



**ALEXANDRE ALVES DE CARVALHO**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA  
MICROPROPAGAÇÃO E NA ANÁLISE DOS  
COMPOSTOS VOLÁTEIS *IN VITRO* DE  
*Chenopodium ambrosioides* L.**

**LAVRAS - MG**

**2013**

**ALEXANDRE ALVES DE CARVALHO**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA MICROPROPAGAÇÃO  
E NA ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS *IN VITRO* DE  
*Chenopodium ambrosioides* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Carvalho, Alexandre Alves de.

Influência de diferentes fatores na micropropagação e na análise dos compostos voláteis *in vitro* de *Chenopodium ambrosioides* L. / Alexandre Alves de Carvalho. – Lavras : UFLA, 2013.  
78 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.  
Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.  
Bibliografia.

1. Epazote. 2. Óleos essenciais. 3. Cultura de tecidos. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.8839130416

**ALEXANDRE ALVES DE CARVALHO**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA MICROPROPAGAÇÃO  
E NA ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS *IN VITRO* DE  
*Chenopodium ambrosioides* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de maio de 2013.

Dr. Ricardo Monteiro Corrêa	IFMG
Dr. Francisco Dias Nogueira	EPAMIG
Dr <sup>a</sup> . Ana Luiza de Oliveira Timbó	UFLA

PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS-MG**

**2013**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos e recursos financeiros para realização desse trabalho.

Ao professor e orientador José Eduardo Brasil Pereira Pinto, não apenas pela disponibilidade e acompanhamento nessa formação profissional, mas também, pela sua amizade e seus ensinamentos.

À professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela coorientação e dedicação.

Aos professores e pesquisadores Ricardo Monteiro Corrêa e Francisco Dias Nogueira, pela aceitação do convite de serem membros da banca avaliadora. Aos colegas do laboratório Ivan, Ana Luiza, Helena, Andreíças Fabri e Flores, Lucila, Sâmia, Mariane, Thainá, Giselly e principalmente ao pesquisador Rodrigo Kloss, pelo grande

apoio e amizade durante a realização dos trabalhos.

Aos funcionários do laboratório Evaldo e Luiz, pela participação no desenvolvimento dos experimentos.

Aos familiares e amigos que de alguma maneira contribuíram para mais essa conquista.

Aos meus pais Osmar e Ana Maria, à minha noiva Ester e seus familiares e minha irmã e seu esposo, que me acompanham diariamente, sendo o apoio de cada um essencial para minha existência;

E finalmente à Deus, o autor de tudo;

Obrigado!

## RESUMO GERAL

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma espécie condimentar e medicinal utilizada em vários países e "erva de Santa Maria", "mastruz" e "epazote" são seus principais nomes populares. No Brasil, essa espécie têm como fundamental finalidade o tratamento de vermes intestinais e há o interesse em seu estudo por estar listada no RENISUS. A cultura de tecidos possibilita a multiplicação em grande quantidade de clones e em pequeno espaço, além da possibilidade de produzir metabólitos secundários *in vitro*. Objetivou-se desenvolver um protocolo de micropropagação para essa espécie e estudar alguns fatores que podem interferir no seu crescimento e produção de constituintes voláteis *in vitro*. Os experimentos foram divididos em dois artigos. No primeiro artigo, testou-se o estabelecimento de segmentos apicais em meio MS com 3 % de sacarose e às diferentes concentrações de sais do meio MS (0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00) e de sacarose (5; 10; 20; 30 e 40 g L<sup>-1</sup>) no crescimento de segmentos nodais de plântulas micropropagadas e sua influência na percentagem da fração volátil presente nas folhas e, finalmente, a aclimatização dessas plântulas em três substratos (comercial, vermiculita e areia). No segundo artigo, avaliou-se os tipos de explantes (segmentos nodal e apical) nas orientações (vertical e horizontal), às distintas intensidades de irradiâncias (16,5; 36,6; 47,6 e 73,2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), à adição de três citocininas (BAP, TDZ e Cinetina) em quatro concentrações (0,0; 0,50; 1,00 e 2,00), além de diferentes volumes de meio de cultura (20; 35; 50; 65 e 80 mL). De modo geral, conclui-se no primeiro artigo que o meio MS com sua concentração de sais reduzidas pela metade (0,50 MS) e 30 g L<sup>-1</sup> proporcionaram maior crescimento *in vitro* de segmentos nodais. As concentrações de sais e sacarose, no meio de cultura, não influenciaram na identificação dos principais constituintes do óleo essencial, entretanto o fator concentrações de sais foi o que mais influenciou a percentagem desses metabólitos. A taxa de multiplicação foi mantida em aproximadamente 8,5 entre as repicagens e a separação em origem nodal e apical apresentaram diferenças nos subcultivos. O substrato comercial, a areia e a vermiculita podem ser utilizadas para aclimatizar essa espécie. No segundo artigo, conclui-se que os segmentos apicais ou nodais na orientação vertical, mantidos em uma sala de crescimento com 47,6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiância, sem a adição de citocininas e com 50 mL de meio de cultura apresentaram melhores respostas para o cultivo *in vitro* de *Chenopodium ambrosioides*. A identificação dos constituintes voláteis dessa espécie não foi influenciada pela intensidade de irradiância e uso de citocinina, sendo que sua percentagem foi influenciada.

Palavras-chave: Epazote. Óleo essencial. Cultura de tecidos.

## ABSTRACT

*Chenopodium ambrosioides* L. is a species utilized as season and medicinal plant, being known in various countries as “Erva de Santa Maria”, “mastruz”, “epazote” and other names. In Brazil, this species is used with the main purpose of treating hookworms, and is listed as one of the 71 herbs and species of RENISUS. Tissue culture enables the rapid multiplication of great quantity of clones in a minimal area, with security, phytosanitary quality and preservation of important characters, there are also factors like preservation of natural habitats and production of compounds *in vitro* with economical value. The main objective of the development of a micropropagation protocol for this species were to study some factors which could intervene in development and it's production of main volatile compounds *in vitro*. The experiments were divided in two papers, the first aimed to evaluate the establishment in MS medium with 3% of sucrose, development of nodal segments in different MS salt concentrations (0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00), sucrose concentrations (5, 10, 20, 30, 40 g L<sup>-1</sup>), and lastly acclimatization in commercial substrate, vermiculite and sand. In the second paper, nodal and apical segments were tested in vertical and horizontal orientation. The irradiance intensity (16.5, 36.6, 47.6 and 73.2  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) were evaluated in a growth room, three kinds of cytokinin (BAP, TDZ and Kinetin) in four different concentration (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0) were studied, as well as different medium culture volume (20, 35, 50, 65 and 80 mL) in the growing of nodal segments. Generally the MS medium with half of it's salt concentration (0.50 MS) and 30g L<sup>-1</sup> provided better growth for nodal segments *in vitro*. Salt and sucrose concentrations in the culture medium had no effect in the identification of the main constituents of the essential oil, however the concentration of salts were the factor with most influence in secondary metabolites quantity. The multiplication rate maintained approximately around 8.5 between the subculturing and the separation from nodal and apical segments represented significant differences. Sand, vermiculite and commercial substrates can be used to acclimatize the species. In general, the apical or nodal segments in vertical orientation, kept in a growth room under 47,6  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of irradiance, without cytokinin and 50 mL of medium culture volume, presented the most desirable results for *in vitro* cultivation of *Chenopodium ambrosioides*. The identification of volatile compounds of this species weren't affected by irradiance intensity and cytokinin, contrary of it's quantification.

Keywords: Epazote. Essential Oil. Tissue culture.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 A espécie *Chenopodium ambrosioides*: A- canteiro fertiirrigado, B- detalhamento da folha, C- detalhamento da inflorescência. Foto: José Eduardo B. P. Pinto e Alexandre A. de Carvalho. UFLA, Lavras, 2013..... 15

Figura 2 Mecanismo envolvendo a formação do ascaridol e outros monoterpenos no gênero *Chenopodium*. Dembitskya *et al.*, 2008..... 16

### ARTIGO 1

Figura 1 Número de plântulas obtidas ou provável de se obter e a taxa de multiplicação em cada subcultivo (1º, 2º e 3º) de *Chenopodium ambrosioides* e em diferentes origens do explante (apical e nodal). UFLA, Lavras, 2013..... 41

Figura 2 Plântulas germinadas em bandejas de isopor, transplantadas para vasos de polietileno que serviram de fontes de explante, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose adicionadas a esse meio e aclimatizadas em diferentes substratos. UFLA, Lavras, 2013..... 44

### ARTIGO 2

Figura 1 Plântulas micropropagadas de *Chenopodium ambrosioides* em diferentes tipos e concentrações de citocininas, irradiâncias, volumes de solução nutritiva e orientações e tipos de explantes. UFLA, Lavras, 2013..... 74



## LISTA DE GRÁFICOS

### ARTIGO 1

- Gráfico 1 Efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS na altura de plântula, no número de folha e de broto e na biomassa seca de folha, de caule, de raiz e total de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013..... 35
- Gráfico 2 Área relativa de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013..... 37
- Gráfico 3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na altura de plântula, no número de folha e de broto e na biomassa seca de folha, de caule, de raiz e total de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose. UFLA, Lavras, 2013..... 39
- Gráfico 4 Área relativa de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose. UFLA, Lavras, 2013..... 40

### ARTIGO 2

- Gráfico 1 Altura de plântula, número de folha e de broto e biomassa seca de folha, caule e raiz de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de irradiâncias. UFLA, Lavras, 2013..... 64
- Gráfico 2 Área relativa de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes níveis irradiâncias. UFLA, Lavras, 2013..... 65
- Gráfico 3 Altura de plântulas e biomassa seca de caules de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de citocininas. UFLA, Lavras, 2013..... 66

Gráfico 4	Biomassa seca de folha e de raiz e número de folha e de broto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, 2013.....	67
Gráfico 5	Biomassa seca de folha e de raiz e número de folha e de broto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de cinetina. UFLA, Lavras, 2013..	68
Gráfico 6	Biomassa seca de folha e de raiz e número de folha e de broto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de TDZ. UFLA, Lavras, 2013.....	69
Gráfico 7	Área relativa de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivada <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, 2013.....	70
Gráfico 8	Área relativa de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivada <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de cinetina. UFLA, Lavras, 2013.....	71
Gráfico 9	Área relativa de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivada <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de TDZ. UFLA, Lavras, 2013.....	71
Gráfico 10	Altura de plântula, número de folha e de broto e biomassas secas de folha, de caule e de raiz de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes volumes de solução de cultivo. UFLA, Lavras, 2013.....	73

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1	Taxa de multiplicação e número de plântulas estimadas no segundo e terceiro subcultivos de <i>Chenopodium ambrosioides</i> estabelecidas <i>in vitro</i> em relação a origem do explante (apical e nodal), separadas no primeiro subcultivo. UFLA, Lavras, 2013.....	42
----------	--	----

### ARTIGO 2

Tabela 1	Número de folha e de broto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivadas <i>in vitro</i> nas orientações verticais e horizontais e tipos de explantes, gemas apicais e segmentos nodais. UFLA, Lavras, 2013.....	61
Tabela 2	Altura de plântula, biomassa seca de caule, de folha e de raiz de gemas apicais e segmentos nodais de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivadas <i>in vitro</i> nas orientações verticais e horizontais. UFLA, Lavras, 2013.	62
Tabela 3	Altura de plântula e biomassa seca de caule de <i>Chenopodium ambrosioides</i> cultivadas <i>in vitro</i> em três tipos de citocininas. UFLA, Lavras, 2013.....	66

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL..... 13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO..... 14</b>
<b>2.1</b>	<b>Descrição da espécie ..... 14</b>
<b>2.2</b>	<b>Constituição química da fração volátil de <i>Chenopodium ambrosioides</i>..... 15</b>
<b>2.3</b>	<b>Importância da espécie..... 16</b>
<b>2.4</b>	<b>Micropropagação..... 18</b>
	<b>REFERÊNCIAS..... 20</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b>	
<b>ARTIGO 1</b>	
<b>CULTURA <i>IN VITRO</i> E PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS DE PLÂNTULAS DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L..... 22</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO..... 25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS..... 27</b>
<b>2.1</b>	<b>Estabelecimento de segmentos apicais ..... 27</b>
<b>2.2</b>	<b>Efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS no crescimento de segmentos nodais..... 28</b>
<b>2.3</b>	<b>Efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento de segmentos nodais ..... 29</b>
<b>2.4</b>	<b>Taxa de multiplicação de segmentos apicais e nodais no primeiro, segundo e terceiro subcultivos ..... 29</b>
<b>2.5</b>	<b>Enraizamento e aclimatização de plântulas micropropagadas..... 30</b>
<b>2.6</b>	<b>Análise estatística..... 31</b>
<b>2.7</b>	<b>Análise da fração volátil por HS-CG/EM..... 31</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 33</b>
<b>3.1</b>	<b>Estabelecimento de segmentos apicais..... 33</b>
<b>3.2</b>	<b>Efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS no crescimento de segmentos nodais ..... 33</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes concentrações de sais do meio MS..... 36</b>
<b>3.4</b>	<b>Efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento de segmentos nodais..... 38</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes concentrações de sacarose ..... 40</b>
<b>3.6</b>	<b>Taxa de multiplicação de segmentos apicais e nodais no primeiro, segundo e terceiro subcultivos..... 41</b>

3.7	Aclimatização de plântulas micropropagadas.....	43
3.6	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	<b>ARTIGO 2</b>	
	Influência de fatores na propagação <i>in vitro</i> e na produção de voláteis em plântulas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L .....	50
1	INTRODUÇÃO.....	53
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1	Efeito das orientações vertical e horizontal no crescimento de segmentos apicais e nodais.....	56
2.2	Efeito de diferentes níveis de irradiância no crescimento de segmentos nodais.....	57
2.3	Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no crescimento de segmentos nodais.....	57
2.4	Efeito de diferentes volumes de meio de cultura no crescimento de segmentos nodais.....	58
2.5	Análises estatísticas.....	58
2.6	Análise da fração volátil por HS-CG/EM.....	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1	Efeito das orientações vertical e horizontal no crescimento de segmentos apicais e nodais.....	60
3.2	Efeito de diferentes níveis de irradiância no crescimento de segmentos nodais.....	63
3.3	Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes níveis de irradiância.....	65
3.4	Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no crescimento de segmentos nodais.....	66
3.5	Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes tipos e concentrações de citocininas.....	69
3.6	Efeito de diferentes volumes de meio de cultura no crescimento de segmentos nodais.....	72
4	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76

## 1- INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas medicinais é relatada, em livros históricos e pinturas rupestres, desde os primórdios dos tempos, para a cura de doenças que assolavam os povos antigos. Danos à saúde humana como consequência do uso irracional e abusivo de medicamentos, sem orientação médica, validações duvidosas, alto custo de fármacos sintéticos e ao culto à natureza, permitiram, recentemente, a intensificação nos estudos de plantas medicinais, como exemplo a Política Nacional de Plantas Medicinais.

A espécie *Chenopodium ambrosioides*, popularmente conhecida como "erva de Santa Maria", "Mastruz" e "Epazote" é amplamente utilizada no mundo. No Brasil, seu principal uso popular é como vermífugo e está presente na lista de plantas de interesse em estudo do governo (RENISUS).

A cultura de tecidos possibilita a multiplicação, em grande quantidade de clones e em pequeno espaço, com segurança na qualidade fitossanitária e preservação de caracteres importantes. Para as plantas medicinais, além da necessidade de obtenção de plantas uniformes e preservação de habitats naturais, pode-se produzir também compostos de interesse *in vitro*.

Para a espécie *C. ambrosioides* não há relatos, na literatura, sobre a propagação e produção de metabólitos secundários *in vitro*. Portanto, objetivou-se desenvolver um protocolo de micropropagação para essa espécie com a avaliação de alguns fatores que podem influenciar o crescimento vegetativo e produção dos constituintes voláteis, como exemplo, a concentração de sais do meio MS e de sacarose, nível de irradiância, uso de citocininas e volume de solução nutritiva.

## 2- REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1- Descrição da espécie

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma planta herbácea, com até um metro de altura, caule piloso e sulcado, folhas inteiras e simples, sendo as superiores sésseis e as inferiores pecioladas de dimensões variadas e providas de tricomas (Figura, 1). Conhecida pelos nomes populares: "mastruz", "erva de Santa Maria", "semente de verme americana", "pata de ganso", "paico" e "epazote", que é um termo étnico mexicano com o significado de "erva gambá" (BLANCKAERT et al., 2012; COSTA; TAVARES, 2006; PEREIRA et al., 2010).

Segundo Lorenzi, Matos e Gomes (2002), a *Chenopodium ambrosioides* é originária da América Central e do Sul e pertencente à família Chenopodiaceae, com a sinonímia de *Ambrina ambrosioides* L. Entretanto, há autores, como Trivellatograssi et al. (2013), que a consideram como Amaranthaceae.

De acordo com Jardim et al. (2010), *Chenopodium ambrosioides* é cultivada em regiões subtropicais e temperadas e consumida como erva medicinal, vegetal folhoso e condimento, em receitas tradicionais, na América do Sul. Suas sementes apresentam alto grau de dormência revelado pelo baixo poder germinativo e é nesse órgão que apresenta o maior teor de óleo essencial, 80 a 90% de ascaridol (MARTINS; SILVA; ALMASSY JÚNIOR, 2010). Cultivares de plantas aromáticas comestíveis como a "epazote" tende a ser selecionado pelo seu sabor e odor que são inversamente proporcionais à concentração de componentes com, aroma forte, no óleo essencial (BLANCKAERT et al., 2012).

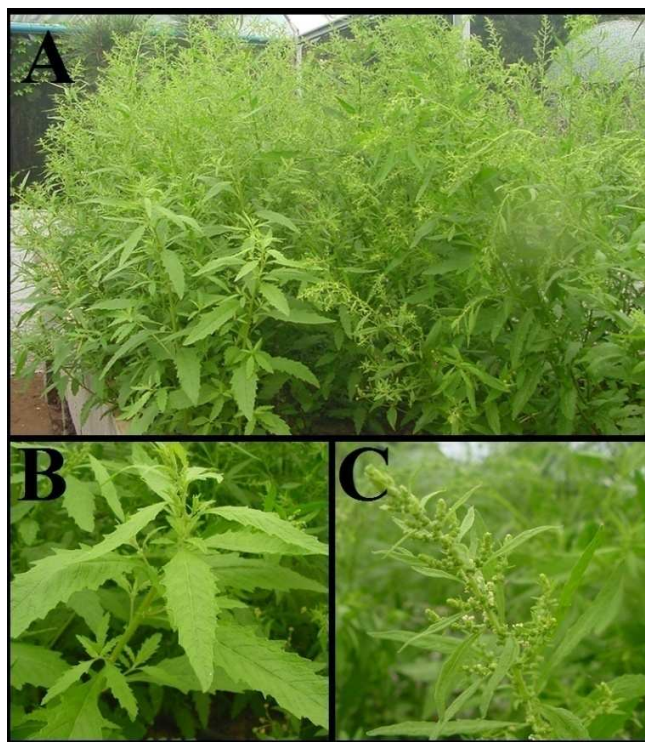


Figura 1 A espécie *Chenopodium ambrosioides*: A- canteiro fertiirrigado, B- detalhamento da folha, C- detalhamento da inflorescência. Foto: José Eduardo B. P. Pinto e Alexandre A. de Carvalho. UFLA, Lavras , 2013

## 2.2- Constituição química da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides*

O óleo essencial da espécie é uma mistura de Z-ascaridol (58,38%), p-cimeno (16,2%),  $\alpha$ -terpineno (9,7%), E-ascaridol (4,3%) e limoneno (3,8%). Z-ascaridol é um composto termosensível que se rearranja quando tratado a 150 °C, formando o E-ascaridol. Essa constituição variável pode resultar em quantificação imprecisa para o Z-ascaridol (CAVALLI et al., 2004).



De acordo com Dembitskya, Shkrobb e Hanusa (2008), a rota metabólica proposta para o ascaridol e outros monoterpenos está demonstrada na figura 2.

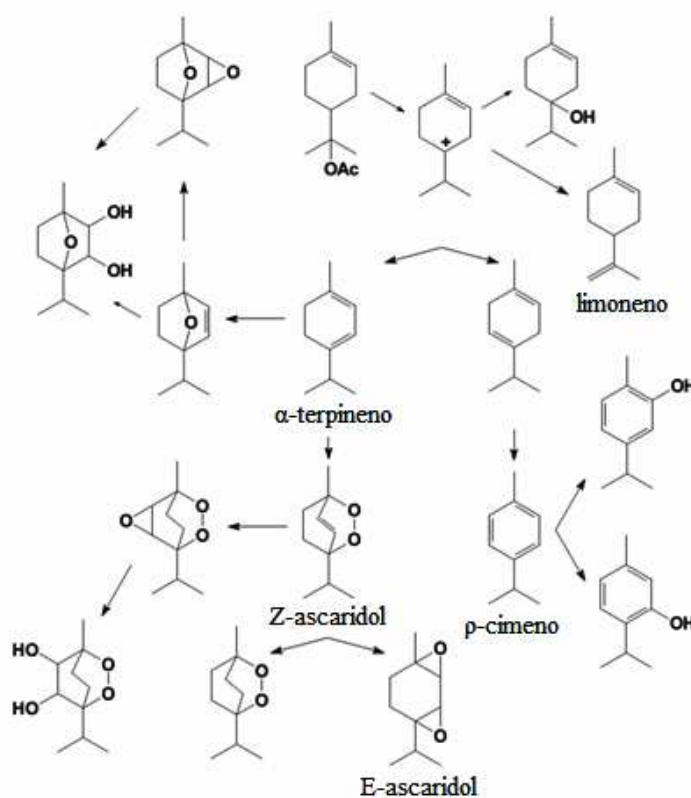


Figura 2 Mecanismo envolvendo a formação do ascaridol e outros monoterpenos no gênero *Chenopodium* (DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008)

### 2.3- Importância da espécie

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), implementado pelo governo brasileiro, seleciona a erva de Santa

Maria como uma das 71 espécies ou gêneros, tradicionalmente utilizados no Brasil, selecionadas para possível uso como fitoterápico ou medicamento popular a serem prescritos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A maioria dessas plantas carece de estudos científicos que validem seus efeitos (VERISSIMO et al., 2011).

A *Chenopodium ambrosioides* é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais, como antifebrífugo, antiespasmódico, tônico, auxiliar da digestão, problemas hepáticos, bronquite, tuberculose, hematomas, anti-reumático e antipirético (COSTA; TAVARES, 2006).

Na América Central, a erva é preparada como uma infusão da planta seca, em água fervente, e ingerida assim que se esfrie. Nos Estados Unidos, era destilada a vapor para produzir o "óleo chenopodium" e essa atividade se industrializou originando o "óleo Baltimore" como ficou conhecido e utilizado para tratar pacientes com vermes (MACDONALD et al., 2004).

No Brasil, a espécie é amplamente utilizada. Em Minas Gerais as folhas e sementes são utilizadas como anti-helmínticas, repelentes de insetos, contra contusões e corrimento vaginal; no Ceará, a infusão das folhas é utilizada contra gripe; em Brasília, as flores são utilizadas como purgante; no Rio Grande do Sul, é útil contra problemas de estômago, vermes, úlceras e para eliminar pulgas e piolhos; no Mato Grosso, como vermífugo e emoliente; no Pará, contra vermes e fraturas (COSTA; TAVARES, 2006).

Há ainda outros usos interessantes, como contra picada de escorpião (alimentar-se de folhas da planta, trituradas com sal), dor (beber o infuso de folhas), hemorróidas (uso tópico) e, ocasionalmente, é mencionado que o consumo diário de "epazote" melhora a memória das crianças (BLANCKAERT et al., 2012).

Apesar dos efeitos positivos, ainda são necessários estudos que demonstrem sua toxicidade para validar o uso, como uma maneira alternativa e acessível para o tratamento desses males. Popularmente, misturam-se as folhas no leite acreditando que há desintoxicação, entretanto não se utiliza o óleo essencial nesse caso.

Outra aplicação da *Chenopodium ambrosioides* é no uso agrônomo, como nematicida, antifúngico, repelente de insetos e antioxidante. Segundo Mello *et al.* (2006), a planta apresenta potencial para controle de *Pratylenchus brachyurus*, tanto para rotação de cultura quanto pela aplicação de extrato. Seu óleo essencial é um repelente contra insetos sendo mais eficaz contra os que habitam no substrato do que os que se alimentam da parte aérea da planta (CLOYD; CHIASSON, 2007).

O óleo essencial também pode vir a ser recomendado como uma alternativa fácil e renovável de antioxidante e antifúngico no lugar de produtos sintéticos. Na proteção e processamento de alimentos, a preocupação comum com os resíduos do tratamento é revogada pelo fato de que há uma crescente evidência de que alguns constituintes do óleo essencial residual sejam benéficos à saúde humana. Esses estudos indicam a possibilidade de explorar a planta na proteção de commodities alimentícias contra infestação por fungos e peroxidação lipídica (KUMAR *et al.*, 2007).

#### **2.4- Micropropagação**

Cultura de tecidos pode ser definida como a cultura asséptica de células, tecidos, órgãos ou planta inteira e é basicamente o crescimento *in vitro* de plântulas a partir de qualquer parte vegetal, em um meio de cultura, sob condições nutricionais e ambientais adequadas (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006; GARCIA-GONZALES *et al.*, 2010).

A técnica de cultura de tecidos baseia-se em duas propriedades das células vegetais: totipotência e plasticidade celular. Totipotência é a capacidade que as células vivas não diferenciadas detêm a habilidade de originar uma nova célula geneticamente idêntica que se diferenciará em um tipo de tecido, órgão ou indivíduo retendo as características das células originais. Plasticidade celular é a característica que marca a diferença entre as células animais e vegetais quanto a sua capacidade de multiplicação, divisão, diferenciação e formação de um novo indivíduo (GARCIA-GONZALES et al., 2010).

A micropropagação representa uma alternativa viável para a rápida propagação de grande quantidade de clones em um espaço pequeno, além da conservação de germoplasma. Plantas aromáticas são geralmente coletadas nos seus habitats naturais o que agride o meio ambiente, podendo causar a extinção de espécies (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006).

As técnicas de cultura *in vitro*, também são válidas para a produção de compostos, naturalmente presentes, em plantas aromáticas. A necessidade de drogas seguras sem efeitos colaterais implica no uso de ingredientes naturais com segurança comprovada. Estudos em biologia molecular por meio da cultura de tecidos demonstraram a ênfase no uso de métodos biotecnológicos para aumentar a produção de fármacos e aditivos alimentícios, ambos em qualidade e quantidade (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006; PISTELLI; NOCCIOLI; ANGIOLILLO, 2013; RAO; RAVISHANKAR, 2002).

No entanto alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, como a heterogeneidade dos indivíduos devido à variabilidade genética e bioquímica, e dificuldade de multiplicação. Neste contexto, se torna imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônomico, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies (MORAIS et al., 2012).

## REFERÊNCIAS

- BLANCKAERT, I. et al. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 4, p. 557-573, Apr. 2012.
- CAVALLI, J.F. et al. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, West Sussex, v. 15, n. 5, p. 275-279, Sept./Oct. 2004.
- CLOYD, R. A.; CHIASSON, H. Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect pests. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 2, p. 459-466, Apr. 2007.
- COSTA, M.; TAVARES, E. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L.(Chenopodiaceae)-erva-de-Santa Maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 63-71, 2006.
- DEBNATH, M.; MALIK, C. P.; BISEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Dallas-Fort Worth, v. 7, n. 1, p. 33-49, Feb. 2006.
- DEMBITSKYA, V.; SHKROBB, I.; HANUSA, L. O. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomedical Papers**, Olomouc, v. 152, n. 2, p. 209-215, Dec. 2008.
- GARCIA-GONZALES, R. et al. Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago, v. 37, n. 3, p. 5-30, Sept./Dec. 2010.
- JARDIM, C. M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 10, p. 1814-1818, 2010.
- KUMAR, R. et al. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antilaftoxigenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v. 115, n. 2, p. 159-164, Apr.2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A.; GOMES, O. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Floral, 2002. 512 p.

MACDONALD, D. et al. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 92, n. 2/3, p. 215-221, June 2004.

MARTINS, G. N.; SILVA, F. D.; ALMASSY JÚNIOR, A. A. Superação de dormência em sementes de *Chenopodium ambrosioides* L. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 22, n. 3/4, p. 205-209, jul./dez. 2010.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle da erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 513-516, set./out. 2006.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

PEREIRA, W. S. et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, n. 3, p. 602-605, Feb. 2010.

PISTELLI, L.; NOCCIOLI, C.; ANGIOLILLO, F. d'. Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 60, n. 1, p. 43-50, Feb. 2013.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 20, n. 2, p. 101-53, May. 2002.

TRIVELLATOGRASSI, L. et al. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 145, n. 1, p. 127-138, Jan. 2013.

VERISSIMO, L. F. et al. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 6, p. 1163-1171, nov./dez. 2011.

**ARTIGO 1**

**CULTURA *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS DE PLÂNTULAS  
DE *Chenopodium ambrosioides* L.**

**Alexandre Alves de Carvalho<sup>1</sup>, José Eduardo Brasil Pereira Pinto<sup>1</sup>, Suzan  
Kelly Vilela Bertolucci<sup>1</sup>, Rodrigo Barbosa Kloss<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Setor de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, Departamento de  
Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG,  
CEP 37200-000 Email: alexandre.ufla@yahoo.com.br

Preparado Segundo a Norma NBR 6022:2003

## RESUMO

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma espécie condimentar e medicinal, amplamente utilizada no mundo. No Brasil, está presente na lista de espécies de interesse em estudos do governo (RENISUS). Objetivou-se estabelecer um protocolo de micropropagação para *Chenopodium ambrosioides* L. e avaliar parâmetros de crescimento e produção de constituintes voláteis *in vitro* dessa espécie em função de diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. As gemas apicais foram estabelecidas em meio MS acrescidos de 3% de sacarose. No crescimento de segmentos nodais, testaram-se diferentes concentrações de sais do meio MS (0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00) e sacarose (5; 10; 20; 30 e 40 g L<sup>-1</sup>). A taxa de multiplicação, do estabelecimento até a terceira repicagem, foi avaliada, separadamente, entre os segmentos de origem nodal e apical. Na aclimatização foram testados três diferentes substratos; (comercial, vermiculita e areia). Os segmentos apicais coletados de plantas matrizes obtiveram sucesso ao estabelecerem-se em meio MS contendo 3% de sacarose. De modo geral, o meio MS com sua concentração de sais reduzida pela metade (0,50 MS) e sacarose 30 g L<sup>-1</sup> proporcionaram melhor crescimento *in vitro* de segmentos nodais. As concentrações de sais e sacarose, no meio de cultura, não influenciaram a constituição química volátil de folhas de *Chenopodium ambrosioides*, entretanto o fator concentrações de sais foi o que mais influenciou, significativamente, a percentagem de áreas relativas dos picos cromatográficos desses metabólitos. A taxa de multiplicação foi de 8,5. Houve diferença em relação à origem dos segmentos (nodal e apical) nos subcultivos avaliados. O substrato comercial, a areia e a vermiculita podem ser utilizados na aclimatização de *Chenopodium ambrosioides*.

Palavras-chave: Epazote. Óleo essencial. Cultura de tecidos.



## ABSTRACT

*Chenopodium ambrosioides* L. is an aromatic plant widely used around the world as medicinal plant or as season. In Brazil it's listed as one of the 71 species with interest by the government RENISUS list which lists the most commonly used medicinal plants in the country. The focuses of the experiments were to analyze the plant growth production of essential oil *in vitro*. The plantlets were identified and established in MS medium with 3% of sucrose. In the development of nodal segments different MS salt concentrations were tested (0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00) as well as sucrose concentrations (5, 10, 20, 30, 40 g L<sup>-1</sup>). The multiplication rate from establishment through the third subculturing was evaluated separately between nodal and apical segments. In acclimatization three different substrates were tested (vermiculite, commercial and sand). The apical segments collected from matrix plants were successfully established in MS medium with 3% sucrose. Generally the MS medium with half of its salt concentration (0.50 MS) and 30 g L<sup>-1</sup> provided better development for nodal segments *in vitro*. Salt and sucrose concentrations in the culture medium had no effect in the identification of the main constituents of the essential oil, however the concentration of salts value were the one which most influences in the quantity of these secondary metabolites. The multiplication rate maintained approximately around 8.5 between the subculturing and the separation from nodal and apical segments did not represent differences. Sand, vermiculite and commercial substrates can be used to acclimatize the species.

Keywords: Epazote. Essential Oil. Tissue culture.

## 1- INTRODUÇÃO

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma erva medicinal e condimentar conhecida, mundialmente, pelos nomes populares: "erva de Santa Maria", "mastruz" e "epazote". Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais, principalmente como anti-helmínticos. A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), implementado pelo governo brasileiro, seleciona essa erva como uma das 71 espécies ou gêneros, tradicionalmente utilizados no Brasil e recomendáveis para possível uso como fitoterápicos ou medicamentos populares a serem prescritos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), para medicina humana (COSTA; TAVARES, 2006; VERISSIMO et al., 2011).

Outra aplicação da erva de Santa Maria é no uso agrônômico, como nematicida (MELLO; MACHADO; INOMOTO, 2006), repelente de insetos (CLOYD; CHIASSON, 2007) e antioxidante (KUMAR et al., 2007).

Alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, como a heterogeneidade dos indivíduos devido à variabilidade genética e bioquímica, e dificuldade de multiplicação. Neste contexto, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônômico, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies (MORAIS et al., 2012).

A micropropagação representa uma alternativa viável para a rápida propagação de grande quantidade de clones em um espaço pequeno, além da conservação de germoplasma. Plantas aromáticas são geralmente coletadas nos seus habitats naturais e essa prática agride o meio ambiente, podendo causar a extinção de espécies (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006).

Para a condução de trabalhos *in vitro*, devem ser estudados e ajustados para cada espécie alguns fatores, como o tipo do meio de cultura e a concentração de sacarose adequada. O meio de cultura mais utilizado é o proposto por Murashige e Skoog (1962), entretanto sabe-se que sua concentração de nutrientes é elevada. Portanto, há diversos trabalhos que relatam a alteração da concentração original de sais desse meio para melhor crescimento e desenvolvimento do vegetal (KIM; JANG, 2004; OLIVEIRA; PASQUAL; PAIVA, 1996; PASQUAL; HOSHIKA; ISHIDA, 1994; PEREIRA et al., 1999) ou maior teor de constituintes voláteis (RAO; RAVISHANKAR, 2002; REIS et al., 2009).

A incorporação de carboidratos ao meio de cultura tem por objetivo o fornecimento de energia para as diversas atividades da planta, sendo que a fotossíntese não supre essa demanda *in vitro*. A sacarose é o carboidrato comumente utilizado e sua concentração ideal deve ser estudada. Para a espécie *Caularthron bicornutum* recomenda-se de 13 a 29 g L<sup>-1</sup> (PIVETTA et al., 2010), 30 g L<sup>-1</sup> para *Alocasia amazonica* (JO et al., 2009) e 60 g L<sup>-1</sup> para *Dendranthema grandiflora* (OLIVEIRA; PASQUAL; PAIVA, 1996).

Assim, objetivou-se, com este trabalho, estabelecer um protocolo de micropropagação para a espécie *Chenopodium ambrosioides* L. e estudar a influência de diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose no crescimento e desenvolvimento da espécie e suas relações com os constituintes voláteis *in vitro*.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais e de Fitoquímica, do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

Em todos os experimentos, a autoclavagem do meio de cultura foi realizada a 120 °C e 1 atm, por 20 minutos. Os tubos ou frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; o pH do meio de cultura foi aferido para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem e o meio de cultura foi suplementado com 0,6% de ágar.

A variável altura de plântulas (AL), expressa o tamanho da brotação principal medida de sua base até a gema apical e a avaliação foi realizada com o auxílio de paquímetro digital. A biomassa seca de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR) foram mensuradas em balança de precisão após secagem em estufa de circulação forçada de ar a 35 °C por três dias. A biomassa seca total foi obtida pela soma das biomassas secas de raiz, caule e folha.

### 2.1- Estabelecimento de segmentos apicais

Plantas adultas da espécie *Chenopodium ambrosioides*, localizadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA, foram utilizadas como fonte de sementes. Confirmou-se a existência da exsicata depositada no herbário do Departamento de Biologia dessa Instituição, sob o registro 10137.

As sementes foram coletadas e semeadas, com o objetivo de obter plantas matrizes, em bandeja de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> (Figura, 2 - A). Após 60 dias, as plântulas germinadas foram transplantadas para potes de polietileno com capacidade de 3,6 litros

contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação com irrigação (Figura, 2 - B).

Após 30 dias, as plantas transplantadas serviram como fonte de segmentos apicais que foram coletados e lavados em água corrente e sabão neutro por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em uma solução de água sanitária a 40% por 10 minutos, seguido de álcool etílico a 70% por 30 segundos e, finalmente, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Ao concluir a assepsia, os explantes foram inoculados em 120 tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e 3% de sacarose.

Após a inoculação, os tubos foram tampados e vedados com parafilme e mantidos em sala de crescimento. Aos 40 dias, a percentagem de contaminação e de plântulas estabelecidas *in vitro* foi avaliada.

## **2.2- Efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS no crescimento de segmentos nodais**

Segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de comprimento e 2 gemas axilares, advindos de plântulas estabelecidas em meio MS e 3% de sacarose, foram inoculados verticalmente em frascos, de 250 mL, contendo 35 mL do mesmo meio em cinco diferentes concentrações de sais (2,00; 1,50; 1,00; 0,50 e 0,25).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições e a unidade experimental foi representada por três frascos contendo três segmentos por repetição.

Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL), número de broto (NB) e de folha (NF), biomassas secas de folha (BSF), de caule (BSC), de raiz (BSR) e a total (BST).

### **2.3- Efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento de segmentos nodais**

Segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de comprimento e 2 gemas axilares, advindos de plântulas estabelecidas em meio MS, com a metade da concentração original de sais, e acrescido de 3% de sacarose, foram inoculados verticalmente em frascos contendo 35 mL com a mesma solução nutritiva (0,50 MS), entretanto, com a adição de cinco diferentes concentrações de sacarose (5; 10; 20; 30 e 40 g L<sup>-1</sup>).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), constituído de quatro repetições e representou-se a unidade experimental por três frascos contendo três segmentos por repetição.

Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL), número de broto (NB) e de folha (NF), biomassas secas de folha (BSF), de caule (BSC), de raiz (BSR) e a total (BST).

### **2.4- Taxa de multiplicação de segmentos apicais e nodais no primeiro, segundo e terceiro subcultivos**

Em todos os cultivos e subcultivos *in vitro* foram utilizados 35 mL de meio MS, com a metade da concentração original de sais, acrescidos de 3% de sacarose. Os segmentos nodais utilizados foram cortados, com aproximadamente 2 cm de comprimento e com 2 gemas axilares, sem as folhas e inoculados na orientação vertical em frascos contendo 4 explantes. Os segmentos apicais foram representados por fragmentos com extensão do meristema apical até a extremidade inferior da segunda folha, sendo que as folhas desenvolvidas foram excisadas.

Vinte e três plântulas, estabelecidas *in vitro*, serviram como fonte de segmentos nodais e apicais que foram inoculados separadamente. Após 40 dias

da inoculação, o número de plântulas obtidas (NP) foi avaliado, isoladamente, em cada tipo de explante utilizado (apical e nodal).

Para a segunda repicagem, do total das plântulas alcançadas na primeira repicagem, amostrou-se 12 oriundas de segmentos nodais e 12 apicais e procedeu-se a repicagem. Após 40 dias foi avaliado o número de plântulas obtidas e estimado o provável número (NPP) de plântulas, caso fossem multiplicadas todas as plântulas da primeira repicagem.

Para a terceira repicagem, procedeu-se de maneira semelhante, amostrando-se 12 de origem apical e 12 nodais, do total de plântulas resultantes na segunda repicagem e procedeu a repicagem. Após 40 dias foi avaliado o número de plântulas obtidas e estimado o provável número (NPP) de plântulas, caso fossem multiplicadas todas as plântulas da segunda repicagem.

A taxa de multiplicação (TM) foi calculada por meio da razão entre o número de plântulas obtidas (NP) ou o número provável (NPP) e o número de plântulas repicadas.

## **2.5- Enraizamento e aclimatização de plântulas micropropagadas**

Segmentos nodais foram inoculados em meio MS, com a metade da concentração original de sais, acrescidos de 3% de sacarose e sem adição de reguladores de crescimento para o enraizamento. Após 40 dias, as plântulas micropropagadas foram retiradas dos frascos de cultivo, lavadas em água corrente, transferidas para tubetes plásticos de 53 cm<sup>3</sup> contendo três tipos de substratos (ProVaso<sup>®</sup>, vermiculita e areia) e mantidos em casa de vegetação com irrigação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído de sete repetições e a unidade experimental foi representada

por quatro tubetes contendo uma plântula cada. Após 30 dias, a porcentagem de plântulas sobreviventes foi avaliada.

## **2.6- Análise estatística**

As análises foram feitas utilizando-se o software R e os pacotes estatísticos *ExpDes* (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2011) e *MASS* (VENABLES; RIPLEY, 2002), conforme R Development Core Team (2012).

Em relação às pressuposições básicas da análise de variância, os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett foram aplicados para verificar a normalidade e homocedasticidade, respectivamente.

Para os tratamentos cujas médias apresentaram diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, foi empregado análise de regressão.

## **2.7- Análise da fração volátil por HS-CG/EM**

Amostras de folhas de *C. ambrosioides* foram coletadas de plântulas aos 40 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sais e sacarose. As amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 35 °C. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), para ambos os fatores, constituído de três repetições e a unidade experimental foi representada por 60 mg de folhas secas.

Para extração da fração volátil de *C. ambrosioides* empregou-se a técnica de headspace estático. Utilizou-se o extrator/amostrador headspace automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 110 °C durante 30 min, temperatura de



seringa a 120 °C. Foram utilizadas folhas secas, acondicionadas em vial para headspace de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE, até a análise; 500 µL da fase de vapor injetaram-se na coluna cromatográfica. A fração volátil foi analisada em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent®7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent®MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno era de 40 °C, isotérmico por 1 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 200 °C e posteriormente de uma rampa de 10 °C/min até 250 °C. A injeção foi realizada no modo split a uma razão de injeção de 1:50. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST SPEECH GROUP WEBSITE, 2013) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por (KOVÁTS, 1965) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1- Estabelecimento de segmentos apicais

O estabelecimento e a assepsia dos segmentos apicais, inoculados em meio MS completo suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, foram eficientes com 98,3% de sobrevivência e com apenas 1,7% de contaminação. Os segmentos apicais inoculados no meio MS tiveram um crescimento aproximado de 4 cm após 40 dias com uma coloração esverdeada.

#### 3.2- Efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS no crescimento de segmentos nodais

Vários fatores podem afetar no desenvolvimento e crescimento do explante *in vitro* e um deles é a concentração do meio de cultura. O meio MS tem na sua constituição de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas uma concentração de 4,41 g L<sup>-1</sup>, considerado um dos meios mais ricos.

Sendo assim, segmentos nodais foram inoculados em diferentes concentrações de sais do meio MS para avaliar o crescimento. E todas as variáveis de crescimento do explante apresentaram diferenças significativas nas concentrações de sais do meio MS (Gráfico, 1).

A maior altura estimada foi de 61,84 mm para a concentração de 0,54 MS. Para o maior número de folhas (28,17) e maior número de brotos (2,40) as concentrações foram bem próximas 0,75 e 0,74 MS, respectivamente. Em relação às biomassas secas, foram aferidos 22,12; 12,05 e 14,89 mg nas concentrações de sais 1,05; 0,68 e 0,25 MS para folha, caule e raiz, respectivamente.

A menor concentração de sais (0,25 MS) afetou o crescimento da raiz. A biomassa seca da raiz decresceu significativamente de 0,25 MS para 2,00 MS

(Gráfico, 1). O efeito da concentração salina do meio pode afetar a disponibilidade de água para as raízes (estresse osmótico) e absorção dos sais pela planta pode atingir um nível tóxico no tecido (estresse iônico). Em geral, o efeito do estresse salino no crescimento pode reduzir biomassa seca, área foliar, comprimento de raiz, altura da planta e senescência, se a concentração for além do limite tolerado (TAIZ; ZEIGER, 2009). A biomassa seca total da plântula ficou entre metade da força do meio MS e a concentração normal do MS, atingindo uma máxima de 0,70 da concentração do MS com um ganho de biomassa de 49,63 mg (Gráfico, 1; Figura, 2 - C).

A redução ou ganho no crescimento do explante cultivados em condições salinas é consequência de várias respostas fisiológicas, incluindo modificações no balanço iônico, disponibilidade de água, nutrição mineral, eficiência fotossintética, e alocação do carbono e utilização. Qiu e Lu (2003) reportam que a redução no crescimento observado em várias espécies, sujeita a concentração de sais, é frequentemente associado com o decréscimo da capacidade fotossintética. Vários pesquisadores tem demonstrado o efeito da concentração de sais no crescimento *in vitro* de diferentes espécies *Drosera peltata* (KIM; JANG, 2004), *Anacardium othonianum* (ASSIS et al., 2012), *Malus domestica* (BAHMANI et al., 2012), *Magnolia 'Ann'* (PARRIS et al., 2012), *Syngonanthus elegantulus* (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013).

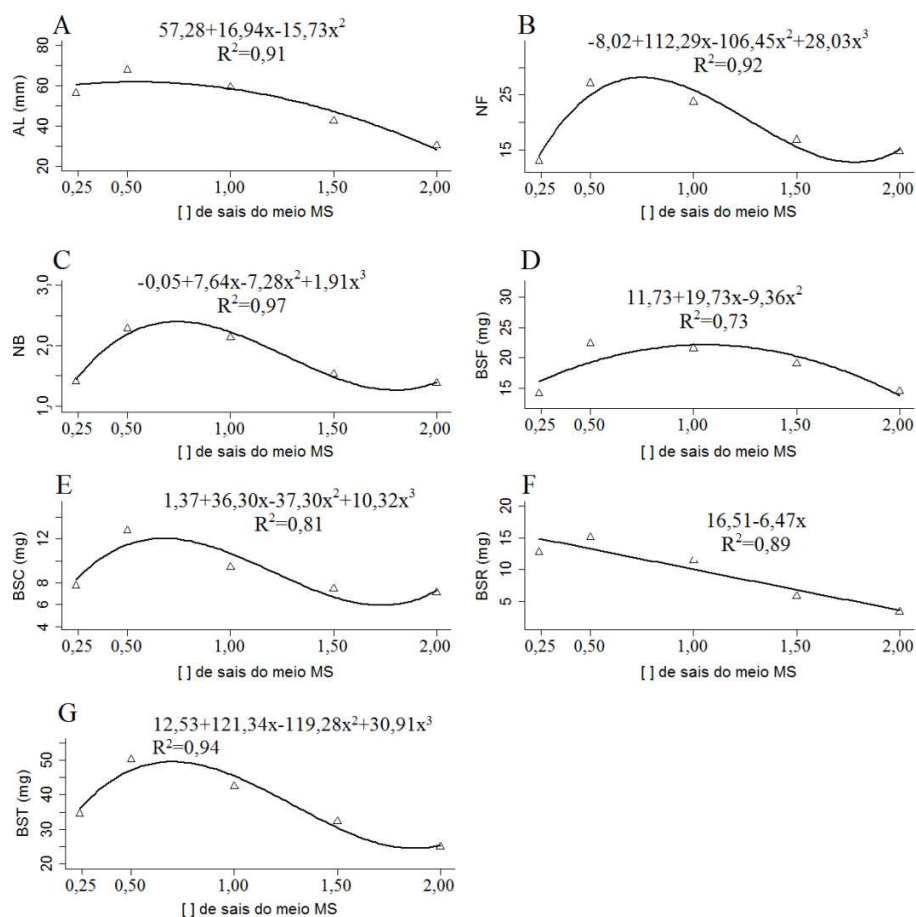


Gráfico 1 Efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- número de folhas (NF), C- número de brotos (NB), D- biomassa seca de folhas (BSF), E- biomassa seca de caules (BSC) e F- biomassa seca de raízes (BSR) e G- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro*. UFLA, Lavras, 2013

O aumento na concentração de solutos eleva proporcionalmente a pressão osmótica e reduz a disponibilidade de água e, com relação à absorção de nutrientes, o excesso de um íon reduz a absorção de outro, como exemplo, a inibição competitiva entre os íons  $K^+$ ,  $Mg^{+2}$  e  $Ca^{+2}$ , e o íon  $Mg^{+2}$  sobre o  $Zn^{+2}$ , nutriente relacionado à síntese do triptofano, o precursor do ácido-indol-acético (AIA) e a inibição não competitiva entre as fontes de nitrogênio ( $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ ) e de boro ( $H_2BO_3^-$ ). Por outro lado, concentrações menores (0,25 MS) podem limitar algum nutriente que é essencial para o metabolismo vegetal (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1989; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Com base nos dados apresentados a concentração entre 0,50 e 1,00 MS é a mais adequada para a manutenção do crescimento de segmentos nodais de *C. ambrosioides*.

### **3.3- Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes concentrações de sais do meio MS**

Quatro constituintes voláteis com 92,27% da área relativa dos picos foram identificados em plântulas cultivadas no meio MS. Os constituintes foram  $\alpha$ -terpineno (20,06%),  $\rho$ -cimeno (16,65%), Z-ascaridol (45,81%) e E-ascaridol (9,75%). Cavalli et al. (2004) identificaram cinco constituintes da fração volátil do óleo essencial (92,38%), com a mistura de Z-ascaridol (58,38%),  $\rho$ -cymeno (16,2%),  $\alpha$ -terpineno (9,7%), E-ascaridol (4,3%) e limoneno (3,8%).

Comparando a concentração da fração volátil da plântula cultivada no meio MS normal e as outras concentrações, houve diferenças significativas entre as áreas relativas dos picos dos constituintes (Gráfico, 2).

Os compostos apresentaram-se em maior percentagem de área relativa para as concentrações de sais do meio MS em 1,79 MS ( $\alpha$ -terpineno), 2,00 MS ( $\rho$ -cimeno), 0,79 MS (Z-ascaridol) e 0,71 MS (E-ascaridol).

Pode-se ainda observar que a diminuição na percentagem de área relativa do  $\alpha$ -terpineno resultou em incrementos no ascaridol (Z) e seu isômero (E), assim como o oposto. Essa relação ocorreu porque o terpineno é precursor da biossíntese do ascaridol (DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008).

Para o constituinte Z-ascaridol, a sua maior área relativa foi observada na concentração de meio de cultura que proporcionou o maior crescimento dos segmentos nodais (entre 0,50 e 1,00 MS). Portanto, esse constituinte volátil foi sintetizado em condições nutricionais adequadas para seu metabolismo, corroborando em partes, com os resultados obtidos por Reis et al. (2009) que observou o maior teor de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em condições nutricionais ideais (1,00 MS), entretanto, também sob estresses (0,25 MS).

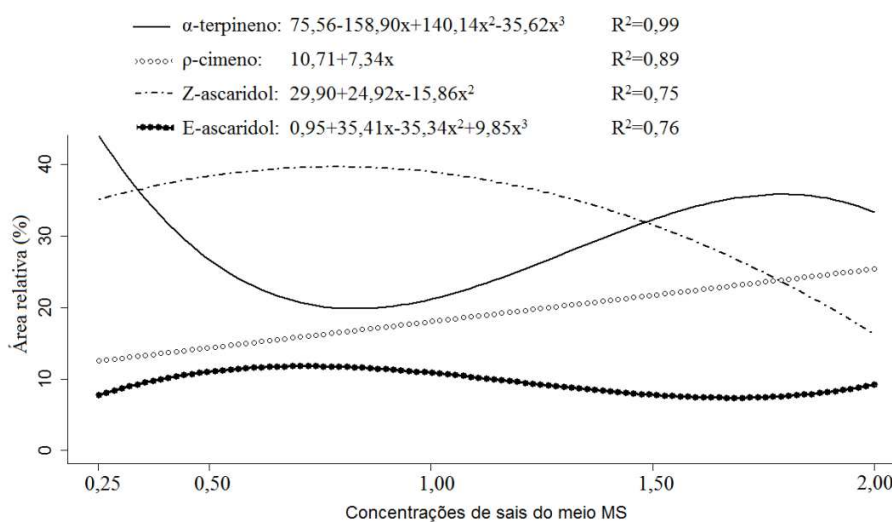


Gráfico 2 Área relativa (%) de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013

### 3.4- Efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento de segmentos nodais

Na cultura de tecidos vegetais, há a necessidade de adicionar carboidratos no meio como uma fonte de energia externa para realização das atividades metabólicas. A concentração de sacarose de 2 a 3% é suplementada *in vitro*, para a maioria das espécies, na fase de estabelecimento e manutenção. Portanto, é essencial suprir o meio de cultura com carboidratos, devido à atividade fotossintética e a irradiação ser baixa e a troca de gás ser limitado (KOZAI; OKI; FUJIWARA, 1990).

Observou-se que as plântulas apresentaram máximo crescimento até um limite de concentração de sacarose, após o qual houve redução nos parâmetros avaliados, exceto para biomassa seca de caule e número de brotos onde foram lineares (Gráfico, 3; Figura, 2 - D). A ótima concentração de sacarose para o acúmulo de biomassa seca total foi com 32,40 g L<sup>-1</sup> de sacarose com um ganho de 50,71 mg, pela análise da curva de regressão. Esse comportamento foi provavelmente causado por aumento excessivo do potencial osmótico do meio e inibição da fotossíntese e têm sido reportados que plântulas são constantemente intoxicadas com altas concentrações de sacarose e nitrogênio no meio de cultura (DESJARDINS; DUBUC; BADR, 2009). Além do mais, Rolland, Baena-Gonzalez e Sheen (2006) atribuíram um importante papel do açúcar em muitas respostas ao desenvolvimento do explante.

Para as condições ambientais do presente estudo, pôde-se observar que a baixa concentração de sacarose (5 g L<sup>-1</sup>) culminou em menores resultados para todas as variáveis com diferenças significativas analisadas, certamente pela baixa atividade fotossintética realizada e para o suprimento de carboidratos que é essencial para a absorção de nutrientes. A concentração mais alta desse carboidrato (40 g L<sup>-1</sup>) não interferiu na biomassa seca do caule e no número de brotos. No entanto, nos outros parâmetros houve uma inibição no crescimento

do explante. A concentração entre 30 e 35 g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou, de forma geral, o melhor crescimento de segmentos nodais de *C. ambrosioides* cultivados *in vitro*.

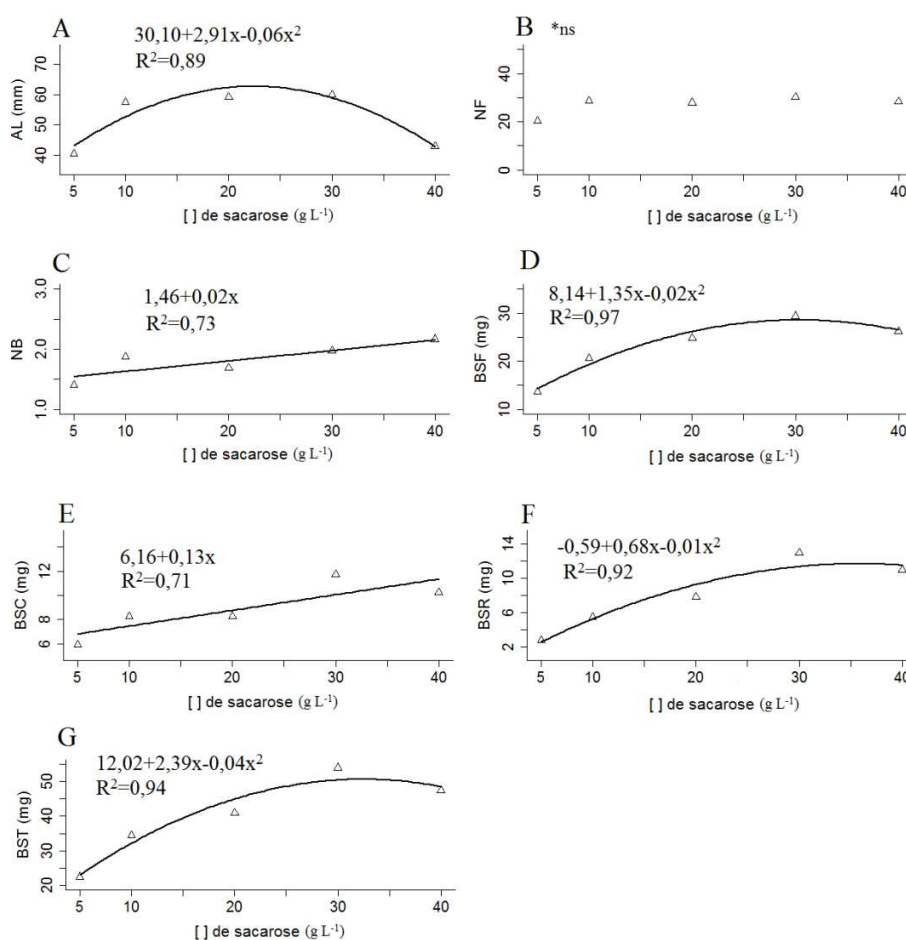


Gráfico 3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na: A- altura de plântulas (AL), B- número de folhas (NF), C- número de brotos (NB), D- biomassa seca de folhas (BSF), E- biomassa seca de caules (BSC), F- biomassa seca de raízes (BSR) e G-biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro*. UFLA, Lavras, 2013. \*<sub>ns</sub> Não significativo pelo teste F



### 3.5- Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes concentrações de sacarose

Os principais constituintes  $\alpha$ -terpineno,  $p$ -cimeno, Z-ascaridol e E-ascaridol tiveram uma área relativa acima de 85%. Com relação a estes constituintes voláteis de *C. ambrosioides*, a concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura não influenciou significativamente em suas percentagens, com exceção do  $\alpha$ -terpineno que aumentou linearmente (Gráfico, 4).

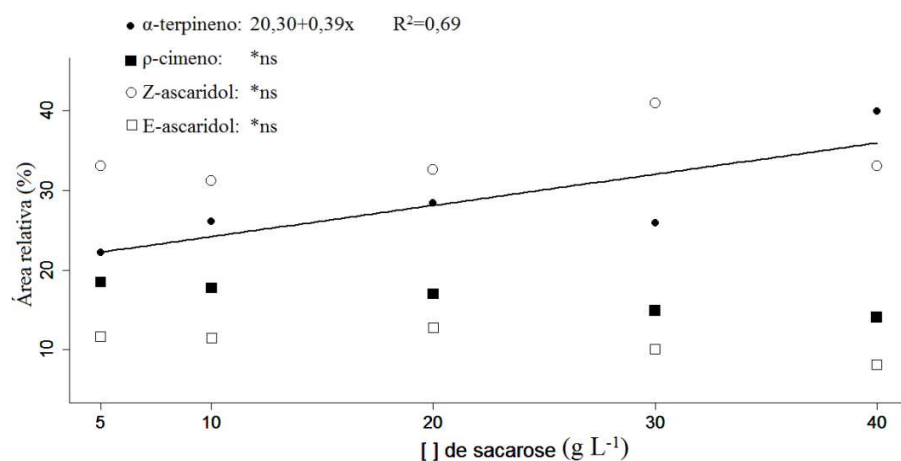


Gráfico 4 Área relativa (%) de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose. UFLA, Lavras, 2013. \*<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F

### 3.6- Taxa de multiplicação de segmentos apicais e nodais no primeiro, segundo e terceiro subcultivos

O número de plântulas obtidas (NP) ou de provável obtenção (NPP) e a taxa de multiplicação (TM) em cada subcultivo estão demonstrados na Figura 1.

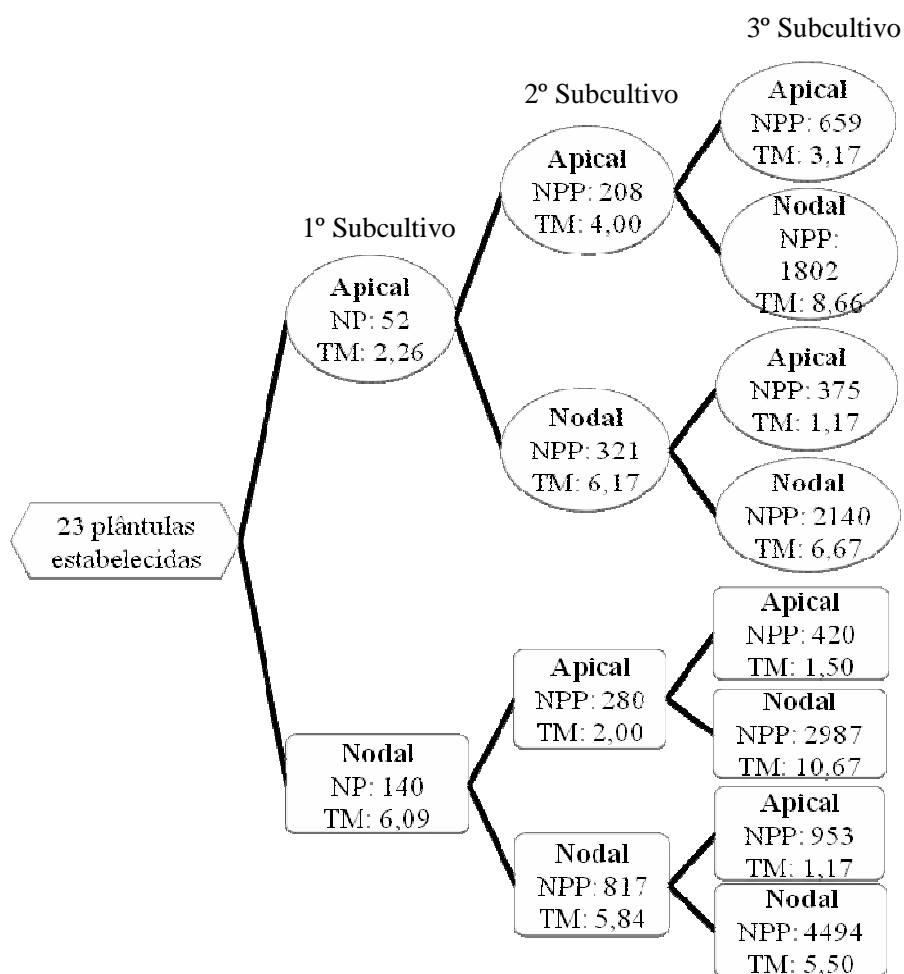


Figura 1 Número de plântulas obtidas (NP) ou provável de se obter (NPP) e a taxa de multiplicação (TM) em cada subcultivo (1º, 2º e 3º) de *Chenopodium ambrosioides* e em diferentes origens do explante (apical e nodal). UFLA, Lavras, 2013

Com relação à origem do segmento a partir do primeiro subcultivo, as taxas de multiplicação no segundo e terceiro subcultivos apresentaram maiores para segmentos de origem apical (10,17 e 9,41) em comparação ao nodal (7,84 e 8,07). Entretanto, ao comparar a taxa de multiplicação, sem considerar as origens, em ambos subcultivos observa-se uma constância (8,47 e 8,51). De acordo com Mantell et al. (1994 citados por FLORES; MALDANER; NICOLOSO, 2006), as taxas de multiplicação, em geral, são de 5 - 10 x, portanto a taxa de multiplicação (de aproximadamente 8,5) observada para *C. ambrosioides*, reflete uma satisfatória metodologia de micropropagação e ressalta-se ainda a não utilização de reguladores de crescimento (Tabela, 1).

Como observado nessa tabela, o explante de origem apical evidenciou maior taxa de multiplicação, portanto, aconselha-se utilizá-lo quando se tem um número suficiente, enquanto que o segmento nodal pode ser utilizado pela facilidade de obtenção de material, o que propicia um número maior de plantas. Entretanto, para *Pfaffia tuberosa*, a regeneração de plantas a partir de segmentos nodais apresentou uma maior taxa de multiplicação *in vitro* quando comparada à dos explantes apicais (FLORES; MALDANER; NICOLOSO, 2006).

Tabela 1 Taxa de multiplicação (TM) e número de plântulas estimadas no segundo e terceiro subcultivos (SC) de *Chenopodium ambrosioides* estabelecidas *in vitro* em relação à origem do explante (apical e nodal), separadas no primeiro subcultivo. UFLA, Lavras, 2013

<b>ORIGEM ( a partir do 1º SC)</b>	<b>2º SC</b>	<b>TM</b>	<b>3º SC</b>	<b>TM</b>
Apical	529	10,17	4976	9,41
Nodal	1097	7,84	8854	8,07
<b>Total</b>	<b>1626</b>	<b>8,47</b>	<b>13830</b>	<b>8,51</b>

### 3.7- Aclimatização de plântulas micropropagadas

As plântulas de *C. ambrosioides* foram aclimatizadas em areia, vermiculita e substrato comercial com uma percentagem de sobrevivência de 100% (Figura, 2 - E).

Pêgo, Paiva e Paiva (2013) ao estudar os mesmos tipos de substratos na aclimatização de plântulas micropropagadas de *Syngonanthus elegantulus*, observou que a areia proporcionou melhores percentagens de sobrevivência. Segundo Paixão et al. (2003 citados por PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013), o melhor substrato para aclimatização de *Syngonanthus mucugensis* é a areia, por proporcionar condições físicas semelhantes de seu habitat (solos arenosos).

Com relação aos substratos Plantmax<sup>®</sup>, areia irrigada com adubo Ouro Verde<sup>®</sup> (1 g L<sup>-1</sup>), vermiculita irrigada com adubo Ouro Verde<sup>®</sup> (1 g L<sup>-1</sup>) e mistura de solo, areia e esterco (1:1:1), não se verificou interferência na percentagem de pegamento das plantas de *Pennisetum purpureum* aclimatizadas (SOUZA SOBRINHO et al., 2007).

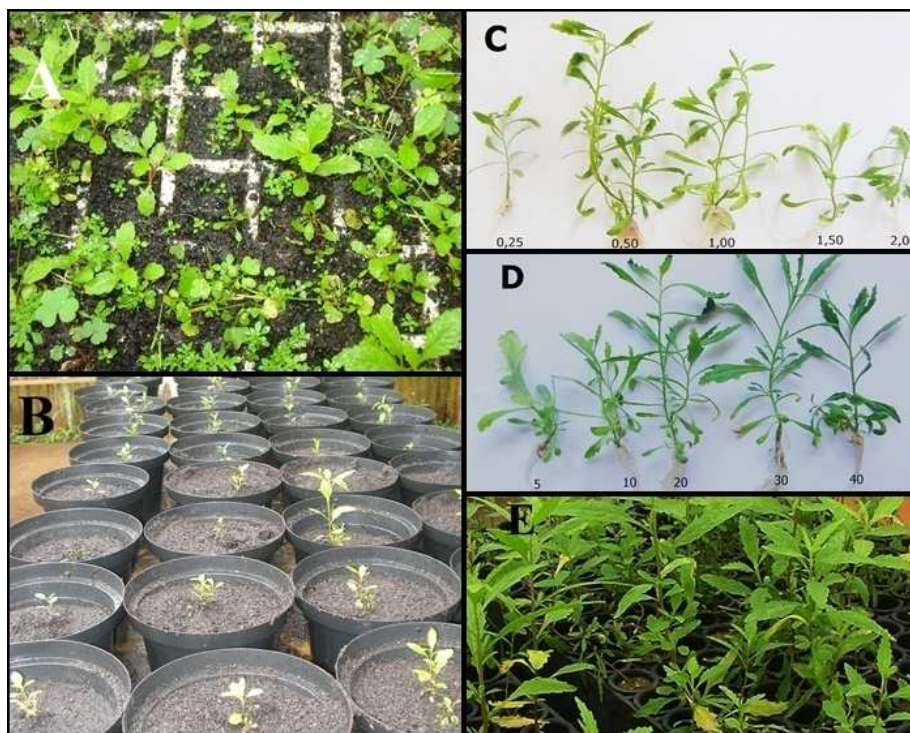


Figura 2 A- plântulas germinadas em bandejas de isopor; B- plântulas transplantadas para vasos de polietileno que serviram de fontes de explantes; C- plântulas cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS; D- plântulas cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações ( $\text{g L}^{-1}$ ) de sacarose; E- plântulas aclimatizadas em diferentes substratos. UFLA, Lavras, 2013

#### 4- CONCLUSÕES

- Segmentos apicais de plantas matrizes de *Chenopodium ambrosioides* podem ser estabelecidos *in vitro* com meio MS e 3% de sacarose.
- Para melhor crescimento de segmentos nodais nos subcultivos, os explantes devem ser inoculados no meio de cultura MS, com a metade da concentração original de sais, e 3% de sacarose.
- A taxa de multiplicação, média de 8,5, é mantida estável nos três primeiros subcultivos de 40 dias de duração.
- A percentagem de área relativa dos principais constituintes da fração volátil é influenciada pelas diferentes concentrações de sais do meio MS.
- Os substratos ProVaso<sup>®</sup>, areia e vermiculita proporcionaram 100% de sobrevivência de plântulas aclimatizadas.

**AGRADECIMENTOS:** FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. Illinois: Allured, 2007. 804 p.

ASSIS, K. C. et al. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 1, p. 77-83, Jan./Mar. 2012.

BAHMANI, R. et al. Effects of salinity on *invitro* shoot proliferation and rooting of apple rootstock MM.106. **World Applied Sciences Journal**, Dubai, v. 17, n. 3, p. 292-295, 2012.

CAVALLI, J. F. et al. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, West Sussex, v. 15, n. 5, p. 275-279, Sept./Oct. 2004.

CLOYD, R. A.; CHIASSON, H. Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect pests. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 2, p. 459-466, Apr. 2007.

COSTA, M.; TAVARES, E. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L.(Chenopodiaceae)-erva-de-Santa Maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 63-71, 2006.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, n. 1, p. 1-24, 1990.

DEBNATH, M.; MALIK, C. P.; BIEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Dallas-Fort Worth, v. 7, n. 1, p. 33-49, Feb. 2006.

DEMBITSKYA, V.; SHKROBB, I.; HANUSA, L. O. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomedical Papers**, Olomouc, v. 152, n. 2, p. 209-215, Dec. 2008.

DESJARDINS, Y.; DUBUC, J. F.; BADR, A. *In vitro* culture of plants: a stressful activity!**Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 812, p. 29-50, Feb. 2009.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, Ouro Preto, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 845-851, June. 2006.

JO, E. A. et al. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, n. 3, p. 307-315, Mar. 2009.

KIM, K. S.; JANG, G. W. Micropropagation of *Drosera peltata*, a Tuberous Sundew, by Shoot Tip Culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 2, p. 211-214, May. 2004.

KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Advances in Chromatography**, Connecticut, v. 1, p. 229-247, 1965.

KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 205-211, Sept. 1990.

KUMAR, R. et al. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antilaftoxigenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v. 115, n. 2, p. 159-164, Apr. 2007.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1989. 201 p.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle da erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 513-516, set./out. 2006.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.



MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. Disponível em: <<http://www.nist.gov/spech/test/tdt/>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

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, n. 1, p. 9-18. 1996.

PARRIS, J. K. et al. Basal salt composition, cytokinins, and phenolic binding agents influence *in vitro* growth and ex vitro establishment of *Magnolia* 'Ann'. **HortScience**, Alexandria, v. 47, n. 11, p. 1625-1629, 2012.

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E.; ISHIDA, J. S. Effects of different sucrose and mineral salt concentrations on *in vitro* propagation of *Nephrolepis exaltata*: an ornamental fern. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 11, p. 1681-1684, nov. 1994.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 32-39, jan./fev. 2013.

PEREIRA, J. E. S. et al. Enraizamento *in vitro* do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 17-20, jan./mar. 1999.

PIVETTA, K. F. L. et al. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1897-1902, set. 2010.

QIU, N.; LU, C. Enhanced tolerance of photosynthesis against high temperature damage in salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica* plants. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 26, n. 7, p. 1137-1145, July. 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Software.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 20, n. 2, p. 101-53, May 2002.

REIS, É. S. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, abr./jun. 2009.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 675-709, June. 2006.

SOUZA SOBRINHO, F. D. et al. Aclimatização de germoplasma de capim-elefante, pós cultivo *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 11-15, jan./fev. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.819 p.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern applied statistics with S**. New York: Springer, 2002. 497 p.

VERISSIMO, L. F. et al. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 6, p. 1163-1171, nov./dez. 2011.

**ARTIGO 2**

**INFLUÊNCIA DE FATORES NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E NA  
PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS EM PLÂNTULAS DE *Chenopodium  
ambrosioides* L.**

**Alexandre Alves de Carvalho<sup>1</sup>, José Eduardo Brasil Pereira Pinto<sup>1</sup>, Suzan  
Kelly Vilela Bertolucci<sup>1</sup>, Rodrigo Barbosa Kloss<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Setor de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, Departamento de  
Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG,  
CEP 37200-000 Email: alexandre.ufla@yahoo.com.br

Preparado Segundo a Norma NBR 6022:2003

## RESUMO

A cultura de tecidos possibilita a multiplicação em grande quantidade de clones e em pequeno espaço, com segurança na qualidade fitossanitária e preservação de caracteres importantes. Para as plantas medicinais além da necessidade de obtenção de plantas uniformes e preservação de habitats naturais, pode-se produzir compostos de interesse *in vitro*. Entretanto, para iniciar qualquer processo de micropropagação deve-se conhecer a resposta da espécie em relação aos fatores que o influenciam. Portanto, objetivou-se avaliar alguns fatores que podem influenciar o crescimento e a produção de constituintes voláteis *in vitro* de *Chenopodium ambrosioides* L. que é uma espécie que compõe a lista interesse em estudos do governo (RENISUS). Segmentos nodais e apicais foram testados nas orientações verticais e horizontais. As intensidades de irradiância (16,5; 36,6; 47,6 e 73,2  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), em uma sala de crescimento, foram avaliadas no crescimento de segmentos nodais. Três tipos de citocininas (BAP, TDZ e Cinetina) em quatro diferentes concentrações (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) foram estudados. Diferentes volumes de meio de cultura (20; 35; 50; 65 e 80 mL) foram examinados no crescimento de segmentos nodais. Genericamente, os segmentos apicais ou nodais na orientação vertical, mantidos em uma sala de crescimento com 47,6  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiância, sem a adição de citocininas e com 50 mL de meio de cultura apresentaram melhores respostas para o cultivo *in vitro* de *C. ambrosioides*. A identificação dos constituintes voláteis dessa espécie não foi influenciada pela intensidade de irradiância e nem pelo uso de citocinina, no entanto, a percentagem de área relativa do pico cromatográfico foi interferida por esses dois fatores.

Palavras-chave: Epazote. Óleo essencial. Micropropagação.

## ABSTRACT

Tissue culture enables the rapid multiplication of great quantity of clones in a minimal area, with security and phytosanitary quality and preservation of important characters. For medicinal plants beyond the necessity of individuals uniform genetically, and preservation of natural habitats, the *in vitro* cultivation can produce compounds with economical value. However to initiate any process of micro-propagation is necessary the knowledge of the response to each factor which can influence the growth and production of compounds. Therefore the valuation of some of these factors which can be influential in growth and volatile compounds production *in vitro* for *C. ambrosioides* L. which is a plant present in the RENISUS list for medicinal plants with high interest in research and use. Nodal and apical segments were tested in vertical and horizontal orientation. The irradiance intensity of 16.5, 36.6, 47.6 and 73.2  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  were evaluated in a growth room for nodal segments development. Three kinds of cytokinin (BAP, TDZ and Kinetin) in four different concentration (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0  $\text{mg L}^{-1}$ ) were studied. Different medium culture volume's (20, 35, 50, 65 and 80 mL) were examined in the development of nodal segments. In general, the apical or nodal segments in vertical orientation, kept in a growth room under 47,6  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of irradiance, without cytokinin and 50 mL of medium culture volume, presented the most desirable results for *in vitro* cultivation of *C. ambrosioides*. The identification of volatile compounds of this species weren't affected by irradiance intensity and cytokinin, contrary of it's quantification.

Keywords: Epazote. Essential Oil. Micropropagation.

## 1- INTRODUÇÃO

*Chenopodium ambrosioides* é um espécie condimentar e medicinal, popularmente conhecida por "erva de Santa Maria", "mastruz" e "epazote". Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais no mundo e no Brasil encontra-se listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), entre as 71 espécies ou gêneros de interesse do Governo Federal (COSTA; TAVARES, 2006; VERISSIMO et al., 2011).

A variabilidade genética, bioquímica, a dificuldade de multiplicação e a extinção de espécies são alguns fatores que podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos. Entretanto, a micropropagação representa uma alternativa viável para a rápida propagação de grande quantidade de clones em um espaço pequeno, além da conservação de germoplasma (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006; MORAIS et al., 2012).

O crescimento e desenvolvimento de uma planta a partir de uma célula ou tecido depende de fatores que variam em função da espécie, do tipo e da idade do tecido, das condições ambientais e a composição dos meios de cultura, os quais são geralmente conduzidos empiricamente num estudo de caso em caso (GARCIA-GONZALES et al., 2010).

A suplementação do meio de cultivo com reguladores de crescimento é um dos principais fatores que interferem a micropropagação. O BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (cinetina) têm sido as fontes de citocininas mais utilizadas, pois são fitohormônios associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, participando no controle da divisão celular (NAGORI; PUROHIT, 2004 citados por ASMAR et al., 2011).

Segundo Hughes (1981 citado por DE LA VIÑA et al., 2001) os níveis de irradiância também influenciam o crescimento de plântulas *in vitro*. Para a espécie *Withania somnifera*, o melhor crescimento e desenvolvimento de

plântulas *in vitro* foram obtidos com  $30 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e  $80 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para *Musa* spp (ARAGON et al., 2010; LEE et al., 2007).

O volume de meio de cultura, também, pode interferir no crescimento de plântulas, *in vitro*, por meio do aumento da disponibilidade de nutrientes ou da competição entre esses indivíduos. Para *Melissa officinalis* L, à medida que aumenta o volume de meio de cultura há a tendência de aumentar o número de nós e o comprimento do maior broto, em plântulas micropropagadas (REIS et al., 2007).

Assim, objetivou-se, com este trabalho, estudar e estabelecer condições adequadas para alguns fatores que influenciam a micropropagação de *Chenopodium ambrosioides* L. dentre eles, segmentos nodais e apicais nas orientações verticais e horizontais, volumes de solução, tipos e concentrações de citocininas e intensidades de irradiância e suas relações com os constituintes voláteis presentes no vegetal.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais e de Fitoquímica, do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

Em todos os experimentos, utilizaram-se frascos, de 250 mL, contendo 35 mL (a exceção do experimento de diferentes volumes de solução) de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a metade da concentração original de sais (0,5 MS), e 3% de sacarose. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada a 120 °C e 1 atm, por 20 minutos, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de  $25 \pm 2$  °C e irradiância de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (exceto o experimento de diferentes intensidades de irradiância), o pH do meio de cultura foi aferido para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem e o meio de cultura foi suplementado 0,6% de ágar.

Plantas adultas da espécie *Chenopodium ambrosioides*, localizadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA, foram utilizadas como fonte de sementes. Confirmou-se a existência da exsicata depositada no herbário do Departamento de Biologia dessa Instituição, sob o registro 10137. As sementes foram coletadas e semeadas, com o objetivo de obter plantas matrizes, em bandeja de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Após 60 dias, as plântulas germinadas foram transplantadas para potes de polietileno com capacidade de 3,6 litros contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação com irrigação.

Após 30 dias, as plantas transplantadas serviram como fonte de segmentos apicais que foram coletados e lavados com água corrente e sabão neutro por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em uma solução hipoclorito de sódio a 40% por 10 minutos, seguido de álcool



etílico a 70% por 30 segundos e, finalmente, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Ao concluir a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura. Após a inoculação, os tubos foram tampados e vedados com parafilme e mantidos em sala de crescimento. Essas plântulas estabelecidas serviram como fontes de segmentos nodais, de aproximadamente 2 cm de comprimento e com 2 gemas axilares, sem as folhas, e segmentos apicais que foram representados por fragmentos com extensão do meristema apical até a extremidade inferior do segunda folha, sendo que as folhas desenvolvidas foram excisadas.

A variável altura de plântula (AL), expressa o tamanho da brotação principal medida de sua base até a gema apical e a avaliação foi realizada com o auxílio de paquímetro digital. As biomassas secas de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR) foram mensuradas em balança de precisão após secagem em estufa de circulação forçada de ar a temperatura constante de 35 °C por três dias.

### **2.1- Efeito das orientações vertical e horizontal no crescimento de segmentos apicais e nodais**

Segmentos nodais e apicais foram inoculados nas orientações verticais e horizontais em meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (2x2), sendo o fator tipo de explante com dois níveis (apical e nodal) e, semelhantemente, o fator orientação do explante (vertical e horizontal). Utilizaram-se cinco repetições e a unidade experimental constituída por três frascos contendo três segmentos por repetição.

Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL), número de broto (NB) e de folha (NF), biomassa seca de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR).

### **2.2- Efeito de diferentes níveis de irradiância no crescimento de segmentos nodais**

Segmentos nodais foram inoculados verticalmente em meio de cultura e acondicionados em sala de crescimento com diferentes intensidades de irradiância (16,5; 36,6; 47,6 e 73,2  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), provenientes da instalação de lâmpadas fluorescentes brancas em ambiente controlado.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído de cinco repetições e a unidade experimental representada por três frascos contendo três segmentos por repetição.

Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL), número de broto (NB) e de folha (NF), biomassa seca de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR).

### **2.3- Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no crescimento de segmentos nodais**

Segmentos nodais foram inoculados verticalmente em meio de cultura com diferentes tipos e concentrações de citocininas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial com um tratamento adicional (3x3+1). O tratamento adicional foi caracterizado pela ausência de citocinina, o fator tipo de citocininas com três níveis (BAP, TDZ e Cinetina) e, semelhantemente, o fator concentração de citocininas (0,5; 1,0 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Utilizou-se três repetições e a unidade experimental representada por três frascos contendo três segmentos por repetição.

Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL), número de broto (NB) e de folha (NF), biomassas secas de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR).

#### **2.4- Efeito de diferentes volumes de meio de cultura no crescimento de segmentos nodais**

Segmentos nodais foram inoculados verticalmente em frascos contendo diferentes volumes de solução (20; 35; 50; 65 e 80 mL) do meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído de quatro repetições e a unidade experimental representada por três frascos contendo três segmentos por repetição.

Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL), número de broto (NB) e de folha (NF), biomassa seca de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR).

#### **2.5- Análise estatística**

As análises foram feitas utilizando-se o software R e os pacotes estatísticos *ExpDes* (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2011) e *MASS* (VENABLES; RIPLEY, 2002), conforme R Development Core Team (2012).

Em relação às pressuposições básicas da análise de variância, os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett foram aplicados para verificar a normalidade e homocedasticidade, respectivamente.

Para os tratamentos cujas médias apresentaram diferença significativa foi empregado o teste de Tukey, adotando-se 5% como nível de significância, e análise de regressão quando o tratamento foi quantitativo.

## 2.6- Análise da fração volátil por HS-CG/EM

Amostras de folhas de *C. ambrosioides* foram coletadas de plântulas aos 40 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tipos e concentrações de citocininas e intensidades de irradiância. As amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 35 °C, por três dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado para o fator intensidades de irradiância e em esquema fatorial com um tratamento adicional (3x3+1) para os fatores tipos e concentrações de citocininas. Em ambos os experimentos, utilizou-se de três repetições e a unidade experimental foi representada por 60 mg de folhas secas.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA. Para extração da fração volátil de *C. ambrosioides* empregou-se a técnica de headspace estático. Para isso, utilizou-se o extrator/amostrador headspace automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 110 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 120 °C. Foram utilizadas folhas secas, acondicionadas em vial para headspace de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE, até a análise; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica. A fração volátil foi analisada em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent®7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent®MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do

injetor e a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 40 °C, isotérmico por 1 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 200 °C e posteriormente de uma rampa de 10 °C/min até 250 °C. A injeção foi realizada no modo split a uma razão de injeção de 1:50. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST SPEECH GROUP WEBSITE, 2013) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por (KOVÁTS, 1965) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

### **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1- Efeito das orientações vertical e horizontal no crescimento de segmentos apicais e nodais**

Para as variáveis números de folha e broto não houve interação significativa entre orientação e tipo de explante, portanto, realizou-se o estudo dos fatores isoladamente (Tabela, 1). Entretanto, para altura de plântula e biomassas secas de caule, de raiz e de folha a interação foi significativa e seu desdobramento está demonstrado na Tabela 2.

Na orientação vertical, houve maior produção de folhas por plântulas (21,91) e o número de brotos não foi influenciado estatisticamente, assim como o fator tipo de explante (apical e nodal) para essas variáveis (Tabela, 1).

Tabela 1 Número de folha (NF) e de broto (NB) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* nas orientações verticais e horizontais e os tipos de explantes (gemas apicais e segmentos nodais) utilizados. UFLA, Lavras, 2013

<b>ORIENTAÇÃO</b>	<b>NF</b>	<b>NB</b>
HORIZONTAL	17,69 b	2,00 a
VERTICAL	21,91 a	2,38 a
<b>TIPO</b>		
APICAL	18,90 a	2,23 a
NODAL	20,70 a	2,15 a

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Ao comparar os tipos de explante nas orientações, se observa que para os segmentos apicais, a biomassa seca do caule não apresentou diferenças significativas entre as orientações verticais e horizontais, entretanto, esses segmentos inoculados na orientação vertical apresentaram maiores resultados para altura de plântula, biomassas secas de folha e de raiz. O oposto pode ser observado para os segmentos nodais, na qual a maior biomassa seca de caule ocorreu na horizontal e para as demais variáveis não houve influência significativa da orientação nesses segmentos.

Observa-se ainda, que para as orientações em relação aos tipos de explantes, os maiores resultados para as biomassas secas de folha e de raiz foram obtidos para segmentos apicais na vertical e para a altura de plântula e biomassa seca de caule, os segmentos apicais e nodais não diferiram significativamente nessa orientação. Uma situação contrária foi verificada para a orientação horizontal, os segmentos nodais obtiveram maior crescimento em altura de plântula e biomassa seca de caule em relação aos apicais e para as biomassas secas de folha e raiz, tanto apicais quanto nodais não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela, 2).

Tabela 2 Altura de plântula (AL - mm), biomassa seca de caule (BSC - mg), de folha (BSF - mg) e de raiz (BSR - mg) de gemas apicais (A) e segmentos nodais (N) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* nas orientações verticais e horizontais. UFLA, Lavras, 2013

VARIÁVEIS	TIPOS	ORIENTAÇÃO	
		VERTICAL	HORIZONTAL
AL	A	57,75 Aa	39,23 Bb
	N	51,34 Aa	50,10 Aa
BSC	A	10,74 Aa	7,80 Ab
	N	8,50 Ba	16,04 Aa
BSF	A	21,36 Aa	15,28 Ba
	N	15,56 Ab	16,78 Aa
BSR	A	12,42 Aa	7,84 Ba
	N	8,54 Ab	9,96 Aa

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para o porta enxerto de macieira, as orientações vertical ou horizontal de segmentos nodais não apresentaram diferenças significativas para altura de plântulas, entretanto, o maior número de brotações e gemas e a maior taxa de multiplicação foram obtidos com segmentos nodais na orientação horizontal (ERIG; SCHUCH, 2002).

Conforme Erig e Schuch (2002), a obtenção de um maior número de brotações, com o segmento nodal na orientação horizontal, deve-se principalmente à quebra da dominância apical, que nessa orientação pode ter inibido a translocação polar de auxina, ocorrendo uma maior brotação nos segmentos nodais. Entretanto, segundo Taiz e Zeiger (2009), o transporte polar da auxina não é afetado pela orientação do tecido, por esse não ser dependente da gravidade e sim de energia metabólica.

Portanto, pode-se explicar que as diferenças encontradas não estão relacionadas ao favorecimento do transporte unidirecional da auxina pela gravidade, mas pela presença da gema apical que exerce dominância e pela facilidade de seu crescimento. Nos segmentos nodais, as brotações

desenvolveram a partir de gemas axilares, não influenciadas pela dominância apical (meristema apical cortado), e as orientações não contribuíram, generalizadamente, para maiores resultados. Em oposição, nos segmentos apicais, o crescimento ocorre a partir de gemas apicais, que verticalmente inoculados, estão em orientação favorável ao rápido crescimento e na horizontal, há a necessidade de acúmulo de auxina na região oposta à luz para direcionar o crescimento vertical dos brotos, conseqüentemente, delongando o processo.

### **3.2- Efeito de diferentes níveis de irradiância no crescimento de segmentos nodais**

Todas variáveis respostas avaliadas apresentaram diferenças significativas em relação às intensidades de irradiância estudadas. Para a altura de plântula e biomassa seca de folha observou-se uma resposta linear e para o número de broto e folha, e biomassa seca de caule e de raiz, uma quadrática (Gráfico, 1).

A maior altura estimada foi de 70,64 mm para a irradiância de 73,2  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . O maior número de folhas (26,06) e número de brotos (1,76) foi estimado para as intensidades de irradiância de 46,69 e 45,79  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente. Em relação às biomassas secas, foram aferidos 26,93; 11,89 e 6,52 mg nas intensidades de 73,2; 50,14 e 55,65  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para folha, caule e raiz, respectivamente.

A qualidade e a quantidade de luz afeta o crescimento, o desenvolvimento de estômatos e as respostas fisiológicas de *Withania somnifera* e para essa espécie, a intensidade de 30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  proporcionou o maior crescimento *in vitro* (LEE et al., 2007). A capacidade de enraizamento de *Persea americana* Mill, foi drasticamente reduzida em alto nível de irradiância (80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (KRISTIANSEN; ØRNSTRUP; BRANDT, 1999).



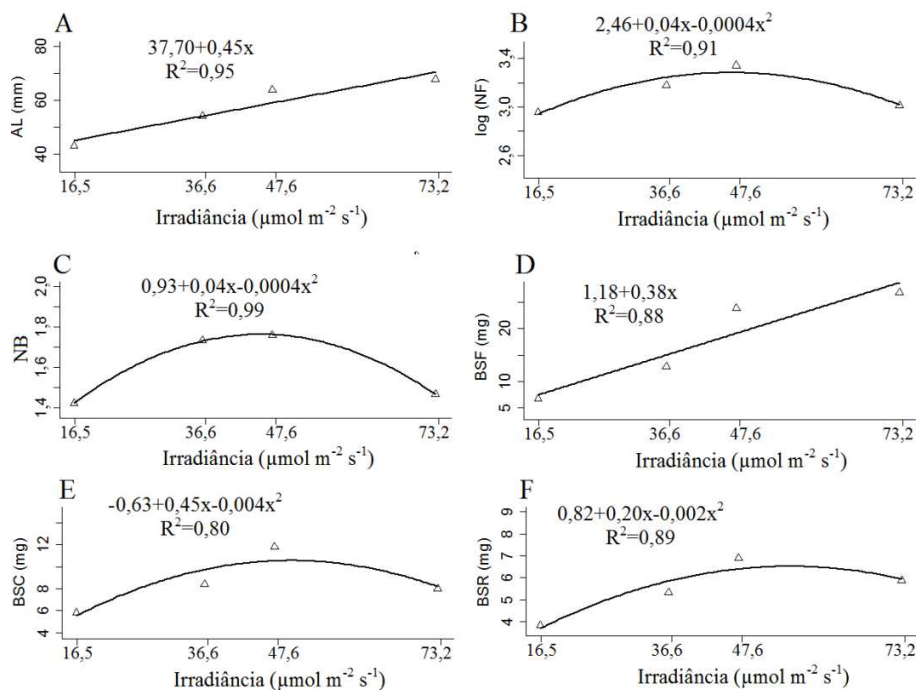


Gráfico 1 A- altura de plântula (AL), B- log do número de folha (NF)\*, C- número de broto (NB), D- biomassa seca de folha (BSF), E- biomassa seca de caule (BSC) e F- biomassa seca de raiz (BSR) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de irradiância. UFLA, Lavras, 2013. \*Variável transformada por log (Y)

Para a micropropagação de *Cymbidium*, o enriquecimento de CO<sub>2</sub> nos frascos sob nível de irradiância elevada promoveu maiores taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, maior crescimento, concluindo que em condições ambientais favoráveis para a fotossíntese, as plântulas são autotróficas *in vitro* (KOZAI; OKI; FUJIWARA, 1990).

Com base nos dados apresentados, a irradiância de 47,6  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  foi a mais adequada para micropropagação de *C. ambrosioides*, nas condições ambientais e nutricionais estudadas. Contudo, estudos são necessários, caso seja de interesse, o favorecimento do autotrofismo dessa espécie *in vitro*, talvez pela

redução da concentração de sacarose no meio de cultura, aumento da intensidade de irradiância e com o enriquecimento de CO<sub>2</sub>.

### 3.3- Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes níveis de irradiância

O óleo essencial da espécie é uma mistura de Z-ascaridol (58,38%), p-cimeno (16,20%),  $\alpha$ -terpineno (9,70%), E-ascaridol (4,30%) e limoneno (3,80%) (CAVALLI et al., 2004). No estudo da cromatografia gasosa, foram identificados todos os referidos constituintes, com exceção do limoneno. Com relação aos principais constituintes da fração volátil de *C. ambrosioides*, os diferentes níveis de irradiância não influenciaram significativamente suas percentagens, com exceção do  $\alpha$ -terpineno que diminuiu linearmente (Gráfico, 2).

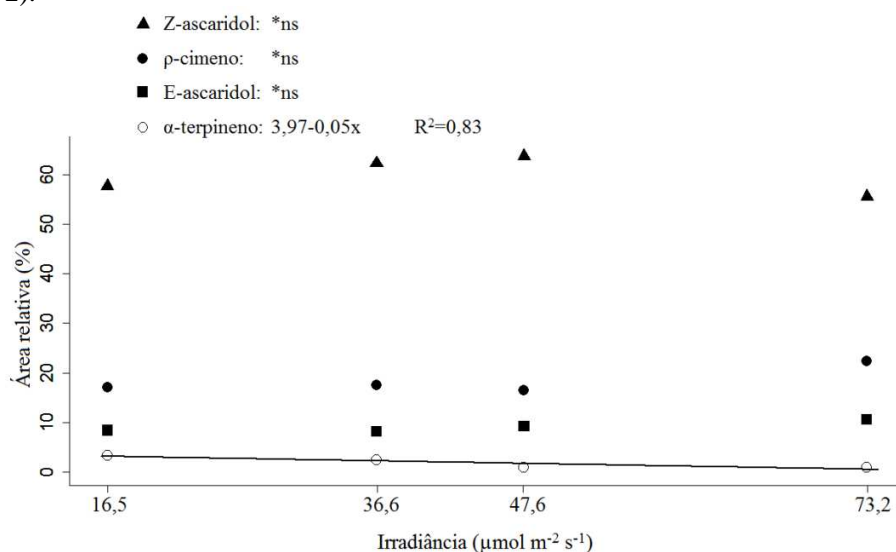


Gráfico 2 Área relativa (%) de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes níveis de irradiância. UFPA, Lavras, 2013

### 3.4- Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no crescimento de segmentos nodais

Para as variáveis altura de plântula e biomassa seca de caule não foram observados interações significativas, ao contrário das demais variáveis. Maiores médias de altura de plântula e biomassa seca de caule foram obtidas em meio de cultura acrescidas ou não de cinetina (Tabela, 3).

Tabela 3 Altura de plântula (AL) e biomassa seca de caule (BSC) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em função de três tipos de citocininas. UFLA, Lavras, 2013

CITOCININAS	AL	BSC
CINETINA	70,61 a	21,65 a
BAP	27,64 b	16,95 ab
TDZ	16,95 c	14,30 b
TESTEMUNHA	67,45 a	15,44 a

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em oposição aos dados obtidos, para a espécie *Hancornia speciosa* a menor altura de plântula foi observada ao não utilizar essas citocininas e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionou melhor resultado (SOARES et al., 2011).

Diferentes concentrações de citocininas adicionadas no meio não influenciaram, estatisticamente, a biomassa seca de caule, entretanto, para a altura de plântulas observou-se uma resposta quadrática (Gráfico, 3).

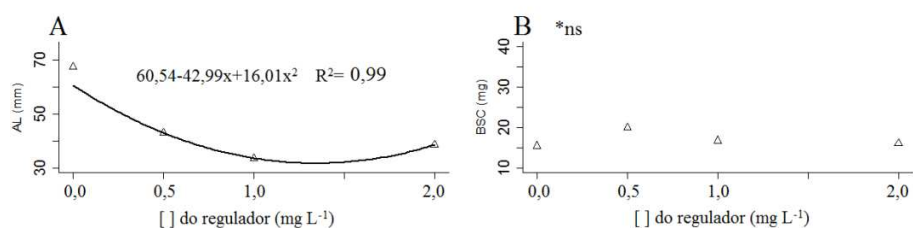


Gráfico 3 A- altura de plântula (AL) e B-biomassa seca de caule<sup>\*ns</sup> (BSC) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de citocinina. UFLA, Lavras, 2013. <sup>\*ns</sup> Não significativo pelo teste F

Concentrações mais elevadas de citocininas, principalmente o BAP, são eficientes para o aumento do número de novos brotos, enquanto que, contrariamente, concentrações mais baixas ou a ausência deste regulador promovem o alongamento do explante (ASMAR et al., 2011). Esse fato foi observado parcialmente para *C. ambrosioides*, o BAP e o TDZ prejudicaram o crescimento de plântulas e a cinetina não apresentou incrementos significativos na altura do broto principal, entretanto, o número de brotos de *C. ambrosioides* não aumentou com a utilização dessas citocininas.

O número médio de folha e broto e a biomassa seca de raiz não apresentaram diferenças estatísticas em relação à adição de doses crescentes de BAP no meio de cultura. A biomassa seca de folhas foi, em média, maior na presença de  $1,47 \text{ mg L}^{-1}$  dessa citocinina (Gráfico, 4).

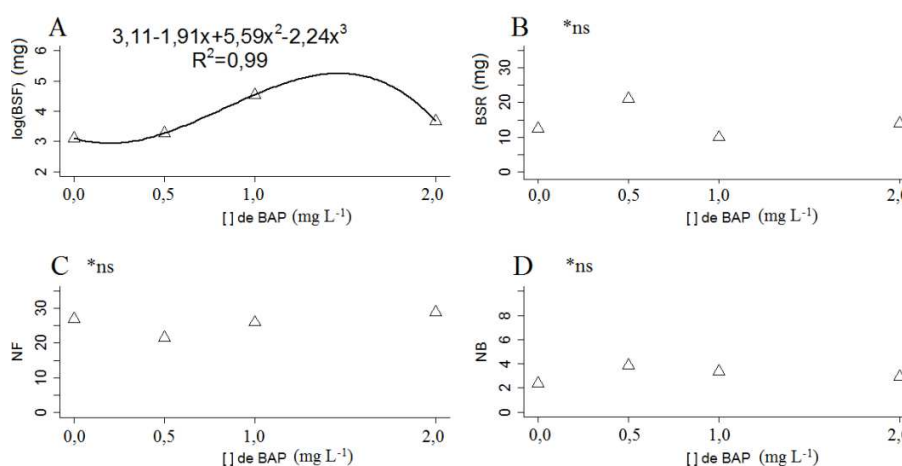


Gráfico 4 A- biomassa seca de folha\* (BSF), B- biomassa seca de raiz\*\* (BSR), C- número de folha\*\* (NF) e número de broto\*\* (NB) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, 2013. \*Variável transformada por  $\log(Y)$ . \*\*<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F

A biomassa seca de folha e de raiz e o número de folha e broto não apresentaram diferenças estatísticas para a adição de cinetina no meio de cultura (Gráfico, 5).

A biomassa seca de folha e o número de brotos em relação às diferentes concentrações de TDZ foram ajustados a um polinômio de primeiro grau, enquanto a biomassa seca de raiz e o número de folha, a um de segundo grau. Entretanto, para essas variáveis analisadas o maior crescimento de segmentos nodais ocorreu na ausência de TDZ (Gráfico, 6).

Como observado nos gráficos, à adição das citocininas BAP e TDZ prejudicaram o crescimento dos explantes e a cinetina não apresentou acréscimos significativos, certamente por existir concentrações endógenas adequadas desse regulador, tanto para formação de raízes adventícias como para brotos.

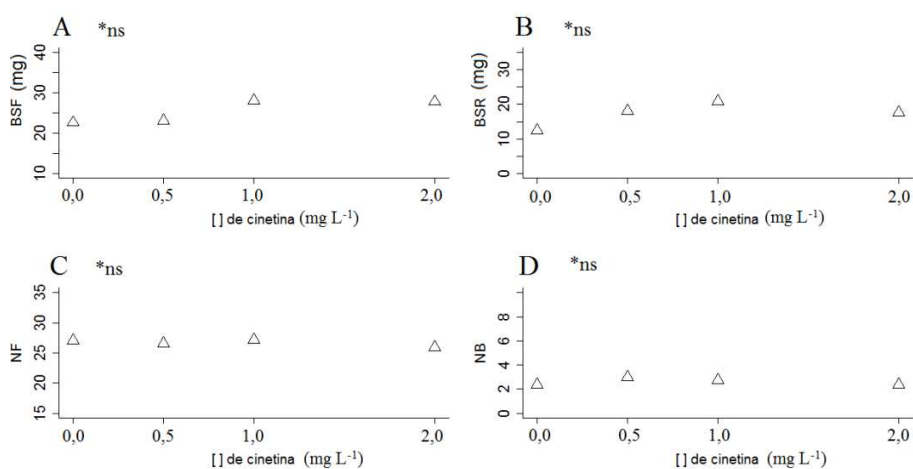


Gráfico 5 A- Biomassa seca de folha\* (BSF), B- biomassa seca de raiz\* (BSR), C- número de folha\* (NF) e número de broto\* (NB) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de cinetina. UFLA, Lavras, 2013. \*<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F

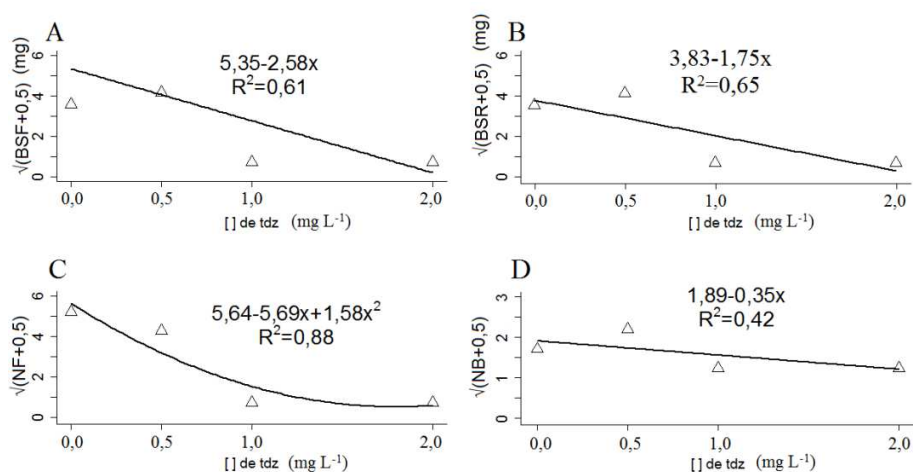


Gráfico 6 A- Biomassa seca de folha\* (BSF), B- biomassa seca de raiz\* (BSR), C- número de folha\* (NF) e número de broto\* (NB) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de TDZ. UFLA, Lavras, 2013. \*Variável transformada por  $\sqrt{(Y+0,5)}$

A formação de menor número de brotos com a utilização do TDZ pode estar relacionada ao fato de essa citocinina ser mais ativa biologicamente que as demais (SOARES et al., 2011).

### 3.5- Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes tipos e concentrações de citocininas

O constituinte volátil *p*-cimeno não apresentou diferenças significativas em doses crescentes de BAP. Entretanto, para o *Z*-ascaridol,  $\alpha$ -terpineno e o *E*-ascaridol as maiores percentagens foram observadas nas concentrações de 0,27; 1,40 e 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente (Gráfico, 7).

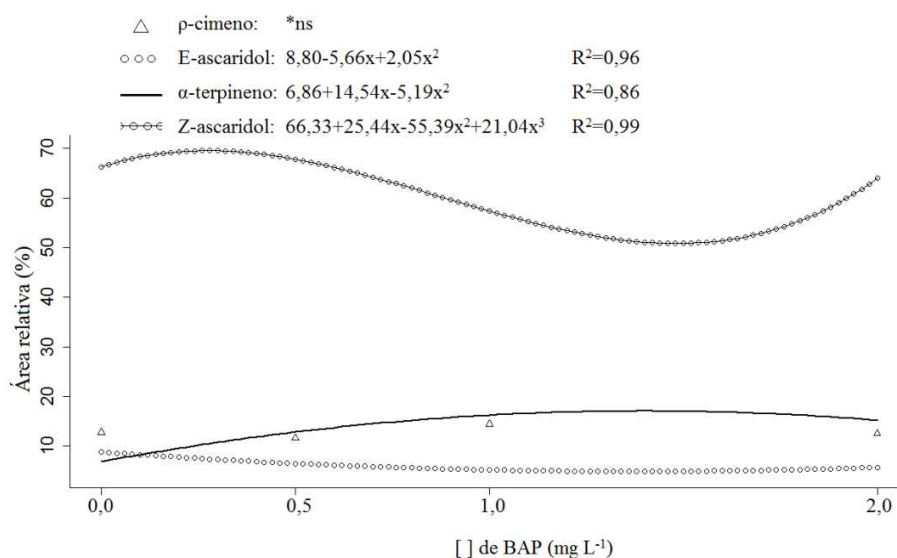


Gráfico 7 Área relativa (%) de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, 2013

Para a cinetina, apenas os constituintes Z-ascaridol e p-cimeno apresentaram-se diferentes às doses crescentes desse regulador e, respectivamente, nas concentrações de 1,52 e 0,32 mg L<sup>-1</sup> obtiveram maiores resultados (Gráfico, 8).

Todos os constituintes voláteis identificados apresentaram-se em percentagens diferentes, estatisticamente, em relação à adição de concentrações crescentes de TDZ. Contudo, as maiores respostas foram observadas na ausência dessa citocinina (Gráfico, 9).

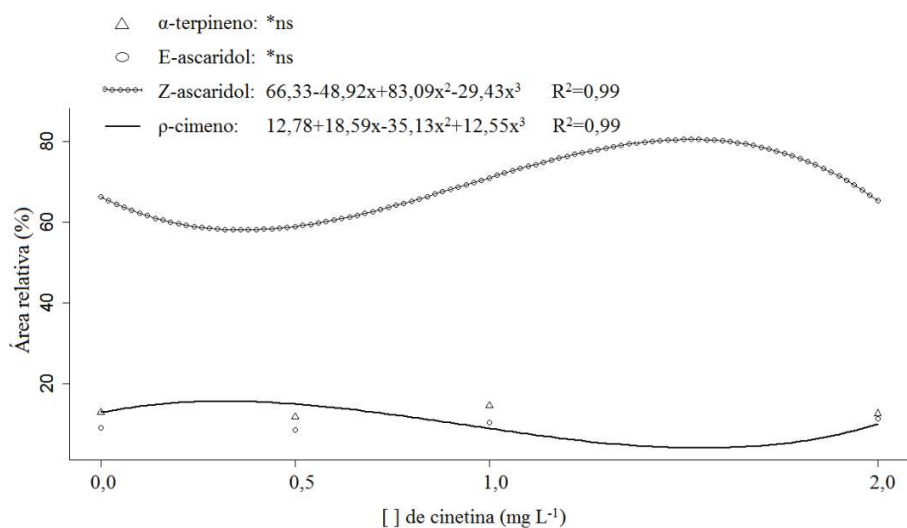


Gráfico 8 Área relativa (%) de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de cinetina. UFLA, Lavras, 2013

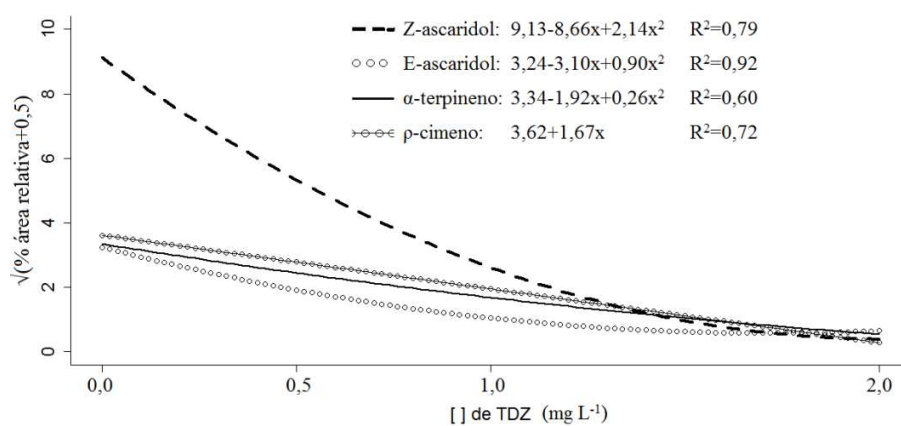


Gráfico 9 Área relativa\* (%) de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Chenopodium ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de TDZ. UFLA, Lavras, 2013. \*Variável transformada por  $\sqrt{(Y+0,5)}$



As citocininas apresentam diferentes efeitos, dependendo do metabólito secundário e da espécie em estudo (RAO; RAVISHANKAR, 2002). Esses autores citam alguns trabalhos na qual ocorreu o estímulo ou a inibição de antocianinas em algumas espécies.

Tratamentos com concentrações crescentes TDZ, observa-se reduções nas percentagens da área relativa dos principais constituintes da fração volátil de *C. ambrosioides*, por não permitir o crescimento dos segmentos nodais. Para a BAP as maiores percentagens do Z-ascaridol foram realizadas em condições adequadas de cultivo, que se assemelha sem esse regulador e para a cinetina, a maior produção desse constituinte foi observada ao adicionar 1,52 mg L<sup>-1</sup>.

### **3.6- Efeito de diferentes volumes de meio de cultura no crescimento de segmentos nodais**

As variáveis respostas estudadas apresentaram diferenças significativas. A altura de plântula demonstrou comportamento cúbico e as demais quadrático (Gráfico, 10).

Os valores máximos para altura, número de folha e de broto, e as biomassas secas (folha, caule e raiz) são 72,43 mm; 43,82; 5,03; (28,86; 22,11 e 28,57 mg), respectivamente, nos volumes 40,60; 64,31; 60,34; (60,53; 60,06 e 63,02).

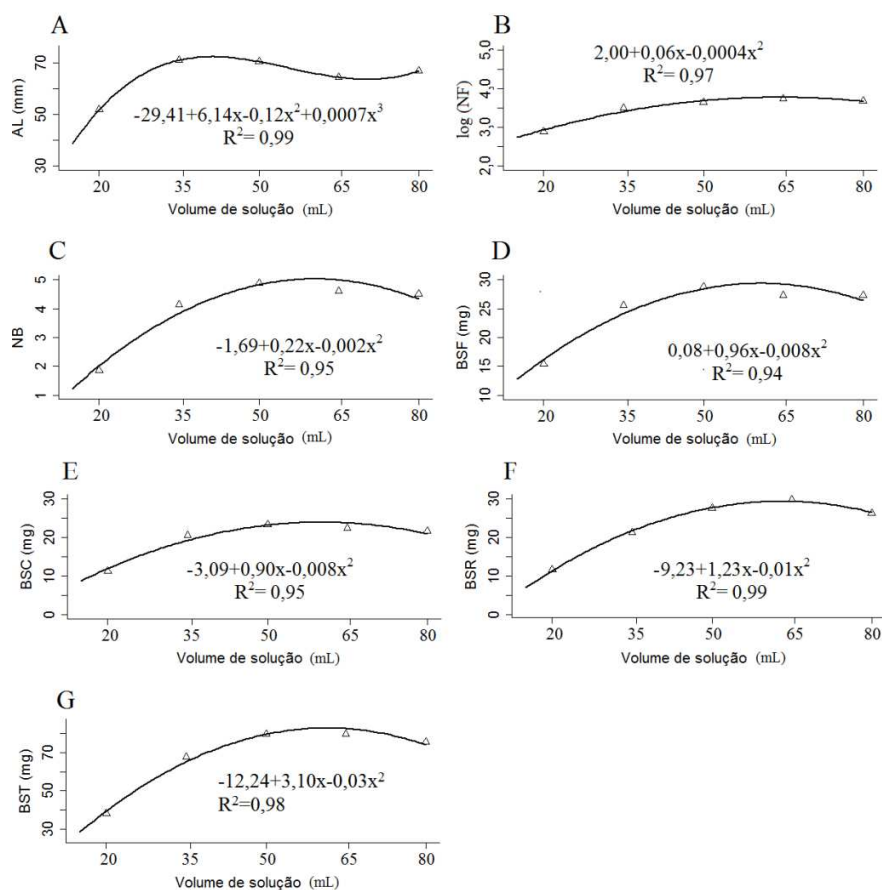


Gráfico 10 A- altura de plântula (AL), B- log do número de folha (NF)\*, C- número de broto (NB), D- biomassa seca de folha (BSF), E- biomassa seca de caule (BSC) e F- biomassa seca de raiz (BSR) de *Chenopodium ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes volumes de solução de cultivo. UFLA, Lavras, 2013. \*Variável transformada por log (Y)

O estudo de viabilidade econômica não foi realizado, entretanto, pode-se observar, de maneira genérica, que volumes de meio de cultura superior a 50 mL não proporcionaram incrementos crescentes no crescimento dos explantes. Ressalta-se ainda, que ao multiplicar essa espécie, seja por segmentos apicais ou

nodais, não haverá grandes diferenças no número de plântulas que serão obtidas entre os volumes de 50 e 80 mL, com base no número de brotos (gemas apicais) e folhas (gemas axilares), de ambos os tratamentos. Entretanto, utilizará de 1,6 x mais de meio de cultura, 80 mL quando comparado com 50 mL, para obtenção de mesma taxa de multiplicação.

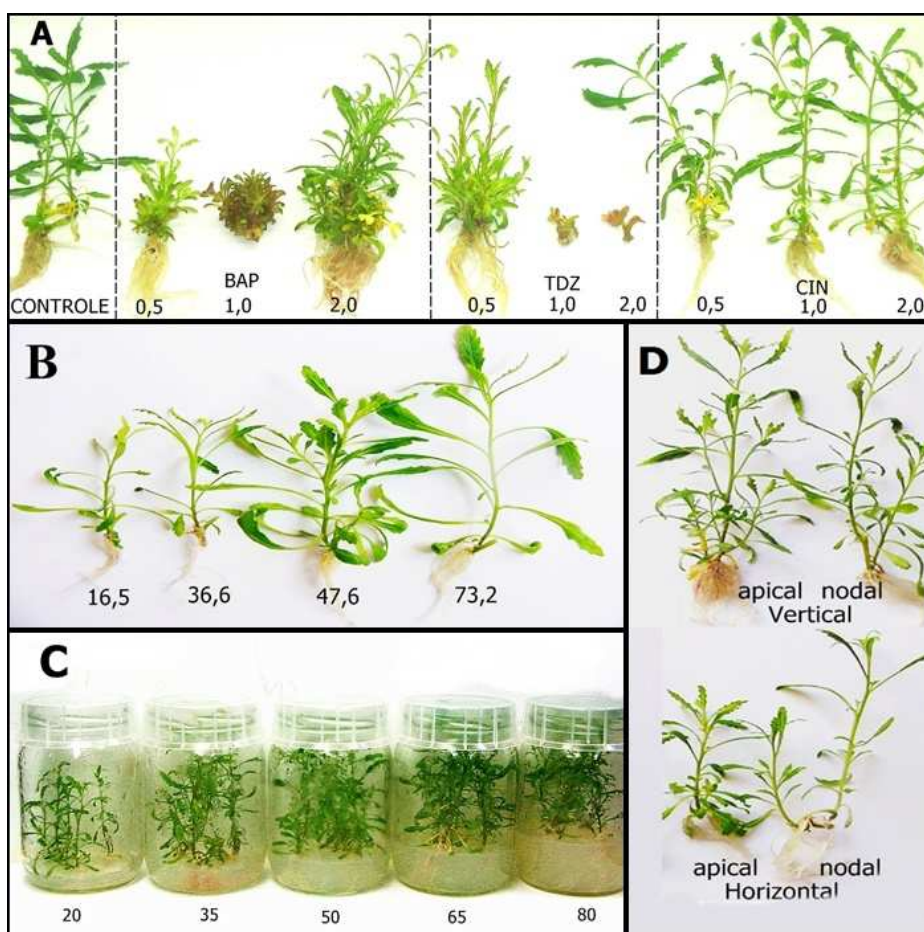


Figura 1 Plântulas micropropagadas de *Chenopodium ambrosioides* em: A- diferentes tipos e concentrações de citocininas; B- diferentes níveis de irradiâncias ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); C- diferentes volumes de solução nutritiva (mL); D- diferentes orientações e tipos de explantes. UFLA, Lavras, 2013

#### 4- CONCLUSÃO

Para o cultivo *in vitro* de *Chenopodium ambrosioides* recomenda-se a inoculação de segmentos nodais nas orientações verticais ou horizontais e gemas apicais na vertical com 50 mL de meio de cultura (0,50 MS e 3% de sacarose), ausente de citocininas, os quais devem ser mantidos na sala de crescimento com  $47,6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiância. A identificação dos constituintes voláteis dessa espécie não foi influenciada pela intensidade de irradiância e uso de citocinina, ao contrário de sua percentagem de área relativa do pico.

**AGRADECIMENTOS:** FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. Illinois: Allured, 2007. 804 p.
- ARAGON, C. E. et al. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 46, n. 1, p. 89-94, Feb. 2010.
- ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 533-538, dez. 2011.
- CAVALLI, J. F. et al. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, West Sussex, v. 15, n. 5, p. 275-279, Sept./Oct. 2004.
- COSTA, M.; TAVARES, E. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L.(Chenopodiaceae)-erva-de-Santa Maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 63-71. 2006.
- DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, n. 1, p. 1-24, 1990.
- DE LA VIÑA, G. et al. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65, n. 3, p. 229-237, June. 2001.
- DEBNATH, M.; MALIK, C. P.; BISEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Dallas-Fort Worth, v. 7, n. 1, p. 33-49, Feb. 2006.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, ago. 2002.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, Ouro Preto, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

GARCIA-GONZALES, R. et al. Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago, v. 37, n. 3, p. 5-30, Sept./Dec. 2010.

KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Advances in Chromatography**, Connecticut, v. 1, p. 229-247, 1965.

KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 205-211, Sept. 1990.

KRISTIANSEN, K.; ØRNSTRUP, H.; BRANDT, K. *In vitro* PPF and media composition affect both *in* and *ex vitro* performance of *Alstroemeria* butterfly-hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, n. 3, p. 145-153, Mar. 1999.

LEE, S.H. et al. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 141-151, Oct. 2007.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July. 1962.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Software.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 20, n. 2, p. 101-53, May. 2002.

REIS, É. S. et al. Tipos de explantes e volumes de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 83-88, dez. 2007.

SOARES, F. P. et al. Proliferation rate and residual effect of different sources of cytokinin on *in vitro* culture of *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, jan./fev. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern applied statistics with S**. New York: Springer, 2002. 497 p.

VERISSIMO, L. F. et al. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 6, p. 1163-1171, nov./dez. 2011.