

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Uso de vácuo infiltração com *Plant Preservative Mixture*® (PPM) no cultivo *in vitro* dos bambus *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia* a partir de matrizes sob diferentes sistemas de cultivo

Maria Antônia Duarte

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso de Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.
Orientador: Miguel Pedro Guerra

Florianópolis – SC

Julho, 2016

Uso de vácuo infiltração com *Plant Preservative Mixture*® (PPM) no cultivo *in vitro* dos bambus *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia* a partir de matrizes sob diferentes sistemas de cultivo

Maria Antônia Duarte ^{(1)*}, Thiago S. Ornellas ⁽²⁾, Miguel Pedro Guerra ⁽³⁾

⁽¹⁾ Acadêmica do curso de Agronomia.

⁽²⁾ Mestrando do programa de pós graduação em Recursos Genéticos Vegetais - Universidade Federal de Santa Catarina

⁽³⁾ Professor Titular, Depto. de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

* Autor correspondente: mariaantoniad809@gmail.com

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar a influência de vácuo infiltração de PPM em explantes obtidos a partir de matrizes cultivadas sob diferentes sistemas de cultivos, durante o estágio de introdução *in vitro* das espécies de bambus lenhosos, *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia*. O experimento foi implantado e conduzido no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, no qual foram avaliados os seguintes sistemas de cultivo: em cultivo protegido (sala de crescimento), cultivados em substratos comercial - Tropstrato florestal, em cultivo protegido (sala de crescimento) hidropônicos, provenientes do cultivo *in vitro* por Ornellas et al (2016), para a espécie *Dendrocalamus asper* e em aquaponia para *Guadua angustifolia*. Outro fator avaliado foi o uso ou não da vácuo infiltração em meio de cultura líquido contendo PPM (0,5%), totalizando 4 tratamentos para a espécie *Dendrocalamus asper* e 2 para *Guadua angustifolia*, conduzidos com 10 - 20 explantes por tratamento. No presente trabalho foi possível verificar que a vácuo infiltração foi eficiente na redução da incidência de contaminação nos diferentes sistemas de cultivo utilizados, trazendo novas perspectivas para outros estudos de cultivo *in vitro* referentes a essa nova técnica.

Palavras-chave: Vácuo infiltração, PPM, *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia*.

The use of vacuum infiltration with *Plant Preservative Mixture*® (PPM) in the in vitro cultivation of bamboo (*Dendrocalamus asper* and *Guadua angustifolia*) from matrices under different cropping systems

Abstract

The present study aimed to evaluate the influence of vacuum infiltration of PPM in explants obtained from matrices grown under different cropping systems. The evaluation was made during the stage of in vitro introduction of species of woody bamboos, *Dendrocalamus asper* and *Guadua angustifolia*. The experiment was established and conducted in the Development and Genetics Plant Physiology Laboratory (LFDGV) at Federal University of Santa Catarina (UFSC). The project's design was completely randomized and the following cropping systems were evaluated: in protected cultivation (growth room), grown on commercial substrates - forest Tropstrato in protected cultivation (growth room) hydroponics, from the in vitro culture by Ornellas et al (2016) for *Dendrocalamus asper* species and aquaponics to *Guadua angustifolia*. In addition, was also evaluated the use or not of vacuum infiltration on liquid medium of culture containing PPM (0.5%). Therefore, the study had 4 treatments for *Dendrocalamus asper* and 2 for *Guadua angustifolia*, conducted with 10 to 20 explants per treatment. The research indicated that the vacuum infiltration was effective in reducing the incidence of contamination on the growing systems tested, which provides new perspectives to further in vitro cultivation studies regarding this new technique.

Keys words: Vacuum infiltration, PPM, *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia*.

Introdução

Os bambus (*Bambuseae*), pertencentes à família das *Poaceae*, subfamília *Bambusoideae* apresentam hábito herbáceo e lenhoso e são adaptados aos climas tropicais e subtropicais com temperaturas moderadas, desenvolvendo-se em distintas altitudes (Neto *et al*, 2009). São encontradas mais de 1.300 espécies dispersas pelo mundo, localizadas em abundância na América e Ásia, contendo aproximadamente 45 gêneros (Salgado, 2014). Tem como principal centro de origem a China e como representante mais conhecido o gênero *Phyllostachys* (Silva, 2010).

Os bambus apresentam grande potencial de uso econômico, social e ecológico (Ribeiro, *et al*, 2016), podendo ser utilizados na construção civil, na alimentação, em produtos farmacêutico e em artesanatos. Outro importante uso é na área ambiental, na recuperação de áreas degradadas e no sequestro de carbono (Generoso, 2014).

Dendrocalamus asper, conhecido no Brasil como bambu gigante, é originário do sudoeste asiático, adaptando-se melhor ao clima tropical. Pode ser utilizado como material de construção e seus brotos são comestíveis. Possui grandes colmos lenhosos entre 20-30 m de altura e 8-20 cm de diâmetro, e tem paredes relativamente espessas (11-20 mm). Ocorre em altitudes até 1.500 m, porém, desenvolvem-se melhor em 400 - 500 m de altitude e em áreas com precipitação média anual de 2.400 mm. Adapta-se à diversos tipos de solo, preferindo solos bem drenados (Schroder, 2010).

O gênero *Guadua* é considerado o mais importante da América, composto por cerca de 30 espécies. A espécie *Guadua angustifolia*, também conhecida como bambu gigante, nativa da Colômbia, possui colmos lisos e ocos, rápido crescimento e pouco peso, muito utilizada na construção. Se desenvolve melhor a altitudes de 500 - 1.500 metros, em temperaturas de 17° a 26°, com precipitação 1200-2500 mm/ano, umidade relativa de 80-90%, em solos com fertilidade moderada e boas características de drenagem. Seu diâmetro habitual é entre 8 e 13 cm, mas dependendo do tipo de solo e das condições climáticas, podem chegar até 25 cm. Durante os primeiros 6 meses cresce num ritmo elevado, podendo chegar à 15 cm de crescimento em altura por dia, até que ele atinja sua altura de 20 a 30 m. Nos anos seguintes, a planta desenvolve sua estrutura lenhosa e biomassa. É considerada de grande importância econômica com elevado potencial (Salas, 2006).

As mudas de bambu são propagadas vegetativamente por meio de divisão de touceiras, rizomas ou colmos (Andrade, 2002). Em muitas espécies, o florescimento é um fenômeno infrequente, produzindo poucas sementes, consideradas na maioria das vezes inférteis e com baixa viabilidade, dificultando a sua multiplicação (Filgueiras, 1988). Estes aspectos somados tornam o processo de obtenção de mudas demorado e custoso.

Assim, o cultivo protegido vem sendo muito utilizado, uma vez que sua técnica possibilita certo controle de variáveis climáticas como temperatura, umidade do ar, radiação solar e vento. Esse controle se traduz em ganho de eficiência produtiva, além de reduzir o efeito da sazonalidade e da contaminação (Silva *et al*, 2014).

Outras técnicas utilizadas são associadas à micropropagação e vêm sendo alvo de estudos e aplicações, com vistas a propagação em larga escala de bambus. Com a

possibilidade de propagação massal das espécies selecionadas, há uma diminuição da mão de obra e aumento da produção de mudas, tornando o processo de conservação mais eficiente em termos de tempo e custos. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, descontaminados e cultivados assepticamente por períodos definidos e em um meio de cultura apropriado (Andrade, 2002).

Um problema frequentemente encontrado na introdução *in vitro* é o manifestação de microbiota associada, como fungos e bactérias. Isso está muitas vezes associado à coleta de explantes em campo, onde a época do ano e a sua maturidade influenciarão na brotação e contaminação por microorganismos, impedindo a eficiência da experimentação e dos processos de assepsia (Nadha *et al.*, 2012).

Microrganismos endófitos desempenham um papel especial na planta em relação à adaptação ao estresse, devido a particular parceria estrutural e funcional com a planta. Sua colonização pode ocorrer pontual ou sistematicamente, por poderem permanecer latentes ou ativos. Por isso, é de suma importância conhecer a microbiota associada às espécies de bambus para que se possa ter conhecimento dos efeitos de determinados antibióticos em várias dessas bactérias, para que não se afete negativamente o material vegetal cultivado *in vitro* (Araújo *et al.*, 2015).

Diante disso, produtos vêm sendo criados e testados para minimizar a contaminação por microorganismos. O Plant Preservative Mixture® (PPM), composto de 5-Cloro-2-Metil-3(2H)-Isotiazolone e 2-Metil-3(2H)-Isotiazolone, é um biocida de amplo espectro fungicida para cultura de tecidos vegetais que pode ser adicionado ao meio de cultura. Seu objetivo é evitar ou reduzir a contaminação microbiana (David e Anthony, 2010).

A erradicação de algumas bactérias endofíticas pelo PPM é, no entanto, considerado um problema. Isso se dá pelo fato das células-alvo microbianas não estarem diretamente expostas ao PPM, onde a penetração e a concentração de biocidas, dentro de espaços intercelulares, pode ser diminuída com o conteúdo aquoso do tecido (Gunson e SpencerPhillips, 1994).

Portanto, a vácuo infiltração, técnica pouco utilizada na cultura de tecidos, tem o objetivo de retirar o oxigênio de dentro das células, facilitando assim a penetração do PPM nos espaços intercelulares.

O presente estudo foi realizado vinculado com o Projeto multidisciplinar e interinstitucional de Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil, chamada MCTI/Ação Transversal/CNPQ.º 66/2013.

Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar a influência de vácuo infiltração com PPM em explantes obtidos a partir de matrizes cultivadas sob diferentes sistemas de cultivos, durante o estágio de introdução *in vitro* das espécies de bambus lenhosos, *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia*.

Material e métodos

Caracterização e origem do material

O experimento foi implantado e conduzido no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis/SC. Foram utilizados explantes de bambus das espécies *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia*. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, onde foram avaliados os seguintes sistemas de cultivo: em cultivo protegido (sala de crescimento), cultivados em substratos comercial - Tropstrato florestal, em cultivo protegido (sala de crescimento) hidropônicos – cultivo sem o uso do solo, no qual os nutrientes são procedentes de solução nutritiva - provenientes do cultivo *in vitro* por Ornellas et al (2016), para a espécie *Dendrocalamus asper* e em aquaponia – interligação entre piscicultura e hidroponia, no qual plantas são cultivadas juntamente a produção de peixes - para *Guadua angustifolia*. Outro fator avaliado foi o uso ou não da vácuo infiltração em meio de cultura líquido contendo PPM (0,5%), totalizando 4 tratamentos para a espécie *Dendrocalamus asper* e 2 para *Guadua angustifolia*, conduzidos com 10 - 20 explantes por tratamento.



Figura 1 - Espécies e matrizes doadoras de explantes utilizadas na introdução *in vitro*. (A) *Guadua angustifolia*; (B) *Dendrocalamus asper*.

Assepsia e estabelecimento in vitro

Foram coletados das matrizes segmentos nodais de 10 a 15 mm de comprimento que continham gemas dormentes protegidas pela bainha. Primeiramente, o material foi lavado com escova, água destilada e detergente comercial e foi realizada a remoção da bainha. Em seguida, os explantes foram imersos em fungicida Mancozeb (3 g.L⁻¹) e bactericida Agrimicina (2 g.L⁻¹) por um período de 20 minutos e, posteriormente, agitados em solução hidroalcoólica à 70% (água:álcool) por aproximadamente 1 minuto, para então serem submetidos à solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), contendo 4,0% de cloro ativo, acrescido de Tween 20 (1 gota/100 ml), por 20 minutos.

O meio de cultura utilizado baseou-se na formulação salina MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementada com 15 µM de benzilaminopurina (BAP), sacarose a 3% (p/v), vitaminas de Morel (MOREL E WETMORE, 1951) e PPM (0,2%). Para a gelificação do meio de cultura, empregou-se 0,25% (p/v) de Phytigel[®], considerado mais eficiente que o Ágar, devido a facilidade de visualização, por ser mais translúcido. O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 e o meio de cultura foi dispensado em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) na base de 5 ml por tubo. O meio foi então autoclavado a 121°C e pressão de 1,1 atm durante 20 minutos.

Finalizando a assepsia em da câmara de fluxo laminar (CFL), os explantes foram lavados com água destilada autoclavada por três vezes. Em seguida, foram seccionados

longitudinalmente e adicionados ao meio de cultura líquido MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas de Morel (MOREL E WETMORE, 195) e PPM (0,5%) por 15 minutos. Os tratamentos que receberam a vácuo infiltração permaneceram em vácuo por 2-3 minutos. No mesmo meio de cultura líquido, após o vácuo, os explantes ficaram imersos até completar o tempo total (15 minutos). Foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura gelificado, mencionado anteriormente. As culturas foram incubadas em sala de cultura ajustada para uma temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por uma semana, e posteriormente, a um regime de fotoperíodo de 16h de luz fornecida por lâmpadas fluorescente fria de luz branca.

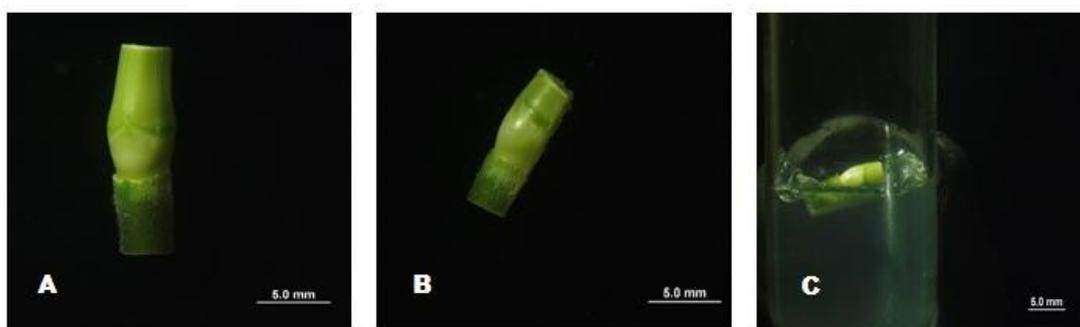


Figura 2 - Explantes de bambu utilizados na introdução *in vitro*. (A) Segmento nodal apresentando gema, após a retirada da bainha; (B) Segmento nodal seccionado longitudinalmente; (C) Segmento nodal introduzido no tubo de ensaio contendo meio de cultura MS.



Figura 3 – Equipamento utilizado para a técnica de vácuo infiltração.

Análises estatísticas

A coleta de dados foi realizada semanalmente, onde foram avaliadas a porcentagem de emissão de brotos dos explantes estabelecidos, como também a porcentagem da manifestação de microorganismos associados (fungos e/ou bactérias), determinada visualmente. Após 30 dias, foram considerados estabelecidos os explantes que brotaram e não apresentaram contaminação fúngica e/ou bacteriana.

As análises estatísticas foram executadas na linguagem/ambiente estatístico R (R CORE TEAM, 2014) e pacote de base do R "ggplot2" (WICKHAM, 2009). Além das bibliografias específicas, R Cookbook (TEETOR, 2011) e R Graphics Cookbook (CHANG, 2012). As médias foram submetidas ao intervalo de confiança a 95%.

Resultado e discussão

A vácuo infiltração contendo PPM se mostrou eficiente na baixa ocorrência de contaminação por microorganismos nas culturas de *Dendrocalamus asper*, além de retardar sua manifestação (Figura 4 e Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Miyazaki et al (2010), que demonstram em experimento com *Petunia hybrida*, que até as mais persistentes bactérias endofíticas podem ser erradicadas por vácuo infiltração com PPM.

Com relação ao sistema de cultivo, a hidroponia se destacou obtendo menos explantes contaminados comparado ao substrato (Figura 4 e Tabela 1). Esta ocorrência pode ser explicada em parte pelo fato de que a hidroponia utiliza apenas a água e sais (utilizados como nutrientes), formando uma solução nutritiva balanceada. Resultados similares foram também evidenciado por Jiménez et al. (2006), onde o PPM (2,0 mg L⁻¹) reduziu a contaminação dos explantes de *Guadua angustifolia* em cultivo protegido, e não foi eficaz em plantas que cresceram no campo. Outro fato a ser apontado é que a matriz hidropônica utilizada na introdução era proveniente do cultivo *in vitro* por Ornellas et al (2016), ou seja, já estava sendo cultivada sem a presença de microorganismos ou com reduzida ocorrência.

Tabela 1 – Porcentagem de contaminação, brotação, fungo e bactérias e intervalo de confiança (IC) encontrados na espécie *Dendrocalamus asper*, nos sistemas de cultivo substrato (n=18) e hidroponia (n=15), como nos tratamentos contendo ou não a vácuo infiltração.

<i>Dendrocalamus asper</i>				
Substrato	Média	IC	Com vácuo	Sem vácuo
Contaminação	31%	± 21,37%	22%	38%
Brotação	8%	± 12,53%	16%	0%
Fungo	25%	± 20,00%	16%	33%
Bactéria	6%	± 10,97%	5%	5%
Hidroponia				
Contaminação	13%	± 17,02%	6%	20%
Brotação	13%	± 17,02%	13%	13%
Fungo	3%	± 8,63%	0%	6%
Bactéria	13%	± 17,02%	6%	20%

A espécie *Guadua angustifolia* cultivada em aquaponia apresentou uma maior ocorrência de contaminação (Figura 5 e Tabela 2), comparada a *Dendrocalamus asper* cultivada em sala de crescimento. Nessa espécie, o tratamento com vácuo infiltração também apresentou resultados menores de contaminação.

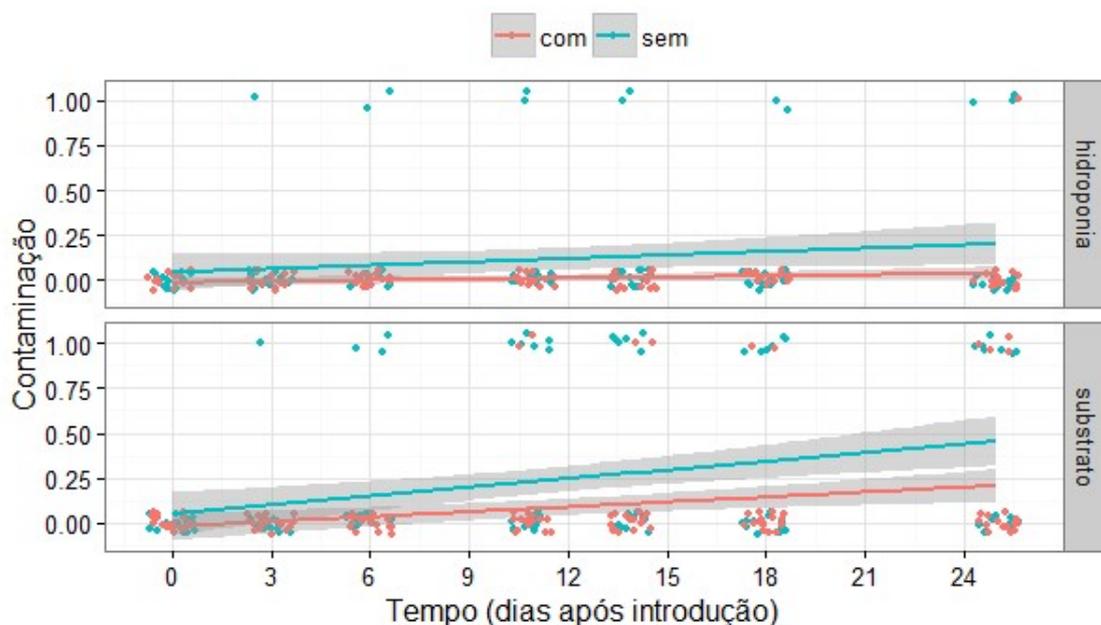


Figura 4 - Ocorrência de contaminações de culturas *in vitro* de *Dendrocalamus asper* ao longo do tempo em função do uso ou não da vácuo infiltração com PPM nos sistemas de cultivo em substrato e hidroponia.

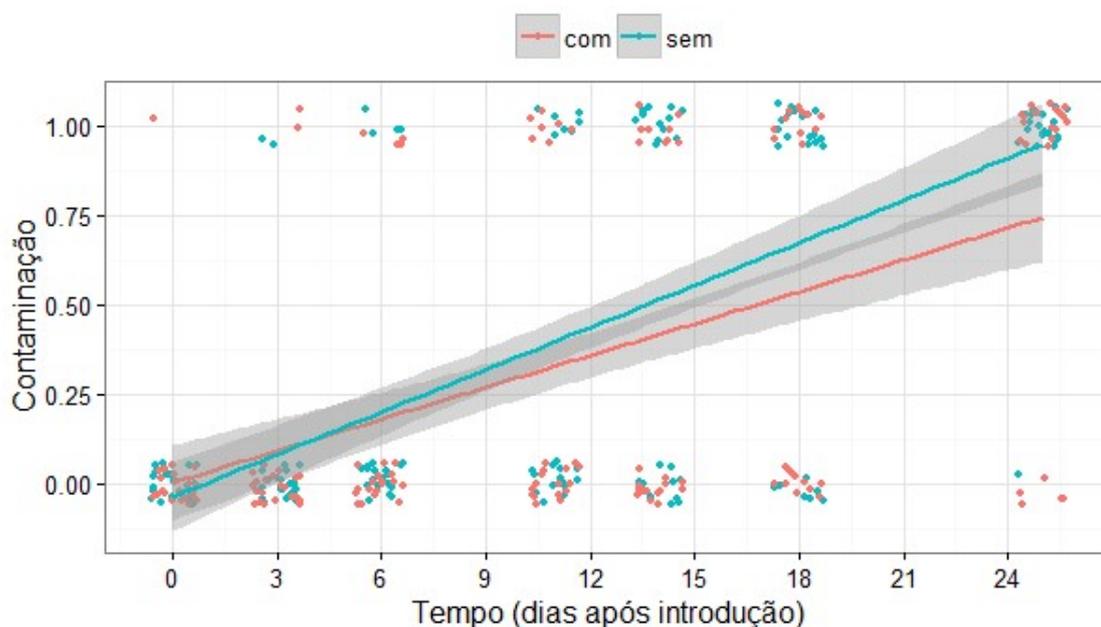


Figura 5 - Ocorrência de contaminações de culturas *in vitro* de *Guadua angustifolia* ao longo do tempo em função do uso ou não da vácuo infiltração com PPM.

Tabela 2 – Porcentagem de contaminação, brotação, fungo e bactérias e intervalo de confiança (IC) encontrados na espécie *Guadua angustifolia* (n=23) nos tratamentos contendo ou não a vácuo infiltração.

<i>Guadua angustifolia</i>				
Aquaponia	Médias	IC	Com vácuo	Sem vácuo
Contaminação	87%	± 13,76%	78%	96%
Brotação	7%	± 10,09%	13%	0%
Fungo	50%	± 20,43%	35%	65%
Bactéria	50%	± 20,43%	56%	43%

A brotação de gemas dos segmentos nodais foi superior nos tratamentos com vácuo infiltração para a espécie as duas espécies (Figuras 6 e 7 Tabelas 1 e 2). O sistema de cultivo com substrato apresentou uma menor porcentagem em relação à hidroponia (Tabela 1), porém a quantidade de explantes brotados foi relativamente baixa. George e Tripepi (2001) evidenciaram o efeito do PPM no metabolismo ou vias de transporte, que aparentemente também pode afetar a capacidade de explante de folhas de algumas espécies

formar brotações adventícias, como demonstrado no seu estudo com redução significativa de brotação em explantes de *Chrysanthemum*. Portanto, os efeitos do PPM devem ser avaliados e testados, em diferentes tipos de espécies, antes de usá-lo nos protocolos de micropropagação, devido ao fato de cada espécie responder de maneira diferente.

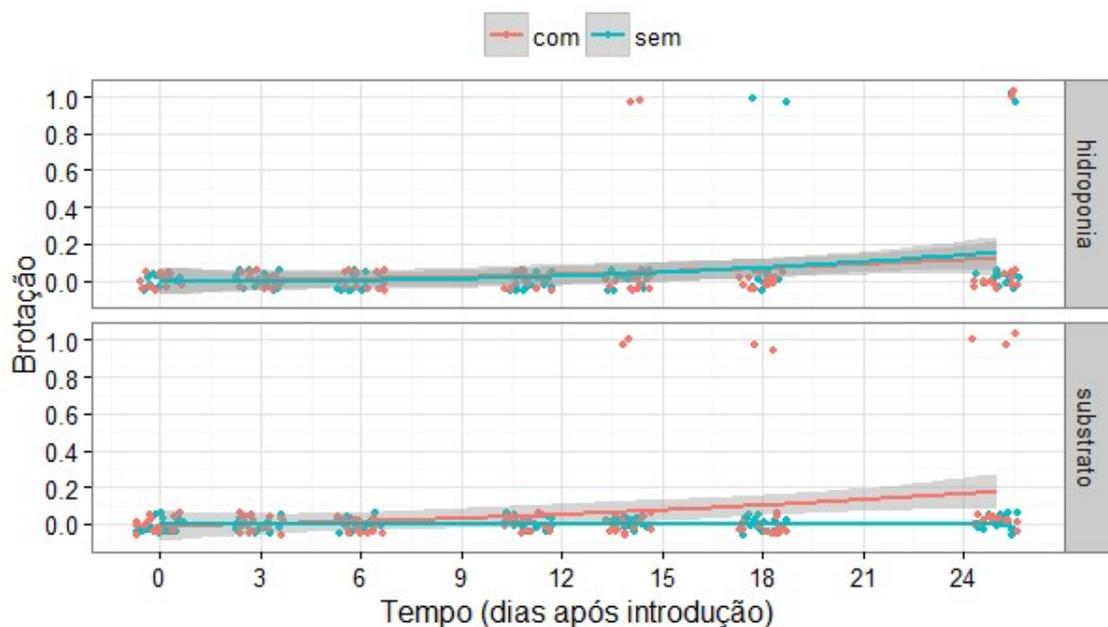


Figura 6 - Ocorrência de brotação *in vitro* de *Dendrocalamus asper* ao longo do tempo em função do uso ou não da vácuo infiltração com PPM nos sistemas de cultivo em substrato e hidroponia.

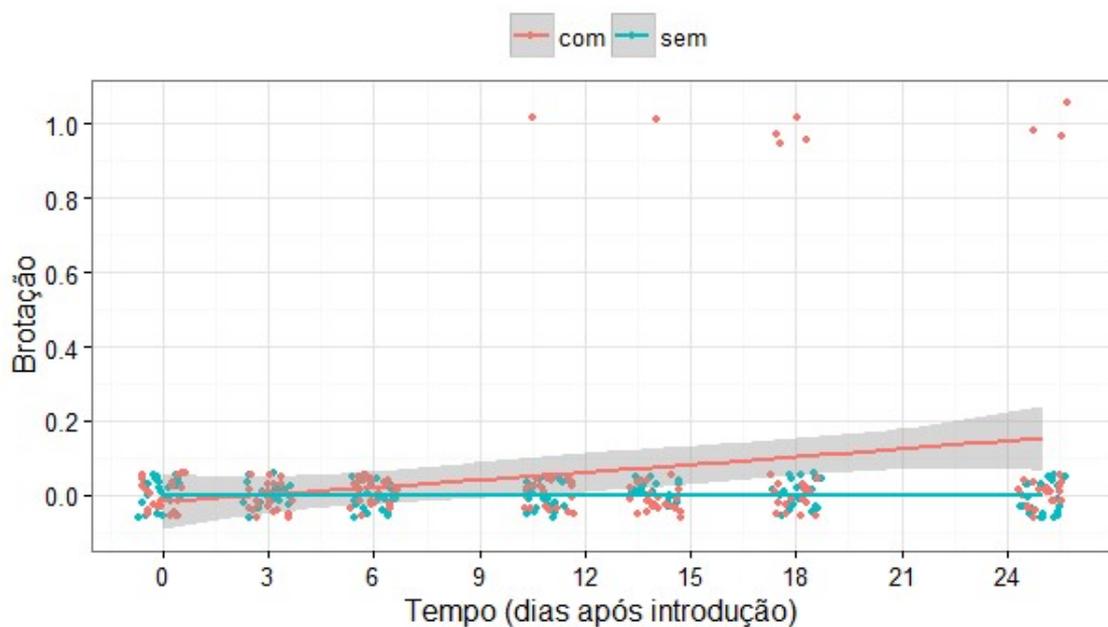


Figura 7 - Ocorrência de brotação *in vitro* de *Guadua angustifolia* ao longo do tempo em função do uso ou não da vácuo infiltração com PPM.

A presença de fungos e bactérias foi maior no tratamento sem vácuo infiltração, nas duas espécies (Figuras 8 e 9). No sistema de cultivo hidropônico a ocorrência de bactérias foi maior (Tabela 1), fato provado por Sutton et al (2006), que mostrou que bactérias se adaptam melhor ao sistema aquático, como o cultivo hidropônico, devido a baixa diversidade biológica do sistema, comparado ao solo. Isso favorece o aparecimento de epidemias, pois ocorre pouca competição entre os microorganismos nativos, beneficiando o estabelecimento das bactérias, que se movem através dos esporos flagelados e zoósporos, transportados pela solução nutritiva e atraídos pelos exsudados radiculares da planta. Segundo Magalhães et al (2004), os principais tipos de organismos patogênicos encontrados na água tratada são as bactérias, cianobactérias, vírus, protozoários e helmintos.

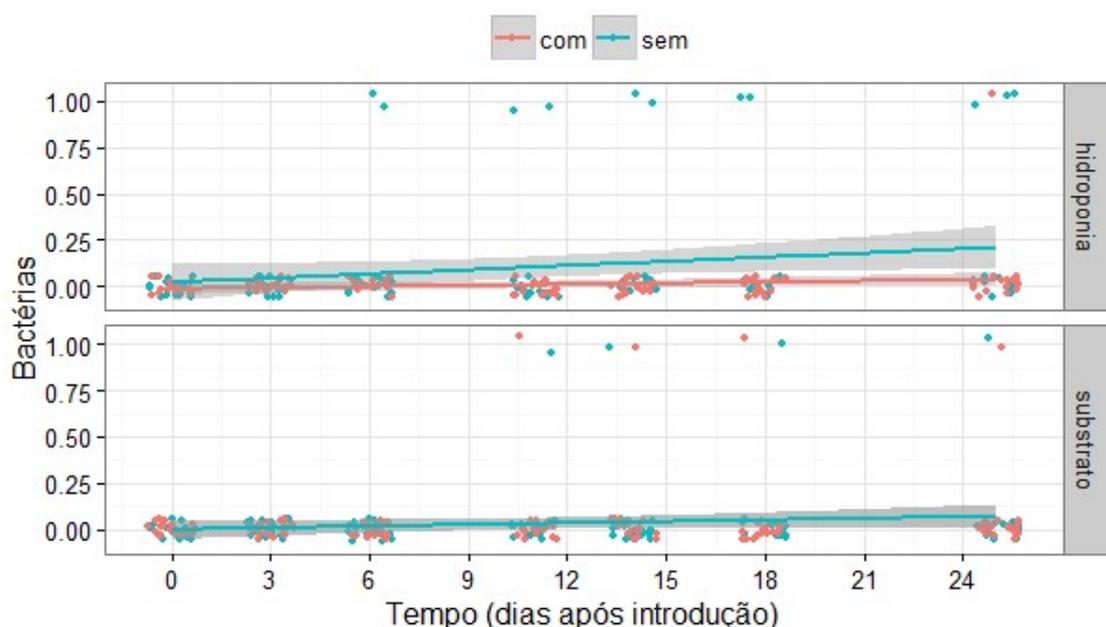


Figura 8 - Ocorrência de bactérias *in vitro* de *Dendrocalamus asper* ao longo do tempo em função do uso ou não da vácuo infiltração com PPM nos sistemas de cultivo em substrato e hidroponia.

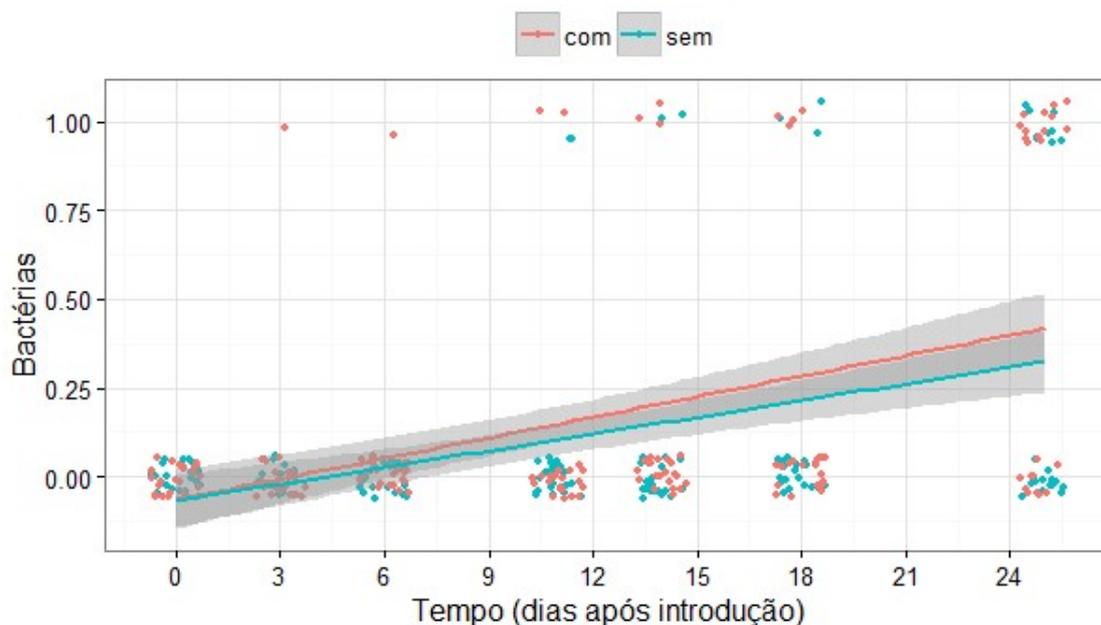


Figura 9 - Ocorrência de bactérias *in vitro* de *Guadua angustifolia* ao longo do tempo em função do uso ou não da vácuo infiltração com PPM.

No sistema de cultivo com substrato, a presença de fungos teve maior ocorrência (Tabela 1). Segundo Wheeler & Rush (2001) os fungos constituem o maior grupo de patógenos radiculares, ocorrendo em todos os tipos de sistemas agrícolas e causando doenças nas principais espécies cultivadas, com uma variada gama de sintomas. Muitos fungos habitantes do solo possuem elevada capacidade de competição saprofítica e podem sobreviver em resíduos de plantas introduzidos no solo, mantendo-se em elevadas densidades populacionais mesmo durante longos períodos de rotação de culturas. Produzem estruturas como agregados miceliais, esclerócios, oósporos, clamidosporos ou outros tipos de esporos, que resistem às condições ambientais adversas, Esse conjunto de características é uma das razões pela qual fungos fitopatogênicos habitantes do solo, uma vez introduzidos numa área de plantio, são praticamente impossíveis de serem eliminados.

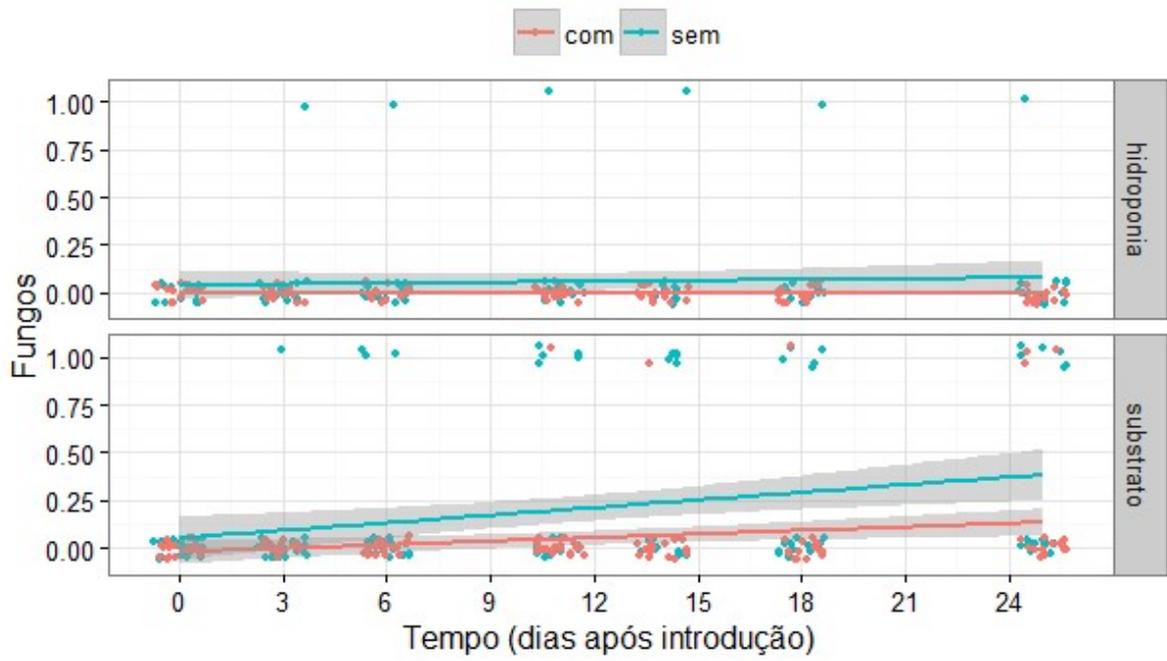


Figura 10 - Ocorrência de fungos *in vitro* de *Dendrocalamus asper* ao longo do tempo em função do uso ou não da vácuo infiltração com PPM nos sistemas de cultivo em substrato e hidroponia.

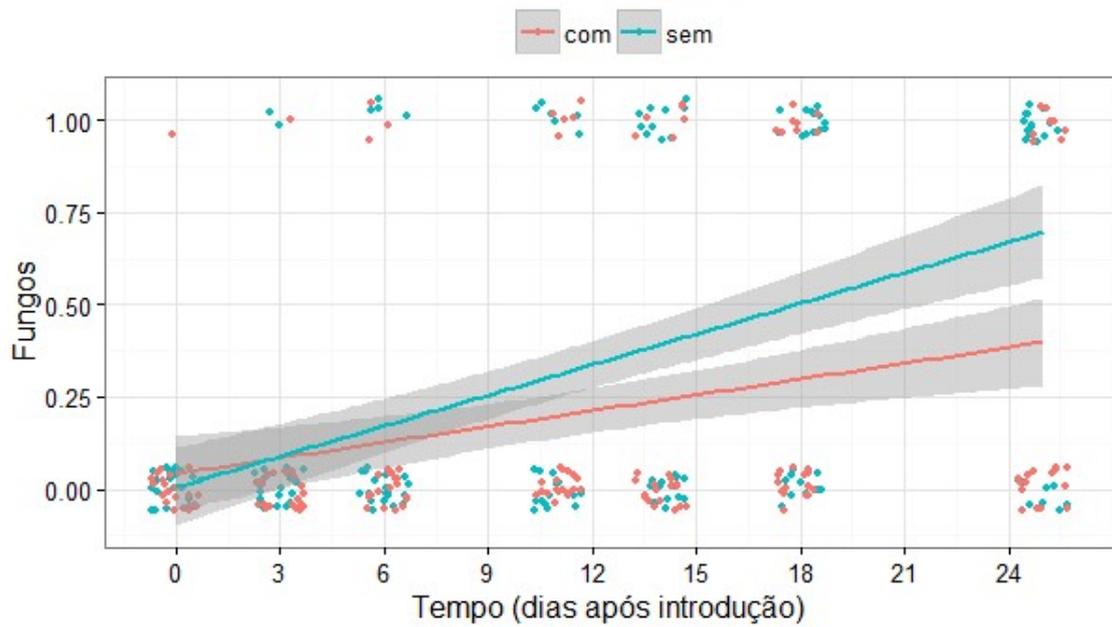


Figura 11 - Ocorrência de fungos *in vitro* de *Guadua angustifolia* ao longo do tempo em função do uso ou não da vácuo infiltração com PPM.

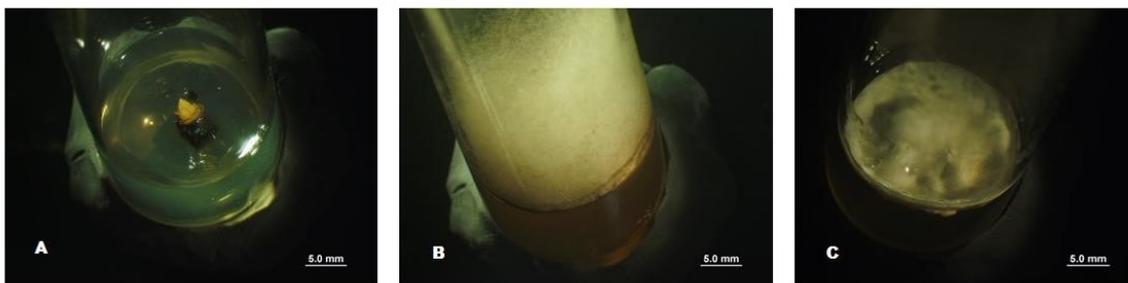


Figura 12 - Introdução *in vitro* de *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia*. (A) Explante com gema brotada; (B) Contaminação fúngica; (C) Contaminação fúngica e bacteriana.

Apesar das médias não se mostraram significativas ao intervalo de confiança a 95%, ao longo do tempo, como pode-se perceber nos gráficos apresentados, os dados tendem a se apresentarem dentro do intervalo de confiança. Há momento em que os envelopes de confiança não se tocam. Poderia ser então, este um momento ideal para repicar para um novo meio de cultura com PPM. Além disso, é importante observar que a quantidade amostral pode ter sido inferior a um nível de robustez adequado, já que a quantidade de explantes disponíveis para esse experimento dependeu da quantidade de gemas cultivadas. Outro fato a ser apontado foi o tempo e a pressão utilizada na vácuo infiltração. Novos trabalhos poderão elucidar experimentos que busquem responder mais questões sobre a vácuo infiltração.

Conclusão

Os resultados do presente trabalhos mostraram que:

- a) A vácuo infiltração contendo PPM se mostrou eficiente na baixa ocorrência de contaminação por microorganismos nas culturas de *Dendrocalamus asper*;
- b) Com relação ao sistema de cultivo, a hidroponia se destacou obtendo menos explantes contaminados comparado ao substrato;
- c) A espécie *Guadua angustifolia* cultivada em aquaponia apresentou uma maior ocorrência de contaminação;
- d) A brotação de gemas dos segmentos nodais foi superior nos tratamentos com vácuo infiltração para a espécie *Dendrocalamus asper*;

- e) A presença de fungos e bactérias foi maior no tratamento sem vácuo infiltração, nas duas espécies;
- f) A vácuo infiltração foi eficiente na redução da incidência de contaminação nos diferentes sistemas de cultivo utilizados, trazendo novas perspectivas para outros estudos de cultivo *in vitro* referentes a essa nova técnica.

Referências bibliográficas

ANDRADE, S.R.M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Documentos / Embrapa Cerrados**. 1ª. ed. Planaltina-DF, n. 58, p.16, 2002.

CHANG, W. **R Graphics Cookbook**. O'Reilly, 413 p., 2012.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods**. Chichester, UK: Willey-Blackwell, 2010. 359 p.

FILGUEIRAS, T. S. (1988) Bambus nativos do Distrito Federal, Brasil (Gramineae: Bambusoideae). **Revista Brasileira Botânica**, 11: 47-66.

GENEROSO, A.L. **Caracterização morfológica e cultivo in vitro de espécies de bambu**. Fev, 2014. Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro.

GEORGE, M.W; TRIPEPI, R.R. Plant Preservative Mixture™ Can Affect Shoot Regeneration from Leaf Explants of Chrysanthemum, European Birch, and Rhododendron. **HORTSCIENCE**. 2001.

GUNSON, H.E, SPENCER-PHILLIPS P.T. N .**Latent bacterial infections: epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants**. In: Lumsden PJ, Nicholas JR, Davies WJ (eds) *Physiology, growth and development of plants in culture*.

Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 379–396, 1994.

JIMÉNEZ, V.M, et al. **In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation**. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2006)

MAGALHÃES, M.A, et al. **Manual abastecimento de água**. Engenharia e Projetos. Monte Santo de Minas – MG, 2004. Disponível em:

http://www.enge.com.br/manual_abastecimento_agua.pdf

MIYAZAKI, J. et al. **Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM)**. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2010) 102:365–372.

MOREL, G.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. ***American Journal of Botany***, v.38, p.138-140, 1951.

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>

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

NETO, J.S.P et al. Aplicação do bambu nas construções rurais. ***Revista Educação Agrícola Superior***. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior - ABEAS - v.24, n.2,p.67-77, 2009.

ORNELLAS, T.S; WERNER, D.; HOLDERBAUM, D.F.; SCHERER, R.F.; GUERRA, M.P. Effects of Vitrofur, BAP and meta-Topolin in the in vitro culture of *Dendrocalamus asper*. **Acta Horticulturae**. No prelo 2016

R CORE TEAM,. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. <<http://www.Rproject.org/>>.

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

SALAS, Eduardo Delgado. **Actualidad y futuro de la arquitectura de bambu en colombia. LA GUADUA ANGUSTIFOLIA “El Bambú Colombiano”**. Tdx, pág, 34 a 81, Universitat Politècnica de Catalunya, 2006.

SALLES, E.A.P.B. **Micropropagação de Acacia mearnsii De Wild**. 2014. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Área de Silvicultura, Departamento de Ciências Florestais, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

SALGADO, A.L.B. **Bambu com sal: aqui e agora, lá e então**. Campinas: Amaro Comunicação, 1ªed. 2014. 352p.

SCHRODER, Stephane. *Dendrocalamus asper*. **Guadua Bamboo**. 2010.

SILVA, B.A, et al. Cultivo protegido, em busca de mais eficiência produtiva!. **Hortifruti Brasil**. Março 2014.

SILVA, R.M.C. **O bambu no Brasil e no mundo**. Janeiro, 2010.

SUTTON, J.C, et al. Etiology and epidemiology of *pythium* root ro in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica* 32: 307-321. 2006.

TEETOR, P. **R Cookbook**. O'Reilly, 436 p., 2011.

Wheeler, T. & Rush, C.M. Soilborne diseases. In: Maloy, O.C. & Murray, T.D. (Eds.) *Encyclopedia of Plant Pathology*. New York. JohnWiley & Sons. 2001b. pp.935-947.

WICKHAM, H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer New York. 2009.
<<http://had.co.nz/ggplot2/book>>.