EFEITO DA POSIÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS SOBRE A CONTAMINAÇÃO E BROTAÇÃO NA MICROPROPAGAÇÃO DO BAMBU

EFFECT OF NODAL SEGMENT POSITION IN CONTAMINATION AND SPROUTING IN BAMBOO MICROPROPAGATION

Gustavo Rubens de Castro Torres[(1)]
Priscila Vitória Santiago dos Santos[(2)]
Robson Antonio de Souza[(3)]
Patrícia Virgínia Padilha Dantas[(4)]

Resumo

A presente pesquisa objetivou identificar a influência da posição da gema no ramo primário sobre a contaminação e brotação de segmentos nodais utilizados na micropropagação *in vitro* de *Bambusa vulgaris.* O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos, correspondentes às posições de número um a número 10 ocupadas pelas gemas no ramo primário, com 10 repetições compostas por segmentos nodais de cada posição em meio específico nas fases de introdução e estabelecimento. O segmento nodal considerado como número um foi aquele cuja folha que recobria a gema tinha cor bege e que foi facilmente removida com os dedos. Quatro avaliações foram conduzidas no 4º, 7º, 14º e 21º dia após o lançamento do experimento. As gemas de número dois a seis foram consideradas as melhores fontes do ramo primário para obtenção de segmentos nodais em virtude do maior nível de brotação, maior número de brotos por gema e menor expressão de contaminação fúngica.
Palavras-chave: Microrganismos. Explante. *Bambusa vulgaris.*

Abstract

This research aimed to identify the influence of the bud position on primary branch on contamination and sprouting of nodal segments used in vitro micropropagation of Bambusa vulgaris. The experiment was carried out with ten treatments arranged in a completely

[1]Doutor Fitopatologia pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pesquisador Bolsista do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE. Endereço eletrônico: gustavo.torres@cetene.gov.br.
[2] Aluna do Ensino Médio da Escola de Referência em Ensino Médio Professor Arnaldo Carneiro Leão.
[3] Licenciado em Ciências Biológicas pela Fundação de Ensino Superior de Olinda – FUNESO. Programador de Produção do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE. Endereço eletrônico: robson.souza@cetene.gov.br.
[4]Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Endereço eletrônico: patrícia.dantas@cetene.gov.br.

randomized design corresponding to the positions of buds from number one to the number 10, from the top to the base on the primary branch with ten replications composed by ten nodal segments of each position in pots or test tubes with specific medium during the fazes of introduction and establishment. The nodal segment considered as number one was the segment which bud was covered by leaf with the color beige that it was easily removed by fingers. Four analyses were carried out at 4th, 7th, 14th and 21st days after the beginning of the experiment. The buds corresponding to the number two to the number six were considered the best source of primary branch to obtain nodal segments because the highest level of bud break, the highest number of shoots per bud and the lowest level of fungi contamination expressed.
Keywords: *Microorganism. Explant. Bambusa vulgaris.*

1 Introdução

O bambu é um membro da família Poaceae, subfamília Bambusoidae, que apresenta ciclo curto, boa comercialização dos colmos e tem múltiplos usos de alto valor econômico e ambiental, uma vez que a cultura é capaz de converter a radiação solar em biomassa útil e serviços em escala igual ou superior a diversas outras espécies arbóreas (LIN et al., 2012).

De acordo com Bareja (2010), o bambu pode ser multiplicado através de métodos sexuados e assexuados, entretanto Generoso (2014) afirma que um dos principais fatores limitantes ao cultivo é a falta de métodos adequados para a propagação vegetativa visando plantios industriais em grandes áreas. Neste sentido, as técnicas de propagação *in vitro* podem ser empregadas para a multiplicação de plantas de difícil propagação por outros métodos para a produção comercial de mudas e possuem assim potencial para atender à demanda de material vegetal de bambu.

As técnicas de micropropagação *in vitro* apesar de promissoras apresentam alguns aspectos considerados limitantes a exemplo da contaminação microbiana. Msogoya et al. (2012) afirmam que o meio de crescimento no qual tecidos vegetais são cultivados é excelente fonte de nutrientes para o crescimento microbiano, sendo que este compete com os tecidos vegetais em cultivo por nutrientes, podendo ainda produzirem fitotoxinas que resultam em mortalidade, necrose de tecidos e reduzida proliferação de brotos e raízes.

Protocolos para a multiplicação *in vitro* de espécies de bambu a partir de segmentos nodais têm sido publicados por diferentes autores (ANAND et al., 2013; DEVI; SHARMA, 2009; JHA; KUMAR, 2013; JIMÉNEZ, 2006; PANDEY; SINGH, 2012; PRATIBBA, SARMA; 2013; PRUTPONGSE; GAVINLERTVATANA, 1992; RAMANAYAKE, 2006; SHARMA; SARMA, 2011; SHROTI, 2012), mas em poucos casos (DEVI; SHARMA, 2009;

MUDOI et al., 2014) determina-se quais as gemas, em função da localização que ocupam no ramo, garantem maior índice de brotação e consequentemente quais seriam preferíveis utilizar na micropropagação *in vitro*, no entanto, em nenhum dos trabalhos citados se faz referência sobre o percentual de contaminação registrado em função da posição da gema, embora esta contaminação seja um fator limitante no processo de micropropagação.

Face ao exposto, o presente trabalho tem por objetivo determinar a influência da posição da gema no ramo primário sobre a contaminação e brotação de segmentos nodais utilizados na micropropagação *in vitro* de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl.

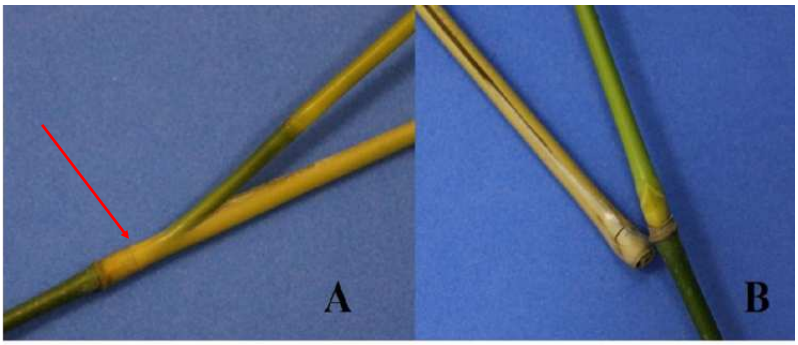
2 Material e Métodos

O trabalho consistiu de um experimento conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos, correspondentes à posição ocupada pela gema no ramo primário no sentido ápice - base, constituídos por 10 repetições equivalentes a 10 segmentos nodais, os quais foram mantidos em frascos e tubos contendo meios específicos durante as fases de introdução e estabelecimento respectivamente.

A coleta de ramos primários foi realizada no terço médio de colmos localizados em touceiras de *B. vulgaris* com mais de 40 anos de idade presentes na Oficina de Ricardo Brennand situada no bairro da Várzea, Recife-PE (Latitude = 8º3’14,62” Sul e Longitude – 34º58’27,56” Oeste). Os ramos foram selecionados de forma que tivessem comprimento mínimo de 1,5 metros, sem a existência de brotações secundárias e com pelo menos 10 gemas visíveis ao se remover com leve esforço dos dedos as folhas que recobriam os nós.

Os ramos foram conduzidos ao Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica - LAPAB do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE. Os entrenós tiveram as gemas enumeradas do ápice para a base de forma que o portador da gema número um fosse aquele em que a folha que recobria a gema, tivesse a coloração bege tom palha e que fosse facilmente removida com leve pressão dos dedos (Figura 1), sendo procedida a contagem em ordem crescente até a gema de número 10. Todas as outras gemas foram descartadas.

Figura 1 – Fotos evidenciando dois entrenós de ramo primário de *Bambusa vulgaris*. Em A entrenó descartado acima da gema considerada como número um por ter a folha que a recobre ainda verde e de difícil remoção (seta vermelha) e em B entrenó considerado como portador da gema número um com a folha que a recobre de cor bege tom palha e facilmente removida com os dedos.



Os ramos foram lavados em água de torneira com detergente neutro e mediu-se, com paquímetro, o diâmetro dos segmentos nodais em função da posição da gema a 1 cm abaixo da cicatriz foliar. Posteriormente seccionou-se os ramos em segmentos nodais com 2 cm de nó acima da gema e 2 cm abaixo da cicatriz foliar classificando-os de acordo com a posição ocupada pela gema no ramo e depositando-se 10 segmentos de mesma posição em garrafas de vidro identificadas quanto ao tratamento.

Os segmentos nodais, agora denominados explantes, foram imersos em 200 mL de solução de Derosal 500 SC® (Suspensão Concentrada de CARBENDAZIM 500 g L^{-1}, Bayer S/A) (4 mL L^{-1}), Cloranfenicol (200 mg L^{-1}) e uma gota de Tween 20, e mantidos sob agitação por 20 horas seguido de um enxágue em água destilada não estéril por 1 min e posterior imersão em 100 mL de solução de cloreto de benzalcônio (1% v:v) sob agitação durante 10 minutos. Posteriormente os explantes foram enxaguados com água destilada não estéril por 1 min e conduzidos à câmara de fluxo laminar para desinfestação em sequência com imersão em solução de álcool a 70% (v:v) por 3 mim, imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 min, um enxágue em água destilada estéril por 1 min, imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v:v) por 10 min seguida de três enxágues consecutivos em água destilada estéril por 1 min cada.

Os explantes tiveram 1 mm da parte inferior e superior cortadas visando eliminar o tecido ainda sob influência do hipoclorito de sódio absorvido e foram introduzidos em frascos contendo 20 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido com metade da concentração de sais, sem sacarose, com 2 mL L^{-1}de PPM (Plant Preservative Mixture™, Plant Cell Technology), 2 mg L^{-1} de BAP (N^6 – Benzylaminopurine), 4 mL L^{-1} de Derosal 500

SC® e 200 mg L^{-1} de Cloranfenicol (meio de introdução). Quatro dias após a introdução, os explantes foram transferidos para meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semi-sólido contendo a concentração total de sais, sacarose, 2 mL L^{-1} de PPM, 4 mg L^{-1} de BAP, 50 mg L^{-1} de ácido cítrico e 50 mg L^{-1} de ácido ascórbico, compondo o chamado meio de estabelecimento. Os explantes foram mantidos em sala de cultivo submetidos à temperatura média de 24 ± 2 ºC e fotoperíodo de 16 h.

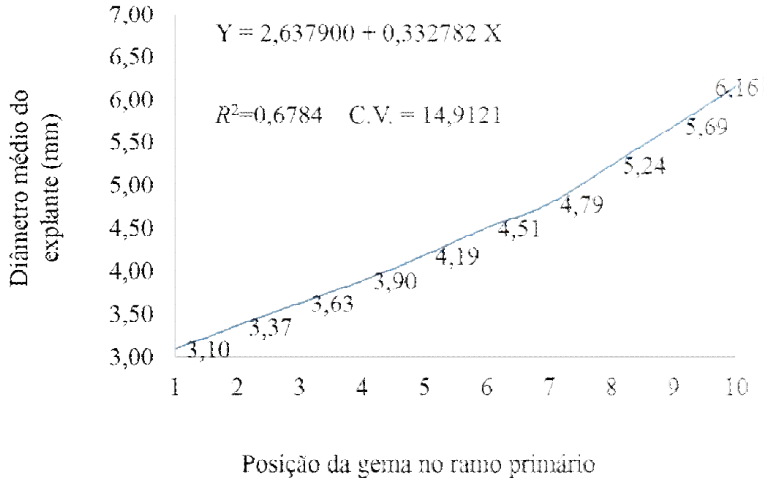
Avaliações de contaminação e brotação foram realizadas em quatro, sete e 14 dias após o lançamento do experimento e uma avaliação de contaminação, descarte e brotação foi realizada após 21 dias. As variáveis analisadas nas três primeiras avaliações foram: número médio de explantes com contaminação fúngica, número médio de explantes com contaminação bacteriana, número médio de explantes com necrose na gema, número médio de explantes com gema brotada e número médio de brotos por gema. Na avaliação de contaminação, descarte e brotação realizada aos 21 dias foram analisadas todas as variáveis citadas e ainda, número médio de explantes destinados à multiplicação, número médio de explantes com gema não brotada e tamanho médio do maior broto.

As médias de cada variável analisada foram submetidas ao teste de comparação de medias de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores médios dos diâmetros dos explantes foram submetidos à Correlação de Pearson para verificar a relação entre o aumento do diâmetro do explante em função da posição da gema no ramo no sentido do ápice para a base e modelos linear, logarítmico e quadrático foram testados na tentativa de descrever esse comportamento.

3 Resultados e Discussão

A análise da correlação de Pearson possibilitou confirmar a existência de aumento dos valores médios dos diâmetros dos explantes positivamente correlacionado (r = 0,9929) com a posição ocupada pela gema do ápice para a base no ramo primário (Figura 2) e tal aumento ajustou-se ao modelo linear (P=0,05).

Figura 2 Correlação gráfica entre o aumento do diâmetro médio dos explantes em função da posição ocupada pela gema, do ápice em direção à base, no ramo primário de *Bambusa vulgaris*.



A partir dos dados obtidos na primeira avaliação, quatro dias após o lançamento do experimento, não se evidenciou a ocorrência de necrose nas gemas, contaminação fúngica ou bacteriana, nem brotação. Já na segunda avaliação, aos sete dias, verificou-se não ocorrer explantes com gemas necrosadas, contaminados por fungo ou bactéria (Tabela 1), entretanto foi identificada a ocorrência de gemas brotadas nos tratamentos correspondentes da primeira à sétima gema (Tabela 1), sendo significativamente maior (40%) nas gemas um e dois em relação às gemas de número seis a 10 (0%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Número médio de explantes com gema brotada e número médio de brotos por explante aos sete dias após o lançamento do experimento

Número da Gema	[a]Brotação	[b]N° de Brotos
1	*0,4a	0,4ab
2	0,4a	0,5a
3	0,3ab	0,3abc
4	0,2ab	0,2abc
5	0,1ab	0,1bc
6	0b	0 c
7	0,1ab	0,1bc
8	0b	0c
9	0b	0c
10	0b	0c
[c]C.V.	13,193	14,049

*Médias transformadas em √x+1 para análise sendo apresentados os valores originais que seguidos de mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. [a]Brotação = número médio de explantes com gema brotada; [b]Nº de Brotos = número médio de brotos por explante; [c]C.V. = Coeficiente de variação.

A terceira avaliação revelou que os tratamentos correspondentes às gemas de número cinco a sete apresentaram brotação significativamente maior (100%) que a gema número um (60%) que não diferiu dos demais tratamentos, em torno de 90% de brotação (Tabela 2).

Tabela 2 - Número médio de explantes com gema brotada e gema necrosada, número médio de explantes com contaminação fúngica e com contaminação bacteriana, número médio de brotos por explante aos 14 dias após o lançamento do experimento.

Número da Gema	[a]Brotação	[b]Necrose	[c]Fungo	[d]Bactéria	[e]Nº de Brotos	[f]Tamanho do Broto (cm)
1	0,6 b	0,1 a	0,1 b	0,0 a	1,9 c	1,52 a
2	0,9 ab	0,1 a	0,1 b	0,0 a	2,9 abc	0,98 a
3	0,8 ab	0,1 a	0,0 b	0,1 a	3,0 abc	1,28 a
4	0,9 ab	0,0 a	0,0 b	0,0 a	3,6 ab	1,22 a
5	1,0 a	0,0 a	0,0 b	0,0 a	3,9 a	1,20 a
6	1,0 a	0,0 a	0,0 b	0,0 a	2,8 abc	1,48 a
7	1,0 a	0,0 a	0,2 a	0,0 a	3,4 ab	1,14 a
8	0,9 ab	0,0 a	0,1 b	0,0 a	2,3 bc	0,97 a
9	0,9 ab	0,1 a	0,2 a	0,0 a	2,8 abc	1,09 a
10	0,9 ab	0,0 a	0,5 a	0,0 a	1,8 c	0,92 a
[g]C.V.	9,301	8,149	12,055	4,125	20,998	38,443

*Médias transformadas em √x+1 para análise sendo apresentados os valores originais que seguidos de mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. [a]Brotação= número médio de explantes com gema brotada; [b]Necrose= número médio de explantes com gema necrosada; [c]Fungo= número médio de explantes com contaminação fúngica; [d]Bactéria = número médio de explantes com contaminação bacteriana; [e]Nº de brotos = número médio de brotos por explante; [f]Tamanho do Broto = Tamanho médio do maior broto emitido por explante; [g]C.V. = Coeficiente de variação.

A necrose nas gemas ocorreu independentemente da posição ocupada no ramo sem diferença significativa entre os tratamentos não ocorrendo nas gemas centrais (gemas de número quatro a oito) e atingindo 10% nas mais apicais (gemas de número um, dois e três) (Tabela 2).

A contaminação fúngica diferiu entre os tratamentos sendo significativamente maior (50%) nas gemas mais basais (de número sete a 10) em relação às apicais (de número um a dois) e centrais (de número três a seis) onde foi nula (Tabela 2). Já a contaminação bacteriana não diferiu entre os tratamentos.

O número médio de brotos por gema foi significativamente maior no tratamento correspondente à gema de número cinco em relação aos tratamentos correspondentes às gemas um e 10, no entanto, estes não diferiram dos demais (Tabela 2). Quanto ao tamanho médio do broto, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

A avaliação realizada após 21 dias permitiu verificar que a contaminação fúngica que esteve ausente nas gemas centrais (da terceira à sexta gema) no 14º dia, expressou-se em média de 20% a 40% dos explantes (Tabela 3).

Tabela 3 - Número médio de explantes apresentando: contaminação fúngica, contaminação bacteriana, necrose na gema, gema brotada e gema não brotada; número médio de explantes descartados, explantes destinados à fase de multiplicação, número médio de brotos por gema e

tamanho médio do maior broto emitido por explante nos tratamentos aos 21 dias após o lançamento do experimento.

Número da Gema	[a]Fungo	[b]Bactéria	[c]Necrose	[e]Multip	[f]C/ Brotação	[g]S/ Brotação	[h]Nº de Brotos	[i]Tamanho do Broto (cm)
1	0,1 b	0,0 a	0,1 a	0,7 a	0,7 b	0,3 ab	2,2 c	2,13 a
2	0,2 ab	0,0 a	0,1 a	0,7 a	0,9 ab	0,1 ab	3,2 abc	2,02 a
3	0,2 ab	0,1 a	0,1 a	0,5 a	0,8 ab	0,2 ab	3,1 abc	2,24 a
4	0,1 b	0,1 a	0,0 a	0,8 a	0,9 ab	0,1 ab	3,9 ab	2,39 a
5	0,4 ab	0,0 a	0,0 a	0,6 a	1,0 a	0,0 b	4,0 ab	2,32 a
6	0,4 ab	0,0 a	0,0 a	0,6 a	1,0 a	0,0 b	3,5 abc	2,57 a
7	0,5 ab	0,0 a	0,0 a	0,5 a	1,0 a	0,0 b	3,9 ab	2,16 a
8	0,3 ab	0,0 a	0,0 a	0,7 a	1,0 a	0,0 b	3,2 abc	2,02 a
9	0,6 a	0,0 a	0,1 a	0,4 a	1,0 a	0,0 b	3,3 abc	1,97 a
10	0,6 a	0,0 a	0,0 a	0,4 a	0,9 ab	0,1 ab	2,4 bc	2,18 a
[j]C.V.	16,77	5,81	8,149	16,643	7,998	10,691	19,837	16,353

*Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferiram significativamente pelo Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade sendo transformadas em √X+1 para análise e apresentados os valores originais. [a]Fungo= Número médio de explantes com contaminação fúngica; [b]Bactéria = número médio de explantes com contaminação bacteriana; [c]Necrose = Número médio de explantes com necrose na gema; [d]Multip= número médio número médio de explantes sadios e com gemas brotadas destinados à fase de multiplicação; [e]C/Brotação = número médio de explantes com gemas brotadas; [f]S/ Brotação = Número médio de explantes sem gema brotada; [g]Explantes com Gema não Brotada = Número médio de explantes com gema não brotada; [h]Nº de Brotos = Número médio de brotos por gema; [i]Tamanho do Broto (cm) = Tamanho médio do maior broto emitido por explante em centímetros; [j]C.V. = Coeficiente de Variação

A contaminação fúngica foi significativamente menor apenas na gema de número um em relação às gemas de número nove e 10 (60%) (Tabela 3) e ainda, independentemente dos tratamentos em 91% de todos os explantes contaminados até os 21 dias, a contaminação surgia a partir da região do nó (Figura 3). A contaminação bacteriana continuou a ocorrer em percentual baixo e atingiu no máximo 10% nos tratamentos correspondentes às gemas três e quatro.

Figura 3 - Fotografias de três diferentes explantes de *Bambusa vulgaris* evidenciando formação de colônia fúngica situada na região do nó.



A ocorrência de necrose das gemas também atingiu no máximo 10%, sendo perceptível nas gemas mais apicais, provavelmente por serem mais tenras e suscetíveis ao efeito das soluções utilizadas na desinfestação.

O número médio de explantes destinados à multiplicação não diferiu entre os tratamentos variando de 40% a 70%. Observou-se, no entanto, que em função do aumento crescente de contaminação fúngica no sentido ápice-base, os maiores percentuais, em números absolutos foram observados até a gema de número seis (Tabela 3).

O número médio de explantes com gemas brotadas foi significativamente maior nos tratamentos correspondentes às gemas de número cinco a nove, em relação à gema de número um sem, no entanto, diferir das demais (Tabela 3).

O maior número de brotos por gema tendeu a ser significativamente maior (quatro brotos por gema) nas gemas mais centrais (gemas quatro a sete). Não foi observada diferença significativa para o tamanho médio do maior broto entre os tratamentos que tendeu a ser em torno de 3 cm (Tabela 3).

A análise dos dados referentes à brotação das gemas ao sétimo dia revelou que nos ramos primários de *B. vulgaris* há um padrão de brotação basípeta tendo em vista o percentual decrescente registrado nos explantes correspondentes às gemas de número um para os explantes correspondentes às gemas de número 10. Tal padrão de quebra da dormência das gemas é relatado por Banik (2015) em colmos de *B. vulgaris,* mas não em relação aos ramos. Apesar da brotação ter sido detectada em maior percentual nas gemas apicais no 7º dia, no 14º dia o percentual de brotação não diferiu da segunda até a décima gema (Tabela 2) e no 21° dia diferiu apenas entre a gema de número um (70%), significativamente menor, em relação às gemas de número cinco a nove (100%) (Tabela 2). Dessa forma, verifica-se que no 21° dia foi possível observar a tendência de ocorrer brotação em todas as gemas, existindo apenas diferença no tempo da quebra de dormência.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com aqueles relatados por outros autores em diferentes espécies de bambu. Devi e Sharma (2009) identificaram que ao 14º dia, em ramos primários de *Arundinaria callosa* Munro, a maior brotação ocorreu em explantes provenientes das gemas medianas embora o percentual tenha atingido 30% e não tenha sido definido critério para enumeração da posição ocupada pelas gemas no ramo.

A presente pesquisa revelou que em *B. vulgaris* a brotação ocorreu em percentual de 90% entre as gemas de número dois e quatro e de 100% entre as gemas de número cinco e nove, no 21º dia, resultados próximos ao que foi encontrado por Mudoi et al. (2014) em

Bambusa nutans Wall. ex. Munro, onde a maior brotação ocorreu em explantes provenientes de gemas no mesmo intervalo sem ter sido citado o período de registro do dado. Segundo os autores, a quebra da dormência em gemas de bambu varia com a posição na planta, estação do ano e a espécie. Sharma e Sarma (2011) citam em trabalho para micropropagação de *Bambusa balcooa* Roxb. que a quebra da dormência de gemas e emissão de brotos depende das condições dos explantes, estação do ano e condições de cultivo.

Anand et al. (2013) relataram para *B. bambos* que o percentual de brotação na primavera foi de 93% e no inverno foi aproximadamente igual embora o percentual de contaminação tenha sido elevado. Já Ramanayake et al. (2006) relataram que em *Bambusa vulgaris* 'Striata' (Lodd. ex Lindl.) Gamble o percentual de brotação obtido na estação chuvosa foi de 50% e de contaminação 85%. Mudoi et al. (2014) descreveram percentual de brotação maior no início do outono (45%) enquanto que na primavera foi menor (25%) para *B. nutans*. O presente estudo foi realizado durante a estação do verão e os percentuais máximos de brotação ficaram próximos e até superaram os encontrados por Anand et al. (2013).

Banik (2015) cita existir evidência de que a folha que recobre a gema do colmo pode ser a origem de substâncias que controlam, ou pelo menos influenciam, o processo de crescimento intercalar e possivelmente a formação de raízes e do primórdio dos ramos. Como, segundo o autor, as gemas dos ramos primários são recobertas também por folhas que se inserem abaixo da gema, não se invalida a possibilidade de que ao remove-la antes da senescência se possa estar causando interferência no desenvolvimento e brotação destas. Por este fato, ao contrário de Ramanayake et al. (2006) que trabalhando com *B. vulgaris* 'Striata' utilizaram todas as gemas do ramo primário determinando como número um a primeira gema visível, independente da senescência da folha, o presente estudo foi realizado considerando-se como gema número um, aquela cuja folha fosse senescente e, dessa forma, todas as gemas teriam as mesmas condições de brotação em relação ao estado de maturidade das folhas que as recobriam e ainda assim, encontrou-se diferença de brotação em função da posição ocupada pela gema no ramo aos 21 dias após o lançamento do experimento (Tabela 3).

Anand et al. (2013) relataram em *B. bambos* que o tamanho do explante também influencia o tempo necessário à brotação. Os explantes pequenos (0,5 – 0,7 cm) não responderam bem no cultivo, enquanto explantes de 2,5 cm levaram alguns dias para iniciar a emissão de brotos provavelmente devido à alta concentração de hormônios endógenos dando suporte à brotação. O presente estudo foi realizado com explantes cujo tamanho foi

padronizado de forma que uma fonte variação das reservas seria em função do diâmetro, variável que apresentou aumento em relação à posição ocupada pela gema (Figura 2) mas, ainda assim, após 21 dias, não se observou diferença significativa entre a brotação das gemas, com exceção da gema número um em relação às gemas de número cinco a nove (Tabela 3). Ramanayake et al. (2006) também relatam em *B. nutans* aumento do diâmetro dos explantes em relação à posição ocupada pela gema no ramo.

O número de brotos por gema apresentou tendência de diferença significativa entre as gemas de número quatro e cinco no 14º dia e que se ampliou ao intervalo correspondente às gemas de número dois a nove, no 21° dia, em relação às gemas mais apical (número um) e basal (número 10). Ramanayake et al. (2006) citam ocorrência de diferença no número de brotos por explante em função da estação do ano, mas não em função da posição da gema e tal fato demonstra haver na mesma fonte de explantes, ramo primário, diferenças significativas quanto a gema utilizada. No caso de *B. vulgaris* o número de brotos por gema no explante correspondente à gema número cinco foi duas vezes maior que aquele encontrado nos explantes correspondentes às gemas de número um e número 10 (Tabela 3).

O tamanho médio do maior broto não apresentou diferença significativa em função da posição da gema no ramo em *B. vulgaris*. Os resultados na presente pesquisa diferem daqueles encontrados por Ramanayake et al. (2006) em *B. vulgaris* 'Striata' que relatam diferença significativa do tamanho do broto dos explantes provenientes das gemas de número cinco e seis. As diferenças podem estar relacionadas à época do ano em que os ramos foram colhidos e a dose de BAP utilizada.

Sharma e Sarma (2011) relatam eficácia de diferentes concentrações de BAP em diferentes espécies de bambu. Os citados autores descrevem maior comprimento de brotos quando utilizaram 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP. Ramanayake et al (2006) relatam ter encontrado diferença significativa entre o tamanho de brotos de *B. vulgaris* 'Striata' quando explantes foram subcultivados por três vezes em meio com 2 $mg\ L^{-1}$ e com 4 $mg.L^{-1}$ de BAP, mas os explantes foram inicialmente mantidos em meio com 2 $mg.L^{-1}$ de BAP, enquanto que no presente estudo os explantes foram mantidos em meio com a mesma dose utilizada pelos citados autores por quatro dias e posteriormente transferidos para meio contendo 4 $mg.L^{-1}$.

A contaminação fúngica foi significativamente maior nas gemas mais próximas da base (sete, nove e dez), não tendo sido detectada nas gemas centrais (três a seis) no 14º dia após o lançamento do experimento (Tabela 2), no entanto, após 21 dias do lançamento do experimento a contaminação fúngica incidiu em percentual de 20% a 60% que não diferiu

significativamente no que diz respeito à posição da gema no intervalo contido entre as posições dois e 10 embora se observe aumento relativamente gradativo no sentido ápice-base (Tabela 3). Desta forma, apesar dos procedimentos de desinfestação e desinfecção observa-se ser provável a existência de estruturas fúngicas no interior dos tecidos suficientes para garantir a contaminação em um nível que chega a comprometer até 60% do material introduzido, dependendo da posição que a gema ocupe no ramo (Tabela 3).

Pandey e Singh (2012) em estudo sobre micropropagação de *Dendrocallamus strictus* Nees verificaram que ao testar diferentes tratamentos visando a desinfestação, o uso de cloreto de mercúrio a 0,2% por 15 min resultou em percentual de brotação de gemas assépticas de 26,67%, inferior ao obtido nos tratamentos do presente estudo. Mudoi et al. (2014) ao testar diferentes pré-tratamentos para assepsia dos explantes de *B. nutans* obteve 55% de contaminação no tratamento mais eficaz, Tween 20 (5%) + MANCOZEBE (0,1%) + Gentamicina (0,1%) + Álcool (70%). Ramanayake et al. (2006) ao utilizar Benlate® (0,42%) em meio para estabelecimento de explantes de *B. vulgaris* 'Striata' obteve apenas 15% de material livre de contaminação. Os trabalhos considerados, com exceção de Mudoi et al. (2014) apresentaram percentuais de explantes isentos de contaminação abaixo do que foi obtido no presente estudo que variou de 10% a 60% entre os tratamentos no 21° dia após o lançamento do experimento.

Diferentes autores (ANAND et al., 2013; PRATIBBA, SARMA, 2013; SAXENA; BHOJWANI, 1993; RAMANAYAKE; YAKANDAWALA; 1997;) relatam que a estação do ano com maior ocorrência de chuvas e elevada umidade interfere na taxa de contaminação fúngica dos tecidos do bambu, resultando em percentuais elevados. De acordo com Liu (2009) em estudo sobre características biológicas do fungo parasita do bambu *Shiraia bambusicola* P. Henn., fatores como temperatura, precipitação e umidade relativa influenciam na emergência e transmissão do fungo e que maior taxa de parasitismo ocorre em condições úmidas e frescas.

O mês de dezembro de 2015, período em que os ramos primários foram coletados na presente pesquisa, foi marcado por chuvas esporádicas totalizando 42,3 mm de precipitação, entretanto, as matrizes nas quais os ramos foram coletados encontram-se situadas na Reserva de Mata Atlântica, local com alta umidade relativa, característica do Bioma em questão, o que favorece a ocorrência de altas taxas de disseminação e contaminação fúngica tendo em vista a umidade constante presente no ambiente.

4 Conclusões

O intervalo do ramo primário correspondente às gemas de número dois a seis consiste na melhor fonte para obtenção de segmentos nodais tendo em vista elevado nível de brotação, maior número de brotos emitidos por gema e menor incidência de contaminação fúngica garantindo assim explantes mais vigorosos e com maior probabilidade de sanidade para a fase de multiplicação. Deve-se, no entanto, evitar as gemas mais basais, a partir da gema número sete pela maior incidência de contaminação e tendência a menor número de brotos por gema.

5 Apoio Financeiro

O autor responsável agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa PCI-DA aprovada sob o processo de número 313323/2015-1 referente à execução do projeto de pesquisa intitulado "Manejo de Contaminantes Microbianos no Processo de Micropropagação *in vitro* para Produção Massal de Mudas de Bambu (*Bambusa spp.*)".

6 Referências

ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In Vitro* Propagation of Edible Bamboo *Bambusa bambos* and Assessment of Clonal Fidelity through Molecular Markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, Rowland Heights, v. 2, n. 4, 257-261, 2013.

BANIK, R. L. Morphology and Growth. In.: LIESE, W.; KÖHL, MICHAEL. **Bamboo**: the plant and its uses. London: Springer. p. 43-89. cap. 3. 2015.

BAREJA, B. G. **Bamboo Production and Propagation Methods**. [S.l.]: Cropsreview.com. 2010. 19 p.

DEVI S. D.; SHARMA, G. J. *In vitro* propagation of *Arundinaria callosa* Munro- an edible bamboo from nodal explants of mature plants. **The Open Plant Science Journal**, Oak Park, v. 3, p. 35-39, 2009.

GENEROSO, A. L. **Caracterização Morfológica e Cultivo in vitro de Espécies de Bambu**. 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Centro de

Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2014.

JHA, A.; DAS, S.; KUMAR, B. Micropropagation of *Dendrocalamus hamiltonii* through nodal explants. **Global Journal of Bio-Science and Biotechonolgy**, Jankipuram, v. 2, n. 4, p. 580-582, 2013.

JIMÉNEZ, V.C. et al. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo. *Guadua angustifolia* Kunt, trough axillary shoot. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 389-395, 2006.

LIN, X.; HUANG, L.; FANG, W. Bamboo regeneration via embryogenesis and organogenesis. In: **Embryogenesis**. Sato, Ken-Ichi (Ed.). INTECH: [Rijeka], cap. 16. p. 359-372. 2012. Disponível em:<http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/bamboo-regeneration-via-embryogenesis-and-organogenesis>. Acesso em: 08 jul. 2014.

LIU, Y. Biological Characteristics of a Bamboo **Fungus, *Shiraia bambusicola*, and Screening for Hypocrellin High-yelding Isolates**. 2009. 96 f. Tese (Phyllosophy Doctor in Crop Production Technology) – Suranaree University of Technology, 2009.

MSOGOYA, T. et al. Identification and Management of Microbial Contaminants of Banana *in vitro* Cultures. **Journal of Applied Biosciences**, Limuru, v. 55, p. 3987-3994. 2012.

MUDOI, K D.; SAIKIA, S. P.; BORTHARKHUR, M. Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall. Ex. Muro. **African Journal of Biotechnology,** Bowie, v. 19, n. 19, p. 1961-1972. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, Rockville, v. 15, p. 473-497. 1962.

PANDEY, B. N.; SINGH, N. B. Micropropagation of *Dendrocalamus strictus* nees from mature nodal explants. **Journal of Applied and Natural Science**, [Uttarakhand] v. 4, n. 1, p. 5-9. 2012.

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

PRUTPONGSE, P.; GAVINLERTVATANA, P. *In vitro* micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 453-454, 1992

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; MEEMADUMA, V. N.; WEERAWARDENE, T. E. *In vitro* shoot proliferation and enhancemenet of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 110, p. 109-113, 2006.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; YAKANDAWALA, K. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. **Plant Science**, Limerick, v. 129, p. 213-223, 1997.

SHARMA, P.; SARMA, K. P. *In vitro* propagation of *Bambusa balcoa* for a better environment. In: International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences, 2011, Bangkok. **Proceedings…** Bangkok: Planetary Scientific Research Centre, 2011. p. 248-252.

SHROTI, R. K. et al. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* through inter nodal segment. **Bulletin of Enviroment, Pharmacology & Life Science**, [Sikandra-Bodla] v. 1, n. 3, p. 58-60, 2012.

SAXENA, S. BHOJWANI, S. S. In vitro clonal multiplication of 4-year-old plants of bamboo, *Dendrocalamus longispathus* Kurz. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Berlin, v. 29, p: 135-142, 1993.