

**CLARISSA DE SOUZA BORGES**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CARQUEJA-GAÚCHA (*Baccharis  
riograndensis* Malag. & J. E. Vidal)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Vera Lucia Bobrowski

Pelotas, 2010

**Banca examinadora:**

-----  
Dr<sup>a</sup>. Vera Lucia Bobrowski - Universidade Federal de Pelotas (Presidente)

-----  
Dr<sup>a</sup>. Luciana Bicca Dode - Universidade Federal de Pelotas

-----  
Dr. Leonardo Ferreira Dutra - Embrapa Clima Temperado

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Neiva e Edison, pelo amor, carinho e incentivo, mesmo de longe, sem os quais eu nunca teria chegado até aqui. Impossível expressar em palavras meu amor e gratidão por vocês.

Ao meu irmão Luis Fernando, pelo amor, carinho e incentivo mesmo a distância.

À Prof. Dr. Vera Lucia Bobrowski, pelos ensinamentos, carinho e orientação ao longo desses anos e, também, pela oportunidade de realização do curso, porque sem ela isso seria impossível.

À colega e amiga Cristina Cuchiara, pela amizade durante todos esses anos e pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pelos ensinamentos passados.

Aos colegas de curso, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

Às minhas amigas Fernanda, Renata, Ingrid, Cristiane; enfim, a todas, pela amizade, carinho, incentivo. Adoro vocês.

Ao laboratorista Álvaro Martins, pelo auxílio e ensinamento nas práticas laboratoriais.

Às colegas de laboratório Amanda e Letícia, pela troca de conhecimentos, amizade, pelas conversas que sempre renderam boas risadas.

À secretária do Programa de Pós-Graduação Suzi, pela atenção e carinho e por estar sempre disposta a me ajudar no que precisei.

A Deus, principalmente.

Por fim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram pra a realização deste trabalho.

## RESUMO

Borges, Clarissa de Souza. **Multiplicação *in vitro* de Carqueja-gaúcha (*Baccharis riograndensis* Malag. & J. E. Vidal)** 2010. 46f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas,

A carqueja-gaúcha é uma espécie endêmica do Rio Grande do Sul pouco explorada e carece de pesquisas na área de micropropagação. Nos últimos anos, aumentou o interesse da utilização da técnica de micropropagação em plantas aromáticas e medicinais, o que proporciona uma produção em larga escala. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de: sacarose, sais do meio MS, nitrogênio e diferentes reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de carqueja. Como explantes foram utilizados segmentos nodais com duas gemas axilares, oriundos de plantas já estabelecidas *in vitro*. No 1º experimento foram testadas as diferentes concentrações de sacarose no meio MS (1%, 3% 5% e 7%). No 2º experimento testou-se as variações das concentrações de sais (macro e micronutrientes) do meio MS (MS/3; MS/2; MS; 2MS). No 3º experimento foram testadas variações nas concentrações de nitrogênio (N, N/2, N/3, N/4) no meio MS. No 4º experimento foram avaliadas diferentes concentrações de BAP (Benzilaminopurina): M1 (MS); M2 (MS+0BAP+0,05GA<sub>3</sub>); M3 (MS+0,10BAP+0,05GA<sub>3</sub>); M4 (MS+0,30BAP+0,05GA<sub>3</sub> mg L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar na concentração de 8 g L<sup>-1</sup> e posteriormente autoclavado a 121 °C por 20 minutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco explantes por frasco. Foram avaliados os números de folhas, brotos e calos e raízes formadas aos 15 e 30 dias de cultivo. No 1º experimento, pode-se observar um maior número de folhas no meio contendo 5% de sacarose, no período de 30 dias. Já o meio MS básico com concentração usual de sacarose 3% apresentou um menor número de folhas aos 30 dias de cultivo. O maior número de brotos foi observado no meio com 1% de sacarose aos 30 dias. Com o aumento da concentração houve decréscimo na produção de brotos. No 2º experimento, verificou-se que o número de folhas foi estimulado pelo aumento da concentração de sais do meio MS, nos meios contendo 100% e 200% dos sais do meio MS; também pode-se observar um aumento da presença de raízes com o passar do tempo e não em relação às variações de sais no meio MS. No 3º experimento, o número de folhas foi maior no meio contendo a menor concentração de nitrogênio e, com o passar do tempo, houve um aumento de número das mesmas, o número de brotações foi menor na concentração usual de nitrogênio e aos 30 dias observou-se aumento de brotações. No 4º experimento, todas as doses de BAP testadas promoveram um aumento de brotações de carqueja-gaúcha e aos 30 dias apresentou um maior número de brotações. Nos meios com presença de reguladores de crescimento houve um aumento na produção de calos na base do explante com o aumento do tempo em cultivo.

Palavras-chave: micropropagação, nitrogênio, sacarose, meio MS, BAP

## ABSTRACT

Borges, Clarissa de Souza. ***In vitro* multiplication of Carqueja-gaucha (*Baccharis riograndensis* Malag. & J. E. Vidal)** 2010. 46f. Dissertation (Master's) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The carqueja-gaucha is an endemic species of Rio Grande do Sul, poorly explored and needs further research in micropropagation. In recent years, increased interest in using the technique of micropropagation of medicinal and aromatic plants, which provides a large-scale production. The objective was to evaluate the effect of different concentrations of sucrose, salts of MS medium, nitrogen and different growth regulators on *in vitro* cultivation of gorse. The explants were nodal segments with two axillary buds from plants already established *in vitro*. In the 1st experiment were tested with different concentrations of sucrose in MS medium (1% 3% 5% and 7%). In the 2nd experiment tested whether variations in concentrations of salts (macro and micronutrients) of the MS (MS / 3, MS / 2, MS; 2MS). In the 3rd experiment tested changes in the concentrations of nitrogen (N, N / 2 N / 3 N / 4) in MS medium. In the 4th experiment evaluated different concentrations (BAP): M1 (MS), M2 (MS +0 +0.05 GA3 BAP), M3 (MS +0.10 +0.05 GA3 BAP), M4 (MS + BAP +0.30 GA3 0.05 mg L<sup>-1</sup>). The pH was adjusted to 5.8 before adding agar at a concentration of 8 g L<sup>-1</sup> and subsequently autoclaved at 121 ° C for 20 minutes. The experimental design was completely randomized design with four replicates of five explants per flask. We evaluated the numbers of leaves, shoots and roots and callus formed at 15 and 30 days of cultivation. In a second experiment, one can observe a greater number of leaves in a medium containing 5% sucrose and within 30 days. But the basic MS medium with normal concentration of sucrose 3% showed a lower number of leaves at 30 days of cultivation. The highest number of shoots was observed in medium with 1% sucrose for 30 days. With increasing concentration decrease in the production of shoots. In the 2nd experiment, it was found that the number of leaves was stimulated by increasing the salt concentration of MS medium, media containing 100% and 200% of the MS culture medium, can also be observed an increase in root presence over time and not for the variations of salts in MS medium. In the 3rd experiment leaf number was greater in medium containing the lowest concentration of nitrogen and over time there was an increase in their number, the number of shoots was lower in the usual concentration of nitrogen and 30 days was an increase of shoots. In the 4th experiment all doses tested BAP promoted an increase in shoots of carqueja-gaucha and 30 days showed a higher number of shoots. In the medium with growth regulators had an increase in the production of callus at the base of the explant with increasing time in culture.

Keywords: Baccharis, micropropagation, nitrogen, sucrose, MS medium, BAP

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição do meio de cultura utilizado. Pelotas. UFPel, 2009. ....	25
Tabela 2 - Número médio de explantes com raízes aos 15 e 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Pelotas. UFPel, 2009. ....	29
Tabela 3- Número médio de folhas formadas nas diferentes variações de sais do meio MS. Pelotas. UFPel, 2009. ....	30
Tabela 4- Número médio de folhas formadas aos 15 e 30 dias de cultivo em meio com variações de concentrações de sais. Pelotas. UFPel, 2009. ....	30
Tabela 5 – Número médio de explantes com presença de raiz aos 15 e 30 dias de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009. ....	31
Tabela 6- Número médio de folhas de carqueja formadas aos 15 e 30 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de nitrogênio. Pelotas. UFPel, 2009. ....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplar feminino de <i>Baccharis riograndensis</i> Malag. & J. E. Vidal.	15
Figura 2 - Número médio de folhas formadas em meios de cultivo com diferentes concentrações de sacarose aos 15 e 30 dias de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009. ....	26
Figura 3 - Número médio de brotos formados nas diferentes concentrações de sacarose aos 15 e 30 dias de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009. ....	27
Figura 4- Número médio de explantes com raízes em meios com diferentes concentrações de sacarose. Pelotas. UFPel, 2009. ....	28
Figura 5- Número médio de brotos formados <i>in vitro</i> nas diferentes concentrações de nitrogênio testadas. Pelotas. UFPel, 2009. ....	33
Figura 6- Número de brotos formados em meios MS com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. ....	35

## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Tabela de análise de variância para as variáveis número médio de folhas, número médio de brotos e número médio de explantes com raiz em carqueja submetida às diferentes concentrações de sacarose e tempo de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009. ....45

Apêndice B - Tabela de análise de variância para as variáveis número médio de brotações, de folhas, de explantes com presença de raiz e presença de calos formados em carqueja submetida às diferentes variações de sais no meio e tempo de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009. ....45

Apêndice C - Tabela de análise de variância para as variáveis número médio de folhas e número médio de brotações em carqueja submetida às diferentes concentrações de nitrogênio e tempo de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009. ....46

Apêndice D - Tabela de análise de variância para as variáveis número médio de brotações e número de calos formados em carqueja submetida às diferentes meios de cultura e tempo de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009. ....46

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1. Plantas Medicinais .....	12
2.2. O Gênero <i>Baccharis</i> .....	12
2.2.1. Composição química do gênero <i>Baccharis</i> .....	13
2.2.2. A espécie <i>Baccharis riograndensis</i> .....	14
2.3. Formas de Propagação .....	16
2.3.1. Propagação por sementes .....	16
2.3.2. Estaquia .....	16
2.3.3. Micropropagação .....	17
2.3.3.1. Fatores que influenciam a Multiplicação.....	19
2.3.3.1.1. Tipos de Explantes .....	19
2.3.3.1.2. Meio de cultura .....	20
2.3.3.1.3. Reguladores de Crescimento .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1. Experimento I - Concentrações de sacarose .....	23
3.2. Experimento II - Concentrações de sais.....	24
3.3. Experimento III - Concentrações de nitrogênio .....	24
3.4. Experimento IV- Concentrações de BAP .....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.1. Experimento I - Concentrações de sacarose .....	26
4.2. Experimento II - Concentrações de sais.....	30
4.3. Experimento III - Concentrações de nitrogênio .....	32
4.4. Experimento IV - Concentrações de BAP .....	34
5. CONCLUSÕES .....	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	37
6. REFERÊNCIAS .....	38
Apêndices.....	45

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é milenar e tradicional nas diversas sociedades humanas e vem crescendo no mercado farmacêutico (ANDRIÃO et al., 2010). O uso de produtos obtidos a partir de plantas na produção de cosméticos e medicamentos tem aumentado nos últimos anos e isso tem estimulado grandes empresas a investirem 10% de seus recursos financeiros em pesquisas com novas substâncias de origem vegetal. Contudo, o estudo das propriedades farmacológicas da flora nacional é incipiente perante a nossa biodiversidade.

Dentre as plantas nativas com propriedades farmacológicas o gênero *Baccharis* da família Asteraceae é muito importante como fonte de matéria-prima para obtenção de produtos medicinais. O gênero compreende várias espécies denominadas popularmente de carqueja e indicadas para o tratamento de distúrbios do sistema digestivo, anemia, cálculos biliares, pâncreas, apresentando também atividade antibiótica e anti-helmíntica entre outras (MORS et al., 2000). Segundo Abad & Bermejo (2007) as propriedades químicas, óleos essenciais, contendo monotérmicos (alfa-pineno, beta-pineno, nopineno), álcoois sesquiterpênicos (carquejol, esterres terpênicos, acetato de carquegila), flavonas e flavononas, flavonóides, cumarinas, taninos e saponinas.

A carqueja, por ser uma planta dióica, apresenta algumas dificuldades para a produção de mudas via sementes. Além da variabilidade genética resultante da fecundação cruzada, a demora para a formação das mudas (CASTRO & FERREIRA, 2000). Dentre as diferentes técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação, ou clonagem *in vitro*, tem sido amplamente aplicada, pois oferece inúmeras vantagens, tais como: rápido aumento do número de plantas geneticamente idênticas e produção de mudas o ano todo; e também a preservação de recursos genéticos vegetais (ABREU, 1998; SERAFIN, 2001).

Além disso, técnicas como micropropagação, culturas de calos, raízes e suspensão celular de plantas medicinais têm sido utilizadas visando não só a propagação em larga escala de genótipos superiores, mas também a produção de metabólitos secundários (CONCEIÇÃO, 2000).

Vários exemplos de culturas de células vegetais têm sido relatados a partir do gênero *Baccharis*, porém a maioria desses relatos refere-se principalmente à espécie *B. trimera* (ABAD & BERMEJO, 2007). Para *B. riograndensis*, uma espécie endêmica do Rio Grande do Sul, citada em vários trabalhos botânicos, não há estudos do comportamento *in vitro*, da composição química e de seus prováveis efeitos medicinais.

Este estudo busca avaliar a influência das concentrações de sacarose, sais do meio MS, nitrogênio e BAP no comportamento *in vitro* da espécie *B. riograndensis*, visando a estabelecer um protocolo de micropropagação para obtenção e multiplicação de plantas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Plantas Medicinais

Desde as primeiras civilizações, qualquer vegetal que produzisse substâncias biologicamente ativas era utilizado na fitoterapia. A simples observação dos recursos naturais com propriedades terapêuticas deu início aos estudos e aplicações mais efetivas para a população, principalmente a partir do século XVIII, com o surgimento das ciências agregadas (YAMAMOTO, 2006). Nos últimos anos a demanda por medicamentos fitoterápicos vem crescendo mundialmente nos países desenvolvidos, como alternativa mais saudável, ou menos danosa de tratamento; e nos países em desenvolvimento, como resultante da falta de acesso aos medicamentos farmacológicos (FREITAS, 2007).

Plantas medicinais, assim como os medicamentos sintéticos, possuem grupos de compostos farmacologicamente ativos que atuam nos organismos vivos. O emprego terapêutico dessas plantas exige o conhecimento prévio de seus compostos e avaliação das potencialidades terapêuticas.

### 2.2. O Gênero *Baccharis*

A ordem Asterales compreende nove famílias, das quais Asteraceae é uma das mais importantes, contemplando espécies vegetais de valor medicinal (DI STASI et al., 2002).

O gênero inclui mais de 500 espécies, distribuídas dos Estados Unidos à Argentina, sendo que 90% ocorrem na América do Sul. Na região Sudoeste do Brasil, existem aproximadamente 120 espécies. A grande concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que toda essa área é o provável centro de origem do táxon (BUDEL et al., 2005).

Espécies desse gênero são importantes economicamente para o homem, pois ajudam no combate à erosão e podem ser utilizadas como plantas ornamentais, embora também possam se apresentar como pragas de

difícil combate em pastagens, podendo também intoxicar o gado. Entretanto, o destaque maior está na medicina, onde várias espécies são utilizadas popularmente (CARNEIRO & FERNANDES, 1996).

Plantas dessa família normalmente são arbustos perenes de 50 cm a 4 m de altura, extensivamente estudados quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros. Inúmeros trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque aos flavonóides, alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos (HERMENECIANO, 2001), além de sua reconhecida importância para a medicina, no tratamento e prevenção de várias doenças. O gênero *Baccharis* é uma rica fonte de óleo essencial utilizado na indústria de perfumaria (SILVA JÚNIOR, 1997).

### **2.2.1. Composição química do gênero *Baccharis***

Cerca de 120 espécies do gênero *Baccharis* foram estudadas quimicamente. De modo geral, os compostos que mais se destacam são os flavonóides, clerodanos e labdanos, embora também se tenha observado com certa frequência a presença de kauranos, triterpenos, germacreno, ácidos cumáricos, tricotecenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Entre as espécies mais pesquisadas, quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontram-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (VERDI et al., 2005). Porém, não foram encontrados relatos sobre composição química da espécie *B. riograndensis*, provavelmente por erros de identificação da espécie, sendo confundida com outras espécies do gênero.

Os flavonóides, juntamente com os diterpenos, são os compostos de maior ocorrência no gênero *Baccharis* e são descritos como bons marcadores quimiotaxonômicos para os mais baixos níveis hierárquicos da família Asteraceae. São 298 ocorrências de flavonóides no gênero *Baccharis* com 109

compostos diferentes, sendo 24 com unidade flavanona e 85 com unidade flavona, das quais 48% se apresentam oxigenadas em C-3.

A classe dos terpenos é comumente encontrada na seção caulopterae (carquejas), sendo observada a ocorrência de mono e sesquiterpenos (constituintes de óleos voláteis), diterpenos, bem como triterpenos, incluindo saponinas e esteróides.

Os diterpenos são os compostos encontrados em maior quantidade no gênero *Baccharis* e são representados principalmente por neo e ent-clerodanos e, menos comum, ent-labdanos e kauranos. Contudo, apesar do grande número de compostos isolados e conhecidos, pouco se conhece sobre a atividade biológica dessas substâncias (VERDI et al., 2005).

Os triterpenos apresentam 103 ocorrências em 48 espécies de *Baccharis*, com 23 compostos diferentes sendo representados principalmente pelo ácido oleanólico, que foi encontrado em 24 espécies, e óxido de baccharis, encontrado em 17 espécies.

### **2.2.2. A espécie *Baccharis riograndensis***

A carqueja-gaúcha (*B. riograndensis*) (Figura 1) é uma espécie endêmica do Rio Grande do Sul que apresenta hábito subarborescente, ramos áfilos triplados, alas dos ramos vegetativos onduladas e alas dos ramos férteis estreitas, capítulos femininos em ramos espiciformes laxos, terminais e axilares, involúcro cilíndrico (7-10 mm altura e 2-3 mm diâmetro), flores femininas com ápice denteado e aquênios  $\pm 8$ -costados (HEIDEN et al., 2006).

*B. riograndensis* ocorre na Região Sul do Brasil. Embora endêmica com área restrita no Rio Grande do Sul, a espécie é abundante na região. Vive em campos secos e pedregosos, principalmente na metade sul do Estado (em afloramentos graníticos no bioma Pampa), e esparsamente na metade norte (em ilhas de campo de altitude inseridas em meio ao bioma Mata Atlântica em áreas do Planalto Sul - Brasileiro) (HEIDEN, 2009).



Figura 1- Exemplar feminino de *Baccharis riograndensis* Malag. & J. E. Vidal (Asteraceae). (HEIDEN *et al*, 2006)

*B. riograndensis* assemelha-se com *B. crispa* quanto ao hábito, aos ramos eretos, ao involúcro campanulado do capítulo masculino e ao papilho unisseriado nas flores masculinas e femininas. Difere de *B. crispa* devido aos ramos férteis estreitamente alados (vs. ramos férteis indistintamente alados), ramos espiciformes laterais reduzidos a capítulos solitários (vs. ramos espiciformes laterais completamente desenvolvidos ou com eixo reduzido

constituindo um glomérulo), involúcro do capítulo feminino cilíndrico (vs. campanulado) e cipselas 2,5–4 mm de comprimento (vs. 1–1,5 mm) (HEIDEN, 2009). Essas espécies são simpátricas em alguns locais e talvez por isso muitas vezes confundidas.

Segundo Heiden & Schneider (2008), encontra-se quase ameaçada, seguindo os critérios da IUCN (2001), devido ao incremento da pressão antropogênica sobre os Campos Sulinos causada pelo aumento do uso da terra e a substituição da vegetação nativa por plantações silviculturais.

## **2.3. Formas de Propagação**

### **2.3.1. Propagação por sementes**

A propagação de plantas é realizada de duas diferentes formas: sexual e assexual ou vegetativa. A propagação por sementes é um processo sexual, pois envolve a união do gameta masculino, grão de pólen, com o gameta feminino, óvulo, para formar a semente produzindo assim variabilidade genética (PAIVA & GOMES, 2001).

Sementes de carqueja se apresentam em tamanho diminuto e de forma retangular, características que praticamente impedem sua utilização como propágulo em cultivos comerciais.

### **2.3.2. Estaquia**

Para iniciar o cultivo da carqueja é necessário definir a forma de produção de mudas, sendo a estaquia um processo rápido e de baixo custo, que permite a manutenção das características de interesse agrônômico e farmacológico nas mudas produzidas, evitando a mistura de espécies e genótipos não interessantes, por se tratar de uma forma de propagação assexuada (DE BONA et al., 2004)

A propagação vegetativa de *Baccharis trimera* por meio de estaca de ramos é viável, pois as estacas apresentam elevado percentual de enraizamento, em média acima de 90%, sem influência do local de origem da estaca (região apical, mediana ou basal do ramo) e de diferentes substratos (De BONA et al., 2005). Dessa forma, uma vez selecionados clones com elevado potencial medicinal, a multiplicação clonal não é entrave para exploração agrícola.

Embora Castro e Ferreira (2001) recomendem a estaquia como forma de propagação de *Baccharis*, a capacidade de rizogênese em estacas de carqueja é variável entre as espécies. Por exemplo, De Bona et al. (2004) concluíram que a espécie *B. trimera* apresentou maior percentual de enraizamento (100%) enquanto as espécies *B. stenocephala* e *B. articulata* apresentaram 50 e 30% respectivamente.

Estacas de carqueja apresentam fácil enraizamento, mas o crescimento da muda precisa ser melhor estudado, para obtenção de mudas de maior vigor e, conseqüentemente, de melhor sobrevivência a campo após o plantio (BIASI e DE BONA, 2000; DE BONA et al., 2005).

Porém, outro fator que pode interferir na capacidade de enraizamento de estacas de carqueja é o sexo da planta. Tratando-se de uma espécie dióica, plantas masculinas e femininas têm ecofisiologia distinta para a preservação da espécie e, portanto, podem apresentar respostas diferentes em relação à facilidade à rizogênese.

### **2.3.3. Micropropagação**

A necessidade da conservação deste germoplasma endêmico e estudos de pesquisa básica sobre suas propriedades farmacológicas e econômicas são prementes, podendo ser realizados através de técnicas de cultura de tecidos como a micropropagação.

A micropropagação permite um trabalho de forma contínua ao longo do ano, o que agiliza a propagação comparando com métodos convencionais

(GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), além de fornecer matéria-prima para análises químicas.

Estudos de micropropagação em *Baccharis* são muito escassos, porém em *B. tridentata* permitiram constatar que esta técnica se mostrou bastante eficiente na obtenção de plantas homogêneas sem adição de reguladores de crescimento (KAJIKI, 2006).

Na micropropagação, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (HARTMANN et al., 2002). Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos cultivados e também participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

A micropropagação difere da propagação tradicional nos componentes biológicos de cada etapa, pois são separados dentro de estágios (estabelecimento dos explantes *in vitro*, multiplicação, alongamento e enraizamento), aumentando assim o controle de cada aspecto da regeneração e dos processos de desenvolvimento. As etapas podem ser manipuladas pela seleção de explantes e controle do desenvolvimento da cultura (HARTMANN et al., 2002).

As técnicas *in vitro* requerem pequeno espaço para manter ou para aumentar o número de plantas e podem produzir plantas livres de patógenos como vírus. Além disso, as taxas de propagação são maiores e, em pouco tempo, pode-se produzir clones de plantas que apresentam dificuldades de propagação via macropropagação. Outra vantagem dessa técnica é a produção das mudas, independente da época do ano (GEORGE, 1993).

A primeira fase de um protocolo de regeneração de plantas a partir de explantes é a seleção do material de onde serão retirados os explantes, levando em consideração critérios como: taxa de crescimento e conservação das características da espécie (MATEO-SAGASTA, 1990). Essa fase também inclui o estabelecimento de culturas assépticas, que ocorre por meio da desinfestação dos explantes (TORRES et al., 1998).

A segunda fase refere-se à produção de propágulos, ou seja, à multiplicação de brotos axilares ou adventícios, de embriões somáticos ou de órgãos. Propágulos produzidos nessa fase, especialmente brotos, podem ser

utilizados em ciclos de multiplicação para aumentar o seu número (GEORGE, 1993). A terceira fase compreende a transferência das partes aéreas produzidas para um meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo na última fase, a de aclimação (TORRES et al., 1998).

### **2.3.3.1. Fatores que influenciam a Multiplicação**

Em estudos realizados com diferentes espécies, tem sido constatado que são vários os fatores que influenciam no comportamento da cultura *in vitro*, como fatores biológicos (tipo e condição fisiológica do explante, características genéticas e outros), fatores químicos (composição do meio de cultura, pH, composição do ar durante o processo de crescimento, reguladores de crescimento e outros) e fatores físicos, como temperatura, luminosidade, fotoperíodo e outros (ANDRADE, 1998).

#### **2.3.3.1.1. Tipos de Explantes**

Para a seleção dos explantes, deve-se considerar alguns aspectos, tais como: a finalidade da micropropagação e o nível de diferenciação do tecido (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Dependendo do explante utilizado e da sua manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por meio de multiplicação de gemas axilares, de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta, e por embriogênese somática direta ou indireta (GEORGE, 1993).

O tipo de explante utilizado no sistema de micropropagação é importante, pois determina a rapidez e eficiência do processo. Os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro* são ápices caulinares, gemas axilares e meristemas, pois possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas inteiras (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

### 2.3.3.1.2. Meio de cultura

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas, que funcionam nas plantas, são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (CALDAS et al., 1998).

Uma grande variedade de meios de cultura vem sendo utilizada para diferentes espécies. Geralmente, os meios consistem em uma mistura balanceada de macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento (GAMBORG & SHYLUK, 1981).

A água é o componente de maior quantidade no meio. É uma fonte potencial de impurezas que podem afetar o crescimento de tecidos *in vitro*. A água destilada e deionizada, ou bi-destilada, normalmente é suficientemente pura para uso nos meios. No entanto, dependendo da fonte da água de laboratório, podem ser encontrados contaminantes orgânicos voláteis, que permanecem após a destilação e inibem o crescimento das culturas (CALDAS et al., 1998).

Os macronutrientes são elementos exigidos em maiores quantidades para o crescimento de plantas inteiras e são incluídos nos meios nutritivos na forma de sais inorgânicos. São eles: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre. Os micronutrientes incluem todos aqueles elementos minerais aceitos atualmente como essenciais para plantas clorofiladas (manganês, zinco, boro, cobre, cloro, ferro e molibdênio), além do cobalto e iodo (CALDAS et al., 1998).

As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub> e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficiente para realizar fotossíntese que sustenta o crescimento. Portanto, a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos

meios nutritivos, sendo que esse açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. A concentração de sacarose também é um fator importante para obter crescimento ótimo, dependendo do explante (CALDAS et al., 1998). Culturas de embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento necessitam de concentrações elevadas de sacarose (12-18%), e altas concentrações também estimulam a formação de embriões em cultura de anteras de fumo (SHARP et al., 1971). A concentração de sacarose mais usada é 3%. Outros compostos orgânicos, além de carboidratos, foram testados como fonte de carbono, normalmente com pouco sucesso.

Os primeiros estudos com cultura de raízes definiram a mistura básica de vitaminas utilizadas até hoje. Essa mistura consiste de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), ácido nicotínico (niacina) e piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>), à qual normalmente se adiciona o aminoácido glicina (CALDAS et al., 1998).

### **2.3.3.1.3. Reguladores de Crescimento**

O objetivo principal dos reguladores de crescimento é o de suprir possíveis deficiências nos teores endógenos de hormônio nos explantes isolados, além disso, visa a estimular certas respostas como a multiplicação da parte aérea ou a formação de raízes adventícias (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos e que desempenham importante papel na regeneração de plantas em várias espécies vegetais estão as citocininas e as auxinas. A disponibilidade e a interação desses dois fitorreguladores podem modular a formação de raiz e parte aérea. Em explantes de algumas espécies lenhosas, que apresentam um crescimento monopodial natural e, muitas vezes, não ramificam suficientemente *in vitro*, a utilização de citocinina torna-se um fator determinante na indução de brotações. Na multiplicação de espécies lenhosas, a maior parte dos trabalhos desenvolvidos inclui a adição de fitorreguladores.

Além das auxinas e citocininas, também as giberilinas são utilizadas na cultura de tecidos de plantas. Dentre as diversas giberilinas, o GA3 é o que tem

sido utilizado com maior frequência. O mais conhecido efeito desse hormônio, o alongamento de partes aéreas, pode ser explorado *in vitro*, quando as partes aéreas produzidas não estão em condições de ser individualizadas para o enraizamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A adição de GA3 também reverte parcialmente o efeito depressivo das citocininas sobre a proliferação de raízes (HU & WANG, 1983).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas como fonte de explantes plantas germinadas *in vitro* a partir de sementes de plantas adultas de *Baccharis riograndensis* e mantidas em meio MS.

#### 3.1. Experimento I - Concentrações de sacarose

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 100mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, solidificado com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e diferentes concentrações de sacarose (10, 30, 50 e 70 g L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de vidro com capacidade de 250 mL (30 mL/frasco) e então procedeu-se a inoculação de segmentos nodais com duas gemas axilares. Posteriormente à inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2°C, intensidade luminosa de 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 20W (Osram®) e fotoperíodo de 16 horas diárias, permanecendo nessas condições por 30 dias. Tais condições foram semelhantes para os experimentos subsequentes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial 4 x 2 (10, 30, 50 e 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 e 30 dias), com cinco repetições por tratamento e cinco explantes por frasco.

A avaliação realizada constou de observação do número de folhas e brotos formados e presença de calo e raiz. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas utilizando o teste de Duncan com auxílio do software estatístico SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984). Os dados, expressos em média, foram transformados

segundo raiz quadrada ( $x + 0,5$ ). Como forma de desdobrar os efeitos da interação dos fatores efetuou-se a análise de regressão polinomial.

### **3.2. Experimento II - Concentrações de sais**

Os meios de cultivo utilizados foram constituídos pela variação nas concentrações de sais do meio MS, acrescidos de  $100\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $8\text{ g L}^{-1}$  de ágar. As variações nas concentrações de sais foram assim constituídas: concentração original (MS); redução de 33% da concentração original (proporção de 1/3); redução de 50% (proporção de 1/2); e aumento dos sais em 100% em relação à concentração original (proporção de 2/1). As condições de autoclavagem e cultivo dos explantes foram similares às descritas no item anterior.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial de quatro concentrações de sais do MS e dois intervalos de tempo (15 e 30 dias). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento e cinco explantes por frasco. A avaliação foi realizada observando-se o número de brotos e folhas, presença de raiz e formação de calos. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 1% de probabilidade de erro.

### **3.3. Experimento III - Concentrações de nitrogênio**

Neste experimento o meio de cultura básico utilizado foi constituído dos sais minerais do MS, acrescidos de  $100\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $8\text{ g L}^{-1}$  de Agar, modificando-se as concentrações de nitrogênio ( $\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4$ ) de acordo com o tratamento (100; 50; 33,3 e 25 %). As condições de autoclavagem e cultivo dos explantes foram similares às descritas no item anterior.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial de quatro concentrações de nitrogênio e dois intervalos de tempo (15

e 30 dias). Foram utilizadas cinco repetições por tratamento e cinco explantes por frasco.

A avaliação foi realizada observando-se o número de folhas e brotos formados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 1% de probabilidade de erro.

### 3.4. Experimento IV- Concentrações de BAP

Para a determinação dos efeitos da citocinina BAP na multiplicação *in vitro*, o meio de cultura básico utilizado foi o MS suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 8g L<sup>-1</sup> de ágar, variando as concentrações de BAP (Tabela 1) e adicionando-se 0,05 mg L<sup>-1</sup> ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Tabela 1- Composição do meio de cultura utilizado Pelotas. UFPel, 2009.

Meio	Composição
M1	MS+ 0BAP + 0 GA <sub>3</sub>
M2	MS + 0BAP + 0,05GA <sub>3</sub> mg L <sup>-1</sup>
M3	MS + 0,10BAP + 0,05GA <sub>3</sub> mg L <sup>-1</sup>
M4	MS + 0,30BAP + 0,05GA <sub>3</sub> mg L <sup>-1</sup>

Os demais procedimentos são idênticos aos citados no experimento anterior.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial de quatro concentrações de BAP e dois intervalos de tempo (15 e 30 dias). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento e cinco explantes por frascos.

A avaliação foi realizada observando-se o número de brotos e calos formados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 1% de probabilidade de erro.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento I - Concentrações de sacarose

O número médio de folhas formadas e de brotos produzidos foi afetado significativamente pela interação de efeito da concentração de sacarose no meio e o período de permanência em cultivo (Apêndice A).

Pode-se observar um maior número de folhas (5,9) no meio contendo 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose e com 30 dias de cultivo (Figura 2). Já o meio MS básico com concentração usual de sacarose 30 g L<sup>-1</sup> apresentou um menor número de folhas (3,01) aos 30 dias de cultivo, mas não apresentou diferença estatística significativa (ns). Porém, aos 15 dias de cultivo, os meios com 30 e 50 g L<sup>-1</sup> não diferiram entre si e estes foram os meios que produziram maior número de folhas (2,21 e 2,33) respectivamente (Figura 2).

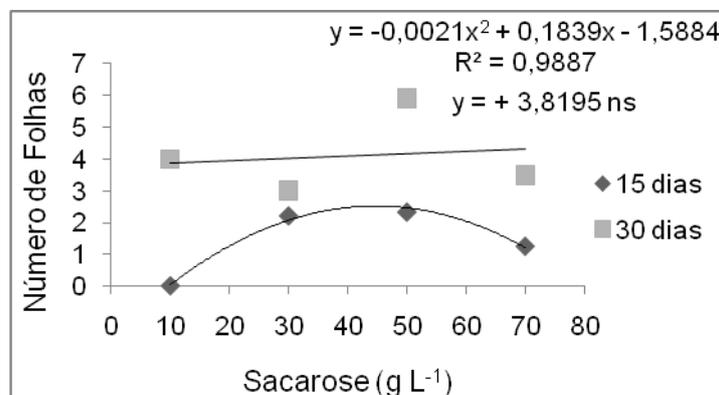


Figura 2 – Número médio de folhas formadas em meios de cultivo com diferentes concentrações de sacarose aos 15 e 30 dias de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009.

Devido à escassez de literatura sobre micropropagação em carqueja, utilizou-se outras espécies herbáceas ou medicinais para discutir os efeitos *in vitro*.

Os resultados obtidos foram similares aos observados por Oliveira et al. (1996) que relatam um aumento no número de folhas em crisântemo em

meio MS com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose em relação à concentração usual, bem como aos obtidos por Nicoloso et al. (2003), onde a elevação da concentração de sacarose de 30 para 60 g.L<sup>-1</sup> promoveu maior produção de biomassa em ginseng brasileiro cultivado *in vitro*. Diferentemente daqueles observados por Ribeiro et al (2007) em erva cidreira; e Bandeira et al.(2007) em tomilho, onde obtiveram um maior número de folhas na concentração usual de sacarose do meio MS.

Os níveis de sacarose no meio de cultivo influenciam vários processos metabólicos afetando diretamente o crescimento e a diferenciação dos tecidos, porém as concentrações podem variar de acordo com a espécie. Nagao, Pasqual e Ramos (1994) relatam que as exigências nutricionais em condições *in vitro* variam de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta, necessitando, assim, otimizar os meios de cultura.

Em contrapartida ao número médio de folhas, observou-se maior número de brotos (3,14) com 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose aos 30 dias (Figura 3), sendo que com o aumento da concentração houve decréscimo na produção de brotos. Tal comportamento observado pode ter sido devido aos explantes de *B. riograndensis* serem oriundo de plantas já estabelecidas em meio contendo a quantidade de carboidrato requerida para essa espécie.

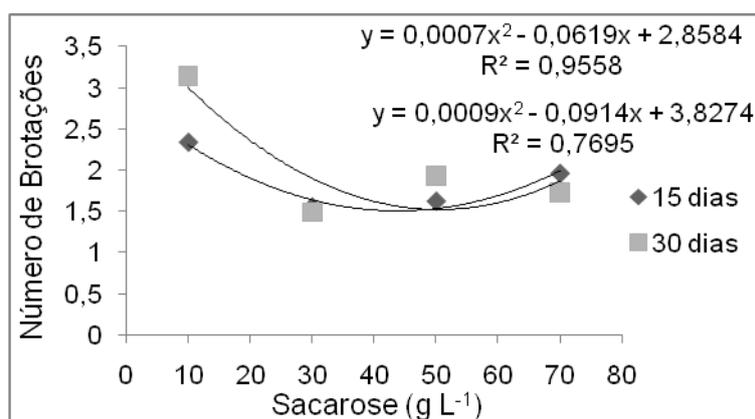


Figura 3 – Número médio de brotos formados nas diferentes concentrações de sacarose aos 15 e 30 dias de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009.

Segundo Grattapaglia e Machado, (1998) concentrações de 20 a 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose são mais usuais para o crescimento e a multiplicação *in vitro*. Abaixo desta faixa, pode ocorrer clorose e, acima, pode-se incorrer em excessivo potencial osmótico do meio, possibilitando deterioração das culturas (RIBEIRO et al., 2009), diferente dos resultados observados neste trabalho.

Para a presença de raiz, houve diferença significativa para a concentração de sacarose e para os tempos de avaliações utilizados ( $p < 0,05$ ), onde os explantes em meio com 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose durante 30 dias de cultivo apresentaram um maior número de raiz (Figura 4).

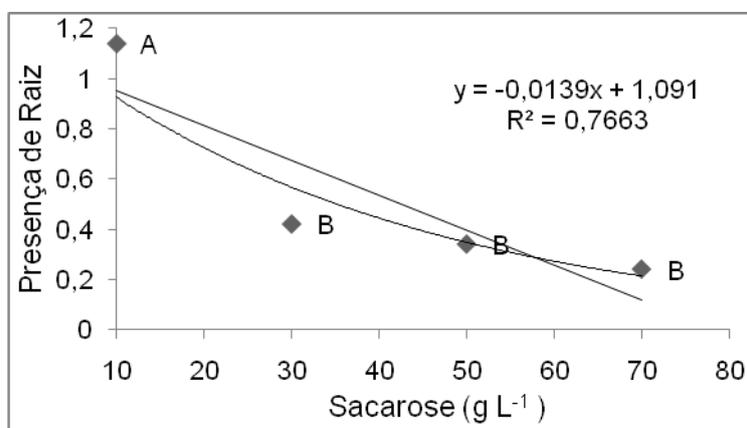


Figura 4 – Número médio de explantes com raízes em meios com diferentes concentrações de sacarose. Pelotas. UFPel, 2009.

Em estudos com crisântemo observou-se maior enraizamento nos meios contendo sacarose acima de 30 g L<sup>-1</sup> (OLIVEIRA et al., 1996); o mesmo não ocorreu ao observar-se a espécie de carqueja em estudo, que requer menores concentrações de sacarose para emissão de raízes

Esses dados se ajustam às afirmações de George e Sherrington (1984), citados por Oliveira (1994) e Guimarães et al. (1999), os quais relatam que concentrações elevadas de sacarose podem inibir a formação de raízes *in vitro*.

Tabela 2 - Número médio de explantes com raízes aos 15 e 30 dias de cultivo *in vitro*. Pelotas. UFPel, 2009.

Tempo (dias)	Presença de Raiz
15	0,77 A
30	0,28 B

\*Médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Em relação ao tempo de cultivo, pode-se observar uma redução na presença de raiz aos 30 dias de cultivo decorrente da perda de explantes devido à contaminação com o aumento de tempo *in vitro* (tabela 2).

Andrade (1998) em seus trabalhos relata que, na fase de enraizamento, a redução da concentração de sacarose no meio de cultura vem sendo citada como benéfica na melhoria da qualidade do sistema radicular, bem como na sobrevivência de plântulas transplantadas.

Em trabalhos com tomilho, pode observar que os dados correspondentes ao desenvolvimento da parte aérea, altura, número de gemas e folhas apresentaram melhores resultados com a concentração usual de sacarose (30 g L<sup>-1</sup>). Médias menores para essas variáveis foram observadas com as concentrações maiores de sacarose em qualquer sistema de vedação Bandeira (2007). Esse fato pode estar relacionado à diminuição da capacidade fotoautotrófica das plantas cultivadas com concentrações maiores de sacarose, o que afetaria o desenvolvimento da parte aérea das mesmas. A atividade da enzima fixadora de carbono RubPcase, nas folhas de certas espécies *in vitro*, é significativamente prejudicada pela sacarose exógena do meio de cultura e, conforme Langford e Wainwright (1986), a absorção de CO<sub>2</sub> pode ser incrementada por meio da redução gradativa de sacarose nos sucessivos subcultivos.

#### 4.2. Experimento II - Concentrações de sais

Pode-se observar, na Tabela 3, que conforme aumentadas as concentrações dos sais do meio MS no meio de multiplicação ocorreu um aumento na produção de folhas; porém estatisticamente não houve diferença entre os meios com 50, 100 e 200% da concentração dos sais. Observou-se também que a redução a 33% ou 50% bem como o dobro não diferiram estatisticamente entre si. Nesse caso, a concentração padrão de sais do MS diferiu estatisticamente apenas da redução a um terço onde houve diminuição no número médio de folhas ( $p < 0,01$ ) (apêndice B).

Tabela 3- Número médio de folhas formadas nas diferentes variações de sais do meio MS. Pelotas. UFPel, 2009.

Sais do MS	Número de Folhas
33%	0,94 b
50%	1,33 ab
100%	2,03 a
200%	2,25 ab

\*Médias seguidas pela letras de minúsculas nas linhas diferem significativamente ao nível de 1% pelo teste de Duncan.

Como esperado, houve um aumento no número de folhas em relação ao tempo de cultivo (Tabela 4), onde aos 30 dias a média de folhas produzidas era de 2,97 ( $p < 0,01$ ).

Tabela 4- Número médio de folhas formadas aos 15 e 30 dias de cultivo em meio com variações de concentrações de sais. Pelotas. UFPel, 2009.

Tempo (dias)	Número de Folhas
15	0,58 b
30	2,97 a

\*Médias seguidas pela letras minúsculas nas linhas diferem significativamente ao nível de 1% pelo teste de Duncan.

Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS para diversas espécies, visando ao melhor desenvolvimento das plantas e redução nos custos. Porém, assim como Ferreira et al. (2002), trabalhando com cupuaçu, a carqueja é uma espécie que necessita de uma maior concentração de sais na fase de indução da parte aérea.

Em trabalho com amoreira-preta, os autores observaram que o número de folhas foi estimulado pelo aumento da concentração de sais do meio MS, que quanto maior a concentração de sais do meio básico MS maior o número de folhas, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (VILLA et al., 2005).

Já para as variáveis número de brotos e presença de calo não houve diferença estatística significativa entre os meios ( $p > 0,01$ ). Com relação à presença de raiz, observou-se diferença significativa apenas entre os intervalos de tempo de permanência em cultivo ( $p < 0,05$ ), onde constatou-se maior presença de raízes aos 30 dias de cultivo. (Tabela 5).

Os resultados observados neste trabalho diferem daqueles descritos por Paiva et al. (1997) quando utilizaram 50% dos sais do meio MS e obtiveram um bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia, pois não houve variação em relação às concentrações de sais testadas. Concentrações de sais no meio básico MS, reduzidas a 50%, 33% ou 25%, também possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar 'Caiguangue' (DANTAS et al., 2000).

Tabela 5 – Número médio de explantes com presença de raiz aos 15 e 30 dias de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009.

Tempo (dias)	Presença de Raiz
15	0,36 B
30	0,59 A

\*Médias seguidas pelas letras maiúsculas nas colunas diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

### 4.3. Experimento III - Concentrações de nitrogênio

Segundo Sabino Donato et al. (1999), a importância do nitrogênio para o crescimento e morfogênese de tecidos cultivados *in vitro* tem sido bem estabelecida. Porém, a otimização da disponibilidade e a forma química do nitrogênio no meio de cultura é de extrema importância, pois pode apresentar variações conforme a cultura.

Neste trabalho observou-se que o número médio de folhas foi maior no meio contendo a menor concentração de nitrogênio (Tabela 6), sendo que na primeira avaliação aos 15 dias não houve produção de parte aérea, mas como esperado houve um aumento de número das mesmas com o tempo em cultivo ( $p < 0,05$ ) - resultados similares aos obtidos para cana-de-açúcar por Sabino Donato et al. (1999).

Tabela 6- Número médio de folhas de carqueja-gaúcha formadas aos 15 e 30 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de nitrogênio. Pelotas. UFPel, 2009.

Concentração de Nitrogênio	Número de Folhas	
	15 dias	30 dias
100%	0,00 a A	0,00 a C
50%	0,00 a A	0,36 a BC
25%	0,00 b A	1,12 a A
33%	0,00 b A	0,90 a AB

\*Médias seguidas letras minúsculas nas linhas diferem estatisticamente ao nível de 1% pelo teste de Duncan e médias seguidas por letras distintas, minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Para a variável brotação (Figura 5) pode-se verificar que o número médio de brotações por explante variou pela modificação das concentrações de N em relação às demais ( $p < 0,01$ ) (apêndice C), sendo que não houve diferença significativa entre as concentrações modificadas.

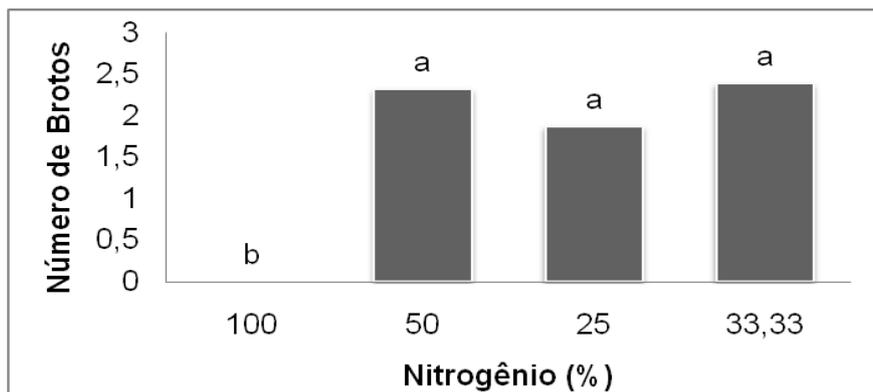


Figura 5 – Número médio de brotos formados *in vitro* nas diferentes concentrações de nitrogênio testadas. Pelotas. UFPel, 2009.

Com relação ao tempo em cultivo, também foi verificado um aumento no número médio de brotos dos 30 dias de cultivo. A média de brotos formados aos 15 e 30 dias foram respectivamente 1,21 e 1,76, cujos resultados diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p < 0,01$ ) (Tabela7).

Tabela 7- Número médio de brotos formados aos 15 e 30 dias de cultivo *in vitro*. Pelotas. UFPel, 2009.

Tempo (dias)	Número de Brotos
15	1,21 b
30	1,76 a

Médias seguidas pelas letras minúsculas nas colunas diferem significativamente ao nível de 1% pelo teste de Duncan.

Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Russowski & Nicolosso (2003), testando o comportamento *in vitro* de ginseng brasileiro, onde não obtiveram nenhuma diferença na variável número de brotos.

De acordo com George e Sherrington (1984), o desenvolvimento e a morfogênese em cultura de tecidos são, acentuadamente, influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido. Segundo Sakuta et al. (1987), altas concentrações de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) podem ser críticas no processo de morfogênese e crescimento dos explantes. Provavelmente, esses resultados estão relacionados com a própria função

metabólica do nitrogênio, como constituinte de aminoácidos, enzimas e proteínas.

Avila et al. (1998), analisando as respostas de três cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à concentração e fontes de N, constataram que o número de segmentos nodais, o comprimento das brotações e a biomassa aumentaram na cv. "Spunta" quando a concentração de N foi diminuída à metade, fato que os autores atribuíram ao aumento da eficiência do uso do carbono, resultados similares ao deste trabalho para carqueja.

#### **4.4. Experimento IV - Concentrações de BAP**

Um dos meios de cultura mais utilizado na micropropagação é o meio MS adicionado de alguns reguladores de crescimento para promover a formação de brotos. Neste trabalho, utilizou-se uma citocinina (BAP) nas concentrações de 0,10 e 0,30 mg/L<sup>-1</sup> e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na concentração de 0,05 mg/L<sup>-1</sup>, a qual a adição de 0,10 mg/L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultura (M3) determinou uma maior produção de brotos de carqueja-gaúcha, porém não diferiu significativamente de M2 e M4 (Figura 6).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o BAP tem sido eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser responsável pela multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de ser a citocinina mais barata de todas. Porém, seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pela falta de alongamento das culturas, pela redução no tamanho das folhas, pelo encurtamento dos entrenós, pelo engrossamento exagerado dos caules e pela hiperhidricidade generalizada, o que leva a problemas na fase de enraizamento.

Andrade et al. (2001) trabalhando com *Eucalyptus grandis* pode verificar que o aumento do número de brotações, por tratamento, foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de BAP, o que evidencia que as concentrações mais elevadas dessa citocinina foram inibitórias para o processo de multiplicação de eucalipto. O mesmo não se pode observar trabalhando com carqueja-gaúcha, onde o meio contendo menor

concentração de BAP (M3) promoveu um aumento do número de brotação, porém este aumento não diferiu estatisticamente ( $p < 0,01$ ) (apêndice D) dos meios com concentração mais elevada desta citocinina (M4), como também do meio sem adição de BAP (M2). Com relação ao tempo de período de 30 dias apresentou um maior número de brotações como esperado.

Cordeiro et al. (2004) trabalhando com *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke, uma espécie florestal, pode observar um aumento linear no número de brotos produzidos por explante à medida que aumentou a concentração de BAP no meio de cultivo. Resultados diferentes dos que podemos observar na espécie de carqueja em estudo, na qual o meio contendo a concentração de  $0,10 \text{ mg/L}^{-1}$  BAP (M3) não diferiu do meio contendo  $0,30 \text{ mg/L}^{-1}$  (M4), como também não diferiu do meio contendo  $0 \text{ mg/L}^{-1}$  BAP com acréscimo de  $0,05 \text{ mg/L}^{-1}$  GA3 (M2), diferindo apenas do meio básico MS sem adição de reguladores de crescimento (M1). Sendo *B. riograndensis* uma espécie nunca estudada em cultura de tecidos, ela requer mais estudos para saber como essa citocinina se comporta.

Segundo Carvalho et al. (1999), na cultura de tecidos as citocininas têm sido apontadas como causadoras do início de brotações em muitos explantes, pois a maioria deles não sintetizam *in vitro* citocininas suficiente para permitir um crescimento contínuo.

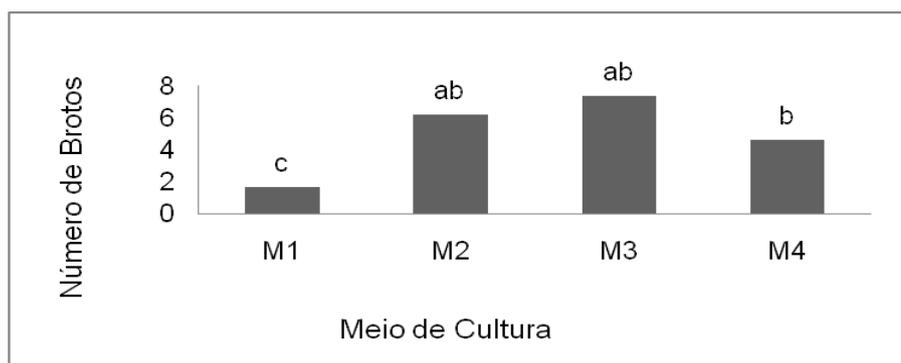


Figura 6 - Número de brotos formados em meios MS com diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

Observa-se também uma diferença significativa entre o número médio de brotos formados aos 15 e 30 dias, sendo a média de 4,27 e 5,72 respectivamente.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que para a carqueja gaúcha a redução da sacarose a 10% determina aumento na produção de brotos, bem como redução de nitrogênio até 25% e a adição de 0,10BAP + 0,05GA<sub>3</sub> mg L<sup>-1</sup>.

As variações nas concentrações de sais não causaram diferenças na produção de brotos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho visa a contribuir para os estudos de propagação *in vitro* de *Baccharis*, em especial da espécie *riograndensis*, sobre a qual poucos estudos têm sido realizados. As condições de cultivo *in vitro* determinadas neste trabalho servirão de ponto de partida para novos experimentos com essa espécie endêmica de carqueja.

## 6. REFERÊNCIAS

ABAD, M. J. BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **ARKIVOC**. Vol. 7, p. 76 – 96, 2007.

ABREU, I. N. de. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 101f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

ALONSO, J.R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Idiciones SRL, 1998. 987p.

ANDRADE, L. B. **Efeito do meio de cultura, tipos de explante e períodos de escuro sobre a micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.), cv. Cristal**. 1998. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1998.

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.41, n.12, p.1715-1719, 2006

ARAUJO, P.S. ; SILVA, J.M.O.D. ; NECKEL, C.A. ; ANSSEN, C. ; OLTRAMARI, A.C ; PASSOS, R. ; TIEPO, E. ; BACH, D.B. ; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa *Aloe vera* L. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, n.25, p.54-57, 2002.

AVILA, A. de L. et al. Nitrogen concentration and proportion of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N affect potato cultivar response in solid and liquid media. **HortScience**, Alexandria, v.33, n.2, p.336-338, 1998.

BANDEIRA, J.M.; LIMA, C.S.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; FALQUETO, A.R.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.472-474, 2007.

BONGA, J.M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Netherlands: M.Nijhoff, p.249-271, 1987.

BUDEL, J.M.; DUARTE M. R.; SANTOS C. A. M.; FARAGO P. V.; MATZENBACHER N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 268-271. 2005.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivo. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, p.87-132. 1998.

CALVETE, E.O. et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.186-191, 2002.

CAMPOS, R.A.S. et al. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.30-6, 2007

CARNEIRO M.A.A., FERNANDES G.W. Herbivoria. **Ciência Hoje** v.20, p. 35-39. 1996.

CARVALHO, G.R.; PIO, R.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; SCARANE, M.J. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no desenvolvimento de plântulas de cafeeiro *in vitro*. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, p.185-187, 1999.

CARVALHO, R.I.N., GIUBLIN, L.M., RIPKA, M., WACHOWISK, C.M., NOLASCO, M.A., SCHEFFER, M.C., RADOMSKI, M.I. Pré-resfriamento e temperatura para germinação de sementes de carqueja. **Scientia Agrária**. v. 6, p.79-84. 2005.

CASTRO, H.G.C.; FERREIRA, F.A. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: carqueja (*Baccharis genistelloides*)**. Viçosa : UFV, 102p, 2000.

CONCEIÇÃO, H. E. O. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp.)** 191f. 2000.Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 118-124, 2004.

DANTAS, M. C. A.; CERETTA, M.; COUTINHO, F. E.; FORTES, G. R. de L. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caigangue. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 123-130, 2000.

DE BONA, C. M.; BIASI, L. A.; NAKASHIMA, T.; ZANETTE, F.; CORRÊA JÚNIOR, C. **Carqueja: cultive esta idéia**. Curitiba: SEAB/UFPR, 2002. 18p

DE BONA, C. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Propagação de três espécies de carqueja com estacas de diferentes tamanhos. **Ciências Agrárias**. Londrina, v. 25, n. 3, p. 179-184, 2004.

DE BONA, C. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Propagation of three species of *Baccharis* by cuttings. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 223- 226, 2005.

DI STASI LC, HIRUMA-LIMA CA, SANTOS CM, GUIMARÃES EM. **Asterales medicinais**. In: Di Stasi LC Plantas medicinais na amazônia e na mata atlântica. São Paulo: Unesp. 2002.

HEMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S. L. T.; CAMPOS, C. C.; ROMOFE, P.; KAPLAN, M. A. C.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. C.; **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 29, p. 947, 2001.

FERREIRA MGR, CÁRDENAS FHN, CARVALHO CHSC, CARNEIRO AA & DANTAS FILHO CF Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 246-248, 2002.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. (coord.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. p.123-146, 2004.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRS, p.101-21. 1999.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. 2007. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo\\_fitoterapicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em 12 mar. 2009.

FRIZZO, C. D.; SERAFINI, L. A.; DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P. Essential oil of *Baccharis trimera* DC. from Southern Brazil. Flavour and fragrance plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London: Butterwoths. 69-84. Journal, v. 16, n. 4, p. 286-288, 2001.

FRIZZO, C.D.; SERAFINI, L.A.; DELLACASSA, E., LORENZO, D.; MOYNA, P. Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, n. 4, p. 286-288, 2001.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements os suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**. v. 50, p. 151-158, 1968.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories.** (p. 171-173) England, Eversley: Exegetics Limited, 1984.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology.** Great Britain: Exegetics Limited, v.1, 547p, 1993.

GIANELLO, J.C.; CEÑAL, J.P.; GIORDANO, O.S.; TONN, C.E.; PETENATTI, M.E.; PETENATTI, E.M.; DEL VITTO, L.A. Medicamentos herbários en el centro-oeste argentino. II. "Carquejas": control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2000.

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

GUIMARÃES, P.T.C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A.M.P.DE. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre propagação in vitro de samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.2, p. 309-316, abr/jun, 1999.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices.** 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.

HEINDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; STEIN, V.; BOBROWSKI, V. L. Número cromossômico de *Baccharis riograndensis* Malag. & J. E. Vidal (asteraceae). **Pesquisas botânica**, nº 57, p. 121-136. São Leopoldo, Instituto Anchieta de Pesquisas, 2006.

HEIDEN, G.& SCHNEIDER, A.A. Lectotypification and notes on *Baccharis riograndensis* (Asteraceae, Astereae). **Journal of the Botanical Research Institute of Texas** v.2, p. 291-295, 2008.

HEIDEN, H.; IGANCI, J. R. V.; MACIAS, L. *Baccharis* sect. *Caulopterae* (asteraceae, astereae) No Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia** v.60, n.4, p. 943-983, 2009.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. **Propagação vegetativa de Eucalyptus: princípios básicos e sua evolução no Brasil.** Piracicaba: IPEF, 12p. (Circular Técnica, n.192), 2000,

HU, C. Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture.** New York: MacMillan Publishing Company, v.1, p. 177-227, 1983.

JANUARIO AH, SANTOS SL, MARCUSSI S, MAZZI MV, PIETRO RC, SATO DN, ELLEN AJ, SAMPAIO SV, FRANCA SC, SOARES AM. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**; v.150, n.3, p.243-51, 2004.

LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, M. 1986. **Photosynthetic ability of in vitro grown rose shoots in relation to media components**. In: International Congress of Plant Tissue and Cell Cultures, 2. St. Paul Abstract... St. Paul: University of Minnesota, 1986, 433p.Abstacts.

LIMA, D.M.; GOLOMBIESKI, E.R.; AYUB, R.A. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.2, p. 359-363, 2000.

LEIFERT, C. et al. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.14, n.2, p.83-109, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo: Plantarum, 2002.

MALDANER, J. et al. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1201-6, 2006.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publication, 2000.

MATEO-SAGASTA, L. A. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, p. 89-94, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plantarum**, v.15, p. 473-479,1962.

NAGAO, E.O. et al. Efeitos de sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n.1, p.25-31, 1994.

ORTINS, G. M. M.; AKISUE, G. Estudo morfohistológico, screening fitoquímico, constantes físicas, e análise rotatográfica de drogas e do extrato fluido, visando o controle de qualidade de espécies de *Baccharis articulata*. **Revista Lecta**, v. 18, n. 2, p. 9-32, 2000.

OLIVEIRA, P.D.; PASQUAL,M.;PAIVA,R. Efeito de diferentes concentrações do meio MS, nitrogênio e sacarose na micropropagação de crisântemo "Orange Reagen". **Bragantia**, Campinas, v. 55(1), p.9-18, 1996.

PAVA, P. D. O.; MAYER, M. B. D.; CAMPOS, R. J. C.; RODRIGUES, V. A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.

PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE. v. 1, 74 p, 2001.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Manejo de populações naturais de plantas medicinais em Santa Catarina. In: **Jornada catarinense de plantas medicinais**, Tubarão. Anais.UNISUL, p.83-90, 1998.

RIBEIRO, M.V.;LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L.C.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Concentrações de sacarose e tipos de vedações no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.843-845, 2007.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B; RODRIGUES, V. A. Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.8, p.2388-2393, 2009.

ROSSOWSKI, D; NICOLOSSO, F. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata*(Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 57-63, 2003.

RUSSOWSKI, D. **Nitrogênio e fósforo na micropropagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson**. 2001. 120f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria.

SABÁ, R.T.; LAMEIRA, O.A.; LUZ, J.M.Q.; GOMES, A.P.R.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n.1, p.106-9, 2002.

SABINO DONATO, V.M.T.; ANDRADE, A.G.de; CÂMARA, T.R.Variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio. **Scientia Agrícola**, v.54, n.4, p.1289-1292, 1999.

SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiologia Plantarum**, v. 71, n. 4, p. 459-463, 1987.

SCHEFFER, M.C. **Roteiro para estudos de aspectos agrônômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUSPR/ CEMEPR**. Sob Informa, v.10, n.2, p.29-31, 1992.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. de; AZEVEDO, J. L. de. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba RS: Ed. Agropecuária, 2001. 463 p.

SHARP, H.; BARTHOLOMEW, B.; BRIGHT, C.; LATIF, Z.; SARKER, S. D.; NASH, R. J. 6-oxygenated flavones from *Baccharis trimera* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 105-107, 2001.

SILVA JÚNIOR, A.A. **Plantas medicinais e aromáticas**. Itajaí: Epagri, 1997.

SOUZA, A.V. et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* mart. **Ciência Agrotécnica**, v.27, n.2, ed. esp., p.1532-8, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. p.449-484. 2004.

TORRES L.M.B., GAMBERINI M.T., ROQUE N.F., LIMA-LANDMAN M.T., SOUCCAR C, LAPA AJ. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p. 617-619, 2000.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28 n.1 São Paulo Jan./Feb. 2005.

VILLA, F.; ARAUJO, A. G. de; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta "Ébano" em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotéc.** Lavras, v. 29, n. 3, 2005. p.582-589.

YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.)** N. E. Br. 2006. Dissertação (Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo, Universidade de São Paulo, Campinas, 2006.

## Apêndices

Apêndice A - Tabela de análise de variância para as variáveis número médio de folhas, número médio de brotos e número médio de explantes com raiz em carqueja submetida às diferentes concentrações de sacarose e tempo de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	G. L.	Quadrado Médio		
		Número de Folhas	Número de Brotos	Presença de Raiz
Tempo	1	7,66**	0,126 <sup>NS</sup>	0,593*
Sacarose	3	0,873**	0,133 <sup>NS</sup>	0,349*
Tempo X Sacarose	3	0,353**	0,177*	0,181 <sup>NS</sup>
Resíduo	32	0,041	0,059	0,100
Média Geral(%)		1,693	1,537	1,007
C.V.(%)		12,029	15,923	31,430

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.  
<sup>NS</sup> não significativo

Apêndice B – Tabela de análise de variância para as variáveis número médio de brotações, de folhas, de explantes com presença de raiz e presença de calos formados em carqueja submetida às diferentes variações de sais no meio e tempo de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	G. L.	Quadrado Médio			
		Número de Folhas	Número de Brotos	Presença de Raiz	Presença de calo
Meio de Cultura	3	0,449**	0,053ns	0,065ns	0,008ns
Tempo	1	6,784**	0,036ns	0,19*	0,00ns
Meio de Cultura X Tempo	3	0,089ns	0,030ns	0,031ns	0,00ns
Resíduo	32	0,077	0,072	0,021	0,004
Média Geral (%)		1,451	1,514	0,988	0,721
C.V.(%)		19,207	17,820	14,817	9,168

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

Apêndice C – Tabela de análise de variância para as variáveis número médio de folhas e número médio de brotações em carqueja submetida às diferentes concentrações de nitrogênio e tempo de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Número de Folhas	Número de Brotos
Nitrogênio	3	0,165*	2,229**
Tempo	1	1,005**	0,380*
Nitrogênio X Tempo	3	0,165*	0,0715 ns
Resíduo	32	0,057	0,084
Média Geral (%)		0,875	1,407
C.V.(%)		27,607	20,636

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

Apêndice D - Tabela de análise de variância para as variáveis número médio de brotações e número de calos formados em carqueja submetida às diferentes meios de cultura e tempo de cultivo. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Número de Brotos	Número de Calos
Meio de Cultura	4	2,159**	0,046*
Tempo	1	0,964**	0,0884**
Meio de Cultura X Tempo	4	0,044 ns	0,039*
Resíduo	30	0,087	0,011
Média Geral (%)		2,340	0,969
C.V.(%)		12,634	11,134

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.