dez 2016.

GRADAILLE, M. D.; RODRÍGUEZ, D. P.; MÁZ, Y. L.; TORRIJO, F. S. Propagación *in vitro* de Bambú Chino (*Dracaena sanderiana* L.). **Ciencia y Tecnología**, v. 3, n. 1, p. 7-13, 2010.

GONÇALVES, D. K. C. Construção civil sustentável: a utilização do bambu em Divinópolis Minas Gerais. **Revista Especialize On-line IPOG**, Goiânia, v. 1, n. 7, p. 1-36, jun., 2014.

GOYAL, A. K.; PRADHAN, S.; BASISTHA, B. C.; SEN, A. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. **Biotech**. v. 5, p. 473-482, 2015.

GUTIÉRREZ, L. G. *et al.* Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion

system RITA. **African Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 28, p.1503-1510, jul. 2016.

JIMÉNEZ, V. M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** n. 86, p.389-395, 2006.

KHAN, H. R.; BURLA, S.; SIRI, N.; LAVANYA, P. Effect of nutrient media and phytohormones on *in vitro* establishment of *Bambusa balcooa*. Roxb. **International Letters of Natural Sciences**, v. 17, p. 1-11, 2014.

KALAIARASI, K.; SANGEETHA, P.; SUBRAMANIAM, S. Development of an efficient protocol for plant regeneration from nodal explants of recalcitrant bamboo (*Bambusa arundinacea* Retz. Willd) and assessment of genetic fidelity by DNA markers. **Agroforest Syst.** v. 88, p. 527-537, may 2014.

LEÃO, J. R. A. **Propagação *in vitro* de *Guadua* spp. nativos da Amazônia Sul-Ocidental, Acre, Brasil**. 2017. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências de Florestas Tropicais) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/36348/1/TESE_JOAO.pdf. Acesso em: 01 jul. 2021.

LEÃO, J. R. A. **Micropropagação de *Aechmea setigera* Mart. Ex. Schuly e Schult. F. (Bromeliaceae): uma espécie de bromélia nativa da Amazônia sul-ocidental**. Rio Branco, 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia) – Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2013.

LIMA NETO, *et al.* Enraizamento de estacas de bambu com o uso de auxinas. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambiental**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 175-179, abr./jun. 2009.

LIN, C. S.; LIN, C. C.; WEI-CHIN CHANG, W. C. Shoot regeneration, re-flowering and post flowering survival in bamboo inflorescence culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 243-249, 2005.

MENDOZA, M. R.; TAMAYO, A. C.; PACHECO, A. Establecimiento de un protocolo para la multiplicación *in vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*): fase 1. **Tierra Tropical**. Costa Rica, v. 6, n. 2, p.191-199, 2010.

MEHTA, R.; SHARMA, V.; SOOD, A.; SHARMA, M.; SHARMA, R. K. Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of *in vitro*-derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall. using AFLP markers. **European Journal of Forest Research**, v. 130, p. 729-736, 2011.

MIRANDA, A. F. A. de. **Estudo anatômico do entrenó de *Guadua Kunth* (Poaceae: bambusoideae) ocorrentes no estado do Acre-Brasil**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, 2016.

MIYAZAKI, J.; TAN, B. H.; ERRINGTON, S. G. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPM®). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 3, p. 365-372, 2010.

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

NADHA, H.; SALWAN, R.; KASANA, R.; ANAND, M.; SOOD, 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.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **Horttechnology**, n.8 v.4, out.-dec., p. 598-601, 1998. Disponível em: < <http://horttech.ashspublications.org/content/8/4/598.full.pdf>> Acesso em: 20 mar. 2017.

OLIVEIRA, *et al.* Desenvolvimento de métodos de micropropagação para produção de mudas de bambu - *Bambusa nutan* G.C. Wall EX Munro. **Revista Ciência Agrícola**, Alagoas, v.10, n.1, p. 25-29, 2012.

OSSE, V. C.; MEIRELLES, C. R. M. O potencial do bambu na minimização dos problemas climáticos nos espaços urbanos. **Revista LABVERDE**, n. 3, p. 36-53, 2011.

PAREDES, K.; DELAVEAU, C.; CARRASCO, P.; BAEZA, C.; MORA, F.; URIBE, M. E. *In vitro* bulbing for the propagation of *Traubia modesta* (Amaryllidaceae), a threatened plant endemic to Chile. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 41, n. 2, p. 207-214, 2014.

PEREIRA, M.A.R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, SP: Canal 6 Editora, 240 p. 2010.

PLANT CELL TECHNOLOGY. Disponível em: <<http://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information>>. Acesso em: 05 maio 2015.

RICHA, S. M. L.; NERRU, B. Endogenous levels of plant growth substances in seeds of five bamboo species in relation to seed viability, **Indian J Plant Physiol**, v. 11, n. 4, p. 358, 2006.

RIBAS, R. P. **Bambu: Planta de Grande Potencial no Desenvolvimento Sustentável**. 2010.

RIBEIRO, A. dos S. *et al.* Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação. **Nativa**, Sinop, v. 4, n. 1, p.15-18, 2016.

SAINI, H.; ARYA, I. D.; ARYA, S. SHARMA, R. *In vitro* micropropagation of Himalayan weeping bamboo, *Drepanostachyum falcatum*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p.1317-1324, 2016.

SHARMA, P., SARMA, K. P. *In vitro* propagation of *Bambusa balcooa* for a better environment. International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences, 2011.

SILVEIRA, M. **A floresta aberta com bambu no sudoeste da Amazônia: padrões e processos em múltiplas escalas**. Instituto de Ciências Biológicas, UNB. Tese de doutorado. 121 p. 2001.

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

SINGH, S. R. *et al.* Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA - based markers. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 35, p. 419-430, 2013.

SUTTER, E.G.; SHACKEL, K.; DÍAZ, J. C. Acclimatization of tissue cultured plants. **Acta Horticultrae**, v. 314, p. 115-119, 1992.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxina em ação: o transporte de sinalização e controle do crescimento e desenvolvimento das plantas. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 7, p. 847-859, 2006.

CAPÍTULO 4

CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE BAMBUS

1 INTRODUÇÃO

De todas as florestas do planeta, cerca de 3% delas são de bambus (INBAR, 2014). Essa planta possui mais de 200 milhões de anos, sendo conhecidas cerca de 1.300 espécies, das quais 50 domesticadas e 38 estudadas (CHAOWANA, 2013).

Devido aos problemas envolvendo as questões climáticas e a escassez da madeira, os bambus vêm chamando a atenção de estudiosos como uma solução para o fornecimento de matéria-prima, não convencional, para diversos setores que ainda dependem da madeira (INBAR, 2014).

Os programas de incentivo à pesquisa com o bambu e suas aplicações possuem inúmeras ações nos países asiáticos, como Índia e China. Na América Latina, destaca-se a Colômbia, que está inserida em diversos programas governamentais de fomento e pesquisas relacionados ao cultivo e aproveitamento industrial da planta, principalmente do gênero *Guadua* (SILVA, 2005).

O Brasil, apesar de usar pouco o bambu nativo, possui legislação recente e específica que versa sobre a política nacional de incentivo ao manejo sustentável e cultivo do bambu, para fomentar pesquisas e agregação de valor ao produto (BRASIL, 2011).

O incentivo ao uso dos bambus, no Brasil, vem crescendo após a Lei 12.484, que foi sancionada em 08 de setembro de 2011 e instituiu a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu - PNMCB. Essa lei incentiva o desenvolvimento dessa cultura no Brasil, por meio de ações governamentais e de empreendimentos privados.

Para Moreira (2012), essa legislação não é específica, por exemplo, no que se refere ao uso do bambu como fonte de geração de energia, mas coloca o bambu como uma cultura importante para o desenvolvimento econômico e social do país.

Outro importante passo foi a assinatura do memorando de entendimento sobre cooperação bilateral em ciência e tecnologia na área de desenvolvimento e inovação em Bambu, entre o Brasil e a República Popular da China. Dessa forma, considera-se que

o momento é propício para todos da área da pesquisa contribuírem na geração de tecnologias para viabilizar o bambu como alternativa de desenvolvimento sustentável (GENEROSO, 2014).

Vários fatores justificam investimentos na cultura do bambu. A construção civil, um dos setores que mais gera empregos, consome uma enorme quantidade de madeira, matéria prima que hoje é um produto caro e escasso. Não se trata de substituir a madeira em todas as suas aplicações pelo bambu, mas de promover o uso conjunto, uma vez que na arquitetura e construção civil o bambu e a madeira se complementam muito bem. Outras demandas, como o déficit habitacional, a geração de energia a partir da biomassa do bambu e o artesanato, mostram que o momento é propício para a difusão do uso do bambu (SAFE, 2004.)

O grande impedimento ainda é a geração de tecnologias para o aproveitamento sustentável, para a inovação e economia em sua utilização, bem como a instalação de uma cultura empreendedora que consiga vislumbrar as vantagens que podem ser obtidas desta planta para todos os segmentos sociais que podem ser envolvidos em sua cadeia produtiva (PEREIRA e BERALDO, 2010).

O bambu apresenta grande potencial agrícola, por se tratar de uma planta perene renovável, que produz colmos anualmente sem a necessidade de replantio. Além disso, é eficiente no sequestro de carbono, podendo ser utilizado para o reflores-

tamento de matas ciliares, tendo muitas aplicações, tanto ao natural, como após processamento adequado (PEREIRA, 2001).

Ecologicamente, o bambu é importante na contenção de encostas, para evitar o processo de erosão e auxiliar na recuperação de áreas degradadas. O seu carvão pode ser utilizado como fonte calorífica para fornos, com diversos usos, desde siderurgia a padarias e como filtro natural de água, além de ser potencialmente útil para biorremediação de solos contaminados e captação de carbono. Essa cultura caracteriza-se, portanto, como economicamente viável, ecologicamente correta e socialmente justa (OSSE e MEIRELES, 2011).

Um dos maiores entraves à popularização e difusão do uso do bambu junto à comunidade refere-se à falta de produtores de mudas das principais espécies com potencial comercial para os agricultores, que seriam os futuros fornecedores de matéria-prima industrial (PEREIRA e BERARDO, 2010).

A propagação do bambu pode ocorrer: de forma sexuada, por meio de sementes, porém não é um método fácil e prático, devido à esporadicidade de floração de muitos bambus, além da baixa viabilidade e vigor de suas sementes; de forma assexuada, através de partes vegetativas da planta, tais como ramos, gemas, colmos e rizomas. Cada espécie possui uma forma de propagação preferencial, devido às suas características ecológicas (CASTAÑO e MORENO, 2004; PEREIRA e BERARDO, 2010).

A principal vantagem da propagação vegetativa é a possibilidade de obtenção de plantas clonais com uniformidade genética e fenotípica. Para a maioria das espécies de *Guadua*, faltam estudos para definir o método mais adequado para sua propagação e para desenvolver um sistema de produção de mudas com elevadas taxas de sobrevivência (PEREIRA e BERALDO, 2010).

A técnica de micropropagação oferece excelentes oportunidades para a propagação comercial de plantas, como também pode auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando, neste caso, grande economia de tempo. Facilita a obtenção de grande número de plantas, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (PAIVA; GOMES, 1995).

As técnicas de propagação vegetativa *in vitro* possuem um grande potencial para atender à demanda de material vegetal de bambu, com as mesmas características da planta matriz. Porém, ainda apresenta problemas, como contaminação por fungos e bactérias, necrose dos explantes ou brotos durante o estabelecimento em laboratório (GENEROSO, 2014).

O processo de propagação *in vitro* pode ocorrer por organogênese direta, onde há desenvolvimento de órgãos diretamente do tecido do explante ou por organogênese indireta quando o desenvolvimento de órgãos se dá a partir de uma massa não diferenciada de células chamada de calo, que é considerada uma forma potencial de propagação em massa (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PIERIK, 1987; LANDA *et al.*, 2000).

O calo é um tecido amorfo formado quando as células da planta se multiplicam desordenadamente, sendo o processo chamado de calogênese. Em cultura de tecidos, os calos podem ocorrer quando os explantes crescem em meio de cultura, com o estímulo de reguladores de crescimento endógenos ou com adição de reguladores exógenos que induzem o crescimento e modificam o metabolismo celular de quiescente para ativo (GEORGE *et al.* 2008).

O objetivo do trabalho foi estudar a calogênese em explantes de bambu (*Guadua cf. angustifolia*), de forma a ampliar o conhecimento em relação às técnicas biotecnológicas que viabilizem a micropropagação da espécie, gerando informação quanto ao seu comportamento quando submetido a condições de cultivo *in vitro* de forma a gerar subsídios para obtenção de tecnologia que possibilite a produção de mudas em larga escala.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, localizado na BR 364, km 14, em Rio Branco Acre, nos anos de 2015 a 2016. Para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, foram utilizados, como fonte de explantes, discos foliares e segmentos nodais de plantas de bambu (*Guadua cf. angustifolia*) oriundas de plântulas coletadas

nas coordenadas S 08°54'15,0" W 68°40'33,6" (margens do Rio Purus, entre os municípios de Sena Madureira-AC e Boca do Acre-AM). Estas foram colocadas em vasos contendo uma mistura de terra, substrato comercial e esterco (1:1:1) e mantidas em casa de vegetação a uma temperatura 30°C e com 88% umidade relativa, recebendo pulverizações semanais com fungicida sistêmico Amistar® (0,42g/L⁻¹). As coletas dos segmentos nodais e das seções foliares foram realizadas 48 horas após a pulverização com o fungicida.

Os meios de cultura utilizados tiveram pH ajustado para 5,8 com auxílio das soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) e foram autoclavados por 15 minutos a 1,1kgf/cm² em temperatura de 121 °C. O preparo do material vegetal, meio de cultura e a inoculação foram feitos em condições assépticas. Após serem inoculadas, as culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de 25 ± 2°C, com lâmpadas fluorescentes Philips TDL (30µmol. m². s⁻¹) e fotoperíodo de 16 horas de luz e na ausência dela.

2.1 EXPERIMENTO I - TIDIAZURON (TDZ) E ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO (ANA) NA INDUÇÃO DE CALOGÊNESE

Folhas jovens coletadas na casa de vegetação e conduzidas ao laboratório foram lavadas em água

corrente e detergente neutro durante 5 minutos, então lavadas por 3 vezes em água destilada e autoclavada. Foram cortados discos foliares com aproximadamente 1,0cm² e estes colocados em solução de ácido ascórbico (0,5mg/L⁻¹) por 15 minutos.

Os explantes foram conduzidos à câmara de fluxo laminar, onde foram imersos em solução de álcool 70% por 1 minuto seguido de solução de hipoclorito de sódio (contendo 1,5% cloro ativo) por 10 minutos com cinco gotas de detergente neutro. Após, foi realizada tríplice lavagem com água destilada e autoclavada. Os discos foliares foram inoculados com a face abaxial (parte de baixo) em contato com o meio, em frascos contendo 30ml de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30mg/L⁻¹), solidificado com ágar (6mg/L⁻¹) e diferentes concentrações do regulador de crescimento TDZ (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2), combinado com 1mg/L⁻¹ ANA (ácido naftalenoacético) e na sua ausência.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições, sendo cada parcela experimental composta de um frasco com 4 explantes. O experimento foi avaliado em 30 dias. Foram avaliados formação de calos, contaminação (fúngica e bacteriana) e oxidação.

2.2 EXPERIMENTO II - BAP (6-BENZILAMINAPURINA) E ANA (ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO) NA INDUÇÃO DE CALOGÊNESE

Os segmentos nodais com 2 a 5cm de comprimento e presença de nó foram lavados em água com sabão em pó por 10 minutos e esfregados com escova de cerdas bem finas. Em seguida, foram lavadas por 10 minutos em água corrente e então lavadas por 3 vezes em água destilada e autoclavada.

Em seguida, o material foi conduzido à câmara de fluxo laminar, onde foi imerso em solução de álcool 70% por 3 minutos, sendo mergulhado em solução de hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) por 10 minutos, com algumas gotas de detergente neutro. Após tríplice lavagem com água destilada e autoclavada, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10ml de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Suplementado com sacarose (30mg/L^{-1}), PPM[®] (2ml/L^{-1}) e solidificado com ágar (6mg/L^{-1}) e diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP (6-benzilaminapurina) combinado ou não com 1mg/L^{-1} ANA (Ácido naftalenoacético) e na sua ausência.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento, sendo cada repetição um tubo de ensaio com um explante. O experimento foi avaliado após 30 dias da inoculação. Na ocasião foram avaliadas as seguintes

variáveis: porcentagem de calos, formação de gemas adventícias, contaminação (fúngica e bacteriana), oxidação e necrose.

2.3 EXPERIMENTO III - PICLORAM, KIN, 2.4-D E ANA NA INDUÇÃO DE CALOGÊNESE EM SEGUIMENTOS NODAIS

Foram coletados segmentos nodais com 2 a 5cm de comprimento e um nó, os quais foram lavados em água com sabão em pó por 10 minutos e esfregados com escova de cerdas bem finas, em seguida foram lavadas por 10 minutos em água corrente e então lavadas por 3 vezes em água destilada e autoclavada.

Os explantes foram conduzidos para câmara de fluxo laminar, onde foram imersos em solução Futriazol (500mg/L^{-1}) por 10 minutos, então foram lavadas em água destilada e autoclavada e imersos em álcool 70% por 1 minuto. Após esse procedimento, os explantes foram mergulhados na solução de hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) com cinco gotas de detergente neutro por 10 minutos, seguidos por uma tríplice lavagem com água destilada e autoclavada. Após tríplice lavagem com água destilada e autoclavada, explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

O meio MS utilizado foi suplementado com sacarose (30mg/L^{-1}), PPM[®] (2ml/L^{-1}) e solidificado

com ágar (6mg/L^{-1}) e diferentes concentrações do regulador de crescimento PICLORAM, Cinetina e 2.4-D (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2) combinado com 1mg/L^{-1} ANA (Ácido naftalenoacético) e na sua ausência.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições por tratamento, sendo que cada repetição corresponde a um frasco com 4 explantes. Na ocasião foram avaliadas as seguintes variáveis: formação de calos, formação de brotação adventícia, contaminação (fúngica e bacteriana), oxidação e necrose.

2.4 EXPERIMENTO IV – USO DE FUNGICIDAS NA DESINFESTAÇÃO *IN VITRO* DE BAMBU

Os segmentos nodais com gema lateral exposta foram coletados e conduzidos ao laboratório Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre. Foram utilizados explantes de 2 a 3cm de comprimento. Tais segmentos foram lavados em água com detergente por 5 minutos e esfregados com escova de cerdas bem finas, em seguida lavados por 5 minutos em água corrente e então lavados por 3 vezes em água destilada e autoclavada.

Em seguida o material foi conduzido à câmara de fluxo laminar, onde foi realizada a pré-desinfestação em solução Amistar® ($0,34\text{g/L}^{-1}$) com

de cloreto de benzalcônio ($0,5\text{g/L}^{-1}$) por 5 minutos. Posteriormente, foi lavado em água autoclavada e destilada e imerso em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto. Após o procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio, contendo 2,5% de cloro ativo, com detergente neutro por 10 minutos seguidos por uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios preenchidos com 10ml de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose (30g/L^{-1}), solidificado com ágar (6g/L^{-1}), 2ml/L^{-1} de *Plant Preservative Mixture* (PPM[®]), 1mg/L^{-1} do ácido 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) e $0,5\text{mg/L}^{-1}$ ANA (Ácido naftalenoacético), ambos reguladores de crescimento e contendo 25PPM (parte por milhão) dos fungicidas Amistar[®], Opera[®] e Nativo[®]. O meio de cultura preparado foi distribuído em elermeyers e fechados com papel alumínio e autoclavado. Após o procedimento, os frascos foram conduzidos para câmara de fluxo laminar, onde foi realizada a adição dos fungicidas através de microfiltro.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 24 repetições por tratamento. Após 30 dias foram avaliadas: formação de calos, formação de brotações adventícias, porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, oxidação e necrose.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados, com a utilização da análise de variância (ANOVA), atendendo o princípio da normalidade e homogeneidade dos dados. O programa estatístico usado foi o Assistat 7.7, desenvolvido pela UFCG, Paraíba. Quando não significativo, foram apresentadas apenas as médias dos tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento realizado em que foram utilizados discos foliares para indução da calogênese, verificou-se que o efeito da aplicação de reguladores de crescimento não pode ser avaliado, devido aos explantes apresentarem expressivos índices de oxidação e despigmentação do tecido, além de contaminação em todos os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Calogênese em folhas jovens de bambu (*Guadua cf. angustifolia*) sob influência dos reguladores de crescimento TDZ e BAP associados com ANA, após 30 dias de inoculação

Tratamentos reguladores/mg/L ⁻¹	Calos (%)	Bactéria (%)	Fungo (%)	Oxidação (%)	
TDZ+ANA	0/0	0	2,00	0	15,00
	0,1/1	0	8,00	0	4,00
	0,25/1	0	0	1,00	17,00
	0,5/1	0	4,00	1,00	21,00
	1,0/1	0	6,00	0	14,00
	2,0/1	0	4,00	1,00	14,00
	0/1	0	6,00	1,00	14,00
BAP+ANA	0/0	0	18,00	0	100,00
	0,1/1	0	18,00	0	100,00
	0,25/1	0	35,00	0	100,00
	0,5/1	0	18,00	0	100,00
	1,0/1	0	0	0	100,00
	2,0/1	0	0	0	100,00
	0/1	0	36,00	18,00	100,00

Fonte: Leão (2017).

Inferese que a oxidação ocorreu devido ao uso de hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% de cloro ativo, o que pode ter sido agressivo às folhas em estágio juvenil (Figura 1). Pereira *et al.*, (2011) relataram que o hipoclorito de sódio com concentração acima de 1,5% de cloro ativo é danoso aos explantes *in vitro* de bananeira (*Musa sp.*), impossibilitando a continuidade do processo de micropropagação. O hipoclorito de sódio é um produto oxidante, ou seja, promove a perda de elétrons, sendo conhecido pela função esterilizante que exerce, pois atua na oxidação

de moléculas orgânicas, como carboidratos, proteínas e lipídeos. O clareamento dos tecidos ocorre devido a essa oxidação. No caso da desinfecção, os oxidantes atacam a membrana celular de microrganismos, levando-os à morte (ESTRELA *et al.*, 2002).

Figura 1 - Oxidação e contaminação fúngica (seta) em explantes foliares de bambu danificados pela ação do hipoclorito de sódio após 30 dias de inoculação



Fonte: Leão (2017).

Apesar disso, o hipoclorito de sódio tem sido usado com êxito em inúmeros protocolos de esterili-

zação (PEREIRA *et al.*, 2009), sendo seu emprego viável no controle da contaminação por microrganismos, além de ser um produto de fácil aquisição e baixo preço. As contaminações foram observadas nos dois experimentos, sendo sobretudo de origem bacteriana.

Goyal e Sen (2016) relatam, em uma revisão sobre a regeneração *in vitro* dos bambus, todos os passos utilizados para a produção de microplantas dessas espécies. Com relação à formação de calos, os autores comentam que várias partes das plantas podem ser utilizadas para essa finalidade, sendo os mais comuns segmentos nodais jovens, embriões maduros, lamina foliar, folha e raízes de microplântulas. Na referida revisão, não há relato de calogênese para espécies do gênero *Guadua*.

Trabalhos utilizando folhas para a obtenção de calos em bambus são raros (SINGH, *et al.*, 2013). Hu *et al.* (2011) obtiveram indução calogênica eficiente em embriões maduros em *Dendrocalanus farinosus*. Zhang *et al.*, (2010) obtiveram calos friáveis e responsivos com a utilização brotos apicais de *D. hamiltonii*, em meio MS, contendo 3mg/L⁻¹ de 2,4-D e 1mg/L⁻¹ de BAP. Marulada *et al.* (2005) verificaram a obtenção de massa calogênica em gemas axilares de *Guadua angustifolia*, utilizando meio de cultura MS suplementado com 6 mg/L⁻¹ de 2,4- D. Já Daquinta *et al.* (2007) obtiveram 80% de calos em segmentos nodais de *G. angustifolia* utilizando meio MS suplementado com 6mg/L⁻¹ de Picloram, os calos apresentavam coloração amarelo creme com estruturas nodulares bem definidas e pu-

deram ser regenerados em pequenas brotações com a utilização de BAP.

Pinto (2014), trabalhando com calogênese em mogno (*Swietenia macrophylla* King) e utilizando os reguladores de crescimento BAP, TDZ com ANA, verificaram a formação de calos com diferentes cores e texturas. Além disso, a utilização do BAP promoveu o aparecimento de calos, em sua maioria compactos e de coloração verde, e, visualmente, com aspecto vítreo. Já com o uso do TDZ, os calos apresentaram coloração creme e eram friáveis.

Sobre o uso do Tidiazurom (TDZ), Pinto (2014) relata não ocorrer diferenciação dos calos em gemas adventícias. O autor cita Huetteman (1998), para confirmar as observações de que o aumento na concentração de TDZ tendem a estimular a formação de calos à custa do crescimento de brotos axilares e adventícios. Segundo os autores, a presença de altas concentrações de citocininas no meio induz a excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas, o que não foi verificado neste estudo.

A utilização do regulador de crescimento BAP e ANA não promoveu calogênese nos explantes foliares de bambu em nenhum dos tratamentos avaliados. Foi observado 100% de oxidação epidérmica no tecido vegetal dos explantes (despigmentação). Somado a esse fator, houve também expressiva contaminação por bactérias, ocorrendo a necrose dos discos foliares.

Após se constatar a impossibilidade de se trabalhar com explantes foliares, optou-se pela utilização

de segmentos nodais. Foram realizados vários experimentos, utilizando-se diversos reguladores de crescimento para a obtenção de massa calogênica.

A utilização do BAP não promoveu a indução da calogênese nos segmentos nodais. Contudo, observou-se o surgimento de brotos em todos os tratamentos que estavam na presença de luz (Tabela 2).

Nos tratamentos que estavam na ausência de luz, o índice de brotação foi inferior (Tabela 2). Observa-se que a brotação só ocorreu nos tratamentos T1 e T6 e houve alto índice de contaminação por bactérias e necrose nos segmentos nodais. Observou-se também que não ocorreram incidências de calos nos segmentos nodais. Apesar do surgimento de brotos, o experimento foi inviabilizado devido aos problemas de contaminação por bactérias e necrose.

Tabela 2 - Calogênese em segmentos nodais de bambu (*Guadua cf. angustifolia*) em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP e ANA na presença e ausência de luz, após 30 dias de inoculação

Tratamentos BAP/ANA mg/L ⁻¹	Calos (%)	Nro brotos	Bactéria (%)	Fungo (%)	Oxidação (%)	Necrose (%)	
Presença de luz	0/0	0	33,00	50,00	0	68,00	32,00
	0,1/1	0	18,00	0	18,00	0	33,00
	0,25/1	0	18,00	50,00	0	0	33,00
	0,5/1	0	18,00	68,00	0	0	33,00
	1,0/1	0	33,00	50,00	0	0	0
	2,0/1	0	33,00	50,00	0	0	33,00
	0/1	0	18,00	84,00	0	0	0
Ausência de luz	0/0	0	15,00	100,00	0	0	0
	0,1/1	0	0	49,00	0	0	49,00
	0,25/1	0	0	49,00	0	0	65,00
	0,5/1	0	0	32,00	0	0	32,00
	1,0/1	0	0	65,00	0	0	32,00
	2,0/1	0	18,00	32,00	18,00	0	49,00
	0/1	0	0	32,00	0	0	100,00

Fonte: Leão (2017).

Vários trabalhos relatam a formação calogênica satisfatória com a utilização do BAP combinado com o ANA (PINTO, 2014; MARCONDES *et al.*, 2014). Ribeiro *et al.* (2010), estudando a calogênese em explantes foliares de *Dieffenbachia sp.*, verificaram que a utilização de 3mg/L⁻¹ ANA + 0,5mg/L⁻¹ BAP apresentou o melhor desempenho quanto à formação de calos nestes explantes.

Machado *et al.* (2010), ao estudarem a formação de calos de *Jatropha Curcas*, verificaram o aparecimento de calos em diversas combinações desses

dois reguladores, por exemplo: 0,5mg/L⁻¹ de ANA e 0mg/L⁻¹ de BAP; 0,5mg/L⁻¹ de ANA e 1mg/L⁻¹ de BAP; e 2mg/L⁻¹ de ANA e 1mg/L⁻¹ de BAP.

O presente estudo não obteve resultados positivos para formação de calos em bambus (*Guadua* cf. *angustifolia*), apesar dos reguladores citados acima promoverem satisfatoriamente a calogênese em várias espécies.

Marcondes *et al.* (2014), ao pesquisarem acerca da calogênese *in vitro* de *Bromelia pinguin* L. sob efeito dos fitorreguladores ANA e BAP, afirmaram que, dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura *in vitro*, destacam-se a combinação dessa auxina e citocinina.

Segundo Pasqual (2004), as auxinas estimulam a expansão celular, induzindo principalmente o enraizamento de segmentos de plantas, e as citocininas promovem a divisão celular. Assim sendo, são indispensáveis para a quebra da dominância apical e para a indução da proliferação de gemas axilares.

Os efeitos esperados na indução da calogênese não foram alcançados no experimento em que foi utilizado o regulador de crescimento Picloram, devido ao alto índice de contaminação por fungos. Resultado idêntico foi obtido no experimento cujo regulador adicionado foi o 2.4-D. Também foi observada uma baixa ocorrência de brotação inviabilizada pela alta contaminação fúngica e bacteriana (Tabela 3). Em todos os tratamentos com Cinetina, ocorreu contaminação por fungos, porém comparando-se com os experimentos an-

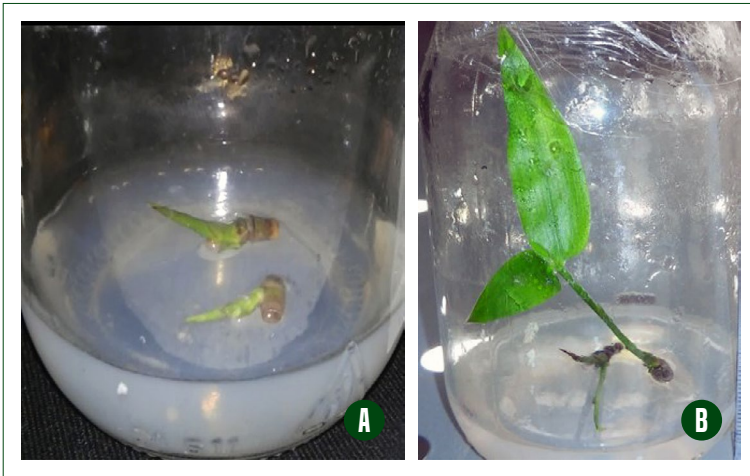
teriores, este apresentou incremento no número de brotações. Em relação aos três reguladores de crescimento utilizados, a Cinetina promoveu o melhor desempenho no desenvolvimento dos brotos (Figura 2 A e B).

Tabela 3 - Calogênese em segmentos nodais de bambu (*Guadua cf. angustifolia*) em meio MS suplementado com diferentes concentrações Picloram, 2,4-D, Cinetina e ANA, após 30 dias de inoculação

Tratamentos reguladores/mg/L ⁻¹	Calos (%)	Nro de brotos	Bactéria (%)	Fungo (%)	Oxidação (%)	Necrose (%)	
Picloram +ANA	0/1	0	0	31,00	99,00	0	32,00
	0,1/1	0	0	17,00	99,00	0	17,00
	0,25/1	0	0	17,00	80,00	0	17,00
	0,5/1	0	0	17,00	80,00	0	17,00
	1,0/1	0	0	30,00	80,00	0	17,00
	2,0/1	0	0	30,00	66,00	0	17,00
2,4-D +ANA	0/1	0	0	32,00	99,00	0	18,00
	0,1/1	0	0	32,00	49,00	0	18,00
	0,25/1	0	18,00	18,00	5,00	0	18,00
	0,5/1	0	0	32,00	5,00	0	18,00
	1,0/1	0	0	32,00	99,00	0	18,00
	2,0/1	0	0	18,00	99,00	0	18,00
Cinetina +ANA	0/1	0	50,00	32,00	100,00	0	0
	0,1/1	0	0	32,00	100,00	0	0
	0,25/1	0	18,00	18,00	100,00	0	0
	0,5/1	0	0	18,00	84,00	0	0
	1,0/1	0	32,00	32,00	100,00	0	0
	2,0/1	0	0	32,00	100,00	0	18,00

Fonte: Leão (2017).

Figura 2 - Segmentos nodais inoculados em meio de cultura MS suplementado com 1mg/L^{-1} de Cinetina e 1mg/L^{-1} de ANA. Brotação após 30 dias (A) e brotação desenvolvida após 40 dias de inoculação (B).

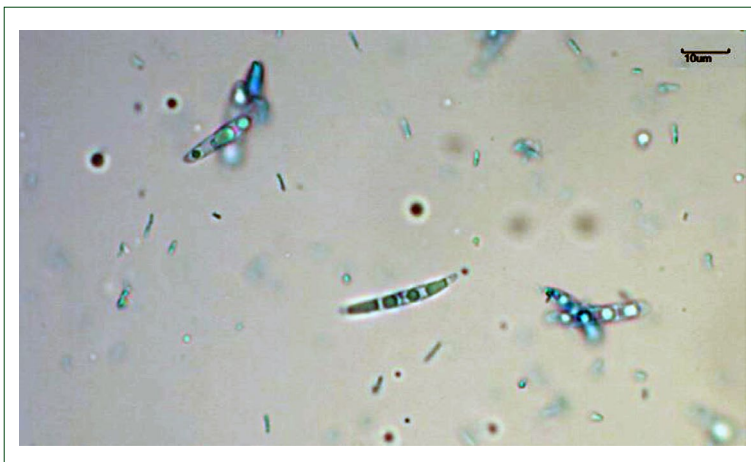


Fonte: Leão (2017).

Segundo Zhang *et al.* (2010), a utilização dos reguladores de crescimento, em especial o 2,4-D para indução de calogênese em bambus, é espécie específico, conseqüentemente a dosagem para propiciar a formação de calos deve ser estudada para cada espécie.

Diante dos resultados obtidos e devido à expressiva contaminação em todos os experimentos, recipientes contaminados foram encaminhados ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Acre para identificação do fungo. Em se tratando de gênero, o microrganismo endógeno foi identificado como *Fusarium sp.* com conídio fusiforme em formato de meia lua, cor clara com septos no sentido transversal (seta) (Figura 3).

Figuras 3 - Aspecto morfológico do fungo do gênero *Fusarium* (bar=10 μ m) encontrado nos segmentos nodais de Bambu (*Guadua* cf. *angustifolia*) inoculado em meio de cultura



Fonte: Leão (2017).

Segundo Tinoco (2010), o fungo do gênero *Fusarium* pode ser encontrado nas mais diversas regiões geográficas do mundo, especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais, o que pode causar clorose e queda prematura das folhas, redução do crescimento e morte das plantas, podendo ocorrer em plantas jovens.

Segundo Burgess (1994), desde 1900, aproximadamente 1.000 espécies de *Fusarium* foram descritas, a maioria pelo exame das suas estruturas (esporódóquios), diretamente nos hospedeiros ou substratos naturais, o que fez com que muitas dessas espécies fossem sinônimas, tendo em vista a grande variabilidade do fungo em diferentes ambientes e substratos.

Após a confirmação da contaminação endógena pelo fungo *Fusarium sp.*, foi realizado um novo experimento com a utilização de diversos fungicidas no meio de cultura. Nesse experimento, ocorreu a redução nas contaminações fúngicas dos segmentos nodais de bambu, principalmente com o fungicida Opera®, quando estavam na ausência de luz. Já na presença de luz, todos os fungicidas apresentaram o mesmo efeito, com eliminação de aproximadamente 50% das contaminações.

Nos dois experimentos, com ausência e presença de luz, foram observados índices elevados de contaminação por bactérias, mesmo com a utilização do biocida PPM®. Uma provável explicação para o alto índice é que experimentos com altas contaminações fúngicas podem favorecer o ambiente ao ataque bacteriano, pois nessa fase os explantes já estão debilitados (Tabela 4).

Tabela 4 - Calogênese em segmentos nodais de bambu (*Guadua cf. angustifolia*) após 30 dias de inoculação em meio de cultura MS em contato com diferentes tipos de fungicidas

Tratamentos Luz/Fungicida	Calos (%)	Nro de brotos	Bactéria (%)	Fungo (%)	Oxidação (%)	Necrose (%)	
Com luz	Controle	0	0	58,00	49,00	0	0
	Amistar®	0	0	72,00	49,00	0	0
	Opera®	0	0	58,00	49,00	0	0
	Nativo®	0	0	49,00	49,00	0	0
Sem luz	Controle	0	0	49,00	99,00	0	21,00
	Amistar®	0	0	58,00	40,00	0	8,00
	Opera®	0	0	49,00	8,00	0	0
	Nativo®	0	0	40,00	49,00	0	40,00

Fonte: Leão (2017).

O PPM[®] é um biocida sintético estável ao calor, que pode ser usado para impedir ou reduzir eficazmente a contaminação microbiana em cultura de tecidos vegetais. Seus ingredientes ativos penetram nos fungos ou nas paredes celulares das bactérias e promovem a inibição da atividade de enzimas chaves dentro dos ciclos metabólicos centrais, tais como: o ciclo de ácido cítrico e da cadeia de transporte de elétrons (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2015).

A necrose ocorreu de maneira não acentuada nos tratamentos que permaneceram na ausência de luz, contrariamente aos tratamentos que ficaram expostos à luz. Não foi verificada oxidação dos explantes em nenhum dos tratamentos avaliados nos dois experimentos (Tabela 4).

Oliveira (2000), ao estudar o controle de fungos endofíticos na presença de substâncias com efeito fungicida e antibiótico inseridas no meio de cultura, observou que, apesar de conseguir o controle dos microrganismos, as doses efetivas provocavam a necrose dos explantes. Contudo, esse fenômeno não foi verificado no presente trabalho para os tratamentos expostos à luz.

Silva Neto e Costa (2010), ao pesquisarem o estabelecimento *in vitro* de segmentos terminais de pequiheiro, utilizaram PPM[®] e alguns fungicidas adicionados ao meio de cultura. Os autores verificaram que 1ppm de Derosal e 1ml/L⁻¹ de PPM[®] controlaram as contaminações por fungos e bactérias. Porém, após trinta dias em cultivo *in vitro*, verificou-se que não ocorreram brotações nos explantes, dados que

corroboram com o presente estudo. Apesar de a utilização dos fungicidas diminuir as contaminações por fungos, quando o experimento é comparado com os experimentos anteriores, não se obteve brotações nos segmentos nodais após 30 dias de inoculação. Em bambus, fatores como temperatura, precipitação e umidade relativa influenciam na emergência e transmissão do fungo e a maior taxa de parasitismo ocorre em condições úmidas e frescas (LIU, 2009). Esse fato pode explicar os altos índices de contaminações fúngicas encontradas neste trabalho, já que a região amazônica possui as referidas características. Vários autores relatam que a estação chuvosa aumenta os percentuais de contaminações fúngicas em diversos tipos de bambus (ANAND *et al.*, 2013; PRATIBBA, SARMA, 2013).

Apesar da proliferação de calos não ter sido alcançada, devido à baixa eficiência no controle dos agentes contaminantes, mesmo utilizando substâncias biocidas no meio de cultura, avançou-se no conhecimento científico dos estudos de calogênese de bambu do gênero *Guadua* cf. *angustifolia*.

4 CONCLUSÃO

- A utilização de solução de hipoclorito de sódio a 1,5% não é aconselhada para tratamentos de assepsia em estudos de propagação *in vitro* em folhas de bambu, por promoverem oxidação;

- A ausência de calos neste trabalho pode estar relacionada ao fato de não se obter completa assepsia no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais do bambu;

- A combinação da Cinetina (Kin) e ANA (ácido naftalenoacético) se mostrou mais eficaz para o desenvolvimento de brotações do que calos;

- Ocorreu contaminação endógena por fungos do gênero *Fusarium sp.* em segmentos nodais de bambu estabelecidos *in vitro*;

- A adição de fungicidas no meio de cultura reduz as contaminações, destacando-se o fungicida Opera® na ausência de luz.

REFERÊNCIAS

- ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In vitro* propagation of edible bamboo *Bambusa* bamboos and Assessment of Clonal Fidelity through Molecular Markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, Rowland Heights, v. 2, n. 4, 257-261, 2013.
- BRASIL, Lei n. 12.484 de 08 de setembro de 2011. Dispõe sobre a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 09 set. 2011
- BURGESS, L. W., SUMMERELL B.A., BULLACK, GOTT K. P., BACKHOUSE, D., **Laboratory Manual For Fusarium Research**, Sydney University of Sydney, 1994.
- CHAWANA, P. Bamboo: an alternative raw material for wood and wood-based composites. **Journal of Materials Science Research**; v. 2, p. 90-102, 2013.
- CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos – cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia**. Bogotá, Colombia. 2004
- DAQUINTA, M.; GREGORI, A.; CID, M.; LEZCANO, Y.; SAGARRA, F. Formación de callos e inducción de brotes a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua angustifolia* Kunth. **Biotecnol. Veg.** v. 7, p. 119-122, 2007.
- ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANO, J. C. E.; MACHESAN, M. A.; PÉCORRA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent**; v.13, n. 2, p.113-117, 2002.

GENEROSO, A. L. **Caracterização morfológica e cultivo *in vitro* de espécies de bambu**, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Dissertação Mestrado. 57 p. 2014.

GEORGE E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, v. 1, The Background, 3rd Edition. Dordrecht: Springer. 2008.

GOYAL, A. K.; SEN, A. *In vitro* regeneration of bamboos, the “Green Gold”: An overview. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 1, p. 9-16, 2016.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, p.183-260, 1998.

HU, S. L.; ZHOU, J. Y.; CAO, Y.; LU, X. Q.; DUAN, N.; REN, P.; CHEN, K. *In vitro* callus induction and plant regeneration from mature seed embryo and young shoots in a giant sympodial bamboo, *Dendrocalamus farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et HL Fung. **Afr J Biotechnol.** v. 10, n. 16, p. 3210-3215, 2011.

HUETTEMAN, C. A. *In vitro* culture of *Juglans nigra* L.: Micropropagation from embryonic axes and forcing of adult quiescent stems. MS Thesis. Southern Illinois University, Carbondale *Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** v. 33, p. 105-119, 1988.

INBAR - International Network for Bamboo and Rattan. **Bamboo: A strategic resource for countries to reduce the effects of climate change**, Beijing. 2014. 20 p.

LANDA, F. de S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; BARROS FILHO, J. S. de S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, dez. 2000.

LEÃO, J. R. A. **Propagação *in vitro* de *Guadua spp.* nativos da Amazônia Sul-Occidental, Acre, Brasil**. 2017. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências de Florestas Tropicais) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/36348/1/TESE_JOAO.pdf. Acesso em: 01 jul. 2021.

LIU, Y. **Biological characteristics of a bamboo fungus, *Shiraia bambusicola*, and screening for hypocrellin high-yielding isolates**. 2009. 96 f. Tese (Phyllosophy Doctor in Crop Production Technology) – Suranaree University of Technology, 2009.

MACHADO, W.; CARNEIRO, A. A.; COELHO, G. T. C. P. **Influencia de BAP e ANA na formação de calos de *Jatropha curcas* L.**, Congresso Brasileiro de Mamona, 4 e Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, p. 270-275. 2010.

MARCONDES, M. A.; MIRANDA, D. P.; KARSBURG, I. V.; MASSAROTO, J. A.; JÚNIOR, N. G. R. Calogênese *in vitro* de *Bromelia pinguin* L. Sob efeito dos fitoreguladores ANA e BAP, **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, 2014, p. 736-742.

MARULANDA, M. M.; GUTIERREZ, L. G.; MÁRQUEZ, M. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. **Actual. Biol.** v. 27, p. 5-15, 2005.

MOREIRA, A. C. O. **Caracterização de *Bambusa vulgaris* Schard ex J. C. Wendl. var. *vulgaris*, e dos resíduos de caldeira no processo de conversão térmica de energia**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.

OLIVEIRA, A. M. **Avaliação de substâncias inibidoras no controle de fungos endofíticos em micropropagação *in vitro* de *Caryocar brasiliense*** Camb. 200. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

OSSE, V. C.; MEIRELLES, C. R. M. O potencial do bambu na minimização dos problemas climáticos nos espaços urbanos. **Revista LABVERDE**, n. 3, p. 36-53, 2011.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa - UFV, 1995, 40 p.

PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 106 p.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987.

PINTO, F. **Calogênese e indução de gemas axilares em mogno (*Swietenia macrophylla* King)**, Universidade Federal do paraná, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, 2012, p.1-87.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, SP: Canal 6 Editora, 240 p. 2010.

PEREIRA, G. A. *et al.* Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. especial, n. e. p. 222-226, out., 2011.

PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.2, p.43-46, 2009.

PEREIRA, M. A. dos R. **Bambu: espécies, características e aplicações**, Departamento de Engenharia Mecânica/UNESP, Apostila, Bauru, 2001. 56p.

PLANT CELL TECHNOLOGY. Disponível em: <<http://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information>>. Acesso em: 05 maio 2015.

PRATIBBA, S.; SARMA, K. P. *In vitro* propagation of *Bambusa tulda*: an important plant for better environment. **Journal of Environment Research and Development**, [S.l.] v. 7, n. 3, p. 1216-1223, 2013.

RIBEIRO, M. F. MOURA, I. F.; DONINI, L. P.; VIÉGAS, J. **Calogênese em *Dieffenbachia* sp.: resposta aos reguladores de crescimento ANA e BAP** Nota Científica, 2007. p. 51-53.

SAFE, S. **Bambus como recurso florestal** - suas aplicações, manejo, silvicultura, propagação, entomologia e a situação no DF; Monografia; Brasília – DF, UNB, 2004.

SINGH, S. R., SINGH, R., KALIA, S., DALAL, S., DHAWAN, A. K., KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo - a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 2013.

SILVA, R. M. C. **O Bambu no Brasil e no mundo**. 2005. Disponível em: <http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2016.

SILVA NETO, S. P. da; COSTA, C. J. Controle de contaminações no cultivo *in vitro* de pequizeiro. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. **Anais...** Natal: SBF, 2010.

TINOCO, M. L. P. **Silenciamento trans-específico *in vitro* entre fumo e o fungo fitopatogênico fusarium verticillioides**, Tese de Doutorado, UNB, Brasília – DF, 2010.

ZHANG, N.; FANG, W.; SHI, Y.; LIU, Q. Q.; YANG, H. Y.; GUI, R. Y.; LIN, X. C. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. **Plant Cell Tissue Org Cult.** v. 103, n. 3, p. 325-332, 2010.

CAPÍTULO 5

MORFOMETRIA E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE BAMBUS

1 INTRODUÇÃO

O bambu é uma espécie que pertence à família Poaceae e tem ampla distribuição geográfica. Existem no mundo cerca de 1.300 espécies de bambu. O Brasil é líder de ocorrência nas Américas, com cerca de 200 espécies, entre nativas e exóticas, sendo a grande maioria endêmica (DRUMOND e WIEDMAN, 2017).

As espécies do gênero *Guadua* dominam uma área de 161.500km² no Sudoeste da Amazônia, e o ciclo de vida destas espécies é estimado entre 27-28 anos (CARVALHO *et al.*, 2013). São bambus entou-

ceirantes, possuem alta produtividade, apresentam colmos maduros aos 3 anos e, após a brotação na touceira, se forem retirados de maneira adequada, sua produção aumenta nos anos subsequentes (PEREIRA e BERALDO, 2007).

De acordo com Ostapiv *et al.* (2008), a utilização racional do bambu na região amazônica pode ajudar a preservar a floresta, diminuindo a pressão existente sobre o corte de espécies arbóreas e incentivando o manejo sustentável. Em países como Peru, Bolívia e especialmente na Colômbia e na Venezuela, o *Guadua* é muito utilizado para a construção civil. Essa planta possui excelentes características físicas, químicas e mecânicas, sendo um eficiente sequestrador de carbono, que pode ser utilizado em reflorestamento e na recomposição de matas ciliares (PEREIRA e BERALDO, 2007).

A propagação do bambu pode ocorrer por: a) reprodução sexuada, através de sementes; b) reprodução assexuada, através de partes vegetativas da planta, tais como ramos, gemas, colmos e rizomas. Cada espécie possui uma forma de propagação preferencial, devido às suas características ecológicas (CASTAÑO e MORENO, 2004; PEREIRA e BERALDO, 2010).

O uso de sementes para a propagação não é um método fácil e prático devido à esporadicidade de floração de muitos bambus, além da baixa viabilidade e vigor, ao difícil armazenamento, à alta taxa de contaminantes microbianos e, principalmente, pelo fato de as espécies de grande porte florescerem em intervalos

muito longos, além da poliploidia de muitas espécies (SAFE, 2004; SINGH *et al.*, 2013).

Segundo Richa e Nerru (2006), a baixa viabilidade das sementes de bambus armazenadas é ocasionada pelos baixos níveis de auxinas e ácido abscísico endógenos. De acordo com Surendran *et al.* (2003), as sementes de bambu apresentam viabilidade baixa, germinam entre 3 a 7 dias, perdem a viabilidade após 1 a 2 meses, seu potencial de germinação é dependente da sazonalidade e ocorre em agrupamentos. A dificuldade em se ter sementes viáveis destas espécies, devido ao efeito cumulativo de fatores biológicos e fisiológicos, tem feito a propagação vegetativa ser a mais indicada para a reprodução destas espécies.

De acordo com Judziewicz *et al.* (1999), a bacia Amazônia é o principal centro de diversidade do gênero *Guadua*, e quase 50% das espécies já registradas cientificamente ocorrem nessa região. Em todo o estado do Acre, podem ser encontradas cinco espécies de bambus (SILVEIRA e DALY, 2008). Destas, *G. weberbaueri* e *G. sarcocarpa* são caracterizadas por possuírem ampla distribuição (OLIVIER e PONCY, 2009). As espécies *G. superba*, *G. latifolia* e *G. angustifolia* apresentam distribuição mais restrita (SILVEIRA, 2001; MIRANDA, 2016).

Para a correta identificação das espécies vegetais, ocorre a necessidade se coletar amostras férteis, ou seja, a identificação taxonômica das espécies baseia-se inicialmente nos estudos das características florais (CALDERÓN e SODERSTROM, 1980; LIESE, 1985). Por esse motivo, a identificação dos diversos bambus

do gênero *Guadua* se torna mais difícil, pois eles apresentam somente órgãos vegetativos por quase toda sua vida, praticamente inexistindo conhecimentos sobre a fenologia destas espécies. Para superar essas dificuldades, outras metodologias têm sido utilizadas. Miranda (2016), estudando a anatomia dos entrenós de colmos de bambus que ocorrem no Acre, identificou cinco espécies de *Guadua* (*Guadua* sp.1, *Guadua* sp.2, *Guadua* sp.3, *Guadua* cf *angustifolia* e *Guadua* *latifolia*).

A biometria de frutos e sementes apresenta-se como instrumento de auxílio na identificação de diferentes espécies. O tamanho e as características das sementes são de grande importância para o estudo de uma espécie e indicam se foram bem nutridas durante seu desenvolvimento, se apresentam embrião bem formado e com maior quantidade de substâncias de reservas acumuladas no decorrer do processo de formação, evidenciando, maior vigor das mesmas (SILVA, 2000).

As características biométricas podem ser utilizadas como parâmetro para melhor uniformizar a emergência das plântulas e para a obtenção de mudas de tamanho semelhante ou de maior vigor (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Essas características também são utilizadas para diferenciar espécies pioneiras e não pioneiras em florestas tropicais (BASKIN e BASKIN, 1998), sendo um instrumento usado para examinar a variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie e suas relações com os fatores ambientais (MACEDO *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como objetivos estudar as características biométricas das sementes e verificar a germinação *in vitro* de *Guadua latifolia* sob influência de AG3 e diferentes meios de cultura (MS e WPM).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE COLETA

As sementes de bambu (*Guadua latifolia*) foram coletadas na Reserva Extrativista Chico Mendes, no município de Assis Brasil - AC, no dia 27 de agosto de 2014, coordenadas geográficas: S10°43'02.2" W 69°24'06.5".

2.2 MORFOMETRIA DE SEMENTES DE BAMBU

Para o estudo de biometria, foram selecionadas 100 sementes, apresentando boas características morfológicas e com aspecto íntegro para a mensuração. As variáveis analisadas foram comprimento (mm), largura (mm) e peso de 100 sementes.

Inicialmente, foi realizada uma seleção no lote de frutos obtidos, e as cariopses que não apresentavam sementes foram descartadas. Posteriormente, as cariopses com sementes tiveram seu tegumento externo retirado e somente as sementes foram utilizadas para a realização da biometria e dos experimentos de germinação *in vitro*.

As medições foram realizadas, utilizando-se um paquímetro digital com precisão de 0,01mm para medir o comprimento e largura. A massa das sementes foi aferida, utilizando-se uma balança analítica com precisão de 0,001g. Os dados das variáveis observadas foram submetidos à análise descritiva, obtendo-se as respectivas médias, valor máximo e mínimo, coeficiente de variação e desvio padrão da média com auxílio de planilha eletrônica Excel e do programa estatístico Assistat beta 7.7 para a correlação de Pearson.

2.3 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE BAMBU

O estabelecimento da germinação *in vitro* de bambu foi realizado com as sementes obtidas na fase anterior. O meio de cultura utilizado foi distribuído em tubos de ensaio, que foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavadas por 18 minutos a 1,1kgf/cm² em temperatura de 121°C. O pH foi ajustado em 5,8 antes da autolavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura con-

trolada de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, disposto de lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($30\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$), expostas ao fotoperíodo de 16 horas de luz.

Os dados foram submetidos a ANOVA e, quando não significativos, foram apresentadas apenas as médias dos tratamentos em tabelas com a utilização de planilha eletrônica Excel.

2.3.1 EXPERIMENTO 1 - GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE BAMBU EM FUNÇÃO DO AG3

As sementes com tegumento retirado foram colocadas em filtros de 100% poliéster medindo (5x5cm) e então mergulhadas em água com cinco gotas de detergente neutro, onde permaneceram por 24 horas. Após esse período, foram dispostas em soluções de 0, 100, 250 e 500mg/L^{-1} de ácido giberélico (AG_3) e água por 48 horas. Após, foram lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida foram levadas para câmara de fluxo laminar e mergulhados por 10 minutos em solução de Amistar® ($0,34\text{g/L}^{-1}$) e cloreto de benzalcônio ($0,5\text{g/L}^{-1}$). Logo depois foram imersas em álcool etílico a 70% (v/v), por um minuto, e então desinfestadas por 10 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo).

Após este procedimento, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclava-

da e inoculadas em tubos de ensaio preenchidos com 10ml de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30g/L^{-1}) e solidificado com ágar (6 g/L^{-1}).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 24 repetições por cada tratamento. A avaliação foi realizada pela verificação de porcentagem de germinação de sementes, quiescência, contaminação bacteriana e fúngica após 30 dias de inoculação.

2.3.2 EXPERIMENTO 2 - GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE BAMBU EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

As sementes com tegumento retirado foram colocadas em filtros 100% poliéster, medindo $5\times 5\text{cm}$, e então foram mergulhadas em água contendo cinco gotas de detergente neutro, permanecendo assim por 24 horas. Após esse tempo foram colocadas em solução 250mg/L^{-1} de ácido giberélico (AG_3), por 48 horas. Depois, foram lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida foram levadas para câmara de fluxo laminar e lavadas por 10 minutos em solução de Amistar® ($0,34\text{g/L}^{-1}$) e cloreto de benzalcônio ($0,5\text{g/L}^{-1}$). Posteriormente foram imersas em álcool etílico a 70% (v/v), por um minuto, e então desinfetadas por 10 minutos em hipoclorito de sódio (2,5%).

Após este procedimento, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio preenchidos com 10ml de meio de cultura MS e WPM (Wood Plant Medium), elaborado por LLOYD e MCCOWN, (1980), suplementados com sacarose (30g/L^{-1}) e solidificado com ágar (6g/L^{-1}) e com diferentes concentrações de ácido giberélico (AG_3) (0, 0,5; 0,75 e $1,0\text{mg/L}^{-1}$).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 24 repetições por tratamento. A avaliação foi realizada pela verificação da porcentagem de contaminação e germinação após 30 dias de inoculação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MORFOMETRIA DE SEMENTES DE BAMBU

Os resultados da caracterização biométrica das sementes de bambu estão apresentados abaixo. As médias foram de 9,81 e 1,46mm para comprimento e largura. Para a variável comprimento os valores mínimo e máximo encontrados foram de 5,53 e 16,15mm. Para a largura mínima e máxima dos valores descritos foram de 1,10 e 2,16mm. O desvio padrão foi de 3,79 e 0,20mm e o coeficiente de variação foi de 38,65

e 13,97mm para variável comprimento e largura, respectivamente. O peso médio total apresentado pelas sementes foi de 0,11g (Tabela 1).

Tabela 1 - Estatística descritiva das variáveis biométricas de sementes de bambu

Variáveis	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Peso (g)
Média	9,81	1,46	0,11
Mínimo	5,53	1,1	0,02
Máximo	16,15	2,16	0,92
Desvio padrão	3,79	0,2	0,13
CV (%)	38,65	13,97	11,53

Fonte: Leão (2017).

A descrição biométrica de sementes pode ser útil na identificação de diferentes espécies, pois fornece informações essenciais para a caracterização de aspectos ecológicos, como dispersão, agentes dispersores e estabelecimento de plântulas que são importantes para detectar a variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie e as relações entre essa variabilidade e os fatores ambientais (MACEDO *et al.*, 2009).

No presente estudo, observou-se que as sementes de bambu apresentaram maior variabilidade no comprimento em comparação com a variável largura e as duas correlacionam-se negativamente, ou seja, quando há o aumento no comprimento das sementes conseqüentemente existe a diminuição da lar-

gura. Para a variável peso, não houve correlação com as demais variáveis (Tabela 2).

Tabela 2 - Matriz de correlação de Pearson das variáveis biométricas de sementes do bambu nativo *Guadua latifolia* coletadas na Reserva Extrativista Chico Mendes, Assis Brasil - AC

Variáveis	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Peso (g)
Comprimento (mm)	1	-0,2158	0,1813
Largura (mm)	*	1	0,0244
Peso (g)	ns	ns	1

Fonte: Leão (2017).

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,1 \leq p < 0,05$); NS - Não Significativo.

De acordo com Bezerra *et al.* (2004), o peso específico e o tamanho das sementes, em muitas espécies, são indicativos de sua qualidade fisiológica. Dentro do mesmo lote, as sementes leves e pequenas podem apresentar menores percentuais de germinação e vigor em relação às sementes mais pesadas e de tamanho superior.

3.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE BAMBU

Os resultados do primeiro experimento de germinação *in vitro* podem ser observados na Tabela 3. A imersão das sementes por 48 horas em solução con-

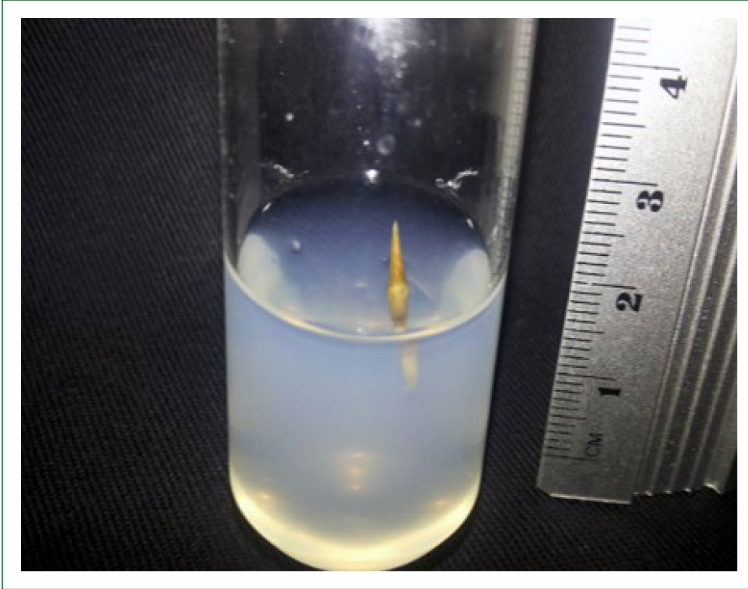
tendo ácido giberélico (AG3) em diferentes concentrações não foi eficiente para promover a germinação das sementes de bambu. Verificou-se que em todos os tratamentos, incluindo no controle, ocorreu início da germinação, mas após a emissão da radícula estagnou e não se desenvolveu (Figura 1). Ainda foi observado que em média 75% das sementes de todos os tratamentos permaneceram vivas, contudo não germinaram.

Tabela 3 - Germinação *in vitro* de sementes de *Guadua latifolia* submersas por 48 horas em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG3) após 30 dias de inoculação em Meio MS

Ag3 mg/L ⁻¹	Germinação (%)	Quiescente (%)	Cont. por bactéria (%)	Cont. por fungo (%)
controle	15	78	8	5
100	26	65	5	5
250	18	79	5	8
500	5	80	5	15
Média	16	75,5	5,75	8,25

Fonte: Leão (2017).

Figura 1 - Germinação *in vitro* de semente de bambu (*Guadua latifolia*) inoculada em meio de cultura MS com emissão da radícula (seta)



Fonte: Leão (2017).

A utilização do AG3 é conhecida por promover a germinação de sementes de várias espécies. Brar *et al.* (2013) observaram que a utilização de solução contendo 50ppm de AG3 *overnight* aumentou a porcentagem de germinação *in vitro* em sementes do bambu asiático *Dendrocalamus membranaceus*. Tal fato não foi observado neste estudo.

Infere-se que a baixa porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de bambu do gênero *Guadua* ocorreu devido ao tempo prolongado entre a coleta e a instalação dos experimentos. Naturalmente, nos

bambuzais que estão frutificando, as sementes germinam rapidamente logo após a dispersão formando um extenso banco de plântulas.

A propagação por sementes dessas espécies é problemática, devido à natureza de florescimento monocárpico, ou seja, cada população individual apresenta um único evento com floração e frutificação maciças e sincrônicas seguidas de mortalidade de toda a população. Além desse fato, de acordo com Singh *et al.* (2013), os bambus apresentam longo ciclo de vida, o que dificulta a obtenção de sementes e, quando estas são obtidas, possuem baixa capacidade de armazenamento, além de fatores ambientais e de secagem, que também podem influenciar na viabilidade das sementes.

Na Tabela 4, observa-se que cerca de 85% das sementes que estavam em meio MS permaneceram vivas. Já para o meio WPM, a taxa foi de quase 20%. O meio MS apresentou menores taxas de contaminação em todos os tratamentos, inclusive no controle quando comparado ao WPM. No meio WPM, foi observada ausência de germinação e baixa contaminação por fungos, porém expressiva contaminação bacteriana endofítica. Apesar do meio MS apresentar a menor taxa de contaminação microbiana, isso não foi suficiente para as sementes de bambu germinassem.

Tabela 4 - Germinação *in vitro* de sementes de *Guadua latifolia* em meios de cultura MS e WPM com diferentes concentrações de ácido giberélico (AG³) e após 30 dias de inoculação

Tratamentos Meio/AG3 mg/L ⁻¹	Germinação (%)	Quiescente (%)	Bactéria (%)	Fungo (%)	
MS	0	0	83	10	0
	0,5	0	84	9	0
	0,75	0	88	5	5
	1	0	88	8	0
WPM	0	0	40	42	10
	0,5	0	19	62	10
	0,75	0	15	40	40
	1	0	5	41	44

Fonte: Leão (2017).

O AG3 foi inserido no meio de cultura para auxiliar o processo de germinação das sementes *in vitro*. Esse hormônio vegetal é relatado como auxiliar no processo que desencadeia a germinação de sementes. Devi *et al.* (2012) verificaram que a utilização de meio de cultura MS contendo 0,5mg/L⁻¹ de AG3 promoveram até 80% de germinação em sementes do bambu gigante nativo da Tailândia *Dendrocalamus giganteus*.

Segundo Corder e Borges Junior (1999), diversos fatores podem afetar o potencial germinativo das sementes, dentre eles, a presença de microrganismos, especialmente fungos e bactérias. No presente trabalho, conseguiu-se diminuir os agentes contaminantes, porém não ocorreu a germinação das sementes, fato que deve estar relacionado às condições inerentes à própria espécie (PEREIRA & BERALDO, 2010).

Estudos futuros com outros lotes de sementes, tipos de meio de cultura devem ser realizados para complementar as respostas obtidas nesse estudo e melhor entendimento do comportamento fisiológico das sementes *in vitro* do bambu *Guadua sp.*

4 CONCLUSÃO

- As sementes estudadas apresentaram variações no comprimento podendo indicar a existência de variabilidade genética dentro da espécie;

- As variáveis comprimento e largura possuem baixa correlação;

- A imersão das sementes por 48 horas em solução de ácido giberélico (AG3) não foi eficiente para promover a germinação das sementes de bambu de forma satisfatória;

- O meio MS apresentou menores taxas de contaminação que o WPM em todos os tratamentos, inclusive no controle, porém não houve germinação de sementes de forma eficiente.

REFERÊNCIAS

BRAR, J.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* seed germination of economically important edible Bamboo *Dendrocalamus membranaceus* Munro. **J. Indian J Exp Biol**, v. 51, n. 1, p. 88-96, 2013.

BASKIN, C. S.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. London: Academic Press, 1998.

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTÉ, V. G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.295-299, 2004.

CALDERÓN, C. E.; SODERSTRORN, T. R. **The genera of Bambusoideae (Poaceae) of the American continent: Keys and comments**. Smithsonian Institution Press: Washington, 1980.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CARVALHO, A. L.; NELSON, B. W.; BIANCHINI, M. C.; PLAGNOL, D.; KUPLICH, T. M.; DALY, D. C. Bamboo-dominated forests of the Southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves". **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.

CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos - cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia**. Bogotá, Colombia. 2004.

- CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Will. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.
- DALY, D. C.; SILVEIRA, M. Primeiro catálogo da flora do Acre, Brasil/First Catalogue of the flora of Acre, Brasil. Rio Branco: Edufac, v. 1000. 2008, 555 p.
- DEVI, W. S.; BENGHELLA, L.; SHARMA, G. J. *In vitro* seed germination and micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro using seeds. **Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 74-80, 2012.
- DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil: da biologia à biotecnologia**. Rio de Janeiro: ICH, 2017. 655 p.
- JUDZIEWICZ, E. J.; CLARK, L.G; LONDOÑO, X; STER, M.J. **American Bamboo**. Smithsonian Institution Press. Washington and London, p. 392-247, 1999.
- LEÃO, J. R. A. **Propagação *in vitro* de *Guadua spp.* nativos da Amazônia Sul-Occidental, Acre, Brasil**. 2017. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências de Florestas Tropicais) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/36348/1/TESE_JOAO.pdf. Acesso em: 01 jul. 2021.
- LIESE, W. Anatomy and properties of bamboo. In: **Proc. Int. Bamboo Workshop, Hangzhou. China**. 1985.
- MACEDO, M. C. de.; SCALON, S. de P. Q.; SARI, A. P.; SCALON FILHO, H.; ROSA, Y.B. C. J.; ROBAINA, A. D. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Magonia pubescens* St.Hil (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 202-211, 2009.

MIRANDA, A. F. A. de. **Estudo anatômico do entrenó de *Guadua Kunth* (Poaceae: bambusoideae) ocorrentes no estado do Acre-Brasil**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, 2016.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, SP: Canal 6 Editora, 240 p. 2010.

OLIVIER, J.; PONCY, O. A taxonomical revision of *Guadua weberbaueri* Pilg. and *Guadua sarcocarpa* Londoño & P. M. Peterson (Poaceae). **Candollea**, v. 64, n. 2, p. 171-178, 2009.

OSTAPIV, F.; SALAMON, C.; GONÇALVES, M. T. T. Cursos tecnológicos de bambu *Guadua* no Acre - perspectivas sustentáveis e inovadoras. **ATHENA - Revista Científica de Educação**, v. 10, n. 10, 2008.

RICHA, S. M. L.; NERRU, B. Endogenous levels of plant growth substances in seeds of five bamboo species in relation to seed viability, **Indian J Plant Physiol**, v. 11, n. 4, p. 358, 2006.

SAFE, S. **Bambus como recurso florestal: suas aplicações, manejo, silvicultura, propagação, entomologia e a situação no DF**. Monografia (Engenheiro Florestal), Brasília – DF, *Universidade de Brasília*, p. 50, 2004.

SILVA, S. C. **Relação entre o tamanho das sementes de milho (*Zea mays* L.) com a germinação, o vigor e os componentes da produção de grãos**. (Dissertação de Mestrado). Jaboticabal. Universidade do Estado de São Paulo. 2000.

SINGH, S. R., SINGH, R., KALIA, S., DALAL, S., DHAWAN, A. K., KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo - a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41 2013.

SILVEIRA, M. **A floresta aberta com bambu no sudoeste da Amazônia: padrões e processos em múltiplas escalas.** Instituto de Ciências Biológicas, UNB. Tese de doutorado. 121 p. 2001.

SURENDRAN, C.; PARAMATHMA, M.;BALAJI, B. **Tree improvement in bamboo. Recent advances in bamboo research.** edited by Shamungauel P (Scientific Publishers India Jodhpur), 2003, p. 29.

CAPÍTULO 6

TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE BAMBUS

1 INTRODUÇÃO

O aumento do desmatamento e a crescente demanda por madeira e outros subprodutos colocam em evidência a busca por materiais alternativos para o suprimento desse recurso cada vez mais indisponível e com elevados custos. Os denominados “materiais não-convencionais” são uma das alternativas para substituir a madeira em várias de suas aplicações.

Dentre esses materiais, o bambu destaca-se devido a várias qualidades, como a alta versatilidade de uso, o que torna este recurso importante em todo

o mundo (MERA; XU, 2014). As inúmeras possibilidades vão desde a recuperação de áreas degradadas, passando por fontes de biomassa, sequestro de carbono, matéria-prima para construção civil, mix de fibras para papel e para a indústria têxtil, usos na indústria alimentar entre outras, chegando até aos bionanomateriais, como demonstram as mais recentes pesquisas (GUIMARAES *et al.*, 2015).

Existem aproximadamente 50 gêneros e 1.300 espécies de bambus, que se distribuem nos trópicos e regiões temperadas, com maior ocorrência nas zonas quentes e com chuvas abundantes das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América do Sul. Crescem naturalmente em todos os continentes, exceto na Europa (LONDOÑO, 2004). Dentre esses, o gênero *Guadua* é o que se desenvolve melhor em climas tropicais (SILVA, 2006). Grande parte está concentrada no sudoeste da Amazônia e é utilizada como matéria-prima para diversos fins, como: reflorestamento, construção civil, papel e celulose, carvão, móveis e artesanatos, além de ser um recurso renovável.

Sua propagação pode ocorrer por: 1) reprodução sexuada, através de sementes, um método difícil e pouco prático devido à esporadicidade de floração de muitos bambus, além da baixa viabilidade e vigor de suas sementes (JANZEN, 1976; RAMANAYAKE; YAKANDAWALA, 1998); 2) reprodução assexuada ou vegetativa, através de partes vegetativas da planta, tais como ramos, gemas, colmos e rizomas (CASTAÑO; MORENO, 2004; PEREIRA; BERALDO, 2010).

Os métodos mais utilizados são: desdobramento de touceiras, enraizamentos de estacas ou pedaços de colmos e ramos (FRANÇA, 2011), porém esses processos são limitados, especialmente para os plantios de grandes áreas, devido à necessidade de um grande número de mudas. Portanto, a inexistência de métodos que permitam a propagação das espécies de bambus em larga escala é o principal entrave para o desenvolvimento industrial desses materiais, tendo em vista a necessidade de implantação de grandes plantios para fins comerciais.

A clonagem vegetal é uma técnica que permite a reprodução assexuada de uma determinada planta, sendo importante para a multiplicação de espécies com características desejáveis. Pode ser realizada de forma convencional, por métodos como a estaquia, alporquia, enxertia e mergulhia, ou então por técnicas mais modernas como a micropropagação, que é realizada em laboratório. Ambas permitem a propagação exata do genoma da planta escolhida.

De acordo com Pereira e Beraldo (2010), a principal vantagem da propagação vegetativa é a possibilidade de obtenção de plantas clonais com uniformidade genética fenotípica. Para a maioria das espécies de *Guadua*, faltam estudos para definir o método mais adequado para sua propagação e para desenvolver um sistema de produção de mudas com elevadas taxas de sobrevivência.

A micropropagação permite a clonagem a partir de pequenos pedaços da planta matriz (deno-

minados explantes), que são desinfetados e cultivados sob condições assépticas, em um meio de cultura apropriado, em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura (MROGINSKI; ROCA, 1991), em um espaço físico reduzido, e com alto padrão de sanidade das mudas produzidas (GEORGE, 1996). Esta técnica é baseada em dois princípios: o balanço hormonal e a totipotência celular. O primeiro permite que ocorram alterações sincronizadas no crescimento e/ou no metabolismo celular (CID, 2005) e o segundo possibilita que uma única célula, sob determinado estímulo, possa ser reprogramada geneticamente, divida-se e dê origem a vários tipos celulares, podendo gerar um novo indivíduo (IELIV *et al.*, 2010).

Ela pode ser dividida em 5 etapas: estabelecimento, multiplicação, alongamento, enraizamento e aclimatização (XAVIER *et al.* 2007), mas dependendo da espécie, uma etapa pode ser adicionada ou retirada. Para algumas plantas, é necessária uma etapa anterior ao estabelecimento, que corresponde ao tratamento da planta matriz. Já para outras, não são necessários o alongamento ou o enraizamento, que poderão ocorrer *ex situ*.

O estabelecimento do cultivo *in vitro* é a fase inicial do processo e a mais problemática, devido a contaminações bacterianas e fúngicas que ocorrem nos explantes (folhas, gemas, segmentos nodais, dentre outros). Além das contaminações superficiais, também se tem a contaminação endógena, mais fre-

quente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo. Nessa etapa, devem-se ter plantas livres de patógenos para se iniciar o cultivo, que culminará na produção de mudas clonais com alta qualidade fitossanitária e fidelidade genética garantida.

Segundo Costa *et al.* (2010), é comum a contaminação do material vegetal durante o cultivo *in vitro*, devido, especialmente, à existência de microrganismos endofíticos e/ou a resistentes ao processo de desinfestação. Além disso, as substâncias desinfestantes geralmente utilizadas são capazes de eliminar apenas os microrganismos que estão na parte superficial do explante, mantendo intactos aqueles que estão em seu interior (OLIVEIRA, 2009).

Em se tratando da cultura do bambu, o aparecimento de contaminações de origem endógena tem sido um dos principais problemas no processo de estabelecimento *in vitro* (NADHA, *et al.*, 2012). Por essa razão, o sucesso para uma micropropagação de qualidade está em conseguir eliminar esses microrganismos por meio do desenvolvimento de um protocolo de desinfestação eficiente do explante a ser utilizado na inoculação.

Em pesquisas mais recentes, tem-se utilizado no meio de cultura um biocida sintético, o PPM® (*Plant Preservative Mixture*), que tem sido eficiente para controlar as contaminações endógenas. Flores *et al.* (2012) verificaram que a utilização de 2ml/L⁻¹ de PPM® foram eficientes para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de cedro e mogno. Jimenez *et al.* 2006 observaram 52% de contaminações em segmen-

tos nodais de *Guadua angustifolia*, utilizando essa mesma concentração de PPM®.

O PPM contém ingredientes ativos que penetram na parede celular de fungos e bactérias, inibindo a atividade de enzimas chaves do metabolismo de ciclos centrais como a do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons, e com isso consegue neutralizar e impedir o crescimento destes microrganismos (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo relatar os procedimentos necessários para o estabelecimento *in vitro* de bambus do gênero *Guadua spp.* de ocorrência no estado do Acre e com enorme potencial econômico.

2 METODOLOGIA PARA CULTIVO *IN VITRO* DE BAMBUS NATIVOS

Inicialmente, devem ser feitas mudas das plantas matrizes que se deseja clonar. Estas devem ser conduzidas à casa de vegetação, que deverá ser fechada lateralmente com tela mosquiteiro, ter telhado de vidro coberto com sombrite de 50%, a uma temperatura média de 30°C e umidade relativa (U.R) variando de 70% a 80% (Figura 1). Nesse local, as plantas deverão receber aplicações periódicas (2 vezes por semana) do fungicida sistêmico Amistar® (3g/L⁻¹).

Figura 1 - Mudas de *Guadua* sp. localizadas na casa de vegetação da Embrapa Acre



Fonte: Raposo, A. 2016.

Após um tempo mínimo de 30 dias recebendo as pulverizações semanais, os segmentos nodais devem ser coletados, utilizando-se uma tesoura de poda e conduzidos ao laboratório onde serão seccionados. Cada corte deverá ter entre 2 a 3cm, conter um nó e uma gema (Figura 2 A), podendo ter ou não espinhos. Devem-se utilizar apenas os segmentos laterais.

Com o auxílio de um bisturi, as bainhas localizadas acima das gemas devem ser retiradas, deixando-as expostas (Figura 2A). Se existirem espinhos, devem ser excisados, por promoverem o aumento do risco de contaminação do material em condições de cultivo *in vitro* (Figura 2B).

**Figura 2 - Segmento nodal de Bambu (*Guadua sp.*)
contendo um nó e uma gema lateral**

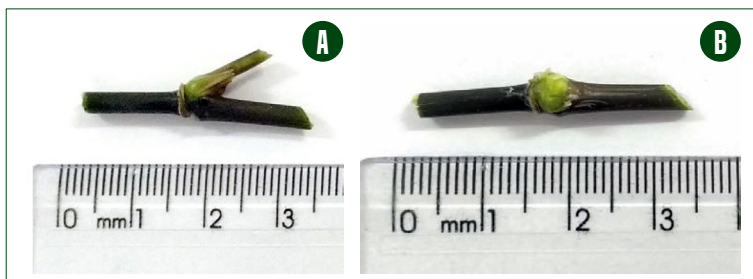


Foto: Raposo, A. 2016.

Para assepsia do material, após excisão, os explantes devem ser colocados em uma bandeja e lavados com água e algumas gotas de detergente neutro e uma escova de cerdas finas, por 5 minutos (para cada 100ml de água colocar 20 gotas de detergente), lavados com água corrente e 3 vezes com água destilada estéril, para completa remoção do detergente.

No interior da câmara de fluxo laminar, devem-se mergulhar os explantes por cinco minutos em solução de pré-desinfestação contendo Amistar® ($0,34\text{g/L}^{-1}$) e cloreto de benzalcônio ($0,5\text{g/L}^{-1}$). Para isso, deve-se preparar aproximadamente 100ml de solução para 100 explantes. Após, lavar em água destilada estéril e mergulhar em álcool etílico (70%), por um minuto, e em hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, contendo algumas gotas de detergente, por 10 minutos. Tem-se, ainda, que lavar o material por três vezes em água destilada estéril. Em seguida, realiza-se a inoculação dos explantes desinfestados em tubos de ensaios preenchidos

dos com 10ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30g/L^{-1}), com ágar (6g/L^{-1}), com a citocinina 6-benzilaminopurina - BAP (2mg/L^{-1}) e com o biocida *Plant Preservative Misture*[®] - PPM[®] (2ml/L^{-1}). Os tubos devem ser fechados com tampas de polipropileno e autoclavados por 15 minutos a $1,1\text{kgf/cm}^2$, em temperatura de $121\text{ }^\circ\text{C}$. O pH deve ser ajustado a 5,8 antes da autoclavagem.

Após a inoculação, o material deverá ser conduzido para sala de crescimento, onde deverá permanecer por 30 dias em temperatura controlada de $25\pm 2^\circ\text{C}$, com irradiância de $30\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$, e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Com esse protocolo é possível, após 15 dias de inoculação, observar o início de brotações (Figuras 3A e 3B). Nesse mesmo tempo, também se observam as contaminações fúngicas e bacterianas (Figuras 3A). Os explantes apresentam coloração verde quando são inoculados, mas com o tempo vão escurecendo, até o ponto de se tornarem completamente marrons (Figura 3 e 4B). Como os segmentos nodais são relativamente novos, são formados por camadas de folhas caulinares, que protegem a gema, sendo o escurecimento observado provavelmente resultado da necrose destas folhas. Não ocorrendo a morte dos explantes, verifica-se que as brotações surgem do local onde a gema ficou exposta em contato com meio de cultura MS suplementado com sacarose (30g/L^{-1}), ágar (6g/L^{-1}), 6-benzilaminopurina - BAP (2mg/L^{-1}) e PPM (2ml/L^{-1}). Observa-se, também, o tamanho desuniforme

me das brotações e brotos com até 2 cm no início da brotação (Figuras 3 A e B).

Figura 3 - Segmentos nodais de bambu com tamanho desuniforme de brotações

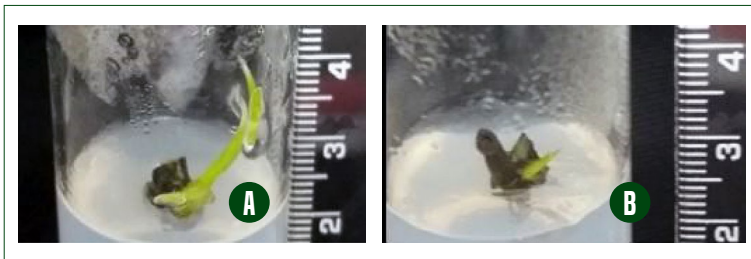


Foto: Raposo, A. 2016.

Figura 4 - Segmentos nodais de bambu com presença de fungos, bactérias e folhas caulinares necrosadas com emissão de brotação da gema lateral

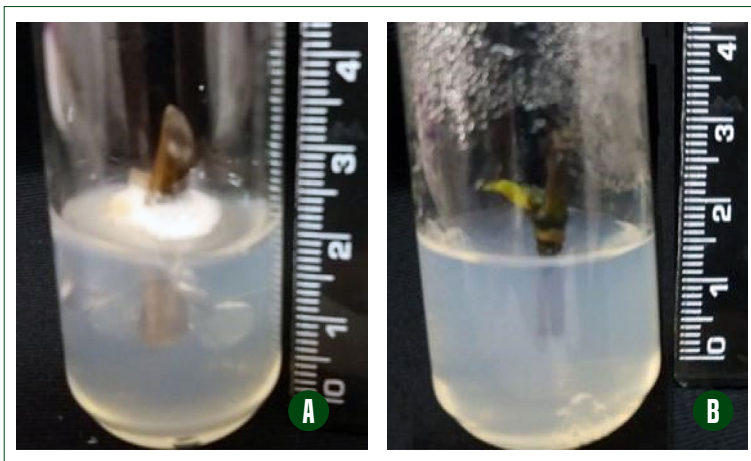


Foto: Raposo, A. 2016.

Após 30 dias de inoculação, os explantes não contaminados apresentam em média 3 brotos. A taxa de sobrevivência, utilizando este protocolo, é relativamente baixa, cerca de 20%. No entanto pesquisas continuam em andamento, de forma a aumentar esse percentual.

O bioma amazônico, devido às suas condições edafoclimáticas peculiares, é propício para o crescimento de microrganismos. De acordo com Rodrigues *et al.* (2011), em floresta tropical úmida, populações de fungos desenvolvem-se melhor em época seca devido às maiores taxas de fluxo de calor observadas neste período, e as bactérias, por sua vez, desenvolvem-se melhor em épocas chuvosas e de transição. O bambu endêmico da região amazônica possui microrganismos endofíticos, que, mesmo com a utilização de antimicrobianos internos e externos, não é possível eliminá-los (KHAN *et al.*,2014).

Após o estabelecimento, o material que não apresentar contaminações visíveis deverá ser transferido, em condições assépticas, para frascos com capacidade de 250ml, preenchidos com 30ml de meio de cultura MS e suplementado com sacarose (30g/L⁻¹), BAP (2mg/L⁻¹) e PPM® (2m/L⁻¹).

O presente trabalho apresenta um passo importante para a implementação da cultura do bambu (*Guadua sp.*). Com a adoção das recomendações colocadas, espera-se obter 20% de explantes desinfestados e estabelecidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos - cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia.** Bogotá, Colombia. 190p. 2004.

CID, L.P.B. **Hormônios vegetais em plantas superiores.** Brasília, DF: EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 188 p.

COSTA, M.G.C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; OTONI, W.C. **Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgão de plantas, 17-59.** In: Scherwinski-Pereira, J.E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas.** Brasília, DF, 2010.

FRANÇA, C.D. **Potencialidades de espécies de Bambu para estabilidade de encostas e áreas degradadas em solos de cerrado.** 2011. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

GUIMARÃES, M. JR.; BOTARO, V.R.; NOVACK, K.M.; NETO, W.P.; MENDES, L.M.; TONOLI, G.H. Preparation of Cellulose Nanofibrils from Bamboo Pulp by Mechanical Defibrillation for Their Applications in Biodegradable Composites. **J. Nanosci Nanotechnol**, v. 15, n. 7, p. 6751-6768, 2015.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture.** Exegetics, Edington, v.1, p. 555. 1996.

ILIEV, I.; GAJDO, A.; LIBIAKOV, G.; JAIN, S.M. **Plant Micropropagation** p. 1-25. In: DAVEY, M.R; ANTHONY, A. (Eds.). *Plant Cell Culture: essential methods*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex.
Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=2BDAABB606679A39FCB6D22E46FB1BF5?doi=10.1.1.469.9152&rep=rep1&type=pdf>> Acesso em: 15 maio 2017.

JANZEN, D.H. Why bamboos wait so long to flower. **Annual Reviews Ecology and Systematics**. v. 7, n.1, p. 347-391, 1976.

JIMÉNEZ, V.M., CASTILLO, J., TAVARES, E., GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** n. 86, p.389-395, 2006.

KHAN, H.R.; BURLA, R.; SIRI, N.; LAVANYA, P. Effect of nutrient media and phytohormones on *in vitro* establishment of *Bambusa balcooa*. Roxb. **International Letters of Natural Sciences**. v. 17, n. 1, p. 1-11, 2014.

LONDOÑO, X. **La Subtribu Guaduinae de América**, Simpósio Internacional *Guadua*; Pereira, Colômbia, 2004.

MERA, F.A.T.; XU,C. Plantation management and resource economics of bamboo in China. **Ciência e Tecnologia**. v. 7, n. 1, p. 1-12, 2014.

MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. **Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro**. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, CIAT, p.19-40, 1991.

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

NADHA, H.K.; SALWAN, R.; KASANA, R.C.; ANAND, M. SOOD 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.

OLIVEIRA, J.P. de. 2009. **Produção de mudas *in vitro* e ocorrência de microrganismos endofíticos em bananeiras da Amazônia Sul-Ocidental**. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre. 123 pp.

PEREIRA, M.A.R.; BERARDO, A.L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, SP: Canal6 Editora, 240 p. 2010.

FLORES, J.P.; VEGA, M.E.A.; TRIPEPI, R.R. Assays for the *in vitro* establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*. **Rev. Colomb. Biotecnol.** v.14, n.1, pp.20-30, 2012.

PLANT CELL TECHNOLOGY. Disponível em <http://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information>. Acesso em: 05 maio 2017.

RAMANAYAKE, S.M.S.D.; YAKANDAWALA, K. Incidence of flowering, death and phenology of development in the Giant Bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). **Annals of Botany**. v. 82, p. 779-785, 1998.

RODRIGUES, H.J.B.; SÁ, L.D.A.; RUIVO, M.L.P.; COSTA, A.C.L.; ROMMEL SILVA, B.; MOURA, Q.L.; MELLO, I.F. Variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.26, n.4, 629 - 638, 2011.

Clonagem de Bambus Nativos da Amazônia Sul-Occidental

SILVA, R.M. de C. **O Bambu no Brasil e no Mundo**. Anais do Encontro da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás. 45 p. 2006. Goiânia, GO. Disponível em: <http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2016.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 55-74.

ANEXO A - POLÍTICA NACIONAL DE INCENTIVO AO MANEJO SUSTENTADO E AO CULTIVO DO BAMBU

LEI N° 12.484, DE 8 DE SETEMBRO DE 2011.

Dispõe sobre a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu e dá outras providências.

Art. 1º Esta Lei institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu - PNMCB, que tem por objetivo o desenvolvimento da cultura do bambu no Brasil por meio de ações governamentais e de empreendimentos privados.

Art. 2º Os incentivos a que se refere o art. 1º desta Lei destinam-se ao manejo sustentado das **formações nativas (grifo do autor)** e ao cultivo de bambu voltado para a produção de colmos, para a extração de brotos e obtenção de serviços ambientais, bem como à valorização desse ativo ambiental como instrumento de promoção de desenvolvimento socioeconômico regional.

Art. 3º São diretrizes da PNMCB:

I - a valorização do bambu como produto agro-silvo-cultural capaz de suprir necessidades ecológicas, econômicas, sociais e culturais;

II - o desenvolvimento tecnológico do manejo sustentado, cultivo e das aplicações do bambu;

III - o desenvolvimento de polos de manejo sustentado, cultivo e de beneficiamento de bambu, em especial nas regiões de maior ocorrência de **estoques naturais do vegetal (grifo do autor)**, em regiões cuja produção agrícola baseia-se em unidades familiares de produção e no entorno de centros geradores de tecnologias aplicáveis ao produto.

Art. 4º São instrumentos da PNMCB:

I - crédito rural sob condições favorecidas, em especial no que se refere a taxas de juros e prazos de pagamento;

II - assistência técnica durante o ciclo produtivo da cultura e as fases de transformação e de comercialização da produção;

III - certificação de origem e de qualidade dos produtos destinados à comercialização.

Art. 5º Na implementação da política de que trata esta Lei, compete aos órgãos competentes:

I - incentivar a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico voltados para o manejo sustentado, o cultivo, os serviços ambientais e as aplicações dos produtos e subprodutos do bambu;

II - orientar o cultivo para a produção e a extração de brotos para a alimentação;

III - incentivar o cultivo e a utilização do bambu pela agricultura familiar;

IV - estabelecer parcerias com entidades públicas e privadas para maximizar a produção e a comercialização dos produtos derivados do bambu;

V - estimular o comércio interno e externo de bambu e de seus subprodutos;

VI - incentivar o intercâmbio com instituições congêneres nacionais e internacionais.

Art. 6º Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação

João Ricardo Avelino Leão

Possui graduação em Engenharia Florestal (2011), e mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (2013) ambos pela Universidade Federal do Acre, e doutorado em Ciências de Florestas Tropicais pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (2017). Atualmente é docente do Instituto Federal do Acre na área de Engenharia Florestal e no Mestrado Profissional em Educação Profissional e Tecnológica (ProfEPT), atuando na linha de pesquisa de Práticas Educativas em Educação Profissional e Tecnológica (EPT). Possui experiência na área de Recursos Florestais, com ênfase em Silvicultura Tropical, atuando principalmente nos seguintes temas: propagação de plantas, sementes florestais e ensino de Engenharia Florestal - manejo florestal, dendrometria, inventário florestal, tecnologia da madeira, proteção florestal, legislação florestal e agronegócio.

