

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MINAS GERAIS – CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA
CURSO BACHARELADO EM AGRONOMIA
FERNANDA MARIA DIAS**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.)
Backer ex K. Heyne 1927 SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E
COMPRIMENTOS DE EXPLANTE**

SÃO JOÃO EVANGELISTA – MG

2018

FERNANDA MARIA DIAS

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Dendrocalamus asper asper* (Schult. & Schult. f.)
Backer ex K. Heyne 1927 SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E
COMPRIMENTOS DE EXPLANTE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais - Campus São João
Evangelista como exigência parcial para obtenção do
título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Dr. Giuslan Carvalho Pereira

Coorientador: Me. Ari Medeiros Braga Neto

SÃO JOÃO EVANGELISTA – MG

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

D541e
2019

Dias, Fernanda Maria.

Estabelecimento *in vitro* de *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne 1927 sob diferentes concentrações de sacarose e comprimentos de explante. / Fernanda Maria Dias. – 2019.
45f; il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Giuslan Carvalho Pereira.

Coorientador: Me. Ari Medeiros Braga Neto.

1. *Dendrocalamus asper*. 2. Contaminação. 3. Sacarose. 4. Comprimento.
I. Dias, Fernanda Maria. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista. III. Título.

CDD 633.587

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais
Campus São João Evangelista

Bibliotecária Responsável: Rejane Valéria Santos – CRB-6/2907,

FERNANDA MARIA DIAS

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Dendrocalamus asper asper* (Schult. & Schult. f.)
Backer ex K. Heyne 1927 SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E
COMPRIMENTOS DE EXPLANTE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João
Evangelista como exigência parcial para obtenção do
título de Bacharel em Agronomia.

Aprovada em 21/12/2018

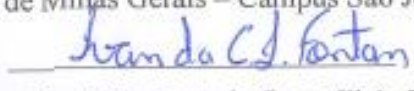
BANCA EXAMINADORA


Orientador: Prof. Dr. Giuslan Carvalho Pereira

Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista


Coorientador: Me. Ari Medeiros Braga Neto

Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista


Membro: Prof. Me. Ivan da Costa Ilhéu Fontan

Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista

*Dedico este trabalho a DEUS e
A minha filha, YASMIN.*

Agradecimentos

A Deus por me oportunizar tantas coisas boas, permitindo que eu alcance meus objetivos.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais campus São João Evangelista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Giuslan Carvalho Pereira. Que além deste trabalho, me orientou diversas vezes ao longo da graduação. Obrigada pelos conselhos que me ajudaram em momentos decisivos da minha vida acadêmica. Talvez se não fossem as suas falas enérgicas em alguns momentos, eu não teria encontrado impulso para superar algumas barreiras que encontrei pelo caminho.

Ao meu coorientador Me. Ari Medeiros Braga Neto pelas valiosas contribuições dadas a este trabalho.

Ao Professor Ivan da Costa Ilhéu Fontan por ter plantado em minha mente a ideia deste trabalho.

Aos servidores Munik, Paulo Modesto e Fernando Ramos, por quem tenho profunda admiração e respeito.

A minha família, grande apoiadora e incentivadora dos meus estudos.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os bambus apresentam um elevado potencial de utilização. Contudo, no Brasil o seu uso é limitado pela escassez de informações sobre aspectos agronômicos, tecnologias de transformação industrial, falta de tradição no emprego desse material e sobretudo pela dificuldade de produção de mudas em larga escala. A micropropagação apresenta-se como uma alternativa a multiplicação de espécies que apresentam limitação de propagação por métodos convencionais, sendo uma técnica que pode viabilizar o plantio de bambu em grandes áreas por fornecer mudas de alto padrão fitossanitário em quantidade e homogeneidade desejáveis. O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a influência da concentração de sacarose e do comprimento do explante sobre o estabelecimento *in vitro* da espécie *Dendrocalamus asper*. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente ao acaso (DIC) com arranjo fatorial (2 x 5), sendo testados o efeito de dois comprimentos de explantes (15 e 30 mm) e cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹). O cultivo *in vitro* deu-se por 21 dias, ao final dos quais se avaliou a porcentagem de sobrevivência, contaminações visíveis causadas por fungos e/ou bactérias, o número de brotos emitidos por tratamento e a oxidação. Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, em seguida foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar se houve diferença estatística entre os tratamentos. Os que apresentaram diferença significativa foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A interação entre os fatores foi significativa (P<0,05) para a média de brotos e não significativa para porcentagem de sobrevivência e contaminação. A oxidação não interferiu no desenvolvimento dos explantes. A menor contaminação e maior sobrevivência foi observada no tratamento com explantes de 15 mm na ausência de sacarose. O maior número de brotos foi obtido no tratamento com explante de 30 mm na ausência de sacarose.

Palavras-chave: *Dendrocalamus asper*, contaminação, sacarose, comprimento.

ABSTRACT

Bamboos have a high potential of use. However, in Brazil its use is limited by the scarcity of information on agronomic aspects, industrial processing technologies, lack of tradition in the use of this material and especially because of the difficulty of large-scale seedlings. Micropropagation presents as an alternative the multiplication of species that present limitation of propagation by conventional methods, being a technique that can make feasible the planting of bamboo in large areas for supplying seedlings of high phytosanitary standard in quantity and homogeneity desirable. The objective of this work was to evaluate the influence of sucrose concentration and explant length on the in vitro establishment of the species *Dendrocalamus asper*. The experiment was conducted in a completely randomized experimental design (DIC) with a factorial arrangement (2 x 5), being tested the effect of two lengths of explants (15 and 30 mm) and five sucrose concentrations (0, 15, 30, 45 and 60 g L⁻¹). In vitro culture was given for 21 days, at the end of which the percentage of survival, visible contaminations caused by fungi and / or bacteria, the number of shoots emitted per treatment and the oxidation were evaluated. The data were transformed into $\sqrt{(x + 1)}$, after which they were submitted to analysis of variance (ANOVA) to verify if there was statistical difference between the treatments. Those that presented significant were compared by the Tukey test at 5% probability. The interaction between the factors was significant ($P < 0.05$) for the mean of shoots e não significativa para porcentagem de sobrevivência e contaminação. Oxidation did not interfere in the development of the explants. The lower contamination and higher survival was observed in the treatment with explants of 15 mm in the absence of sucrose. The highest number of shoots was obtained in the treatment with a 30 mm explant in the absence of sucrose.

Key words: *Dendrocalamus asper*, contamination, sucrose, length.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Origem dos explantes utilizados no cultivo in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i> . (a) matriz plantada à campo. (b) segmento nodal seccionado. (c) segmentos nodais acondicionados em caixa de isopor.	24
Figura 2 - Preparo dos explantes de <i>Dendrocalamus asper</i> . (a) Retirada da bainha e exposição da gema dormente. (b) segmentos nodais seccionados a 15mm e 30mm e raspados na região de inserção da bainha para posterior inoculação.	25
Figura 3 – Manifestação microbiana durante a fase de estabelecimento. (a) Contaminação fúngica com origem no explante. (b) Contaminação fúngica do meio de cultura e do explante. (c) Contaminação fúngica e bacteriana.	28
Figura 4 – % de contaminação e sobrevivência em função do comprimento do explante e da concentração de sacarose.....	29
Figura 5 – Número de brotos aos 21 dias de estabelecimento de <i>Dendrocalamus asper</i> . (a) Segmento nodal de 15mm em meio de cultura sem sacarose. (b e c) Segmentos nodais de 30mm em meio de cultura sem sacarose. (d) Segmento nodal de 30mm em meio de cultura contendo	31
Figura 6 – Número de explantes contaminados, sobreviventes sem broto e estabelecidos (com broto) em cada tratamento durante o estabelecimento in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i>	32
Figura 7 – Média do número de brotos emitidos em função da concentração de sacarose e do comprimento dos explantes durante o estabelecimento in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição básica do meio de cultura MS.....	19
Tabela 2 – Comprimentos dos explantes e concentrações de sacarose testados durante o estabelecimento in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i>	26
Tabela 3 – Resumo da análise de variância (anova) para a contaminação (Cont.) e sobrevivência (Sob.) em relação ao comprimento dos explantes e concentração de sacarose durante a fase de estabelecimento in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i>	27
Tabela 4 – Porcentagem de contaminação (Cont.) e sobrevivência (Sob.) em relação ao comprimento dos explantes durante a fase de estabelecimento in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i>	30
Tabela 5 – Porcentagem da contaminação (Cont.) e sobrevivência (Sob.) dos explantes em relação a concentração de sacarose (em gramas) do meio de cultura durante a fase de estabelecimento in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i>	30
Tabela 6 – Resumo da análise de variância (anova) para o número de brotos por tratamento em relação ao comprimento dos explantes e da concentração de sacarose durante a fase de estabelecimento in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i>	31
Tabela 7 – Resumo da análise de variância (anova) para o número de brotos por tratamento, considerando o desdobramento de comprimento dentro de cada nível de sacarose.....	33
Tabela 8 – Média do número de brotos por explante em função do efeito da concentração de sacarose do meio de cultura sob os diferentes comprimentos de explante utilizados durante a fase de estabelecimento in vitro de <i>Dendrocalamus asper</i>	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DOS BAMBUS	11
2.2 O POTENCIAL DO BAMBU.....	12
2.3 A ESPÉCIE <i>Dendrocalamus asper</i>	15
2.4 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO	15
2.5 MICROPROPAGAÇÃO	16
2.5.1 Aspectos gerais.....	16
2.5.2 Meios de cultura	19
2.5.3 Estabelecimento <i>in vitro</i>	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	23
3.2 ORIGEM E SELEÇÃO DO MATERIAL PROPAGATIVO	24
3.3 DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES	25
3.4 PREPARO DO MEIO DE CULTURA E INOCULAÇÃO	26
3.5 ARRANJO EXPERIMENTAL, PARÂMETROS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 CONTAMINAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA.....	27
4.2 NÚMERO DE BROTO.....	31
5. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO I	42

1. INTRODUÇÃO

Bambu é o nome comum de várias espécies pertencentes à família Poaceae e subfamília Bambusoideae. No Brasil, existe um elevado número de espécies nativas, entre as quais várias são endêmicas. Além disso uma grande quantidade de espécies foi introduzida e se adaptou muito bem às condições edafoclimáticas do país. Essas plantas possuem parte aérea constituída por caules do tipo colmo, folhas constituídas por bainha e lâmina, ramificações laterais, inflorescências denominadas espiguetas e frutos geralmente do tipo cariopse. A parte subterrânea é composta por rizomas e raízes fasciculadas (FILGUEIRAS & VIANA, 2017). O florescimento da maioria das espécies é um fenômeno raro, fazendo com que algumas delas apresentem uma fase vegetativa praticamente indefinida (AZZINI et al., 1982; SILVA, 2005). Deste modo, tem-se a propagação vegetativa como principal e as vezes exclusivo método de multiplicação dos bambus.

Desde os tempos primitivos, o bambu esteve presente no cotidiano de diversos povos, isso se dá principalmente a sua versatilidade, podendo ser empregado na alimentação, construção civil, artesanato, ornamentação, produção de celulose, produção de biomassa, entre tantas outras possibilidades de uso (SILVA, 2005). No oriente e em outros países onde tradicionalmente os bambus são mais valorizados, já existem pesquisas bastante avançadas com relação ao seu uso. O Brasil dispõe de condições edafoclimáticas propícias ao cultivo de diversas espécies de valor comercial, e muitas áreas degradadas inaptas para outros cultivos que podem ser utilizadas para o plantio de bambu. Contudo a falta de tradição na utilização deste material e o escasso conhecimento científico sobre as espécies, restringem o investimento em tecnologias locais adequadas a utilização (DRUMOND & WIEDMAN, 2017).

Um dos fatores que mais limitam a expansão da cadeia produtiva dos bambus é a dificuldade de obtenção de mudas para o plantio. O raro florescimento, e a baixa viabilidade das sementes dificultam a propagação sexuada (NOGUEIRA et al., 2017). A propagação vegetativa é relativamente eficiente para produção de pouca quantidade de mudas e limitadas para a produção de um elevado número de plantas (FONSECA, 2007). Deste modo tem-se na micropropagação uma importante alternativa para a propagação e larga escala, o que tem gerado grandes expectativas e realização de muitas pesquisas para o desenvolvimento de protocolos para propagação massal de mudas (MUDOI et al., 2013).

A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa *in vitro*. É iniciada a partir de um “explante”, que pode ser um fragmento de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido vegetal que responda às condições *in vitro*. A regeneração é fundamentada na capacidade de

totipotência da célula, ou seja, a capacidade de produzir órgãos ou embriões que originarão uma planta inteira. É a aplicação mais prática dentro da cultura de tecidos e aquela de maior impacto. Embora a produção comercial de plantas *in vitro* seja bastante difundida na Europa, Ásia e Estados Unidos, no Brasil é uma prática relativamente recente (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998; CANÇADO et al., 2009). Essencialmente esta técnica apresenta quatro etapas: estabelecimento dos explantes em meio de cultivo, multiplicação dos propágulos, enraizamento e aclimatização das plântulas. Apesar das inúmeras vantagens de sua utilização, o emprego desta técnica pode ser limitado pelo alto custo e por problemas frequentemente encontrados, como contaminação, mutações, desordens fisiológicas e baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização. É necessário que esses problemas sejam superados para que na produção de mudas torne-se viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação (ERIG & SCHUCH, 2005; CABRAL, 2004). Diversos fatores endógenos e exógenos exercem influência no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*, sendo necessário estabelecer um protocolo próprio para cada espécie vegetal (CAMPOS et al., 2013).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a influência da concentração de sacarose e do comprimento do explante sobre o estabelecimento *in vitro* da espécie *Dendrocalamus asper*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DOS BAMBUS

Bambu é a denominação utilizada para o grupo de plantas da família Poaceae e subfamília Bambusoideae. Atualmente são classificadas em três tribos: Arundinarieae, Bambuseae e Olyreae. No Brasil, são encontradas espécies das tribos Olyreae e Bambuseae (FILGUEIRAS & VIANA, 2017). A tribo Bambuseae é composta por plantas de porte mais elevado e colmos lenhosos, enquanto a tribo Olyreae reúne plantas de menor porte e colmos herbáceos (GUILHERME et al, 2017).

A família Bambusoideae ocorre naturalmente em todos os continentes, exceto na Europa (LOPEZ, 2003). Devido a ampla distribuição geográfica, é possível encontrar espécies adaptadas a diversas condições edafoclimáticas. O bambu pode ser cultivado a altitudes de 0 a 3.800 metros, com índice pluviométrico entre 500 e 4.500 mm/ano, temperatura média entre -15°C e 40°C, enfrentando umidade relativa de 35% a 100% e apresentando boa produtividade em solos com pH entre 4,5 e 7,5 (SANTI, 2015). Estima-se que existam cerca de 1.300 espécies

de bambus em todo o mundo. Na América, o Brasil possui a maior diversidade e elevado endemismo. São conhecidas 258 espécies nativas distribuídas em 35 gêneros, dentre os quais, 175 espécies e 12 gêneros são endêmicos (FILGUEIRAS & VIANA, 2017).

Os bambus possuem hábito arborescente de rápido crescimento que expressa de forma visível no alongamento de seus colmos. Estudos demonstraram que em espécies de maior porte, o incremento de altura pode ser próximo de 40 cm em um período de 24 horas (SILVA, 2005). O acúmulo de biomassa é insuperável entre as espécies vegetais (MUDOI, et al., 2013).

Essas plantas possuem parte aérea constituída por caules do tipo colmo, folhas constituídas por bainha e lâmina, ramificações laterais e inflorescências denominadas espiguetas. Os frutos, são geralmente do tipo cariopse, caracterizada pelo pericarpo aderido à semente. A parte subterrânea é composta por rizomas e raízes fasciculadas (FILGUEIRAS & VIANA, 2017). As formas de crescimento das espécies estão ligadas diretamente à estrutura dos rizomas (TOMBOLATO et al., 2012). Rizomas paquimorfos são curtos e grossos e suas gemas laterais dão origem apenas a novos rizomas. Somente a gema apical é capaz de originar um novo colmo. Deste modo, tem-se o grupo de espécies entouceirantes ou de crescimento simpodial. Estas são mais comumente encontradas nas regiões tropicais e os gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Guadua* são os principais representantes. O rizoma do tipo leptomorfo é capaz de originar um novo caule a partir de uma gema lateral que supera o estado de dormência. As espécies desse grupo são então chamadas de alastrantes, apresentando crescimento monopodial. São de ocorrência mais comum nas regiões de clima temperado e tem como representante mais conhecido, o gênero *Phyllostachys* (SILVA, 2005).

O florescimento dos bambus, é essencialmente distinto das demais angiospermas, pode ser um fenômeno raro levando até 120 anos para acontecer. Deste modo, tem-se em algumas espécies uma fase vegetativa praticamente indefinida (AZZINI et al., 1982; SILVA, 2005). De um modo geral, na tribo Olyreae, as plantas são pluricárpicas, ou seja, florescem anualmente. A tribo Bambuseae, apresenta o fenômeno de monocarpia, marcada pela morte de toda população após floração em massa. Não há porém, uma regra geral aplicável a todas as espécies, pois o ciclo de floração varia entre espécies e entre populações razoavelmente distantes de uma mesma espécie (FILGUEIRAS & VIANA, 2017).

2.2 O POTENCIAL DO BAMBU

O bambu sempre esteve presente no dia a dia e na cultura dos povos primitivos de todos continentes, com exceção da Europa que não tem nenhuma espécie nativa (SILVA, 2005).

Há milênios o bambu é utilizado no oriente para as mais diversas funções no cotidiano. Em países como Equador, Colômbia e Costa Rica, onde as pesquisas já estão bastante avançadas com relação ao uso do bambu, já se encontra o emprego deste material em construção de pontes, paradas de ônibus, praças de pedágio e também em programas governamentais de habitações de interesse social (DRUMOND & WIEDMAN, 2017). O bambu pode ser empregado de diferentes formas em atividades que vão desde a recuperação de áreas degradadas, passando por fontes de biomassa, matéria-prima para construção civil, mix de fibras para papel e para a indústria têxtil, chegando até os bionanomateriais (SANTI, 2015).

Os bambus apresentam a capacidade de sequestrar rapidamente o carbono atmosférico, além das excelentes características físicas e mecânicas, configurando, assim, uma alternativa promissora à madeira, podendo também ser utilizado em reflorestamentos, na recomposição de matas ciliares e como protetor e regenerador ambiental. (MOGNON et al., 2017; AFONSO & SILVA, 2017). Às margens das rodovias pode ser empregado na substituição das defensas de concreto ou metal visando a retenção e absorção dos impactos dos veículos em casos de acidentes; proteção de encostas e cortes de estradas contra a erosão ou deslizamentos; visualização e sinalização de curvas; paisagismo, entre outros (SILVA, 2005).

As espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* são as mais exploradas para a produção de celulose no Brasil e portanto, bastante estudadas. No que se refere aos aspectos agrônômicos, o bambu supera estas duas espécies devido a maior facilidade de cultivo e adaptação a solos marginais e a uma maior amplitude climática. Como matéria prima para o papel, os bambus possuem fibras estreitas como a do *Eucalyptus* e longas como as do *Pinus*, o que proporciona um perfeito entrelaçamento e confere grande resistência aos produtos fabricados (SILVA, 2005; SANTI, 2015). Atualmente, a espécie *Bambusa vulgaris* é a mais utilizada em cultivos comerciais no Brasil. Utilizada amplamente na fabricação de papel de alta resistência, seu cultivo está concentrado na região Nordeste, sobretudo nos estados do Maranhão, Pernambuco e Paraíba (LIMA NETO et al., 2009). Estima-se que em todo o Brasil sejam produzidas anualmente cerca de 150 mil toneladas de celulose de bambu (SANTI, 2015).

O bambu é também uma alternativa para a produção de biomassa pela alta produtividade e rápido crescimento e maturidade. Uma quantidade significativa de bambu, que não é adequada para a fabricação de produtos, está disponível como resíduos que podem ser utilizados para produção de bioenergia (TEIXEIRA, et al 2017). O poder calorífico do carvão de bambu não difere muito do eucalipto que é a matéria prima de referência para este fim. Quando destinado à produção de carvão ativado, apresenta a grande vantagem de possuir

aproximadamente o dobro da área de superfície do carvão proveniente das outras matérias primas, conferindo-o, maior poder de adsorção de sólidos e gases (SILVA, 2005).

Na alimentação humana, o broto de bambu é bastante consumido na culinária asiática, fazendo parte de uma enorme variedade de pratos tradicionais. Reconhecidos pelo sabor, são também ricos em proteínas, carboidratos e minerais. A alta taxa de fibras alimentares estão relacionadas a redução do colesterol e atividade anticarcinogênica, classificando o broto de bambu como alimento nutracêutico e medicamento natural (PINTO et al., 2017). O processo de produção de brotos é relativamente simples, podendo ser processado pelas indústrias de beneficiamento de palmito dado a sua semelhança com este produto (SILVA, 2005). No Brasil, a imigração japonesa exerceu forte influência na introdução de espécies exóticas destinadas a produção de brotos comestíveis devido ao hábito de consumo (TOMBOLATO et al., 2012).

Globalmente, os maiores mercados para o bambu são o de artesanato (AFONSO & SILVA, 2017). É reconhecidamente um dos materiais mais versáteis para este fim. É uma matéria prima de fácil obtenção, de baixo custo e que demanda ferramentas simples na sua transformação. Além disso, apresenta grande plasticidade e fácil combinação com outros materiais, aceita colagem, responde bem ao acabamento com lixa e verniz e pode ser utilizado na sua forma natural cilíndrica ou plana quando desdobrado (SILVA, 2005).

No meio rural brasileiro, o uso do bambu é destinado a confecção de balaios, tutoramento de culturas como o tomate, na construção de moradias, cercas, galinheiros e até mesmo na construção de sistemas de irrigação (SILVA, 2005).

Apesar da versatilidade e todo o potencial de diversas espécies de bambu, a atividade econômica ainda é bastante restrita no Brasil. Esse cenário é devido à ausência de tradição no emprego do bambu como matéria-prima e, também, às lacunas de conhecimento e tecnologias locais que permitam usar as espécies adequadas às diferentes regiões do país (DRUMOND & WIEDMAN, 2017). Nos últimos anos, houve um aumento do conhecimento e da pesquisa sobre alguns aspectos das espécies originando novos usos industriais. No entanto, o escasso conhecimento científico tem restringindo o pleno desenvolvimento da cultura (SANTOS et al, 2016).

Em 2011, o governo brasileiro instituiu a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB), Lei 12.484 de 2011, que tem por objetivo o desenvolvimento da cultura do bambu no País por meio de ações governamentais e de empreendimentos privados (BRASIL, 2011). Entre as diretrizes da PNMCB está a valorização do bambu como produto agro-silvo-cultural capaz de suprir necessidades ecológicas, econômicas, sociais e culturais; o desenvolvimento tecnológico do manejo sustentado, cultivo

e das aplicações do bambu e 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, em regiões cuja produção agrícola baseia-se em unidades familiares de produção e no entorno de centros geradores de tecnologias aplicáveis ao produto. Segundo DINIZ (2016), o que resultou na criação da referida lei, foi a assinatura de um memorando de entendimento com a China para cooperação bilateral em ciência e tecnologia na área de desenvolvimento em bambu. Isso ocorreu devido a existência de um vácuo entre o vasto potencial de utilização do bambu e o escasso conhecimento sobre suas características agrônômicas. A promulgação da lei é um importante passo no sentido de fortalecer ações na área, contudo, após sete anos, esta ainda não foi regulamentada, dificultando a execução das diretrizes previstas.

2.3 A ESPÉCIE *Dendrocalamus asper*

O *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne 1927, conhecido popularmente como “bambu gigante” ou “bambu balde”, é pertencente a tribo Bambuseae, apresenta rizomas paquimorfos, formando touceiras de grande porte, com até 30 m de altura e com diâmetro dos colmos na base podendo atingir mais de 30 cm. Os entrenós basais apresentam pubescência prateada a dourada, as bainhas dos colmos possuem tricomas curtos e sedosos na cor castanho claro. No passado, a espécie foi equivocadamente identificada como *Dendrocalamus giganteus*, contudo, trata-se de duas espécies diferentes, comprovado por suas diversas características morfológicas distintivas (SHIRASUNA, 2012; ENE 2012).

Originário da região sudeste da Ásia, provavelmente foi introduzido no Brasil pelos colonizadores portugueses. Atualmente é utilizado em estruturas de todos os portes, na fabricação de bambu laminado colado, no paisagismo, na alimentação através do consumo dos brotos, entre outros usos. O desenvolvimento das touceiras é mais satisfatório quando cultivadas a pleno sol, porém tolera temperaturas de até -5 C° (TOMBOLATO et al., 2012).

2.4 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO

Um grande obstáculo para o desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu refere-se ao seu deficiente processo de multiplicação. O raro florescimento, e a baixa viabilidade das sementes dificultam a propagação sexuada (NOGUEIRA et al., 2017). As dificuldades de se produzir grandes quantidades de mudas com qualidade e homogeneidade, faz com que o potencial produtivo de diversas espécies não seja devidamente explorado (RIBEIRO et al.,

2016). Os bambus são propagados vegetativamente, sobretudo por técnicas de transplântio direto (desdobramento de touceiras) ou enraizamento de estacas e pedaços de colmos. Essas técnicas são relativamente eficientes para produção de pouca quantidade de mudas e limitadas para a produção de um elevado número de plantas (FONSECA, 2007). Deste modo a micropropagação será inevitavelmente necessária para a propagação em larga escala, o que tem gerado grandes expectativas e realização de muitas pesquisas para o desenvolvimento de protocolos para propagação massal de mudas (MUDOI et al., 2013).

Embora muitos estudos sobre cultura de tecidos com espécies de bambu tenham sido desenvolvidos, sobretudo na Ásia, onde são tradicionalmente mais valorizados quanto ao seu uso, ainda há uma disponibilidade relativamente reduzida de literatura atualizada sobre o tema (NOGUEIRA et al., 2017).

2.5 MICROPROPAGAÇÃO

2.5.1 Aspectos gerais

A cultura de tecidos pode ser definida como um conjunto heterogêneo de técnicas que utiliza um explante (fragmento de tecido vegetal vivo), cultivado assepticamente em um meio artificial de composição química definida e mantida em condições ambientais controladas (MROGINSKI et al., 2010). O cultivo *in vitro* baseia-se no aproveitamento da totipotência das células vegetais a partir das quais se induz o crescimento e multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta a depender da via de regeneração utilizada (ANDRADE, 2002; CARVALHO et al., 2006).

Com ampla utilização na agricultura moderna, a cultura de tecidos pode ser empregada das mais variadas formas nos programas de melhoramento genético de plantas, na conservação e intercâmbio de germoplasma, multiplicação de genótipos superiores, recuperação de plantas livres de vírus, multiplicação de espécies de difícil propagação, dentre outros (FERREIRA et al., 1998).

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). Possui o potencial de se produzir plantas em escala comercial, com qualidade e uniformidade, a partir de um genótipo superior e com taxas de multiplicação ilimitadas (OLMOS et al., 2010). Embora a produção comercial de plantas *in vitro* seja bastante difundida na Europa, Ásia e Estados Unidos, no Brasil é uma prática relativamente recente (GRATTAPAG LIA &

MACHADO, 1998; CANÇADO et al., 2009). Entre outras vantagens de sua utilização, estão a possibilidade de se produzir plantas independente da estação do ano e a redução do tempo e da área necessária para propagação (ERIG & SCHUCH, 2005).

Por outro lado, o emprego desta técnica pode ser limitado pelo alto custo para obtenção das mudas, pois requer elevado nível de investimentos em estrutura de laboratórios, estufas, telados e necessidade de mão-de-obra especializada. Além disso, no processo de produção de mudas *in vitro* pode-se enfrentar alguns problemas, como contaminação, mutações, desordens fisiológicas e baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização. É necessário que esses problemas sejam superados para que na produção de mudas torne-se viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação (ERIG & SCHUCH, 2005; CABRAL, 2004). Diversos fatores endógenos e exógenos exercem influência no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*, sendo necessário estabelecer um protocolo próprio para cada espécie vegetal, considerando suas características únicas (CAMPOS et al., 2013).

A micropropagação apresenta essencialmente quatro etapas: estabelecimento dos explantes em meio de cultivo, multiplicação dos propágulos, enraizamento e aclimatização das plântulas. Em alguns casos é necessário considerar uma etapa prévia (Etapa 0), que é a preparação dos explantes para o estabelecimento, como por exemplo, manutenção das plantas matrizes em ambiente controlado, manejo nutricional e tratamentos fitossanitários (OLMOS et al., 2010). Este esquema permite alterações conforme as particularidades de cada espécie, como por exemplo, adição da fase de alongamento da parte aérea antes do enraizamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Previamente ao estabelecimento de uma cultura asséptica, é necessário que o material vegetal devidamente selecionado e coletado no campo, passe por procedimento de desinfestação superficial adequado. A fase de estabelecimento é considerada a mais crítica da micropropagação, sobretudo, pela possibilidade de contaminação (DUTRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). Após a desinfestação os explantes isolados são inoculados em meio de cultura. Para o sucesso dessa fase, é importante determinar também, o meio nutritivo mais adequado (TORRES et al., 1998).

Os explantes oriundos da fase de estabelecimento são inoculados em meio de cultura contendo combinações de auxinas e citocininas, dependendo da espécie e do tipo de explante (DUTRA et al., 2009). Os propágulos livres de contaminações, com brotações aparentes e bem desenvolvidos, são transferidos para o meio de multiplicação, no qual formam-se novas brotações a partir de múltiplas gemas axilares. Podem ser realizados novos subcultivos a fim

de se obter mais material propagativo com constituição genética idêntica à da planta matriz (NOGUEIRA et al., 2017). O objetivo principal desta fase é produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo e com o mínimo de variação genética (OLIVEIRA et al., 2013). Quanto ao alongamento, é desejável que ocorra simultaneamente a multiplicação das brotações, contudo, em função dos genótipos e de materiais de difícil propagação *in vitro*, pode ser necessário a adição da etapa de alongamento em meio de cultura próprio, em geral, com adição de giberelina (DUTRA et al., 2009).

A fase de enraizamento é caracterizada pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas oriundas da multiplicação e alongamento, podendo ocorrer tanto *in vitro* como *ex vitro* (OLMOS, 2010). No primeiro sistema, as raízes são formadas em condições assépticas e posteriormente transplantadas em substrato. No segundo, as partes aéreas são induzidas ao enraizamento direto no substrato, como se fossem micro estacas (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). As espécies lenhosas e com idade ontogenética avançada, apresentam maiores dificuldades de enraizamento em relação as espécies herbáceas (OLMOS, 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Durante a fase de multiplicação, o uso frequente de citocininas no meio de cultura, resulta muitas vezes em brotações de tamanho reduzido, desprovidas ou com poucas raízes. Assim, o enraizamento *in vitro* visa a formar um sistema radicular bem constituído e funcional, favorecendo a sobrevivência e o crescimento *ex vitro* das plantas (NOGUEIRA et al., 2017). Por outro lado, o processo *ex vitro* proporciona economia de mão-de-obra, de espaço, energia elétrica e meio de cultura. Além disso, tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias (DUTRA et al., 2009). A opção por um dos sistemas depende da qualidade da parte aérea obtida, da espécie, do genótipo e da infraestrutura disponível (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998).

A última fase da micropropagação é a aclimatização. Esta é realizada em ambiente sombreado por um período variado. Posteriormente as plantas são submetidas a pleno sol, onde ocorre a rustificação e o crescimento (DUTRA et al., 2009). O sucesso da aclimatização depende da qualidade das plantas formadas nas fases anteriores. Mesmo plantas com aspecto normal sofrem estresse devido a mudança súbita de umidade relativa, passagem da condição heterotrófica para autotrófica, redução na disponibilidade de nutrientes e exposição a micro-organismos, não raramente patogênicos (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). Trata-se de uma das etapas mais importantes do processo que deve ser feita com cuidado, pois a otimização desta fase é de fundamental importância para evitar prejuízos devido a grandes perdas dos explantes (NOGUEIRA et al., 2017).

2.5.2 Meios de cultura

Meio de cultura pode ser definido como uma formulação de sais inorgânicos e compostos orgânicos requeridos para a nutrição e manipulação dos cultivos (MROGINSKI et al., 2010). Existem diversas formulações utilizadas em cultura de tecidos vegetais, sendo que a composição dos meios nutritivos pode variar enormemente (CANÇADO et al., 2009). Contudo, é necessário que o meio contenha todas as fontes de macro e micronutrientes, vitaminas, reguladores de crescimento, além de fontes de carbono e oxigênio para o desenvolvimento satisfatório das plantas, como se estivessem em condições naturais. O meio mais amplamente difundido, utilizado para o cultivo *in vitro* da maioria das espécies vegetais é o MS de Murashige e Skoog (tabela 1) (CALDAS et al., 1998).

Os reguladores de crescimento, ou fitorreguladores são substâncias sintéticas que desempenham um papel semelhante ao dos homônimos vegetais. No meio de cultura são responsáveis por suprir possíveis deficiências dos teores endógenos e estimular a resposta desejada de acordo com o objetivo (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). A concentração dos reguladores de crescimento, geralmente são especificadas em cada trabalho. Auxinas, citocininas e giberelinas são os mais utilizados (CALDAS et al., 1998).

As citocininas são indispensáveis para induzir a proliferação de gemas e promover a quebra de dominância apical (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). As auxinas são utilizadas para induzir a formação de raízes adventícias, formação de calos e desenvolvimento de nós. Enquanto que as giberelina são utilizadas para induzir o crescimento dos nós e dos meristemas ou gemas *in vitro*, romper a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de brotos ou raízes adventícias (CARVALHO, 2006).

Fungicidas e bactericidas também podem ser adicionados ao meio para controlar contaminações (DUTRA et al., 2009). O carvão ativado é utilizado para diminuir intoxicações causadas pelos fenóis oxidados, produzidos pelo próprio tecido (CALDAS et al., 1998). A consistência do meio de cultura pode ser ajustada pela adição de agentes gelificantes. O ágar é o composto mais utilizado (MROGINSKI et al., 2010).

Tabela 1 – Composição básica do meio de cultura MS.

Fonte de macro e micronutriente	(mg L ⁻¹)
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	1.650,000
Nitrato de Potássio (KNO ₃)	1.900,000
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	440,000

Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4)	170,000
Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370,000
Sódio – EDTA ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37,300
Sulfato de Ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27,800
Sulfato de Manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16,900
Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8,600
Ácido bórico (H_3BO_3)	6,200
Iodeto de Potássio (KI)	0,830
Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,025
Molibdato de Sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,250
Cloreto de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025
Fonte de vitamina	(mg L⁻¹)
Tiamina-HCL ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{C}_{12}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)	0,10
Piridoxina-HCL ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	0,50
Ácido nicotínico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	0,50
Fonte de aminoácido	(mg L⁻¹)
G Licina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$)	2,00
Fonte de carbono	(mg L⁻¹)
Mio-inositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	100,00
Sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	30.000,00*
Agente geleificante	(mg L⁻¹)
Ágar	7.000,00

Fonte: MURASHIGE & SKOOG (1962). Adaptado de Ribeiro (2017).

*Concentração pode ser variável de acordo com os objetivos do trabalho.

As plantas cultivadas *in vitro*, apresentam de uma forma geral, baixos teores de clorofila para realização de fotossíntese, isso dá pelas condições de iluminação e concentração de CO_2 a que são submetidas (RIBEIRO, 2017). Dessa maneira, a maioria dos cultivos *in vitro* são heterotróficos, havendo a necessidade de se fornecer uma fonte de carbono. A sacarose é a mais empregada, em concentrações que geralmente variam de 2 a 5 %. O mio-inositol incorporado ao meio, contribui para melhor crescimento dos cultivos (MROGINSKI et al., 2010). A concentração da sacarose é um fator importante para obtenção de um crescimento ótimo, sendo que a mais utilizada é 3% (CALDAS et al., 1998).

Apesar da reconhecida importância de se adicionar sacarose no meio de cultura, no que se refere ao desenvolvimento adequado das plântulas, é importante salientar que este fator

contribui para o desenvolvimento de micro-organismos no meio. As perdas significativas de plantas pela contaminação microbiana podem ser potencializada pela presença da sacarose no meio de cultura (ERIG & SCHUCH, 2005). Além disso, estudos tem sido realizados no sentido de reduzir os custos de produção de mudas micropropagadas e verificar as respostas morfofisiológicas das plântulas a diferentes concentrações desta fonte de carbono (FERNANDES et al., 2013; DIAS et al., 2007; MONFORT et al., 2015; COSTA et al., 2016; RIBEIRO, 2017).

2.5.3 Estabelecimento *in vitro*

O estabelecimento inicia-se com a seleção dos explantes mais adequados e termina com a obtenção de culturas livres de contaminantes e suficientemente adaptadas às condições *in vitro* (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). Todo o processo é realizado segundo um determinado procedimento padrão, exigindo ajustes específicos para cada genótipo.

Escolha das plantas matrizes: A correta seleção e preparação dos explantes implica diretamente sobre a qualidade dos mesmos e suas respostas frente aos principais problemas que afetam a fase de estabelecimento, que são a contaminação e a oxidação dos explantes (OLMOS et al., 2010). Pela possibilidade de realizar as práticas de manejo adequadas, o ideal é dispor de matrizes em bancos de germoplasma, coleções de trabalho ou jardins clonais, mantidos preferencialmente em casas de vegetação (NOGUEIRA et al., 2017). Este fato não constitui problemas para as plantas herbáceas, porém é de difícil execução para as plantas arbóreas. Na impossibilidade de se obter propágulos a partir de ambientes protegidos, as plantas em campo deverão ser tratadas com algum método que permita manter o controle do ambiente (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). O tratamento fitossanitário preventivo de plantas matrizes a campo, realizado periodicamente com uso de fungicidas sistêmicos e de contato, com objetivo de manter os contaminantes exógenos e endofíticos em níveis baixos, exercem grande influência na otimização das etapas seguintes de desinfestação (BAVARESCO et al., 2017).

Seleção e desinfestação dos explantes: Diversos tipos de explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro*. Ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os mais indicados. Estes devem ser selecionados cuidadosamente, pois podem determinar o grau de sucesso da micropropagação (CARVALHO et al., 2006). De modo geral, o nível de diferenciação dos tecidos das espécies lenhosas é um fator restritivo à micropropagação, assim, a seleção dos explantes deve ser realizada preferencialmente a partir de brotações fisiologicamente ativas em estágio primário de crescimento (OLIVEIRA et al.,

2013). A seleção do material propagativo, deve levar em consideração a estação do ano, que pode interferir negativamente nos níveis hormonais, na concentração de polifenóis das plantas e nas taxas de contaminação (NOGUEIRA et al., 2017).

O tamanho do explante é um fator importante que influencia a desinfecção e regeneração das plantas (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). É necessário levar em consideração que existe um tamanho mínimo que depende da espécie e do material vegetal. Os explantes muito pequenos requerem o emprego de meios mais completos (MROGINSKI et al., 2010). Apesar de alguns autores terem relatado diferentes respostas no desenvolvimento de plântulas *in vitro* devido ao comprimento dos explantes (RIOS et al., 2008; SOUZA et al., 2007), são poucos os trabalhos encontrados que investigam a influência do comprimento de segmentos nodais no estabelecimento *in vitro*. Deste modo, são encontrados em diversos trabalhos, o emprego de comprimentos diferentes até mesmo para uma mesma espécie vegetal, sem no entanto, justificar o motivo de sua utilização. NOGUEIRA et al., (2017), recomendam o uso de segmentos nodais de 5 a 10 mm para bambus em geral, PRADO & RUSCH (2018), utilizaram 10 mm de comprimento. Para *Bambusa oldhamii* Munro, ARAÚJO, et al (2015) e LIN, et al (2007) utilizaram 50 mm. Para *Bambusa vulgaris*, RIBEIRO, et al (2016) e BRONDANI, et al (2017), utilizaram explantes de 10 a 15 mm e de 10 a 20 mm, respectivamente. Para as espécies *Guadua longifimbriata* e *Guadua angustifolia*, foram utilizados explantes de 30 a 50 mm (COSTA et al., 2017). Para *Dendrocalamus asper*, BRONDANI, et al (2017), utilizou segmentos nodais com comprimento de 10 a 20 mm, enquanto ARAÚJO, et al (2015) utilizou 50 mm.

A contaminação microbiana que ocorre durante a propagação *in vitro* de plantas é um grande gargalo que impede a experimentação bem sucedida (ARAÚJO, 2015). A dificuldade maior desta etapa do processo é obter tecido descontaminado sem conduzi-lo a morte quando isolado. Na desinfestação do explante podem ser utilizadas diversas substâncias de ação germicida, dentre os quais o etanol, o hipoclorito de sódio e o de cálcio, são os mais utilizados. Os detergentes de cozinha ou Tween 20 podem ser aplicados na solução desinfestante, com o objetivo de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com os tecidos. O processo deve ser realizado na câmara de fluxo laminar em condições assépticas e com uso de vidraria previamente esterilizada (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998; CARVALHO et al., 2006). As concentrações das soluções desinfestantes, assim como, as combinações dos princípios ativos e os tempos de exposição podem variar consideravelmente em função da espécie e da sensibilidade do explante. Também podem ser utilizados fungicidas e bactericidas

durante a desinfestação ou incorporá-los em baixas concentrações ao meio de cultura (OLIVEIRA et al., 2013).

Isolamento dos explantes: Concluído o processo de desinfestação, faz-se o isolamento dos explantes em fluxo laminar. A operação de excisão deve ser rápida e precisa, a fim de evitar sobretudo, a desidratação dos tecidos (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). Os explantes são inoculados em meio de cultura, onde permanecem por um período que varia conforme a espécie. Para a Pitangueira, SOUZA, et al (2007), utilizaram o período de 45 dias; para espécies de Eucalipto, pode durar de 20 a 30 dias (DUTRA et al., 2009); para espécies de Bambu, de 4 a 8 semanas (NOGUEIRA et al., 2017). Já nas primeiras semanas de cultivo, a contaminação e oxidação podem ser percebidas. Portanto, a fim de evitar contaminações generalizadas, é indicada a inoculação individualizada em tubos de ensaio ao invés de frascos de cultura (DUTRA et al., 2009).

A oxidação fenólica é um problema frequentemente encontrado durante o isolamento (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). É altamente dependente da espécie, do genótipo, do tipo de explante utilizado e da época do ano. Essa oxidação é especialmente representativa no estabelecimento *in vitro* de explantes de espécies lenhosas. Menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação, podem contribuir para minimizar o problema (CARVALHO et al., 2006). Dentre outras medidas eficientes, cita-se a lavagem dos explantes em água corrente previamente a desinfestação, auxiliando na lixiviação dos compostos fenólicos e a utilização de substâncias antioxidantes, como Polivinilpirrolidone – PVP, ácido ascórbico, ácido cítrico, entre outros, seja no meio de cultura ou na forma de banho (GRATTAPAG LIA & MACHADO, 1998). Além disso, a iniciação do cultivo na ausência de luz ou baixa intensidade luminosa por 7 a 14 dias, troca frequente do meio de cultura, uso de solidificante ou carvão ativado podem evitar a oxidação fenólica (DUTRA et al., 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Minas Gerais, campus São João Evangelista. Sendo implantado no dia 19 de outubro de 2018 e os dados coletados no dia 09 de novembro de 2018.

3.2 ORIGEM E SELEÇÃO DO MATERIAL PROPAGATIVO

Os explantes utilizados foram coletados de plantas matrizes de *Dendrocalamus asper*, as quais tem aproximadamente 7 anos de idade plantadas a campo e expostas a condições naturais do ambiente, localizadas em propriedade rural do município de Cantagalo-MG, situada na latitude 18°30'56'' S e longitude 42°41'36'' W a altitude de 658 m. Foram consideradas como plantas matrizes, os colmos bem desenvolvidos, isto é, aparentemente adultos, vigorosos, apresentando boas condições fisiológicas e sanitárias e sem injúrias mecânicas. A touceira foi pulverizada com fungicida sistêmico Cercobin (1 g L⁻¹), por duas vezes, com intervalo de 7 dias entre as aplicações (NOGUEIRA et al., 2017).

Para identificação da espécie foi utilizada a chave ilustrada de identificação das espécies da subfamília bambusoideae introduzidas, asiáticas do PEFI (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil), baseada em caracteres vegetativos (SHIRASUNA, 2012) (ANEXO I).

Foram coletados os segmentos nodais de ramos secundários do terço superior do colmo, que ainda não apresentavam brotação de suas gemas. No momento da coleta, as brotações selecionadas foram reduzidas a um comprimento de 50 a 100 mm, tendo a parte do limbo foliar removido e suas bainhas preservadas (NOGUEIRA et al., 2017). Para a coleta das brotações, foi utilizada tesoura de poda previamente esterilizada em álcool 70% (v/v). O material foi acondicionado em caixa de isopor contendo solução aquosa de ácido ascórbico a 1 g L⁻¹ sendo levado imediatamente ao laboratório (PRADO & RUSCH, 2018).



Figura 1 - Origem dos explantes utilizados no cultivo in vitro de *Dendrocalamus asper*. (a) matriz plantada à campo. (b) segmento nodal seccionado. (c) segmentos nodais acondicionados em caixa de isopor.

3.3 DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Procedeu-se a desinfestação dos explantes com base na metodologia adotada por BRONDANI et al., 2017, com algumas modificações. No laboratório, as bainhas filiais foram retiradas com auxílio de bisturi, expondo-se as gemas axilares. A região foi raspada cuidadosamente para não afetar as gemas. Os segmentos nodais foram então imersos em água destilada com detergente líquido e lavados com auxílio de uma esponja. Posteriormente, os materiais foram reduzidos ao comprimento de 15 mm e 30 mm. Em seguida foi realizado tratamento com o fungicida Cercobin – 1 g L⁻¹ por 20 minutos e feito enxague com água destilada.

Na câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em solução de álcool 70% por um minuto e enxaguados com água destilada, deionizada e autoclavada por 3 vezes. Posteriormente, os mesmos foram imersos em solução a 2,5% (v/v) de cloro ativo (NaClO) acrescida do espalhante adesivo Tween 20 (0,05%, v/v) durante 20 minutos. Em seguida, foram realizados cinco enxágues com água destilada, deionizada e autoclavada. Ao final da assepsia, os explantes foram mantidos em água destilada, deionizada e autoclavada para inoculação.



Figura 2 - Preparo dos explantes de *Dendrocalamus asper*. (a) Retirada da bainha e exposição da gema dormente. (b) segmentos nodais seccionados a 15mm e 30mm e raspados na região de inserção da bainha para posterior inoculação.

3.4 PREPARO DO MEIO DE CULTURA E INOCULAÇÃO

O meio de cultura foi preparado seguindo o proposto por MURASHIGE & SKOOG (1962) (tabela 1), acrescido de 2 mg L⁻¹ (8,88 µmol L⁻¹) de 6-benzilaminopurina – BAP, 100 mg L⁻¹ de Mio-inositol e 7 g L⁻¹ de Ágar bacteriológico, o pH foi ajustado anteriormente a adição do Ágar para 5.7±1 com o uso de hidróxido de potássio (KOH) (COSTA et al., 2017). A adição de sacarose foi feita em cinco diferentes concentrações de acordo com os tratamentos propostos para o experimento (Tabela 2). Foi adicionado 10 ml de meio de cultura em tubos de ensaio nas dimensões 20 mm x 150 mm. O material foi esterilizado em autoclave vertical a 121 °C e 1,0 kgf.cm⁻² de pressão por 20 minutos.

Tabela 2 – Comprimentos dos explantes e concentrações de sacarose testados durante o estabelecimento *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

Tratamentos	Comprimento do explante (mm)	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)
T1	15	0
T2	15	15
T3	15	30
T4	15	45
T5	15	60
T6	30	0
T7	30	15
T8	30	30
T9	30	45
T10	30	60

Na câmara de fluxo laminar, os explantes previamente desinfestados foram inoculados (um explante por tubo) em meio de cultura, sob condições assépticas. Os tubos foram vedados com filme PVC e levados para a sala de crescimento, submetidos ao fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

3.5 ARRANJO EXPERIMENTAL, PARÂMETROS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente ao acaso (DIC) com arranjo fatorial (2 x 5), sendo testados o efeito de dois comprimentos de explantes (15 e 30 mm) e cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹) sobre o estabelecimento *in vitro* de *D. asper*. Cada tratamento foi composto por 20 repetições, sendo

cada uma delas constituída por um tubo contendo um explante, totalizando 200 tubos de ensaio em todo o experimento.

O cultivo *in vitro* deu-se por um período de 21 dias, ao final dos quais foram considerados como estabelecidos, os explantes vivos, que não apresentavam contaminação e/ou oxidação e pelo menos um broto e os que não apresentavam brotos foram considerados apenas como sobreviventes. A contaminação bacteriana foi caracterizada pelo aspecto leitoso ou translúcido do meio de cultura, com ou sem coloração diferenciada, enquanto a contaminação fúngica foi caracterizada pela presença de esporos e crescimento de micélios (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010). Ambas as contaminações foram consideradas como uma só variável. A oxidação foi caracterizada pelo escurecimento dos tecidos ou do meio de cultura (SATO, et al., 2001). Avaliou-se a porcentagem de sobrevivência, contaminações visíveis causadas por fungos e/ou bactérias, o número de brotos emitidos por tratamento e a oxidação.

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 1999). Não atendidas as pressuposições, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, em seguida foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar se houve diferença estatística entre os tratamentos. Os que apresentaram diferença significativa foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTAMINAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA

A interação entre o comprimento e as concentrações de sacarose, verificada pelo teste F, não foi significativa ($P < 0,05$) para as variáveis contaminação e sobrevivência (Tabela 3). No entanto, quando analisado isoladamente, o comprimento dos explantes e a concentração de sacarose no meio de cultura influenciaram significativamente estas variáveis.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância (anova) para a contaminação e sobrevivência em relação ao comprimento dos explantes e concentração de sacarose durante a fase de estabelecimento *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

Fontes de Variação	G L	Quadrado Médio	
		Contaminação ⁽¹⁾	Sobrevivência ⁽¹⁾
Comprimento (C)	1	0,123532*	0,123532*
Sacarose (S)	4	0,537023*	0,134256*

C x S	4	0,022304 ^{ns}	0.005576 ^{ns}
Resíduo	190	5,009928	0.026368
Média real (%)		79,00	21,00
CV (%)		12,23	14,94

*valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F; ^{ns} valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F; ⁽¹⁾ dados transformados por $\sqrt{x + 1}$ onde x=dado amostrado.

Em todos os tratamentos foi verificada a contaminação por fungos e/ou bactérias, atingindo 79% do total de explantes inoculados (Figura 3). A porcentagem de contaminação no cultivo *in vitro* é influenciada por diversos fatores, sendo a contaminação do explante, um problema sério no estabelecimento de uma cultura primária, tornando um entrave para a multiplicação (MONFORT, 2015). Os motivos para a incidência de fungos podem ser diversos, como a fonte do material utilizado. Matrizes plantadas a campo tendem a apresentar maior porcentagem de contaminação por micro-organismos, pois não há controle das condições fitossanitárias (RIBEIRO, 2017). A presença de micro-organismos endofíticos, embora possa ser benéfica para as plantas na natureza, torna-se um dos principais limitadores no processo de micropropagação, uma vez que estes não são eliminados durante o processo de assepsia superficial (ARAÚJO et al., 2015). Outro fator que pode ter influenciado a taxa de contaminação, foi a época de coleta do material propagativo. SINGH, et al. (2011), relataram uma grande influência do período de coleta de explantes de *D. asper* sobre as taxas de contaminação *in vitro*, sendo de 8,7% nos meses de fevereiro a abril e chegando a 50% de setembro a dezembro.

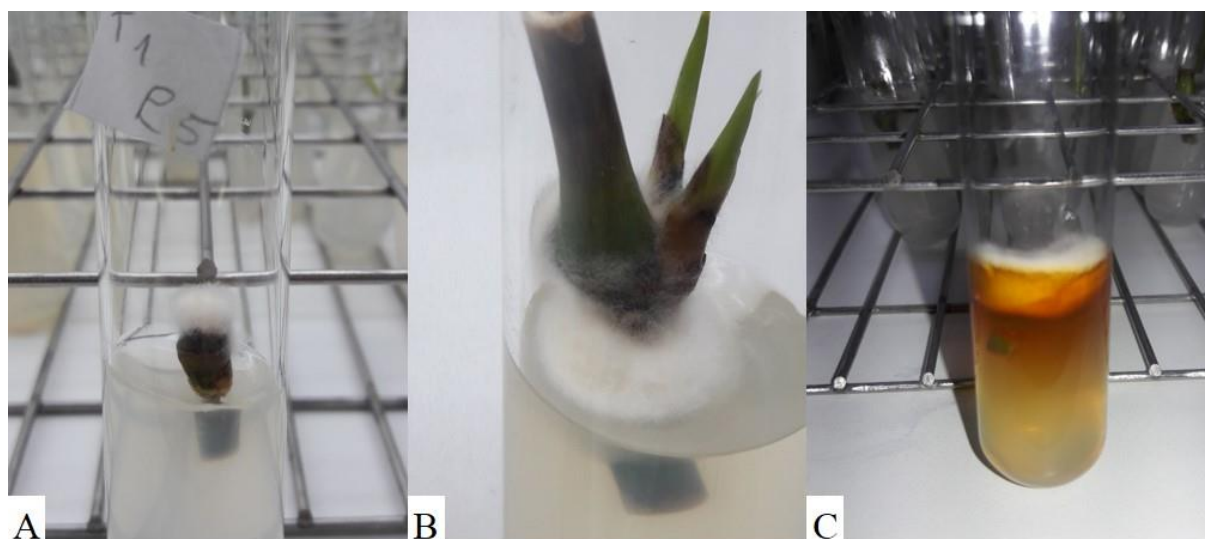


Figura 3 – Manifestação microbiana durante a fase de estabelecimento. (a) Contaminação fúngica com origem no explante. (b) Contaminação fúngica do meio de cultura e do explante. (c) Contaminação fúngica e bacteriana.

A menor taxa foi verificada quando se utilizou explantes de 15mm na ausência de sacarose (T1), onde houve contaminação de 55% dos explantes. A maior taxa de contaminação foi observada no T10 (30mm, 60 g L⁻¹ de sacarose), onde houve a contaminação de 100% dos explantes (Figura 4). ARAÚJO, et al (2015) obtiveram para essa mesma espécie, 73,08% de contaminação. Valores semelhantes foram encontrados por BAVARESCO et al., (2017), que em experimento com explantes de *Eucalyptus citriodora* removidos de plantas a campo, obtiveram índices de contaminação variando de 45 a 87% nos diferentes tratamentos empregados.

A porcentagem de contaminação foi menor quando utilizados explantes de 15 mm (73%), enquanto que os explantes de 30 mm apresentaram contaminação em 85% dos tratamentos. Sendo esta diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. GRATTAPAG LIA & MACHADO, (1998), explicam que em geral, quanto maior o tamanho do explante, maiores também são as possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento. Entretanto, aumentam também as possibilidades de contaminação microbiana devido a introdução de maior volume de material possivelmente contaminado no meio de cultivo.

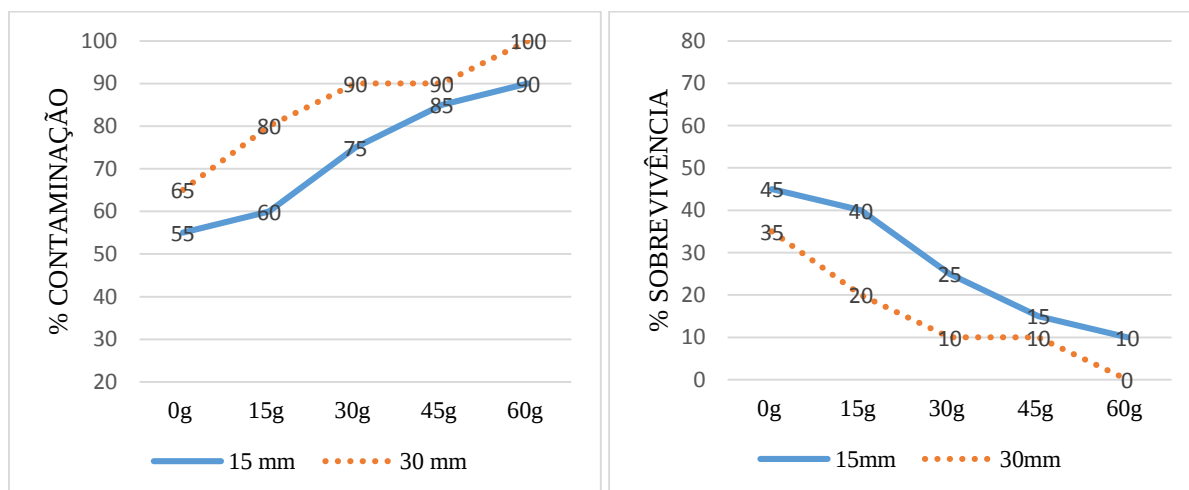


Figura 4 – % de contaminação e sobrevivência em função do comprimento do explante e da concentração de sacarose.

Valores inversos a contaminação foram detectados para a porcentagem de explantes sobreviventes, pois a oxidação não influenciou a sobrevivência e o estabelecimento (Tabela 4). Para algumas espécies de bambus, a oxidação não causa mortalidade nem prejudica a multiplicação e o enraizamento dos explantes, não inviabilizando, portanto, as fases subsequentes do cultivo *in vitro* (RIBEIRO, 2017). Tal fato pode explicar a ausência de

antioxidantes em meios de cultura em diferentes trabalhos sobre micropropagação de bambu, como o Polivinilpirrolidone – PVP, muito comum em protocolos de micropropagação para as mais variadas espécies vegetais. Outra questão importante a ser considerada é o metabolismo sazonal de compostos fenólicos, que pode variar significativamente conforme a época do ano (BRITO et al, 2017). Para outras espécies de bambu, os autores constataram que no início do período primavera-verão os teores desse metabólito são baixos. Muito provavelmente o fato se aplica também ao *D. asper*, considerando que o material foi coletado no início da primavera para realização do presente experimento.

Com relação a sacarose, foi verificado o aumento da contaminação e consequente redução do número de explantes sobreviventes quando se aumentou a concentração desse carboidrato no meio de cultura. Sendo registrado o menor percentual de contaminação na ausência de sacarose (60%) e o maior percentual quando utilizado 60 g L⁻¹ (95%), com diferença significativa entre os vários tratamentos (Tabela 5). Resultados semelhantes foram encontrados por RIBEIRO et al, (2016), onde a menor contaminação ocorreu na ausência de sacarose em trabalho com *B. vulgaris*. Segundo AGRA et al., (2010) a sacarose é utilizada nas reações químicas e como constituinte celular dos micro-organismos que encontram também, temperatura e atmosfera favoráveis ao desenvolvimento.

Tabela 4 – Porcentagem de contaminação (Cont.) e sobrevivência (Sob.) em relação ao comprimento dos explantes durante a fase de estabelecimento in vitro de *Dendrocalamus asper*.

Comprimentos	Contaminação	Sobrevivência
15 mm	73 a	27 a
30 mm	85 b	15 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Tabela 5 – Porcentagem da contaminação (Cont.) e sobrevivência (Sob.) dos explantes em relação a concentração de sacarose (em gramas) do meio de cultura durante a fase de estabelecimento in vitro de *Dendrocalamus asper*.

Concentração de Sacarose	Contaminação	Sobrevivência
0	60,0 a	40,0 a
15	70,0 a b	30,0 a b
30	82,5 a b c	17,5 a b c
45	87,5 b c	12,5 b c
60	95,0 c	05,0 c

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

4.2 NÚMERO DE BROTONS

Para análise estatística, foram considerados apenas os brotos formados pelos explantes isentos de contaminação, uma vez que a presença de micro-organismo inviabiliza a utilização do material.

A interação entre os fatores foi significativa ($P < 0,05$) para a média de brotos emitidos por tratamento aos 21 dias do início do cultivo (Tabela 6). O número de brotos por explante estabelecido variou entre 1 e 3 nos diferentes tratamentos (Figura 5). Foram emitidos um total de 6 brotos nos tratamentos T1 a T5, cujo comprimento dos explantes era de 15mm. Já nos tratamentos T6 a T10, em que se utilizou explantes de 30mm, foram produzidos um total de 30 brotos. Isso demonstra que tamanhos reduzidos de explantes apresentaram uma capacidade limitada de emissão de brotos em relação aos explantes maiores.

Tabela 6 – Resumo da análise de variância (anova) para o número de brotos por tratamento em relação ao comprimento dos explantes e da concentração de sacarose durante a fase de estabelecimento in vitro de *Dendrocalamus asper*.

Fontes de Variação	G L	Quadrado Médio ⁽¹⁾
Comprimento (C)	1	0,332085*
Sacarose (S)	4	0,048312*
C x S	4	0,076141*
Resíduo	190	0,042468
Média real (%)		18,00
CV (%)		19,34

*valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F; ⁽¹⁾ dados transformados por $\sqrt{x + 1}$ onde x=dado amostrado.

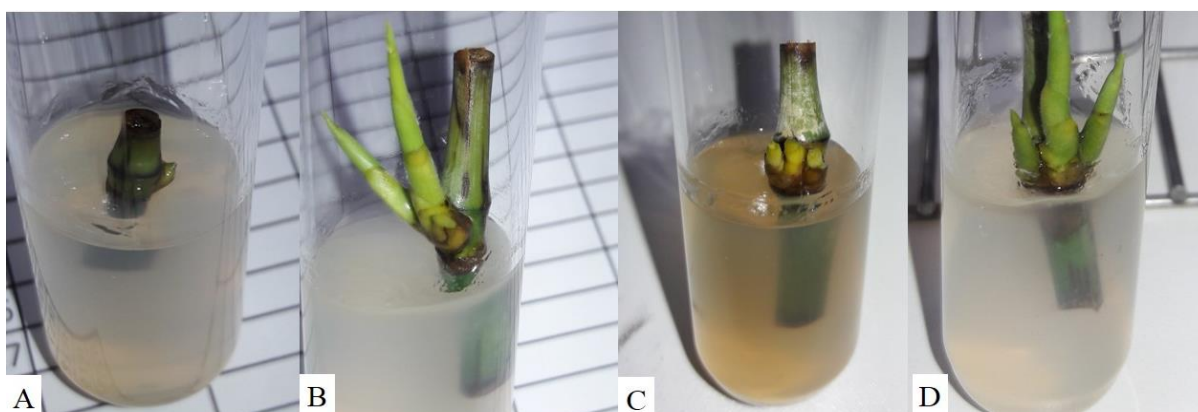


Figura 5 – Número de brotos aos 21 dias de estabelecimento de *Dendrocalamus asper*. (a) Segmento nodal de 15mm em meio de cultura sem sacarose. (b e c) Segmentos nodais de 30mm em meio de cultura sem sacarose. (d) Segmento nodal de 30mm em meio de cultura contendo

O pior cenário foi encontrado para os Tratamentos T1 e T10, onde nenhum broto foi produzido (Figura 6).

O melhor resultado foi encontrado no T6, em que se utilizou explantes de 30mm na ausência de sacarose, onde 6 dos 20 explantes foram capazes de produzir um total de 11 brotos.

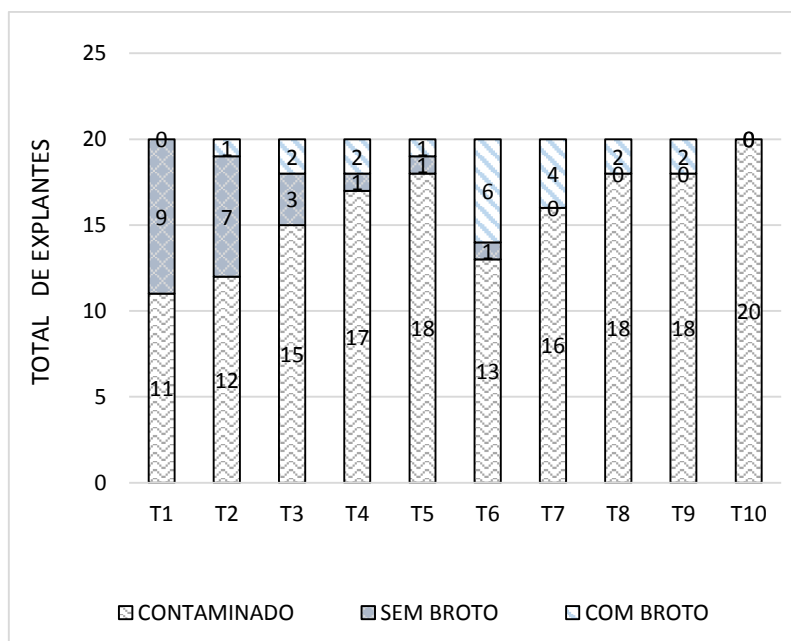


Figura 6 – Número de explantes contaminados, sobreviventes sem broto e estabelecidos (com broto) em cada tratamento durante o estabelecimento in vitro de *Dendrocalamus asper*.

Considerando o fator comprimento dentro de cada nível de sacarose, verificou-se diferença significativa para as concentrações 0 e 15 g L⁻¹ (Tabela 7). Nos dois casos, explantes com 30mm de comprimento apresentaram as melhores médias de emissão de brotos (T6 e T7). Resultados semelhantes foram obtidos por BRONDANI et al., (2017), quando adotaram como estratégia para redução de contaminação, a redução do tamanho dos explantes de *D. asper* e *B. vulgaris*, e observaram que a capacidade de desenvolvimento tornou-se limitada ou até mesmo sem indução de brotações.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância (anova) para o número de brotos por tratamento, considerando o desdobramento de comprimento dentro de cada nível de sacarose.

Fontes de Variação	G L	Quadrado Médio ⁽¹⁾
Comprimento/ 0g	1	0,343498*
Comprimento/ 15g	1	0232545*
Comprimento/ 30g	1	0,020413 ^{ns}
Comprimento/ 45g	1	0,020413 ^{ns}
Comprimento/ 60g	1	0,004289 ^{ns}
Resíduo	190	0,042562

*valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F; ^{ns} valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F ⁽¹⁾ dados transformados por $\sqrt{x + 1}$ onde x=dado amostrado.

Fica evidenciado que o comprimento do explante foi determinante para a formação de brotos. O mesmo foi observado por (SOUZA et al., 2007), onde explantes de *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira) medindo 15mm apresentaram maiores porcentagens de estabelecimento em relação aos comprimentos de 5mm e 10mm. O autor considera que o resultado provavelmente está relacionado com a maior quantidade de reservas presentes nos explantes maiores, que seriam utilizadas para a formação de novas brotações, pois o desenvolvimento se dá através de divisões celulares e requer substâncias de reserva presentes no material.

Considerando o fator sacarose dentro de cada nível de comprimento, verificou-se que para o comprimento de 15mm, todas as concentrações de sacarose conduzem a uma mesma capacidade de formação de brotos, pois as médias dos tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 8).

No caso dos explantes de 15mm, apesar do T1 (0 g L⁻¹ de sacarose) não ter apresentado média estatisticamente distinta em relação aos demais tratamentos, é necessário considerar que este obteve o maior número de explantes sobreviventes, onde 9 deles permaneceram viáveis ao final dos 21 dias de cultivo, contudo, nenhum foi capaz de emitir brotos nesse período. É possível que a combinação da ausência de sacarose com explante reduzido tenha resultado na incapacidade de emissão de brotos. O baixo número de explantes estabelecidos nos demais tratamentos foi influenciado pelas elevadas taxas de contaminação. O fato pode ser explicado pela questão da fonte exógena de energia fornecer esqueletos de carbono para a biossíntese dos componentes estruturais e funcionais, tanto do explante quanto do agente contaminador (CALDAS et al., 1998; RIBEIRO et al., 2016).

Para o comprimento de 30mm, houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 8), onde foi produzido uma média de 0,55 brotos por explante no tratamento 6 e média de 0,0 brotos no tratamento 10. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente.

Tabela 8 – Média do número de brotos por explante em função do efeito da concentração de sacarose do meio de cultura sob os diferentes comprimentos de explante utilizados durante a fase de estabelecimento *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

Concentração de Sacarose (g)	15 mm	30 mm
0	0,00 a	0,55 a
15	0,05 a	0,45 a b
30	0,10 a	0,25 a b
45	0,10 a	0,25 a b
60	0,05 a	0,00 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

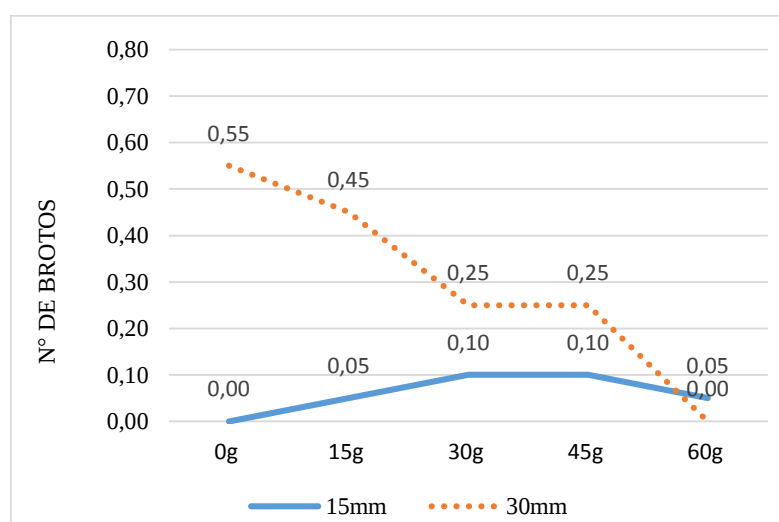


Figura 7 – Média do número de brotos emitidos em função da concentração de sacarose e do comprimento dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

Com relação a sacarose, muitos autores relataram o efeito desse carboidrato no desenvolvimento das plântulas *in vitro*. MONFORT, et al. (2015), verificaram que a ausência de sacarose proporcionou efeito negativo sobre o número, comprimento, matéria seca da brotação e número de raízes de *Ocimum selloi* (Atroveran). Porém, os mesmos autores afirmam que as altas concentrações contribuem para o menor desenvolvimento das plântulas *in vitro*, pois aumentam o efeito osmótico do meio de cultura prejudicando a absorção de nutrientes. DIAS, et al. (2007) observaram que a ausência da fonte de carbono interfere no desenvolvimento *in vitro* da cana de açúcar, porém as concentrações podem ser reduzidas sem prejuízos para o desenvolvimento de ápices caulinares.

Tratamentos com maiores concentrações de sacarose apresentaram maiores níveis de contaminação influenciando na média de brotos, no caso do T10 (30mm, 60 g L⁻¹ de sacarose), nenhum broto foi considerado devido a contaminação de 100% do tratamento (Figura 7). Micro-organismos competem por nutrientes e compostos energéticos com o explante, prejudicando o crescimento e desenvolvimento dos tecidos inoculados *in vitro*, podendo até mesmo levá-los a morte (BRONDANI et al., 2017). Deste modo, pode-se inferir que o melhor resultado encontrado no T6, em que se utilizou explantes de 30mm na ausência de sacarose, deve-se a uma compensação da ausência do carbono exógeno pelas reservas presentes no explante. O crescimento de micro-organismos foi limitado por não haver uma fonte de energia prontamente disponível e mesmo assim, houve reserva nutricional do explante que pôde ser utilizada para a formação de novos tecidos.

5. CONCLUSÃO

O comprimento do explante e as concentrações de sacarose influenciaram no estabelecimento de *Dendrocalamus asper*.

A menor contaminação e maior sobrevivência foi observada no tratamento com explantes de 15mm na ausência de sacarose.

O maior número de brotos foi obtido no tratamento com explante de 30mm na ausência de sacarose.

REFERÊNCIAS

- AFONSO D. G.; SILVA, Z. A. G. P. G. **Bambu nativo: alternativa de desenvolvimento econômico e sustentável para o estado do Acre**. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia**. - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.
- AGRA, P.R.M.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M; COSTA, C.M.G.R.; COSTA, N.P.; NETO, P.A.; **Efeito de ambientes e concentrações de sacarose na contaminação *in vitro* de Violeta africana**. Tecnol. e Ciên. Agropec., v.4, n.1, p.43-47, 2010.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.
- ARAUJO, C. H. P; CARNEIRO, L. L.; ARAUJO, C. L. P; SIBOV, S. T. **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. 1172, 2015.
- AZZINI, A.; ARANHA, C.; PIO, R.M. **Florescimento e frutificação em bambu**. Bragantia, v.41, n.1, p.175-180, 1982.
- BAVARESCO, L. G; PASQUALI, R.; FLUMINHAN, A. **Cultivo *in vitro* de explantes removidos de plantas cultivadas a campo visando à micropropagação de *Eucalyptus citriodora***. Periódico eletrônico Forum ambiental da alta paulista, 2017.
- BRASIL. **Lei nº 12.484 de 2011 - Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu**, 2011. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2011/lei/l12484.htm>. Acesso em: 10 out 2018.
- BRONDANI, G.E.; OLIVEIRA, L. S. O.; FURLAN, F. C.; RIBEIRO, A. S. **Estabelecimento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl e *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne**. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia**. - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.
- CABRAL, J. B. **Controle de produção industrial de plantas *in vitro***. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, Campinas, v.10, n.1/2, p.24-25, 2004.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e a transformação genética de plantas**. Brasília. EMBRAPA_SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998, v.1, p.183-260.
- CAMPOS, V. C. A.; LIMA-BRITO, A.; GUTIERREZ, I. E. M.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, A. V. V. **Micropropagação de umburana de cheiro**. Cienc. Rural vol.43 no.4 Santa Maria Apr. 2013 Epub Mar 15, 2013.
- CANÇADO, G. M. A.; Ribeiro, A. P.; FREITAS, G. F.; SÁ, M. E. L.; SILVA, H. E.; PASQUAL, M.; VAL, A. D. B.; NUNES, C. F. **Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.30, n.253, p.64-74, nov./dez. 2009

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M. M. A. MEDEIROS, M.J.L. **Fatores Inerentes À Micropropagação**. Campina Grande, 2006. 28p. (Embrapa Algodão. Documentos, 148)

COSTA, F. A.; MARQUES, A. A.; RONDON, J. N.; CEREDA, M. P. **Protocolo para micropropagação de duas espécies de Guadua**. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia**. - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.

COSTA, M. B. T.; ARRUDA, A. S.; VIEIRA, M. C.; PAULA, M. S. P.; LUZ, J. M. Q. **Estabelecimento *in vitro* de *ochroma pyramidale* em diferentes concentrações de meios e sacarose**. Revista Agrotecnologia, Ipameri, v.8, n.1, p.1-9, 2017

DIAS, A. L. F.; SILVA, K. S.; RIVAS, R.; DIAS, G. A.; HOULLO-KIDO, L. M. **Micropropagação fotoautotrófica *in vitro* de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de sacarose**. 16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais / 3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas / 1º Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas. Goiás, 2007.

DINIZ, F. **Embrapa investe no conhecimento e conservação de espécies nativas de bambu**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16896451/embrapa-investe-no-conhecimento-e-conservacao-de-especies-nativas-de-bambu>. Acesso em: 10 dez 2018.

DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia**. - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. **A micropropagação do Eucalipto**. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, n. 58, p. 49-59, jan./jun.2009.

ENE, J. ***Dendrocalamus asper* e *Dendrocalamus giganteus*. Relatório comparativo entre as duas espécies**. PORTO ALEGRE, 2012. Disponível em: <http://agrobambu.blogspot.com/2012/02/dendrocalamus-asper-dendrocalamus.html?m=1>. Acesso em 18 set. 2018.

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

FERNANDES, D. A.; AZEVEDO, P. H.; COSTA, R. B.; BRONDANI, G. E. **Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L.f.** Revista de Agricultura v.88, n.3, p. 218 – 228, 2013.

FERREIRA, D.F. **Sisvar. Versão 5.6**, Lavras, 1999. Disponível para download em: <http://www.dex.ufla.br/~danielff/programas/sisvar.html>. Acesso em 14 out. 2018.

FERREIRA, M. E; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. **Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e a transformação genética de plantas**. Brasília. EMBRAPA_SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998, v.1, p.183-260.

FILGUEIRAS, T. S.; VIANA, P.L. **Bambus brasileiros: morfologia, taxonomia, distribuição e conservação.** In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia.** - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.

FONSECA, F. K. P. **Produção de mudas de bambu *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) por propagação vegetativa.** Rio Largo, AL. Dissertação de Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal. Universidade Federal de Alagoas, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação.** In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e a transformação genética de plantas.** Brasília. EMBRAPA_SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998, v.1, p.183-260.

GUILHERME, D. O.; RIBEIRO, N. P.; CEREDA, M. P. **Cultivo, manejo e colheita do bambu.** In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia.** - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.

HIDALGO, LOPEZ, O. **Bamboo: the gift of the gods.** D’Vinni Ltda., Bogotá, Colombia, 2003, 553p.

LIMA NETO, M. C.; RIBEIRO, J. de S.; BEZERRA NETO, E. **Enraizamento de estacas de bambu Com o uso de auxinas.** Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba, v. 7, n. 2, p. 175-179, abr./jun. 2009

LIN, C.S.; KALPANA, K.; CHANG, W.C.; LIN, N.S. **Improving Multiple Shoot Proliferation in bamboo Mosaic virus-free Bambusa oldhamii Munro propagation by liquid culture.** HortScience, v.42, n. 5, p.1243-1246, 2007.

MOGNON, F.; SANQUETTA, C. R.; CORTE, A. P.; RODRIGUES, A. L.; SANQUETTA M. N. I. **Bambu, uma alternativa para o sequestro de carbono.** In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia.** - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.

MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; SILVA, A. F. L. S. T.; SILVA, G. M. **Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atroveran.** Rev. Ceres, Viçosa, v. 62, n.2, p. 215-223, mar-abr, 2015

MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. **Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales.** En: LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; HOPP, E.; MROGINSKI, L. **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II.** Ediciones INTA - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina, 2010.

MUDOI, K. M.; SIDDHARTHA, P. S.; ADRITA, G.; ANIMESH, G.; DEBASHISHA, B.; MINA, B., **Micropropagation of importante bamboos: a review,** African Journal of Biotechnology, v. 12, p. 2770– 2785, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiologia Plantarum, n.15, v.3, p.473-497, 1962.

NOGUEIRA, J.S.; COSTA, F. H.S.; VALE, P. A. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Micropropagação de bambu em larga escala: princípios, estratégias e**

desafios. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia.** - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. **Micropropagação de espécies florestais brasileiras.** Pesq. flor. bras., Colombo, v. 33, n. 76, p. 445-460, out./dez. 2013.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. **Micropropagación.** En: LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; HOPP, E.; MROGINSKI, L. **Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II.** Ediciones INTA - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina, 2010.

PRADO, D.C.P.; RUSCH, F. **Assepsia, desinfestação e isolamento *in vitro* de propágulos de bambu com uso de produto natural.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer. v.15 n.27; - Goiânia, 2018.

PINTO, J. V. C.; BRITO, V. H. S; CEREDA, M. P. **Potencialidades nutraceuticas de brotos de bambus.** In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia.** - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.

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

RIBEIRO, A. S. **Micropropagação de *Bambusa vulgaris* visando a produção de mudas clonais.** Cuiabá, 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso.

RIOS, S.A.; NIETSCH, S.; PEREIRA, M.C.T.; XAVIER, A.A.; FERNANDES. T.P.; DIAS, M.M.; LIMA, C.; SANTOS, T.M. **Protocolos de assepsia e comprimento de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ sobre a produção de mudas por micropropagação.** Unimontes Científica, Montes Claros, v.10, n.1/2 – jan./dez. 2008.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. et al. **Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação.** Cerne, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SANTI, T. **Bambu para toda obra.** Revista O Papel. Revista mensal de tecnologia em celulose e papel ano l XXVI nº 4, Abril 2015. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1016916/1/25536.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

SANTOS, D. R. S.; SETTE JUNIOR, C. R.; SILVA, M. F.; YAMAJI, F. M.; ALMEIDA, R. A. **Potencial de espécies de Bambu como fonte energética.** Scientia Forestalis, Piracicaba, v. 44, n. 111, p. 751-758, set. 2016. DOI: [dx.doi.org/10.18671/scifor.v44n111.21](https://doi.org/10.18671/scifor.v44n111.21)

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas.** Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica. 2010. 446 p.

SHIRASUNA, R. T. **Bambus nativos (Poaceae: Bambusoideae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil / -- São Paulo, 2012. 266 p. il. Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2012.**

SILVA, R. M. C. **O bambu no Brasil e no mundo**. Goiânia: Embambu, 2005. Disponível em: <http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil.pdf>. Acesso em 18 set. 2018.

SINGH, S.R.; DALAL, S.; SINGH R.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. **Micropropagation of *Dendrocalamus asper* (Schultes f.) Backer ex Heyne: an exotic edible bamboo**. Journal of Plant Biochemistry and biotechnology. v. 22, n.2, p. 220-228, 2011.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; SOARES, G.C. **Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. R. Bras. Agrociência, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, jan-mar, 2007.

TEIXEIRA, W. G.; MAERQUES, J. D.O.; FLANAGAM, C. S. R. **Retenção de água em carvão de bambu e madeira produzidos a diferentes temperaturas**. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil : da biologia à tecnologia**. - 1. ed. - Rio de Janeiro : ICH, 2017. 655 p.

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

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e a transformação genética de plantas**. Brasília. EMBRAPA_SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998, v.1, p.183-260.

ANEXO I

**CHAVE ILUSTRADA DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DA
SUBFAMÍLIA BAMBUSOIDEAE INTRODUZIDAS, ASIÁTICAS DO PEFI,
BASEADA EM CARACTERES VEGETATIVOS (SHIRASUNA, 2012)**

1. Rizomas leptomorfos.....2



1'. Rizomas paquimorfos.....4



2. Colmos 1-3(-5,5)m altura, cilíndricos, desprovidos de sulco; folhas do colmo persistentes; ramos complementares do médio-colmo 1(-3) por nó.....



.....*Pseudosasa japonica*

2'. Colmos 5-12m altura; com sulco evidente; folhas do colmo caducas; ramos complementares do médio-colmo 2 por nó.....3. *Phyllostachys*

3. Lâminas dos ramos de cor verde uniforme (concolores).....*P. aurea*



3'. Lâminas dos ramos de cor verde com estrias amarelo-esbranquiçadas (variegada).....



.....*P. aurea* cultivar '*albovariegata*'.

4. Colmos 1-3,5m altura; diâmetro 1cm; entrenó c. 15cm compr.; lâminas dos ramos linear-lanceoladas 5-11x0,4-0,6cm.....



.....***Sinarundinaria falcata***

4'. Colmos 4-30m altura; diâmetro 1,5-15cm; entrenó 25-50cm compr.; lâminas dos ramos 7-35x0,7-5cm.....5

5. Colmos 15-30m altura; diâmetro do colmo (-6)13-30cm; lâminas do colmo reflexas e geralmente decíduas.....6. ***Dendrocalamus***

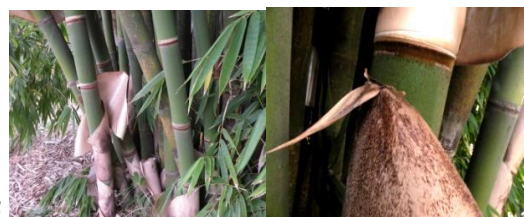
5'. Colmos 4-18m altura; diâmetro do colmo 4-18cm; lâminas do colmo sempre eretas e persistentes.....7. ***Bambusa***

6. Colmos 15-30m altura; entrenós jovens basais com pubescência prateada a dourada; bainha do colmo com tricomas curtos, sedosos castanho-claros.....



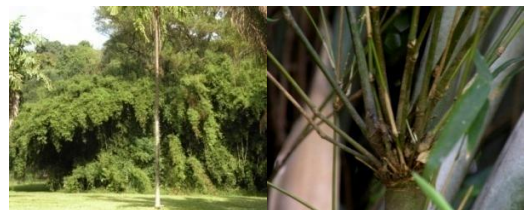
.....***D. asper***

6'. Colmos 20-25m altura, entrenós jovens basais glabros, verdes; bainha do colmo com tricomas urticantes, castanho-escuros.....



.....***D. latiflorus***

7. Colmos 4-7(-9)m altura, diâmetro 1,5-2,5(-4)cm; ápice do colmo pêndulo; ramos complementares subiguais ou o central ligeiramente



dominante.....***B. multiplex***

7'. Colmos 7-18m altura, diâmetro 3-10cm; ápice sub-ereto ou ligeiramente inclinado; ramos complementares 1-3 dominantes.....8

8. Entrenó do colmo totalmente verde, bainha da folha do colmo com tricomas densos, urticantes, castanho-escuros; bainha da folha do ramo com tricomas esparsos, concentrados no ápice, castanho-escuros, fímbrias apicais nulas.....



.....*B. vulgaris*

8'. Entrenó do colmo amarelo com estrias verdes, bainha da folha do colmo com tricomas densos, urticantes, castanho-escuros; bainha da folha do ramo com tricomas esparsos, concentrados no ápice, castanho-escuros, fímbrias nulas.....



.....*B. vulgaris cultivar vittata*

8". Entrenó do colmo totalmente verde; bainha da folha do colmo com tricomas esparsos castanho-escuros a g Labra, bainha da folha dos ramos g Labra a totalmente pilosa; fímbrias 1-10mm compr.....9

9. Colmos não ramificados na base; folha do colmo com aurículas; fímbrias nulas; bainha da folha do ramo totalmente pilosa; lâmina da folha do ramo g Labra em ambas as faces.....*B. beecheyana*



9'. Colmos densamente a pouco ramificados desde a base, folha do colmo com aurículas; fímbrias presentes; bainha da folha do ramo g Labra; lâmina da folha do ramo hispida.....10

10. Colmo densamente ramificado na base; fímbrias 5-8mm compr.....*B. dissimulator*



10'. Colmos pouco ramificados na base, fímbrias 1-3mm compr.....11

11. Lígula interna da folha do colmo fortemente assimétrica; fimbrias da folha do ramo brancas 4-

10mm compr. *B. malingensis*



11'. Lígula da folha do colmo reta a levemente assimétrica; fimbrias da folha do ramo verde-
vináceas

1-3mm compr. *B. tuldooides*

