

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE LOSNA (*Artemisia absinthium* L.) EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Simão, M.J.¹, Damasceno, S.¹, Nogueira, A.M.¹, Guizardi, P.S.¹, Silva, N.C.B.¹

¹CCA/UFES /Departamento de Produção Vegetal, Alegre – ES, ninacbs@cca.ufes.br

Resumo- A losna (*Artemisia absinthium* L - Asteraceae) é um arbusto aromático perene de pequeno porte rico em óleos voláteis que são usados em tratamentos de algumas doenças. Este trabalho teve objetivo avaliar a germinação *in vitro* das sementes de *A. absinthium* em três diferentes meios de cultura. Após desinfestação superficial com uma lavagem em etanol 95% e solução de hipoclorito de sódio 50%, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo os meios de cultura MS, MS½ e água destilada (AAS), acrescidos de sacarose, vitaminas e ágar. O material foi avaliado quanto ao IVG, porcentagem de germinação e contaminação, presença de raiz, número de folhas, altura da plântula, biomassa fresca/seca. As médias foram submetidas à análise de variância e Teste de Tukey (5%). O tratamento AAS resultou em 53% de germinação, apresentando o maior IVG em comparação com os demais. Já o tratamento MS½ apresentou maior altura das plantas e maior número de folhas em relação aos demais, porém teve o menor IVG e menor porcentagem de germinação.

Palavras-chave: Losna, germinação *in vitro*, meio nutritivo

Área do Conhecimento: Cultura de tecidos

Introdução

Plantas medicinais são uma importante fonte de contribuição terapêutica para aliviar doenças humanas (DEV, 1997). A erva medicinal *Artemisia absinthium* Linn, também conhecida como losna, é um subarbusto aromático perene de pequeno porte pertencente à família Asteraceae, oriunda da Europa e encontrada em países como EUA, Índia, China, Paquistão e Nova Zelândia (LAMARTI et al., 1996; GONZÁLES et al., 2003; TARIQ et al., 2009; BORA e SHARMA, 2010). O óleo volátil destilado das folhas e flores secas é usado na composição de perfumes e em alguns analgésicos externos (GAMBELUNGHE & MELAI, 2002; LACHENMEIER, 2006).

A losna é amplamente usada na medicina popular (ORAV et al., 2005), visto que diversos trabalhos reportaram a atividade etnofarmacológica do uso de *A. absinthium* como antipirético, anti-séptico, antiespasmódico, estimulante cardíaco, em tratamento de doenças neurodegenerativas, câncer, desintéria bacilar aguda, inflamação do fígado, na melhora da memória, e apresentou atividade significativa no tratamento de acidente vascular cerebral (GILANI e JANBAZ, 1995; KOUL, 1997; WAKE et al., 2000; MUTO et al., 2003; GUARRERA, 2005; HARENDRA et al., 2009; BORA e SHARMA, 2010).

A elevada demanda de plantas medicinais nos seus habitats está levando a um esgotamento destes recursos naturais. A manutenção desses genótipos valiosos é de grande importância

(SUJATHA e KUMARI; 2008), sendo a micropropagação uma forma de conservação de germoplasma.

A micropropagação, termo sugerido por Hartman et al. (1990), compreende o cultivo asséptico de partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Essa técnica é aquela com maior impacto comercial, pois possibilita a produção de um grande número de plantas assépticas em um curto espaço de tempo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990), considerando ainda o espaço físico reduzido e a possibilidade de manter coleções de plantas de genótipos diferentes.

A micropropagação de *A. absinthium* foi estudada por Nin et al., regenerando plantas a partir de brotos (1994) e através da cultura de calos (1996). O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de diferentes meios de cultura, baseados em Murashige & Skoog (1962), na germinação das sementes e no desenvolvimento das plantas de *Artemisia absinthium* L para sua micropropagação.

Metodologia

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias, em Alegre. As sementes comerciais de losna (ISLA[®]) foram desinfestadas com lavagem em água destilada com algumas gotas de detergente durante 10 minutos, imersão em para etanol 95% por um minuto e finalizando em

hipoclorito de sódio comercial (água sanitária) 50% durante 15 minutos.

Foram utilizados três meios baseado em Murashige & Skoog (1962): (1) meio MS (2) meio MS $\frac{1}{2}$, com 50% da concentração padrão de sais, (3) meio AAS, constituído somente de água destilada. Todos os meios foram acrescidos de sacarose (30g/L), solidificados com agar (7g/L) e o pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$. Todo material foi esterilizados em autoclave a 120° C e 1.1 Kgf/cm $_2$. As sementes foram mantidas em sala de cultivo sob iluminação artificial com luz branca do tipo luz do dia (tubos fluorescentes), com fluência de 1,6 W/ m 2 , fotoperíodo diário de 16 horas e temperatura a 25 ± 2 °C.

O experimento foi inteiramente casualizado, em fatorial 3x1, com 3 repetições e a unidade experimental constituída de 20 tubos de ensaio, cada um com uma semente, no total de 60 tubos para cada meio. O experimento foi avaliado durante um período de 35 dias quanto ao índice velocidade de germinação (IVG) e, ao final, quanto à porcentagem de germinação, contaminação, presença de raiz, número de folhas, altura da plântula, biomassa fresca/ seca. O IVG foi calculado utilizando a equação descrita por Maguire (1962). Um paquímetro foi utilizado para medição de altura da planta. Para obter dados de biomassa seca, as plantas foram submetidas a um ressecamento por 48 horas em uma estufa à 60°C e medidas com uso da balança de precisão.

As médias obtidas foram submetidas à análise de variância e Teste de Tukey, com probabilidade de 5%.

Resultados

A taxa de contaminação das culturas foi baixa, variando entre 11,67%, no tratamento AAS, 6,67% no meio com MS, e 0% no tratamento MS $\frac{1}{2}$.

A maior porcentagem de germinação (53,3%) bem como maior velocidade de germinação (1,91) foi observada no tratamento AAS (Tabela 1). Já a menor taxa de germinação (30%) e IVG (0,656) foi alcançada no meio MS $\frac{1}{2}$ (Tabela 1).

Tabela 1 – IVG e porcentagem de germinação.

Tratamento	IVG	Porcentagem de Germinação
MS	0,7135	41,7%
MS $\frac{1}{2}$	0,6566	30%
AAS	1,9100	53,3%

O meio MS $\frac{1}{2}$ apesar de apresentar o menor IVG e porcentagem de germinação permitiu o

desenvolvimento de plântulas mais altas e com maior número de folhas (Tabela 2, Figura 1).

Tabela 2- Tamanho das plântulas (cm) e número de folhas após 35 dias *in vitro*.

Tratamento	Altura (cm)	Número de Folhas
MS	1.463 B	7.2 A
MS $\frac{1}{2}$	2.491 A	8.7 A
AAS	0,184 C	2.1 B

Análise estatística através de teste de Tukey (0.05), onde valores que diferenciam significativamente apresentam letras diferentes.



Figura 1- Plântulas de *A. absinthium* desenvolvidas após 21 dias de cultivo *in vitro* nos diferentes meios de cultura. A – meio AAS; B – Meio MS; C – meio MS $\frac{1}{2}$

Na análise de biomassa, o meio MS $\frac{1}{2}$ também se apresentou mais eficiente, com maior biomassa fresca e seca (81,6 e 8,7 mg, respectivamente). O meio AAS levou a menor acúmulo tanto de biomassa fresca quanto seca (Tabela 3). A biomassa seca das plântulas crescidas nos meios contendo sais (MS e MS $\frac{1}{2}$) não apresentou diferença significativa diferindo apenas do meio AAS (Tabela 3).

Tabela 3 – Produção de biomassa em plântulas de losna nas diferentes condições de crescimento *in vitro*.

Tratamento	Biomassa Fresca (mg)	Biomassa Seca (mg)
MS	37,7 B	6,6 A
MS½	81,6 A	8,7 A
AAS	4,9 C	0,2 B

Análise estatística através de teste de Tukey (0.05), onde valores que diferenciam significativamente apresentam letras diferentes.

Discussão

A germinação de sementes é um fenômeno que pode ser dividido em três etapas: embebição, ativação e retomada do crescimento embrião. A água é um dos fatores mais importantes na germinação pois está envolvida em todas as etapas. Sua absorção ocorre exclusivamente devida à diferença de potencial hídrico entre o interior da semente e o meio onde ela se encontra (KERBAUY, 2008). O meio AAS possui maior disponibilidade de água livre que os demais meios de cultura avaliados o que pode ter contribuído para a maior taxa e velocidade de germinação observados.

Para o desenvolvimento adequado das plântulas são necessários nutrientes essenciais tais como N, P, Mg, Fe, K, dentre outros. Os diferentes nutrientes (macro e microelementos) participam de diferentes formas do metabolismo vegetal proporcionando o crescimento adequado das plântulas. Diferentes espécies vegetais podem apresentar necessidades nutricionais diferentes (Taiz e Zeiger, 2009). Os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, vitaminas, açúcares e hormônios, influenciando o desenvolvimento das plantas *in vitro* (HOPPE et al., 2004). De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que a concentração de sais adicionada no meio MS½ é considerada favorável ao desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Artemisia absinthium* L. O tratamento com meio AAS não se mostrou eficiente ao desenvolvimento das plântulas devido a ausência de nutrientes.

Conclusão

A germinação *in vitro* de sementes de losna pode ser obtida utilizando meio contendo água-ágar-sacarose apenas. Entretanto, após a germinação, as plântulas formadas devem ser

transferidas para o meio MS½ visando à obtenção de indivíduos com características morfológicas mais adequadas à propagação *in vitro* de *Artemisia absinthium* L.

Referências

- BORA, K. S.; SHARMA, A. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. **Journal of Ethnopharmacology**. 2010.
- DEV, S. Ethno therapeutics and modern drug development: The potential of Auurveda. **Curr. Sci.** v.73 n.1, p. 909-928. 1997.
- GAMBELUNGHE, C. & MELAI, P. Absinthe: enjoying a new popularity among young people. **Forensic Sci. Int.** v.130, p. 183–186. 2002.
- GILANI, A.H., JANBAZ, K.H. Preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCl4-induced hepatotoxicity. **General Pharmacology** v.26, p.309–315. 1995.
- GONZÁLES, H.R.; SOSA, I.H.; FERRADÁ, C.A.R.; AMITAS, M.M.R. Propagación *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. en Cuba. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 2003, n. 1. 2003.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Cap.9, p.99-170, 1990.
- GUARRERA, P.M. Traditional phytotherapy in central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). **Fitoterapia**, v. 76, p.1–25. 2005.
- HARENDRA, S.P., GANG, L., MING, Q.W. A new dawn for the use of traditional Chinese medicine in cancer therapy. **Molecular Cancer**, v.8, p.21. 2009.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T., **Plant propagation: principles and practices**. 5th. ed. Englewood Cliffs : Prentice-Hall, p. 647, 1990.
- HOPPE, J. M. et. al. Produção de sementes e mudas florestais, Caderno Didático. Santa Maria, nº 1, 388 p, 2ª ed. Santa Maria, 2004.
- KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 452p. 2008.
- KOUL, M.K. Medicinal Plants of Kashmir and Ladakh, Temperate and Cold Arid Himalaya. Indus

Publishing Company, FS-5, Tagore Garden, New Delhi, p. 102. 1997.

- LACHENMEIER, D. W., EMMERT, J., KUBALLA, T. & SARTOR, G. Thujone – cause of absinthism? **Forensic Sci. Int.**, v. 138, p. 1–8. 2006.

- LAMARTI, A.; SADKI, I.; BADO, A.; DEFFIEUX, G.; CARDE, J.-P. Obtention Par Culture In Vitro De Clones D'absinthe, *Artemisia absinthium* L., Denués De Thuyone. **Bull. Soc. Pharm. Bordeaux**, v. 135, p. 25-43. 1996.

- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison. v. 2. p. 176-177. 1962.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497.1962.

- MUTO, T., WATANABE, T., OKAMURA, M., MOTO, M., KASHIDA, Y., MITSUMORI, K. Thirteen-week repeated dose toxicity study of wormwood (*Artemisia absinthium*) extract in rats. **Toxicological Sciences**, v. 28, p. 471–478. 2003.

- NIN, S., MOROSI, E., SCHIFF, S., BENNICI, A. *Callus cultures of Artemisia absinthium L.: initiation, growth optimization and organogenesis.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, n.1, p. 62-72. 1996.

- NIN, S., SCHIFF, S., BENNICI, A., MAGHERINI, R. *In vitro* propagation of *Artemisia absinthium* L. **Adv. Hort. Sci.**, v. 8, p. 145-147. 1994.

- ORAV, A.; RAAL, A.; ARAK, E.; MÜÜRSEPP, M.; KAILAS, T. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin. **Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.**, v. 55, n. 3, p. 155-165. 2005.

- SUJATHA, G; KUMARI, B.D.R. Micropropagation, encapsulation e growth of *Artemisia vulgaris* node explants for germoplasm preservation. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 93-100. 2008.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed. 820p. 2009.

- TARIQ, K.A.; CHISHTI, M.Z.; AHMAD, F.; SHAWL, A.S. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. **Veterinary Parasitology** v. 160, p. 83–88. 2009.

- WAKE, G., COURT, J., PICKERING, A., LEWIS, R., WILKINS, R., PERRY, E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. **Journal of Ethnopharmacology**. v.69, p.105–114. 2000.