

## Crescimento *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) em meios de cultivo simplificados<sup>§</sup>

*In vitro* growth of *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) using simplified culture media

Sandra Cristina G Cavalini<sup>1,3</sup>, Patrícia F Gianini<sup>2,3</sup>, Cristiano Pedroso-de-Moraes<sup>2,3\*</sup>

§Trabalho de conclusão do curso de Especialização em Biotecnologia do primeiro autor; 1. Discente do Curso de Especialização em Biotecnologia; 2. Docentes do Curso de Especialização em Biotecnologia; 3. Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS - Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 - Jd. Universitário. Araras - SP. CEP: 13607-339.

\*Corresponding author: [pedroso@uniararas.br](mailto:pedroso@uniararas.br)

**Resumo** Uma das formas de aumentar a produção de mudas com qualidade genética tem sido a propagação *in vitro*. Diferentes formulações de meios de cultura têm sido desenvolvidas na tentativa de se obter meios eficazes e protocolos simplificados, a fim de se produzir plantas com qualidade e custo reduzido. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar a propagação *in vitro* de *Artemisia absinthium* utilizando meios de cultura simplificados. Para tal, foi realizado um experimento em delineamento inteiramente casualizado, no qual as sementes foram inoculadas em meio MS com metade da concentração de macronutrientes e outros dois meios à base dos fertilizantes Hyponex® e Kristalon laranja®. Após 90 dias da inoculação verificou-se que o meio de cultura que proporcionou maior eficiência no desenvolvimento *in vitro* de sementes foi o Kristalon laranja, pois apresentou os maiores valores médios para todas as variáveis analisadas.

**Palavras-chaves:** *In vitro*, propagação, plantas medicinais.

**Abstract** One of the ways to increase the production of plants with good genetic quality has been the *in vitro* propagation. Different culture media have been developed to obtain more efficient results and simplified protocols in an attempt to obtain quality plants at low cost. Thus, the objective of this study was to develop *in vitro* propagation of *Artemisia absinthium* with simplified culture medium. The experimental design was completely randomized, in which seeds were grown in MS medium with half concentration of macronutrients and two other media based on Hyponex® and Kristalonlaranja®. The results after 90 days showed that the Kristalon laranja medium produced the best *in vitro* results for all analyzed variables.

**Keywords:** *In vitro*, propagation, medicinal plant.

### Introdução

Asteraceae, caracteriza-se como o grupo sistemático mais biodiverso dentre as angiospérmicas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. Seus representantes, exibem portes muito diferenciados, apresetando-se comumente, herbáceos e arbustivos, e mais raramente, arbóreos (Verdi *et al.* 2005, Mendieta *et al.* 2010).

Investigações realizadas com diferentes espécies de Asteraceae, apontam a presença de ampla variedade de metabólitos secundários, com destaque para os flavonóides, os quais caracterizam-se como importantes marcadores quimiotaxonômicos, além de sua importância medicinal no tratamento e prevenção de distúrbios de saúde e diversas patologias (Verdi *et al.* 2005).

Dentre as inúmeras espécies de compostas utilizadas medicinalmente, destaca-se a *Artemisia absinthium* L., conhecida popularmente como losna. Sua infusão apresenta-se benéfica em relação à: funções digestivas, colagogas, carminativas, tônico hepáticas, vermífugas, orexígenas, bactericidas e antiinflamatórias tóxicas (Verdi *et al.* 2005, Ferro 2008; Mendieta *et al.* 2010). Vale ressaltar também, que a mesma é usada na fabricação da bebida absinto (Ferro 2008; Mendieta *et al.* 2010).

Os metabólitos secundários descritos para esta espécie vegetal são óleos essenciais (tuíol, tuiona, camazuleno, felandreno, borneol, geraneol, alpha-pineno, cineol), princípios amargos (absintina e santonina), ácidos orgânicos, terpenos, carotenóides, flavonóides, resinas e taninos (Ferro 2008). Além disso, é importante destacar que *A. absinthium* possui o composto denominado tujona, responsável por quadros de intoxicação crônica, capaz de causar disfunção cerebral com convulsões semelhantes à epilepsia, delírio e alucinações (Mendieta *et al.* 2010).

Apesar de *A. absinthium* ser propagada convencionalmente a

partir de estacas caulinares maduras (Ferro 2008), em âmbito industrial farmacêutico, a propagação *in vitro* constitui uma técnica de grande importância para multiplicação em larga escala da espécie. Tal método facilita a produção de mudas de material elite em escala comercial, por produzir plantas livres de patógenos e acelerar programas de melhoramento que são demorados e complexos em virtude do ciclo, hábito de crescimento e ausência de melhores técnicas convencionais de propagação vegetativa massal (Ledo *et al.* 2001).

Diretamente relacionado à germinação *in vitro* de sementes da espécie, é referenciado apenas um trabalho, no qual foram utilizados os meios, MS (Murashige e Skoog 1962), ½MS (meio MS com metade da concentração de sais de sua formulação original) e meio AAS (constituído somente por ágar, água destilada e sacarose). Neste trabalho, foi constatado que a germinação da espécie pode ser obtida utilizando apenas meio contendo água e ágar-sacarose. Entretanto, após a germinação, as plântulas formadas necessitaram ser transferidas para o meio ½MS visando à obtenção de indivíduos com características morfológicas mais adequadas à propagação *in vitro* (Simão *et al.* 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) em meios de cultivo simplificados.

## Métodos

Para a realização do trabalho, sementes (aquênios) de sete diferentes indivíduos de *Artemisia absinthium* foram coletadas em Maio de 2013 e levadas ao Laboratório de Botânica e Estudos Ambientais do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, situado no município de Araras, São Paulo, Brasil.

Foram preparados três tipos de meios de cultura, sendo o primeiro constituído da metade da concentração de sais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), o qual foi usado como controle, e os outros dois meios constituídos de Hyponex® Scotts (NPK 6,5-9-19) ou Kristalon laranja® Yara (NPK 6-12-36) a 2 g L<sup>-1</sup>, acrescidos de 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose com pH ajustado para 5,8 depois da adição de 7 g L<sup>-1</sup> de ágar-banana (Dezan *et al.* 2012). Posteriormente, 50 mL de cada meio de cultura foram vertidos em quatro frascos de 250 mL e esterilizados em autoclave a 121°C e 1atm de pressão durante 20 minutos (Arditti e Ernst 1992).

Para a desinfestação das sementes, optou-se pela utilização de hipoclorito de sódio a 0,5%, as quais foram submetidas à agitação na solução durante cinco minutos, em tubos para centrífuga. Posteriormente, os tubos foram submersos em álcool 70% e levados à câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada e depositadas nos frascos contendo os meios de cultura (Dezan *et al.* 2012).

As semeadura ocorreu em quatro frascos por tratamentos, sendo inoculadas por recipiente, 250 propágulos. Os frascos

semeados foram fechados com tampa plástica transparente ou metálica e mantidos durante 90 dias em câmara climática (B.O.D. MA 403), à temperatura constante de 25°C, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de aproximadamente 116 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Foram avaliados a germinabilidade (G%), índice de velocidade de germinação (IVG) (Labouriau, 1983; Maguire, 1962, respectivamente), o comprimento total da plântula (CTP), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz axial (CRA) e da maior folha (CMF), a massa fresca total (MFT) e a massa seca total (MST), obtida colocando-se o material em temperatura de 65°C até atingir a massa seca constatare. As medidas foram obtidas utilizando-se paquímetro digital e balança analítica (0,001 g). Para a análise estatística dos dados foi utilizada ANOVA e em seguida as médias foram submetidas ao teste de Tukey (α = 0,05) utilizando-se o aplicativo BioEstat 5.

## Resultados e discussão

Os resultados demonstraram que as plântulas de *Artemisia absinthium*, cultivadas em meio de cultivo à base do fertilizante Kristalon laranja, apresentaram as maiores médias para todas as variáveis analisadas quando comparadas aos outros meios de cultivo (Tabela 1).

A micropropagação de plantas em meios de cultivo simplificados representa uma alternativa para a produção comercial de espécies de interesse econômico (Stancato 2001), entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido (Itaya *et al.* 2005). Dessa forma, recentemente, o uso de fertilizantes comerciais tem se intensificado como forma de facilitação para o preparo de meios e redução de custos de produção em várias espécies vegetais, como observado por Pedroso-de-Moraes *et al.* (2009 a,b), para *Cattleya loddigesii* e *Cattleya tigrina*, em que a utilização de Kristalon laranja propiciou o desenvolvimento de plantas em larga escala e com menor custo.

**Tabela 1** Valores médios para germinabilidade (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento total da plântula (CTP), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca total (MFT), massa seca total (MST), comprimento da raiz axial (CRA) e comprimento da maior folha (CMF) de *Artemisiaabsinthia* após 90 dias de cultivo *in vitro* nos meios de cultura ½ MS, Hyponex® (HY) e Kristalon laranja® (KR). CV = Coeficiente de Variação.

Meios de Cultura	Variáveis Biométricas Avaliadas							
	G (%)	IVG	CTP (cm)	CPA (cm)	CRA (cm)	CMF (cm)	MFT (g)	MST (g)
½MS	76,4 B <sup>1</sup>	2,05 B	1,73 B	0,64 B	0,71 C	0,73 B	1,32 B	0,07 B
HY	68,9 C	1,08 C	1,14 C	0,21 C	0,85 B	0,56 C	1,11 C	0,05 C
KR	88,5 A	3,12 A	2,08 A	1,18 A	1,05 A	0,93 A	1,54 A	0,09 A
CV(%)	12,6	9,5	15,9	9,9	19,8	10,7	17,1	11,7

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5 % de significância.

Em cultivo *in vitro*, um dos principais nutrientes essenciais e ativos é o nitrogênio, o qual é absorvido, principalmente, na forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Sakuta *et al.* 1987), assim, o crescimento das culturas, seu metabolismo químico e a formação e produção de metabólitos são influenciados diretamente pela quantidade e pela fonte de N (Russowski e Nicoloso 2003). Ainda, o efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas é marcante, sendo que o nitrato, como única fonte de nitrogênio, em geral, sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies vegetais (Reinert e Mohr 1967).

Os valores médios observados para as variáveis estão de acordo com os obtidos para *Cattleya loddigesii* (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a), no qual o meio de cultura a base de fertilizante Kristalon laranja apresentou as maiores médias para as variáveis: altura das plântulas (AP), massa fresca (MF) e massa seca (MS), comprimento da maior raiz (CR) e comprimento da maior folha (CF), quando comparados aos meios ½MS e Hyponex, fato este atribuído aos menores percentuais de nitrogênio amoniacal presentes nestes meios de cultivo. Ainda, a obtenção de tais resultados também podem ser explicados pela existência de uma relação quadrática entre as variáveis analisadas em plântulas submetidas a doses balanceadas de nitrogênio nítrico e amoniacal, em que se obtêm, principalmente, aumento de massa fresca, massa seca e altura de plântulas, com ênfase no desenvolvimento do sistema radicial (Bernardi *et al.* 2004, Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a). Tal fato é corroborado pelas porcentagem de nitrogênio nítrico (0,29; 0,33 e 0,35%) e amoniacal (0,18; 0,23 e 0,54%) encontradas para a totalidade de macronutrientes que compõem o meio ½MS e os fertilizantes Hyponex e Kristalon laranja, respectivamente. Esta afirmação é confirmada por resultados semelhantes obtidos para plantas terrestres do gênero *Cymbidium* (Powell *et al.* 1988, Wen e Hew 1993, Pan e Chen 1994) em que foi constatado, que doses semelhantes das duas fontes de nitrogênio influenciaram positivamente as variáveis acima citadas, principalmente em relação à variável, comprimento da maior raiz (CR), como o ocorrido neste trabalho.

Para *Artemisia absinthium*, em relação à variável número de raízes (NR), os resultados corroboram com os encontrados para *Aechmea blanchetiana* (Kanashiro *et al.* 2007), na qual o número de raízes decresceu linearmente com o aumento da concentração de nitrogênio amoniacal no meio MS modificado. A mesma tendência foi constatada em *Pfaffia glomerata* (Russowski e Nicoloso 2003), na qual foi obtido maior número de raízes na concentração 50% de nitrato de amônio contido no meio MS e tendendo ao decréscimo nas maiores concentrações. Tais diferenças em relação aos resultados encontrados podem estar relacionadas com a variabilidade existente no desenvolvimento de distintos genótipos de plantas cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio (Singh 1992).

Dessa forma, conclui-se que o meio de cultura Kristalon laranja é o mais adequado para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Artemisia absinthium*.

## Referências

- Arditti J, Ernest R (1992) **Micropropagation of orchids**. New York, John Wiley & Sons.
- Bernardi AC, Faria RT, Carvalho JFRP, Unemoto LK, Assis AM (2004) Desenvolvimento vegetativo de *Dendrobium nobile* Lindl. fertirrigadas com diferentes concentrações da solução nutritiva de Saruge. **Semina: Ciências Agrárias** 25: 13-20.
- Dezan LF, Canassa F, Souza-Leal T, Diogo JA, Massaro R, Cordeiro GM, Pedroso-de-Moraes C (2012) Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. **Idesia (Arica)** 30: 53-58.
- Ferro D (2008) **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, Editora Atheneu.
- Itaya NM, Vaz APA, Kerbauy GB, Figueiredo-Ribeiro RCL (2005) Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas *in vitro* de *Viguieradiscolor* Baker (Asteraceae). **Acta Botanica Brasílica** 19: 579-586.
- Kanashiro S, Ribeiro RCS, Gonçalves AN, Dias CTS, Jocys T (2007) Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea** 34: 59-66.
- Labouriau LG (1983) **A germinação de sementes**. Washington DC, OEA.
- Ledo AS, Lameira OA, Benbadis AK, Menezes IC, Ledo CAS, Oliveira MSP (2001) Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura** 23: 468-469.
- Maguire JD (1962) Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science** 2: 176-177.
- Mendieta MC, Vargas NRC, Souza ADZ, Vanini M, Heck RM (2010) Plantas medicinais utilizadas por comunidade quilombola do município de Mostardas para hipertensão arterial, XIX CIC – XII ENPOS – II Mostra Científica, p. 3. Disponível em: <[http://www.ufpel.tche.br/cic/2010/cd/pdf/CS/CS\\_00138.pdf](http://www.ufpel.tche.br/cic/2010/cd/pdf/CS/CS_00138.pdf)>. Acesso em: 2 junho 2013
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.
- Pan RC, Chen JX (1994) Effects of nitrate-nitrogen and ammonium-nitrogen on growth and development in *Cymbidium sinensis*. **Acta Botanica Yunnanica** 16: 285-290.
- Pedroso-de-Moraes C, Diogo JA, Pedro NP, Canabrava RI, Martini GA, Marteline MA (2009a) Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleyaloddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências** 7: 67-69.
- Pedroso-de-Moraes C, Santambrosio NS, Massaro R, Cordeiro GM, Souza-Leal T (2009b) Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaios e Ciência** 13: 57-65.
- Powell CL, Caldwell KI, Littler RA, Warrington I (1988) Effect of temperature regime and nitrogen fertilizer level on vegetative and reproductive bud development in *Cymbidium* orchids. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 113: 552-556.
- Reinert RA, Mohr HC (1967) Propagation of *Cattleyaby* tissue culture of lateral bud meristems. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science** 91: 664-671.
- Russowski D, Nicoloso FT (2003) Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural** 33: 57-63.
- Sakuta M, Takagi T, Komamine A (1987) Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolaca americana*. **Physiologia Plantarum** 71: 459-463.
- Simão MJ, Damasceno S, Nogueira AM, Guizardi PS, Silva NCB (2010) Germinação *in vitro* de sementes de losna (*Artemisia absinthium* L.) em diferentes meios de cultura. **Anais...XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba**.

- Singh F (1992) Micropropagation of orchids *Scaphiglotis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: Bajaj YPS (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry: high-tech and micropropagation IV**. New York, Springer. Berlin Heidelberg 20: 223-245.
- Stancato GC (2001) Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 7: 25-33.
- Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG (2005) Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova** 28: 85.
- Wen ZQ, Hew CS (1993) Effects of nitrate and ammonium on photosynthesis, nitrogen assimilation and growth of *Cymbidium sinense*. **Journal of the Singapore National Academy of Science** 20: 21-23.