

Densidade do fluxo de fótons e tipos de citocininas influenciam a produção de biomassa e acúmulo de compostos orgânicos voláteis em *Dysphania ambrosioides* L sob condições *in vitro*

Photon flux density and cytokinin types influence biomass production and volatile organic compound accumulation in *Dysphania ambrosioides* L under *in vitro* conditions

La densidad de flujo de fotones y los tipos de citoquininas influyen en la producción de biomasa y la acumulación de compuestos orgánicos volátiles en *Dysphania ambrosioides* L en condiciones *in vitro*

Recebido: 30/12/2022 | Revisado: 16/01/2023 | Aceitado: 17/01/2023 | Publicado: 20/01/2023

Alexandre Alves de Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3704-8633>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: alexandre.ufla@yahoo.com.br

Rafael Marlon Alves de Assis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8978-2867>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: rafamarlon7@gmail.com

João Pedro Miranda Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2699-4931>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jjoaomiranda7@gmail.com

Jeremias José Ferreira Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2178-2972>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jeremias12agro@gmail.com

Flávia Dionísio Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8282-4059>
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Brasil
E-mail: flavia1808@hotmail.com

Jandeilson Pereira dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3708-2540>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jandeilsonpereira@gmail.com

Suzan Kelly Vilela Bertolucci

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8796-7043>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: suzan@ufla.br

José Eduardo Brasil Pereira Pinto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1141-7907>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jeduardo@ufla.br

Resumo

No presente trabalho objetivou-se avaliar diferentes intensidades luminosas e concentrações de citocininas no crescimento e análise de constituintes voláteis *in vitro* de *Dysphania ambrosioides* L., espécie que compõe a lista de interesse em estudos do governo (RENISUS). As intensidades de irradiância na sala de crescimento foram de 16,5; 36,6; 47,6 e 73,2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para avaliar o 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 mg L^{-1}) foram estudadas. Segmentos nodais mantidos na sala de crescimento com 47,6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiância e sem a adição de citocinina proporcionaram melhor crescimento de plântulas *in vitro*. O número de constituintes voláteis dessa espécie não foi influenciado pela intensidade de irradiância e nem pelo uso de citocinina, no entanto, as concentrações dos compostos foram afetadas.

Palavras-chave: Planta medicinal; Micropropagação; Regulador de crescimento; Luz.

Abstract

This study aimed to evaluate different intensity of irradiance and cytokinins concentration which can be influential in growth and volatile compounds production *in vitro* for *Dysphania ambrosioides* L., a plant present in the RENISUS list for medicinal plants with high interest in research and use. The irradiance intensities of 16.5, 36.6, 47.6 and 73.2

$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in the growth room were evaluated for nodal segments development. Three kinds of cytokinin (BAP, TDZ and Kinetin) in four different concentrations (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L^{-1}) were studied. Nodal segments were kept in growth room under 47.6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of irradiance and without cytokinin was found suitable for nodal segment growth in vitro. The number of volatile compounds of this species was not affected by irradiance intensity or cytokinin, however, the concentrations were affected.

Keywords: Medicinal plant; Micropropagation; Plant growth regulator; Light.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes intensidades de luz y concentraciones de citoquininas en el crecimiento y análisis in vitro de constituyentes volátiles de *Dysphania ambrosioides* L., especie que conforma la lista de interés en estudios gubernamentales (RENISUS). Las intensidades de irradiación en la sala de crecimiento fueron 16,5; 36,6; 47,6 y 73,2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para evaluar el crecimiento de los segmentos nodales. Se estudiaron tres tipos de citoquininas (BAP, TDZ y Kinetina) a cuatro concentraciones diferentes (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg L^{-1}). Los segmentos nodales mantenidos en la sala de crecimiento con 47,6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiancia y sin la adición de citoquinina proporcionaron un mejor crecimiento de las plántulas in vitro. El número de constituyentes volátiles de esta especie no fue influenciado por la intensidad de la irradiancia ni por el uso de citoquinina, sin embargo, las concentraciones de los compuestos fueron afectadas.

Palabras clave: Planta medicinal; Micropropagación; Regulador de crecimiento; Luz.

1. Introdução

Dysphania ambrosioides é uma 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, 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 e a 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 *et al.*, 2006; Morais *et al.*, 2012).

O crescimento e o 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 diferenciados para cada espécie em estudo (García-González *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 (Asmar *et al.*, 2011).

Os níveis de irradiância também influenciam o crescimento de plântulas e a produção de metabólitos secundários quando exposto a diferentes condições de luz *in vitro* para cada espécie em estudo (Alvarenga *et al.*, 2015a; Araújo *et al.*, 2021; Coelho *et al.*, 2021; da Silva *et al.*, 2022; de Hsie *et al.*, 2019; de La Viña *et al.*, 2001; Lazzarini *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2022; Sáez *et al.*, 2013). Para a espécie *Withania somnifera*, o melhor crescimento e desenvolvimento de plântulas *in vitro* foram obtidos com 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para *Musa* spp (Aragón *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2007).

Assim, objetivou-se, com este estudo, estabelecer condições de intensidades de irradiância e concentrações de citocininas no crescimento e análise dos constituintes voláteis *in vitro* de *Dysphania ambrosioides* L.

2. Metodologia

2.1 Condições gerais do experimento

Em todos os experimentos, a autoclavagem do meio de cultura foi realizada a 120 °C e 1 atm, por 20 min. Os tubos ou frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± °C e densidade de fluxo de fótons de 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR Photon Flux Sensor, ProCheck – Decagon Devices), com exceção ao experimento de níveis de irradiância; 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.

2.2 Estabelecimento do explante

Plantas silvestres da espécie *Dysphania ambrosioides*, localizadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA, foram utilizadas como fonte de sementes. A exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Biologia dessa Instituição, sob o registro 10137. As sementes foram coletadas e semeadas em bandeja de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax® e, após 60 dias, foram transplantadas para potes de polietileno (4 L) contendo o mesmo substrato, e mantidas em casa de vegetação.

Os segmentos apicais foram coletados após 30 dias e lavados em água corrente por 30 min e imersos em álcool etílico a 70% por 30 s seguidos de uma solução de água sanitária a 40% por 10 min e, finalmente, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com metade das concentrações de sais, e 3% de sacarose.

2.3 Efeito de diferentes níveis de irradiância no crescimento de segmentos nodais

Segmentos nodais foram inoculados verticalmente em meio de cultura com a metade das concentrações de sais e 3% de sacarose, e cultivados em sala de crescimento com diferentes intensidades de irradiância (16,5; 36,6; 47,6 e 73,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sob lâmpadas fluorescentes brancas frias (Osram, Brasil). O delineamento experimental 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, mm), número de broto (NB) e de folha (NF), biomassa seca de folha (BSF, mg), de caule (BSC, mg) e de raiz (BSR, mg).

2.4 Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no crescimento de segmentos nodais

Segmentos nodais foram inoculados verticalmente em meio de cultura com a metade das concentrações de sais e 3% de sacarose, e em diferentes tipos 6-benzilaminopurina (BAP), tidiazuron (TDZ) e Cinetina e concentrações de citocininas (0,5; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}). 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. Utilizaram-se três repetições e a unidade experimental representada por três frascos contendo três segmentos por repetição. Após 40 dias, foram avaliadas as mesmas variáveis do experimento de níveis de irradiância.

2.5 Análise da fração volátil por HS-CG/EM

Folhas de plântulas com 40 dias foram secas em estufa de circulação de ar a 35°C e utilizou-se para análise da fração volátil 60 mg de folhas secas, em triplicata.

As análises químicas foram realizadas por headspace-CG/EM empregando um cromatógrafo gasoso Agilent®7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C. As condições operacionais foram estabelecidas os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 110°C durante 30 min, temperatura de seringa a 120°C. 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).

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, 2008) e de literatura (Adams, 2007).

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software R e o pacote estatísticos ExpDes (Ferreira *et al.*, 2011), conforme *R Development Core Team* (2013). Para os tratamentos cujas médias apresentaram diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, foi empregado a análise de regressão para fatores quantitativos e o teste de Tukey para fatores qualitativos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito de diferentes níveis de irradiância no crescimento de segmentos nodais

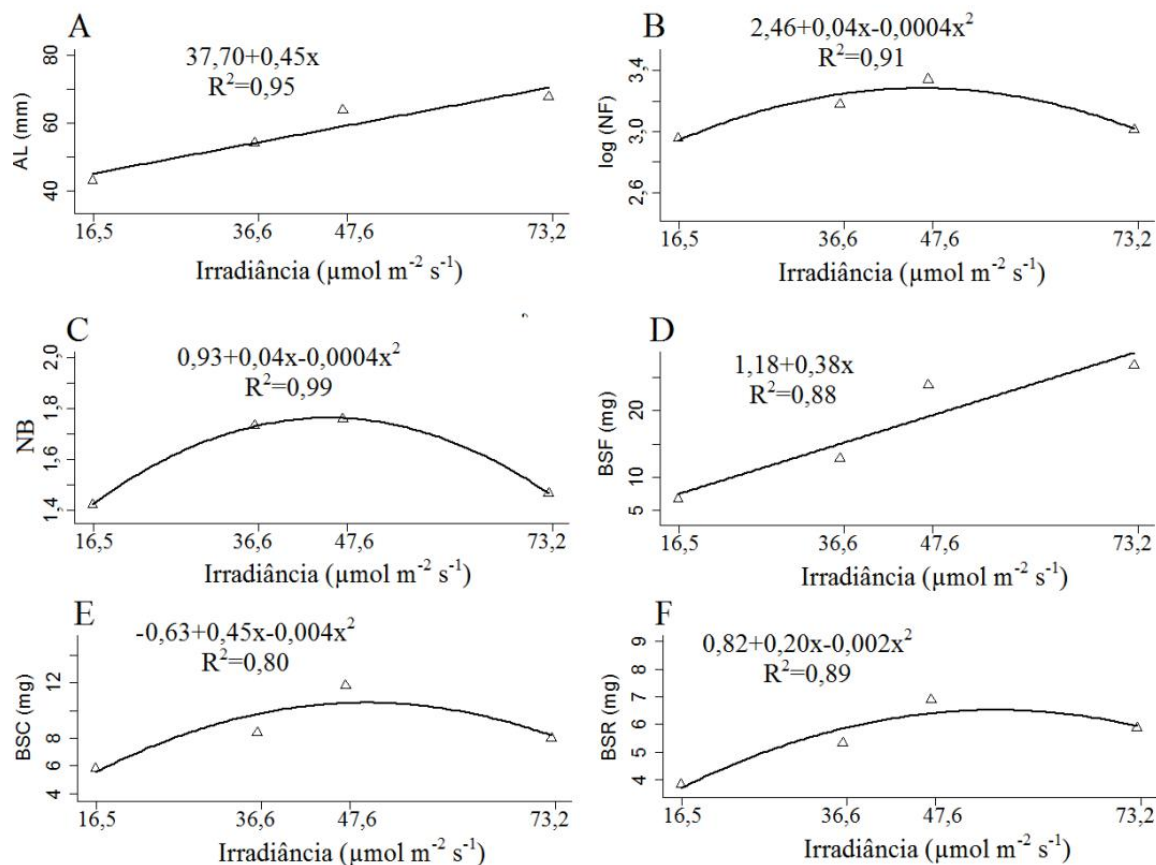
Os segmentos nodais foram inoculados em diferentes intensidades de irradiância para avaliar influência desse fator no crescimento da espécie e suas relações com os constituintes voláteis *in vitro*. O crescimento *Dysphania ambrosioides* apresentou diferenças significativas em relação às intensidades de irradiância estudadas (Figura 1 e 2). 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 (Figura 1).

A maior altura estimada foi de 70,64 mm para a irradiância de 73,2 µmol m⁻²s⁻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 µmol m⁻²s⁻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 µmol m⁻²s⁻¹ para folha, caule e raiz, respectivamente. Observou-se pelos parâmetros de crescimento que a espécie em estudo *D. ambrosioides* desenvolveu melhor em intensidades de luz altas. Estes resultados corroboram com os estudos em *Mouriri elliptica* onde melhor crescimento da plântula foi com 100 µmol m⁻²s⁻¹ (Assis *et al.*, 2016) e com *Momordica grosvenori* (Zhang *et al.*, 2009), com as espécies *Phaius tankervilleae* e *Vanda coerulea* com a intensidade de 74 µmol m⁻²s⁻¹ (Soontornchainaksaeng *et al.*, 2001).

Coelho *et al.* (2021) reportaram que a intensidade e a qualidade da luz afetaram o crescimento, as concentrações de pigmentos fotossintéticos e a atividade antioxidante em plântulas de *Urtica dioica*. A intensidade de 94 µmol m⁻² s⁻¹ levou às melhores condições de luz para a micropropagação desta espécie e para a melhor produção de massa seca de folhas *in vitro*. A espécie *Lippia rotundifolia* já teve um comportamento diferente onde as intensidades de luz mais baixas de 20 e 54 µmol m⁻² s⁻¹ promoveu mais alto crescimento, conteúdo de pigmento fotossintético e acúmulo de biomassa (de Hsie *et al.*, 2019). Este crescimento foi semelhante a espécie em estudo *D. ambrosioides*. Isto demonstra que cada espécie responde ao crescimento com diferentes intensidade de luz no cultivo *in vitro* de plântulas.

No entanto, a intensidade de luz abaixo de 47,6 µmol m⁻²s⁻¹ foi um fator limitante para o crescimento *in vitro* da espécie *Dysphania ambrosioides*. Já para a espécie *Achillea millefolium* (de La Viña *et al.*, 2001) a intensidade de 27 µmol m⁻²s⁻¹ foi a melhor para um ótimo crescimento *in vitro* da espécie. E com *Alocasia amazônica* o melhor crescimento respondeu com a intensidade de 30 µmol m⁻²s⁻¹ (Jo *et al.*, 2008) e também para a espécie *Withania somnifera* 30 µmol m⁻²s⁻¹ proporcionou o maior crescimento *in vitro* e o desenvolvimento de estômatos (Lee *et al.*, 2007).

Figura 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 *Dysphania ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de irradiância. *Variável transformada por log (Y).



Fonte: Autores.

A biomassa seca da raiz *D. ambrosioides* diminuiu com a alta intensidade de luz $73,2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Isto também foi observado com alto nível de irradiância ($80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em *Persea americana* Mill (Kristiansen *et al.*, 1999). No entanto, para a *Urtica dioica* a intensidade de $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ levou às melhores condições de luz para a melhor produção de massa seca de folhas *in vitro*.

Com base nos dados apresentados, a irradiância de $47,6$ a $73,2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 2A) foi a mais adequada para o crescimento de *D. ambrosioides*, nas condições ambientais e nutricionais estudadas. Contudo, outros estudos são necessários como redução da concentração de sacarose no meio de cultura, aumento da intensidade de irradiância com o enriquecimento de CO_2 usando sistema de membranas.

Figura 2 - Plântulas micropropagadas de *Dysphania ambrosioides* após 40 dias, repicadas em: A- diferentes intensidades de luz e B- diferentes tipos e concentrações de citocininas no meio de cultura.



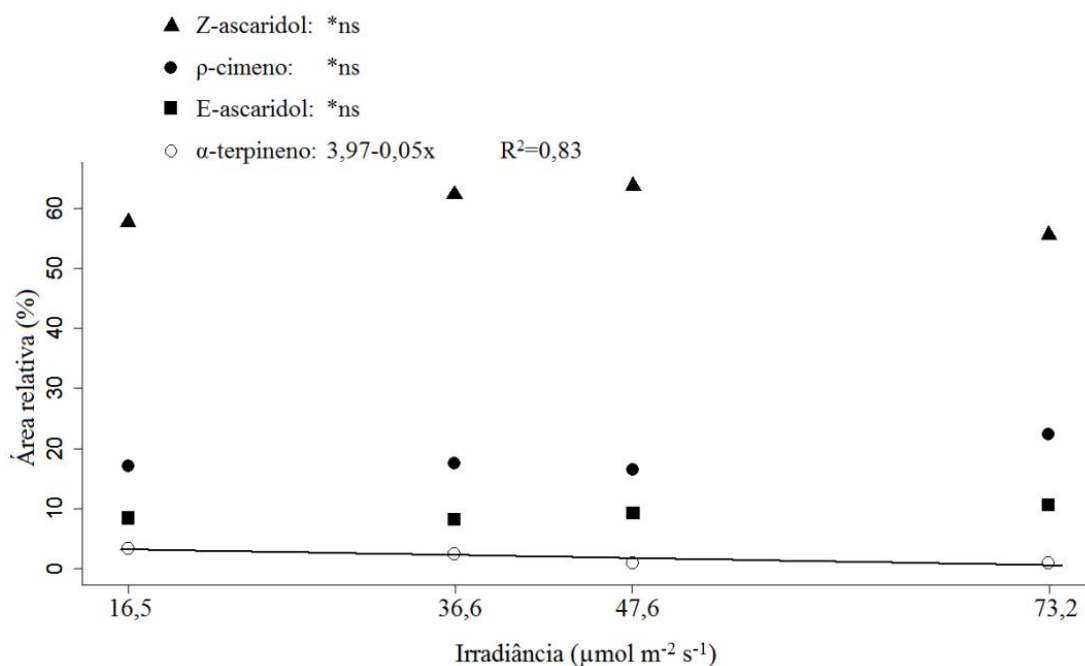
Fonte: Autores (2023).

3.2 Análise da fração volátil por HS-CG/EM sob diferentes intensidades de irradiância

A análise dos voláteis de *D. ambrosioides* sob diferentes intensidades de irradiância identificou um total de 23 constituintes. Os majoritários foram Z-ascaridol (60,0%), ρ -cimeno (18,4%), E-ascaridol (9,14%) α -terpineno (2,0%) e limoneno (0,3%) totalizando acima de 89% dos compostos. Estes resultados são semelhantes ao encontrado no óleo essencial da espécie com uma mistura de Z-ascaridol (58,38%), ρ -cimeno (16,20%), α -terpineno (9,70%), E-ascaridol (4,30%) e limoneno (3,80%) (Cavalli *et al.*, 2004).

Com relação aos principais constituintes da fração volátil de *D. ambrosioides*, os diferentes níveis de irradiância não influenciaram significativamente suas percentagens, com exceção do α -terpineno que diminuiu linearmente (Figura 3). Os constituintes ρ -cimeno e E-ascaridol, apesar de não haver diferença estatística, houve uma tendência de aumento de 24% e 21% em alta intensidade de irradiância ($73,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) respectivamente e o Z-ascaridol um aumento até a intensidade de $47,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e depois uma queda de 14% em $73,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3).

Figura 3 - Área relativa (%) de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Dysphania ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes níveis de irradiância.



Fonte: Autores (2023).

Estudos reportam que o crescimento e os compostos voláteis variam com a espécie. Rocha *et al.* (2022) reportaram que as melhores condições de iluminação para o cultivo *in vitro* de *Lippia dulcis* foram obtidas sob a maior intensidade de luz ($139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Nesta condição, o melhor crescimento, acúmulo de massa seca, maior área foliar e maior produção de 6-metil-5-hepten-2-ona e 3-metil-2-ciclohexen-1-ona foram observados. De Hsie *et al.* (2019) reportaram que diferentes intensidade de luz afetou diferentes compostos voláteis. O composto mirceno e pentadecano foram maiores sob intensidades de luz de 88 e $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Os níveis mais altos de limoneno e ocimenona foram obtidos em 20 e $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intensidade, respectivamente, e o maior teor de mircenona foi obtido a $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intensidade. Araújo *et al.* (2021) reportaram tanto a densidade do fluxo de fótons (DFF) quanto o comprimento de onda afetaram o crescimento, pigmentos sintéticos e acúmulo de compostos voláteis (VOC) em *Aeollanthus suaveolens* sob cultura *in vitro*. Uma intensidade de luz de $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi ideal para o crescimento de plântulas. Uma DFF de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ m aumentou os teores de clorofila e carotenoides. Os autores reportaram que o acúmulo de VOCs foi influenciado por DFF e qualidade espectral.

3.3 Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no crescimento de segmentos nodais

Os segmentos nodais foram inoculados em três tipos de citocininas com concentrações diversas para avaliar a influência desses reguladores no crescimento da espécie (Figura 2B) e suas relações com os constituintes voláteis *in vitro*. Para as variáveis altura de plântula e biomassa seca de caule não foram observadas interações significativas, ao contrário das demais variáveis. Maiores médias de altura de plântula e biomassa seca de caule foram obtidas em meio de cultura suplementada ou não de cinetina (Tabela 1).

Tabela 1 - Altura de plântula (AL) e biomassa seca de caule (BSC) de *Dysphania ambrosioides* cultivadas *in vitro* em função de três tipos de citocininas.

Citocininas	AL (mm)	BSC (mg)
CINETINA	70,61 a	21,65 a
BAP	27,64 b	16,95 ab
TDZ	16,95 c	14,30 b
Controle	67,45 a	15,44 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Autores.

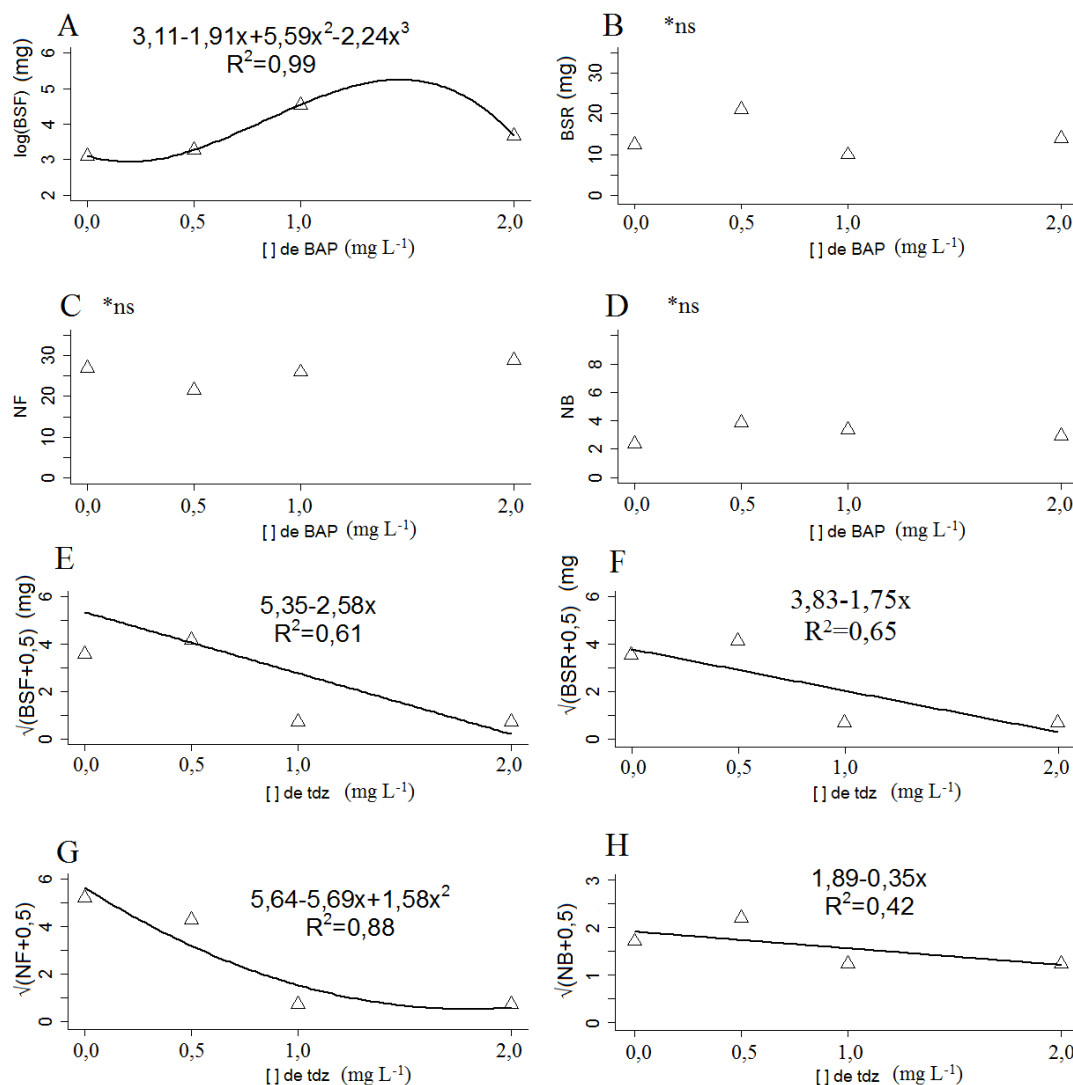
O número médio de folhas e brotos e a biomassa seca de raiz não apresentaram diferenças estatísticas em relação à adição de doses crescentes de BAP no meio de cultura. A biomassa seca de folhas foi, em média, maior na presença de 1,47 mg L⁻¹ dessa citocinina. As dosagens usadas de 0,5 até 2,0 mg/L para a multiplicação *in vitro* de *Dysphania ambrosioides* não foram adequadas. Concentrações usadas de BAP para a espécie em estudo, principalmente a concentração de 2,0 mg/L, 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).

A biomassa seca de folha e raiz e o número de brotos em relação às diferentes concentrações de TDZ foram ajustados a um polinômio de primeiro grau, enquanto 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 (Figura 4). A suplementação de TDZ de 1,0 mg/L e acima foi prejudicial para o crescimento da espécie (Figura 2 e Figura 4 E, F, G e H) apresentando uma toxicidade ao explante. TDZ é uma feniluréia usada primeiramente como desfolhante de algodão e tem sido mostrada como uma forte atividade biológica como citocinina em vários trabalhos de cultura de tecido como liberação da dormência de gemas e a formação de brotos adventícios (Visser *et al.*, 1992). Talvez uma concentração abaixo de 0,5 mg/L de TDZ poderia auxiliar na proliferação de brotos adventícios dessa espécie. Alvarenga *et al.* (2015b) utilizando as concentrações de 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 mg/L de TDZ no cultivo *in vitro* de *Achillea millefolium* mostrou que a melhor combinação (0,75 mg/L) para número, comprimento e biomassa seca de brotos.

A utilização de cinetina no meio suplementado com o regulador ocorreu que a biomassa seca de folha e de raiz e o número de folha e broto não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 2). A cinetina normalmente não auxilia na proliferação de brotos adventícios e sim no crescimento de gema em proporções com a auxina. E a mistura da cinetina com a auxina induz o início do processo de diferenciação e divisão celular e a quebra de dormência das gemas laterais (Taiz *et al.*, 2017).

Através desse estudo foi observado que à adição das citocininas BAP e TDZ prejudicaram o crescimento dos explantes e a cinetina não apresentou acréscimos significativos. Outros estudos serão necessários para combinar a melhor dose ou mesmo combinar diferentes reguladores de crescimento ao meio de cultura para auxiliar na proliferação de brotos. No entanto, pelo que foi observado no estudo dessa espécie, o uso de meio MS sem adição de reguladores de crescimento é eficiente para multiplicar através dos segmentos nodais e apicais com uma taxa de multiplicação de 8 a 10 segmentos a cada 30 dias, respectivamente (dado não publicado). Desse modo é uma verdadeira propagação assexuada e mais segura de propagar sem utilizar os reguladores de crescimento.

Figura 4 - A- Biomassa seca de folha* (BSF), B- biomassa seca de raiz* (BSR), C- número de folha* (NF) e número de broto* (NB) de *Dysphania ambrosioides* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP (A até D) e TDZ (E até H). *Variável transformada por $\sqrt{Y+0,5}$.



Fonte: Autores (2023).

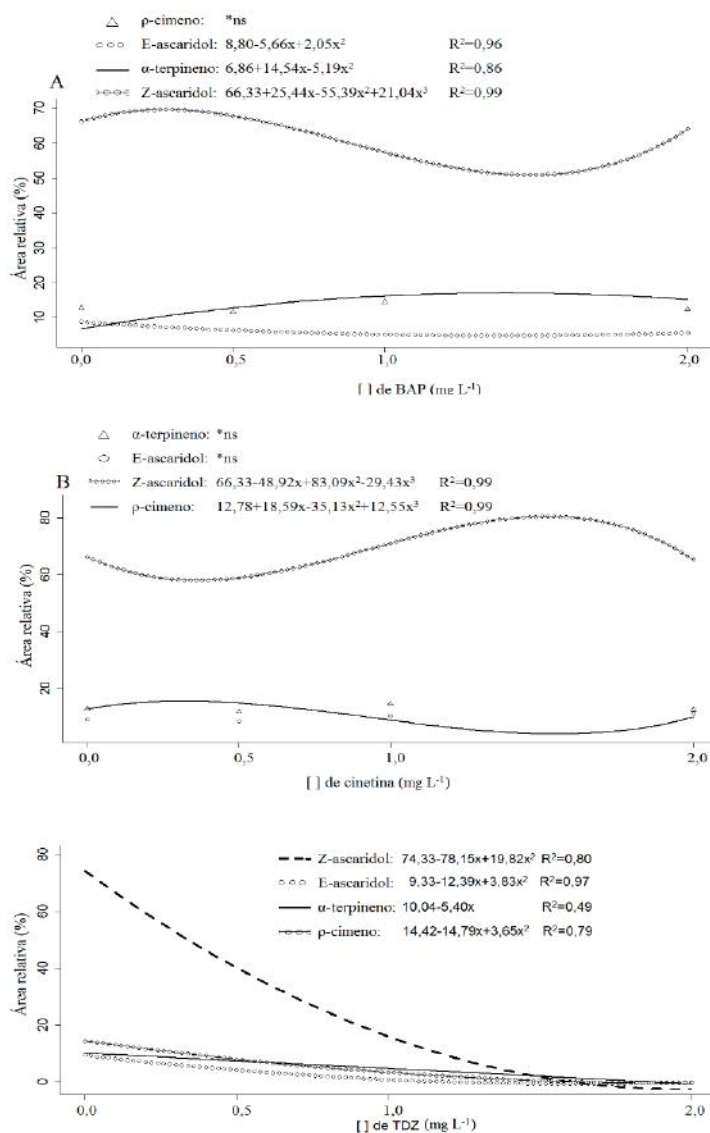
3.4 Análise da fração volátil por HS-CG/EM em diferentes tipos e concentrações de citocininas

Análise dos voláteis de *D. ambrosioides* sob diferentes tipos e concentrações de citocininas identificou um total de 31 constituintes. Os majoritários foram Z-ascaridol (64,06%), p-cimeno (12,4%), α-terpineno (11,4%), E-ascaridol (7,64%), e limoneno (0,6%) totalizando acima de 95% dos compostos.

O constituinte volátil p-cimeno não apresentou diferenças significativas em doses crescentes de BAP. Entretanto, para o Z-ascaridol, α-terpineno e o E-ascaridol as maiores porcentagens foram observadas nas concentrações de 0,27; 1,40 e 0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente. 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⁻¹ obtiveram maiores resultados. Todos os constituintes voláteis identificados apresentaram-se em porcentagens diferentes, estatisticamente, em relação à adição de concentrações crescentes de TDZ. Contudo, as maiores respostas foram observadas na ausência dessa citocinina (Figura 5). Tratamentos com concentrações crescentes TDZ, observa-se reduções nas porcentagens da área relativa dos principais

constituintes da fração volátil de *D. ambrosioides*, por não permitir o crescimento dos segmentos nodais. Estudo com *Achillea millefolium* foi observado mudanças significativas no perfil e conteúdo dos constituintes no meio suplementado com TDZ (Alvarenga *et al.*, 2015a).

Figura 5 - Área relativa (%) de picos cromatográficos dos principais constituintes da fração volátil de *Dysphania ambrosioides* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de citocininas.



Fonte: Autores (2023).

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.

Pode-se ainda observar que o meio suplementado com altas doses de BAP ocorreu à diminuição na percentagem de área relativa do Z-ascaridol resultando em incrementos no α -terpineno. Essa relação ocorreu porque o terpineno é precursor da biossíntese do ascaridol (Dembitsky *et al.*, 2008). No meio suplementado com cinetina houve um aumento de Z-ascaridol e uma diminuição do ρ -cimeno, neste caso em vez da rota seguir para terpineno estava seguindo para a biossíntese de cimeno.

4. Conclusão

Para o cultivo *in vitro* de *Dysphania ambrosioides* recomenda-se a inoculação em meio de cultura MS ou com a redução das concentrações de sais pela metade (1/2MS) 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 intensidade de irradiância e uso de citocinina afetou o conteúdo dos constituintes majoritários. Pesquisas futuras devem ser realizadas para verificar se diferentes espectros de luz alteram o crescimento e a produção de metabólitos secundários de plantas cultivadas *in vitro*.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro e pela concessão de bolsas de estudo.

Referências

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (4a ed., Vol. 456). Allured publishing corporation Carol Stream.
- Alvarenga, I. C. A., Pacheco, F. V., Silva, S. T., Bertolucci, S. K. V., & Pinto, J. E. B. P. (2015a). In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(2), 299-308.
- Alvarenga, I. C. A., Silva, S. T., Vilela Bertolucci, S. K., Brasil Pereira Pinto, J. E., & Pacheco, F. V. (2015b). Application of thidiazuron (TDZ) for “in vitro” multiplication of yarrow (*Achillea millefolium* L.) and profile of volatile compounds [Other Journal Article]. *Australian Journal of Crop Science*, 9(10), 948-953.
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., & González-Olmedo, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(1), 89-94.
- Araújo, D. X., Rocha, T. T., de Carvalho, A. A., Bertolucci, S. K. V., Medeiros, A. P. R., Ribeiro, F. N. S., Barbosa, S. M., & Pinto, J. E. B. P. (2021). Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (Catinga-de-mulata) under in vitro conditions. *Industrial Crops and Products*, 168, 113597.
- Asmar, S. A., Resende, R. F., Araruna, E. C., Morais, T. P., & Luz, J. M. Q. (2011). Citocininas na multiplicação in vitro de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13, 533-538.
- Assis, E. S. d., Neto, A. R., de Lima, L. R., Silva, F. G., Rosa, M., Filho, S. C. V., & Silva Leite, M. (2016). “In vitro” culture of “*Mouriri elliptica*” (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior [Other Journal Article]. *Australian Journal of Crop Science*, 10(2), 229-236.
- Cavalli, J.-F., Tomi, F., Bernardini, A.-F., & Casanova, J. (2004). Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochemical Analysis*, 15(5), 275-279.
- Coelho, A. D., de Souza, C. K., Bertolucci, S. K. V., de Carvalho, A. A., Santos, G. C., de Oliveira, T., Marques, E. A., Salimena, J. P., & Pinto, J. E. B. P. (2021). Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 145(1), 59-74.
- Costa, M., & Tavares, E. (2006). Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L.(Chenopodiaceae) – erva-de-Santa Maria. *Rev Bras Pl Med*, 8(3), 63-71.
- da Silva, G. M., Mohamed, A., de Carvalho, A. A., Pinto, J. E. B. P., Braga, F. C., de Pádua, R. M., Kreis, W., & Bertolucci, S. K. V. (2022). Influence of the wavelength and intensity of LED lights and cytokinins on the growth rate and the concentration of total cardenolides in *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva and M. Silva) Hinz cultivated in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(1), 93-105.
- de Hsie, B. S., Bueno, A. I. S., Bertolucci, S. K. V., de Carvalho, A. A., da Cunha, S. H. B., Martins, E. R., & Pinto, J. E. B. P. (2019). Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 198, 111577.
- de La Viña, G., Barceló-Muñoz, A., & Pliego-Alfaro, F. (2001). Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(3), 229-237.
- Debnath, M., Malik, C. P., & Bisen, P. S. (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(1), 33-49.
- Dembitsky, V., Shkrob, I., & Hanus, L. O. (2008). Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 152(2), 209-215.
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A. (2011). Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. *Revista da Estatística da Universidade Federal de Ouro Preto*, 1(1), 1-9.

- García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. D. S. (2010). Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37(3), 5-30.
- Jo, E.-A., Tewari, R. K., Hahn, E.-J., & Paek, K.-Y. (2008). Effect of photoperiod and light intensity on in vitro propagation of *Alocasia amazonica*. *Plant Biotechnology Reports*, 2(3), 207-212.
- Kristiansen, K., Ørnstrup, H., & Brandt, K. (1999). In vitro PPF and media composition affect both in and ex vitro performance of *Alstroemeria Butterfly*-hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56(3), 145-153.
- Lazzarini, L. E. S., Bertolucci, S. K. V., Pacheco, F. V., dos Santos, J., Silva, S. T., de Carvalho, A. A., & Pinto, J. E. B. P. (2018). Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135(3), 367-379.
- Lee, S.-H., Tewari, R., Hahn, E.-J., & Paek, K.-Y. (2007). 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*, 90(2), 141-151.
- Morais, T., Luz, J., Silva, S., Resende, R., & Silva, A. (2012). Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(1), 110-121.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- NIST. (2008). *SPEECH GROUP WEBSITE. Topic detection and tracking evaluation*. Retrieved 16 Dezembro 2022 from
- R Development Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. *Vienna: R Foundation for Statistical Computing*.
- Rao, R. S., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153.
- Rocha, T. T., Araújo, D. X., de Carvalho, A. A., Germano, C. M., de Fátima Santos, M., Lameira, O. A., Bertolucci, S. K. V., & Pinto, J. E. B. P. (2022). In vitro culture of *Lippia dulcis* (Trev.): light intensity and wavelength effects on growth, antioxidant defense, and volatile compound production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 58(4), 636-652.
- Sáez, P. L., Bravo, L. A., Latsague, M. I., Toneatti, M. J., Sánchez-Olate, M., & Ríos, D. G. (2013). Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. *Plant Science*, 201-202, 12-24.
- Soontornchainaksaeng, P., Chaicharoen, S., Sirijuntarut, M., & Kruatrachue, M. (2001). In vitro studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L'Herit.) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. *Science Asia*, 27(4), 233-237.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora.
- Verissimo, L. F., Bacchi, A. D., Zaminelli, T., Paula, G. H. O. d., & Moreira, E. G. (2011). Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6), 1163-1171.
- Visser, C., Qureshi, J. A., Gill, R., & Saxena, P. K. (1992). Morphoregulatory role of thidiazuron 1: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiology*, 99(4), 1704-1707.
- Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X., & Xiao, Y. (2009). Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. *HortScience horts*, 44(3), 757-763.