

Estabelecimento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl e *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne

Gilvano Ebling Brondani⁽¹⁾, Leandro Silva de Oliveira⁽²⁾,
Fernanda Cardoso Furlan⁽³⁾ e Anatálya dos Santos Ribeiro⁽³⁾

⁽¹⁾ Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, 37200-000, Caixa Postal 3037, Lavras – MG. E-mail: gebrondani@yahoo.com.br

⁽²⁾ Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Avenida Universitária, n.1000, Bairro Universitário, 39404-547, Montes Claros – MG. E-mail: leandroengflor@gmail.com

⁽³⁾ Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Avenida Fernando Corrêa da Costa, n.2367, Boa Esperança, 78060-900, Cuiabá – MT. E-mail: fefurlan_tga@hotmail.com e anatalya_ribeiro@hotmail.com

Resumo – O presente capítulo apresenta e discute metodologias para avaliar o explante e as condições de cultivo mais adequadas para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais das espécies *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl e *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne. Foram avaliados quatro tipos de explantes (segmento nodal) e condições de cultivo: C1 – segmento nodal cultivado por 14 dias no escuro; C2 – segmento nodal cultivado em condições de luminosidade; C3 – segmento nodal com corte longitudinal mantendo a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade e C4 – segmento nodal com corte longitudinal sem a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade. Após a assepsia, os explantes foram inoculados *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 0,004% de cloro ativo (NaOCl) e subcultivados aos 21, 42 e 63 dias. Avaliaram-se a porcentagem de estabelecimento *in vitro*, a oxidação, a manifestação de micro-organismos e a emissão de brotações. Os resultados revelaram decréscimo no estabelecimento de explantes de *B. vulgaris* e *D. asper*, seguido de aumento da oxidação e da manifestação de micro-organismos ao longo dos subcultivos. As brotações axilares dos explantes cresceram e se desenvolveram apenas nos tratamentos C1 e C2, com maior emissão de broto em C2 aos 63 dias, sendo esses os explantes e condições de cultivo mais indicados para o estabelecimento *in vitro* das espécies.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: INTRODUÇÃO, EXPLANTE, CONTAMINAÇÃO, BAMBU.

In vitro establishment of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl and *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne

Abstract – *The aim of the research was to evaluate the most suitable type of explant and culture conditions for in vitro establishment of nodal segments of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl and *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne. Four different types of explants (i.e., nodal segment) and culture conditions were evaluated: C1 - nodal segment cultivated for 14 days in the dark; C2 - nodal segment cultivated in light conditions; C3 - nodal segment with longitudinal section, containing the axillary bud and cultivated in light conditions and C4 - nodal segment with longitudinal section, without axillary bud and cultivated in light conditions. After the disinfection, the explants were inoculated in vitro on MS culture medium supplemented with 0.004% of active chlorine (NaOCl), and were subcultured at 21, 42 and 63 days. The percentage of in vitro establishment of explants, the oxidation, the manifestation of microorganisms and the shoot induction were evaluated. The results showed a decrease of in vitro establishment of nodal segments, followed by an increase of oxidation and manifestation of microorganisms along the subcultures. Shoots were developed only in C1 and C2 (the largest shoot induction per explant occurred in C2, at 63 days), being these types of explants and cultivation condition the most appropriate for in vitro establishment for both species.*

INDEX TERMS: INTRODUCTION, EXPLANT, CONTAMINATION, BAMBOO.

Introdução

A busca por novas alternativas de matéria-prima de base fibrosa para usos múltiplos está se tornando cada vez mais frequente, principalmente se considerarmos as questões econômicas, sociais e ambientais relacionadas ao rápido crescimento populacional. Dentre as espécies de interesse no setor florestal, destacam-se os bambus, mundialmente reconhecidos devido às inúmeras aplicações. Os usos da planta envolvem desde a produção de papel, celulose, energia, biocombustível e extração de amido até o emprego na construção civil, bioengenharia, fabricação de móveis, artesanatos, produtos farmacêuticos, alimentícios e medicinais (Bag et al., 2000; Souza, 2004; Ostapiv & Fagundes, 2007; Komatsu et al., 2011; Singh et al., 2013).

Os bambus apresentam ramificações complexas, talos lenhosos do tipo colmo, floração monocárpica (isto é, apenas uma floração durante seu ciclo de vida) (Filgueiras & Gonçalves, 2004) e pertencem à família Poaceae (Gramineae), subfamília Bambusoideae (Pereira & Beraldo, 2008; Singh et al., 2013). As espécies de bambus estão distribuídas, principalmente, em países tropicais e subtropicais, sobretudo na Ásia, América do Sul e em algumas regiões no leste da África (Filgueiras & Gonçalves, 2004).

No Brasil, alguns estudos demonstraram a aplicabilidade do cultivo de bambu para a produção de biomassa (Mendes et al., 2010; Neto et al., 2010). Levando em consideração as espécies que apresentam potencialidades para a composição de plantios comerciais (Souza, 2010), o *Bambusa vulgaris* e o *Dendrocalamus asper* apresentam considerável destaque pelo elevado valor econômico, adaptabilidade e rápido crescimento (Pereira & Beraldo, 2008; Pereira & Garbino, 2003; Mendes et al., 2010; Neto et al., 2010; Souza, 2010; Mognon et al., 2015). Porém ainda é necessário aprimorar aspectos técnicos, científicos e econômicos ligados à produtividade, bem como desenvolver biotecnologias visando à produção de mudas em quantidade e qualidade adequadas para suprir a demanda do mercado nacional.

A produção de mudas das espécies de bambus por via seminal (a partir de sementes originadas em plantações voltadas para esse fim) é muito limitada, principalmente por as sementes serem raras devido ao imprevisível e longo ciclo de florescimento, que pode ocorrer aos 10, 50, 100 anos ou mais (Ramanayake et al., 2001; Vengala et al., 2008). Além disso, o processo pode resultar na mortalidade da planta devido ao gasto excessivo das reservas energéticas para a produção das flores e sementes (Arya et al., 1999; Ramanayake et al., 2001). Devido a essa característica, diferentes técnicas de propagação são adotadas para a produção de mudas de bambus, as quais são consideradas excelentes ferramentas para a clonagem de genótipos selecionados, independentemente do seu florescimento (Arya et al., 1999; Islam et al., 2011). Dentre essas técnicas, a micropropagação, que consiste na produção de clones de uma planta a partir de uma única célula vegetal somática, órgão ou de um pequeno pedaço de tecido vegetal (explante), tem obtido relevância nos últimos anos.

No entanto, embora existam vários trabalhos voltados à cultura *in vitro* de variedades de bambus (Arya et al., 1999; Bag et al., 2000; Ramanayake et al., 2001; Arya et al., 2002; Sood et al., 2002; Ramanayake & Wanniarachchi, 2003; Singh et al., 2003; Lin et al., 2004; Singh et al., 2004; Das & Pal, 2005; Jiménez et al., 2006; Ramanayake et al., 2006; Komatsu et al., 2011), a técnica de micropropagação aplicada a essas espécies apresenta, frequentemente, elevadas taxas de contaminação por micro-organismos (principalmente bactérias e

fungos) durante a fase de estabelecimento *in vitro*, o que dificulta avanços no campo da biotecnologia.

As contaminações por micro-organismos durante essa etapa podem ser resultantes de diversos fatores, tais como o estado nutricional e fitopatológico da planta doadora de propágulos (Brondani et al., 2011; Brondani et al., 2012; Brondani et al., 2013; Oliveira et al., 2015), tipo e origem de explante utilizado para a inoculação (Brondani et al., 2009), presença de micro-organismos endofíticos (tais como os que vivem em simbiose com a planta) (Komatsu et al., 2011; Oliveira et al., 2013; Baccarin et al., 2015), a manipulação do operador (Dutra et al., 2009), dentre outros. Inúmeros protocolos de desinfestação de tecidos têm sido desenvolvidos para evitar tais problemas e aumentar a porcentagem de estabelecimento *in vitro* de diversos tipos de propágulos (Brondani et al., 2009; Dutra et al., 2009; Brondani et al., 2010; Brondani et al., 2013). Contudo, esses procedimentos nem sempre são aplicáveis para todas as espécies. O emprego de antibióticos também é uma prática adotada, sendo frequente no cultivo *in vitro* de espécies de bambus (Yasodha et al., 2008; Mudoj & Borthakur, 2009; Nadha et al., 2012; Singh et al., 2012; Brar et al., 2013; Mudoj et al., 2014). Contudo, sua adoção aumenta demasiadamente os custos de produção (Tambarussi et al., 2015). Uma alternativa para a obtenção de explantes estabelecidos *in vitro* é a esterilização química do meio de cultura, que apresenta resultados satisfatórios para a cultura de *Eucalyptus* (Brondani et al., 2013) e pode ser testada para espécies de bambus.

Aliado a práticas de desinfestação de explantes, o estudo prévio dos tecidos meristemáticos a partir da análise anatômica (Almeida et al., 2015) também auxilia na tomada de decisões sobre o método mais adequado para o preparo do explante. A análise é útil para determinar tanto a posição dos tecidos a serem excisados, quanto o tipo de meristema a ser cultivado, fatores que podem ser decisivos para o sucesso das demais fases da micropropagação das espécies de bambus.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o tipo de explante e as condições de cultivo mais adequados para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Bambusa vulgaris* e *Dendrocalamus asper*.

Material e métodos

ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL E PRÉ-ASSEPSIA - Ramos laterais (10 a 20 cm de comprimento) contendo gemas dormentes da porção mediana (propágulos, figura 1a) foram coletados (maio de 2014) de plantas de *Bambusa vulgaris*

e *Dendrocalamus asper* com aproximadamente sete anos de idade e plantadas no campo em Piracicaba (SP). Os ramos foram transportados até o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Faculdade de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá (MT). Em condições de laboratório, foram extraídas as bainhas foliares próximas às gemas axilares (figura 1b). Os ramos foram imersos em água destilada com detergente líquido. Nessa etapa, fez-se a raspagem prévia da região adjacente às gemas axilares, onde a bainha foliar se encontrava aderida ao colmo (figura 1c). Após a lavagem com esponja na região das gemas axilares, segmentos nodais de 1 a 2 cm de comprimento foram seccionados e imersos em água destilada para o enxágue final.

ASSEPSIA E INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES - Os explantes foram imersos em solução de álcool 70% durante um minuto e enxaguados com água destilada e autoclavada. Posteriormente, os mesmos foram imersos em solução a 2,0-2,5% (v/v) de cloro ativo (NaClO) acrescida de Tween 20 (0,05%, v/v) durante 20 minutos. Em seguida, foram realizados cinco enxágues com água destilada e autoclavada. Ao final da assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0,004% de cloro ativo (NaOCl). Aos 21 e 42 dias após a inoculação, foram realizados subcultivos para o mesmo meio de cultura descrito anteriormente, desta vez suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP).

TRATAMENTOS E VARIÁVEIS MENSURADAS - Os segmentos nodais de *Bambusa vulgaris* e *Dendrocalamus asper* foram padronizados e submetidos a quatro condições de cultivo: C1 – segmento nodal cultivado por 14 dias no escuro (após 14 dias, os segmentos nodais foram cultivados em condições de luminosidade); C2 – segmento nodal cultivado em condições de luminosidade; C3 – segmento nodal com corte longitudinal mantendo a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade e C4 – segmento nodal com corte longitudinal sem a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade (figura 1d-f). As condições de luminosidade referem-se àquelas dentro da sala de crescimento. Os segmentos nodais foram subcultivados a cada 21 dias para um novo meio de cultura durante 63 dias. Aos 21, 42 e 63 dias, avaliaram-se o estabelecimento de explantes (ausência de manifestação bacteriana e/ou fúngica – EST), manifestação de micro-organismos (bacteriana e/ou fúngica – MMO) (figura 1g-h), oxidação (OXI) (figura 1i) e explantes que emitiram brotos (EB) (figura 1j-k). O experimento foi conduzido no delineamento in-



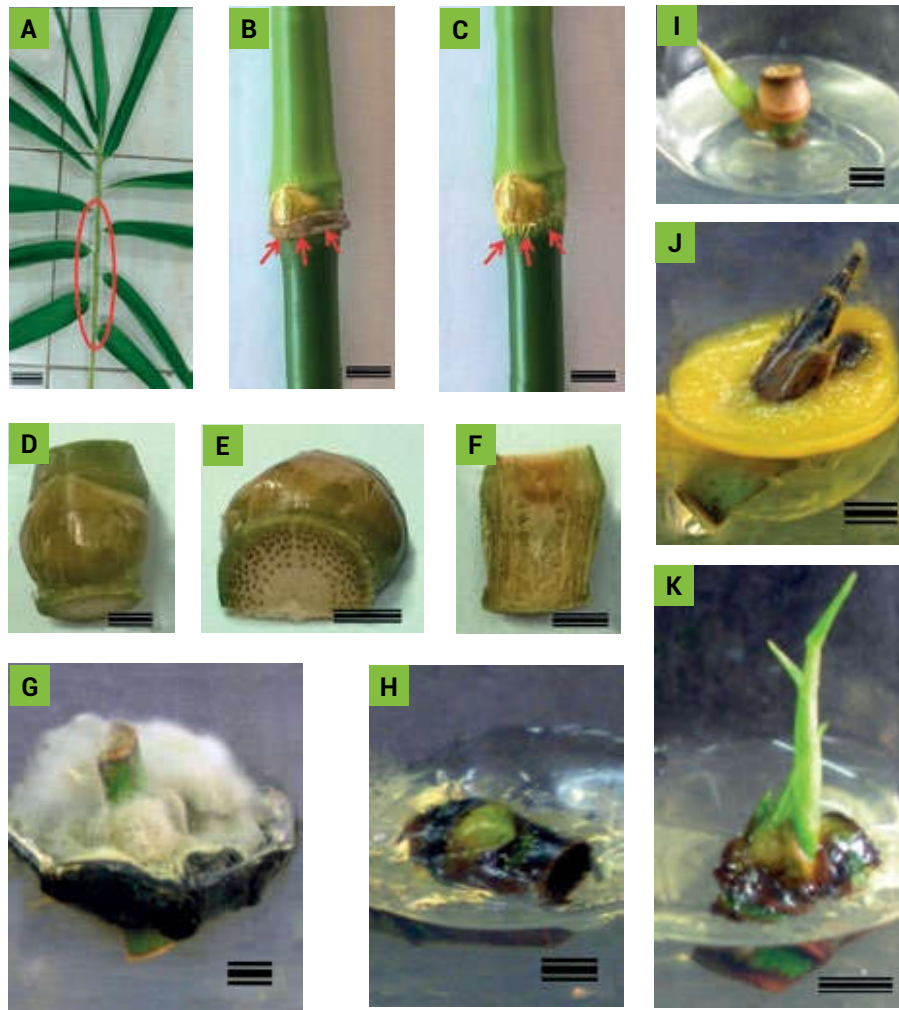


Figura 1. Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Bambusa vulgaris* e *Dendrocalamus asper*. (A) Detalhe de ramo lateral de *D. asper* com destaque da região utilizada para a obtenção dos segmentos nodais (elipse vermelha). Barra = 5,0 cm. (B) Segmento nodal de *B. vulgaris* evidenciando a região da gema e apresentando resquícios da bainha foliar (setas vermelhas). Barra = 1,0 cm. (C) Segmento nodal de *B. vulgaris* evidenciando a raspagem prévia da região adjacente à gema onde a bainha foliar se encontrava aderida ao colmo (setas vermelhas). Barra = 1,0 cm. (D) Segmento nodal de *B. vulgaris* utilizado como explante e contendo a gema. Barra = 0,5 cm. (E) Segmento nodal de *B. vulgaris* com corte longitudinal e mantendo a gema. Barra = 0,5 cm. (F) Segmento nodal de *B. vulgaris* com corte longitudinal sem a gema. Barra = 0,5 cm. (G) Manifestação fúngica no estabelecimento *in vitro* de explante de *B. vulgaris* aos 21 dias. Barra = 1,0 cm. (H) Manifestação bacteriana no estabelecimento *in vitro* de explante de *B. vulgaris* aos 21 dias. Barra = 1,0 cm. (I) Explante oxidado no estabelecimento *in vitro* de *B. vulgaris* aos 21 dias. Barra = 1,0 cm. (J) Estabelecimento *in vitro* de explante de *D. asper* emitindo broto aos 42 dias. Barra = 1,0 cm. (K) Estabelecimento *in vitro* de explante de *B. vulgaris* emitindo broto aos 42 dias. Barra = 1,0 cm

teiramente casualizado em arranjo fatorial (4x3), com os fatores constituídos por quatro formas de preparo de explantes e condições de cultivo (C1, C2, C3 e C4) e três subcultivos (21, 42 e 63 dias). Para tanto, foram utilizadas três repetições, considerando 10 explantes por repetição. As espécies não foram consideradas como fatores, sendo analisadas isoladamente.

PREPARO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES *IN VITRO* - O meio de cultura foi preparado com água destilada, adicionando-se 7 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose. O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1 M) e/ou NaOH (0,1 M) antes da adição do ágar ao meio nutritivo. Em seguida, procedeu-se a autoclavagem para eliminação de micro-organismos com temperatura de 121 °C ($\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$) durante 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada a 24 °C ($\pm 1 \text{ °C}$), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

ANÁLISE HISTOLÓGICA - As amostras (brotações axilares de *Bambusa vulgaris* e *Dendrocalamus asper*) foram fixadas em solução de formaldeído e glutaraldeído modificado (glutaraldeído 1%; paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio - NaH₂PO₄.H₂O à 0,1 M; pH 7,2) (Karnovsky, 1965). Na sequência, foram submetidas a seis séries de vácuo (-600 mmHg) por 30 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram armazenadas durante 30 dias a 4 °C. Em seguida, foram desidratadas por meio de série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%, v/v), permanecendo em cada solução por 15 minutos. Após imersão em meio de infiltração (Historessina, Leica) durante 24 horas, foram alocadas na porção inferior do recipiente de moldura. Na etapa seguinte, as amostras foram emblocadas em Historessina (hidroxietyl metacrilato, Leica) com endurecedor conforme recomendação do fabricante, onde permaneceram durante 28 dias à temperatura de 24 °C. Os blocos contendo as amostras foram seccionados longitudinalmente a 10 μm de espessura com o uso de micrótomo rotativo automático Microm HM 355S (Thermo Scientific). Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina (0,05%, v/v) em tampão fosfato de sódio e ácido cítrico (Sakai, 1973) durante 20 minutos e montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan). As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (Opton), com imagens capturadas em escala micrométrica.

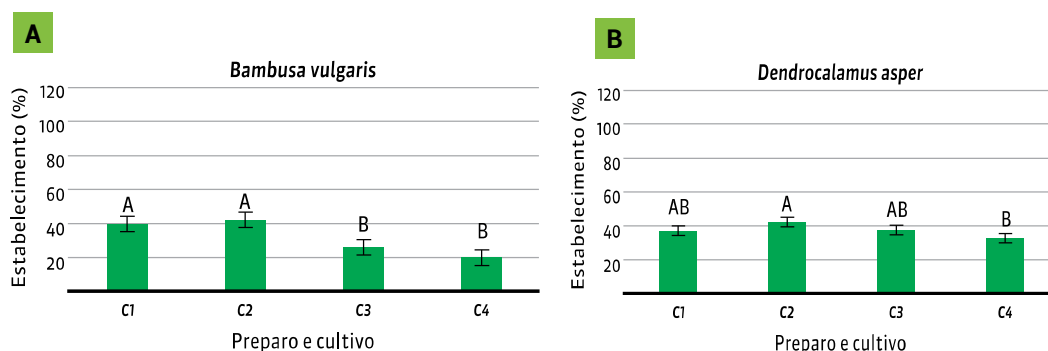
ANÁLISE ESTATÍSTICA - Os dados mensurados foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Shapiro-Wilk ($P < 0,05$), a fim de verificar a homogenei-

dade de variância entre os tratamentos e a distribuição normal dos dados, respectivamente. Os dados foram transformados conforme a necessidade por meio do teste Box-Cox. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA, $P < 0,05$ e $P < 0,01$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os pacotes SOC (EMBRAPA, 1990) e R (R Development Core Team, 2012) foram utilizados para a análise estatística dos dados. As lâminas histológicas foram caracterizadas por análise descritiva.

Resultados e discussão

Tanto para *Bambusa vulgaris* quanto para *Dendrocalamus asper*, verificou-se influência significativa do número de subcultivos para a porcentagem de estabelecimento de explantes (EST), porcentagem de explantes oxidados (OXI) e porcentagem de explantes que apresentaram manifestação de micro-organismos (MMO). Os tipos de preparo e condições de cultivo influenciaram apenas a porcentagem de explantes estabelecidos (EST). Também foi constatada interação do número de subcultivos com o tipo de preparo do explante e condição de cultivo em relação à porcentagem de explantes que emitiram brotações (EB).

Para *Bambusa vulgaris*, o maior valor da EST foi observado em C1 (segmento nodal mantido por 14 dias no escuro), resultando em 40,5%, e C2 (segmento nodal mantido em condições de luminosidade), com 42,0%. Ambos não apresentaram diferença significativa (figura 2a). Para *Dendrocalamus asper*, o valor da EST não diferiu significativamente entre C1, C2 e C3 (segmento nodal com corte longitudinal mantendo a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade), que apresentaram, respectivamente, valores de 37,3%; 42,7% e 37,5% (figura 2b).



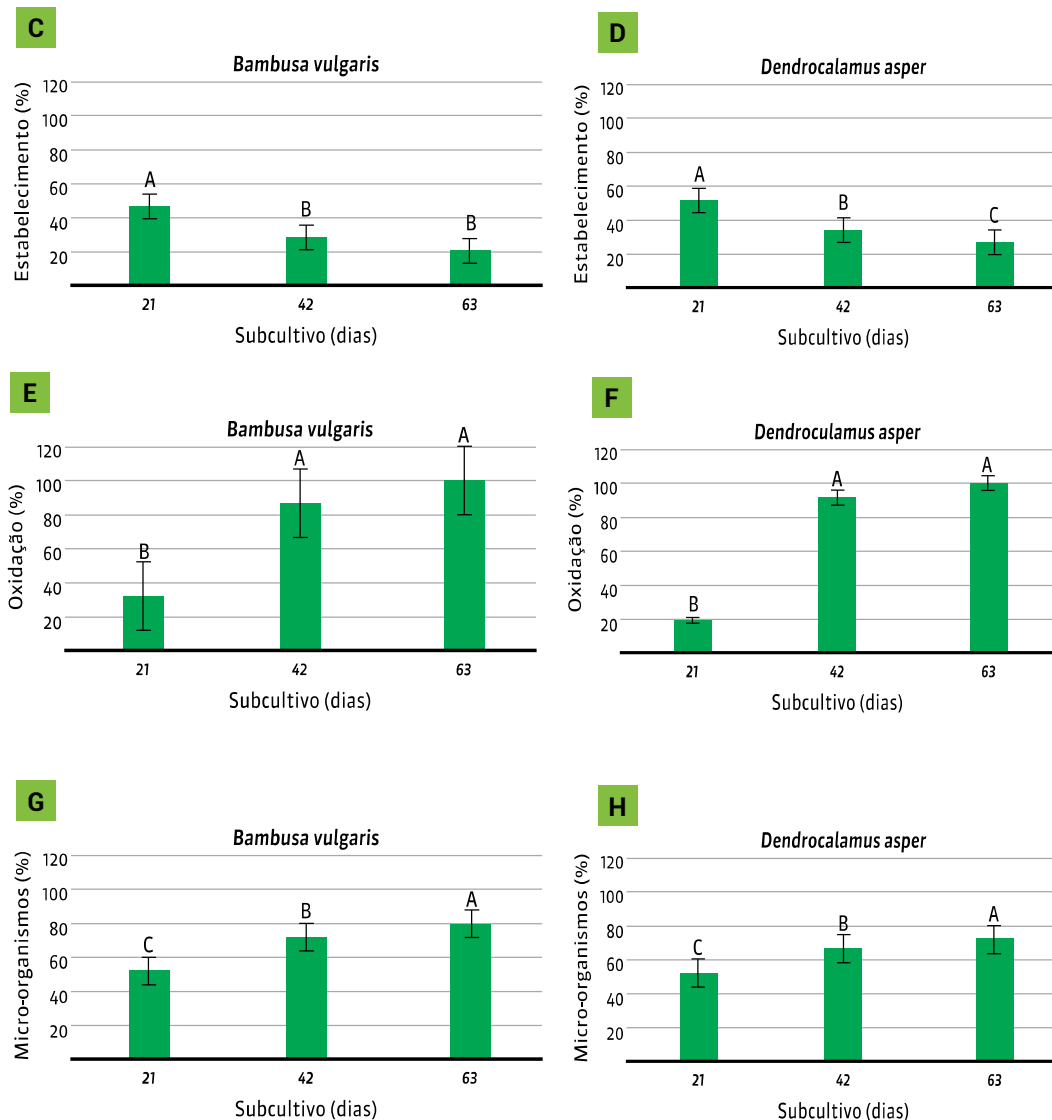


Figura 2. Características mensuradas durante o cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Bambusa vulgaris* e *Dendrocalamus asper*.

(A-B) Porcentagem de estabelecimento *in vitro* de explantes em relação aos tipos de preparo e condições de cultivo. (C-D) Porcentagem de estabelecimento *in vitro* de explantes em relação aos subcultivos. (E-F) Porcentagem de oxidação de explantes em relação aos subcultivos. (G-H) Porcentagem de manifestação de micro-organismos (bacteriana e/ou fúngica) de explantes em relação aos subcultivos. Preparo e cultivo: C1 - segmento nodal cultivado por 14 dias no escuro (após 14 dias, os segmentos nodais foram cultivados em condições de luminosidade); C2 - segmento nodal cultivado em condições de luminosidade; C3 - segmento nodal com corte longitudinal mantendo a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade C4 - segmento nodal com corte longitudinal sem a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade. Valores médios seguidos por mesma letra não diferem significativamente à 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey. Dados apresentados com média \pm erro padrão

Contudo, conforme foram realizados os subcultivos dos explantes para novos meios de cultura, observou-se decréscimo do EST (figura 2c-d), seguido de aumento da oxidação dos explantes (figura 2e-f) e da manifestação de micro-organismos (figura 2g-h). Aos 63 dias de subcultivo, 20,6% dos explantes de *Bambusa vulgaris* (figura 2c) e 27,2% dos explantes de *Dendrocalamus asper* (figura 2d) apresentaram-se estabelecidos, denotando expressiva perda de material durante o período considerado. Além disso, os maiores valores da OXI (100%) (figura 2e-f) e da manifestação de micro-organismos (72,8 a 79,4%) (figura 2g-h) também foram observados aos 63 dias. Apesar da frequente oxidação (geralmente observada na base do segmento nodal), algumas gemas apresentaram viabilidade para a emissão de brotos.

Na cultura de tecidos de plantas, a contaminação pode ser um fator limitante para o estabelecimento *in vitro*, interferindo negativamente em relação à propagação de clones previamente selecionados (Barrueto Cid & Teixeira, 2010; Hartmann et al., 2011). As espécies de bambus possuem organismos fitopatogênicos endógenos (Singh et al., 2013) que proliferam no meio de cultura após os explantes serem seccionados, uma vez que o corte do tecido aumenta o processo de liberação de exudados ao meio de cultura. Esses micro-organismos passam a competir por nutrientes e outros compostos energéticos com o explante, fato que prejudica o crescimento e desenvolvimento dos tecidos inoculados *in vitro*, podendo ocasionar até a sua mortalidade.

O processo de oxidação também pode ser prejudicial às culturas, pois ocasiona necrose dos tecidos e a liberação de compostos fenólicos ao meio de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998), aumentando a perda de material estabelecido. Estudo realizado por Soto et al. (2001) mostrou que a oxidação dos tecidos influenciou o estabelecimento *in vitro* de *Bambusa vulgaris*. Algumas metodologias podem ser adotadas para reduzir o efeito da oxidação, tais como o subcultivo frequente dos explantes em curto intervalo de tempo (Hartmann et al., 2011) e a suplementação de substâncias antioxidantes e de carvão ao meio de cultivo (Singh et al., 2013). Considerando a constatação de elevados índices de oxidação no presente estudo, torna-se importante conduzir novas pesquisas para reduzir a frequência desse evento.

Houve emissão de brotações axilares nos preparos e condições de cultivo C1 e C2 para *Bambusa vulgaris* (figura 1k e tabela 1) e para *Dendrocalamus asper* (figura 1j e tabela 2). Em termos gerais, C2 foi o melhor tipo de preparo e condição de cultivo para ambas as espécies, considerando a maior emissão de brotos aos 63 dias (tabelas 1 e 2). Os preparos e condições de cultivo C3 e C4 não emitiram brotação, portanto não é aconselhado o seu emprego para o estabelecimento *in vitro* das espécies avaliadas de acordo com as condições

experimentais. O fato mostra que os segmentos nodais com cortes longitudinais (para aumentar a superfície de contato do tecido com o meio de cultura) não foram viáveis para a inoculação *in vitro*. Partiu-se do pressuposto de que quanto menor o tamanho do explante, maior será a probabilidade de o tecido apresentar-se livre de patógenos (e, assim, aumentar o estabelecimento *in vitro* de explantes). Entretanto, a estratégia de redução do tamanho do explante a partir do corte longitudinal não diminuiu a manifestação de micro-organismos durante os 63 dias de cultivo *in vitro*, independentemente da espécie avaliada. A capacidade de desenvolvimento do explante tornou-se limitada ou até mesmo sem indução de brotações (tabelas 1 e 2), fato que também foi destacado por Grattapaglia & Machado (1998) em revisão com outras espécies.

Tabela 1. Porcentagem de explantes de *Bambusa vulgaris* que emitiram brotações axilares em relação aos tipos de preparo, condições de cultivo e subcultivos

Preparo e condição de cultivo	Subcultivos (dias)		
	21	42	63
C1	0,0 (±0,0)Aa	0,0 (±0,0)Ba	7,7 (±0,1)Ba
C2	0,0 (±0,0)Ac	25,5 (±1,3)Ab	42,2 (±0,6)Aa
C3	0,0 (±0,0)Aa	0,0 (±0,0)Ba	0,0 (±0,0)Ca
C4	0,0 (±0,0)Aa	0,0 (±0,0)Ba	0,0 (±0,0)Ca

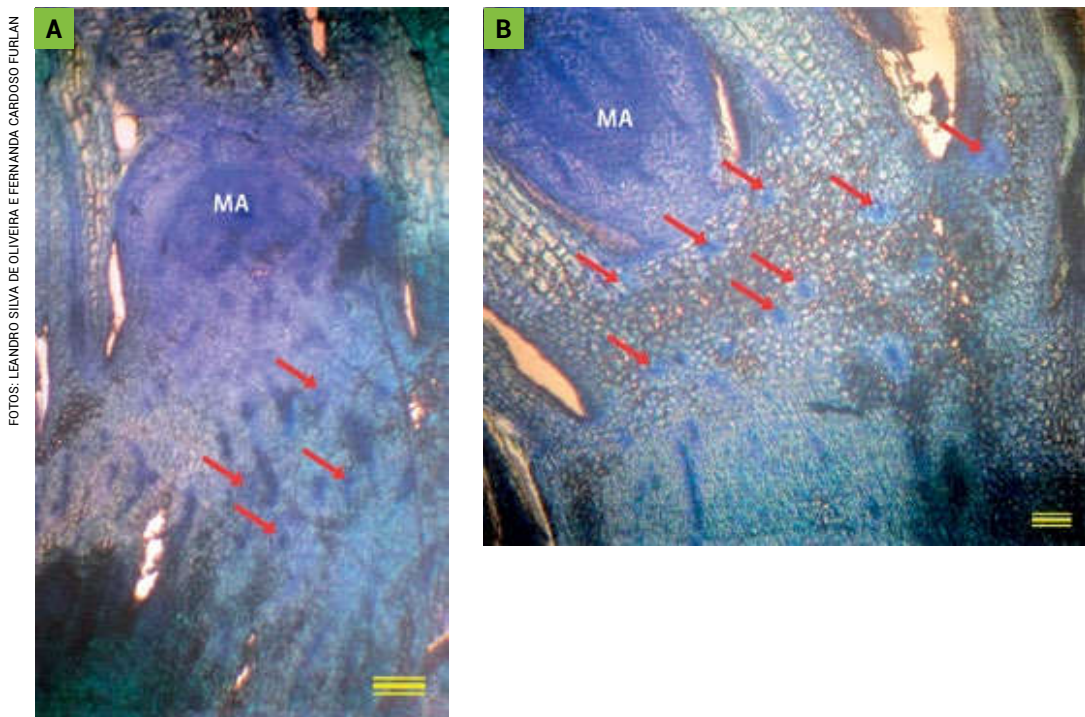
Nas colunas, valores médios seguidos por mesma letra maiúscula e, nas linhas, valores médios seguidos por mesma letra minúscula não diferem significativamente à 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey. C1 - segmento nodal cultivado por 14 dias no escuro (após 14 dias, os segmentos nodais foram cultivados em condições de luminosidade); C2 - segmento nodal cultivado em condições de luminosidade; C3 - segmento nodal com corte longitudinal mantendo a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade e C4 - segmento nodal com corte longitudinal sem a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade. Dados apresentados com média (±erro padrão).

Tabela 2. Porcentagem de explantes de *Dendrocalamus asper* que emitiram brotações axilares em relação aos tipos de preparo, condições de cultivo e subcultivos

Preparo e condição de cultivo	Subcultivos (dias)		
	21	42	63
C1	0,0 (±0,0)Ac	4,8 (±0,7)Bb	14,3 (±0,2)Ba
C2	0,0 (±0,0)Ac	18,8 (±2,8)Ab	46,7 (±0,2)Aa
C3	0,0 (±0,0)Aa	0,0 (±0,0)Ca	0,0 (±0,0)Ca
C4	0,0 (±0,0)Aa	0,0 (±0,0)Ca	0,0 (±0,0)Ca

Nas colunas, valores médios seguidos por mesma letra maiúscula e, nas linhas, valores médios seguidos por mesma letra minúscula não diferem significativamente à 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey. C1 - segmento nodal cultivado por 14 dias no escuro (após 14 dias, os segmentos nodais foram cultivados em condições de luminosidade); C2 - segmento nodal cultivado em condições de luminosidade; C3 - segmento nodal com corte longitudinal mantendo a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade e C4 - segmento nodal com corte longitudinal sem a gema axilar e cultivado em condições de luminosidade. Dados apresentados com média (±erro padrão).

Na definição de um tipo de preparo e condição de cultivo inicial de um explante sob condições *in vitro*, deve-se levar em consideração o nível de diferenciação do tecido, sua determinação e a finalidade da micropropagação (Hartmann et al., 2011; Almeida et al., 2015). A seleção de explantes de espécies de bambus deve preconizar a utilização de tecidos que apresentem potencial meristemático (com grande capacidade de reprodução e de diferenciação em outros tipos de tecido vegetal), tais como gemas axilares (Gratapaglia & Machado, 1998). Pela análise dos cortes histológicos, pôde-se observar que existem inúmeros centros meristemáticos junto às gemas axilares (figura 3a-b), o que denota potencialidade para a emissão de novas brotações a partir desses tecidos.



FOTOS: LEANDRO SILVA DE OLIVEIRA E FERNANDA CARDOSO FURLAN

Figura 3. Análise histológica das brotações axilares de *Bambusa vulgaris* e *Dendrocalamus asper*. (A) Corte longitudinal da brotação axilar de *D. asper*, aos 63 dias após o estabelecimento *in vitro*. MA - meristema apical. Setas vermelhas evidenciam a presença de centros meristemáticos. Barra = 200 μ m. (B) Corte longitudinal da gema apical de *B. vulgaris* localizada no segmento nodal padronizado para o estabelecimento *in vitro*, aos 63 dias de cultivo. Barra = 200 μ m

O uso de segmentos nodais contendo gemas axilares tem sido frequentemente aplicado como explante para o cultivo *in vitro* de diferentes espécies de bambus (Ramanayake et al., 1995; Ramanayake & Yakandawala, 1997; Jiménez et al., 2006; Lemos et al., 2011; Singh et al., 2012; Singh et al., 2013). Contudo, a

manifestação de micro-organismos e a oxidação dos tecidos ainda necessitam ser melhor entendidos e efetivamente controlados para que se obtenha sucesso nas demais fases da micropropagação, preferencialmente sem o uso de agentes químicos, como os antibióticos e produtos a base de mercúrio.

Conclusões

No decorrer dos três subcultivos realizados, houve decréscimo do estabelecimento *in vitro* dos explantes de *Bambusa vulgaris* e *Dendrocalamus asper*, seguido de aumento da oxidação dos tecidos e da manifestação de micro-organismos.

As brotações axilares dos explantes de *Bambusa vulgaris* e *Dendrocalamus asper* cresceram e se desenvolveram apenas nos preparos e condições de cultivo C1 (segmento nodal cultivado por 14 dias no escuro) e C2 (segmento nodal cultivado em condições de luminosidade). Dessa forma, esses explantes são recomendados para o estabelecimento *in vitro*.

O preparo e condição de cultivo C2 proporcionou a maior emissão de brotações axilares nos explantes de ambas as espécies, aos 63 dias após a inoculação.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Chamada Universal 14/2013 – Processo 471370/2013-4 e Bolsa de Mestrado) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes – Bolsa PNPd e Bolsa de Mestrado), pelo apoio financeiro. Ao Dr. Enio Tiago de Oliveira e ao Laboratório de Bioquímica e Micropropagação de Plantas (Esalq/USP), pela disponibilização dos materiais genéticos.

Referências

- ALMEIDA, M.; GRANER, E.M.; BRONDANI, G.E.; OLIVEIRA, L.S.; ARTIOLI, F.A.; ALMEIDA, L.V.; LEONE, G.F.; BACCARIN, F.J.B.; ANTONELLI, P.O.; CORDEIRO, G.M.; OBERSCHELP, G.P.J.; BATAGIN-PIOTTO, K.D. **Plant morphogenesis: theoretical bases**. Advances in Forestry Science, v.2, n.1, p.13-22, 2015.
- ARYA, S.; SHARMA, S.; KAUR, R.; ARYA, I.D. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. **Plant Cell Reports**, v.18, n.10, p.879-882, 1999.

- ARYA, I.D.; SATSANNGI, R.; ARYA, S. Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. **Journal of Sustainable Forestry**, v.14, n.2/3, p.103-114, 2002.
- BACCARIN, F.J.B.; BRONDANI, G.E.; ALMEIDA, L.V.; VIEIRA, I.G.; OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v.46, n.4, p.465-483, 2015.
- BAG, N.; CHANDRA, S.; PALNI, L.S.M.; NANDI, S.K. Micropropagation of dev-ringal [*Thamnochlamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. **Plant Science**, v.156, n.2, p.125-135, 2000.
- BARRUETO CID, L.P.; TEIXEIRA, J.B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p.51-66.
- BRAR, J.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* seed germination of economically important edible bamboo *Dendrocalamus membranaceus* Munro. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.51, p.88-96, 2013.
- BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage × *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.11-19, 2009.
- BRONDANI, G.E.; HANSEL, F.A.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I. Desinfestação e meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. **Floresta**, v.40, n.3, p.541-554, 2010.
- BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A.; ARAUJO, M.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.33, n.4, p.655-663, 2011.
- BRONDANI, G.E.; ONDAS, H.W.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.48, n.5, p.478-487, 2012.
- BRONDANI, G.E.; OLIVEIRA, L.S.; BERGONCI, T.; BRONDANI, A.E.; FRANÇA, F.A.M.; SILVA, A.L.L.; GONÇALVES, A.N. Chemical sterilization of culture medium: a low cost alternative to *in vitro* establishment of plants. **Scientia Forestalis**, v.41, n.98, p.257-264, 2013.
- DAS, M.; PAL, A. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, n.1, p.109-112, 2005.
- DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.58, p.49-59, 2009.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa SOC – software científico: versão 2.1**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.
- FILGUEIRAS, T.S.; GONÇALVES A.P.S. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (POACEAE). **Bamboo Science & Culture**, v.18, n.1, p.7-18, 2004.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915p.
- ISLAM, M.S.; BHUIYAN, M.K.; HOSSAIN, M.M.; HOSSAIN, M.A. Clonal propagation of *Bambusa vulgaris* by leafy branch cuttings. **Journal of Forestry Research**, v.22, n.3, p.387-392, 2011.

- JIMÉNEZ, V.M.; CASTILHO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, n.3, p.389-395, 2006.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- KOMATSU, Y.H.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M.A. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, v.22, n.2, p.209-215, 2011.
- LEMOES, E.E.P.; FONSECA, F.K.P.; OLIVEIRA, J.F.; LEÃO, I.B.; REZENDE, L.P.; SOUZA, C.D.; FILGUEIRAS, T.S.; FERREIRA, M.O. Inovações tecnológicas para a propagação de espécies de bambu. In: SEMINÁRIO NACIONAL DO BAMBU, 1., 2011. Brasília. **Anais**. Brasília: Universidade de Brasília (UnB), 2011. p.56-61.
- LIN, C.S.; LIN, C.C.; CHANG, W.C. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, n.1, p.75-82, 2004.
- MENDES, S.C.; MOLICA, S.G.; FERREIRA, R.L.C.; CÉSPEDES, G.H.G. Absorção e distribuição de nutrientes em plantios comerciais de bambu (*Bambusa vulgaris*) no Nordeste do Brasil. **Revista Árvore**, v.34, n.6, p.991-999, 2010.
- MOGNON, F.; RODRIGUES, A.L.; SANQUETTA, C.R.; DALLA CORTE, A.P.; NOVAES, A.B.; BLUM, C.T. Alocação e modelagem da biomassa em *Dendrocalamus asper*. **Floresta**, v.45, n.1, p.1-10, 2015.
- 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.
- MUDOI, K.D.; SAIKIA, S.P.; BORTHAKUR, M. Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall.ex. Munro. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n.19, p.1961-1972, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, 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.
- NETO, M.C.L.; NETO, E.B.; BARRETO, L.P.; SILVA, J.A.A. Exportação de macronutrientes em cultivos comerciais de bambu no tabuleiro costeiro do estado da Paraíba. **Revista Árvore**, v.34, n.2, p.251-257, 2010.
- OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.33, n.76, p.445-460, 2013.
- OLIVEIRA, L.S.; BRONDANI, G.E.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; CALSAVARA, R.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, v.78, n.4, p.219-231, 2015.
- OSTAPIV, F.; FAGUNDES, E.D. Perspectivas para o desenvolvimento da cultura e da cadeia produtiva do bambu no Paraná, tendo como referência a inovação, a educação tecnológica e o modelo produtivo chinês. **Revista Científica de Educação**, v.9, n.9, p.41-53, 2007.

- PEREIRA, M.A.R.; GARBINO, L.V. Desenvolvimento e produção do bambu gigante (*Dendrocalamus giganteus*) cultivado na UNESP/Campus de Bauru - S.P., com vistas à sua utilização na engenharia agrícola. In: XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 32., 2003, Goiânia. **Anais**. Goiânia: CONBEA, 2003. Um CD-ROM.
- PEREIRA, M.A.R.; BERALDO, A.L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru: Canal 6 Editora, 2008. 240p.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **An introduction to R. Notes on R: a programming environment for data analysis and graphics**. Version 2.15.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-12-7, 2012. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 25 jun. 2014.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; YAKANDAWALA, K.; NILMINI DEEPIKA, P.K.D.; IKBAL, M.C.M. Studies on micropropagation of *Dendrocalamus giganteus* and *Bambusa vulgaris* var. *striata*. In: INTERNATIONAL BAMBOO WORKSHOP, 5., INTERNATIONAL BAMBOO CONGRESS, 4., 1995. Ubud. **Proceedings**. Ubud: Thomson Press (India) Ltd., International Development Research Centre, 1995. p.75-85.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; YAKANDAWALA, K. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. **Plant Science**, v.129, n.2, p.213-223, 1997.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; WANNIARACHCHI, W.A.V.R.; TENNAKOON, T.M.A. Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo *Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.37, n.5, p.667-671, 2001.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; WANNIARACHCHI, W.A.V.R. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). **Scientia Horticulturae**, v.98, n.2, p.195-200, 2003.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; MEEMADUMA, V.N.; WEERAWARDENE, T.E. *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* ‘*Striata*’). **Scientia Horticulturae**, v.110, n.1, p.109-113, 2006.
- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Biotechnic and Histochemistry**, v.48, n.5, p.247-249, 1973.
- SINGH, M.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. *In vitro* selection of NaCl-tolerant callus lines and regeneration of plantlets in a bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.39, n.2, p.229-233, 2003.
- SINGH, S.; KUMAR, P.; ANSARI, S.A. A simple method for large-scale propagation of *Dendrocalamus asper*. **Scientia Horticulturae**, v.100, n.1/4, p.251-255, 2004.
- SINGH, S.R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. 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.; 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 of Plants**, v.19, n.1, p.21-41, 2013.
- SOOD, A.; AHUJA, P.S.; SHARMA, M.; SHARMA, O.P.; GODBOLE, S. *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, n.1, p.55-63, 2002.
- SOTO, A.H.; ARIAS, A.G.; GUERRERO, M. **Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo)**. Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología, 2001. 24p.

- SOUZA, A.P.C.C. Bambu na habitação de interesse social no Brasil. **Cadernos de Arquitetura e Urbanismo**, v.11, n.12, p.217-245, 2004.
- SOUZA, E.B. **Estudo da viabilidade técnica para o cultivo de bambu gigante (*Dendrocalamus giganteus*) em Planaltina-DF**. Planaltina: Faculdades Integradas – UPIS, 2010. 89p. (Boletim Técnico).
- TAMBARUSSI, E.V.; ROGALSKI, M.; NOGUEIRA, F.T.S.; BRONDANI, G.E.; MARTIN, V.F.; CARRER, H. Influence of antibiotics on indirect organogenesis of Teak. **Annals of Forest Research**, v.58, n.1, p.177-183, 2015.
- VENGALA, J.; JAGADEESH, H.N.; PANDEY, C.N. Development of bamboo structure in Índia. In: XIAO, Y.; INOUE, M.; PAUDEL, S.K. (Eds.). **Modern bamboo structures**. London: Taylor & Francis Group, 2008. p.51-63.
- YASODHA, R.; KAMALA, S.; ANAND KUMAR, S. P.; DURAI KUMAR, P.; KALAIARASI, K. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. **Scientia Horticulturae**, v.116, n.1, p.113-116, 2008.

