

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desinfecção de explantes e cultivo *in vitro* de Piretro da Dalmácia
(*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria)**

Nice Livio Borsoi

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitotecnia**

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Nice Livio Borsoi
Engenheiro Agrônomo**

**Desinfecção de explantes e cultivo *in vitro* de Piretro da Dalmácia
(*Chrysanthemum cinerariaefolium* cv. *Vacaria*)**

**Orientador:
Prof. Dr. PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitotecnia**

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Borsoi, Nice Livio

Desinfecção de explantes e cultivo *in vitro* de Piretro da Dalmácia (*Chrysanthemum cinerariaefolium* cv. *Vacaria*) / Nice Livio Borsoi. - - Piracicaba, 2009.
65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Crisântemo 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Micropropagação vegetal 4. Piretro I. Títu

CDD 635.93355
B738d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À família

Pelas palavras sinceras de otimismo, pelo carinho e pela colaboração que me proporcionaram para que eu pudesse vencer mais essa etapa, e que, acima de tudo acreditaram que seria possível. A vocês dedico a minha conquista.

Ofereço este trabalho ao Sr. Fernando Borsoi, pelo entusiasmo, dedicação, atenção e respeito à minha pessoa e por compartilhar os seus conhecimentos que me auxiliaram na busca dessa realização.

AGRADECIMENTOS

- Inicialmente à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por intermédio do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia que viabilizou o Mestrado Interinstitucional.
- Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Campus Sertão que disponibilizou a estrutura física do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal para a realização deste trabalho em nível de Mestrado.
- Aos professores do PPG Fitotecnia – ESALQ/USP pelo conhecimento transmitido.
- Ao professor Dr. Pedro Jacob Christoffoleti da ESALQ-USP, Departamento de Produção Vegetal, área de Biologia e Manejo de Plantas Daninhas, pelo ensinamento e orientação durante minha participação no curso e condução deste trabalho.
- Aos professores Dr. Durval Dourado Neto da ESALQ/USP e Dr. Paulo Augusto Manfron da UFSM pela amizade e apoio durante a realização do curso.
- Em especial ao professor MSc. Adriano Michel e à Eng. Agr. MSc. Marilei Suzin pelo incentivo, amizade, simplicidade e integridade profissional e por terem compartilhado os seus conhecimentos e acompanhado com tanta ênfase toda essa trajetória. A vocês o mais sincero muito obrigado.
- A todos que de forma direta ou indireta participaram da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Panorama do agronegócio de flores	15
2.2 Caracterização botânica da Família <i>Asteraceae</i>	16
2.3 Aspectos históricos da produção de <i>C. cinerariaefolium</i> Vis.	18
2.4 Micropropagação de plantas	20
2.4.1 Principais etapas do cultivo in vitro de plantas	21
2.4.1.1 Etapa 0: Cuidados com a planta doadora de explantes.....	21
2.4.1.2 Etapa I: seleção, desinfestação e inoculação dos explantes em condições assépticas	22
2.4.1.3 Etapa II: multiplicação dos propágulos in vitro.....	27
2.4.1.4 Etapa III: Enraizamento das plântulas obtidas e aclimatização	29
3.1 Experimento I	31
3.1.1 Material vegetal:	31
3.1.1.1 Tratos culturais das plantas doadoras de explantes.....	31
3.1.1.2 Limpeza dos segmentos.....	32
3.1.1.3 Desinfestação química dos segmentos	32
3.1.1.4 Isolamento dos explantes.....	33
3.1.1.5 Delineamento estatístico.....	34
3.2 Experimento II	34
3.2.1 Material vegetal	34
3.2.2 Subcultivos	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Experimento I	39
4.2 Experimento II	42
4.3 Considerações finais	48

5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS.....	57

RESUMO

Desinfecção de explantes e cultivo in vitro de Piretro da Dalmácia (*Chrysanthemum cinerariaefolium* cv. Vacaria)

As atividades que envolvem a floricultura vêm se destacando positivamente no cenário econômico do agronegócio brasileiro. Dentre as espécies de plantas utilizadas para este fim ressaltam-se as espécies pertencentes à família botânica *Asteraceae*, principalmente as do gênero *Chrysanthemum*. A espécie *C. cinerariaefolium* Vis. (Piretro da Dalmácia) é mundialmente cultivada visando à produção de aleloquímicos que apresentam atividades de inseticidas naturais (piretrinas). No Brasil chegou a ser produzida para esse fim em larga escala, no município de Taquara-RS na década de 30 a 40. Recentemente o interesse de seu cultivo tem aumentado como uma alternativa natural de manejo de pragas como planta ornamental, principalmente para jardins. Contudo, o fato de não produzir sementes férteis limita sua capacidade de propagação massal. Visando aperfeiçoar sua micropropagação foram realizados dois experimentos. No experimento 1 foi avaliado aos 30 dias de cultivo a influência de cinco concentrações de hipoclorito de sódio (10, 20, 30, 40 e 50% do produto comercial Mazzarolo) e cinco tempos de permanência na solução durante a desinfestação dos explantes (5, 10, 15, 20, 25 min.). Ao todo foram isolados 125 meristemas totalizando 25 tratamentos com cinco repetições. Os explantes isolados foram inoculados no meio de isolamento, o qual foi constituído de MS + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃ + 0,01 mg.L⁻¹ ANA + 30 g.L⁻¹ de Sacarose em 7,0 g.L⁻¹ de Agar. No experimento 2 foi avaliado a influência das diferentes concentrações de hipoclorito e dois tempos de permanência na solução desinfetante sobre a porcentagem de necrose, estruturas amorfas, plântulas formadas e comprimento de brotos. As plântulas regeneradas do experimento 1 foram inoculadas no meio de multiplicação que constou do MS + 0,4 mg.L⁻¹ de Thiamina HCl + 100 mg.L⁻¹ de Mio-Inositol + 0,05 mg.L⁻¹ de ANA + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 40 g.L⁻¹ de Sacarose e 7,0 g.L⁻¹ de Agar. O pH dos meios foi ajustado em 5,9 antes da autoclavagem. Os resultados obtidos no experimento 1 indicaram que quanto maior o tempo de permanência na solução, maior a porcentagem de necrose. Porém, quanto menor a permanência maior a taxa de contaminação microbiana. No experimento 2, observou-se que a porcentagem de necrose é maior na concentração de 50%. Não houve influência dos fatores analisados na produção de estruturas amorfas. Para o número de brotos/explante e comprimento de brotos, o melhor desempenho se deu na solução 30%. Porém, a taxa de brotos por explante diminuiu à medida que aumentou o tempo de permanência na solução. Com relação ao comprimento dos brotos, os melhores resultados foram observados até o tempo de 15 minutos de permanência. Assim conclui-se que *C. cinerariaefolium* Vis. responde positivamente ao cultivo *in vitro*. A taxa de necrose aumenta à medida que aumenta a concentração de hipoclorito. Por outro lado, a taxa de contaminação aumenta à medida que diminui a concentração da solução desinfetante. A concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de permanência na solução desinfetante afetam o número e o comprimento de brotos produzidos nos subcultivos.

Palavras-chave: Micropropagação; Crisântemo; Desinfestação; Piretro

ABSTRACT

Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* cv. Vacaria) explants disinfection and cultivation in vitro

The activities that involve floriculture have distinguished positively in the economic scenario of the Brazilian agribusiness. Among the plant species used for that purpose it can be distinguished the species belonging to the botanical family *Asteraceae*, mainly from the genus *Chrysanthemum*. The species *C. cinerariaefolium* Vis. is worldwide cultivated in order to produce the allelochemicals, which have activities of natural insecticides (pyrethrin). In Brazil it was produced in large scale, in the Taquara-RS County in the decade of 30 to 40. Recently the interest on its cultivation has increased as natural alternative of pest management as ornamental plant, mainly in yards. However, the fact of no seed is produced by the plant that limits its capacity of massal production. In order to optimize its micropropagation two experiments were developed. In the experiment 1 it was evaluated 30 days after cultivation the influence of five concentrations of sodium hypochlorite (10, 20, 30, 40 and 50% of the commercial product Mazzarolo), and five time lengths of the explants permanence in the disinfecting solution (5, 10, 15, 20 and 25 min.). It was isolated 125 meristems, 25 treatments with five replications. The isolated explants were inoculated in isolation media, that was constituted of MS + 1.0 mg.mL⁻¹ of BAP + 0.1 mg.L⁻¹ of GA₃ + 0.01 mg.L⁻¹ ANA + 30 g.L⁻¹ of sucrose in 7.0 g.L⁻¹ of Agar. In the experiment 2 it was evaluated the influence of different concentrations of hypochlorine and two length of time in disinfection solution measuring the percentage of necrosis, amorphous structures, seedlings formed and length of the sprouts. The regenerated seedlings from experiment 1 were inoculate in a medium of multiplication that was of MS + 0.4 mg.L⁻¹ of Thiamine HCl + 100 mg.L⁻¹ of Mio-Inositol 0.05 mg.L⁻¹ of ANA + 1.0 mg.L⁻¹ of BAP + 40 g.L⁻¹ of sucrose and 7.0 g.L⁻¹ of Agar. The pH of the medium was adjusted to 5.9 before the autoclaving process. The results obtained in the experiment 1 indicated that the higher the time length in the solution, the higher is the percentage of necrosis. However, the higher is the permanence of higher rate of microbial contamination. In the experiment 2; it was observed that the percentage of necrosis is higher at the concentration of 50%. There was no influence of the analyzed factors in the yield of amorphous structures. For the number of sprouts/explants and length of sprouts, the better performance was in the solution of 30%. However, the rate of sprouts per explants diminished as the length of time in the solution increased. The best results for sprout length were obtained up to 15 minutes of permanence. Therefore, it can be concluded that *C. cinerariaefolium* Vis. responds positively to *in vitro* culture. The rate of necrosis increases as the hypochlorine concentration is higher. On the other hand, the contamination rate increases as the disinfection solution diminishes. The concentration of hypochlorine sodium as the length of time of permanence in the initial disinfecting solution used during the explants disinfection affects the number and the sprout length produced during the subculture.

Keywords: Micropropagation; *Chrysanthemum*; Disinfection; Pyrethro

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o segmento da floricultura vem apresentando destaque significativo dentro do agronegócio brasileiro. Dentre as várias famílias botânicas utilizadas na produção de flores destaca-se a *Asteraceae* sendo representada principalmente pelo gênero *Chrysanthemum*. A espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. (Piretro), é cultivada na sua grande maioria no Kênia, Tanzânia, Ruanda e Equador. No Brasil foi introduzida, nas décadas de 30 a 40, no estado do Rio Grande do Sul, mais especificamente no Município de Taquara, localizado na serra gaúcha, o qual se tornou a capital do Piretro pela quantidade de matéria prima produzida. A produção objetivava a extração de piretrinas, substâncias que apresentam um alto poder letal sobre os insetos, e era destinada a exportação para os Estados Unidos. A partir da Segunda Guerra Mundial, as piretrinas passaram a ser produzidas sinteticamente e os plantios comerciais brasileiros foram abandonados.

Atualmente, esta espécie desperta dentro da floricultura como uma planta ornamental, principalmente para ser cultivada em jardins. Contudo os poucos exemplares existentes não produzem sementes ficando sua propagação restrita aos métodos convencionais de propagação vegetativa, que não conseguem suprir a demanda exigida para a produção em grande escala. A cultura de tecidos representa a possibilidade de superar as dificuldades de propagação vegetativa desta espécie, pois essa ferramenta biotecnológica é capaz de produzir um grande número de plantas em curto espaço de tempo e com qualidade fitossanitária superior.

Contudo, por se tratar de uma espécie que, por enquanto, apresenta pouca expressão comercial, não há no Brasil relatos sobre tentativas de cultivo *in vitro* desta planta. Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade de resposta ao cultivo *in vitro* da espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria, e estabelecer protocolos para a desinfestação dos explantes, o que representa o primeiro passo para o estabelecimento *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Panorama do agronegócio de flores

O mercado mundial de flores está em franca expansão, destacando-se países como Holanda, Itália e principalmente Estados Unidos. A principal demanda para a floricultura é o mercado interno, pois possui um grande potencial de expansão uma vez que, o consumo per capita é baixo, em torno de US\$ 5,00, enquanto que os países europeus chegam a US\$ 70,00 por habitante, sendo que o recorde é a Suíça com US\$170,00 por habitante/ano (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

O potencial deste seguimento do agronegócio no Brasil está em função das diversidades climáticas, onde favorecem as mais diferentes espécies de clima temperado e tropical, permitindo produção o ano inteiro, dando garantia ao setor na atividade, principalmente no aspecto social, pois é uma atividade realizada principalmente por pequenos produtores, o que contribui na distribuição de renda (FRANÇA; MAIA, 2008; BRAGA, 2006). Nesse sentido, Vencato et. al. (2006) Apud França e Maia (2008); salientam que a floricultura destaca-se por empregar, em média 10 a 15 funcionários por hectare, superando em 10 vezes outros cultivos, e que gera, hoje, o emprego de 120 mil pessoas, sendo que destas 80% são mulheres, com grande utilização de mão-de-obra familiar.

A imigração teve um papel importante no processo de organização e no crescimento da floricultura brasileira, destacando-se a italiana, a alemã, e principalmente, a japonesa. Em 1948, imigrantes Holandeses se instalaram no leste paulista e em 1972 fundaram a Cooperativa Agropecuária de Holambra, sendo dedicada a várias atividades entre elas a de flores (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). Com a criação da Cooperativa, a floricultura teve grande impulso, respondendo hoje, por 60% da produção de flores no Brasil.

Com a implantação do Programa de Desenvolvimento de Flores e Plantas Ornamentais do Ministério da Agricultura em 2000, a floricultura passou a fazer parte da agenda de políticas públicas, incentivando o setor (FRANÇA; MAIA, 2008). Depois do Estado de São Paulo, os principais produtores de flores e Plantas Ornamentais no

Brasil são Santa Catarina, Pernambuco, Alagoas, Ceará, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Goiás, Bahia, Espírito Santo, Amazonas e Pará (BUAINAIN; BATALHA, 2007 Apud FRANÇA; MAIA, 2008). Esses autores ressaltam ainda que o Rio Grande do Sul possui aproximadamente 550 floricultores cadastrados pelo SEBRAE, sendo sua produção basicamente para o consumo interno.

O país possui aproximadamente 8.500 ha com floricultura, sendo 50,4% cultivados com flores e plantas para mudas; 13,2% para flores envasadas; 28,8% para flores de corte; 3,1% para folhagens de corte e 1,9% para outros produtos da floricultura (GRAZIANO, 2002 Apud JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). Segundo Vliet (2005) apud Junqueira e Peetz (2008); o mercado mundial de flores e plantas ornamentais está atualmente avaliado em 75 milhões de US\$ anuais, sendo que, deste total, 14 milhões advêm do mercado de mudas. O gênero *Chrysanthemum* representa as flores mais importantes tanto para corte como para vaso em nível mundial (SILVA, 2003).

2.2 Caracterização botânica da Família *Asteraceae*

De acordo com Souza e Lorenzi (2008), a família *Asteraceae* representa a maior família das *Eudicotiledôneas*, possuindo 1.600 a 1.700 gêneros e cerca de 30.000 espécies. Somente no Brasil, ocorrem aproximadamente 250 gêneros os quais abrigam cerca de 2.000 espécies. O nome *Asteraceae* provém do grego; *Áster* que significa “estrela” devido ao formato da inflorescência. A família se caracteriza por apresentar flores dispostas em inflorescência sempre do tipo capítulo rodeada por uma ou mais fileiras de brácteas. A maioria das espécies são plantas herbáceas, raramente arbóreas, algumas apresentando látex e óleos essenciais, podendo ou não ser resinosas. Em geral, são suculentas podendo ser anuais, bianuais ou perenes, com agregação de folhas na base (roseta). Apresentam distribuição cosmopolita, sendo que existem espécies hidrofíticas, heliofíticas, mesofíticas e xerofíticas (SOUZA; LORENZI, 2008; CRONQUIST, 1987).

As folhas são geralmente alternadas e espiraladas, menos freqüente opostas e raramente verticiladas, podendo ser herbáceas, carnosas, coreáceas ou membranosas e estar mais ou menos modificadas em espinhos, podendo ser pecioladas ou sésseis,

com ou sem glândulas aromáticas, fíticas ou sem odor característico. As folhas podem ser simples ou compostas. A lâmina foliar pode ser inteira ou disectada, pinatífida, ou palmatífida, às vezes espinhosa. Em geral, carecem de estípula. As margens da lâmina foliar podem ser inteiras, crenadas, serrilhadas, dentadas, planas, revolutas ou involutas. As folhas não apresentam um meristema basal persistente. Na maioria das plantas desta família apresentam uma nervura central e nervuras laterais mais ou menos similares, que são chamadas de folhas com nervuras pinadas.

As flores são pequenas, hermafroditas, unissexuais ou estéreis. Pela sua simetria podem ser actinomorfas como zigomorfas, radial e bilateral. As flores não são fáceis de serem vistas, desta forma os capítulos funcionam com uma única flor, sendo formado pelas flores tubulares no centro e bilabiadas na porção externa, que atraem os insetos polinizadores. As flores tubulares amadurecem centripetamente e a polinização é cruzada, ampliando a variabilidade genética.

Os frutos são usualmente chamados de aquênios, que por definição são frutos secos, uniseminados, derivados de ovários unicarpelares e súperos. Em muitas espécies, os frutos apresentam papilho persistente que auxilia na dispersão das sementes pelo vento (SOUZA; LORENZI, 2008). Muitas espécies desta família apresentam importância econômica, por possuírem características de interesse para utilização alimentícia, oleaginosa, medicinal, ornamental bem como fonte de inseticidas naturais. Nesse contexto, destaca-se o Piretro, o qual é fonte natural de piretrinas que é considerada, entre os inseticidas naturais, o mais seguro na produção de alimentos.

O termo *Chrysanthemum* foi usado por Linné, o qual uniu o prefixo grego *Krys*= ouro, dourado e o sufixo *Anthemum*= flor, significando flor de ouro ou flor dourada, devido à beleza e intensidade de cores de suas flores. Conforme Corrêa (1978), o *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. é uma das três espécies conhecido popularmente como Piretro ou Piretro da Dalmácia, sendo classificado da seguinte forma: *Reino*: Plantae; *Divisão*: Magnoliophyta; *Classe*: Magnolipsida; *Ordem*: Asterales; *Família*: Asteraceae; *Subfamília*: Anthemidae; *Gênero*: *Chrysanthemum* e *Espécie*: *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. (Figura 1). O gênero *Chrysanthemum* reúne mais de 20.000 espécies, sendo que cerca de 20 delas apresentam interesse econômico, dentre elas destaca-se a *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.



Figura 1 - Esquema da estrutura anatômica da espécie *C. cinerariaefolium* Vis.

(WIKIPEDIA, 2008) Disponível em:
 <<http://es.wikipedia.org/wiki/Chrysanthemum>>.

2.3 Aspectos históricos da produção de *C. cinerariaefolium* Vis.

Plantas do gênero *Chrysanthemum* são cultivadas na China desde 2000 a.C. como planta ornamental. Uma cidade da China foi homenageada com o nome Ju-Xian como a cidade do crisântemo. No Japão, a espécie foi introduzida no ano 500 d.C., o imperador adotou como flor do selo imperial (PETRY, 2000). Na Europa chegou por volta do ano de 1700.

A espécie *C. cinerariaefolium* Vis., é nativa da Dalmácia, perene, pertencente à família das *Asteraceae*, parecido com uma margarida, com flores vistosas brancas,

rosas, amarelas e roxas. No Brasil esta espécie foi introduzida durante a Segunda Guerra Mundial, no município gaúcho de Taquara, tornando-se a capital do Piretro devido à larga produção sendo inclusive objeto de exportação (Figura 2).



Figura 2 - Cultivo de *C cinerariaefolium* Vis. para a produção de inseticidas naturais em Taquara – RS
(PIRISA, 2008). Disponível em: <<http://www.pirisa.com/2005/historia.asp>>.

A espécie foi de fácil adaptação na região, chegando a produzir mais de 1.000 toneladas do produto. Após a colheita o Piretro era secado, ensacado e armazenado, que posteriormente era selecionado, moído e prensado, seguindo para a cidade de Porto Alegre, onde era embarcado em navios para os Estados Unidos. A cultura perdurou por uma década (1930 – 1940), perdendo seu atrativo econômico com a descoberta de outras substâncias químicas sintéticas. Atualmente, poucos exemplares podem ser encontrados na região da serra gaúcha e nos campos de cima da serra (região de Vacaria-RS), ainda remanescentes das antigas plantações comerciais os quais deram origem a cultivar Vacaria.

Como o panorama do agronegócio de flores e de plantas ornamentais no Brasil está crescendo, o *C. cinerariaefolium* cv Vacaria ressurgue como uma alternativa para a produção de plantas ornamentais principalmente para jardins. Neste contexto, a cultivar (Vacaria), oriunda de plantas remanescentes das antigas plantações, volta a chamar atenção como alternativa para a produção de plantas ornamentais, principalmente para

jardins. Dentre suas características, destaca-se o fato de sua floração ser mais tardia em relação às plantas de outras variedades que decaem no outono, além de apresentar rusticidade e fácil adaptação ao solo e clima. Contudo, esta espécie não produz sementes ficando sua multiplicação restrita aos rebentos vegetativos formados pelas plantas adultas. Nesse sentido, a utilização de técnicas biotecnológicas de propagação como a micropropagação torna-se uma alternativa interessante para auxiliar na propagação massal da planta.

2.4 Micropropagação de plantas

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o termo micropropagação se deve a propagação vegetativa de pequenos segmentos de uma planta. Kerbauy (1997), destaca que a idéia de cultivar células isoladas de plantas surgiu no início do século passado com Gottlieb Haberlandt, um ilustre botânico alemão, como uma estratégia capaz de materializar os conceitos embutidos na teoria celular proposta por Schwann e Shleider por volta de 1839. De acordo com essa teoria, a célula vegetal seria capaz, a princípio, de originar um organismo inteiro comportando-se como uma célula ovo ou zigoto. Esse comportamento é conhecido como totipotência celular.

Conforme Villalobos e Thorpe (1991), as técnicas utilizadas na micropropagação de tecidos vegetais já contribuíram muito no entendimento dos processos de diferenciação celular bem como, na utilização de tais processos para se aumentar a eficiência na exploração comercial das plantas. Os mesmos autores ressaltam ainda que dentre as principais vantagens da utilização da cultura de tecidos na propagação de plantas destacam-se:

- o rápido incremento do número de plantas oriundas de um genótipo elite;
- a redução do tempo de multiplicação;
- a possibilidade de se obter um grande número de plantas em um curto espaço de tempo e em uma pequena área de cultivo reduzindo-se assim os custos de produção;
- a produção de material com maior qualidade fitossanitária principalmente no que se refere a viroses;

- a facilidade de intercâmbio de material *in vitro*, inclusive entre países diferentes, com menor restrição fitossanitária;
- a possibilidade de se obter rapidamente grande número de exemplares de uma espécie ou variedade da qual existam poucos representantes disponíveis (GRIOLLI, 2008; LEVY; LEVY, 1991).

Além disso, micropropagação é de fundamental importância na multiplicação de plantas que apresentam incompatibilidade esporofítica ou mesmo auto-incompatibilidade, que alteraram a constituição genética inviabilizando a produção de sementes viáveis (LEVY; LEVY, 1991). Nesse sentido, Grewal e Sharma (1978) destacam que os subcultivos ao longo do processo de micropropagação aumentam significativamente o número de brotos formados.

Atualmente, a micropropagação comercial concentra-se na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas; e em plantas lenhosas com destaque na obtenção de porta enxertos de espécies frutíferas e de essências florestais de crescimento rápido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Silva (2003) ressalta que a regeneração de plantas *in vitro* é um pré-requisito para a utilização de técnicas biotecnológicas mais avançadas como é o caso da transgenia.

2.4.1 Principais etapas do cultivo *in vitro* de plantas

O método de cultura de tecidos vegetais *in vitro* pode ser dividido em quatro fases distintas:

- * Etapa 0: Cuidados com a planta doadora de explantes;
- * Etapa I: Seleção, desinfestação e inoculação dos explantes em condições assépticas;
- * Etapa II: Multiplicação dos propágulos *in vitro*;
- * Etapa III: Enraizamento das plântulas obtidas e aclimatização.

2.4.1.1 Etapa 0: Cuidados com a planta doadora de explantes

O material vegetal utilizado para iniciar o cultivo pode determinar de modo significativo o sucesso ou o fracasso de todo o processo. Pierik (1990), destaca mais de

10 fatores, ligados a planta doadora de explantes, que podem influenciar direta ou indiretamente no cultivo. Entre eles destacam-se: o genótipo, a idade da planta, o estado fisiológico, o estado sanitário, as condições de crescimento, o posicionamento do explante dentro da planta, o tamanho do explante.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o estado fisiológico da planta matriz, doadora dos explantes, é fundamental no desempenho do material durante o cultivo *in vitro*. Nesse sentido, Borgatto et al. (2002), mencionam a importância da adubação com cálcio, potássio e do magnésio em plantas matrizes, na resposta organogênica dos explantes.

A condição fitossanitária da planta doadora é importante, pois está diretamente relacionada com o sucesso na desinfestação dos explantes. Assim, Grattapaglia e Machado (1998) lembram que o primeiro passo para manutenção de uma planta matriz é conservá-la em um ambiente mais limpo possível. Logo, espera-se ter maiores dificuldades no estabelecimento das culturas cujos explantes tenham sido retirados de plantas que se encontram mantidas a campo em relação aquelas que se encontram em uma casa ou câmara de vegetação. Essa vantagem das plantas oriundas das casas de vegetação, se deve ao fato de que neste local pode-se facilmente efetuar o controle de insetos e fitopatógenos. Além disso, permite controlar e manipular fatores como a temperatura, o fotoperíodo e a intensidade luminosa e, desta forma, estimular o surgimento de brotos em qualquer época do ano eliminando a sazonalidade de disposição do material, permitindo a realização de experimentos em qualquer época do ano.

2.4.1.2 Etapa I: seleção, desinfestação e inoculação dos explantes em condições assépticas

Principais tipos de explantes utilizados na micropropagação

Vários tipos de tecidos podem ser utilizados como explantes para iniciar o processo de micropropagação de plantas como por exemplo: meristemas, ápices caulinares, pedaços de folhas, botões florais, segmentos de raízes, etc. Para Mrogiski &

Rocca (1991), a seleção do explante vai depender do objetivo que se deseja alcançar com o cultivo *in vitro*. Assim, quando se deseja a obtenção de plantas livre de viroses, os explantes mais adequados são os meristemas ou ápices caulinares uma vez que estes, normalmente, não possuem ligações com os vasos condutores de seiva principal meio de translocação dos vírus no interior das plantas. Nesse sentido, Taiz e Zeiger (2004), salientam que é importante distinguir o ápice da parte aérea do meristema propriamente dito pois, o primeiro é constituído pelo meristema apical acrescido dos primórdios foliares enquanto o segundo, é formado exclusivamente pelas células indiferenciadas sem incluir qualquer órgão derivado.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o tamanho do explante pode influenciar na resposta do tecido durante seu cultivo *in vitro*. Contudo, Villalobos e Thorpe (1991), ressaltam que a influência do tamanho do explante é maior quando objetiva-se a obtenção de plantas livres de vírus. Contudo, o tamanho do explante pode ser decisivo no processo de assepsia pois via de regra quanto menor o explante maior a probabilidade de ocorrer sua necrose em função da solução desinfetante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Desinfestação dos explantes

De acordo com Roca e Mrogiski (1991), a associação explante - meio e as condições físicas de incubação dos cultivos *in vitro*, tornam o ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos, principalmente fungos e bactérias, os quais, podem competir com os explantes pelos nutrientes do meio ou ainda modificar sua composição química tornando-o impróprio para o desenvolvimento das culturas.

A maior dificuldade nesta fase contudo, está em conseguir eliminar todos os microrganismos que possam promover a contaminação da cultura sem provocar a morte do tecido vegetal. Embora pareça uma tarefa simples, isso é extremamente complicado principalmente no que se refere a microrganismos endógenos, em tecidos que apresentem muitas reentrâncias ou pilosidade excessiva ou ainda em explantes que se localizam muito próximos ao solo (raízes, tubérculos, etc.). Além disso, os microrganismos endógenos, muitas vezes, não se manifestam nos estágios iniciais do

processo de micropropagação, tornando-se visíveis somente após algum tempo de cultivo (algumas semanas) (SUZIN, 2004) .

Conforme Moraes, Almeida e Cazé Filho (2007) a concentração da solução desinfetante e o tempo de exposição podem influenciar significativamente no índice de contaminação *in vitro*, tornando-se necessário o estabelecimento de um protocolo eficiente para cada espécie. Grattapaglia e Machado (1998), salientam que a concentração das soluções desinfetantes e o tempo de permanência nas mesmas depende da sensibilidade dos tecidos.

Várias substâncias com ação germicida tem sido utilizadas para promover a desinfestação dos explantes. Normalmente, utiliza-se etanol a 70% por alguns segundos (± 10) e compostos a base de cloro como, por exemplo, hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. Nesse sentido, Villalobos e Thorpe (1991), ressaltam ainda, a utilização de peróxido de hidrogênio, nitrato de prata e cloro comercial. Muitas vezes é empregado juntamente com a solução desinfetante um produto tenso ativo com o intuito de quebrar a tensão superficial da água conferindo maior eficiência na atuação do desinfetante. Dentre as substâncias mais utilizadas para esse fim, destaca-se o Tween 20 % o qual é utilizado em pequenas quantidades (2-5 gotas/100ml). Após o término da desinfestação é recomendado à lavagem dos explantes para retirar os resíduos do desinfetante que permanecem atuando nos tecidos. Isso normalmente é feito através de enxágües consecutivos com água destilada, deionizada e esterilizada (ROCCA; MROGISKI, 1991).

O pré-tratamento das plantas matrizes, ou seja, das plantas que serão utilizadas como doadoras de explantes, também é rotineiramente utilizado como uma estratégia para se atingir esse objetivo, destacando-se aí termoterapia (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Principais características dos meios utilizados na inoculação dos explantes para o cultivo 'in vitro' de plantas

Conforme Krikorian (1991), as células vegetais necessitam de um grande número de substâncias orgânicas e inorgânicas para seu perfeito desenvolvimento. Os meios

utilizados na cultura de tecidos vegetais devem, *a priori*, fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento e diferenciação celular que irá culminar na regeneração de uma plântula (CALDAS et al., 1998). Ao longo dos estudos sobre meios de cultura diversas formulações de nutrientes foram utilizadas para aperfeiçoar a regeneração de tecidos *in vitro*. Contudo, atualmente, as mais utilizadas são as descritas por Murashige e Skoog em 1962 (MS) e por White em 1951 (CALDAS et al., 1998).

Os componentes dos meios de cultura deve ser sempre de qualidade superior para evitar que perdas de tempo e recursos financeiros durante a realização de um experimento. O principal constituinte dos meios de cultura é a água. Pierik (1990) ressalta que esta deve ser destilada e deionizada para evitar a contaminação do meio por compostos iônicos que podem reagir com os demais componentes dos meios formando substâncias tóxicas ou indisponibilizando nutrientes para o explante.

Além da água as soluções dos meios contém ainda:

* Macronutrientes: são os elementos exigidos em maior quantidade pelas plântulas sendo representados por; nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre e ferro. Todos adicionados na forma de sais inorgânicos sendo que o nitrogênio é o elemento exigido em maior concentração podendo ser adicionado na forma de orgânica (aminoácidos) e inorgânica (nitratos). O potássio entra normalmente, complexado com o nitrato ou fosfato. Com relação ao cálcio, é comum se observar deficiências desses elementos nas plântulas em função do mesmo apresentar baixa translocação dentro das plântulas.

* Micronutrientes: são elementos exigidos em menor concentração pelas plântulas. São representados pelo manganês, zinco, cloro, cobre, cloro e molibdênio. Normalmente a função destes elementos é permitir a realização de várias rotas metabólicas uma vez que geralmente são constituintes enzimáticos.

* Carboidratos: o carboidrato mais utilizado nos meios de cultura é a sacarose. Sua função é suprir a carência de carbono e energia dos explantes uma vez que nas condições de cultivo *in vitro* as plântulas não realizam fotossíntese de maneira eficiente.

* Vitaminas: são compostos orgânicos utilizados em baixas concentrações que desempenham a função de regular reações catalíticas do metabolismo celular.

* Fitorreguladores

Além das misturas minerais de macro e micronutrientes, os meios de cultura devem apresentar um perfeito balanço hormonal. Nesse sentido, diversas substâncias tem sido estudadas e utilizadas como promotores de crescimento e/ou desenvolvimento *in vitro*, dentre elas destacam-se as pertencentes ao grupo das auxinas e citocininas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; CALDAS et al., 1998). O correto balanço entre esses dois grupos de hormônios determina a rota de desenvolvimento que o explante vai seguir durante a permanência na cultura. As duas principais rotas organogênicas observadas no cultivo *in vitro* são: a organogênese direta e a indireta. Na primeira o explante origina um órgão diretamente sem passar por uma fase de calo enquanto na segunda, primeiro ocorre à formação de uma massa de células desorganizadas (calo) e posteriormente sobre essa ocorre a organogênese. Via de regra, quando esse balanço favorecer as auxinas o meio promove o enraizamento, já o balanço inverso promove a produção de parte aérea. A formação de calos, geralmente, é fruto de igual concentração entre os hormônios (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Como a via organogenética pode ser controlada pelo balanço auxina/citocinina, normalmente, observa-se a existência de um protocolo para cada fase de desenvolvimento da plântula *in vitro* (isolamento, multiplicação e enraizamento). A diferença básica entre cada um desses meios está no tipo e na concentração de auxina e citocinina utilizados.

* Material de suporte: o produto mais comumente utilizado como suporte é o Agar, um produto extraído de algas cuja única função é promover a gelificação do meio impedindo que os explantes “afundem” o que poderia ocasionar a morte por asfixia. Sua concentração pode variar de 0,6 até 1% e determina o estado físico do meio ou seja, na presença do Agar, o meio torna-se gelatinoso (sólido ou semi-sólido) e em sua ausência permanece líquido.

* Outros aditivos: o uso de misturas complexas de substâncias naturais ainda é feito para se obter êxito na cultura de tecidos de algumas espécies. É o caso por exemplo, da utilização de água de côco, extrato de banana, extrato de batata, etc.

Após o preparo do meio sua esterilização deve ser feito através da autoclavegem a 121°C (1,0 kg.cm²) por um período de 15 a 20 minutos (CALDAS et al., 1998; KRIKORIAN, 1991; TORRES, et al., 2004; TAIZ; ZAIGER, 2004).

Condições de incubação

De acordo com Torres et al. (2004) após o isolamento e inoculação dos explantes é fundamental que os mesmo sejam mantidos em condições adequadas de iluminação, temperatura e umidade.

* *Luz*: Grattapaglia e Machado (1998), salientam que as condições podem variar muito desde escuro total nos primeiros dias de cultivo até uma intensidade de 20 a 70 mmol.m⁻².s⁻¹, com um fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro. A intensidade e a qualidade da luz podem interferir significativamente nas taxas de multiplicação bem como na emissão de raízes em algumas culturas.

* *Temperatura*: vários trabalhos indicam que os processos morfogênicos exigem variações de temperatura diurno-noturna. Contudo na maioria dos laboratórios as temperaturas são mantidas constantes em função de trabalharem com várias espécies ao mesmo tempo e dos custos de manutenção uma vez que para simular temperaturas diferenciadas para as diferentes espécies faz-se necessária a disponibilidade de uma estrutura física (salas de cultura) maior. Assim, normalmente, as câmaras de cultivo são mantidas em uma temperatura média de 25°C (±2°C), a qual abrange um maior número de espécies.

* *Umidade relativa*: a umidade relativa interna dos frascos de cultivo é um fator bastante importante principalmente, em função da ocorrência de vitrificação (hiperhidraticidade) que ocorre devido à alta umidade relativa que impede a liberação da água pelos tecidos das plântulas uma vez que a umidade relativa pode chegar a níveis superiores a 98% (TORRES et al., 2004).

2.4.1.3 Etapa II: multiplicação dos propágulos in vitro

A fase de multiplicação representa a fase de propagação massal propriamente dita. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a fase de multiplicação tem por objetivo

produzir o maior número de plântulas em menor tempo possível. Eles ressaltam ainda dois pontos fundamentais para determinar o sucesso na multiplicação de uma espécie: 1) não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes e baixa em outros, deve-se obter taxas satisfatórias de modo geral sem muita variação de um explante para outro. 2) as partes aéreas produzidas devem ter qualidade e apresentar a maior uniformidade possível pois isso determina o sucesso da fase de enraizamento.

Via de regra três pontos são fundamentais para a fase de multiplicação:

a) a composição do meio de cultura: como já é conhecido a composição dos meios utilizados na fase de multiplicação vai depender da espécie que está sendo cultivada. Contudo, diversos trabalhos demonstram que variações na composição dos componentes do meio (macronutrientes e fonte de carbono). Durante a fase de multiplicação as citocininas são indispensáveis uma vez que quebram a dominância apical induzindo a proliferação de gemas axilares. Geralmente, sua concentração varia de 0,1 a 5,0 mg.L⁻¹. Por outro lado, a concentração de auxinas é sempre baixa, visando manter um balanço auxina/citocinina menor que “um”, sendo representada geralmente pelo ácido naftalenoacético (ANA). Foi verificado também a influência do estado físico do meio, sendo que no meio sólido as culturas apresentam maior sucesso do que aquelas mantidas em meio líquido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

b) as condições ambientais do crescimento: a fase de multiplicação representa a mais longa dentro do processo de cultivo *in vitro* de plantas. Assim, fica mais sujeito a influência das variações ambientais principalmente no que se refere à disponibilidade de luz, variações de temperatura, umidade relativa, etc. O tipo de vedação dos frascos interfere diretamente na vitrificação dos explantes devido ao aumento ou diminuição das trocas gasosas.

c) os cuidados na manipulação do material durante os subcultivos: esse fator pode interferir na taxa de multiplicação de duas maneiras: 1) O número de plântulas formadas pode estar relacionado com que o manipulador efetua os subcultivos. Ou seja, trabalhos demonstram que manter as plântulas em pequenas touceiras faz com que estas se desenvolvam mais uniformemente do que plântulas isoladas devido ao alto estresse a que são submetidas a cada subcultivo. 2) A contaminação dos explantes nessa fase, geralmente, está relacionado com a falta de cuidado do operador, quer seja

por descuido da assepsia das mãos e/ou instrumentos usados na manipulação das plântulas ou pela não visualização da contaminação de um frasco levando-o a ser subcultivado. Nesse sentido, Grattapalia e Machado (1998), salientam que todos os frascos oriundos de um frasco que esteja contaminado, tendem a apresentar o mesmo tipo de contaminação.

2.4.1.4 Etapa III: Enraizamento das plântulas obtidas e aclimatização

* O *enraizamento*: essa etapa caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas plântulas obtidas durante a fase de multiplicação, deixando-as aptas para o transplântio no ambiente *ex vitro*. A qualidade das partes aéreas produzidas na fase de multiplicação interfere no enraizamento.

O enraizamento pode ser feito de duas formas *in vitro* ou *ex vitro*. A) *In vitro* - as plântulas são individualizadas e inoculadas em uma meio específico para que a emissão de raízes ocorra sob as condições do laboratório. B) *Ex vitro* - após a individualização das plântulas, cada uma é utilizada como se fosse uma micro estaca e o enraizamento propriamente dito se dá em uma estufa ou casa de vegetação.

A) Enraizamento *in vitro*: o processo de rizogênese (formação de raízes) ocorre, em média, entre três e quatro semanas de cultivo no meio de enraizamento e pode ser dividida em três etapas: a indução, a iniciação e o alongamento. A grande dificuldade encontra-se na determinação das condições ambientais (*in vitro*) para que cada uma destas etapas possa ocorrer normalmente (incluindo-se aqui o meio de cultura e as condições de incubação).

Da mesma forma que na fase de multiplicação, a composição do meio utilizado para o enraizamento pode variar de acordo com a espécie estudada. Contudo normalmente são utilizados meio com a concentração de sais reduzidos (1/2 MS, 1/3MS, etc.), porém, os níveis de sacarose são mantidos iguais ao da multiplicação já que a rizogênese é um processo que demanda muita energia. Diversas auxinas têm sido testadas tendo sua concentração variada de acordo com a espécie em estudo. A utilização de carvão ativado no meio demonstra ser bastante útil principalmente no que diz respeito à terceira fase da rota rizogênica (o alongamento), uma vez que este fixa a

auxina que se torna inibitória para essa etapa. Além da ação química o carvão ativado tem se mostrado benéfico, pois promove o escurecimento do meio tornando-o mais parecido com o substrato. Por conseqüência, as raízes formadas apresentam uma coloração mais clara do que aquelas originadas em meio sem carvão ativado.

As condições ambientais utilizadas para o enraizamento *in vitro* são semelhantes às usadas na fase de multiplicação, contudo, é relatado modificações na luminosidade podendo até mesmo ser mantido os frascos no escuro por alguns dias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

B) Enraizamento *ex vitro*: a possibilidade de eliminar a fase de enraizamento dentro do laboratório é bastante interessante do ponto de vista econômico, tanto em material e mão de obra como melhor aproveitamento dos espaços dentro da câmara de cultura. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), enraizamento *ex vitro* é sinônimo de utilização de microestacas. Contudo, a utilização destas plântulas requer alguns cuidados. Pierik (1990), chama atenção para algumas características que são importantes para a obtenção de êxito nesse processo, a primeira delas é o fato de que as plântulas obtidas *in vitro* diferem em muitos aspectos daquelas obtidas *in vivo*, como por exemplo, não possuem cutina (camada de cera que protege o tecido da perda excessiva de água), as raízes formadas são pouco funcionais (devido à ausência de pêlos absorventes), não apresentam estômatos funcionais (em função da alta umidade relativa dentro do vidro), etc. Assim, para a obtenção de êxito na aclimatização *ex vitro* deve-se utilizar estufas ou casas de vegetação dotada de um sistema de irrigação eficiente bem como, de um sistema que garanta a manutenção de uma umidade relativa do ar em níveis altos. Contudo, muitos estudos deverão ser feitos acerca deste assunto, Bosa et al. (2003) comparou o enraizamento de plântulas de *Gypsophila paniculata in vitro* e *ex vitro* e concluiu que para essa variedade não é possível eliminar a fase de enraizamento *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento I

3.1.1 Material vegetal:

3.1.1.1 Tratos culturais das plantas doadoras de explantes

Para a realização deste experimento foram utilizadas plantas oriundas de matrizes cultivadas a campo no município de Vacaria RS (Figura 3).



Figura 3 – A) Plantas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. *Vacaria*, mantidas a campo no município de Vacaria RS. B) Plantas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. *Vacaria*, mantidas na estufa do laboratório de cultura de tecidos. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal/IFRS - Campus Sertão, 2009

As plantas doadoras de explantes, foram transplantadas no dia 10/08/06 e mantidas em potes plásticos com capacidade volumétrica de cinco litros. O substrato constou de casca de arroz e areia grossa na proporção de 50% de cada. Os potes contendo as plantas doadoras, foram mantidos em estufa climatizada, sobre bancada e

sendo periodicamente adubados com adubo químico (NPK 5-20-20) diluído em água. A irrigação foi feita manualmente sempre que necessária. A realização de tratamento fitossanitário, foi feito manualmente com auxílio de um pulverizador manual e constou de aplicações quinzenais de fungicida (Mancozeb na dose de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ do produto comercialmente conhecido por DITHANE) e inseticida (Malathion na dosagem de $5,0 \text{ mL.L}^{-1}$ produto comercialmente conhecido por MALATOL).

3.1.1.2 Limpeza dos segmentos

As hastes doadoras dos explantes, foram cortadas das plantas matrizes e levadas ao laboratório de cultura de tecidos e citogenética vegetal IFRS-Campus Sertão, onde realizou a retirada das folhas e da matéria excedente (caule desprovido de gemas, folhas secas, capítulos florais, etc.). Em seguida, os segmentos foram colocados em frascos de vidro com tampa para posteriormente serem levados à câmara de fluxo laminar na qual se realizou desinfestação.

3.1.1.3 Desinfestação química dos segmentos

A desinfestação constou de um rápido mergulho dos segmentos em álcool 70% (cerca de 10 segundos). Após, foi efetuado o descarte do álcool e os segmentos foram submersos em cinco frascos com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (produto comercial conhecido por MAZZAROLO, contendo de sete a nove por cento de cloro ativo) com a adição de Tween 20% (duas gotas para cada 100 ml). As concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas foram 10, 20, 30, 40, e 50% da solução comercial. Também foram avaliados diferentes tempos de permanência dos segmentos em cada uma das cinco soluções (5, 10, 15, 20 e 25 minutos). Assim, em cada um dos cinco frascos das diferentes concentrações, os segmentos permaneceram em constante agitação durante os tempos acima citados. Decorrido cada um dos tempos, retirou-se aleatoriamente cinco segmentos e realizou-se a lavagem dos mesmos por quatro vezes com água destilada, deionizada e esterilizada.

3.1.1.4 Isolamento dos explantes

Após o término da lavagem de todos os segmentos, realizou-se a retirada dos meristemas, com auxílio de esteromicroscópio binocular, placas de Petri, pinças e bisturis, sob fluxo laminar (Figura 4).



Figura 4 – Isolamento dos ápices caulinares de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria. Lab. de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal / IFRS-Campus Sertão, 2009

Os meristemas medindo cerca de 0,5 mm foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20ml de meio de cultura. Não foi levado em conta o posicionamento do meristema ao longo da haste. Para esse trabalho utilizou-se o meio de isolamento descrito por Kusey, Hammer e Weiler (1980) para *Gypsophila paniculata*, o qual é constituído pelos sais do MS (ANEXO I), acrescido de 1,0 mg.L⁻¹ de 6-Benzilaminopurina (BAP) + 0,1 mg.L⁻¹ de Ácido Giberélico (GA₃) + 0,01 mg.L⁻¹ de Ácido Naftaleno Acético (ANA) + 30 g.L⁻¹ de Sacarose e 7,0 g.L⁻¹ de Agar. O pH do meio foi ajustado antes da autoclavagem em 5,9. Para os experimentos foi utilizado o meio MS adquirido pronto da SIGMA e ajustado de acordo com o protocolo descrito.

Os tubos de ensaio devidamente fechados foram levados à câmara de cultivo *in vitro* onde permaneceram no escuro durante sete dias, sob uma temperatura de 25°C

($\pm 2^{\circ}\text{C}$). Decorrido esse período, os tubos contendo os explantes foram colocados na luz sob um fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro.

3.1.1.5 Delineamento estatístico

O delineamento experimental adotado foi completamente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5 (cinco concentrações de hipoclorito x cinco tempos de permanência) totalizando 25 tratamentos, sendo que para cada um dos tempos dentro de uma concentração haviam cinco repetições (tubos com um explante cada), totalizando 125 unidades experimentais; todos dispostos ao acaso. As variáveis analisadas foram a percentagem de contaminação e necrose aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Os resultados foram submetidos a análise de variância e sendo significativo ao nível de 5% de probabilidade foram ajustados através de equações de regressão e as médias apresentadas graficamente.

3.2 Experimento II

3.2.1 Material vegetal

Para esse experimento utilizou-se plântulas cultivada *in vitro* oriundas do experimento 1. Os explantes iniciais, com 30 dias de cultivo *in vitro* (Figura 5 A) foram transferidos dos tubos de ensaios para frascos de vidro com capacidade para 268 mL, contendo aproximadamente 20 mL do meio de multiplicação descrito por Kusey; Hammer e Weiler (1980). Esse meio é constituído pelos sais do MS acrescido de 0,4 mg.L⁻¹ de Tiamina HCl + 100 mg.L⁻¹ de Mio-Inositol + 0,05 mg.L⁻¹ de Ácido Naftaleno Acético (ANA) + 1,0 mg.L⁻¹ de 6-Benzilaminopurina (BAP) + 40 g.L⁻¹ de Sacarose e 7,0 g.L⁻¹ de Agar. O pH do meio foi ajustado antes da autoclavagem em 5,9.

3.2.2 Subcultivos

Em cada frasco foram colocadas as plântulas oriundas de cada um dos tempos de permanência na solução de hipoclorito de sódio do experimento anterior, de tal forma que, o número máximo de plântulas por frasco não ultrapassou a cinco (Figura 5B). Foi mantida a identificação da origem das plântulas, ou seja, a qual concentração de hipoclorito elas foram submetidas durante o processo de desinfestação. No total, 105 plântulas foram inoculadas no meio de multiplicação, as quais foram alojadas em 25 frascos identificados como S0 (Subcultivo 0), os quais foram distribuídos nas prateleiras da sala de cultivo totalmente ao acaso.

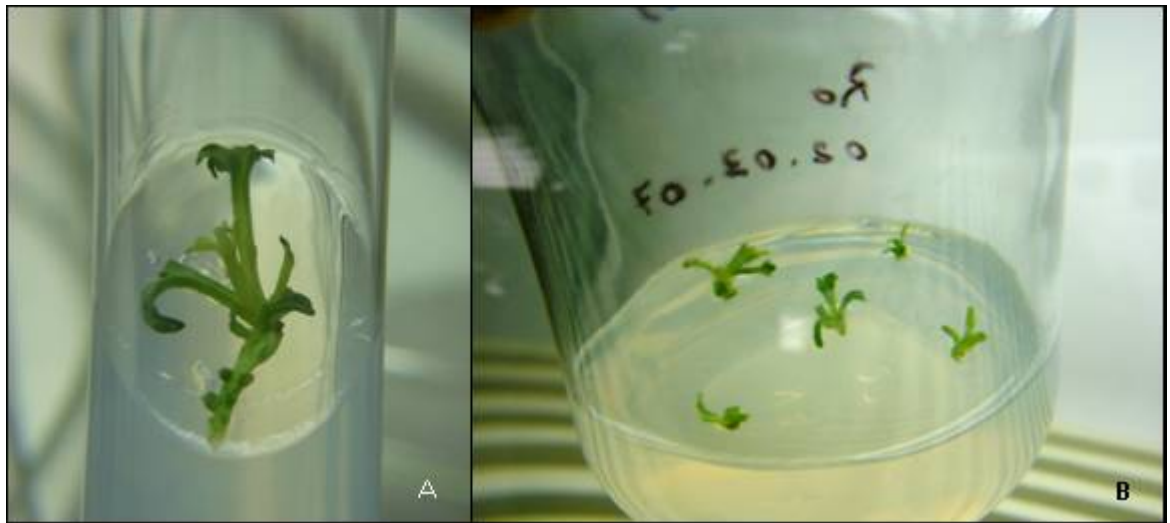


Figura 5 – A) Plântula de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria aos 30 dias de cultivo *in vitro*. B) Esquema da distribuição das plântulas dentro dos frascos durante os subcultivos. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal - IFRS-Campus Sertão, 2009

Os explantes foram mantidos na câmara de cultura a uma temperatura de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e um fotoperíodo de 16 horas de luz / 08 horas de escuro. Semanalmente efetuou-se a avaliação visual dos frascos a fim de determinar as taxas de necrose, contaminação e formação de estruturas amorfas (calos, deformações, etc.) dentro do intervalo de cada subcultivo.

Ao todo foram efetuados dois subcultivos com um intervalo de 60 dias entre cada um deles sendo denominados S1 e S2, respectivamente. Durante o processo das repicagens do material, foi avaliado o número de plântulas que: apresentavam necroses, originaram estruturas amorfas, apresentaram contaminações e encontravam-se viáveis no momento da repicagem, o qual foi expresso em porcentagem. Também se avaliou o número de brotos obtidos de cada plântula que havia sido transferida para o meio de multiplicação e o comprimento médio (em cm) das plântulas formadas (Figura 6). A taxa de multiplicação foi obtida pela divisão do número total de plântulas obtidos em cada frasco, pelo número de plântulas colocadas inicialmente no mesmo.

Os dados referentes ao percentual de necrose, percentual de estruturas amorfas, percentual de plântulas viáveis, taxa de multiplicação e comprimento médio dos brotos foram submetidos à análise de variância. Para isso utilizou-se o pacote estatístico SAS V8, e sendo significativo ao nível de 5% de probabilidade foram ajustados através de equações de regressão e as médias apresentadas graficamente.

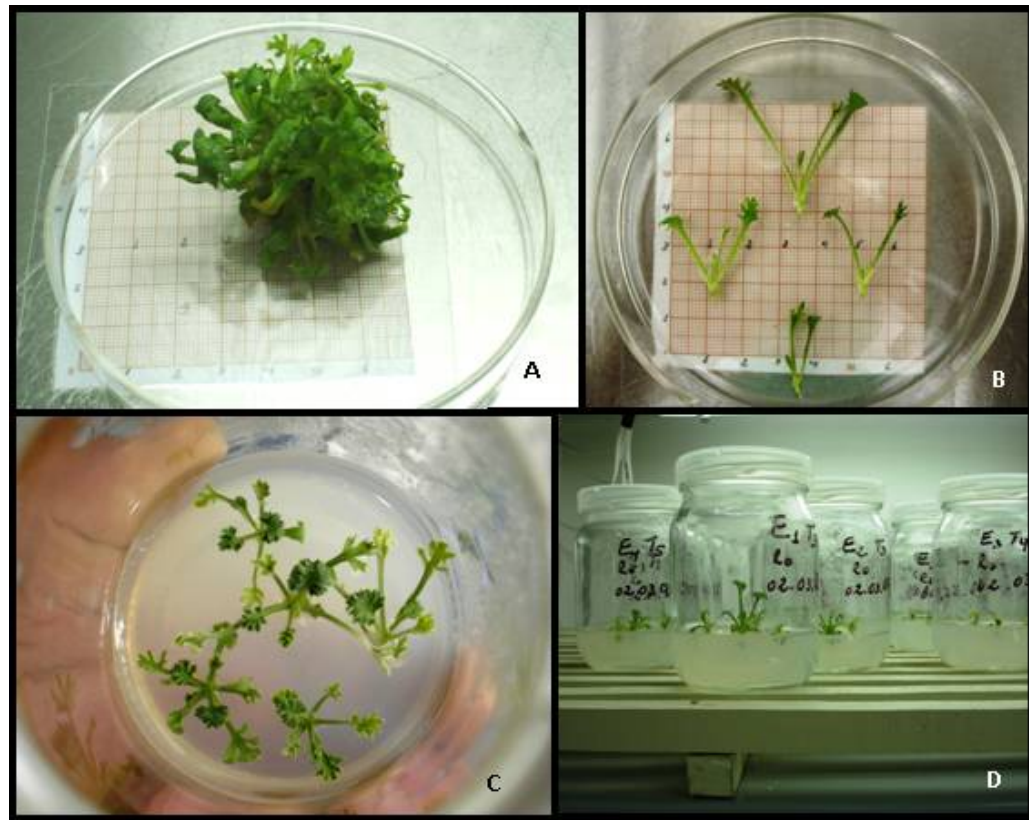


Figura 6 – A) Touceira de plântulas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria obtidas após 60 dias de cultivo *in vitro*. B) Esquema da medição dos brotos formados durante a realização dos subcultivos. C) Disposição das plântulas dentro dos frascos para multiplicação. D) Disposição dos frascos nas prateleiras da câmara de cultura. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal / IFRS-Campus Sertão, 2009

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I

Através dos resultados obtidos neste experimento verifica-se um baixo índice de contaminação, bem como de necrose dos explantes. Conseqüentemente, a porcentagem de sobrevivência aos 30 dias de cultivo foi alta variando de 72 a 96% dos 125 meristemas inoculados, com uma média de 84% (Figura 7).

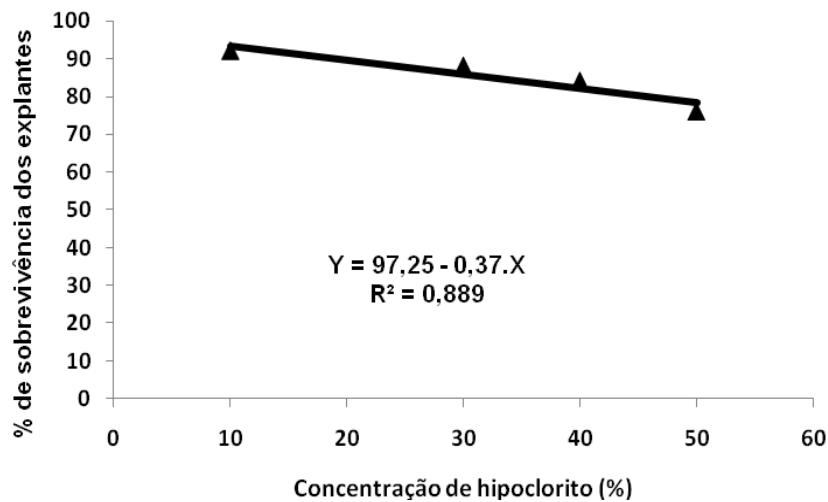


Figura 7 – Taxa de sobrevivência dos explantes de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal / IFRS-Campus Sertão, 2009. $F_{\text{regressão linear}} = 16,01$, significativo em nível de 5% de probabilidade. Símbolos representam os valores originais médios dos tratamentos e a linha representa a regressão linear, cuja equação está representada no gráfico

Pode-se observar também na Figura 7 que, na medida em que aumentou a concentração de hipoclorito na solução utilizada para a desinfestação, houve declínio nas taxas de sobrevivência até os 30 dias de cultivo *in vitro*. Isso pode estar relacionado a dois fatores básicos: 1) após o isolamento, os explantes passam por um período crítico no qual, eles devem se adaptar às novas condições fisiológicas que o cultivo *in vitro* proporciona. Nesse sentido, Villalobos e Thorpe (1991), salientam que os explantes, uma vez isolados do resto da planta, têm seu metabolismo celular alterado

principalmente, no que diz respeito ao seu balanço hormonal interno. O aumento da concentração de hipoclorito de sódio na solução utilizada para a desinfestação pode provocar intoxicação dos tecidos vegetais, retardando o desenvolvimento ou até mesmo, provocando necrose quando a concentração for excessiva e/ou o tecido utilizado como explante for muito tenro.

O efeito negativo da alta concentração de hipoclorito de sódio pode ser observada também nas Figuras 8 e 9. Na primeira, observa-se que a porcentagem de necrose aumenta à medida que aumenta o tempo de permanência dos explantes nas soluções do desinfetante. Na segunda, observa-se como se apresentam os explantes necrosados. Efeito semelhante foi observado por Ferreira e Ranal (1999), quando utilizaram hipoclorito de sódio na escarificação de sementes de uma variedade de *Brassica chinensis* L. (couve-da-malásia). Borges et al. (2005) observaram que o hipoclorito pode provocar alterações em nível cromossômico o que resulta na redução do índice de divisão celular em *Allium cepa*. Esse fator aliado a toxidez provocada pela atividade do cloro, poderiam explicar os resultados obtidos para essa variável nesse experimento.

Por outro lado, Moraes, Almeida e Cazé Filho (2007), ressaltam que o aumento na concentração de hipoclorito de sódio bem como, do tempo de permanência dos explantes na solução, torna o processo de desinfestação mais eficaz. Nesse sentido, Domini et al. (2005), relatam que na desinfestação de lâminas foliares em antúrios, a supressão do hipoclorito ocasionou contaminação de 100% do material. Assim, fica claro que o grande desafio da cultura de tecidos é conseguir a eliminação dos microrganismos contaminantes sem promover a morte dos explantes.

Com relação à variável contaminação, os resultados obtidos nesse experimento demonstram que quanto menor a concentração de hipoclorito na solução desinfetante maior a porcentagem de contaminação. Contudo, a partir da concentração 30% não houve mais registro de contaminações microbianas (Tabela 1).

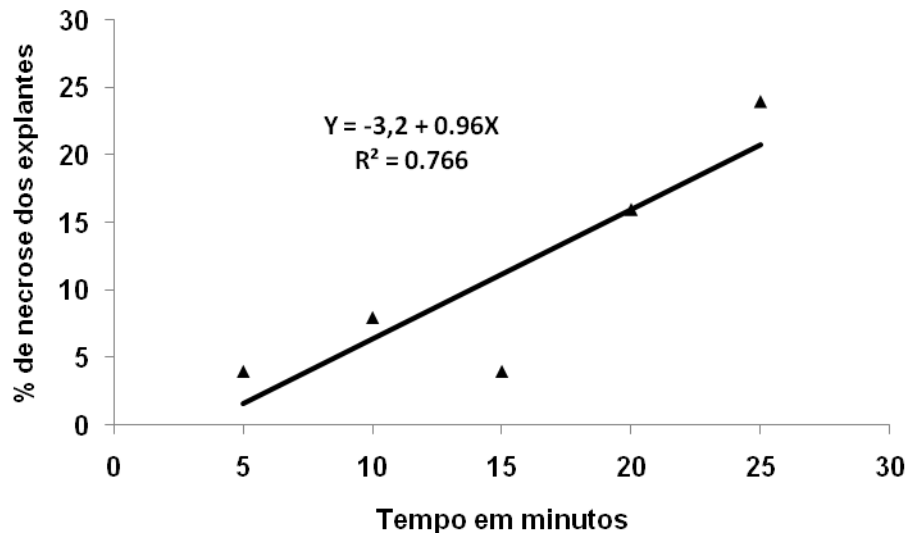


Figura 8 - Porcentagem de necrose dos explantes de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, quando submetidos a diferentes tempos de permanência em solução de hipoclorito de sódio. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal/IFRS-Campus Sertão, 2009. $F_{\text{regressão linear}} = 9,81$, significativo em nível de 5% de probabilidade. Símbolos representam os valores originais médios dos tratamentos e a linha representa a regressão linear, cuja equação está representada no gráfico

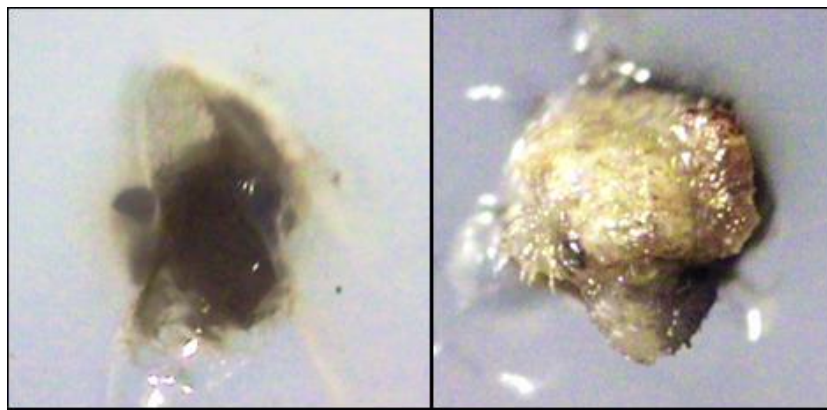


Figura 9 - Aspectos dos explantes necrosados de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal/IFRS-Campus Sertão, 2009

Tabela 1 – Porcentagem de contaminação dos explantes de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio independente do tempo de permanência. Lab. de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal/IFRS-Campus Sertão, 2009

Concentração de hipoclorito	Meristemas inoculados	Contaminação aos 30 dias (%)	Total de contaminação (%)
10%	25	8	16
20%	25	4	8
30%	25	0	0
40%	25	0	0
50%	25	0	0

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Moraes, Almeida e Cazé Filho (2007), os quais observaram que na desinfestação de gemas axilares de abacaxizeiro, a taxa de contaminação decaiu à medida que se aumentou a concentração de hipoclorito e o tempo de permanência dos explantes na solução. Resultados semelhantes foram obtidos por Nietsche et al. (2006), os quais constataram que a utilização de álcool e hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes de bananeira promoveu queda significativa de contaminação.

4.2 Experimento II

De modo geral, foi constatado um alto índice de multiplicação dentro da espécie *C. cinerariaefolium* cv Vacaria. Foram inoculadas 105 plântulas no meio de multiplicação, as quais produziram 352 novas plântulas que foram levadas para o subcultivo 01 (S1). Estas por sua vez originaram 1.391 plântulas no subcultivo 02 (S2) (ANEXO II, III e IV). Assim, após efetuar o primeiro subcultivo (S1) pôde-se observar que o número de brotos formados para cada plântula inoculada em S0 (início do experimento), foi de 3,8 (352/105) e no segundo subcultivo (S2) foi de 4,8 (1.391/352). Calculando-se o índice geral de brotos formados por plântula inoculada, pode-se

constatar que o número de brotos formados por explante foi de 4,3. Esse resultado foi superior ao obtido por Chagas et al. (2004), os quais testaram várias concentrações de auxinas (ANA) e citocininas (BAP) na multiplicação *in vitro* da cultivar de crisântemo cv. *White Polaris*, obtendo 2,45 brotos por explante inoculado. Resalta-se que é particularmente interessante promover a rápida propagação desta espécie. Grewal e Sharma (1978) salientam que a cultura de ápices caulinares representa uma forma eficaz de produzir mudas de *C. cinerariaefolium* uma vez que aumentam significativamente as taxas de multiplicação. Isso se torna importante em espécies que não produzem ou produzem sementes que sejam estéreis (GREWAL; SHARMA, 1978; FUJII; SHIMIZU, 1990), como ocorre no *C. cinerariaefolium* Vis. cv. *Vacaria*, que por essa razão é multiplicada apenas vegetativamente através de métodos convencionais (divisão de touceiras, estacas, etc.).

A análise de variância indicou influência da concentração do hipoclorito utilizado na desinfestação dos explantes iniciais sobre a porcentagem de necrose durante os subcultivos. O teste de Duncan a 5% (ANEXO E) apontou diferenças significativa na taxa de necroses nas plântulas oriundas dos explantes que foram submetidos à solução de 50% de hipoclorito (Figura 10) mostrando assim, que a influência da assepsia química dos explantes não se limita apenas ao período de adaptação ao meio (± 15 dias), podendo afetar todo o processo de micropropagação.

Por outro lado, com relação à porcentagem de estruturas amorfas (Figura 11) não foi constatada influência da concentração do hipoclorito de sódio bem como do tempo de permanência dos explantes nas diferentes concentrações. Isso pode ser explicado pelo fato de que essa variável é mais dependente de fatores ligados ao meio de cultura como por exemplo o balanço hormonal (auxina x citocinina) (HINOJOSA, 2005). Foi constatado a ocorrência de vitrificação (hiperhidricidade) durante os subcultivos, mas essa alteração fisiológica parece estar mais relacionada à concentração dos compostos do meio de cultura, a carência de trocas gasosas entre os tecidos e o ambiente e a alta umidade relativa no interior do frasco (TORRES et al., 2000).

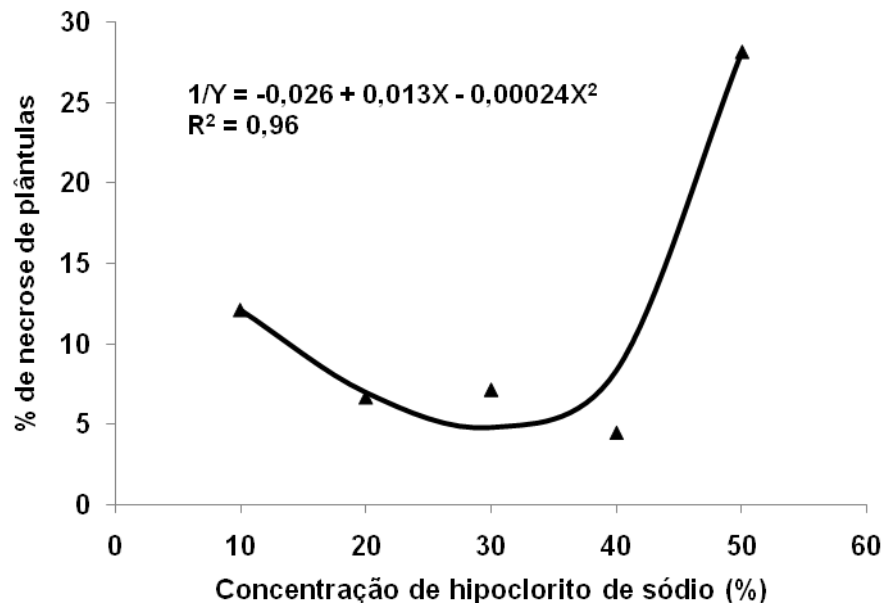


Figura 10 – Influência da concentração do hipoclorito de sódio na porcentagem de necrose durante o subcultivo de plântulas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria. Letras iguais não diferem pelo teste de Duncan a 5%. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal / IFRS - Campus Sertão, 2009. $F_{\text{regressão}} = 22,58$, significativo em nível de 5% de probabilidade. Símbolos representam os valores originais médios dos tratamentos e a linha representa a regressão linear, cuja equação está representada no gráfico

Com relação à porcentagem de contaminação, os índices obtidos foram baixo, não apresentando influência significativa sobre o percentual de plântulas produzidas. Conforme Grattapaglia e Machado (1998), isso se deve ao fato de que a contaminação dos frascos de cultura durante a fase de multiplicação, a princípio, encontra-se mais relacionada com os cuidados do manipulador durante a realização dos subcultivos, do que a interferências intrínsecas dos explantes.

Não foi constatada influência das concentrações de hipoclorito de sódio e dos diferentes tempos de permanência dos explantes na porcentagem de explantes viáveis. Porém, no que se refere ao número de brotos formados por plântula inoculada, os dados apontaram influência da concentração de hipoclorito e do tempo de permanência separadamente (Figuras 12 e 13).

O número de brotos formados nas plântulas oriundas de explantes teve um pico de produção em torno da concentração de 30% de hipoclorito de sódio durante a assepsia (Figura 12) (ANEXO F). De acordo Domini et al. (2005), isso deve estar relacionado com o fato de que em concentrações baixas de hipoclorito de sódio na desinfestação, a porcentagem de contaminações aumenta reduzindo o número de explantes que entraram na fase de multiplicação. Por outro lado, quando a concentração superou 30% o residual deixado pelo hipoclorito pode ter interferido no índice de brotos de forma significativa. Essa deve ser a razão do teste ter revelado que o tempo de permanência dos explantes nas diferentes concentrações influencia no índice de brotos formados/explante inoculado (Figura 13).



Figura 11 - Estruturas amorfas observadas no cultivo *in vitro* de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria Lab. de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal/IFRS-Campus Sertão, 2009.

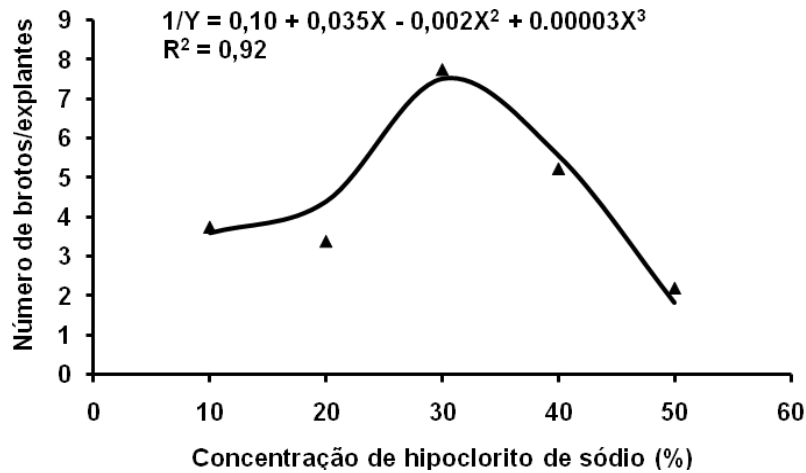


Figura 12 – Número de brotos formados por explante inoculado nas plântulas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria oriundas das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. $F_{\text{regressão}} = 8,25$, significativo em nível de 5% de probabilidade. Símbolos representam os valores originais médios dos tratamentos e a linha representa a regressão linear, cuja equação está representada no gráfico

Da mesma forma, houve diferença significativa dos dois fatores sobre o comprimento médio dos brotos (Figura 14). Pode-se observar que as melhores médias de comprimento de brotos foi em torno da concentração de 30% coincidindo com o resultado para a variável número de brotos formados por plântula inoculada. Da mesma forma que ocorreu na variável número de brotos, as maiores médias de comprimento de brotos foram obtidas nos menores tempos de permanência dos explantes nas soluções de hipoclorito (5, 10 e 15 minutos) (Figura 15). Portanto, as variáveis número de brotos formados/plântula inoculada e comprimento dos brotos parecem sofrer a mesma influência no que se refere à concentração de hipoclorito e o tempo de exposição ao mesmo (ANEXO G).

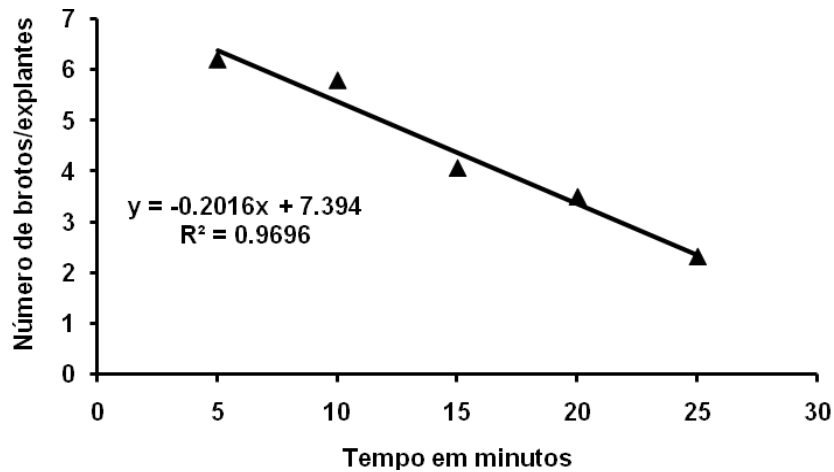


Figura 13 – Número de brotos formados por explante inoculado nas plântulas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria oriundas dos diferentes tempos de permanência em assepsia. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal / IFRS-Campus Sertão, 2009. $F_{\text{regressão linear}} = 95,63$ significativo em nível de 5% de probabilidade. Símbolos representam os valores originais médios dos tratamentos e a linha representa a regressão linear, cuja equação está representada no gráfico

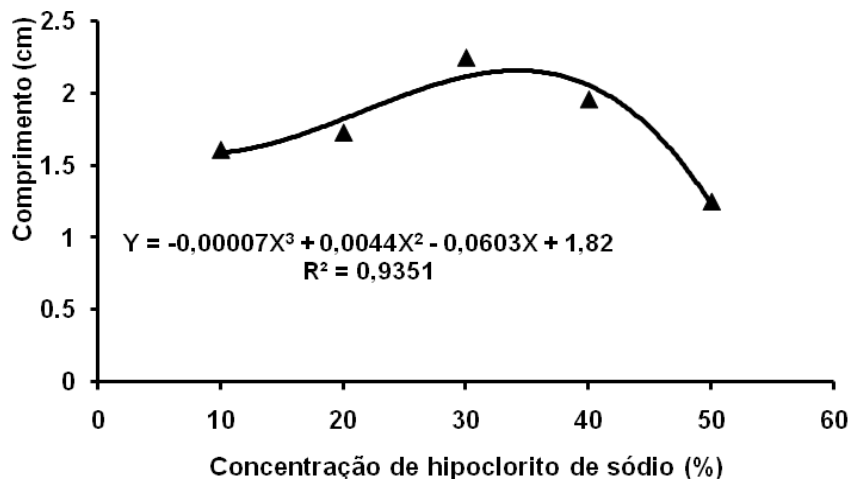


Figura 14 – Média de comprimento das plântulas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria; A) oriundas das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal / IFRS-Campus Sertão, 2009. $F_{\text{regressão}} = 9,60$, significativo em nível de 5% de probabilidade.

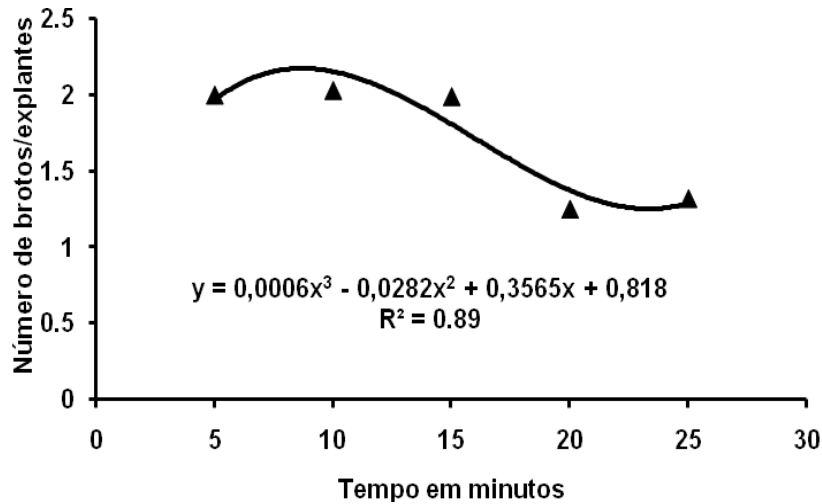


Figura 15 – Média de comprimento das plântulas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria; oriundas dos diferentes tempos de permanência em assepsia. Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal / IFRS-Campus Sertão, 2009. $F_{\text{regressão}} = 7,77$, significativo em nível de 5% de probabilidade. Símbolos representam os valores originais médios dos tratamentos e a linha representa a regressão linear, cuja equação está representada no gráfico

4.3 Considerações finais

A realização deste trabalho gerou vários questionamentos interessantes que mesmo sem terem sido mensurados merecem atenção em virtude da importância que demonstraram.

I - Embora se tenha obtido uma taxa de multiplicação satisfatória (4,3 brotos/plântula inoculada) a qual permitiria a obtenção de mais de 60.000 plântulas em um ano, (partindo-se de um único meristema caso esse fosse mantido até o sétimo subcultivo, o que normalmente, é recomendado para a micropropagação), faz-se necessário trabalhos posteriores, acerca de um protocolo mais eficaz para a micropropagação desta espécie. Esta observação está fundamentada no fato de ter sido observado na pesquisa a ocorrência de um longo período de adaptação ao meio

entre um subcultivo e outro (cerca de 40 dias) antes de ocorrer o desenvolvimento das plântulas no meio de multiplicação.

II - Próximo aos 60 dias de cultivo, pôde-se observar sintomas de carência nutricional nas brotações produzidas, principalmente no ápice (ANEXO H - A), indicando claramente a necessidade de ajustes no protocolo, já que isso é comum na cultura de tecidos (TORRES et al., 2004).

III- Foi constatado grande carência de informações sobre a biologia da planta, por se tratar de um material que praticamente sobreviveu sozinho ao longo de anos e, os poucos exemplares desta variedade, são frutos de uma longa adaptação a um ambiente totalmente diferente do seu centro de origem o que lhe agregou características bem diferenciadas das observadas nas variedades cultivadas em outras regiões do mundo. Por conta disso, os resultados obtidos nesse trabalho são inéditos pois é a primeira vez que se relata a tentativa de micropropagar esta espécie em nível de Brasil, já que os trabalhos encontrados na literatura foram realizados próximos aos centros que ainda utilizam esta espécie para fins de produção de inseticidas naturais.

IV – Durante a realização dos experimentos observou-se respostas diferenciadas nas taxas de multiplicação dos explantes dentro de um mesmo frasco, de tal modo que, alguns explantes simplesmente não formaram nenhum broto enquanto outro apresentava alta taxa de multiplicação. Além disso, o comprimento dos brotos também variou muito de explante para explante (ANEXO H - B). Como os fatores ambientais são uniformes e, a princípio, não há variação genotípica, resta o questionamento sobre que fator poderia estar atuando sobre esse explante, mesma observação pode ser feita com relação ao comprimento dos brotos.

A elucidação dessas questões poderão, embasar programas de melhoramento genético para a espécie tornando-a apta para competir com outras variedades de crisântemo já existentes no mercado brasileiro.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa é possível concluir que, a espécie *C. cinerariaefolium* Vis. cv. *Vacaria* responde positivamente ao cultivo *in vitro*.

A porcentagem de necroses aumenta à medida que aumenta a concentração da solução de hipoclorito de sódio utilizada na desinfestação e o tempo de permanência dos explantes na mesma. Porém, quanto menor a concentração de hipoclorito e tempo de permanência maior a porcentagem de contaminação.

A concentração da solução de hipoclorito de sódio bem como, o tempo de permanência dos explantes nessa solução afetam o número e o comprimento dos brotos formados durante os subcultivos.

A concentração que apresentou os melhores resultados para as variáveis analisadas foi em torno de 30% quando utilizado um tempo máximo em torno de 15 minutos.

REFERÊNCIAS

- BORGATTO, F.; DIAS, C.T.S.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Calcium, potassium and magnesium treatment of *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” and callogenesis *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.4, p.689-693, out./dez. 2002.
- BORGES, C.S.; CATTELAN, L.V.; VARGAS, D.P.; BOBROWSKI, V.L. Avaliação citóxica de formol e hipoclorito de sódio utilizados na desinfestação de sementes em cultura de tecidos de plantas. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2005, Pelotas. Disponível em: <www.ufpel.edu.br/cic/2005/arquivos/conteudo_CB.html>. Acesso em: 05 jan. 2009.
- BOSA, N.; CALVETTE, E.O.; NIENOW, A.A.; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 207-210, abr./jun. 2003.
- BRAGA, F.T. **Ambiente de cultivo na propagação in vitro de Crisântemo (*Dendranthema grandiflora* TZVELEV CV. RAGE): características anatômicas e fisiológicas**. 2006. 119 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- BUAINAIN, M.; BATALHA, M.O. **Cadeia produtiva de flores e mel**. Brasília: IICA; MAPA, SPA, 2007. 140 p. (Série Agronegócio, 9).
- 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: EMBRAPA-Serviço de Produção de Informação/EMBRAPA-CNPH, 1998. Vol. 1, p.87-132.
- CHAGAS, E.A.; FRÁGUAS, C.B.; SILVA, E.F.; PASQUAL, M.; MENDONÇA, V.; Multiplicação *in vitro* de crisântemo cv. White Polaris. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10; n. 1, p. 123–126, jan./mar. 2004.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978. v. 5, 687 p.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants: with a new foreword**. New York: Columbia University, 1987. 1262 p.
- DOMINI, L.P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J. A.; VIÉGAS, J.; Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517–522, 2005.

FERREIRA, W.R.; RANAL, M. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Brassica chinensis* L. Var. *Parachinensis* (Bailey) Sinskaja (couve-da-malásia). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; Brasília, v. 34, n. 3, p. 353-361, 1999.

FRANÇA, C.A.M.; MAIA, M.B.R.; Panorama do agronegócio de flores e plantas ornamentais no Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: SOBER, 2008. p. 761-700.

FUJII, Y.; SHIMIZU, K. Regeneration of plants from achenes and petals of *Chrysanthemum coccineum*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, p. 625–627, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p.183–260.

GREWAL, S.; SHARMA, K. Pyretrum Plant (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis) Regeneration from Shoot Tip Culture. Short Communications. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 16, p. 1119-1121, 1978.

GRIOLLI, P.R. Propagação de plantas ornamentais. In: PETRY, C. **Plantas ornamentais: aspectos para a produção**. 2. ed. Passo Fundo. Ed. Universidade de Passo Fundo, 2008. p. 59–69.

HINOJOSA, G.F. Auxinas em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: BARRUETO CID, L.P. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2005. p. 15–57.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro* – uma realidade. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30–33, 1997.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 41–59.

KUSEY, W.E.; HAMMER, A.P.; WEILER, T.C. *In vitro* propagation of *Gypsophila paniculata* L. “Bristol fairy”. **HortScience**, Stanford, v. 15, n. 5, p. 600–601, 1980.

- LEVY, L.W.; LEVY, P.E. Propagation masiva de piretro y guanto mediante el cultivo de tejidos. In: ROCCA, W.M.; MROGISKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: CIAT, 1991. cap. 29, p. 651–662.
- MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento in vitro de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 2, p. 39-44, 2007.
- MROGISKI, L. A.; ROCA, W. A. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In: ROCCA, W.M.; MROGISKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: CIAT. 1991. cap. 19, p. 19-40.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium of rapid growth and bioassay with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.2, p.473-497, 1962.
- NIETSCHE, S.; MARQUES, S.V.; PEREIRA, M.C.T.; SALLES, B.; XAVIER, A.A.; FRANÇA, A.C.; LIMA, C.; SILVA, L.S. Estabelecimento *in vitro* de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36. n. 3, p. 988-991, 2006.
- PETRY, C. Cultivo do crisântemo In: PETRY, C.. **Plantas ornamentais: aspectos para a produção**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária; EDIUPF, 1999. p. 102–112.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 1990 326 p.
- PIRISA PIRETRO INDUSTRIAL LTDA. Disponível em: <<http://www.pirisa.com/2005/historia.asp>>. Acesso em: 10 ago. 2008.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.
- ROCA, L.A.; MROGISKI, W.M. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCCA, W.M.; MROGISKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: CIAT, 1991. cap. 2, p.19–40. SAS Institute. SAS user's guide: statistics, version 8e. Cary, NC, 1998. 108p.
- SILVA, J.A.T. da. *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 21, p. 715–766, 2003.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704 p.

SUZIN, M. **Variabilidade genética de microrganismos e suas relações com plantas**. 2004. 71 p. Monografia (Especialização em Genética e Evolução Biológica) – Universidade de Passo Fundo, Instituto de Ciências Biológicas, Passo Fundo, 2004.

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Campinas: Artmed, 2004. 719 p.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V.R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.P.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A.V. de. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004. 20 p. (Circular Técnica, 24).

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliça; CBA, 2000. 128 p.

VILALOBOS, V.M.; THORPE, T.A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCCA, W.M.; MROGISKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: CIAT, 1991. cap. 6, p. 127–141.

WIKIPEDIA. Disponível em:

http://es.wikipedia.org/wiki/Chrysanthemum_cinerariaefolium. Acesso em: 10 out. 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 2 - Protocolo de preparação das soluções estoque do meio MS descrito por (MURASHIGE; SKOOG, 1962), concentrado 100 vezes

Solução estoque	Componentes Macronutrientes	Concentração g.L⁻¹
A	NH ₄ NO ₃	165
B	KNO ₃	190
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	44
D	MgSO ₄ .7H ₂ O	37
E	KH ₂ PO ₄	17
	Micronutrientes	
	MnSO ₄ .H ₂ O	1,690
	H ₃ BO ₄	0,620
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,860
F	KI	0,083
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
	FeEDTA	
G	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,73
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78
	Mistura orgânica	
	Tiamina.HCl	0,02
H	Ácido Nicotínico	0,1
	Piridoxina.HCl	0,1
	Glicina	0,4

Adaptado de Caldas et al. (1998).

ANEXO B

Tabela 3 - Planilha de dados referente à fase de isolamento dos explantes de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria. Laboratório de Cultura de tecidos e Citogenética Vegetal/IF - Campus Sertão. Sertão. 2009

Experimento	Tempo (min.)	Data de inoculação	Data de avaliação	Meristemas inoculados	Necroses	Cont.	Total sobreviv.	Data de avaliação	Necroses	Cont.	Total sobreviv.
10%	5	22/1/2007	29/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	10	22/1/2007	29/1/2007	5	1	1	3	2/3/2007	0	1	2
	15	22/1/2007	29/1/2007	5	0	1	4	2/3/2007	0	0	4
	20	22/1/2007	29/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	25	22/1/2007	29/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	1	4
	Total E01			25	1	2	22		0	2	20
20%	5	23/1/2007	30/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	1	0	4
	10	23/1/2007	30/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	1	4
	15	23/1/2007	30/1/2007	5	0	1	4	2/3/2007	0	0	4
	20	23/1/2007	30/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	2	0	3
	25	23/1/2007	30/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	1	0	4
	Total E02			25	0	1	24		4	1	19
30%	5	23/1/2007	30/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	10	23/1/2007	30/1/2007	5	1	0	4	2/3/2007	0	0	4
	15	23/1/2007	30/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	20	23/1/2007	30/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	1	0	4
	25	23/1/2007	30/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	3	0	2
	Total E03			25	1	0	24		4	0	20
40%	5	24/1/2007	31/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	10	24/1/2007	31/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	15	24/1/2007	31/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	20	24/1/2007	31/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	1	0	4
	25	24/1/2007	31/1/2007	5	1	0	4	2/3/2007	0	0	4
	Total E04			25	1	0	24		1	0	23
50%	5	24/1/2007	31/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	10	24/1/2007	31/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	15	24/1/2007	31/1/2007	5	1	0	4	2/3/2007	0	0	4
	20	24/1/2007	31/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	0	0	5
	25	24/1/2007	31/1/2007	5	0	0	5	2/3/2007	1	0	4
	Total E05			25	1	0	24		1	0	23
				125	4	3	118	0	10	3	105

ANEXO C

Tabela 4 - Planilha de dados referente ao primeiro subcultivo das plântulas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria. Laboratório de Cultura de tecidos e Citogenética Vegetal/IFRS - Campus Sertão. Sertão. 2009

Experimento	Tempo	Nº de vidro S0	Explantos	Nº de necroses	Nº E. de amorfas	Nº contaminados	Nº Viáveis	Nº de brotos S1	Comprimento de brotos (cm)	Média de comprimento brotos (cm)	Nº de Vidros S1
I	I	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	5,00	7,00	7,50	1,07	1,40
	II	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	2,00	22,00	33,10	1,50	4,40
	III	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	10,00	13,80	1,38	2,00
	IV	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	5,00	11,00	15,90	1,45	2,20
	V	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	10,00	15,70	1,57	2,00
TOTAL GERAL E01=		5,00	20,00	0,00	0,00	0,00	20,00	60,00	86,00	1,43	12,00
II	I	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	23,00	35,90	1,56	4,60
	II	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	6,00	5,50	0,92	1,20
	III	1,00	4,00	1,00	0,00	0,00	3,00	13,00	18,60	1,43	2,60
	IV	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	3,00	4,00	4,80	1,20	0,80
	V	1,00	4,00	1,00	0,00	0,00	3,00	5,00	7,60	1,52	1,00
TOTAL GERAL E02=		5,00	19,00	2,00	0,00	0,00	17,00	51,00	72,40	1,42	10,20
III	I	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	5,00	26,00	42,00	1,62	5,20
	II	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	22,00	35,60	1,62	4,40
	III	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	5,00	17,00	22,90	1,35	3,40
	IV	1,00	4,00	2,00	0,00	0,00	2,00	3,00	3,70	1,23	0,60
	V	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,00	2,80	1,40	0,40
TOTAL GERAL E03=		5,00	20,00	2,00	0,00	0,00	18,00	70,00	107,00	1,53	14,00
IV	I	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	5,00	39,00	62,50	1,60	7,80
	II	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	5,00	7,00	9,60	1,37	1,40
	III	1,00	5,00	1,00	0,00	0,00	4,00	29,00	35,50	1,22	5,80
	IV	1,00	4,00	1,00	0,00	0,00	3,00	9,00	11,80	1,31	1,80
	V	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	12,00	20,60	1,72	2,40
TOTAL GERAL E04=		5,00	23,00	2,00	0,00	0,00	21,00	96,00	140,00	1,46	19,20
V	I	1,00	5,00	1,00	0,00	0,00	4,00	8,00	15,40	1,93	2,00
	II	1,00	5,00	1,00	0,00	0,00	4,00	4,00	5,90	1,48	1,00
	III	1,00	4,00	2,00	0,00	0,00	2,00	5,00	4,50	0,90	1,00
	IV	1,00	5,00	2,00	0,00	0,00	3,00	4,00	5,30	1,33	1,00
	V	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	54,00	95,50	1,77	10,80
TOTAL GERAL E05=		5,00	23,00	6,00	0,00	0,00	17,00	75,00	126,60	1,69	15,00
TOTAL GERAL =		25,00	105,00	12,00	0,00	0,00	93,00	352,00	532,00	1,51	70,40

ANEXO D

Tabela 5 - Planilha de dados referente ao segundo subcultivo das plântulas de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria. Lab. de Cultura de tecidos e Citogenética Vegetal/IFRS - Campus Sertão. Sertão. 2009

Experimento	Tempo	Nº de vidro S1	Explantos	Nº de necroses	Nº de E. amorfas	Nº de contaminados	Nº de Viáveis	Nº de brotos S2	Comprimento dos brotos (cm)	Média comprimento brotos (cm)	Nº de vidros S2
10%	5	2,00	7,00	0,00	0,00	0,00	7,00	46,00	75,30	1,64	10,00
	10	5,00	22,00	1,00	0,00	0,00	21,00	105,00	189,20	1,80	21,00
	15	2,00	10,00	3,00	0,00	0,00	7,00	12,00	19,60	1,63	2,40
	20	3,00	11,00	2,00	0,00	0,00	9,00	25,00	36,90	1,48	5,00
	25	2,00	10,00	1,00	0,00	0,00	9,00	20,00	27,50	1,38	4,00
TOTAL GERAL E1=	14,00	60,00	7,00	0,00	0,00	53,00	208,00	348,50	1,68	41,60	
5	5,00	23,00	0,00	0,00	0,00	23,00	115,00	203,50	1,77	23,00	
20%	10	2,00	6,00	0,00	0,00	0,00	6,00	17,00	24,40	1,44	3,40
	15	3,00	13,00	3,00	0,00	0,00	10,00	16,00	36,70	2,29	3,20
	20	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	15,00	18,70	1,25	3,00
	25	1,00	5,00	1,00	0,00	0,00	4,00	6,00	6,40	1,07	1,20
TOTAL GERAL E2=	12,00	51,00	4,00	0,00	0,00	47,00	169,00	289,70	1,71	33,80	
5	6,00	26,00	1,00	0,00	10,00	15,00	167,00	330,70	1,98	33,40	
30%	10	5,00	22,00	5,00	0,00	0,00	17,00	147,00	336,50	2,09	29,40
	15	4,00	17,00	1,00	0,00	0,00	16,00	82,00	187,70	2,29	16,40
	20	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	3,00	28,00	57,10	2,04	5,60
	25	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	2,00	10,00	16,70	1,67	2,00
TOTAL GERAL E3=	17,00	70,00	7,00	0,00	10,00	53,00	434,00	928,70	2,14	86,80	
5	8,00	39,00	3,00	0,00	0,00	36,00	226,00	529,25	2,34	45,20	
40%	10	2,00	7,00	0,00	0,00	0,00	7,00	40,00	106,00	2,65	8,00
	15	5,00	29,00	0,00	0,00	4,00	25,00	145,00	295,00	2,03	29,00
	20	2,00	9,00	0,00	0,00	4,00	5,00	13,00	13,60	1,05	2,60
	25	3,00	12,00	1,00	0,00	0,00	11,00	28,00	40,70	1,45	5,60
TOTAL GERAL E4=	20,00	96,00	4,00	0,00	8,00	84,00	452,00	984,55	2,18	90,40	
5	2,00	8,00	4,00	0,00	0,00	4,00	12,00	18,60	1,55	2,40	
50%	10	1,00	4,00	1,00	0,00	0,00	3,00	9,00	16,50	1,83	1,80
	15	1,00	5,00	3,00	0,00	0,00	2,00	5,00	6,20	1,24	1,00
	20	1,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	12,00	14,70	1,23	2,40
	25	11,00	54,00	12,00	0,00	0,00	42,00	90,00	127,90	1,42	18,00
TOTAL GERAL E5=	16,00	75,00	20,00	0,00	0,00	55,00	128,00	183,90	1,44	25,60	
TOTAL GERAL =	79,00	352,00	42,00	0,00	18,00	292,00	1391,00	2735,35	1,97	278,20	

ANEXO E

Tabela 6 - Resultados da análise da variância nos dados da multiplicação *in vitro* de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria para a variável: Porcentagem de necrose nas diferentes concentrações de hipoclorito

Causa de variação	GL	SQ	QM	F-Teste
Conc. Hipo	4	4848,577	1212,144	3,93 * *
Tempo	4	1932,148	483,037	1,57 ns
Conc. Hipo x Tempo	16	5944,442	371,528	1,20 ns
Erro	5	15422,94	308,459	
Total	74	28332,00		

CV=148,84

Tabela 7 - Resultados do teste de Duncan a 5% de significância, nos dados da multiplicação *in vitro* de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria para a variável: Porcentagem de necrose nas diferentes concentrações de hipoclorito

Concentração de Hipoclorito	Média de Necrose (%)
10	12,143 b
20	6,667 b
30	7,143 b
40	4,474 b
50	28,125 a

ANEXO F

Tabela 8 - Resultados da análise da variância nos dados da multiplicação *in vitro* de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria para a variável: Número de brotos formados por explantes inoculado

Causa de variação	GL	SQ	QM	F-Teste
Conc. Hipo	4	145,247	36,312	8,87**
Tempo	4	69,771	17,443	4,26**
Conc. Hipo x Tempo	16	85,442	5,340	1,30ns
Erro	5	204,692	4,094	
Total	74	652,530		

CV= 45,233

Tabela 9 - Resultados do teste de Duncan a 5% de significância, nos dados da multiplicação *in vitro* de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria para a variável: Número de brotos formados por explantes inoculado em ralação a concentração de hipoclorito

Concentração Hipoclorito	Média Nº Brotos/Explante
10	3,74bc
20	3,36c
30	7,74a
40	5,22b
50	2,19c

Tabela 10 - Resultados do teste de Duncan a 5% de significância, nos dados da multiplicação *in vitro* de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria para a variável: Número de brotos formados por explantes inoculado em ralação ao tempo de exposição ao hipoclorito na desinfestação

Tempo	Média Nº Brotos/Explante
T1	6,196a
T2	5,791a
T3	4,063b
T4	3,491bc
T5	2,311c

ANEXO G

Tabela 11 - Resultados da análise da variância nos dados da multiplicação in vitro de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria para a variável: Comprimento dos brotos formados em função da concentração de hipoclorito e do tempo de exposição durante a desinfestação

Causa de variação	GL	SQ	QM	F-Teste
Conc. Hipo	4	3,502	0,876	3,74 **
Tempo	4	3,512	0,878	3,75 **
Conc. Hipo x Tempo	16	6,253	0,391	1,67 ns
Erro	5	11,714	0,234	
Total	74	30,782		

CV= 27,497

Tabela 12 - Resultados do teste de Duncan a 5% de significância, nos dados da multiplicação in vitro de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria para a variável: Comprimento dos brotos formados em função da concentração de hipoclorito utilizada na desinfestação

Concentração Hipoclorito	Média Comprimento de Brotos
10	1,605bc
20	1,731b
30	2,250a
40	1,962ab
50	1,251c

Tabela 13 - Resultados da análise da variância e do teste de Duncan a 5% de significância, nos dados da multiplicação in vitro de *C. cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria para a variável: Comprimento dos brotos formados em função do tempo de exposição ao hipoclorito durante a desinfestação

Tempo	Média Comprimento de Brotos
T1	2,001a
T2	2,029a
T3	1,988a
T4	1,245b
T5	1,315b

ANEXO H

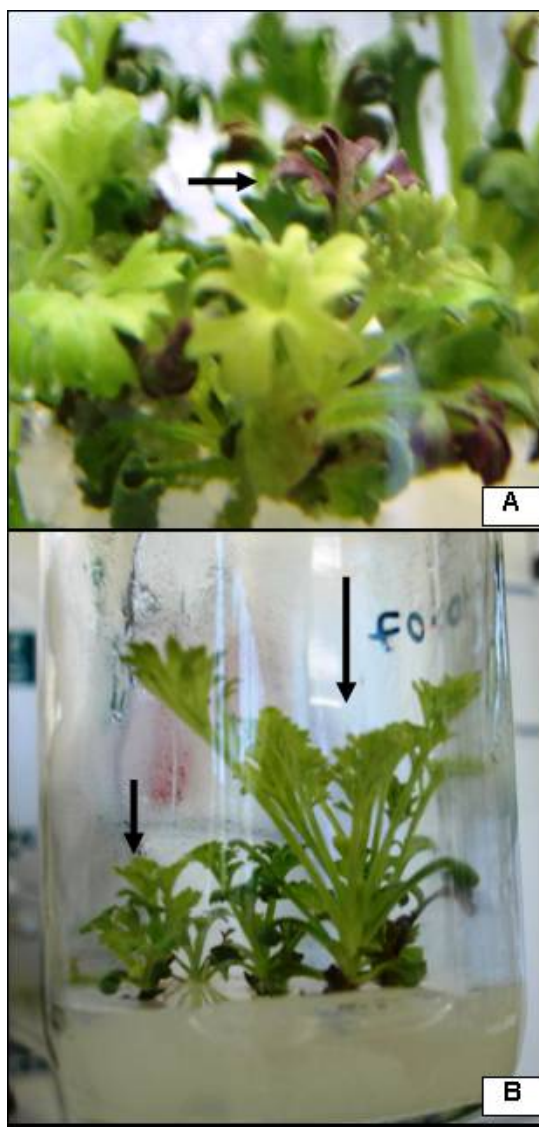


Figura 16 – A) Indícios de deficiências nutricionais nos ápices das brotações dos explantes produzidos durante a multiplicação. B) Desuniformidade de tamanho de explantes produzidos durante a multiplicação de *C. cinerariaefolium* Vis. cv Vacaria. Lab. de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal / IFRS-Campus Sertão, 2009

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)