

Fontes de luz e composição do meio de cultura no estabelecimento *in vitro* de chia (*Salvia hispanica* L.)

Light sources and composition of the culture medium in the *in vitro* establishment of chia (*Salvia hispanica* L.)

Fuentes de luz y composición del medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de chía (*Salvia hispanica* L.)

Recebido: 29/09/2020 | Revisado: 08/10/2020 | Aceito: 14/10/2020 | Publicado: 16/10/2020

Adilson Ricken Schuelter

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5545-7601>

Faculdade Educacional de Medianeira, Brasil

E-mail: adilson_schuelter@yahoo.com.br

Claudio Bellon

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3407-3171>

Centro Universitário Dinâmica das Cataratas, Brasil

E-mail: claudio.bellon@hotmail.com

Matheus Canonica

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0997-611X>

Faculdade Educacional de Medianeira, Brasil

E-mail: canonica@outlook.com.br

Suzana Stefanello

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7744-0192>

Universidade Federal do Paraná, Brasil

E-mail: sstefanello@ufpr.br

Rosane dos Santos Grignet

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3554-4257>

Centro Universitário Dinâmica das Cataratas, Brasil

E-mail: rogrignet@gmail.com

Debora Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6751-9179>

Faculdade Educacional de Medianeira, Brasil

E-mail: deboraps.smi@gmail.com

Resumo

O objetivo do trabalho foi estudar a germinação *in vitro* de chia em diferentes fontes de luz e concentrações de sais e a regeneração com reguladores de crescimento. Testou-se a desinfestação superficial das sementes com álcool 70% em diferentes tempos de imersão antes da lavagem com hipoclorito de sódio (1%) por 20 minutos. Avaliou-se também o efeito da concentração de sais do meio de cultura MS (0, 25, 50 e 100%) e dos tipos de lâmpadas (fluorescente ou LED) sobre a germinação. Segmentos apicais obtidos do melhor tratamento na etapa de germinação *in vitro* foram utilizados para avaliar a regeneração em meio de cultura MS suplementado com ANA (0; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹) e TDZ (0; 2,5; 5,0 mg.L⁻¹). Os resultados revelaram que a imersão das sementes por 30 segundos em etanol foi mais eficiente na desinfestação. Sementes incubadas em meio de cultura contendo sais do meio de cultura MS em relação ao controle, sob diferentes fontes de iluminação, não resultou na modificação do percentual de germinação, ocorrendo, contudo, modificação no tamanho das plântulas e na matéria fresca. Em relação ao efeito de ANA e TDZ na morfogênese com lâmpadas LED, verificou-se que ANA tem um papel importante na rizogênese, enquanto o TDZ na indução e formação de pequenas brotações adventícias. Foi possível estabelecer um protocolo da desinfestação até a obtenção de brotações, utilizando lâmpadas LED, que pode ser utilizado de maneira rotineira para a micropropagação de chia.

Palavras-chave: Meio de cultura; Fontes de luz; Diodo emissor de luz; Tidiazuron.

Abstract

The goal of this work was to determine the effect of light sources, concentration of salts and growth regulators on *in vitro* germination of chia seeds. It was tested superficial cleaning with 70% ethanol submersion for different times before rinsing with 1% sodium hypochlorite for 20 minutes. The effect of the concentration of salts of the MS culture medium (0, 25, 50 and 100%) and the types of lamps (fluorescent or LED) on germination were also evaluated. Apical segments obtained from the best treatment in the *in vitro* germination stage were used to evaluate the regeneration in MS media supplemented with NAA (0, 0.5, 1.0 mg.L⁻¹) and TDZ (0, 2.5, 5.0 mg.L⁻¹). The results showed that the submersion of seeds for 30 seconds in ethanol was the most efficient treatment. Seeds incubated in growth media containing half force of MS media under different light sources did not modified the percentage of germination compared to control, but affected the plantlets size and fresh matter. The effects of NAA and TDZ on morphogenesis under LED light, showed the importance of NAA on rhizogenesis, while the TDZ induced the formation of adventitious stems. It was possible to

establish the protocol for seed cleaning and to obtain plantlets under LED light, which can be routinely used in micropropagation of chia.

Keywords: Culture medium; Light sources; Light emitting diode; Thidiazuron.

Resumen

El objetivo del trabajo fue estudiar la germinación *in vitro* de chía en diferentes fuentes de luz y concentraciones de sales y la regeneración con reguladores del crecimiento. La desinfección superficial de las semillas se probó con alcohol al 70% en diferentes tiempos de inmersión antes de lavar con hipoclorito de sodio (1%) durante 20 minutos. También se evaluó el efecto de la concentración de sales del medio de cultivo MS (0, 25, 50 y 100%) y los tipos de lámparas (fluorescentes o LED) sobre la germinación. Se utilizaron segmentos apicales obtenidos del mejor tratamiento en la etapa de germinación *in vitro* para evaluar la regeneración en medio de cultivo MS suplementado con ANA (0; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹) y TDZ (0; 2,5; 5,0 mg.L⁻¹). Los resultados revelaron que la inmersión de las semillas durante 30 segundos en etanol fue más eficiente en la desinfección. Semillas incubadas en un medio de cultivo que contenía sales del medio de cultivo MS en relación al control, bajo diferentes fuentes de iluminación, no resultaron en un cambio en el porcentaje de germinación, sin embargo sí hubo un cambio en el tamaño de las plántulas y en la materia fresca. En cuanto al efecto de ANA y TDZ sobre la morfogénesis con lámparas LED, se encontró que ANA juega un papel importante en la rizogénesis, mientras que TDZ en la inducción y formación de pequeños brotes adventicios. Se logró establecer un protocolo de desinfección hasta la obtención de los brotes, utilizando lámparas LED, que se pueden utilizar de manera rutinaria para la micropropagación de chía.

Palabras clave: El medio de cultivo; Fuentes de luz; Diodo emisor de luz; Tidiázurón.

1. Introdução

Salvia hispanica L. é uma espécie herbácea anual, originária da América Central, empregada por muitos séculos pelos povos pré-colombianos (Cahill, 2003), devido aos benefícios à saúde proporcionados pelas suas sementes (Gracieri et al., 2019), que possuem elevados teores de proteínas, fibras e ômega-3 (Ali et al., 2012), além de não conter glúten (Bueno et al., 2010).

Considerada como a nova semente de ouro deste século (Orona-Tamayo et al., 2017), a chia vem sendo incorporada cada vez mais na dieta humana (Melo et al., 2019; Dos Santos

Nascimento et al., 2020). Nos últimos anos, tanto a produção quanto o consumo da semente de chia e de seus subprodutos como óleo e farinha tem aumentado a nível mundial (López et al., 2017; Melo et al., 2019).

Com a crescente demanda por produtos com elevada qualidade nutricional, tem aumentado o interesse pelo cultivo da chia no Brasil, sendo de fundamental importância o conhecimento sobre o germoplasma disponível e o estabelecimento de estratégias para a sua conservação. A micropropagação pode ser uma alternativa viável para chia, pois apesar de ser propagada via sementes, escassas informações encontram-se na literatura sobre os fatores que limitam a germinação nessa espécie (Paiva et al., 2018), entretanto as condições de cultivo e a forma de armazenamento encontram-se diretamente relacionadas com a longevidade das sementes (Marcos Filho, 2005). Além do que, por ser uma planta de dias curtos (Jamboonsri et al., 2012; Busilacchi et al., 2013), a indução floral ocorre apenas em condições de outono/inverno do Sul do Brasil, sendo seu cultivo limitado em apenas uma época do ano.

Assim, determinar as melhores condições para a germinação e a regeneração é essencial para o sucesso da propagação *in vitro*, a qual pode ser influenciada por múltiplos fatores, dentre eles a composição do meio de cultura empregado, bem como o tipo e a concentração das substâncias reguladoras de crescimento. O Tidiazuron (TDZ) é uma fenil-ureia que exibe atividade citocinínica e tem sido eficiente na multiplicação *in vitro* de várias espécies, induzindo a organogênese em diferentes explantes (Alvarenga et al., 2015; Tsai et al., 2016; Goelzer et al., 2019; Rodrigues et al., 2019).

Além disso, os espectros de luz podem influenciar a germinação e o morfogênese das plantas, por isso é importante otimizar o sistema de iluminação para o crescimento das plantas. Lâmpadas LEDs (diodos emissores de luz) apresentam longa vida útil e economia de energia em relação às fontes de luz convencionais e já sendo testadas no crescimento *in vitro* e aclimatização *ex vitro* (Gupta & Jatothu, 2013).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de fontes de luz e da composição do meio de cultura sobre o estabelecimento *in vitro* de *Salvia hispanica* L.

2. Metodologia

As atividades de pesquisa do presente trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Sementes do Centro Universidade Dinâmica das Cataratas (UDC, Foz do Iguaçu, PR) e de Botânica da Faculdade Educacional de Medianeira (UDC Medianeira, Medianeira, PR), tendo sido adotados métodos indutivos de natureza quantitativa (Pereira et al., 2018).

2.1. Etapa I – Desinfestação de sementes

Sementes de chia foram inicialmente imersas em água estéril (Controle - 20 minutos) ou em solução de álcool 70% por 30 segundos (D2), 1 minuto (D3) ou 2 minutos (D4). Na sequência, realizou-se a imersão das sementes em hipoclorito de sódio (1%) por 20 minutos, e por último fez-se a tríplice lavagem com água estéril.

As sementes desinfestadas foram inoculadas em frascos (500 mL de capacidade) contendo 50 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹) e geleificado com ágar (6,5 g.L⁻¹). Os frascos foram incubados em BOD com temperatura de 24°C e fotoperíodo de 16 horas por dez dias, quando foi avaliado o percentual de germinação considerando a protrusão da radícula (GR) bem como a formação de plântulas completas (GP).

Além disso, realizou-se com auxílio de paquímetro, a mensuração dos comprimentos da parte aérea (CPA), da raiz primária (CR) e da plântula completa (TP) de 10 plântulas por unidade experimental. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições e tendo como unidade experimental um frasco com 20 sementes.

2.2. Etapa II – Germinação *in vitro* de sementes

Sementes foram inicialmente desinfestadas, empregando-se o melhor tratamento estabelecido na Etapa I, e na sequência inoculadas em 50 mL de meio de cultura MS, contendo diferentes concentrações de sais minerais e vitaminas (T1 - 0%, T2 - 25%, T3 - 50% e T4 - 100%). Os frascos contendo as sementes foram incubados em sala de crescimento com temperatura de 24 ± 2°C e 16 horas de fotoperíodo, variando-se o tipo de iluminação, ambas com 72 μmol m⁻².s⁻¹ de irradiância: quatro lâmpadas fluorescentes ou duas lâmpadas LEDs branca (Pulse LED®, 18W).

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial (4x2) com cinco repetições, sendo que a unidade experimental constou de um frasco com 15 sementes. Decorridos 10 dias após a instalação do experimento foram avaliados o percentual de germinação considerando a protrusão da radícula (GR) bem como a formação de plântulas completas (GP). Com a amostragem de 10 plântulas/frasco, realizou-se a determinação dos comprimentos da plântula (TP), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz primária (CR), matéria fresca (MF) e matéria seca das plântulas (MS).

2.3. Etapa III – Resposta morfo genética em chia

Segmentos apicais de plântulas germinadas *in vitro* com aproximadamente 1 cm, advindos dos melhores tratamentos das Etapas I e II, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS geleificado com ágar ($6,5 \text{ g.L}^{-1}$) e tendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O meio de cultura foi suplementado com ANA – ácido naftalenoacético (0; 0,5; 1,0 mg.L^{-1}) e TDZ - Tiazuron (0; 2,5; 5,0 mg.L^{-1}), totalizando nove tratamentos. Após a inoculação, os tubos foram incubados em sala de crescimento a temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, contendo duas lâmpadas LEDs branca (Pulse LED®, 18W).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial (concentrações de ANA e de TDZ) com 10 repetições. A unidade experimental foi constituída por um tubo de ensaio contendo um segmento apical. A proliferação de gemas axilares e/ou organogênese (cauligênese e rizogênese) foi avaliada semanalmente por um período de seis semanas (42 dias).

Os resultados obtidos nas Etapas I e II foram submetidos a análise de variância e teste de comparação de médias empregando-se o Programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

3. Resultados e Discussão

O estabelecimento da cultura asséptica de explantes que apresentam microrganismos superficiais, tem sido obtida com êxito por meio da utilização de água corrente estéril e a aplicação de agentes desinfestantes, como o etanol e o hipoclorito de sódio (Singh, 2018) que também foram verificados para sementes de chia.

Na avaliação realizada 10 dias após a desinfestação, todos os tratamentos foram eficientes para controle microbiano, contudo as sementes submetidas à assepsia com imersão em álcool por 30 segundos (D2) mostrou-se mais viável, pois não inibiu o crescimento das plântulas (Tabela 1). Nesse contexto, o tempo de exposição das células vegetais ao etanol e o surgimento de fitotoxidez tem sido extensivamente verificada em diferentes grupos de plantas (Bhojwani & Dantu, 2013; Perata et al., 1986), incluindo-se aos de sementes de *Salvia hispanica*. Assim, o aumento gradual do tempo de imersão das sementes no etanol 70%, além de ocasionar a diminuição do tamanho das plântulas, reduziu o percentual de germinação.

Tabela 1. Comparação de médias para as variáveis comprimento da raiz primária (CR), comprimento da parte aérea, (CPA), tamanho da plântula (TP), percentagem de germinação com protrusão da radícula (GR) e percentual de germinação com formação de plântula completa (GP) em chia submetida a tratamentos de desinfestação.

Tratamentos	CR (mm)	CPA (mm)	TP (mm)	GR (%)	GP (%)
D1	22,83ab	24,02a	46,85ab	68,09a	63,59a
D2	28,39a	22,59ab	50,97a	54,18a	46,77ab
D3	25,38ab	20,65ab	46,02ab	44,34a	30,34b
D4	21,39b	15,16b	36,54b	44,09a	31,69b
DMS ²	6,66	8,85	14,13	26,51	27,98

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ² Diferença Mínima Significativa para o teste de Tukey a 5% de probabilidade. D1 = imersão em água (controle), D2 = álcool 30 segundos, D3 = álcool 1 min, D4 = álcool 2 min. Fonte: Autores (2020).

Pela avaliação da suplementação de diferentes concentrações de sais do meio de cultura MS sobre a germinação *in vitro* (Tabela 2), constatou-se que não houve aumento na percentagem de germinação (GR e GP), independente da fonte de iluminação.

De acordo com George et al. (2008), a suplementação de fontes de carbono e macronutrientes ao meio de cultura promove a redução do potencial osmótico, podendo interferir no processo de absorção de água e nutrientes. Entretanto, não se detectou diferença entre os tratamentos quanto a composição meio de cultura, verificando-se que a protrusão da radícula e a exposição dos cotilédones ocorreram respectivamente, 48 horas e 72 horas após a incubação. Contudo, pode-se sugerir que a ausência de diferença entre os tratamentos possa estar associada com as características intrínsecas das células epidérmicas do revestimento de sementes maduras de chia.

O contato da água promove o rompimento dessas células epidérmicas em chia, ocorrendo a liberação de um gel transparente mucilaginoso (Ixtaina et al., 2010), e que apresenta elevada a capacidade de absorção, e que de acordo com Munhoz et al. (2012), após duas horas de hidratação, o processo de absorção esteja completo.

Com a suplementação de sais do MS no meio de cultura houve incremento das variáveis CPA, TP e MF tanto para os cultivos submetidos a iluminação com lâmpadas LED

quanto as fluorescentes (Tabela 2). Contudo, plântulas crescidas em meio de cultura MS contendo 50% e 100% dos sais minerais resultaram na formação de plântulas mais vigorosas, principalmente aquelas crescidas sob lâmpadas LED. Assim, a incubação em meio de cultura MS 100% com lâmpadas LED foi selecionada como desejável para germinação *in vitro* de *Salvia hispanica*, devido a redução do consumo de energia elétrica (Miller et al., 2019; Bernades et al., 2020), maior especificidade dos comprimentos de onda fotossinteticamente ativos, maior durabilidade das lâmpadas, além de reduzir as emissões térmicas em relação as fluorescentes, facilitando o controle da sala de crescimento (Gupta & Jatothu, 2013).

Tabela 2. Comparação de médias para o comprimento da raiz primária (CR), comprimento da parte aérea (CPA), tamanho da plântula (TP), percentagem de germinação com protrusão da radícula (GR), percentagem germinação com formação da plântula completa (GP), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) em chia submetida diferentes tipos de fontes de luz.

Fonte de Luz	Meio MS (%)	CR (mm)	CPA (mm)	TP (mm)	GR ¹ (%)	GP (%)	MF (g)	MS (g)
LED	0	68,34a	19,86b	88,2b	72,89a	52,37a	0,122b	0,012a
	25	82,03a	36,01a	118,04a	68,42a	64,42a	0,216a	0,016a
	50	68,12a	32,34a	100,47a	80,13a	70,63a	0,196a	0,018a
	100	72,35a	34,94a	107,28a	72,56a	60,48a	0,18a	0,017a
Fluorescente	0	66,45a	22,64b	89,09b	77,55a	64,22a	0,096b	0,018a
	25	77,7a	39,49a	117,19a	70,85a	66,77a	0,202a	0,022a
	50	67,2a	40,55a	107,75a	65,42a	50,92a	0,218a	0,016a
	100	70,1a	37,12a	107,22a	81,31a	73,06a	0,192a	0,022a
Média LED ²		72,7A	30,78A	103,50A	73,5A	61,97A	0,178A	0,016A
Média Fluorescente		70,78A	34,95A	105,31A	73,78A	63,74A	0,177A	0,019A

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna para cada tipo de luz indica a ausência de diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna para cada variável indica a ausência de diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade. Fonte: Autores (2020).

Segmentos apicais de plântulas, oriundas da germinação *in vitro* em meio de cultura com 100% da concentração de sais minerais sob lâmpadas LED, foram inoculadas sob

diferentes combinações de ANA e TDZ (Tabela 3, Figura 1). Detectou-se que, independente da composição do meio de cultura, houve proliferação celular na base dos explantes, sendo que nos tratamentos T4, T5 e T7, que contém ANA, e na ausência ou baixas concentrações de TDZ, há formação de raízes adventícias após uma semana de cultivo. Resultado similar foram obtidos por Marconi et al. (2013), tendo revelado também a influência do ANA combinado ou não com outra citocinina sintética, denominada de cinetina, sobre a rizogênese em chia.

Tabela 3. Efeito da combinação dos reguladores de crescimento ANA e TDZ na resposta morfo genética de segmentos apicais de plântulas de chia após 42 dias de cultivo.

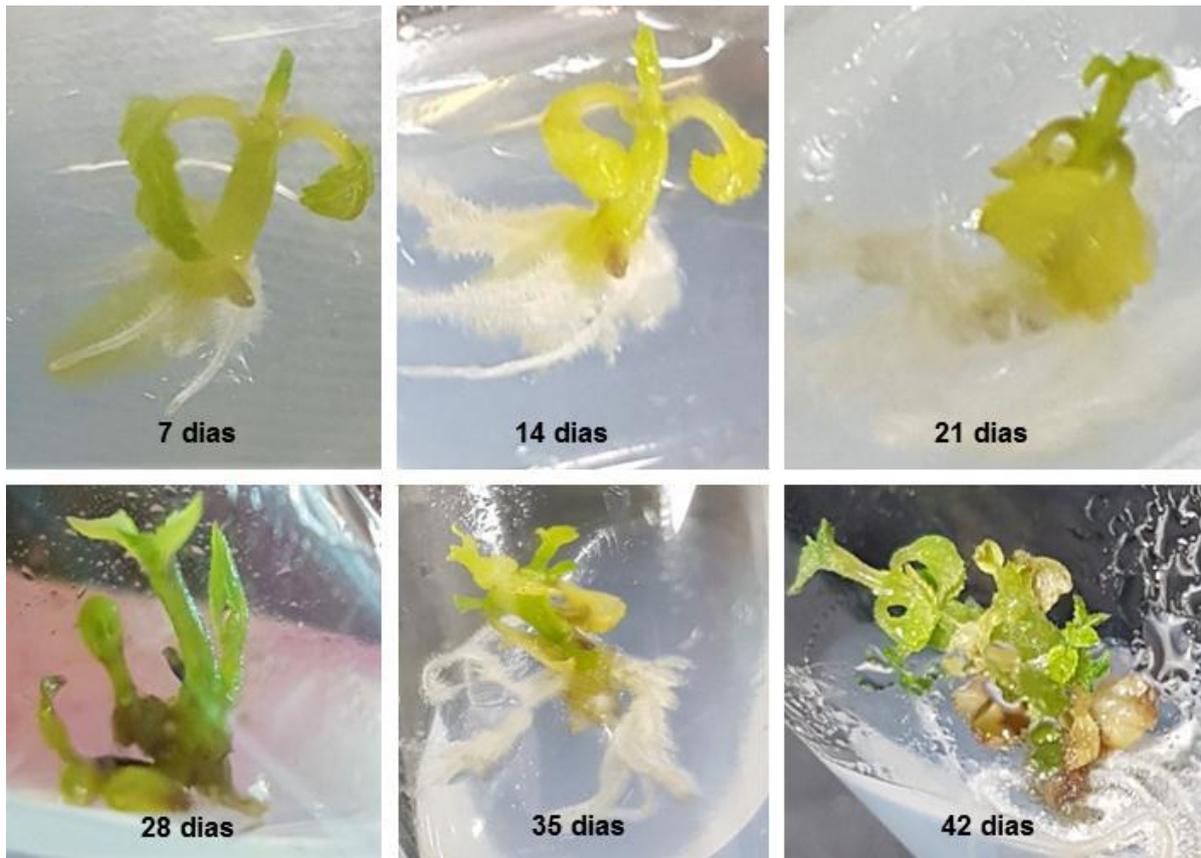
Tratamento	Combinação		Número Médio de Brotações ^{1/}		Raízes
	ANA (mg.L ⁻¹)	TDZ (mg.L ⁻¹)	Axilares	Adventícias	Adventícias
T1	0,0	0,0	-	-	-
T2	0,0	2,5	-	2,5	-
T3	0,0	5,0	-	3,2	-
T4	0,5	0,0	2,3	-	+
T5	0,5	2,5	1,7	2,2	+
T6	0,5	5,0	-	2,7	-
T7	1,0	0,0	1,3	-	+
T8	1,0	2,5	-	1,5	-
T9	1,0	5,0	-	1,8	-

^{1/} (+) = ocorrência de resposta morfo genética; (-) = ausência de resposta morfo genética Fonte: Autores (2020).

Decorridos 21 dias do momento da incubação dos explantes nos tratamentos T4, T5 e T7 (Figura 1), constatou-se também a proliferação de gemas axilares, que de acordo com Ribeiro et al. (2012), refere-se ao estímulo do crescimento de meristemas pré-existent da planta, utilizando-se como explantes, ápices meristemáticos e caulinares, gemas axilares e segmentos nodais. Zayova et al. (2016) que também estudaram a propagação *in vitro* de chia a partir de segmentos caulinares, obtiveram resultados um pouco diferentes e relataram que a proliferação direta de brotações foi dependente do tipo de citocinina utilizada, com maior número de brotações por explante em meio de cultura MS acrescido de 2 mg.L⁻¹ de BAP. Os

autores observaram também que o TDZ ($0,5$ e 1 mg.L^{-1}) não estimulou a formação direta de brotos, nem tão pouco de calos, embora tenha influenciado positivamente o crescimento após cinco semanas de cultura (Tabela 1).

Figura 1. Resposta morfo genética de segmentos apicais de plântulas de chia de germinadas *in vitro* incubados em meio de cultura MS contendo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ avaliados semanalmente até 42 dias de cultivo.



Fonte: Autores (2020).

Por outro lado, a formação de brotos por organogênese indireta ocorreu nos tratamentos onde TDZ foi utilizado individualmente ou em combinação com ANA e, nestes casos, verificou-se a formação de calos com consequente produção de gemas adventícias, que resultaram em brotações com aproximadamente 10 mm após 42 dias de cultivo (Tabela 3), seguido por um período de estagnação do crescimento caulinar. Resultados positivos para a formação de brotos com a suplementação do meio de cultura MS com TDZ foram apresentados recentemente por Rodrigues et al. (2019) na propagação *in vitro* de *Hyptis marruboides*, que pertence também a família Lamiaceae. Os autores relataram que a indução de maior número de brotos foi obtida com 1 mg.L^{-1} de TDZ, contudo o comprimento das

brotações foi maior nos tratamentos onde o TDZ estava ausente no meio de cultura e o mesmo foi suplementado com BAP. Efeito inibitório do TDZ no alongamento das brotações também foi reportado por Sharma et al. (2014) em estudos realizados com *Salvia splendens*, sendo o BAP mais efetivo do que o TDZ na regeneração de brotos, independente do explante ser segmento caulinar apical ou nodal.

Como as brotações adventícias formadas apresentavam tamanho diminuto, realizou-se a transferência para meio de cultura MS isento de reguladores do crescimento, detectando-se a alongação rápida dos explantes e o seu enraizamento. Enfim, os resultados obtidos no presente trabalho revelam a ação do TDZ na indução de organogênese indireta em *Salvia hispanica*, e confirmam o seu papel inibitório do crescimento das brotações. Deve-se ainda destacar que as lâmpadas LED empregadas se mostraram efetivas para a morfogênese de chia, e que deverão ser utilizadas em trabalhos futuros.

4. Considerações Finais

Os resultados permitiram estabelecer protocolo regenerativo para chia, incluindo-se inicialmente a obtenção de cultura asséptica associada a formação de plântulas de chia vigorosas, por meio da imersão de sementes em etanol (70%) por 30 segundos e hipoclorito de sódio (1%) por 20 minutos, seguida por tríplice lavagem. Pela avaliação da concentração de sais minerais e da fonte de iluminação, constatou-se que esses fatores não têm influência sobre a percentagem de germinação, mas a presença desses nutrientes no meio de cultura, promove o crescimento das plântulas e o maior acúmulo de massa fresca em relação ao controle. Assim, recomenda-se para germinação *in vitro* de chia, o uso de meio de cultura MS (100%) associado com a incubação sob lâmpadas LED, uma vez que essa fonte de iluminação resulta em maior economia de luz com a formação de plântulas vigorosas. Em relação a obtenção de brotações oriundas de segmentos apicais de plântulas de chia, constatou-se que TDZ combinado ou não com ANA estimula a proliferação de gemas axilares e a indução de gemas adventícias. Dessa forma, o TDZ é essencial para a formação de pequenas brotações adventícias, porém apresenta ação inibitória para a alongação, sendo necessária a repicagem para meio de cultivo isento dessa citocinina sintética.

Enfim, o protocolo laboratorial estabelecido apresenta relevância em termos de conservação do germoplasma da espécie e em auxílio aos programas de melhoramento. Entretanto, trabalhos futuros deverão ser realizados visando incrementar a eficiência do processo regenerativo por meio da combinação com diferentes reguladores visando aumentar

o número médio de brotações para serem aclimatadas.

Referências

Ali, N. M., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of Chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(171956). doi: <https://doi.org/10.1155/2012/171956>

Alvarenga, I. C. A., Silva, S. T., Vilela Bertolucci, S. K. V., Brasil Pereira Pinto, J. E., & Pacheco, F. V. (2015). Application of Thidiazuron (TDZ) for *in vitro* multiplication of yarrow (*Achillea millefolium* L.) and profile of volatile compounds. *Australian Journal of Crop Science*, 9 (10), 948-953. Retrieved from: <http://www.cropj.com>

Bernades, D. M., Celeste, W. C., & Chaves, G. D. L. D. (2020). Eficiência energética na iluminação pública urbana: revisão bibliográfica dos equipamentos e tecnologias. *Research, Society and Development*, 9(7), e606973957-e606973957. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3957>

Bhojwani, S. S. & Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text*. New Delhi, India: Springer.

Bueno, M., Di Sapio, O., Barolo, M., Villalonga, M. E., Busilacchi, H., & Severin, C. (2010). *In vitro* response of different *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) explants. *Molecular Medicinal Chemistry*, 21, 125-126. Retrieved from: <http://www.idecefyn.com.ar>

Busilacchi, H, Bueno, M., Severin, C., Di Sapio, O., Quiroga, M., & Flores, V. (2013). Evaluación de *Salvia hispanica* L. cultivada en el sur de Santa Fe (República Argentina). *Cultivos Tropicales*, 34(4), 55-59. Retrieved from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362013000400009&lng=es&tlng=en.

Cahill, J. P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Economic Botany*, 57(4), 604-618. doi: [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0604:EOCSHL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0604:EOCSHL]2.0.CO;2)

Dos Santos Nascimento, D., Oliveira, S. D., & de Oliveira, M. E. G. (2020). Caracterização físico-química e avaliação sensorial de brownies potencialmente funcionais elaborados com farinha de linhaça marrom (*Linum usitatissimum*) e farinha de chia (*Salvia hispanica* L.). *Research, Society and Development*, 9(9), e215997146-e215997146. doi: 10.33448/rsd-v9i9.XX

Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In: George, E. F. et al. (Eds). *Plant propagation by tissue culture*. (3a ed.), 65-113. Dordrecht: Springer.

Goelzer, A., Déo, T. G., Lopes, G. B., & Damiani, C. R. (2019). Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae)/Growth regulators *in vitro* multiplication of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). *Brazilian Applied Science Review*, 3(2), 1280-1291. Retrieved from: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BASR/article/view/1342/1214>

Grancieri, M., Martino, H. S. D., & Mejia, E. G. (2019). Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a source of proteins and bioactive peptides with health benefits: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 480-499. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12423>

Gupta, S. D., & Jatothu, B. (2013). Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 211-220. doi: <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>

Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W., & Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 166-174. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.006>

Jamboonsri, W., Phillips, T., Geneve, R., Cahill, J., & Hildebrand, D. (2012). Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L. - a new ω 3 source. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(2), 171-178. doi: <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9673-x>

López, A. X., Huerta, A. G., Torrez, E. C., Sangerman-Jarquín, D. M., Rosas, G. O., & Arriaga, M. R. (2017). Chia (*Salvia hispanica* L.) current situation and future trends. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(7), 1619-1631. Retrieved from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=2007093420170007&lng=en&nrm=iso

Marconi, P. L., López, M. C., De Meester, J., Bovjin, C., & Alvarez, M. A. (2013). *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus. *Biotechnologia Vegetal*, 13(4), 203-207. Retrieved from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/19003>

Marcos Filho, J. (2005). *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ.

Melo, D., Machado, T. B., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Chia seeds: an ancient grain trending in modern human diets. *Food & Function*, 10, 3068-3089. doi: <https://doi.org/10.1039/C9FO00239A>

Miler, N., Kulus, D., Woźny, A., Rymarz, D., Hajzer, M., Wierzbowski, K., Nelke, R., & Szeffs, L. (1919). Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: a study on plant quality and cost reduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 99-108. doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9939-5>

Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of food Engineering*, 108(1), 216-224. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., & Paredes-Lopez, O. (2017). Chia—The New Golden Seed for the 21st Century: Nutraceutical Properties and Technological Uses. In *Sustainable protein sources* (pp. 265-281). Academic Press.

Paiva, E. P. D., Torres, S. B., Alves, T. R. C., Sá, F. V. D. S., Leite, M. D. S., & Dombroski, J. L. D. (2018). Germinação e componentes bioquímicos de sementes de *Salvia hispanica* L. em diferentes níveis e temperaturas de salinidade. *Acta Scientiarum. Agronomia*, 40(39396). doi: 10.4025/actasciagron.v40i1.39396.

Perata, P., Alpi, A., & Loschiavo, F. (1986). Influence of ethanol on plant cells and tissues. *Journal of Plant Physiology*, 126(2-3),181-188. doi: 10.1016/S0176-1617(86)80019-0

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book].

Ribeiro, J., De Melo, N. F., De Araujo, F. P., Coelho, A. D. S., Coelho, M., & Pinto, M. (2012). Micropropagação de goiabeira, maracujazeiro, bananeira e videira. Embrapa Semiárido-Circular Técnica (INFOTECA-E).

Rodrigues, M. A., Bertolucci, S. K. V., Alvarenga, I. C. A., Silva, S. T., Carvalho, A. A., & Pinto, J. E. B. P. (2019). Cytokinins in the *in vitro* multiplication and analysis of the volatile fraction of *Hyptis marrubioides*. *Ciência Agronômica*, 50(1), 90-99. doi: 10.5935/1806-6690.20190011

Sharma, S., Shahzad, A., Kumar, J., & Anis, M. (2014). *In vitro* propagation and synseed production of scarlet salvia (*Salvia splendens*). *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 25, 359-368. doi: <https://doi.org/10.1007/s12210-014-0308-y>

Singh, C. R. (2018). Review on problems and its remedy in plant tissue culture. *Asian Journal of Biological Sciences*, 11,165-172. doi: 10.3923/ajbs.2018

Tsai, K. L., Chen, E. G., & Chen, J. T. (2016). Thidiazuron-induced efficient propagation of *Salvia miltiorrhiza* through *in vitro* organogenesis and medicinal constituents of regenerated plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(29). doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2051-0>

Zayova, E., Nikolova, M., Dimitrova, L., & Petrova, M. (2016). Comparative study of *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* propagated *Salvia hispanica* (chia) plants: morphometric analysis and antioxidant activity. *AgroLife Scientific Journal*, 5(2), 166-173. Retrieved from: <http://agrolifejournal.usamv.ro/>

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Adilson Ricken Schuelter – 30%

Claudio Bellon – 20%

Matheus Canonica – 10%

Suzana Stefanello – 20%

Rosane dos Santos Grignet – 10%

Debora Pereira – 10%