



## Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação

Anatálya dos Santos RIBEIRO<sup>1\*</sup>, Gilvano Ebling BRONDANI<sup>1</sup>, Gabriela Cristina Rech TORMEN<sup>1</sup>,  
Alexssandra Jéssica Rondon de FIGUEIREDO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

\* E-mail: [anatalya\\_ribeiro@hotmail.com](mailto:anatalya_ribeiro@hotmail.com)

Recebido em outubro/2015; Aceito em janeiro/2016.

**RESUMO:** Dentre os novos sistemas de cultivo de plantas, os biorreatores apresentam destaque como um método de adequada aplicabilidade, o que pode proporcionar melhores condições para a multiplicação de mudas em larga escala e com custo reduzido. O objetivo do presente estudo foi avaliar o número de explantes estabelecidos (isentos de contaminação bacteriana ou fúngica), a multiplicação e o alongamento de brotos de *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl. em diferentes sistemas de cultivo. Explantes oriundos da fase de estabelecimento *in vitro* foram transferidos para três sistemas de cultivo, sendo eles compostos por biorreator de imersão temporária (BIT), cultivo *in vitro* em meio líquido (MEL) e cultivo *in vitro* em meio de cultura padrão (PADRÃO), onde também foram testadas duas concentrações de sacarose (0 e 30 g.L<sup>-1</sup>). Aos 14 dias, foi avaliada a taxa de explantes estabelecidos. Dos explantes considerados vivos e que não apresentaram contaminação foram avaliados o número e o comprimento médio dos brotos. O maior número de explantes estabelecidos foi observado no método de cultivo tipo BIT na ausência de sacarose, e MEL quando suplementado 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O BIT e MEL se destacaram apresentando maior número médio de brotos por explante. O meio de cultura PADRÃO resultou em menor número de explantes estabelecidos e o menor número de brotos por explante.

**Palavras-chave:** *Bambusa vulgaris*, biorreator, micropropagação, sacarose.

### *In vitro* bamboo cultivation in different spread systems

**ABSTRACT:** Among the new systems for cultivating plants, the bioreactors stood out as a method with suitable applicability, which may provide better conditions for the multiplication of seedlings in large scale and with a reduced cost. The aim of this study was to evaluate the number of established explants (free of bacterial or fungal contamination), as well as the multiplication and elongation of *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl. sprouts in different cultivation systems. Explants derived from the *in vitro* establishment phase were transferred to three cultivation systems, which were composed by temporary immersion bioreactor (BIT), liquid-based *in vitro* cultivation (MEL) and *in vitro* cultivation in standard culture medium (STANDARD), where two sucrose concentrations were also tested (0 and 30 g.L<sup>-1</sup>). At 14 days, the rate of established explants was evaluated. From the explants considered alive and without signs of contamination, we evaluated the number and average length of sprouts. The greater number of established explants was observed in the BIT cultivation method in the absence of sucrose, and MEL when added 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose. The BIT and MEL stood out showing greater average number of sprouts per explant. The STANDARD culture medium resulted in lower number of established explants, besides the lowest number of sprouts per explant.

**Keywords:** *Bambusa vulgaris*, bioreactor, micropropagation, sucrose.

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies de bambus possuem potencial para uso econômico, ecológico e social devido às suas características morfológicas e silviculturais. Podem ser utilizadas para a recuperação de áreas degradadas, sequestro de carbono, construção civil, fabricação de móveis, produção de biodiesel, papel e celulose, artesanato, produtos farmacêuticos e também na indústria alimentícia (DELGADO, 2011; SAFE, 2004).

Entretanto, frente a dificuldade de produção de mudas em larga escala, o potencial produtivo de diversas espécies de

bambusão tem sido devidamente explorado. Além disso, os métodos de propagação tradicional mostram-se, por muitas vezes, ineficazes para aplicação em escala comercial (GIELIS et al., 2001). Algumas das alternativas de propagação ainda não testadas ou pouco exploradas referem-se ao cultivo de espécies de bambu *in vitro*. Esse procedimento pode ser eficientemente usado para a obtenção de mudas de espécies economicamente importantes que apresentam dificuldades de propagação.

Dentre os novos sistemas de micropropagação desenvolvidos, os biorreatores tem se destacado como um método de produção em larga escala e de adequada aplicação, podendo proporcionar

melhores condições assépticas para as culturas e com menor custo de produção (TEIXEIRA, 2002). Além disso, a utilização desse tipo de sistema proporciona maior oxigenação e nutrição das culturas através do meio líquido, redução da hiper-hidricidade e, conseqüente melhoria da qualidade dos propágulos (MURCH et al., 2004). O objetivo do estudo foi avaliar o cultivo de *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl. em diferentes sistemas de propagação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Caracterização e origem do material

O experimento foi instalado e conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Viveiro Florestal da Faculdade de Engenharia Florestal (FENF), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Os explantes utilizados no experimento foram provenientes de matrizes de *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl. que foram propagadas pelo processo de alporquia no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Centro de Biotecnologia Agrícola – CEBTEC/ESALQ/USP e transportadas para o viveiro da Faculdade de Engenharia Florestal da UFMT.

### 2.2. Assepsia e estabelecimento *in vitro*

Segmentos nodais da porção mediana da brotação com 10 a 15 mm de comprimento e contendo gemas dormentes sem as folhas (KOMATSU et al., 2011) foram coletados da matriz. As gemas das extremidades (apical e basal) foram descartadas.

Inicialmente, o material foi lavado com esponja e água destilada e autoclavada contendo Tween 20 (0,05%, v/v). A região dos nós foi totalmente raspada e o material foi imerso durante 24 horas em uma solução de 1 mg L<sup>-1</sup> de P.A. *Benomyl*. Após 24 horas, dentro da câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados com água destilada e autoclavada e imersos em solução hidroalcoólica à 70% (água:álcool, v/v) contendo Tween 20 (0,05%, v/v) por 1 minuto. Em seguida, foram submetidos à solução de 2,0-2,5% (v/v) de cloro ativo (NaOCl) acrescida de Tween 20 (0,05%, v/v) durante 20 minutos. Ao final da assepsia, foram enxaguados com água destilada e autoclavada por três vezes e inoculados verticalmente em tubos de ensaio (2×10 cm) contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Após 21 dias, foram considerados estabelecidos os explantes que não apresentaram contaminação fúngica e/ou bacteriana.

### 2.3. Multiplicação e alongamento de brotos

Os explantes estabelecidos foram transferidos para o sistema de biorreator de imersão temporária (BIT), tubos de ensaio com meio de cultura líquido (MEL) e meio de cultura padrão, semi-sólido (testemunha) (Figura 1).

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e 0,10 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA). A sacarose (Nuclear®/ C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> / 342,30 g) foi adicionada em duas concentrações diferentes (0 e 30 g.L<sup>-1</sup>). Ao meio de cultura PADRÃO também foi adicionado 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar (Riolab®). Após o ajuste do valor do pH para 5,8, o meio de cultura foi autoclavado à temperatura de 121°C (≈ 1,0 kgf.cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em sala de incubação com temperatura de 25°C (±2°C), fotoperíodo de 16 horas sob 32 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de luminosidade fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

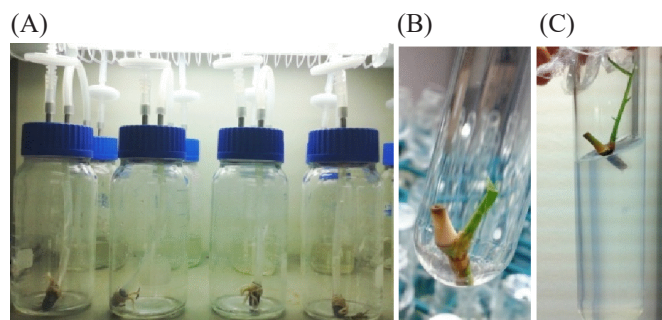


Figura 1. Detalhe dos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *Bambusa vulgaris*. (a): Biorreator de imersão temporária (BIT); (b): Meio líquido (MEL); (c): Meio de cultura semi-sólido (PADRÃO)

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2×3) sendo avaliados três métodos de cultivo (BIT, MEL e PADRÃO - testemunha) e duas concentrações de sacarose (0 e 30 g.L<sup>-1</sup>). O BIT foi conduzido com duas repetições de cinco explantes para o tratamento com 0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e três repetições de 7 explantes para 30 g.L<sup>-1</sup> de Sacarose. Os demais tratamentos foram conduzidos com 20 explantes.

Após 14 dias, foram avaliados o número de explantes estabelecidos (vivos, isentos de contaminação fúngica e/ou bacteriana), a contaminação (por fungos e/ou bactérias) e explantes mortos. Os explantes considerados estabelecidos foram avaliados segundo o número de brotos por explante (NB) e comprimento médio dos brotos por explante (CMB).

Para análise estatística, foi calculada e comparada a porcentagem de explantes estabelecidos, contaminados e mortos. O número e o comprimento médio de brotos por explante foi avaliado através de análise de variância (ANOVA,  $P < 0,05$ ), onde os tratamentos foram comparados segundo o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As condicionantes da ANOVA (homocedasticidade e normalidade dos resíduos) foram verificadas através dos testes de Levene ( $P < 0,05$ ) e Shapiro-Wilk ( $P < 0,05$ ). O software utilizado na análise dos dados foi o R 3.1.2.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os três sistemas de cultivo, a ausência de sacarose proporcionou menor contaminação, contudo, maior mortalidade dos explantes (Figuras 2 e 3). Isso pode ser explicado pela ausência de uma fonte de energia exógena que favoreça a

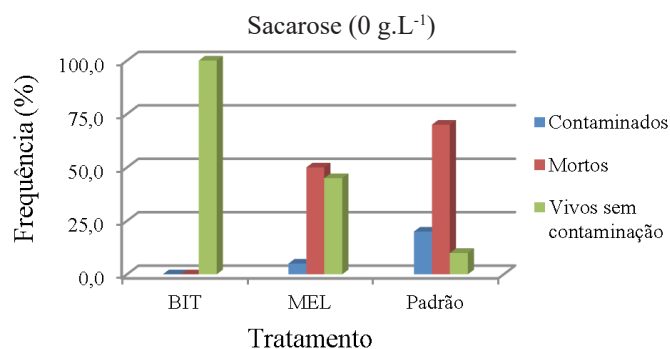


Figura 2. Taxa de contaminação, mortalidade e estabelecimento *in vitro* dos explantes de *Bambusa vulgaris* frente à ausência de sacarose no meio de cultura em diferentes sistemas de propagação. BIT – biorreator de imersão temporária, MEL – meio de cultura líquido, PADRÃO – meio de cultura semi-sólido

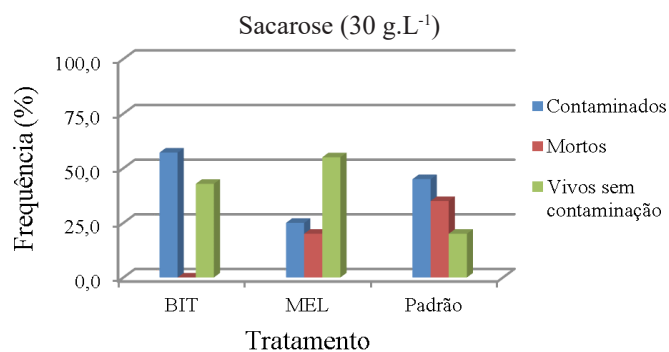


Figura 3. Taxa de contaminação, mortalidade e estabelecimento *in vitro* dos explantes de *Bambusa vulgaris* frente à adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura em diferentes sistemas de propagação. BIT – biorreator de imersão temporária, MEL – meio de cultura líquido, PADRÃO – meio de cultura semi-sólido

biossíntese dos componentes estruturais e funcionais, tanto do explante quanto do agente contaminador (CALDAS et al., 1998; NASCIMENTO, 2010).

Considerando os três tipos de sistema de cultivo (Figura 1), a taxa de explantes vivos isentos de contaminação (estabelecidos) variou segundo as diferentes concentrações de sacarose. Quando não houve adição dessa fonte de energia, o BIT apresentou o melhor resultado, com 100% de explantes estabelecidos. Já no tratamento com adição de sacarose, o MEL se destacou (55% de explantes estabelecidos).

O menor número de explantes estabelecidos ocorreu para as duas concentrações de sacarose (0 e 30 g.L<sup>-1</sup>) em meio de cultura semi-sólido PADRÃO (Figuras 2 e 3). Esse fato está relacionado às elevadas taxas de contaminações e de mortalidade, o que resultou em um reduzido número de explantes estabelecidos (apenas 10% e 20%, respectivamente para 0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose). Segundo Lemos (2001), explantes cultivados em meio de cultura tradicional (semi-sólido) tem a área de contato com o meio de cultura limitada à sua base, reduzindo a absorção de nutrientes. O autor afirma que isso não ocorre no meio líquido, onde os nutrientes disponíveis são mais disponíveis para a absorção pelo explante. Em relação à contaminação, o meio de cultura PADRÃO apresentou a maior taxa (20%) quando nenhuma concentração de sacarose foi adicionada (Figura 2).

O BIT apresentou 57% de contaminação quando a sacarose fez parte do meio de cultura (Figura 3). Os explantes que não morreram e não apresentaram contaminação foram avaliados segundo o número e comprimento médio dos brotos, onde apenas o fator método utilizado para o cultivo (ou seja, BIT, MEL e PADRÃO) apresentou diferença significativa de acordo com a análise de variância (Tabela 1). O número médio de brotos avaliados no método MEL (1,04 brotos por explante) apresentou comportamento intermediário, não diferindo significativamente em relação aos demais métodos (Tabela 2). O BIT (1,49 brotos por explante) diferiu significativamente do PADRÃO (0,50 brotos por explante). Lemos (2001) e Correia (2011) também observaram resultados significativos quanto ao sistema de cultivo, onde o biorreator apresentou o maior número de brotos por explante, quando comparado ao meio de cultura padrão, no cultivo de clones de *Musa* spp. e clones de híbridos de *Eucalyptus globulus*. Os sistemas de cultivo avaliados e as diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao meio de

cultivo não foram significativas em relação ao comprimento médio dos brotos de *Bambusa vulgaris* (Tabela 3).

Considerando o efeito simples dos três sistemas avaliados, o BIT e MEL se destacaram, o que denota a influência positiva do meio de cultura líquido para o desenvolvimento *in vitro* dos explantes da espécie. O sistema de cultivo do tipo biorreator de imersão temporária (BIT) proporcionou maior contato dos tecidos dos explantes com o meio de cultura, promovendo a absorção de nutrientes (macro e micronutrientes) por meio das folhas ecolmo, além da constante renovação do ar durante o período de transferência da solução nutritiva (o qual ocorreu a cada 3 horas, com tempo de imersão de 1 minuto) e eliminação dos possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo (LEMONS, 2001). Em termos gerais, os explantes acondicionados em meio de cultura líquido (BIT ou MEL) apresentaram maior velocidade de crescimento e desenvolvimento. Contudo, esses sistemas de cultivo ainda necessitam de aprimoramento para garantir a produção de mudas de *Bambusa vulgaris* em larga escala.

Tabela 1. Resumo da análise de variância (ANOVA) para o número de broto por explante (NB) e comprimento médio de broto por explante (CMB) de *Bambusa vulgaris* em relação aos diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose

Causas da variação	GL	Quadrado médio	
		NB <sup>(1)</sup> (explante <sup>-1</sup> )	CMB <sup>(1)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )
Sistema (Sis)	2	0,00015882*	0,00000556 <sup>ns</sup>
Sacarose (Sac)	1	0,00012078 <sup>ns</sup>	0,00004400 <sup>ns</sup>
Sis × Sac	2	0,00003413 <sup>ns</sup>	0,00006902 <sup>ns</sup>
Resíduo	32	0,00003727	0,00005299
Média	-	1,01	0,58
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	0,60	0,71

<sup>ns</sup> valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>(1)</sup> dados transformado por EXP[(n+0,5)/100] onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub>(%) = coeficiente de variação experimental.

Tabela 2. Valores médios do número de broto por explante de *Bambusa vulgaris* em relação ao sistema de cultivo e concentração de sacarose

Sistema de cultivo	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )		Média
	0	30	
BIT	1,40 ± 0,40	1,57 ± 0,30	1,49 A
MEL	0,89 ± 0,11	1,18 ± 0,18	1,04 AB
PADRÃO	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,50 B
Média	0,76	1,25	1,01

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. BIT – biorreator de imersão temporária, MEL – meio de cultura líquido, PADRÃO – meio de cultura semi-sólido. Dados apresentados como: média ± erro padrão.

Tabela 3. Valores médios do comprimento médio de broto (cm) por explante de *Bambusa vulgaris* em relação ao sistema de cultivo e concentração de sacarose

Sistema de cultivo	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )		Média
	0	30	
BIT	0,63 ± 0,18	0,54 ± 0,14	0,59
MEL	0,52 ± 0,15	0,67 ± 0,27	0,60
PADRÃO	0,00 ± 0,00	1,10 ± 0,65	0,55
Média	0,38	0,77	0,58

BIT – biorreator de imersão temporária, MEL – meio de cultura líquido, PADRÃO – meio de cultura semi-sólido. Dados apresentados como: média ± erro padrão.

#### 4. CONCLUSÃO

O BIT combinado com a concentração de 0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e MEL com a adição de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose resultaram em maior taxa de explantes estabelecidos. O BITE MEL se destacaram apresentando maior número médio de brotos por explante. O meio de cultura PADRÃO apresentou menor número de explantes estabelecidos e menor número de brotos por explante.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 471370/2013-4) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa CENARGEN. v.1, p.87-132, 1998.
- CORREIA, A.C.G. **Micropropagação em biorreatores de imersão temporária e enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
- DELGADO, P.S. **O bambu como material co-eficiente: caracterização e estudos exploratórios de aplicações**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Rede temática de Engenharia de Materiais, Ouro Preto, Minas Gerais, 2011.
- LEMO, E. E. P.; FERREIRA, M. D. S.; ALENCAR, L. M. C. DE; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, E. V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452001000300006>
- GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K.; OPRINS, J.; DEBERGH, P. C. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 552, p. 195-203, 2001. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.552.22>
- KOMATSU, Y. H.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; BRONDANI, G. E.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. A. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, Heilongjiang, v. 22, n. 2, p. 209-215, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s11676-011-0152-1>
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 3, n. 15, p.473-497, 1962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- MURCH, S. J.; LIU, C.; ROMERO, R. M.; SAXENA, P. K. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p.63-68, 2004. <http://dx.doi.org/10.1023/B:TICU.0000020397.01895.3e>
- NASCIMENTO, J. S. **Biologia dos Microrganismos**. In: GUERRA, R. A. T. (Org.). **Cadernos CB Virtual 4**. João Pessoa: UFPB, v. 4, p. 233-306. 2010.
- SAFE, S. **Bambus como recurso florestal: suas aplicações, manejo, silvicultura, propagação, entomologia e a situação no DF**. 2004. 50 f. Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal) – Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2004.
- TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 24, p. 36-41, 2002.