UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA

ANA PAULA NEVES

INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE SEGMENTOS NODAIS DE *Dendrocalamus asper*

LARANJEIRAS DO SUL
2017

ANA PAULA NEVES

INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE SEGMENTOS NODAIS DE *Dendrocalamus asper*

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Professor Roberson Dibax.

LARANJEIRAS DO SUL

2017

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

NEVES, ANA PAULA
INTRODUÇÃO IN VITRO DE EXPLANTES DE SEGMENTOS NODAIS DE Dendrocalamus asper/ ANA PAULA NEVES. -- 2017.
35 f.:il.

Orientador: Roberson Dibax.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Agronomia , Laranjeiras do Sul, PR, 2017.

1. Micropropagação. 2. Assepsia. 3. Contaminação. 4. Bambu. I. Dibax, Roberson, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ANA PAULA NEVES

INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE SEGMENTOS NODAIS DE *Dendrocalamus asper*

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Professor Dr. Roberson Dibax.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 21/06/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberson Dibax – UFFS

Prof. Dr. Ricardo Yamazaki – UFFS

Doutoranda Ana Paula de Azevedo Pasqualini – UFPR

Scanned by CamScanner

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e suporte incondicional.

À UFFS pelos professores, pelas oportunidades e amigos que encontrei durante a graduação.

À UFPR pela oportunidade de realização de estágio e experimento do trabalho de conclusão de curso e a todos que me acolheram e ensinaram nesse período, em especial à doutoranda Ana Paula de Azevedo e à professora Marguerite Quoirin, do departamento de Botânica.

Ao Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR.

Ao meu orientador, pelos conselhos, pela paciência e ajuda para a realização deste trabalho.

RESUMO

O bambu é uma planta florestal com grande variedade de usos. É propagado convencionalmente por divisão de touceiras, estacas do colmo, ou propagação via semente. Porém estes métodos apresentam dificuldades como a necessidade de um grande número de material vegetal e mão-de-obra, ou muitos anos de espera até o florescimento e formação de sementes. Sendo assim, a micropropagação ganha importante destaque, pois proporciona alto rendimento de mudas sadias. No entanto, a contaminação bacteriana e fúngica *in vitro* são entraves quando se visa micropropagar explantes originados do campo, sendo necessário otimizar os protocolos de assepsia. Entre as diversas espécies de bambu, o *Dendrocalamus asper*, de importância econômica, ambiental e social, pelo seu crescimento rápido, madeira de boa qualidade e sequestro de carbono. O presente trabalho teve como objetivo a introdução *in vitro* de *Dendrocalamus asper*, a partir de segmentos nodais. Os explantes foram coletados na Fazenda experimental Canguiri e levados ao Laboratório de Micropropagação de Plantas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualisado (DIC), composto por 13 tratamentos: Amoxicilina, Canamicina e Cefotaxima sódica em diferentes concentrações (0,2; 0,4 e 0,8%), PPM™ (4ml/L, 6ml/L e 8ml/l) e o Tratamento Controle. Cada tratamento era composto por 4 repetições de 6 tubos cada, totalizando 24 tubos por tratamento, contendo meio MS sólido acrescido de 15µM de BAP. Os resultados foram submetidos à ANOVA pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Houve diferença significativa para os tratamentos de 6ml/L e 8ml/L de PPM™, que se mostraram superiores aos demais tratamentos. Através das imagens, é possível notar diferenças qualitativas entre os tratamentos e a grande incidência de contaminação bacteriana e dificuldade de obtenção de culturas assépticas, sugerindo a presença de bactérias endógenas. É, portanto, necessário aprimorar protocolos de desinfestação para o material coletado.

Palavras-chave: Bambu. Micropropagação. Contaminação. Assepsia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 7
2. OBJETIVOS 8
2.1 Objetivo Geral 8
2.2 Objetivos Específicos 8
3. JUSTIFICATIVA 8
4. REFERENCIAL TEÓRICO 9
4.1 Bambu 9
4.2 Características gerais 11
4.3 *Dendrocalamus asper* 12
4.4 Cultivo *in vitro* de plantas 12
4.5 Meio de cultura 14
4.6 Cultivo *in vitro* de bambu 14
5. MATERIAIS E MÉTODOS 16
5.1 Local de desenvolvimento da pesquisa 16
5.2 Instalação do experimento 16
5.3 Preparo do Meio MS 17
5.4 Obtenção de explantes para a pesquisa 19
5.5 Assepsia dos explantes 21
5.6 Introdução dos explantes *in vitro* 22
5.7 Análise estatística 23
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 23
6. CONCLUSÃO 30
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31

1. INTRODUÇÃO

O bambu é uma planta comumente encontrada na Ásia, África e Américas. É amplamente utilizado pelo homem há vários séculos para diversos fins: na indústria de celulose e papel, para fabricação de pisos laminados, movelaria, carvão, paisagismo, jardinagem, construção civil, artesanato, tecidos, forragem animal, drenagem, confecção de tubos para irrigação, instrumentos musicais, ferramentas, produtos medicinais, alimentação humana a partir dos brotos, bebidas, ou ainda como fonte de bioenergia (ARAUJO et al., 2015).

A nível de Brasil, é no Acre onde se localiza a maior reserva nativa de bambu do mundo, porém, seu uso é ainda pouco difundido no país, devido à falta de conhecimentos tecnológicos e de mão de obra especializada para o seu manejo (PRATES, 2013). Portanto, para que o bambu seja uma alternativa viável para seus diversos usos, é de suma importância que se desenvolvam estudos sobre seu manejo e propagação.

De acordo com Kleine (2005), existem mais de 230 espécies nativas do Brasil, embora o mercado se limite a comercializar poucas espécies exóticas. É possível notar uma demanda reprimida de produtos por falta de oferta, sendo os principais usos no Brasil voltados para a indústria de celulose e papel, movelaria, artesanato, construção civil, jardinagem e culinária.

Dentre as espécies conhecidas e cultivadas no Brasil, o *Dendrocalamus asper*, também conhecido como bambu gigante, é uma espécie amplamente utilizada por prover fibra, madeira, bioenergia, instrumentos musicais, artesanato e alimento (a partir dos brotos) em países como China, Tailândia, Malásia, Indonésia e Filipinas (SINGH, 2011). No Brasil, os brotos de *D. asper* são utilizados para alimentação, e sua madeira para construção civil, artesanato, laminados, carvão vegetal combustível e carvão vegetal ativo, papel e celulose, culinária, entre outros (KLEINE, 2005).

Sabe-se que existem diferentes técnicas de propagação de bambu, tais como propagação via sementes, desdobramento de touceiras, enraizamento de estacas ou pedaços de colmos e ramos, (FONSECA, 2007) e a micropropagação. A propagação de bambu por segmentos nodais é um método tradicional, porém requer muita mão-de-obra e grande número de plantas matrizes (NADHA et al., 2012).

É visto que essas técnicas clássicas são inconvenientes para propagação em grande escala, devido à grande demanda de material biológico e mão-de-obra. Portanto, a micropropagação se mostra como alternativa mais viável para a propagação de plantas de bambu (MUDOI, et al., 2013). Os desafios encontrados na micropropagação começam na assepsia, pois no caso de segmentos nodais, estes apresentam patógenos endógenos quando trazidos do campo,

dificultando a introdução *in vitro* sem contaminação. Em muitas pesquisas, se tem relato de aparecimento persistente de contaminação bacteriana nas culturas, e falha dos procedimentos de esterilização superficial para produzir culturas assépticas, relatando este como um grande problema com as plantas lenhosas (NADHA et.al, 2012).

Devido a isso, um bom protocolo de assepsia se faz necessário, uma vez que para o sucesso de técnicas de cultivo *in vitro*, primeiramente se deve estabelecer com sucesso a cultura *in vitro*. A conservação *in vitro* do bambu ainda é pouco explorada, havendo a necessidade de estabelecer protocolos eficientes para a desinfestação de explantes, a multiplicação de brotos e a conservação da coleção (GENEROSO, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Micropropagar segmentos nodais de *Dendrocalamus asper*.

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar segmentos nodais de *Dendrocalamus asper* a fim de promover estudos relacionados à propagação *in vitro*;

- Otimizar protocolo de assepsia;

- Introdução *in vitro* dos explantes;

- Controle dos contaminantes bacterianos e fúngicos *in vitro* a partir do uso de antibióticos e biocidas;

- Comparar tratamentos e avaliar qual ou quais são mais efetivos no controle de desenvolvimento microbiano;

- Sugerir, a partir dos resultados obtidos, possíveis estratégias de assepsia e estabelecimento *in vitro* de *D. asper*, contribuindo para a propagação da espécie;

- Obter brotos de *D. asper*.

3. JUSTIFICATIVA

Por se tratar de uma planta predominantemente tropical, perene, renovável e que produz colmos anualmente sem a necessidade de replantio, o bambu apresenta um grande potencial agrícola. Além de ser um eficiente sequestrador de carbono, apresenta excelentes características

físicas, químicas e mecânicas. Pode ser utilizado em reflorestamentos, na recomposição de matas ciliares, e também como um protetor e regenerador ambiental, bem como pode ser empregado em diversas aplicações ao natural ou após sofrer um adequado processamento (PEREIRA, 2012).

O Brasil possui a maior biodiversidade de bambus da América e uma das maiores do mundo, com cerca de quatro milhões de hectares de florestas somente na Amazônia, e mais de 230 espécies nativas do Brasil em praticamente todas as regiões (DINIZ, 2016).

Por se tratar de uma espécie com diversas finalidades, desde papel e celulose até construção civil, indústria farmacêutica, bioenergia, entre outros, e adaptada ao clima brasileiro, é de suma importância que se desenvolvam métodos para manejo e produção de plantas sadias, padronizadas e em grande escala. O resultado disso será uma maior oferta de produtos ao mercado que se encontra em expansão, podendo suprir e criar novas demandas.

Quando se trata da propagação de bambu, a mesma encontra desafios como o tempo de florescimento de algumas espécies, que pode ser de 120 anos, inviabilizando a propagação por sementes (DINIZ, 2016). Portanto, a micropropagação tem papel fundamental para garantir a obtenção de mudas padronizadas para um mercado exigente. Buscando evitar a variabilidade genética das espécies, facilitar o manejo e viabilizar a produção comercial (ALMEIDA et al., 2013).

Como a cultura do bambu encontra problemas no cultivo *in vitro* devido à contaminação microbiana do material, o estabelecimento de um protocolo onde os explantes reduza ou extinga a contaminação é de grande ajuda no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

Logo, em função da precariedade de informações para a propagação in vitro de *D. asper*, torna-se necessário o desenvolvimento de protocolos eficazes para a introdução *in vitro* e posterior sucesso na micropropagação de bambu (ALMEIDA et al., 2013).

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Bambu

Originários da Ásia (62% das espécies conhecidas), mas comumente encontrados também na África (4%) e Américas (34%), os bambus são plantas perenes, da família Poaceae, e subfamília *Bambusoideae.* Existem cerca de 1250 espécies de bambus, divididas em mais de

90 gêneros, espalhados pelo mundo, sendo entre as latitudes 47ºN e 47ºS a região mais favorável ao cultivo do bambu, o que inclui o Brasil na sua totalidade (KLEINE, 2005).

Bambus são plantas versáteis, resistindo desde temperaturas negativas, à climas tropicais. São variadas também no seu crescimento, podendo ser uma pequena gramínea ou chegar a extremos de 40 metros de altura. Além disso, seus tons variam de acordo com a espécie, e podemos encontrar plantas violeta, azul, preto, vermelho, sendo as mais comuns nas cores verde e amarelo. (VASCONCELLOS, 2010).

O estado do Acre tem a maior reserva nativa de bambu do mundo, porém sua exploração ainda é limitada, o que ocorre devido à falta de conhecimentos tecnológicos e de mão de obra especializada para o seu manejo (PRATES, 2013).

Devido ao potencial do Brasil na produção de bambu, foi instaurada a Lei nº 12.484 de 8 de setembro de 2011, da Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu (PNMCB), através de ações governamentais e empreendimentos privados, procurando destinar o manejo das formações nativas e o cultivo de bambu voltado para a produção de colmos, extração de brotos e obtenção de serviços ambientais, bem como à valorização desse ativo ambiental como instrumento de promoção de desenvolvimento econômico regional e valorização do bambu como espécie agro-silvo-cultural.

Em relação à outras madeiras de uso econômico, algumas espécies de bambu apresentam maior produção de biomassa por ano, com a vantagem de poder ser colhido anualmente a partir do quinto ano, e por tempo indeterminado sem novos plantios quando o manejo é eficiente (KLEINE, [ca. 2005]). O bambu é uma planta sustentável e economicamente viável para quem a cultiva, havendo também a possibilidade de consórcio com outras culturas por um longo período de tempo, e sem necessidade de grandes equipamentos. Além disso, existe um mercado em crescimento para a madeira, sendo substituta das atuais madeiras na confecção de móveis de luxo (DINIZ, 2016).

Kleine [ca. 2005] mostra resultados de uma pesquisa comparativa entre bambu, eucalipto e pinus, onde podemos observar vantagens em valores quantitativos da produção de biomassa em relação ao tempo: o bambu dispensa replantio por mais de 100 anos, e que novos brotos surgem espontaneamente a cada ano. O pinus é replantado a cada corte, sendo este realizado a cada 15 ou 20 anos. O eucalipto, por sua vez, rebrota após o corte que é feito aos 7 anos, mas deve ser replantado depois de até 4 ciclos (28 anos) quando destinado à celulose. A colheita do bambu pode ser feita bianualmente nos casos de serem destinados para papel e celulose, e anualmente para outros fins, contra sete anos do eucalipto e 15 anos ou mais para o pinus. Em questões de

produtividade, bambu e eucalipto são semelhantes, e ambos equivalem ao dobro da produtividade do pinus.

Como desvantagem do bambu sobre o pinus e eucalipto, Kleine [ca. 2005] cita a presença de sílica e amido, que não são desejáveis no processo de fabricação de celulose, mas podem facilmente ser removidas com tecnologia simples. A sílica é ainda responsável por comprometer mais rapidamente a lâmina dos instrumentos de corte.

Conforme Bahtiar et al. (2012), o plantio de *Dendrocalamus asper* é uma das melhores maneiras para minimizar os impactos do aquecimento global. Segundo os autores, quantidades substanciais de carbono estão sendo armazenadas nas florestas de bambu da China, e existem projetos em andamento para aumentar de 727 milhões de toneladas em 2010 para aproximadamente um bilhão de toneladas em 2050, ou cerca de 40% em 40 anos (INBAR, 2014).

Segundo Kleine (2005), bambu é um material amplamente utilizado pelos povos indígenas e da Ásia, e sua imagem é associada à produto ecológico devido ao sequestro de carbono e dispensa nos usos de adubos, agrotóxicos e equipamentos pesados. Essa planta é ainda utilizada em matas ciliares para combate da erosão, em margeamento de rodovias proporcionando sombra e sem risco de queda sobre a estrada, e ainda como amortecedor de impactos para veículos que podem vir a bater, sem causar o mesmo impacto que uma árvore.

4.2 Características gerais

O bambu, também conhecido como taquara ou taboca pelos índios, é uma das plantas mais difundidas do planeta, seja por sua beleza ou multiplicidade de usos, ou adaptabilidade à variados climas. É uma planta lenhosa, monocotiledônea e angiosperma. Pode ser ornamental e pequena, enfeitando jardins e vasos, ou gigante com até 30 centímetros de diâmetro e 30 metros de altura. As plantas são formadas por colmos, na parte aérea e rizomas e raízes na parte subterrânea. Seus colmos são cilíndricos, geralmente ocos, muito resistentes e flexíveis, formados por nós e entre-nós de material lenhoso, com superfície externa lisa, e sem casca. Seus galhos e folhas formam-se no terço superior dos colmos e são leves (KLEINE, 2005).

De acordo com Pereira (2012), os bambus possuem crescimento rápido, atingindo sua altura máxima aos seis meses e maturidade em três anos. Seu diâmetro não aumenta durante esse crescimento, pois já nasce com seu diâmetro definitivo, e segue afinando da base até a ponta. Passado esse período de crescimento, o colmo passa para o processo de amadurecimento que dura até cerca de três anos, onde sua resistência mecânica será desenvolvida.

O rendimento florestal é excelente e chega a 40 ton/ha/ano, assemelhando-se ao eucalipto. Em contrapartida, sua propagação é espontânea, dispensando plantio por mais de 100 anos na mesma área. Além disso, novas mudas podem surgir de colmos enterrados, uma vez que se formam gemas nos diversos nós de cada colmo (KLEINE, 2005).

4.3 *Dendrocalamus asper*

O gênero *Dendrocalamus* se caracteriza por plantas tropicais, onde se conhecem 83 espécies que crescem naturalmente na Índia e no sul da Ásia. *D. asper* é um bambu ornamental, nativo na China e comumente plantado na Tailândia, Vietnã, Malásia, Indonésia e Filipinas (SINGH, 2011).

Semelhante ao *Dendrocalamus giganteus*, o *D. asper* é conhecido como bambu gigante, ou bambu balde, sua madeira é resistente e flexível, de crescimento rápido. Seus colmos chegam a crescer de 20 a 30 metros de altura e 8 a 20 centímetros de diâmetro na base (PEREIRA e BERALDO, 2007). Seus principais usos são para alimentação através de brotos comestíveis, fibra, madeira, biocombustível, construções diversas, instrumentos musicais, artesanato, entre outros, apresentando ainda alto potencial como regenerador ambiental (MOGNON, 2015).

4.4 Cultivo *in vitro* de plantas

No Brasil, a cultura de tecidos está relacionada não apenas à laboratórios acadêmicos, mas também às empresas privadas, que se destacam pela clonagem de mudas de importância econômica como cana-de-açúcar, plantas madeireiras e floríferas. A micropropagação movimenta bilhões de dólares em todo mundo, aquecendo os mercados e promovendo criação de novos laboratórios, empregos, tecnologias e patentes, gerando plantas resistentes, produtivas, dentro de uma visão mais moderna e dinâmica do agronegócio internacional (CID, 2004).

Inicialmente, a cultura *in vitro* requer espaço reduzido e independe de fatores climáticos e épocas do ano. Estima-se que 10m² de prateleiras são suficientes para cultivar 20mil plantas a serem aclimatadas produzindo, portanto, maior número de plantas que o método de multiplicação tradicional, com qualidade genética e fitossanitária. Este melhor aproveitamento de espaço e tempo são interessantes para indústrias no geral, mas principalmente madeireiras e papel e celulose (MALAJOVICH; MANN, 2011).

Apesar de ser possível a propagação sexuada de uma planta, a propagação vegetativa tem suas vantagens por se tratar de uma técnica simples e rápida, produzindo mudas em espaço

reduzido e com uniformidade do estande, mantendo ainda as características genéticas da planta matriz (HARTMANN&KETER, 1981).

A técnica da micropropagação consiste na reprodução assexuada ou vegetativa, onde as plantas serão idênticas à planta matriz e entre si, ou seja, serão clones. Isso é possível devido à totipotência das células, que é a capacidade de uma célula regenerar réplicas do organismo do qual ela deriva. Sendo assim, células vegetais são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (KERBAUY, 1999). Essa capacidade é restringida em animais, e nas plantas permite a sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis ou após ataques de herbívoros, pragas e patógenos (MALAJOVICH; MANN, 2011).

De acordo com Malajovih; Mann (2011), graças à totipotencialidade, qualquer célula vegetal pode originar um novo organismo, sendo possível extrair pequenos fragmentos de tecidos retirados de diversas partes da planta, como folhas, raízes, segmentos nodais, gemas axilares, gemas florais ou apicais. No entanto, o padrão de determinação das células de cada tecido ou órgão são variáveis, podendo ser mais ou menos responsivos à indução da morfogênese *in vitro*. Geralmente, quanto mais diferenciado for o tecido do explante utilizado, maior será sua determinação e menor a resposta à indução.

A diferenciação celular depende de pelo menos três fatores: fator genético; características originadas durante a ontogênese, que é a origem do desenvolvimento de um organismo, onde essas características tendem a se manter estáveis ou permantentes; e características cuja expressão depende apenas do ambiente (KERBAUY, 1999).

Durante a morfogênese, ou seja, a regeneração da planta, existe a diferenciação e especialização das células em tecidos e órgãos. A morfogênese pode ser por via direta ou indireta. É direta quando há diferenciação de meristemas apicais, ou seja, as plantas regeneradas são idênticas à planta matriz e rediferenciação de células de outros tecidos organizados. Pode ser indireta quando há a rediferenciação de células de qualquer tecido em calos, ou diferenciação das células do calo em meristemóides, ou ainda diferenciação dos meristemóides em órgão ou planta completa (RODRÍGUEZ, 1987).

Dentro da diferenciação celular, temos a competência e determinação celular, que são conceitos que se interagem. A competência é a capacidade da célula em seguir uma rota morfogênica específica, enquanto a determinação é o grau de "comprometimento" da célula com a rota morfogênica, e o estado determinado é estável e pode ser transmitido de forma intacta durante muitas gerações celulares, chamada de herança somática, que nada mais é que a manutenção via mitose das características induzidas. Neste ponto, é implícito que certas

respostas específicas de diferentes partes da planta são determinadas pela competência das células-alvo, onde os hormônios por si só não controlam o padrão de diferenciação celular (KERBAUY, 1999).

No presente trabalho, houve a cultura de segmentos nodais de bambu, sendo coletados explantes contendo gemas laterais isoladas de segmentos de caule. Cada gema se desenvolve para formar uma brotação (GUERRA; NODARI, 2006).

4.5 Meio de cultura

De acordo com Malajovich (2015), um dos meios mais utilizados é o MS (Murashige & Skoog, 1962), uma mistura complexa de sais complementada com vitaminas, à qual se acrescentam sacarose e ágar, podendo ainda acrescentar auxinas (IAA) e citocininas de modo a gerar um meio completo para o crescimento dos cultivos de tecidos vegetais. Os macronutrientes são fornecidos na forma de sais, contendo nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, enxofre e magnésio, em quantidades milimolares.

Os micronutrientes, tidos nas soluções em quantidades micromolares, são ferro, manganês, zinco, boro, cobre e molibdênio. A concentração ótima de cada nutriente varia de acordo com a espécie (QUISEN; ANGELO, 2008). Na Tabela 2 é possível verificar os componentes e concentrações utilizados para a micropropagação dos explantes nodais de bambu.

Os macro e micronutrientes são adicionados, completando o volume desejado com água destilada. Esse conteúdo é transferido para um Becker de 1 litro, adicionando 30g de sacarose. Após a solubilização da sacarose, mede-se o pH do meio, que deve ser 5,8. A cada litro de meio, são adicionados 6g de ágar bacteriológico para meio MS sólido, e se forem usados em tubos de ensaio ou frascos, levar o líquido para fundir no microondas, mexendo a cada 2 minutos, por 6 minutos, dependendo da potência do microondas. Após a ebulição do líquido, o material pode ser vertido nos tubos ou frascos, ser devidamente tampado e levado para esterilização em autoclave por 20 minutos a partir do momento que atingir a temperatura de 120ºC/ 1atm. O ágar derrete quando a temperatura passa de 90ºC e solidifica quando a temperatura é inferior a 50ºC (MALAJOVICH, 2015).

4.6 Cultivo *in vitro* de bambu

A micropropagação é uma técnica valiosa para multiplicação rápida de plantas difíceis de propagar, tanto para produção comercial, quanto para a conservação de germoplasma. A

técnica de cultura de tecidos oferece uma vantagem substancial em relação às técnicas clássicas utilizadas na propagação em massa de bambus. Para a micropropagação in vitro de bambu, são utilizados dois padrões distintos: embriogênese somática e organogênese (SINGH, 2012).

No trabalho, a organogênese pode ser direta ou indireta. Direta onde gemas ou primórdios de gemas pré-existentes são induzidos à proliferação. Indireta quando novas gemas e eixos caulinares são formados a partir de calos (tecido não organizado), originados de explantes de diferentes origens (GUERRA; NODARI, 2006).

Sabe-se que, durante o cultivo *in vitro* do bambu, temos diversos relatos de contaminação microbiana, o que impede que a experimentação seja bem-sucedida e haja o estabelecimento de processos de assepsia adequados para cada cultura. Procedimentos experimentais que incluem a esterilização química e uso de antibióticos foram utilizados em vários níveis de sucesso para minimizar ou eliminar a contaminação.

Nos trabalhos de Nadha et al. (2012), foram testados diferentes antibióticos como canamicina, carbenicilina, ampicilina, rifampicina e sulfato de estreptomicina nas concentrações 0, 5, 10, 15, 25, 40 e 50 mg/L, sozinhos e em combinações, para manter os explantes assépticos. A canamicina (10mg/L) foi identificada como um antibiótico potencialmente útil na eliminação de bactérias contaminantes sem danificar o explante. O sulfato de estreptomicina (10mg/L) foi eficiente na descontaminação, porém apresentou inibição das brotações nos explantes. O meio de multiplicação foi acrescido de BAP (6-benzilaminopurina), que é um fitorregulador de crescimento eficaz na multiplicação de espécies lenhosas (ARAGÃO; ALOUFA; COSTA, 2011). O meio MS suplementado com 15 µM de BAP se mostrou mais eficaz para a quebra de dormência de gemas de bambu no experimento de Singh (2011).

Em outros estudos, como Pereira et al. (2010) e Palú et al. (2011) também são testados antibióticos para controle de bactérias endógenas na micropropagação de bananeira e figueira, respectivamente. Em ambos os estudos, observou-se controle eficiente de bactérias em diferentes dosagens.

Além de antibióticos, a mistura preservativa de plantas (PPM™) é um composto químico eficaz na redução da contaminação de explantes já testados em *Paeonia duffruticosa* (BERUTO et al., 2004). É um biocida de amplo espectro de ação, e mais barato em relação a antibióticos. Pode ser usado em baixas concentrações (até 1 ml/L) para reduzir contaminação de bacteriana e fúngica em culturas de tecidos e plantas, e em altas concentrações (a partir de 1 ml/L) para reduzir contaminações endógenas (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2009). O papel do PPM™ é penetrar na parede celular de bactérias ou fungos inibindo a atividade de enzimas

chaves, como o ciclo do ácido cítrico e a cadeia de transporte de elétrons, porém existem relatos de fitotoxidade em altas concentrações (PASQUAL, 2010).

Em função dessa contaminação microbiana, e da ausência de um protocolo eficaz de introdução *in vitro* de *D. asper*, busca-se, neste trabalho, utilizar diferentes biocidas para o controle da contaminação bacteriana, que impede o cultivo *in vitro* e sua multiplicação. O experimento utilizou diferentes tratamentos do meio MS acrescido de BAP (15µM), e os antibióticos canamicina, amoxicilina e cefotaxima sódica (de nome comercial Cetazima) nas concentrações 0,2%, 0,4% e 0,8% ou g/L, e PPM™ nas concentrações 4ml/l, 6ml/l e 8ml/l para avaliar o melhor meio para introdução in vitro de *D. asper*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local de desenvolvimento da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Micropropagação de Plantas da Universidade Federal do Paraná. O mesmo se localiza no campus de Ciências Agrárias da UFPR, no setor de Fitotecnia. Atualmente, desenvolve pesquisas na área de plantas medicinais, florestais e frutíferas trabalhando com diferentes técnicas de cultivo in vitro e técnicas convencionais de propagação de plantas *ex vitro*, além de transformação genética de plantas.

5.2 Instalação do experimento

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualisado (DIC), contendo 13 tratamentos com 4 repetições de 6 tubos, totalizando 24 tubos por tratamento (Tabela 1). Cada tratamento continha meio MS sólido juntamente com 15µM de BAP, o qual se mostrou eficaz nesta concentração em outros experimentos para o desenvolvimento dos explantes de bambu. Houve um tratamento controle, e os demais com adição de antibióticos como amoxicilina, canamicina e cefotaxima sódica em diferentes concentrações (0,2; 0,4 e 0,8%) ou PPM™ (4ml/L, 6ml/L e 8ml/l).

Tabela 1 – Tratamentos do experimento:

Tratamentos	Biocida	Concentração
T1	Controle	0 %
T2	Amoxicilina	0,2 %
T3	Amoxicilina	0,4%

T4	Amoxicilina	0,8%
T5	Canamicina	0,2 %
T6	Canamicina	0,4%
T7	Canamicina	0,8%
T8	Cefotaxima sódica	0,2 %
T9	Cefotaxima sódica	0,4%
T10	Cefotaxima sódica	0,8%
T11	PPM™	2 ml/L
T12	PPM™	4 ml/L
T13	PPM™	6 ml/L

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

5.3 Preparo do Meio MS

Para o preparo do experimento, foram utilizados 0,5 litro de meio MS para cada tratamento, totalizando 6,5 litros de meio MS sólido, preparados conforme a Tabela 2.

Tabela 2- Meio de cultura MS sólido utilizado para a micropropagação de explantes nodais de *D. asper*

Componente	Fórmula Química	Concentrações (mg.L-1)
Macronutrientes		
A - Nitrato de amônio	NH_4NO_3	1650
B - Nitrato de potássio	KNO_3	1900
C - Cloreto de cálcio	$CaCl_2.2H_2O$	441
D - Sulfato de magnésio	$MgSO_4.7H_2O$	370
E - Fosfato de potássio	KH_2PO_4	170
Micronutrientes		
F – Sulfato de ferro	$FeSO_4.7H_2O$	27,85
Sulfato de manganês	$MnSO_4.H_2O$	16,9
Sulfato de zinco	$ZnSO_4.7\ H_2O$	8,6
Ácido bórico	H_3BO_3	6,2
Molibdato de sódio	$Na_2MoO_4.2\ H_2O$	0,25
Cloreto de cobalto	$CoCl_2.6\ H_2O$	0,025
Sulfato de cobre	$CuSO_4.5\ H_2O$	0,025
Sódio EDTA	Na_2EDTA	37,25
Iodeto de Potássio	KI	0,83
Misturas inorgânicas		
Cloridrato de tiamina	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$	0,5
Ácido nicotínico	C_6H_5NO	0,5
Cloridrato de piridoxina	$C_6H_{12}CINO_2$	0,5

Glicina	$C_2H_5NO_2$	2
Ágar		6.000
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	30.000

Regulador vegetal	Peso molecular	Concentração utilizada (µM)
BAP	225,3	15,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Para o preparo de 1 litro de meio, utilizando uma pipeta para medir os ml, colocado em seguida, em uma proveta de 1L: 5mL de cada solução (A, B, C, D, E e F) para o preparo de 1 litro de meio, 2ml de Tiamina, e 10 ml de Ácido Nicotínico, 10 ml de Piridoxina e 10 ml de Glicina. Após colocados os macro e micronutrientes, acrescentou-se água destilada, completando a solução até 1L indicado na proveta. Aguardou-se a solubilização da sacarose.

O material foi dividido em 13 tratamentos de 500ml cada, adicionados 15µmol de BAP, medido o pH de cada tratamento, estabilizando em 5,8.

Os 9 tratamentos que tiveram por finalidade a adição de antibióticos (Imagem 2), foram colocados em erlenmeyers com capacidade de 500ml, adicionado 3g de ágar bacteriológico em cada erlenmeyer, vedado primeiramente com papel alumínio, depois com papel pardo, em seguida autoclavados.

Para estes tratamentos, o antibiótico é inserido no meio já autoclavado, dentro da câmara de fluxo laminar, para evitar contaminações e manter o efeito do antibiótico ativo.

Imagem 1 – Erlenmeyers contendo meio MS + BAP antes de ser vedado com papel pardo e autoclavado.

Fonte: a autora, 2017.

Os quatro demais tratamentos foram postos em beckers, adicionando 3g de ágar bacteriológico para cada e fundidos em microondas, agitando de 2 em 2 minutos até entrarem em ebulição, vertidos em tubos de ensaio, tampados com papel alumínio e autoclavados por 20 minutos a 120º/1atm. Após todo o meio ter sido autoclavado, e estar asséptico, os tubos já prontos foram armazenados para posterior introdução de explantes.

Os erlenmeyers foram levados para um fluxo de ar laminado onde foi retirado a tampa de cada erlenmeyer e adicionado o antibiótico foi esterilizado com ajuda de um filtro millipore e homogeinizados ao meio, em suas devidas concentrações (0,2%, 0,4%, 0,8%), e adicionado com a ajuda de uma seringa também esterilizada.

Imagem 2 – Filtro millipore acoplado à uma seringa.

Fonte: Merck millipore, 2017.

Cada tratamento foi devidamente adicionado ao erlenmeyer com o meio ainda líquido, em torno de 60ºC, agitado, e vertido nos tubos dentro da câmara de fluxo laminar para garantir a assepsia do material.

Para os tratamentos controle e PPM™, foi disposto 500ml em um becker para cada tratamento, sendo o controle apenas o meio MS apresentado na Tabela 2. As dosagens de PPM™ foram acrescentadas com ajuda de uma pipeta no meio ainda líquido, antes da medição do pH. O meio foi então aquecido no microondas até a ebulição do líquido e vertido nos tubos, que foram tampados e armazenados juntamente aos outros tratamentos, todos devidamente identificados. No dia seguinte se deu a coleta dos explantes.

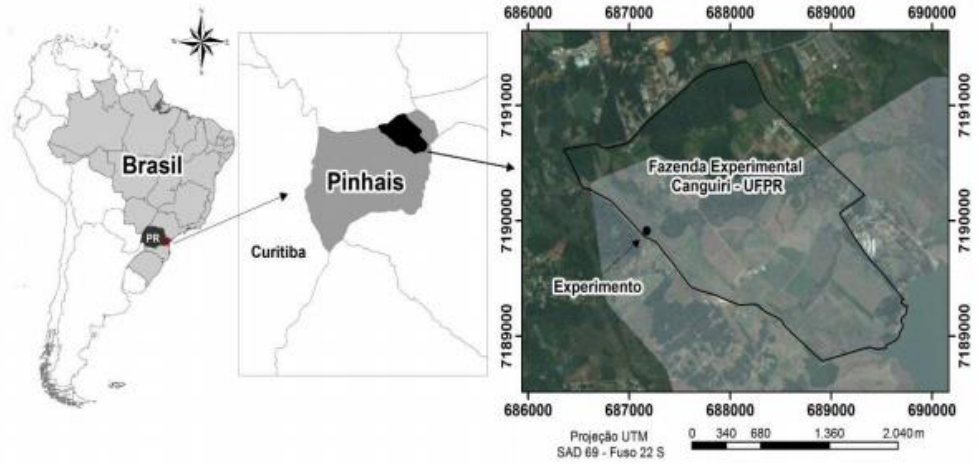
5.4 Obtenção de explantes para a pesquisa

A coleta do material foi realizada no dia 10 de fevereiro de 2017, na fazenda Canguiri, fazenda experimental da Universidade Federal do Paraná, localizada na região metropolitana

de Curitiba/PR (25°23'11.8"S 49°07'33.9"W), onde são realizadas atividades didáticas e pesquisas científicas. Estão presentes na Fazenda Canguiri, solos dos tipos: cambissolos, latossolos, gleissolos e organossolos (SUGAMOSTO, 2002).

A fazenda experimental está contida no sistema geodésico regional SAD 69, UTM Fuso 22 Sul, com coordenadas centrais X: 688.200m e Y: 7.190.200m. Sua altitude regional é de aproximadamente 900 metros (MOGNON, 2015). O clima da região é classificado como Cfb, caracterizado por precipitação média anual de aproximadamente 1400 mm. A temperatura média anual é de 12,5 a 22,5ºC, podendo apresentar geadas severas (IAPAR, 1994).

Imagem 3 – Localização da área de coleta do material vegetal, município de Pinhais/ PR.



Fonte: Mognon, 2015.

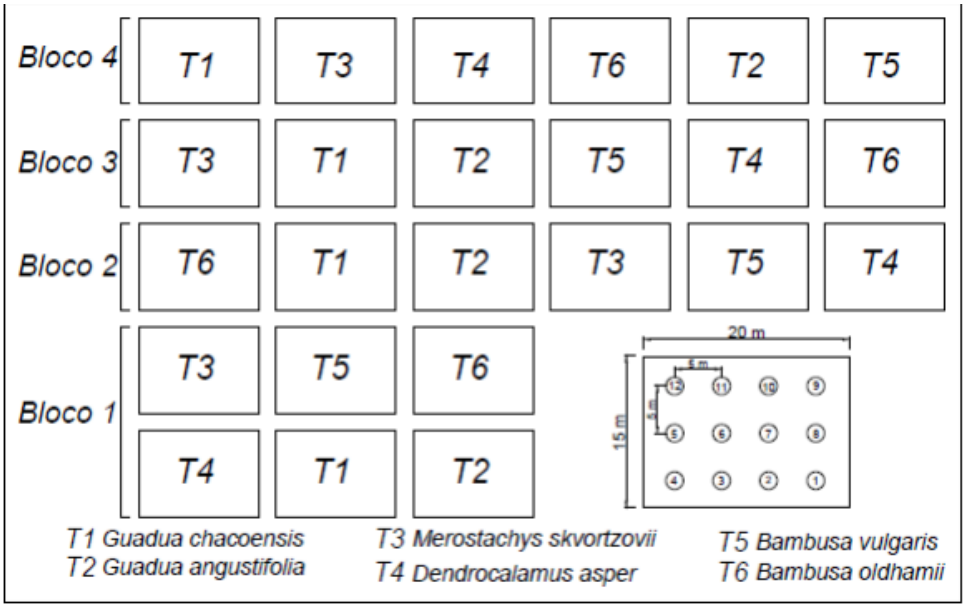
Foram coletados segmentos nodais de plantas de *D. asper* com quatro anos de idade, instaladas na unidade experimental, que de acordo com Guerra e Nodari (2006), são segmentos caulinares que carregam gemas simples ou múltiplas.

Imagem 4 – Plantas matrizes de *D. asper* na unidade experimental da UFPR.

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Os explantes foram retirados das áreas onde constam T4 (*D. asper*) na fazenda experimental, como se observa abaixo:

Imagem 5 – Delineamento da área de bambuzais na unidade experimental da UFPR.



Fonte: Mognon, 2015.

5.5 Assepsia dos explantes

Os explantes foram coletados dos colmos, aparados, tirando as folhas, e a bainha em volta do segmento nodal ainda à campo. Cada explante foi cortado de modo a ter cerca de 5 centímetros, com os nós ligeiramente acima da metade do explante.

Imagem 6 – a) Explante nodal de *D. ásper* coberto com bainha foliar; b) retirada da bainha.

Fonte: a autora, 2017.

Depois disso, um a um os explantes foram borrifados com álcool 70% e limpos com ajuda de um papel toalha. Após esse procedimento, foram armazenados em potes de vidro com água deionizada e autoclavada, e tampados para posterior assepsia em laboratório.

O material coletado foi levado ao laboratório de micropropagação e cultura de tecidos da Universidade Federal do Paraná, para sua assepsia e introdução *in vitro*.

Os explantes foram imersos numa diluição de 2 g/L de fungicida Cercobim, durante 24 horas.

Imagem 7 – Explantes de segmentos nodais imersos em solução de Cercobim (2g/L).

Fonte: a autora, 2017.

Após as 24 horas, os explantes foram levados para o fluxo laminar, enxaguados cinco vezes com água deionizada e autoclavada (estéril), imersos em álcool 70% durante 1 minuto, 20 minutos em Cloreto de mercúrio 0,1% ($HgCl_2$), enxaguado por 3 vezes em água estéril e imerso em Hipoclorito 1% (NaOCl) por 2 minutos. Para reduzir o dano causado na assepsia, tiveram a base e o ápice descartados, conforme estudos de Pasqualini; Quoirin (2016).

5.6 Introdução dos explantes *in vitro*

Os explantes foram então introduzidos nos tubos de ensaio contendo 15 ml de meio MS com BAP e os devidos tratamentos com antibiótico ou PPM™ em diferentes concentrações, tampados e vedados com plástico filme, e acondicionados em sala de crescimento no escuro por 7 dias à uma temperatura média de 25ºC. Após os 7 dias, foram expostos a um fotoperíodo de 16 horas, iluminados por tubos fluorescentes brancos frios com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente 30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (PASQUALINI; QUOIRIN, 2016).

5.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo composto por 13 tratamentos com 24 repetições cada, totalizando 312 tubos.

Após 14 dias de instalação do experimento, foram avaliados presença de fungos e bactérias com a ajuda de uma lupa de bancada com iluminação. Essa avaliação foi tabelada e transformada em porcentagem de contaminação dos explantes por bloco de repetições e por tratamento (Tabela 3).

Os dados em porcentagem foram transformados na análise de variância, e comparados significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, pelo programa estatístico ASSISTAT.

Aliado à análise estatística, é possível fazer a análise qualitativa do experimento com base em repetições representativas dos tratamentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante o procedimento de assepsia, foi possível observar que os explantes sofreram oxidação devido ao uso do hipoclorito de sódio. Com a retirada dos tratamentos do escuro, foi possível notar que o explante se manteve amarelado, oxidado. Logo, por maior que fosse o sucesso da descontaminação dos explantes, estes não emitiriam brotação.

Após 14 dias da instalação do experimento, foi feita a avaliação dos tratamentos procurando vestígios de bactéria ou fungos. A grande maioria das repetições estava contaminada com bactérias, provavelmente endógenas, e poucos fungos. Não foram diferidas entre si, mas nenhum tubo estava contaminado apenas com fungos, ou seja, onde havia contaminação fúngica, havia também a contaminação bacteriana.

Aos 21 dias, foi feita uma nova avaliação, desta vez visual, onde foi possível notar uma densidade de bactérias bem mais expressiva, porém os tratamentos com PPM™ se mantiveram intactos. Essa avaliação visual foi registrada fotograficamente.

Tabela 3 – Porcentagem de contaminação e teste de médias de *D. asper* após 14 dias do estabelecimento *in vitro*:

Tratamento	Média (%)	Tukey*
T1 - Controle	100	A
T2 – 0,2% Amoxicilina	100	A
T3 – 0,4% Amoxicilina	100	A

T4 – 0,8% Amoxicilina	100	A
T5 – 0,2% Canamicina	100	A
T6 – 0,4% Canamicina	100	A
T7 – 0,8% Canamicina	100	A
T8 – 0,2% Cetazima	100	A
T9 – 0,4% Cetazima	100	A
T10 – 0,8% Cetazima	100	A
T11 – 4 ml PPM™	95,85	A
T12 – 6ml PPM™	49,9	B
T13 – 8ml PPM™	54,05	B

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

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

Como é possível observar (Tabela 3), apenas os tratamentos 12 (6ml/L de PPM™) e 13 (8ml/L de PPM™) diferiram estatisticamente dos demais, sendo isso evidente também na avaliação qualitativa.

Pode-se observar que a maioria dos tratamentos teve 100% de contaminação, e em sua grande maioria bacteriana, devido ao desenvolvimento mais lento dos fungos e à época do ano onde os fungos estão menos agressivos (SINGH et al., 2011). Houve resultado expressivo dos dois tratamentos 6ml/l e 8 ml/l de PPM™ (Tabela 3), onde a taxa de contaminação foi de 49,9% e 54,05%, respectivamente.

Imagem 8 – Amostras representativas de cada tratamento.

Fonte: a autora, 2017.

Na análise qualitativa das amostras foi observado a diferença da incidência de contaminação por bactérias entre os tratamentos, onde alguns tratamentos com antibiótico como

a Amoxicilina em todas as concentrações e Canamicina (0,4%) e Cefotaxima sódica (0,4 e 0,8%) praticamente não diferiram do tratamento Controle (Imagem 8).

Com isso, conclui-se que seria necessário o isolamento da bactéria para melhor ação do antibiótico, já que os três antibióticos testados não obtiveram sucesso. Devido à falta de materiais, optou-se por utilizar antibióticos já testados em outros estudos de outras espécies, esperando resultado positivo na sua eliminação.

Em alguns trabalhos como Nadha et al. (2012), o problema comum de crescimento bacteriano em torno de brotações in vitro na cultura de tecidos de *Guadua angustifolia* foi resolvido com tratamento dos brotos com canamicina durante 10 dias, porém isso não foi reproduzido no experimento, podendo ser devido à diferença entre espécies e/ou bactérias.

Na assepsia, a esterilização superficial dos explantes foi prejudicial para *D. asper*, oxidando boa parte, senão todo o material coletado, a partir do protocolo de assepsia para *Bambusa oldhamii*, onde foi utilizado imersão em álcool por 1 minuto, que desidratou os tecidos, e com a imersão em hipoclorito na concentração de 1%, que possivelmente queimou os explantes.

De acordo com Pasqual et al. (2010), a persistente contaminação dos tecidos por bactérias é um problema, considerando que tratamentos sucessivos com solução de hipoclorito de sódio ou outro desinfetante são mais prejudiciais ao tecido que à bactéria. Isso indica que devem ser feitos mais estudos sobre a assepsia ideal para a espécie *D. asper*, já que esta é visivelmente mais sensível ao protocolo de assepsia.

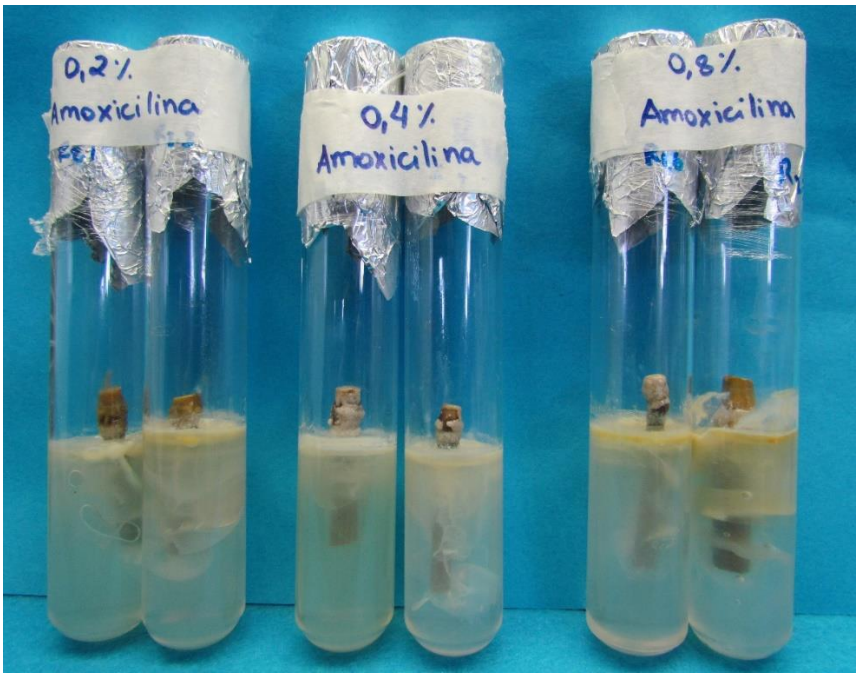
Na pesquisa de Arditti (2008), houveram testes bem-sucedidos com uso de sabonetes líquidos antibacterianos para a assepsia de orquídeas, e há relatos do uso de PPM™ diluído em material aquoso para a imersão dos explantes.

Imagem 9 – Amostra representativa do tratamento Controle.

Fonte: a autora, 2017.

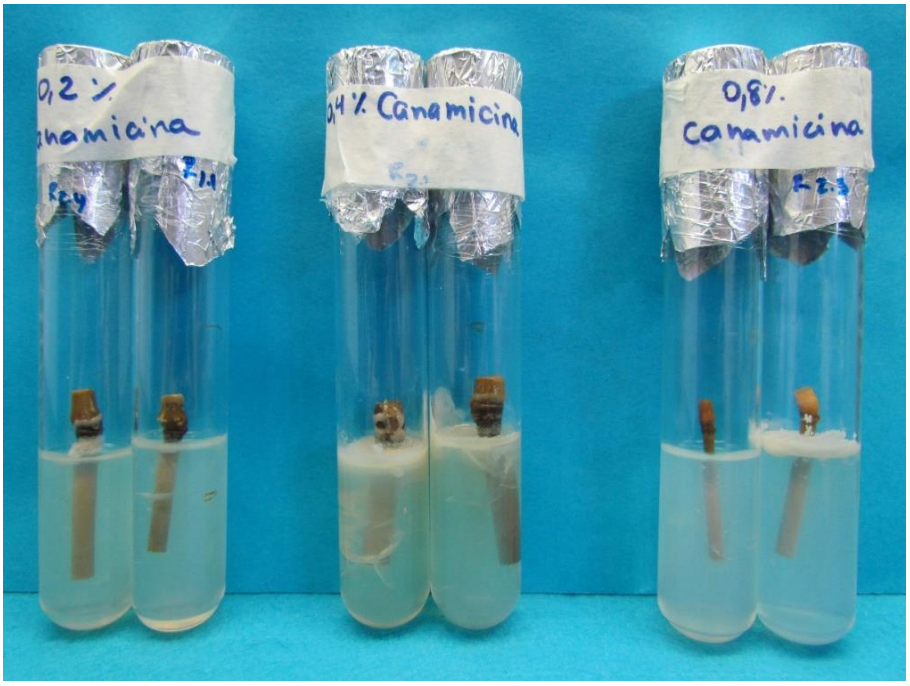
É possível notar grande contaminação bacteriana do tratamento controle (Imagem 9) e dos tratamentos com diferentes doses de Amoxicilina (Imagem 10), não diferindo entre si.

Imagem 10 – Amostras dos tratamentos com Amoxicilina em diferentes dosagens.



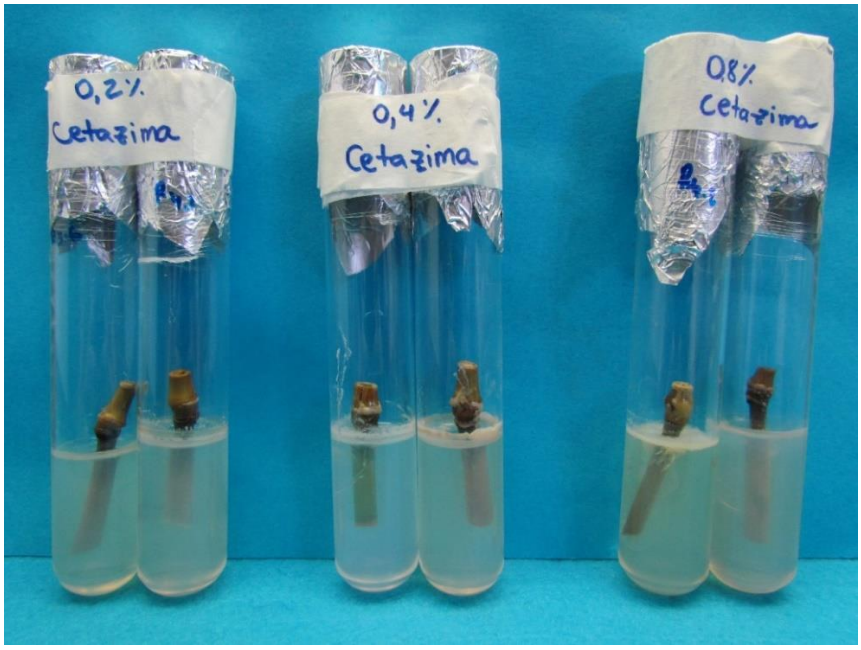
Fonte: a autora, 2017.

Imagem 11 – Amostras dos tratamentos com Canamicina em diferentes dosagens.



Fonte: a autora, 2017.

Imagem 12 – Amostras dos tratamentos com Cefotaxima sódica em diferentes dosagens.



Fonte: a autora, 2017.

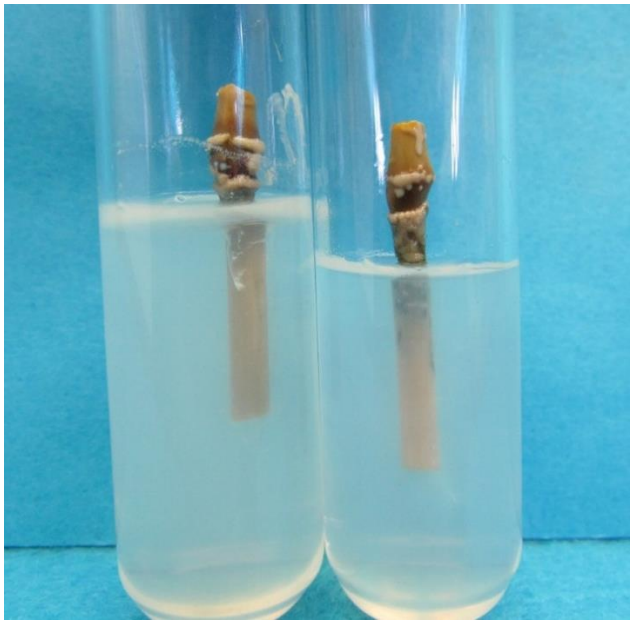
Apesar de não diferirem estatisticamente entre si, e por estarem todos igualmente contaminados, os tratamentos com Canamicina (Imagem 11) e Cefotaxima sódica (Imagem 12) apresentaram uma diferença visual na incidência e aparência de bactérias quando comparados ao Controle (Imagem 9) e Amoxicilina (Imagem 10). Porém, ainda seria necessário o isolamento da bactéria para entender mais amplamente os motivos desse acontecimento.

Imagem 13 – Amostras dos tratamentos com PPM™ em diferentes dosagens.

Fonte: a autora, 2017.

Os tratamentos com PPM™ (Imagem 13) se mostraram eficientes quanto à multiplicação da bactéria no meio, porém houve desenvolvimento superficial, reforçando a teoria de que o material vem contaminado do campo por bactérias endógenas (Imagens 14 e 15).

Imagem 14 – Contaminação bacteriana no explante, enquanto o meio contendo o tratamento com 6ml/ L PPM™ está livre de contaminação.



Fonte: a autora, 2017.

Imagem 15 – Contaminação bacteriana no explante, enquanto o meio contendo o tratamento 8ml/L PPM™ está livre de contaminação.

Fonte: a autora, 2017.

É, portanto, de suma importância que hajam estudos mais detalhados abordando o isolamento, caracterização e controle de bactérias e fungos endógenos presentes nos explantes de *D. asper*, visto que a grande ocorrência de contaminação *in vitro* impede a continuidade dos testes. Em testes comparativos de Araújo (2015), *B. oldhamii* foi submetido às mesmas condições de cultivo que *D. asper*, mas apresentou contaminação fúngica de 2,639% enquanto *D. asper* teve 65,38% de explantes contaminados. Já a contaminação bacteriana foi de 5,36% para *B. oldhamii* , e 73,07% para *D. asper*.

Isso sugere que o tamanho dos brotos pode interferir na maior concentração de bactérias e fungos endógenos ao redor da gema, já que os explantes de *B. oldhamii* são bem mais finos que os de *D. asper*.

Imagem 16 – Fungos ao redor da gema dormente em diferentes tratamentos.

Fonte: a autora, 2017.

Alguns autores como Singh et al. (2011), relatam que dependendo da época do ano em que se coleta o material, se tem maior contaminação fúngica dos explantes, sendo a coleta feita durante a primavera a que apresentou melhor resposta em termos de diminuição de contaminação (8,7 – 14%). Por esse motivo, e pelo fato de que a contaminação fúngica demora mais para aparecer no material micropropagado, não houve neste experimento resultados

drásticos com contaminação fúngica, apenas alguns explantes dos tratamentos Controle, 0,8% Amoxicilina e 0,8% Canamicina (Imagem 16), respectivamente.

Os fungos observados começam a se desenvolver na região da gema, vindo a formar uma espécie de cotonete na porção do explante que se encontra fora do meio de cultura (Imagem 16).

6. CONCLUSÃO

A assepsia com Hipoclorito 1% álcool não é a assepsia ideal para *D. asper* pois não permitiu o desenvolvimento dos explantes.

O problema do crescimento bacteriano e fúngico *in vitro*, comum em diversas espécies de bambu, e em *Dendrocalamus asper*, ainda precisa ser muito estudado, porém a partir deste trabalho, pode-se adotar o uso de 6ml/L ou 8ml/L de PPM™ na composição do meio de cultura, como uma medida eficiente de prevenção da contaminação bacteriana no meio de cultura.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação microbiana tem sido um grande entrave para a micropropagação de bambu e reprodutibilidade de protocolos de cultura de tecidos. A falta de informação e suscetibilidade dos contaminantes aos antibióticos é um importante objeto de estudo. Isso inclui o isolamento, identificação e caracterização das bactérias para que se possa aplicar terapias bem sucedidas, incluindo a possibilidade de combinações de antibióticos.

Novos estudos serão necessários para a assepsia de *D. asper*, evitando a oxidação dos explantes, como o uso de sabonetes líquidos antibacterianos ou uso do PPM™ para imersão dos explantes anteriormente à introdução *in vitro*, objetivando a desinfestação de bactérias endógenas.

O tamanho dos brotos pode interferir na maior concentração de bactérias e fungos endógenos ao redor da gema, logo a busca dos menores explantes à campo com o intuito de levar menor contaminação, deve ser considerada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. A. et al., **Chamada MCTI/AÇÃO TRANSVERSAL/CNPq N.º 66**. Projeto: Estruturação de uma Rede de Pesquisa e Desenvolvimento da Cultura do Bambu no Estado de Goiás, 2013, 85 p.

ARAGÃO, A.K.O.; ALOUFA, M.A.I.; COSTA, I. A. **O EFEITO DO BAP (6-BENZILAMINOPURINA) SOBRE A INDUÇÃO DE BROTOS 339 EM EXPLANTES DE PAU-BRASIL**. Cerne, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cerne/v17n3/v17n3a07.pdf> Acesso 18/04/2017.

ARAUJO, C. H. P., et al., **Estabelecimento in vitro de duas espécies de bambu: Dendrocalamus asper e (Schultes f.) Backer ex Heyne E Bambusa oldhamii Munro**. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.1 n.2; p. 2015. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAhEhIAL/estabelecimento-in-vitro-duas-especies-bambu-dendrocalamus-asper-schultes-f-backer-ex-heyne-bambusa-oldhamii-munro>

ARDITTI, J. **Micropropagation of Orchids**. Blackwell Publishing, 2nd ed., 2008. 1524p. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=zZ34w2WPqoUC&pg=PA1285&lpg=PA1285&dq=dettol+micropropagation&source=bl&ots=FPl17_xoN-&sig=xFnTen3zsGVzMb3eYU-0iJrw3zM&hl=ptBR&sa=X&ved=0ahUKEwjVyKu_nbHTAhVCS5AKHbBkD3sQ6AEIIzAA#v=onepage&q=dettol%20micropropagation&f=false> Acesso 19/04/17.

AZZINI, A.; SALGADO, A.L. de B. **Enraizamento de propágulos de bambu em diferentes substratos**. Campinas– SP, Bragantia, 52(2): 113-118. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/brag/v52n2/03.pdf> Acesso 19/04/17.

BAHTIAR E. T. et al. Measuring Carbon Dioxide Sink of Betung Bamboo (Dendrocallamus asper (Schult f.) Backer ex Heyne) by Sinusoidal Curves Fitting on Its Daily Photosynthesis Light Response. **Journal of Agricultural Science and Technology**. v. 2, p. 780-788, 2012.

BERUTO, M.; LANTERI, L.; PORTOGALLO, C. **Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*)**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 79, p. 249-255, 2004.

CID, L. P. B. **Cultivo de plantas in vitro**. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 3ª edição, Brasília, DF, 2014. http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00054390.pdf

DINIZ, F. **Embrapa investe no conhecimento e conservação de espécies nativas de bambu**. Pesquisa, desenvolvimento e inovação, Produção vegetal. 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>

FONSECA, F. K. P. **Produção de mudas de bambu Guadua angustifolia Kunt (POACEAE) por propagação vegetativa**. Centro de Ciências agrárias. Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, AL, abril de 2007.

GENEROSO, A.L. **Caracterização morfológica do cultivo in vitro de espécies de bambu**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Campo dos Goytacazes, RJ, 2014.

GUERRA, M.P; NODARI, R.O. Apostila de Biotecnologia – CCA/ UFSC. Laboratório de Biotecnologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal. Edição da Steinmacher (2006).

HARTMANN, H.T; KESTER, D.E. Propagación de plantas: princípios e práticas. México: CECSA, 1981. p.237-346.

IAPAR, Instituto Agronômico do Paraná. **Cartas climáticas do estado do Paraná**. Londrina. 1994. 49p.

IMAGEM MILLIPORE Disponível em: <**http://www.medicalexpo.com/pt/prod/merck-millipore/product-70876-442526.html** >

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

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

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1.ed. v. 2, 1999. p.519-531.

KLEINE, H.J. **Cadeia produtiva de bambu: uma fibra excepcional**. 2005. Disponível em: <http://bambusc.org.br/?page_id=106> Acesso: 11/04/2017.

KLEINE, H.J. **Potencial do bambu**. [ca. 2005]. Disponível em: < http://bambusc.org.br/?page_id=989&lang=pt-br> Acesso: 11/04/2017.

BRASIL, **Lei nº 12.484** de 8 de setembro de 2011, disponível em:
< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2011/lei/l12484.htm> Acesso: 09/04/2017.

NADHA, H.K. et al., **Identification and elimination of bacterial contamination during in vitro propagation of Guadua angustifolia Kunth**. Pharmacognosy Magazine, v. 8, n. 30, p. 93-97, 2012.

MALAJOVICH, M. A.; MANN, V. S. **Micropropagação:** Cultivo *in vitro* no laboratório de ensino. Guia de atividades nº80, Biotecnologia: ensino e divulgação, 2011. Disponível em: <https://bteduc.com/guias/80_Micropropagacao_laboratorio_ensino.pdf> Acesso: 16/04/2017.

MALAJOVICH, M. A. **Micropropagação**: Meios de cultivo clássicos. Guia de atividades nº111, Biotecnologia: ensino e divulgação, 2015. Disponível em: <https://bteduc.com/guias/111_Micropropagacao_Meios_classicos.pdf> Acesso: 17/04/2017.

MOGNON, F. **Avaliação comportamental do crescimento, biomassa e estoque de carbono em espécies de bambu**. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - 81f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: < http://www.floresta.ufpr.br/defesas/pdf_dr/2015/t390_0435-D.pdf> Acesso: 16/04/17.

MUDOI, K.D. et al. **Micropropagation of important bamboos: A review**. Medicinal, Aromatic and Economic Plants Division, CSIR - North East Institute of Science and Technology, Jorhat 785 006, Assam, India, 2013.

OSSE, V. C.; MEIRELLES, C. R. M. O Potencial do Bambu na Minimização dos Problemas Climáticos nos Espaços Urbanos. **Revista LABVERDE**, São Paulo, nº03, nov. 2011. Disponível em: < http://www.revistas.usp.br/revistalabverde/article/viewFile/61412/64324> Acesso: 11/04/2017.

PALÚ, E.G. et al. **USO DE ANTIBIÓTICOS PARA O CONTROLE DE BACTÉRIAS ENDÓGENAS VISANDO À MICROPROPAGAÇÃO DA FIGUEIRA**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 2, p. 587-592, Junho, 2011. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33n2/a31v33n2.pdf> Acesso: 19/04/2017.

PASQUAL M. et al. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: PEREIRA, J. E. S. (org). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Embrapa, 1ª ed., Brasília, DF, 2010. cap. 2, p.61-162.

PASQUALINI, A.P.A; QUOIRIN, M. **Estabelecimento in vitro de *Bambusa oldhamii* Munro**. UFPR, Curitiba, 2016.

PEREIRA, G. A. et al. **Controle de contaminantes em explantes de bananeira "Grande Naine" na micropropagação in vitro.** Tecnologia & Ciência Agropecuária. João Pessoa, v.4, n.2, p.35-39, jun. 2010. Disponível em: <http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-04-2010/volume-4-numero-2-junho-2010/tca07_controle.pdf> Acesso: 19/04/2017.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. 1. Ed. Bauru. SP: Canal 6, 2007. 240p.

PEREIRA, M. A. dos R. **Projeto bambu**: introdução de espécies, manejo, caracterização e aplicações. 2012. 200 f. Tese (livre-docência) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/106710>.

PLANT CELL TECHNOLOGY. Plant Preservative Mixture™. Disponível em: < http://www.plantcelltechnology.com/about-ppm/ > Acesso: 24/05/2017.

PRATES, E. M. B. **Morfologia externa e anatomia do colmo de dendrocalamus asper (poaceae: bambusoideae) em duas localidades no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação de mestrado em ciências florestais. Publicação: ppgefl.dm214/2013 BRASÍLIA/DF: MAIO – 2013. Disponível em: < http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/15888/1/2013_EduardaMariaBheringPrates.pdf>

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. da S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus, AM. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Doc 61. Dez/ 2008. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47132/1/Doc-61-A5.pdf> Acesso: 17/04/17.

RODRÍGUEZ, J.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento de plantas. In: VIII ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS, UEFS, 1986, Feira de Santanta, BA. **Anais**, Feira de Santana, BA, Sitientibus, 1987. Disponível em: < http://www2.uefs.br/sitientibus/pdf/7/aplicacoes_da_cultura_de_tecidos_no_melhoramento_de_plantas.pdf> Acesso: 17/05/2017.

SINGH, S. R. et al. **Micropropagation of Dendrocalamus asper {Schult. & Schult. F.} Backer ex k. Heyne**): an exotic edible bamboo. Society for Plante Biochemistry and Biotechnology. Published online:13. 2011.

SINGH, S. R. et al. **Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo** - a plant with extraordinary qualities. Revista: Physiol Mol Biol Plants, 2012.

SUGAMOSTO, M. L. **Uso de Técnicas de Geoprocessamento para Elaboração de Mapa de Aptidão Agrícola e Avaliação da Adequação de Uso do Centro de Estações Experimentais do Canguiri, Município de Pinhais - Paraná**. 133 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

VASCONCELLOS, R. M. de. **Espécies e Taxonomia do Bambu:** espécies e identificação. Rio de Janeiro – RJ, 2010. Disponível em:
< http://web500.com.br/Bambu_Brasil/index.php/2010/09/especies-e-taxonomia-do-bambu/>

ZAPPELINI, J. Diversidade Genética de Espécies de Bambu na Ilha de Santa Catarina: Observações preliminares. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Florianópolis - SC, 2014. Disponível em:
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/132086/J%C3%9ALIA%20ZAPPELINI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>