

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS
– PPG CFT**

JOÃO RICARDO AVELINO LEÃO

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Guadua* spp. NATIVOS DA AMAZÔNIA SUL-
OCIDENTAL, ACRE, BRASIL**

MANAUS-AM

2017

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS
– PPG CFT

JOÃO RICARDO AVELINO LEÃO

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Guadua* spp. NATIVOS DA AMAZÔNIA SUL-
OCIDENTAL, ACRE, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Florestas Tropicais, área de concentração Silvicultura Tropical.

Orientador: Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio.
Coorientadora: Dra. Andréa Raposo

MANAUS-AM

2017

L433 Leão, João Ricardo Avelino

Propagação in vitro de Guadua spp. nativos da Amazônia Sul-Occidental, Acre, Brasil / João Ricardo Avelino Leão. ---
Manaus: [s.n.], 2017.
84 f.: il.

Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2017.
Orientador: Paulo de Tarso Barbosa Sampaio
Coorientador: Andréa Raposo
Área de concentração: Ciências de Florestas Tropicais

1. Bambu. 2. Cultura de Tecidos. 3. Reguladores de
Crescimento. I. Título.

CDD 584.9

JOÃO RICARDO AVELINO LEÃO

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Guadua* spp. NATIVOS DA AMAZÔNIA SUL-
OCIDENTAL, ACRE, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Florestas Tropicais, área de concentração Silvicultura Tropical.

Tese aprovada em 29 de Agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Evandro José Linhares Ferreira

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-AC)

Dr. Ary Vieira de Paiva

Universidade Federal do Acre

Dra. Larissa Ramos Chevreuil

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dra. Eva Maria Alves Cavalcanti Atroch

Universidade Federal do Amazonas

Dr. João Baptista Silva Ferraz

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dedico esta obra aos meus pais e àqueles que um dia pensaram
em desistir e persistiram resilientemente.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador do universo pelo sopro de vida e por inspirar-me diariamente mantendo minha sanidade física, mental e emocional até a conclusão do processo de doutoramento.

Ao Prof. Dr. Ary Vieira de Paiva, coordenador do Dinter (UFAC/INPA), por oportunizar-me crescimento acadêmico desde o primeiro PIBIC em 2009.

Aos professores do PPG-CFT (MCTI/INPA) em nome do prof. Dr. José Francisco, exemplo de profissionalismo e dedicação à coordenação do CFT/INPA.

À minha coorientadora Dra. Andréa Raposo (EMBRAPA Acre) por acompanhar-me de forma majestosa deste o mestrado concluído em 2011, meu exemplo de família, profissional e ser humano. Seus conselhos sempre foram acalentadores.

Ao meu orientador Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio por abraçar a causa e confiar em minhas habilidades mesmo à distância.

Ao Dr. Jonh Preece que me acolheu de forma genuína na USDA-UC/Davis e ao Modesto Junior College (Modesto, CA) pelo crescimento intelectual e cultural.

À EMBRAPA Acre pelo espaço, estrutura funcional e convivência diária com os pesquisadores, em nome da Dra. Tatiana, Dr. Elias Miranda, Fernando Pretti e Polaco.

À Valdecira Azevedo e a secretaria do PPG-CFT (Ciências de Florestas Tropicais) por atenderem de forma célere as solicitações e e-mails enviados.

Aos amigos do LABMOL Ana Cláudia, Susana, Hellen, Twbyas, Fran, Renata e Luciélio pelo compartilhamento de conhecimentos e convivência no laboratório.

À minha família Dorinha Gomes, Artur Lustosa, Artur Leão, Fernando Araújo pelo apoio e suporte emocional ao longo dessa e outras caminhadas.

Aos amigos Rob Conley, Bob, Rick Pittinger pelas revisões em inglês e à Suzanne e Lory pelos momentos de lazer e boas risadas em Riverbank, CA.

Aos amigos de todas as horas, João Paulo, Stoney, Ana Paula e Kétila por partilharem dos meus sonhos, amizade, diversão e camaradagem.

Aos amigos que o Doutorado me proporcionou, Renato, Karol, Casa Linda, Beto, Geângelo e Mônica. A saudade de casa foi menor com o calor manauara.

Aos amigos do Dinter pelo compartilhamento de informação e por persistirem até aqui, Anelena, Nara, Willian, Elsa, Ferraz, Gleison e Sonaira. **Meu eterno e muito obrigado!**

Everyone should have a tree inside.

“Veni, Vidi, Vici”
(Júlio César).

RESUMO

A maior floresta de bambu nativo do mundo está localizada no estado do Acre em uma região da Amazônia brasileira com alta biodiversidade na fronteira com Peru e Bolívia. Existe uma atual demanda para a produção em larga escala de mudas de bambu do gênero *Guadua* devido sua versatilidade e característica de ser uma matéria-prima renovável e sustentável. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método de propagação *in vitro* utilizando partes pequenas da planta de bambu (segmentos nodais, folhas e sementes) em ensaios de estabelecimento, multiplicação, enraizamento, calogênese e germinação *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de morfogênese e biologia molecular da Embrapa-Acre. No estabelecimento *in vitro* foi utilizado como agente pré-desinfestante Amistar® e cloreto de benzalcônio, e desinfestante álcool e hipoclorito de sódio. Além disso, o biocida sintético PPM® foi testado nas concentrações de 0, 2 e 3 mL L⁻¹ em meio de cultura MS semissólido. Os parâmetros avaliados foram número de brotos, sobrevivência, porcentagem de contaminação bacteriana e fúngica. Para a multiplicação *in vitro* foi utilizado o regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0, 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ em meio MS líquido. As variáveis estudadas foram número de brotos e folhas, altura do maior broto, taxa de multiplicação, presença de calo e raízes em dois subcultivos consecutivos. No enraizamento *in vitro* foram utilizados os reguladores ácido indolacético (AIA), indolbutírico (AIB) e naftalenoacético (ANA) nas concentrações de 0, 0,5, 1 e 2 mg L⁻¹. As variáveis analisadas foram porcentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento de raiz, parte aérea, número de brotos, folhas e necrose. Na calogênese foi testado a influência dos reguladores 2,4-D, Picloram, BAP e ANA na indução de calos, na ausência e presença de luz. As variáveis analisadas foram porcentagem de calos, oxidação, contaminação bacteriana e fúngica. Na germinação de sementes foi testado a influência do ácido giberélico (AG3), BAP, meio de cultura MS e WPM na indução de plântulas *in vitro* e foi analisado porcentagem de germinação, sementes quiescentes, contaminação bacteriana e fúngica. Durante o estabelecimento verificou-se maior eficiência na utilização de 2 mg L⁻¹ de PPM® no controle de bactérias e fungos, porém não houve aumento da regeneração de brotos independentemente da concentração usada. Na multiplicação *in vitro* foi observada a eficiência do BAP nas amostras que estavam expostas ao regulador de crescimento. No subcultivo 1, houve aumento significativo no número de brotos regenerados *in vitro* e incremento em altura das brotações em todos os tratamentos, exceto no controle. No subcultivo 2, os dados obtidos indicaram o contínuo aumento no número de brotações em todas as concentrações testadas, exceto para a testemunha. Além das brotações manterem-se, estatisticamente, com a mesma altura. No enraizamento a maior porcentagem de explantes com formação de raízes foi em AIA com 83%. Recomenda-se que durante a micropropagação de segmentos nodais de *Guadua latifolia* seja utilizado 2 mL L⁻¹ de PPM®, 2 mg L⁻¹ de BAP, 15 dias de incubação para cada subcultivo, 0,5 mg L⁻¹ de AIA durante o enraizamento e 25 dias de pré-aclimatização. Não houve formação de massa calogênica em *Guadua cf. angustifolia* e as sementes germinadas de *G. latifolia* não se desenvolveram completamente.

Palavras-chave: Poaceae. Bambu. Micropropagação. Calos. Sementes.

ABSTRACT

The world's largest native bambu forest is in the state of Acre in the Brazilian Amazon. An enormous area high in biodiversity, located just in the Brazilian border with Peru and Bolivia and there is in fact a large scale demand on the *Guadua*'s gender seeding production, due to its versatility and for being such a renewable and sustainable raw material. The goal was to develop a protocol of *in vitro* propagation using small parts of bamboo plant (nodal segments, leaves and seeds) in laboratory tests of establishment, multiplication, rooting, callus induction and *in vitro* germination. The experiments were conducted at the morphogenesis and Biomolecular Laboratory from EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation in Acre). The establishment was realized with nodal segments collected from plants stored at the laboratory greenhouse. The nodal segments were disinfected with a systemic fungicide, bactericide, alcohol and sodium hypochlorite. Plant Preservative Mixture (PPM[®]) was used as a synthetic biocide in concentration of both 0, 2 and 3 mL L⁻¹ in glass tubes with the semisolid Murashige and Skoog (MS) culture medium and 2 mg L⁻¹ of benzylaminopurine (BA) to stimulate the axillary bud break at 15 days of incubation. The variables analyzed were shoot number, and degrees of bacterial and fungal contamination. *In vitro* multiplication was performed with BA plant growth hormone in concentrations of 0, 2, 4, 6, 8 mg L⁻¹ in glass tubes with MS liquid at 38 days of incubation. The variables analyzed were shoot number, shoot length, multiplication rate, callus and root growth in two consecutive subcultures. Rooting was induced with the indoleacetic (IAA), indolebutyric (IBA) and naphthaleneacetic (NAA) acids in concentrations of 0, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹. The variables analyzed were root number, root length, rooting rate at 30 days of incubation. In callus formation was used 2,4-D, Picloram, BA and NAA regulators, with light and no light. It was checked degree of callus, bacterial and fungal contamination. *In vitro* germination was tested with AG3, BA, MS and WPM culture medium. It was verified degree of plant formation, bacterial and fungal contamination. The establishment using 2 mL L⁻¹ of PPM[®] was more effective against bacterial and fungal attack, and shoot regeneration was not concentration dependent. The use of BA was effective in increasing the shoot number and the shoot length during the first subculture as compared with the control treatment. The second subculture results showed increased shoot number in all BA concentrations tested, except for the control. Shoot length showed no statistical increase in any of the concentrations used. The *in vitro* rooting using the auxin IAA demonstrated good root response while IBA and NAA were not response. It was verified 83% of rooting in IAA. Micropropagation of *Guadua latifolia* nodal segments is best accomplished using 2 mL L⁻¹ of PPM[®] for establishment, 2 mg L⁻¹ of BA for multiplication, and 0.5 mg L⁻¹ of A IAA for rooting. It is not found callus formation in *Guadua cf. angustifolia*, and the seed germination of *G. latifolia* was not develop completely.

Keywords: Poaceae. Bamboo. Micropropagation. Callus. Seeds.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>GUADUA</i>	17
3.2 PROPAGAÇÃO SEMINAL E VEGETATIVA DE BAMBU.....	17
3.2.1 PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE BAMBU	18
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 1 - PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO BAMBU NATIVO <i>Guadua latifolia</i>	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43
CAPÍTULO 2 - CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE BAMBUS <i>Guadua cf. angustifolia</i>	48
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAL E M ÉTODOS.....	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65
CAPÍTULO 3 - BIOMETRIA E GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>Guadua latifolia</i>	69
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO.....	82

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - Propagação *in vitro* do bambu nativo *Guadua latifolia*

Tabela 1 - Análise bromatológica de plântulas de bambu (<i>Guadua latifolia</i>) submetidas ao cultivo <i>in vitro</i>	33
Tabela 2 - Utilização de diferentes agentes desinfestantes no estabelecimento <i>in vitro</i> de bambus comparado com o uso de PPM®.....	34
Tabela 3 - Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de bambu (<i>Guadua latifolia</i>) após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura MS semissólido suplementado com 2 mg L ⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de PPM®.....	35
Tabela 4 - Multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de bambu (<i>Guadua latifolia</i>) em meio de cultura MS líquido em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP).....	37
Tabela 5 - Estimativa da produção de brotos <i>in vitro</i> de bambu (<i>Guadua latifolia</i>) em seis subcultivos durante 180 dias em meio de cultura MS líquido em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP).....	38
Tabela 6 - Enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas de bambu (<i>Guadua latifolia</i>) em meio de cultura MS líquido contendo diferentes concentrações de ácido indolacético (AIA).....	39

Capítulo 2 - Calogênese em explantes de bambus *Guadua cf. angustifolia*

Tabela 1 - Calogênese em folhas jovens de bambu (<i>Guadua cf. angustifolia</i>) sob influência dos reguladores de crescimento TDZ e BAP associados com ANA, após 30 dias de inoculação.....	33
Tabela 2 - Calogênese em segmentos nodais de bambu (<i>Guadua cf. angustifolia</i>) em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP e ANA na presença e ausência de luz, após 30 dias de inoculação.....	34
Tabela 3 - Calogênese em segmentos nodais de bambu (<i>Guadua cf. angustifolia</i>) em meio MS suplementado com diferentes concentrações Picloram, 2,4-D, Cinetina e ANA, após 30 dias de inoculação.....	35
Tabela 4 - Calogênese em segmentos nodais de bambu (<i>Guadua cf. angustifolia</i>) após 30 dias de inoculação em meio de cultura MS em contato com diferentes tipos de fungicidas.....	37

Capítulo 3 - Biometria e germinação *in vitro* de sementes de *Guadua latifolia*

Tabela 1 - Estatística descritiva das variáveis biométricas de sementes de bambu.....	38
Tabela 2 - Matriz de correlação de Pearson das variáveis biométrica de sementes do bambu nativo <i>Guadua latifolia</i> coletadas na Reserva Extrativista Chico Mendes, Assis Brasil - AC.....	39
Tabela 3 - Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Guadua latifolia</i> submersas por 76 horas em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG3) após 30 dias de inoculação em Meio MS.....	38
Tabela 4 - Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Guadua latifolia</i> em meios de cultura MS e WPM com diferentes concentrações de ácido giberélico (AG ³) e após 30 dias de inoculação.....	39

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Propagação *in vitro* do bambu nativo *Guadua latifolia*

- Figura 1** - Microestacas de *Guadua latifolia* selecionados para estabelecimento *in vitro*. Gema lateral exposta, sem a presença de bainha caulinar e espinhos (seta).....30
- Figura 2** - Brotação axilar de bambu (*Guadua latifolia*) após 15 dias de cultivo. Brotações em 2 mL L⁻¹ de PPM® (A). Brotações em 3 mL L⁻¹ de PPM® (B).....32
- Figura 3** - Brotos regenerados de bambu (*Guadua latifolia*) após o subcultivo 1. Ausência de brotações em 0 mg L⁻¹ de BAP (A). Brotações adventícias em 4 mg L⁻¹ de BAP (B). Altura de brotos em 6 mg L⁻¹ de BAP (C).....38
- Figura 4** - Plântulas de bambu (*Guadua latifolia*) enraizadas *in vitro* após 30 dias de cultivo. Rizogênese em 0,5 mg L⁻¹ de AIA (A). Rizogênese em 2 mg L⁻¹ de AIA (B). Pré-aclimatização em sala de crescimento (C).....40

Capítulo 2 - Calogênese em explantes de bambus *Guadua cf. angustifolia*

- Figura 1** - Oxidação e contaminação fúngica (seta) em explantes foliares de bambu danificados pela ação do hipoclorito de sódio após 30 dias de inoculação.30
- Figura 2** - Segmentos nodais inoculados em meio de cultura MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de Cinetina e 1 mg L⁻¹ de ANA. A) brotação após 30 dias. B) brotação desenvolvida após 40 dias de inoculação.....32
- Figura 3** - Aspecto morfológico do fungo do gênero *Fusarium* (bar=10 µm) encontrado nos segmentos nodais de Bambu (*Guadua cf. angustifolia*) inoculado em meio de cultura. Observe o conídio fusiforme em formato de meia lua, cor clara com septos no sentido transversal (seta).....38

Capítulo 3 - Biometria e germinação *in vitro* de sementes de *Guadua latifolia*

- Figura 1** - Germinação *in vitro* de semente de bambu (*Guadua latifolia*) inoculada em meio de cultura MS. Note a emissão da radícula (seta).....76

1 INTRODUÇÃO

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

Segundo Filgueiras e Gonçalves (2004), o Brasil possui 34 gêneros de bambus, sendo 16 herbáceos e 18 lenhosos, totalizando 232 espécies nativas. Os bambus lenhosos se caracterizam por possuírem rizomas fortes, bem desenvolvidos, brotos protegidos por folhas caulinares, completo sistema de ramificação, lâmina foliar decídua, florações cíclicas e monocárpicas e por se desenvolverem em locais abertos, são polinizados pelo vento (LONDOÑO, 2004). Dentre os bambus lenhosos que ocorrem no Brasil, o gênero *Guadua* é considerado endêmico da Amazônia, possuindo 16 espécies (FILGUEIRAS e GONÇALVES, 2004).

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

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

A vegetação nesta região é caracterizada pela ocorrência de florestas abertas com bambu do gênero *Guadua* conhecidas como tabocais no estado do Acre e cobrem áreas extensas com aproximadamente 161.500 km² e seu ciclo de vida é estima entre 27-28 anos (CARVALHO et al., 2013).

De acordo com Ostapiv et al. (2008), a utilização racional deste recurso na região Amazônica pode ajudar a preservar a floresta, diminuindo a pressão existente sobre o corte de espécies arbóreas e incentivar o manejo sustentável. Em países

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

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

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

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

Um dos principais fatores limitantes do cultivo de bambu é a falta de métodos adequados para sua propagação vegetativa, visando plantios industriais em grandes áreas. De acordo com Fonseca (2007), os métodos tradicionais de propagação vegetativa do bambu não são adequados, pois se baseiam na subdivisão das touceiras ou no plantio de partes do colmo. Esses métodos são trabalhosos e de baixo rendimento, pois as mudas devem ser desmembradas da touceira matriz com sua destruição total ou parcial. Dentro deste contexto, as técnicas de propagação *in vitro* têm surgido como uma alternativa mais eficaz e confiável para a propagação destas espécies.

Embora os bambus apresentem crescimento rápido e maturação precoce, sua natureza monocárpica tem sido um problema para os programas de melhoramento e para o manejo sustentável destas espécies. O uso de sementes para propagação é de difícil obtenção por estarem relacionadas à baixa viabilidade, difícil armazenamento, alta taxa de contaminantes microbianos e, principalmente, pelo fato das espécies de grande porte florescerem em intervalos muito longos, além da

poliploidia de muitas delas (SAFE, 2004; SINGH et al., 2013b). Segundo Richa e Nerru (2006), a baixa viabilidade das sementes de bambus armazenadas é ocasionada pelos baixos níveis de auxinas e ácido abscísico endógenos.

Em uma revisão sobre a importância da micropropagação para espécies de bambu, Mudo et al. (2013) citam que já existem estudos de propagação *in vitro* com mais de 40 espécies e que estes trabalhos se concentram nos gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus*. Os autores citam somente um trabalho para o gênero *Guadua* (JIMÉNEZ et al., 2006). Este fato demonstra que apesar de já se ter vários estudos de micropropagação com espécies de bambu, pesquisas de propagação *in vitro* com o gênero *Guadua* são poucas e necessárias, por isso são de grande importância.

O bambu possui importância cultural, social, ambiental e econômica. Em todo o mundo, são mais de 2,5 bilhões de pessoas que dependem economicamente desta planta. Somado a este fator, existe uma demanda crescente por produtos ecologicamente corretos e como consequência uma expectativa no aumento do uso de materiais produzidos por estas espécies (SINGH et al, 2013b).

Apesar da importância social, cultural, econômica e ambiental que os bambus apresentam no estado do Acre seu uso ainda é pouco praticado devido à grande dificuldade em propagá-los convencionalmente e também pela carência de estudos com esta planta. Este fato demonstra a grande importância de trabalhos relacionados à propagação *in vitro* destas espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver protocolo para a produção de mudas de bambus (*Guadua* spp.) utilizando técnicas de cultivo *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o cultivo *in vitro* de bambus *Guadua latifolia*.
- Induzir a organogênese direta em brotos de bambus *Guadua latifolia* cultivados *in vitro*.
- Promover a rizogênese das brotações obtidas na fase de multiplicação *in vitro* de bambus *Guadua latifolia*.
- Obter calos a partir de discos foliares e segmentos nodais de bambus *Guadua* cf. *angustifolia*.
- Caracterizar biometricamente as sementes de bambus *Guadua latifolia*.
- Testar a germinação *in vitro* de sementes de bambus *Guadua latifolia*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância do gênero *Guadua*

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

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

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

As espécies do gênero *Guadua*, são bambus lenhosos que podem atingir 25-35 m de altura, ocupam grandes clareiras e dominam o dossel das florestas, formando uma trama quase impenetrável de colmos com espinhos no sub-bosque. O ciclo de vida destas espécies é estimado entre 29-32 anos (SILVEIRA, 1999), após o qual florescem, morrem e depositam toneladas de material morto no solo em um espaço de tempo curto (TOREZAN e SILVEIRA, 2000). Formam touceiras e possuem alta produtividade com colmos maduros aos 3 anos e se forem retirados de maneira adequada a produção aumenta nos anos subsequentes.

3.2 Propagação seminal e vegetativa de bambu

A propagação do bambu pode ocorrer por reprodução sexuada, através de sementes, o qual não é um método fácil e prático devido à esporadicidade de floração

dos bambus, além da baixa viabilidade e vigor de suas sementes (SAFE, 2004). Além disso, plantas do gênero *Guadua* são consideradas como sendo de rara florescência, o que dificulta sua propagação por sementes (FONSECA, 2007).

Já na forma vegetativa a propagação dos bambus ocorre por técnicas como desdobramento de touceiras, enraizamentos de estacas ou pedaços de colmos e ramos, porém esses processos são limitados, especialmente, para os plantios de grandes áreas, onde o grande número de mudas é necessário (PEREIRA e BERALDO, 2010).

De acordo com Pereira e Beraldo (2010), a principal vantagem da propagação vegetativa é a possibilidade de obtenção de plantas clonais com uniformidade genética e fenotípica. Para a maioria das espécies de *Guadua* faltam estudos para definir o método mais adequado para sua propagação e para desenvolver um sistema de produção de mudas com elevadas taxas de sobrevivência (NADHA, et al., 2012; DRUMOND e WIEDMAN, 2017).

3.2.1 Propagação *in vitro* de bambu

A micropropagação é a aplicação mais conhecida da cultura de tecidos vegetais, ela permite o crescimento e a multiplicação *in vitro* de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, em um meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais controladas como iluminação e temperatura (CARVALHO, 2006).

Essa técnica pode ser empregada para a multiplicação de plantas difíceis de serem propagadas por outros métodos, tanto para a produção comercial de mudas quanto para a conservação de germoplasma (SOUZA e JUNGHANS, 2009). Essa metodologia fundamenta-se na teoria da totipotência celular, onde cada célula de uma planta é capaz de regenerar uma planta inteira, tornando-se, possível regenerar várias plantas a partir de uma unidade celular (SOUZA e JUNGHANS, 2007).

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

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

maiores problemas diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica. Além dessas contaminações superficiais, é frequente se deparar com contaminações presentes no interior dos tecidos sendo mais frequente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (ABREU et al., 2002).

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

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

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

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

Diversos tipos de antibióticos já foram empregados e testados com êxito no combate às bactérias que inviabilizam o sucesso dos estudos de micropropagação de bambus, como por exemplo, canamicina e sulfeto de estreptomicina em *Guadua angustifolia* (NADHA, et al., 2012) e sulfato de estreptomicina combinado com hidrocloreto de tetraciclina em *Bambusa balcooa* (KHAN et al. (2014).

O uso de fungicidas em bambus foi relatado combinado com antibióticos e também de forma isolada. O antifúngico sistêmico Basvistin® é utilizado no controle de fungos em *Dendrocalamus asper*. Além disso, outras substâncias, como cloreto de

mercúrio (HgCl₂), são amplamente usadas como agentes desinfestantes (SINGH, et al. 2012; KALAIARASI, et al., 2014; GOYAL, et al., 2015).

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

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

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

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

Como visto, na literatura ainda são poucos os estudos de cultivo *in vitro* com pesquisas voltadas para o desenvolvimento de métodos adequados e sistemas de produção de mudas com elevadas taxas de sobrevivência para a produção de mudas

de bambus do gênero *Guadua*, principalmente para os endêmicos da floresta Amazônica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L.A.; SANTOS, L. de F.; SOUZA, G. A. B. de; MENDES, R. A. **O uso de benomil em cultura de tecidos**. In: Encontro de Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Resumo dos Trabalhos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 28, 2002.
- ARAÚJO, C. H. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de duas espécies de bambu: *Dendrocalamus asper* (Schultes f.) Backer ex Heyne e *Bambusa oldhamii* Munro. Enciclopédia **Biosfera - Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 11 n. 22; p. 1117-1182, 2015.
- CARVALHO, A. L.; NELSON, B. W.; BIANCHINI, M. C; PLAGNOL, D.; KUPLICH, T. M.; DALY, D. C. Bamboo-dominated forests of the Southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves". **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.
- CARVALHO, J. M. F. C. et al. Embriogênese somática. Campina Grande (Embrapa Algodão. Documentos, 152), p. 35, 2006.
- CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos – cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia**. Bogotá, Colombia. 2004.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. **Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal, in: Cultivo in vitro de plantas**, editor técnico Cid L. P. B., Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, p. 51-66, 2010.
- DALY, D. C.; SILVEIRA, M. Primeiro catálogo da flora do Acre, Brasil/First Catalogue of the flora of Acre, Brasil. Rio Branco: Ediufac, v. 1000. 2008, 555 p.
- DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil: da biologia à biotecnologia**. Rio de Janeiro: ICH, 2017. 655 p.
- FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. P. S. A. Checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). Bamboo science and culture. **The journal of the American Bamboo Society**. v. 18, n.1, p. 7-18, 2004.
- FONSECA, F. K. P. da. Produção de mudas de bambu *Guadua angustifolia* Kunth (POACEAE) por propagação vegetativa. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas. 58 pp. 2007.
- GRADAILLE, M. D.; RODRÍGUEZ, D. P.; MÁZ, Y. L.; TORRIJO, F. S. Propagación *in vitro* de bambú chino (*Dracaena sanderiana* L.). **Ciencia y Tecnología**, v. 3, n. 1, p. 7-13, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NADHA, H.; SALWAN, R.; KASANA, R.; ANAND, M.; SOOD, A. Identification and elimination of bacterial contamination during *in vitro* propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. **Pharmacognosy magazine**, v. 8, n.30, p. 93-97, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 1 - PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO BAMBU NATIVO *Guadua latifolia*

Leão, J. R. A.; Raposo, A.; Sampaio, P. de T. B.

Resumo: As florestas de bambu nativo, no estado do Acre, estão localizadas em uma região com alta biodiversidade na Amazônia brasileira, na fronteira com Peru e Bolívia. Existe uma atual demanda para a produção em larga escala de mudas de bambu do gênero *Guadua* devido sua versatilidade e característica de ser uma matéria-prima renovável e sustentável. O objetivo desse estudo foi desenvolver um método de estabelecimento e multiplicação *in vitro* por meio de segmentos nodais de bambu. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de morfogênese e biologia molecular da Embrapa Acre. No estabelecimento *in vitro* foi utilizado como agente pré-desinfestante Amistar® e cloreto de benzalcônio, a desinfestação foi realizada com álcool e hipoclorito de sódio. Além disso, o biocida sintético PPM® foi testado nas concentrações de 0, 2 e 3 mL L⁻¹ em meio de cultura MS semissólido. Os parâmetros avaliados foram número de brotos, sobrevivência de explantes, porcentagem de contaminação bacteriana e fúngica. Para a multiplicação *in vitro* foi utilizado o regulador de crescimento vegetal 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0, 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ em meio MS líquido. As variáveis estudadas foram número de brotos e folhas, altura do maior broto, taxa de multiplicação, presença de calo e raízes em dois subcultivos consecutivos. No enraizamento *in vitro* foram utilizados os reguladores ácido indolacético (AIA), indolbutírico (AIB) e naftalenoacético (ANA) nas concentrações de 0, 0,5, 1 e 2 mg L⁻¹. As variáveis analisadas foram porcentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento de raiz, parte aérea, número de brotos, folhas e necrose. Durante o estabelecimento verificou-se maior eficiência na utilização de 2 mg L⁻¹ de PPM® no controle de bactérias e fungos, porém não houve aumento da regeneração de brotos independentemente da concentração usada. Na multiplicação *in vitro* foi observada a eficiência do BAP nas amostras que estavam expostas ao regulador de crescimento. No subcultivo 1, houve aumento significativo no número de brotos regenerados *in vitro* e incremento em altura das brotações em todos os tratamentos, exceto no controle. No subcultivo 2, os dados obtidos indicaram o contínuo aumento no número de brotações em todas as concentrações testadas, exceto para a testemunha. Além das brotações manterem-se, estatisticamente, com a mesma altura. No enraizamento a maior porcentagem de explantes com formação de raízes foi em AIA com 83%. Os indutores de enraizamento AIB e ANA não promoveram raízes *in vitro*. Portanto, recomenda-se que durante a micropropagação de segmentos nodais de *Guadua latifolia* seja utilizado 2 mL L⁻¹ de PPM®, 2 mg L⁻¹ de BAP com 15 dias de incubação para cada subcultivo, 0,5 mg L⁻¹ de AIA durante o enraizamento e 25 dias de pré-aclimatização.

Palavras-chave: Organogênese. Micropropagação. Citocinina. Hormônio vegetal. Amazônia.

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

O bambu é uma planta monocárpica, ou seja, após a floração ocorre morte das plantas. As sementes possuem pouca viabilidade devido a baixos níveis de auxinas e

ácido abscísico endógenos, além de serem espécies que florescerem em intervalos muito longos. Estes fatores tornam a propagação sexuada extremamente difícil (RICHA e NERRU, 2006).

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

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

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

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

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

O bambu está se tornando uma importante cultura para a erradicação da pobreza e o desenvolvimento ambiental. Em todo o mundo, são mais de 2,5 bilhões de pessoas que dependem economicamente desta planta (SINGH et al, 2013).

Somando a este fato, tem-se a demanda por produtos ecologicamente corretos e como consequência uma expectativa no aumento do uso de materiais produzidos por estas espécies.

E apesar da importância social, cultural e econômica dos bambus ainda são pouco difundidos devido à grande dificuldade em propagá-los convencionalmente. Este fato demonstra a grande importância de trabalhos relacionados à propagação *in vitro* destas espécies.

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, localizado na Br 364 Km 14 em Rio Branco Acre, nos anos de 2014 a 2017. Para o estabelecimento do cultivo *in vitro* foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais de plantas de bambu (*Guadua latifolia*) oriundas de mudas coletadas na Reserva Extrativista Chico Mendes no município de Assis Brasil - AC no dia 27 de agosto de 2014, coordenadas geográficas: S10°43'02.2" W 69°24'06.5". Estas foram colocadas em vasos contendo uma mistura de terra, substrato comercial e esterco (1:1:1) e mantidas em casa de vegetação a uma temperatura 30 °C e com 88% umidade relativa, recebendo pulverizações semanais com fungicida sistêmico Amistar® (0,42 g L⁻¹). As coletas das seções caulinares foram realizadas 48 horas após a pulverização com o fungicida.

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

2.1 Estabelecimento *in vitro* de bambu (fase 0)

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



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

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

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

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos com 24 repetições, sendo quatro explantes por parcela (frasco). As

avaliações foram realizadas após 15 dias da inoculação. As variáveis avaliadas foram os percentuais de contaminação por fungos e bactérias por meio de observação visual da formação de colônias bacterianas, número de brotações pela verificação da expansão da gema axilar formando um broto e porcentagem de brotos vivos ao final do experimento.

2.2 Multiplicação *in vitro* de bambu (fase 1)

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

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

2.3 Enraizamento e pré-aclimatização de bambu (fase 2 e 3)

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

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

A pré-aclimatização das plantas completas formadas *in vitro* foi previamente realizada em sala de crescimento (temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz), com a transferência das plantas para recipientes medindo 10 centímetros de diâmetro e 8 cm de profundidade (capacidade de 500 mL) contendo

substrato comercial do tipo Plantmax[®] devidamente esterilizado em autoclave, com irrigações diárias de forma manual. Aos 25 dias de pré-aclimatização foi verificado número de folhas, comprimento das mudas e número de novas brotações e taxa de sobrevivência.

2.4 Análise estatística

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento *in vitro* de bambu (fase 0)

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

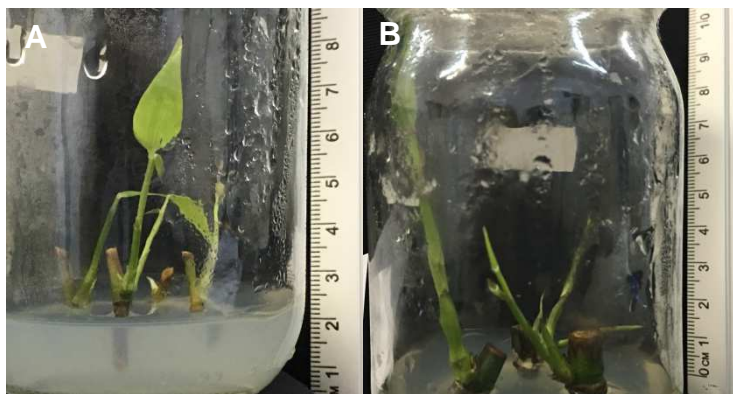


Figura 2 - Brotação axilar de bambu (*Guadua latifolia*) após 15 dias de cultivo. Brotações em 2 mL L⁻¹ de PPM[®] (A). Brotações em 3 mL L⁻¹ de PPM[®] (B).

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

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

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

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

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

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

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

Fonte: Embrapa Acre. MS - matéria seca.

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

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

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

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

*Cloreto de Mercúrio, ** Hipoclorito de sódio *** Plant Preservative Mixture

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

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

O *plant preservative mixture* (PPM) é uma mistura de metilcloroisotiazolinona (2,0 a 2,6 g L⁻¹) e metilisotiazolinona (0,6 a 0,8 g L⁻¹) pertencentes ao grupo das isotiazolonas, que são usadas na prevenção e redução do crescimento de contaminantes orgânicos no meio de cultura de plantas micropropagadas atuando

como eletrófilos na reação da cisteína e glutatona (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2015, patente n. 5750402).

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

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

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

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); PPM®. Plant preservative mixture

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

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

Para a propagação *in vitro* do gênero *Guadua* o aparecimento de contaminações de origem endógena tem sido um dos principais problemas no processo de estabelecimento, pois o sucesso de uma micropropagação de qualidade

está em conseguir eliminar esses microrganismos por meio do desenvolvimento de um protocolo de desinfestação eficiente (NADHA, et al., 2012).

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

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

A taxa de sobrevivência das brotações *in vitro* foi de aproximadamente 93% e 78% para as duas concentrações de PPM[®] testadas de 2 e 3 mL L⁻¹, respectivamente. Os tratamentos avaliados foram estatisticamente significativos e o tratamento controle apresentou somente 40% de sobrevivência (Tabela 3). Altas concentrações de PPM[®] podem ser nocivas ao desenvolvimento dos explantes *in vitro* (dados não publicados).

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

3.2 Multiplicação *in vitro* de bambu (fase 1)

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

Durante a fase de multiplicação não foi observado a presença de calos nos explantes, tampouco o surgimento de raízes espontâneas, como relatado por Jiménez

et al. (2006), em seus estudos com *Guadua angustifolia*. Além disso, a variável número de folhas não apresentou significância estatística.

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

Tabela 1 - Multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de bambu (*Guadua latifolia*) em meio de cultura MS líquido em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP)

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

* valores foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$ ** médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

A ausência do regulador de crescimento BAP no tratamento controle afetou significativamente a variável número de brotos que apresentou a menor quantidade de brotações regeneradas nos dois subcultivos analisados.

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

Ao analisar a variável altura de brotos (Tabela 4) verificou-se que houve diferença estatística entre as concentrações testadas de BAP no subcultivo 1. As maiores médias foram observadas para nos tratamentos que possuíam 2 e 6 mg L⁻¹ do regulador testado (Figura 3 C). Ademais, para o subcultivo 2 não houve diferença estatística para o tamanho das brotações desenvolvidas *in vitro*. Contudo, esta

característica, apesar de importante, não é determinante na multiplicação, pois caso seja necessário, o alongamento das brotações é realizado na fase de enraizamento.

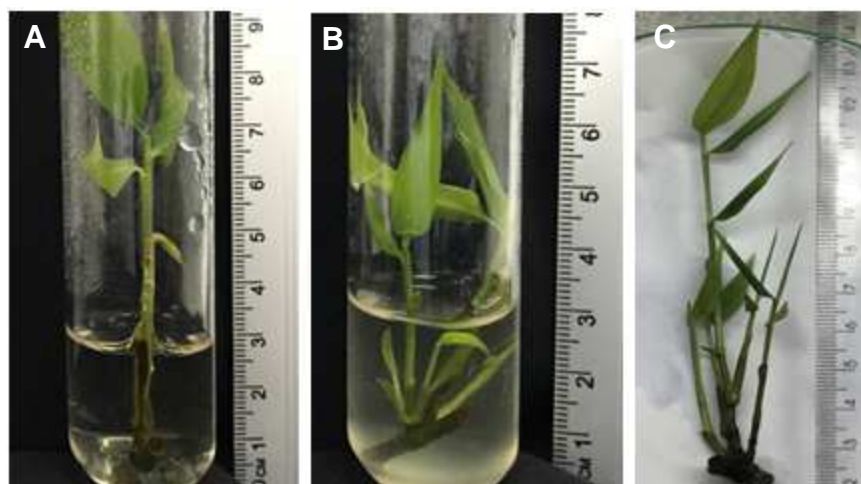


Figura 3 - Brotos regenerados de bambu (*Guadua latifolia*) após o subcultivo 1. Ausência de brotações em 0 mg L⁻¹ de BAP (A). Brotações adventícias em 4 mg L⁻¹ de BAP (B). Altura de brotos em 6 mg L⁻¹ de BAP (C).

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

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

Tabela 2 - Estimativa da produção de brotos *in vitro* de bambu (*Guadua latifolia*) em seis subcultivos durante 180 dias em meio de cultura MS líquido em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP)

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

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

3.3 Enraizamento e pré-aclimatização de bambu (fase 2 e 3)

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

As brotações obtidas na fase de multiplicação foram submetidas à rizogênese na presença dos reguladores de crescimento AIA, AIB e ANA. Somente os tratamentos com presença de AIA apresentaram formação de raízes. Na concentração de 0,5 mg L⁻¹ foi verificada, estatisticamente, a maior porcentagem de raízes formadas (Tabela 6). Os demais reguladores testados AIB e ANA não responderam satisfatoriamente e as plântulas permanecendo quiescentes até a finalização do experimento.

Tabela 3 - Enraizamento *in vitro* de plântulas de bambu (*Guadua latifolia*) em meio de cultura MS líquido contendo diferentes concentrações de ácido indolacético (AIA)

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

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

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

Necessita-se de estudos complementares com foco na utilização de AIA para verificação de diferença quanto ao desempenho deste regulador nos demais parâmetros de enraizamento *in vitro*. A resposta apresentada com o uso deste regulador foi não convencional se comparado aos demais indutores de rizogênese empregados em cultura de tecidos. Contudo, sua utilização foi decisiva na formação das raízes *in vitro* e possibilitou a formação de raízes e o sucesso na fase de pré-aclimatização (Figura 4).

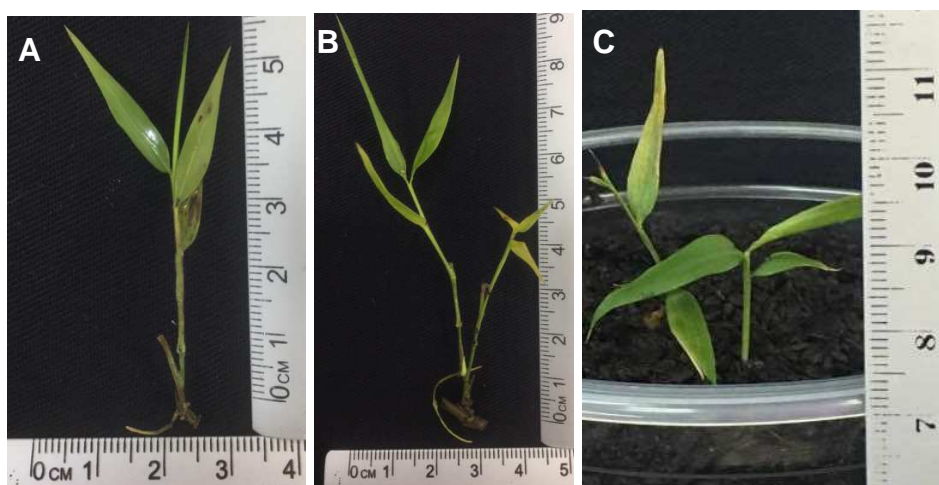


Figura 4 - Plântulas de bambu (*Guadua latifolia*) enraizadas *in vitro* após 30 dias de cultivo. Rizogênese em $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA (A). Rizogênese em 2 mg L^{-1} de AIA (B). Pré-aclimatização em sala de crescimento (C).

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

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

O ácido idolbutírico (AIB) e naftalenoacético (ANA) parecem não influenciar a formação de raízes nas concentrações utilizadas para esta espécie de bambu, apesar

do AIB ser uma das auxinas mais utilizados em cultura de tecidos e ser conhecido por promover enraizamento tanto *in vitro* quanto *ex vitro*.

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

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

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

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

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

Uma das fases mais críticas na micropropagação é a transição de um meio heterotrófico *in vitro* para o autotrófico *ex vitro*, podendo se ter grandes perdas de indivíduos. Por essa razão, é realizada a aclimatização onde as plântulas são expostas gradativamente as condições externas, onde são controladas a luminosidade e a umidade relativa (BATAGIN et al., 2009). As plantas que crescem *in vitro* possuem folhas delgadas, tenras, fina camada de cera epicuticular, fotossinteticamente pouco funcionais, com baixa densidade estomática (AFREEN, 2004) que a tornam mal adaptadas às condições *ex vitro* (SUTTER, 1992), o que causa perda de água e estresse hídrico nas primeiras horas de aclimatização (BELLINTANI et al., 2007).

A aclimatização de *Bambusa balcooa* foi relatada com sucesso por Gantait et al. (2016), além da verificação do desempenho e o crescimento em campo desta espécie produzida *in vitro* comparada com plantas produzidas *in vivo*

(macropropagação). Além da propagação *in vitro* estudos que avaliam fidelidade genética na verificação anomalias mutagênicas a nível de DNA ou variação somaclonal são descritos para os bambus *Dendrocalamus strictus* e *D. asper* como forma de verificar e comprovar a efetividade da micropropagação (GOYAL et al., 2015; SINGH et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

- O uso de 2 mL L⁻¹ de PPM[®] na fase de estabelecimento *in vitro* de *Guadua latifolia* reduz a contaminação bacteriana e fúngica.
- A utilização de 2 mg L⁻¹ do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) promove o aumento no número de brotos regenerados e taxa de multiplicação de 3,35 brotos por explante.
- Cada subcultivo deve ter duração de 20 dias e a troca de meio de cultura deve ser realizada neste período para evitar o aparecimento de folhas amarelas.
- A concentração de 0,5 mg L⁻¹ do ácido indolacético (AIA) na fase de enraizamento favorece o desenvolvimento de raízes adventícias.
- Recomenda-se 25 dias de pré-aclimatização em sala de crescimento antes da retirada das mudas ao viveiro ou casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants. In: KOZAI, T. et al. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2004. p. 59-87
- ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C. I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals... of Botany**, Oxford, n. 97, p. 883-893, 2006.
- ANSELMO FILHO, P.; BADR, O. Biomass resources for energy in North-Eastern Brazil. **Applied Energy**, v. 77, p. 51-67. 2004.
- ARAUJO, C. H. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de duas espécies de bambu: *Dendrocalamus asper* (Schultes f.) Backer ex Heyne e *Bambusa oldhamii* Munro. Enciclopédia **Biosfera - Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.11 n. 22; p. 1117-1182, 2015.
- BANDEIRA, J. M.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A. R.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007.
- BARBOSA, A. C., DINIZ H. N. Controle de processo erosivo provocado por rompimento de adutora na Serra da Mantiqueira, SP, Brasil, **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 4, p. 691-702, 2010.
- BATAGIN, K. D.; ALMEIDA, C. V.; TANAKA, F. A. O.; ALMEIDA, M. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiro cv. IAC Gomo de Mel micropropagados e aclimatizados em diferentes condições luminosas. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, p. 85-92, 2009.
- BELLINTANI, M. C. et al. Efeito da ventilação *in vitro* na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1098-1100, 2007.
- CARVALHO, A. L.; NELSON, B. W.; BIANCHINI, M. C.; PLAGNOL, D.; KUPLICH, T. M.; DALY, D. C. Bamboo-dominated forests of the Southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves". **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.
- CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos – cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia**. Bogotá, Colombia. 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GUTIÉRREZ, L. G. et al. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA. **African Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 28, p.1503-1510, jul. 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NADHA, H.; SALWAN, R.; KASANA, R.; ANAND, M.; SOOD, A. Identification and elimination of bacterial contamination during in vitro propagation of *Guadua angustifolia* Kunth . **Pharmacognosy magazine**, v. 8, n. 30, p. 93-97. 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2 - CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE BAMBUS *Guadua* cf. *angustifolia*

Leão, J. R. A; Souza, F. de F. Raposo, A. Sampaio, P. de T. B.

RESUMO: O bambu é um produto florestal não madeireiro e ao mesmo tempo uma matéria-prima não-convencional bastante utilizada como complementar ao uso da madeira em várias de suas aplicações. Os bambus nativos destacam-se devido as suas qualidades, versatilidade de usos e também são conhecidos como madeira do futuro ou madeira ecológica. Ele pode ser a solução para muitos segmentos da economia brasileira, com enorme potencial de utilização na arquitetura, indústria de pisos, construção civil e rural. Esta pesquisa teve como objetivo estudar o comportamento do bambu quando submetido às condições de cultivo *in vitro* de forma a gerar subsídios para se ter uma tecnologia que possibilite a produção de mudas em larga escala com a obtenção de organogênese indireta (calos). Foram realizados vários experimentos utilizando como fonte de explantes discos foliares e segmentos nodais. Foram testados vários reguladores de crescimento (ANA, BAP, CIN, TDZ, 2,4-D e Picloram) com diversas substâncias inseridas no meio de cultura como o PPM[®], na presença e ausência de luz com o propósito de se obter a formação de calos. Foram utilizados os fungicidas Amistar[®], Opera[®] e Nativa[®] no controle de contaminantes *in vitro* na presença e ausência de luz. Como resultado verificou-se que a utilização de solução de hipoclorito de sódio a 1,5% não é aconselhada para tratamentos de assepsia em estudos de propagação *in vitro* em folhas de bambu, por promover oxidação e como consequência a despigmentação do tecido foliar; o não aparecimento de calos neste trabalho pode estar relacionado ao fato de não se obter completa assepsia no estabelecimento *in vitro*; a combinação da CIN (cinetina) e ANA (ácido naftalenoacético) se mostrou mais eficaz para o desenvolvimento de brotações do que calos; ocorreu contaminação endógena por fungos do gênero *Fusarium* sp. em segmentos nodais. O fungicida Opera[®] apresentou melhor desempenho no controle de contaminantes comparado com os demais que foram utilizados. Apesar do objetivo inicial de promover a calogênese não ter sido alcançado houve aumento no conhecimento científico com os estudos de propagação *in vitro* do bambu do gênero *Guadua angustifolia*.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Regulador de crescimento. Calos. Fungicidas.

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

Outro importante passo foi a assinatura do memorando de entendimento sobre cooperação bilateral em ciência e tecnologia na área de desenvolvimento e inovação em Bambu, entre o Brasil e a República Popular da China. Desta forma, se considera que o momento é propício para todos da área da pesquisa contribuírem na geração de tecnologias para viabilizar o bambu como alternativa de desenvolvimento sustentável (GENEROSO, 2014).

Vários fatores justificam investimentos na cultura do bambu. A construção civil, um dos setores que mais gera empregos, consome uma enorme quantidade de

madeira, hoje um produto caro e escasso. Não se trata de substituir a madeira em todas as suas aplicações pelo bambu, mas de promover o uso conjunto, uma vez que na arquitetura e construção civil o bambu e a madeira se complementam muito bem. Outras demandas como o déficit habitacional, a geração de energia a partir da biomassa do bambu e o artesanato, mostram que o momento é propício para a difusão do uso do bambu (SAFE, 2004.)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, localizado na Br 364 Km 14 em Rio Branco Acre, nos anos de 2015 a 2016. Para o estabelecimento do cultivo *in vitro* foram utilizados como fonte de explantes discos foliares e segmentos nodais de plantas de bambu (*Guadua* cf. *angustifolia*) oriundas de plântulas coletadas nas coordenadas S 08°54'15,0" W 68°40'33,6" (margens do Rio Purus, entre os municípios de Sena Madureira-AC e Boca do Acre-AM). Estas foram colocadas em vasos contendo uma mistura de terra, substrato comercial e esterco (1:1:1) e mantidas em casa de vegetação a uma temperatura 30 °C e com 88% umidade relativa, recebendo pulverizações semanais com fungicida sistêmico Amistar® (0,42 g L⁻¹). As coletas dos segmentos nodais e das seções foliares foram realizadas 48 horas após a pulverização com o fungicida.

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

2.1 Experimento I - Tidiazuron (TDZ) e ácido naftalenoacético (ANA) na indução de calogênese

Folhas jovens coletas na casa de vegetação e conduzidas ao laboratório foram lavadas em água corrente e detergente neutro durante 5 minutos, então lavado por 3 vezes em água destilada e autoclavada. Foram cortados discos foliares com aproximadamente 1,0 cm² e estes colocados em solução de ácido ascórbico (0,5 mg L⁻¹) por 15 minutos.

Os explantes foram conduzidos à câmara de fluxo laminar onde foram imersos em solução de álcool 70% por 1 minuto seguido de solução de hipoclorito de sódio (contendo 1,5 % cloro ativo) por 10 minutos com cinco gotas de detergente neutro. Após foi realizada tríplice lavagem com água destilada e autoclavada os discos foliares foram inoculados com a face abaxial (parte de baixo) em contato com o meio,

em frascos contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 mg L^{-1}) e solidificado com ágar (6 mg L^{-1}) e diferentes concentrações do regulador de crescimento TDZ (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2) combinado com 1 mg L^{-1} ANA (ácido naftalenoacético) e na sua ausência.

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

2.2 Experimento II - BAP (6-Benzilaminapurina) e ANA (ácido naftalenoacético) na indução de calogênese

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

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

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento, sendo cada repetição um tubo de ensaio com um explante. O experimento foi avaliado após 30 dias da inoculação. Na ocasião foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de calos, formação de gemas adventícias, contaminação (fúngica e bacteriana), oxidação e necrose.

2.3 Experimento III - Picloram, KIN, 2.4-D e ANA na indução de calogênese em seguimentos nodais

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

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

O meio MS utilizado foi suplementado com sacarose (30 mg L^{-1}), PPM® (2 mL L^{-1}) e solidificado com ágar (6 mg L^{-1}) e diferentes concentrações do regulador de crescimento PICLORAM, Cinetina e 2.4-D (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2) combinado com 1 mg L^{-1} ANA (Ácido naftalenoacético) e na sua ausência.

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

2.4 Experimento IV – Uso de fungicidas na desinfestação *in vitro* de bambu

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

Em seguida o material foi conduzido à câmara de fluxo laminar, onde foi realizado a pré-desinfestação em solução Amistar® ($0,34 \text{ g.L}^{-1}$) com de cloreto de benzalcônio ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) por 5 minutos, então foram lavados em água autoclavada e

destilada e imersos em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto. Após este procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio contendo 2,5% de cloro ativo, com detergente neutro por 10 minutos seguidos por uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

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

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

2.5 Análise estatística

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

Inferese-se que a oxidação ocorreu devido ao uso de hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% de cloro ativo, este pode ter sido agressivo às folhas em estágio juvenil (Figura 1). Pereira et al., (2011) relataram que o hipoclorito de sódio com concentração acima de 1,5% de cloro ativo é danoso aos explantes *in vitro* de bananeira (*Musa* sp.) impossibilitando a continuidade do processo de micropropagação. O hipoclorito de sódio é um produto oxidante, ou seja, promove a perda de elétrons, sendo conhecido pela função esterilizante que exerce, pois ele atua na oxidação de moléculas orgânicas, como carboidratos, proteínas e lipídeos, o clareamento dos tecidos ocorre devido a esta oxidação. No caso da desinfecção, os oxidantes atacam a membrana celular de microrganismos, levando-os à morte (ESTRELA et al., 2002).



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

Apesar disso, esta substância tem sido usada com êxito em inúmeros protocolos de esterilização (PEREIRA et. al., 2009), sendo seu emprego viável no controle da contaminação por micro-organismos, além de ser um produto de fácil aquisição e baixo preço. As contaminações foram observadas nos dois experimentos, sendo sobretudo de origem bacteriana.

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

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

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

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

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

Após se constatar a impossibilidade de se trabalhar com explantes foliares optou-se pela utilização de segmentos nodais. Foram realizados vários experimentos utilizando diversos reguladores de crescimento para a obtenção de massa calogênica.

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

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

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

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

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

Machado et al. (2010), ao estudarem a formação de calos de *Jatropha Curcas* verificaram o aparecimento de calos em diversas combinações destes dois reguladores, por exemplo, 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 0 mg L⁻¹ de BAP; 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 1 mg L⁻¹ de BAP; e 2 mg L⁻¹ de ANA e 1 mg L⁻¹ de BAP.

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

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

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

Os efeitos esperados na indução da calogênese não foram alcançados no experimento onde foi utilizado o regulador de crescimento Picloram devido ao alto índice de contaminação por fungos. Resultado idêntico foi obtido no experimento cujo regulador adicionado foi o 2,4-D, também foi observado uma baixa ocorrência de brotação inviabilizada pela alta contaminação fúngica e bacteriana (Tabela 3). Em todos os tratamentos com Cinetina ocorreu contaminação por fungos, porém comparando-se com os experimentos anteriores, este apresentou incremento no número de brotações. Em relação aos três reguladores de crescimento utilizados a Cinetina promoveu o melhor desempenho no desenvolvimento dos brotos (Tabela 3, Figura 2).

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

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

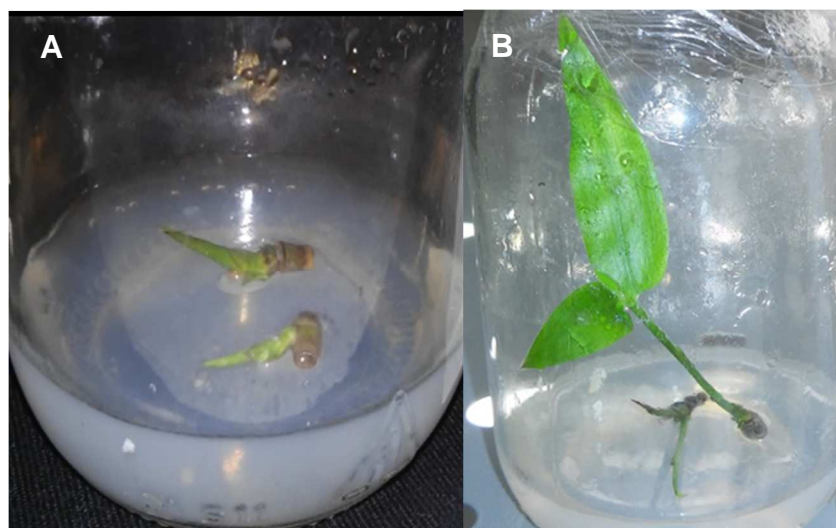


Figura 2 - Segmentos nodais inoculados em meio de cultura MS suplementado com 1 mg L^{-1} de Cinetina e 1 mg L^{-1} de ANA. A) brotação após 30 dias. B) brotação desenvolvida após 40 dias de inoculação.

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

Diante dos resultados obtidos e devido a expressiva contaminação em todos os experimentos, recipientes contaminados foram encaminhados ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Acre para identificação do fungo. A nível de gênero o micro-organismo endógeno foi identificado como *Fusarium* sp. (Figura 3).



Figuras 3 - Aspecto morfológico do fungo do gênero *Fusarium* (bar=10 μ m) encontrado nos segmentos nodais de Bambu (*Guadua* cf. *angustifolia*) inoculado em meio de cultura. Observe o conídio fusiforme em formato de meia lua, cor clara com septos no sentido transversal (seta).

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

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

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

Nos dois experimentos com ausência e presença de luz foi observado índices elevados de contaminação por bactérias, mesmo com a utilização do biocida PPM[®], uma provável explicação para este alto índice é que em experimentos com altas

contaminações fúngicas podem favorecer o ambiente ao ataque bacteriano, pois nesta fase os explantes já estão debilitados (Tabela 4).

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

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

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

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

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

Silva Neto e Costa (2010) ao pesquisar o estabelecimento *in vitro* de segmentos terminais de pequiutilizaram PPM[®] e alguns fungicidas adicionados ao meio de cultura, estes autores verificaram que 1 ppm de Derosal e 1 mL L⁻¹ de PPM[®] controlaram as contaminações por fungos e bactérias. Porém, após trinta dias em

cultivo *in vitro*, verificou-se que não ocorreram brotações nos explantes. Dados que corroboram com o presente estudo que apesar da utilização dos fungicidas diminuam as contaminações por fungos, quando comparado com os experimentos anteriores, não se obteve brotações nos segmentos nodais após 30 dias de inoculação.

Em bambus fatores como temperatura, precipitação e umidade relativa influenciam na emergência e transmissão do fungo e que a maior taxa de parasitismo ocorre em condições úmidas e frescas (LIU, 2009).

Este fato pode explicar os altos índices de contaminações fúngicas encontradas neste trabalho, já que a região amazônica possui estas características. Vários autores relatam que a estação chuvosa aumenta os percentuais de contaminações fúngicas em diversos tipos de bambus (ANAND et al., 2013; PRATIBBA, SARMA, 2013).

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

4 CONCLUSÃO

- A utilização de solução de hipoclorito de sódio a 1,5% não é aconselhada para tratamentos de assepsia em estudos de propagação *in vitro* em folhas de bambu, por promoverem oxidação das mesmas.
- O não aparecimento de calos neste trabalho pode estar relacionado ao fato de não se obter completa assepsia no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais do bambu.
- A combinação da Cinetina (Kin) e ANA (ácido naftalenoacético) se mostrou mais eficaz para o desenvolvimento de brotações do que calos.
- Ocorreu contaminação endógena por fungos do gênero *Fusarium* sp. em segmentos nodais de bambu estabelecidos *in vitro*.
- A adição de fungicidas no meio de cultura reduz as contaminações, destacando-se o fungicida Opera[®] na ausência de luz.

REFERÊNCIAS

- ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In vitro* propagation of edible bamboo *Bambusa* bamboos and Assessment of Clonal Fidelity through Molecular Markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, Rowland Heights, v. 2, n. 4, 257-261, 2013.
- BRASIL, Lei n. 12.484 de 08 de setembro de 2011. Dispõe sobre a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 09 set. 2011
- BURGESS, L. W., SUMMERELL B.A., BULLACK, GOTT K. P., BACKHOUSE, D., **Laboratory Manual For Fusarium Research**, Sydney University of Sydney, 1994.
- CHAOWANA, P. Bamboo: an alternative raw material for wood and wood-based composites. **Journal of Materials Science Research**; v. 2, p. 90-102, 2013.
- CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos – cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia**. Bogotá, Colombia. 2004
- DAQUINTA, M.; GREGORI, A.; Cid, M.; LEZCANO, Y.; SAGARRA, F. Formación de callos e inducción de brotes a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua angustifolia* Kunth. **Biotecnol. Veg.** v. 7, p. 119-122, 2007.
- ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANO, J. C. E.; MACHESAN, M. A.; PÉCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent**; v.13, n. 2, p.113-117, 2002.
- GENEROSO, A. L. **Caracterização morfológica e cultivo in vitro de espécies de bambu**, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Dissertação Mestrado. 57p. 2014.
- GEORGE E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture, v. 1, The Background, 3rd Edition. Dordrecht: Springer. 2008.
- GOYAL, A. K.; SEN, A. *In vitro* regeneration of bamboos, the “Green Gold”: An overview. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 1, p. 9-16, 2016.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, p.183-260, 1998.
- HU, S. L.; ZHOU, J. Y.; CAO, Y.; LU, X. Q.; DUAN, N.; REN, P.; CHEN, K. *In vitro* callus induction and plant regeneration from mature seed embryo and young shoots in a giant sympodial bamboo, *Dendrocalamus farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et HL Fung. **Afr J Biotechnol.** v. 10, n. 16, p. 3210-3215, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 3 - BIOMETRIA E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Guadua latifolia*

LEÃO, J.R.A; SOUZA, E. de A.; RAPOSO, A.; SAMPAIO, P. de T. B.

Resumo: O bambu é conhecido como uma planta de múltiplos usos. Vários estudos descrevem sua utilização na construção civil, arquitetura, energia, biomassa, artesanato, papel e celulose, porém estudos de biometria e germinação *in vitro* para as espécies endêmicas da Amazônia são inexistentes. O objetivo deste estudo foi caracterizar as sementes de bambu biometricamente e promover sua germinação *in vitro* desta espécie. O experimento foi executado no laboratório de morfogênese e biologia molecular da Embrapa Acre. Foram utilizadas sementes coletadas na Reserva Extrativista Chico Mendes no município de Assis Brasil, Acre. Foram selecionadas 100 cariopses que apresentavam características morfológicas conservadas para a avaliação biométrica. As seguintes variáveis foram analisadas, comprimento (mm), largura (mm) e peso de 100 sementes. Foi utilizado um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm para medir o comprimento e a largura. Já a massa foi aferida em balança analítica com precisão de 0,001 g. Na germinação *in vitro* foi testado a influência de diferentes concentrações do ácido giberélico e a influência do meio de cultura MS e WPM. As variáveis analisadas foram porcentagem de germinação, quiescência, contaminação fúngica e bacteriana. Com os dados de biometria foi realizado estatística descritiva com cálculo de média, valor máximo e mínimo, coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis comprimento, largura e peso de sementes e também correlação de Pearson. Já os dados da germinação foram submetidos à Anova. Os resultados biométricos foram 5,53 e 16,15 mm para o comprimento mínimo e máximo e 1,10 e 2,16 mm para largura mínima e máxima; média de 9,81 e 1,46 mm, respectivamente para comprimento e largura. O desvio padrão foi de 3,79 e 0,20 mm e o coeficiente de variação foi de 2,59 e 7,16 mm para variável comprimento e largura. O peso médio total apresentado pelas sementes foi de 0,11 g. A correlação indicou que as variáveis mensuradas comprimento e largura se correlacionam negativamente. Não houve resultados significativos para a germinação *in vitro*. Portanto, estudos adicionais são necessários para o entender o comportamento *in vitro* e a fisiologia de sementes de *Guadua latifolia*.

Palavras-chave: Mensuração. Cariopse. Meio de cultura. Ácido giberélico.

1 INTRODUÇÃO

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

As espécies do gênero *Guadua* dominam uma área de 161.500 km² no Sudoeste da Amazônia e o ciclo de vida destas espécies é estimado entre 27-28 anos (CARVALHO et al., 2013). São bambus entouceirantes e possuem alta produtividade, apresentam colmos maduros aos 3 anos, e após a brotação destes na touceira, se forem retirados de maneira adequada, sua produção aumenta nos anos subsequentes (PEREIRA e BERALDO, 2007).

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

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

O uso de sementes para a sua propagação não é um método fácil e prático devido à esporadicidade de floração de muitos bambus, além da baixa viabilidade e vigor, ao difícil armazenamento, à alta taxa de contaminantes microbianos e, principalmente, pelo fato das espécies de grande porte florescerem em intervalos muito longos, além da poliploidia de muitas espécies (SAFE, 2004; SINGH et al., 2013).

Segundo Richa e Nerru (2006), a baixa viabilidade das sementes de bambus armazenadas é ocasionada pelos baixos níveis de auxinas e ácido abscísico endógenos. De acordo com Surendran et al. (2003), as sementes de bambu

apresentam viabilidade baixa, germinam entre 3 a 7 dias, perdem a viabilidade após 1 a 2 meses e seu potencial de germinação é dependente da sazonalidade e ocorre em agrupamentos. A dificuldade em se ter sementes viáveis destas espécies devido ao efeito cumulativo de fatores biológicos e fisiológicos tem feito a propagação vegetativa ser a mais indicada para a reprodução destas espécies.

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

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

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

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

As características biométricas podem ser utilizadas como parâmetro para melhor uniformizar a emergência das plântulas e para a obtenção de mudas de tamanho semelhante ou de maior vigor (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Sendo também utilizada para diferenciar espécies pioneiras e não pioneiras em florestas tropicais (BASKIN e BASKIN, 1998), sendo um instrumento usado para examinar a

variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie e suas relações com os fatores ambientais (MACEDO et al., 2009).

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de coleta

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

2.2 Biometria de sementes de bambu

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

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

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

2. 3 Germinação *in vitro* de sementes de bambu

O estabelecimento da germinação *in vitro* de bambu foi realizado com as sementes obtidas na fase anterior. O meio de cultura utilizado foi distribuído em tubos de ensaio que foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavadas por 18 minutos a $1,1 \text{ Kg/cm}^2$ em temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$. O pH foi ajustado em 5,8 antes da autolavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, disposto de lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($30 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$), expostas ao fotoperíodo de 16 horas de luz.

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

2.3.1 Experimento 1 - Germinação *in vitro* de sementes de bambu em função do AG_3

As sementes com tegumento retirado foram colocadas em filtros de 100% poliéster medindo (5x5 cm) e então mergulhadas em água com cinco gotas de detergente neutro onde permaneceram por 24 horas. Após este período foram dispostas em soluções de 0, 100, 250 e 500 mg L^{-1} de ácido giberélico (AG_3) e água por 48 horas, após este tempo foram lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada.

Em seguida foram levadas para câmara de fluxo laminar e mergulhadas por 10 minutos em solução de Amistar[®] ($0,34 \text{ g L}^{-1}$) e cloreto de benzalcônio ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), após foram imersas em álcool etílico a 70% (v/v), por um minuto e então desinfestadas por 10 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo).

Após este procedimento as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio preenchidos com 10 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}) e solidificado com ágar (6 g.L^{-1}).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 24 repetições por cada tratamento. A avaliação foi realizada pela

verificação de porcentagem de germinação de sementes, quiescência, contaminação bacteriana e fúngica após 30 dias de inoculação.

2.3.2 Experimento 2 - Germinação *in vitro* de sementes de bambu em diferentes meios de cultura

As sementes com tegumento retirado foram colocadas em filtros 100% poliéster medindo (5x5 cm) e então foram mergulhadas em água contendo cinco gotas de detergente neutro onde permaneceram por 24 horas. Após este tempo foram colocadas em solução 250 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) por 48 horas, após este período foram lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada.

Em seguida foram levadas para câmara de fluxo laminar e lavadas por 10 minutos em solução de Amistar® (0,34 g L⁻¹) e cloreto de benzalcônio (0,5 g L⁻¹), após foram imersas em álcool etílico a 70% (v/v), por um minuto e então desinfestadas por 10 minutos em hipoclorito de sódio (2,5%).

Após este procedimento as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio preenchidos com 10 mL de meio de cultura MS e WPM (Wood Plant Medium), elaborado por LLOYD e MCCOWN, (1980), suplementados com sacarose (30 g L⁻¹) e solidificado com ágar (6 g L⁻¹) e com diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃) (0, 0,5; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹).

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Biometria de sementes de bambu

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

foi de 38,65 e 13,97 mm para variável comprimento e largura, respectivamente. O peso médio total apresentado pelas sementes foi de 0,11 g (Tabela 1).

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

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

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

No presente estudo observou-se que as sementes de bambu apresentaram maior variabilidade no comprimento em comparação com a variável largura e as duas correlacionam-se negativamente, ou seja, quando há o aumento no comprimento das sementes conseqüentemente existe a diminuição da largura. Para a variável peso não houve correlação com as demais variáveis (Tabela 2).

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

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

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,1 \leq p < 0,05$); ns - não significativo.

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

percentuais de germinação e vigor em relação às sementes mais pesadas e de tamanho superior.

3.2 Germinação *in vitro* de sementes de bambu

Os resultados do primeiro experimento de germinação *in vitro* podem ser observados na Tabela 3. A imersão das sementes por 48 horas em solução contendo ácido giberélico (AG3) em diferentes concentrações não foi eficiente para promover a germinação das sementes de bambu, verificou-se que em todos os tratamentos, incluindo no controle, ocorreu início da germinação, mas estas após a emissão da radícula estagnaram e não se desenvolveram (Figura 1). Ainda foi observado que em média 75% das sementes de todos os tratamentos permaneceram vivas, contudo não germinaram.

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

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

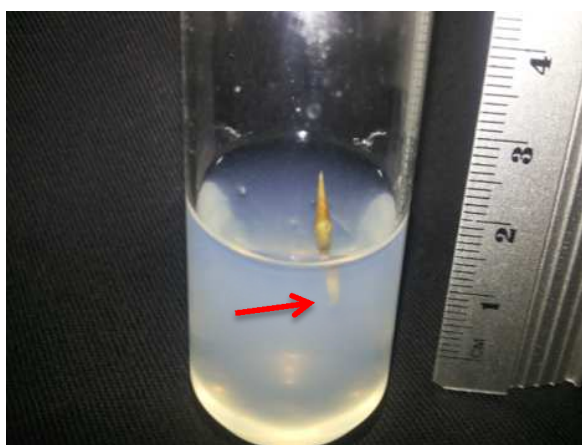


Figura 1 - Germinação *in vitro* de semente de bambu (*Guadua latifolia*) inoculada em meio de cultura MS. Note a emissão da radícula (seta).

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

Infere-se que a baixa porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de bambu do gênero *Guadua* ocorreu devido ao tempo prolongado entre a coleta e a instalação dos experimentos. Naturalmente nos bambuzais que estão frutificando as sementes germinam rapidamente logo após a dispersão formando um extenso banco de plântulas.

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

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

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

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

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

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

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

4 CONCLUSÃO

- As sementes estudadas apresentaram variações no comprimento podendo indicar a existência de variabilidade genética dentro da espécie.
- As variáveis comprimento e largura possuem baixa correlação.

- A imersão das sementes por 48 horas em solução de ácido giberélico (AG3) não foi eficiente para promover a germinação das sementes de bambu de forma satisfatória.
- O meio MS apresentou menores taxas de contaminação que o WPM em todos os tratamentos, inclusive no controle, porém não houve germinação de sementes.

REFERÊNCIAS

- BRAR, J.; ANAND, M.; SOOD, A. *In vitro* seed germination of economically important edible Bamboo *Dendrocalamus membranaceus* Munro. **J. Indian J Exp Biol**, v. 51, n. 1, p. 88-96, 2013.
- BASKIN, C. S.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. London: Academic Press, 1998.
- BEZERRA, A. M. E.; MOMENTÉ, V. G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.295-299, 2004.
- CALDERÓN, C. E.; SODERSTRORN, T. R. **The genera of Bambusoideae (Poaceae) of the American continent: Keys and comments**. Smithsonian Institution Press: Washington, 1980.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- CARVALHO, A. L.; NELSON, B. W.; BIANCHINI, M. C; PLAGNOL, D.; KUPLICH, T. M.; DALY, D. C. Bamboo-dominated forests of the Southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves". **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.
- CASTAÑO, F.; MORENO, R. D. **Guadua para todos - cultivo y aprovechamiento. Proyecto manejo sostenible de bosques de Colombia**. Bogotá, Colombia. 2004.
- CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Will. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.
- DALY, D. C.; SILVEIRA, M. Primeiro catálogo da flora do Acre, Brasil/First Catalogue of the flora of Acre, Brasil. Rio Branco: Ediufac, v. 1000. 2008, 555 p.
- DEVI, W. S.; BENGHELLA, L.; SHARMA, G. J. *In vitro* seed germination and micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro using seeds. **Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 74-80, 2012.
- DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil: da biologia à biotecnologia**. Rio de Janeiro: ICH, 2017. 655 p.
- JUDZIEWICZ, E. J; CLARK, L.G; LONDOÑO, X; STER, M.J. **American Bamboo**. Smithsonian Institution Press. Washington and London, p. 392-247, 1999.
- LIESE, W. Anatomy and properties of bamboo. In: **Proc. Int. Bamboo Workshop, Hangzhou, China**. 1985.

- MACEDO, M. C. de.; SCALON, S. de P. Q.; SARI, A. P.; SCALON FILHO, H.; ROSA, Y.B. C. J.; ROBAINA, A. D. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Magonia pubescens* St.Hil (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 202-211, 2009.
- MIRANDA, A. F. A. de. Estudo anatômico do entrenó de *Guadua* Kunth (Poaceae: bambusoideae) ocorrentes no estado do Acre-Brasil. 2016. 82 f. **Dissertação** (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, SP: Canal 6 Editora, 240 p. 2010.
- OLIVIER. J.; PONCY, O. A taxonomical revision of *Guadua weberbaueri* Pilg. and *Guadua sarcocarpa* Londoño & P. M. Peterson (Poaceae). **Candollea**, v. 64, n. 2, p. 171-178, 2009.
- OSTAPIV, F.; SALAMON, C.; GONÇALVES, M. T. T. Cursos tecnológicos de bambu *Guadua* no Acre - perspectivas sustentáveis e inovadoras. **ATHENA - Revista Científica de Educação**, v. 10, n. 10, 2008.
- RICHA, S. M. L.; NERRU, B. Endogenous levels of plant growth substances in seeds of five bamboo species in relation to seed viability, **Indian J Plant Physiol**, v. 11, n. 4, p. 358, 2006.
- SAFE, S. Bambus como recurso florestal: suas aplicações, manejo, silvicultura, propagação, entomologia e a situação no DF. **Monografia** (Engenheiro Florestal), Brasília – DF, *Universidade de Brasília*, p. 50, 2004.
- SILVA, S. C. Relação entre o tamanho das sementes de milho (*Zea mays* L.) com a germinação, o vigor e os componentes da produção de grãos. (Dissertação de Mestrado). Jaboticabal. Universidade do Estado de São Paulo. 2000.
- SINGH, S. R., SINGH, R., KALIA, S., DALAL, S., DHAWAN, A. K., KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo - a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology Plants**, v. 19, n. 1, p. 21–41 2013.
- SILVEIRA, M. A floresta aberta com bambu no sudoeste da Amazônia: padrões e processos em múltiplas escalas. Instituto de Ciências Biológicas, UNB. **Tese de doutorado**. 121 p. 2001.
- SURENDRAN, C.; PARAMATHMA, M.;BALAJI, B. **Tree improvement in bamboo. Recent advances in bamboo research**. edited by Shamungael P (Scientific Publishers India Jodhpur), 2003, p. 29.

ANEXO

ANEXO A – Legislação sobre manejo e cultivo do bambu

Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos

LEI Nº 12.484, DE 8 DE SETEMBRO DE 2011.

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

A PRESIDENTA DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

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

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

Art. 3º São diretrizes da PNMCB:

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

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

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

Art. 4º São instrumentos da PNMCB:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Brasília, 8 de setembro de 2011; 190º da Independência e 123º da República.

DILMA ROUSSEFF

Guido Mantega

Mendes Ribeiro Filho

Izabella Mônica Vieira Teixeira

Afonso Florence