

## Cultivo in vitro de *Salvia hispanica* L.

### Cultive tissue of *Salvia hispanica* L.

Claudia Regina Baur Arfux<sup>1</sup>, Celia de Fátima Menegati<sup>2</sup>, Renata Moreira da Silva<sup>3</sup>,  
Josimara Nolasco Rondon<sup>4</sup>, Valdinez Gabriel<sup>5</sup>, Francilina Araujo Costa<sup>6</sup>, Cristiano Marcelo  
Espinola Carvalho<sup>7</sup>, Pricila Fatima de Souza<sup>8</sup>, Cristiane Bezerra da Silva<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Docente, Unigran, Dourados, MS, Brasil., <sup>2</sup>Docente, Unigran, Dourados, MS, Brasil., <sup>3</sup>Docente, Unigran, Campo Grande, MS, Brasil., <sup>4</sup>Doutor, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brasil., <sup>5</sup> Mestrando, Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Campo Grande, MS, Brasil., <sup>6</sup> Docente do curso de Agronomia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brasil., <sup>7</sup>Doutor, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brasil., <sup>8</sup> Mestranda, Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Campo Grande, MS, Brasil., <sup>9</sup> Doutor, Pesquisadora, Embrapa, Curitiba, PR.

### Resumo

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea anual originária do México que em tempos pré colombianos foi muito utilizada com finalidade alimentar e medicinal, mas durante o processo de domesticação sofreu perda de habitat devido a degradação de recursos naturais. Tem alto teor de ômega-6 e ômega-3, potentes antioxidantes, proteínas, fibra alimentar,  $\alpha$ -linolêico, muito utilizada nos tratamentos de redução de peso, e redução de colesterol e seu preço está sempre em alta (100 g de sementes custa em média R\$ 25,00). O objetivo foi avaliar a produção de plântulas de *S. hispanica* a partir de embriões em meios de cultivo com e sem sacarose. Realizou-se assepsia em 120 sementes com detergente Tween 80 por 2 minutos, imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, em álcool 70% por 2 minutos, seguido de triplo enxágüe com água destilada esterilizada. Após esse procedimento, as sementes foram colocadas em frascos de vidro com 5 mL de meio MS líquido, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol com o pH ajustado para 5,8, sem fitorregulador e sem ágar. Como controle usou-se meio de cultivo MS sem sacarose e sem ágar. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento, a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas. Cada frasco continha 30 sementes com 4 repetições. Avaliou-se a germinação e o crescimento inicial de hipocótilo e raiz das plântulas. Foram utilizadas 60 plântulas por tratamento para avaliação de medidas com régua milimetrada quanto ao comprimento caulinar e de raiz. A germinação sempre foi maior em cultivo com sacarose. Plântulas cultivadas partir de 14 dias tiveram maior crescimento da parte aérea e radicular em meio MS com sacarose. A sacarose afeta diretamente o desenvolvimento de plântulas de chia e pode comprometer o crescimento normal e promover variação somaclonal.

**Palavras-chave:** meio de cultivo, sacarose, desenvolvimento in vitro.

### Abstract

Chia (*Salvia hispanica* L.) is an annual herbaceous plant native to Mexico in pre-Columbian times was used a lot with food and medicinal purpose, but during the process of domestication suffered habitat loss due to degradation of natural resources. It has high content of omega-6 and omega-3, potent antioxidants, protein, dietary fiber,  $\alpha$ -linoleic, widely used in weight reduction treatments, and reduction of cholesterol and its price is always high (100 g seed costs on average £ 25.00). The objective was to evaluate the production of seedlings of *S. hispanica* from embryos in culture media with and without sucrose. Held at 120 seed disinfection detergent Tween 80 for 2 minutes soaking

in 1% sodium hypochlorite for 5 minutes in 70% ethanol for 2 min followed by rinsing three times with sterile distilled water. After this procedure, the seeds were placed in glass vials with 5 mL of liquid MS medium plus 30 g L<sup>-1</sup> sucrose 100 mg L<sup>-1</sup> inositol 1 pH adjusted to 5.8 without and without phytohormone agar. Was used as control MS medium without sucrose and without agar. The cultures were kept in a growth chamber at 25 ± 2 ° C under a photoperiod of 16 hours. Each vial contained 30 seeds with 4 replications. We evaluated the germination and early growth of the seedling root and hypocotyl. 60 seedlings per treatment were used for evaluation of measures with a millimeter ruler on the length of the shoot and root. Germination was always higher in cultures with sucrose. Plantlets from 14 days had higher growth of shoots and roots in MS medium with sucrose. Sucrose directly affects seedling development of chia and may impair normal growth and promote somaclonal variation.

**Keywords:** culture medium, sucrose, development in vitro

---

## 1 Introdução

A chia (*Salvia hispanica* L.) da família da menta (Labiatae) é uma planta herbácea anual originária do México que em tempos pré colombianos foi muito utilizada com finalidade alimentar e medicinal, mas durante o processo de domesticação das populações selvagens das montanhas do México e Guatemala sofreu perda de habitat devido a degradação de recursos naturais, essa espécie ficou um pouco esquecida. Atualmente desponta como uma espécie de grande potencial econômico.

As suas sementes contêm alto teor de ômega-6 e ômega-3, e uma considerável quantidade de potentes antioxidantes, proteínas, fibra alimentar,  $\alpha$ -linolêico, por isso é cultivada semestralmente (BUENO et al., 2010; DAL'MASO et al, 2013).

Por ser muito utilizada nos tratamentos de redução de peso, e redução de colesterol entre outros problemas de saúde, seu preço está sempre em alta, onde 100 g de sementes de chia chega a custar em média R\$ 25,00 no varejo.

Plantas de chia chega a atingir 1 metro de altura, flores pequenas entre 3-4 mm, coloração nas sementes de preto, cinza a preto manchado de branco, forma oval, com dimensão de 1 a 2 mm (ALI et al., 2012).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais vêm sendo largamente aplicadas não só pela possibilidade de se obter plantas mais resistentes a fatores de estresse bióticos (fusariose) e abióticos (salinidade), mas também pela rápida propagação clonal *in vitro* de plantas de novas variedades. (FONTENELE, et al, 2008).

Como não há literatura sobre cultivo *in vitro* de *S. hispanica*, esse estudo teve como objetivo avaliar a produção de microplantas e no crescimento inicial sob condições *in vitro*.

## 2 Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e ceteagro da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB – localizado no município de Campo Grande MS. O material vegetal utilizado foi sementes de *Salvia hispanica* L.

Foi realizada assepsia em 120 sementes com detergente Tween 80 por 2 minutos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, e em álcool 70% por 2 minutos, seguido de triplo enxágüe com água destilada esterilizada.

Após o procedimento de assepsia, as sementes foram colocadas em frascos de vidro transparentes de 5 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962, Souza, et al. 2014 *in press*) líquido, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de inositol com o pH ajustado para 5,8, sem fitorregulador e sem ágar.

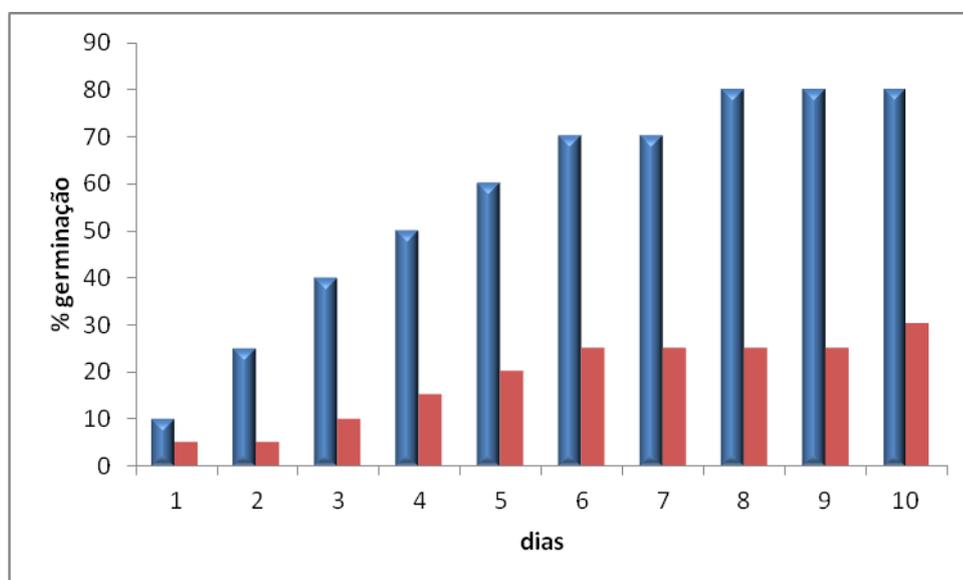
O tratamento controle consistiu de meio de cultivo MS sem sacarose e sem ágar.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cada frasco continha 30 sementes em meio de cultivo, em 4 repetições.

Os parâmetros avaliados foram a germinação e o crescimento inicial de hipocótilo e raiz das plântulas germinadas. Foram utilizadas 60 plântulas por tratamento para avaliação de medidas com régua milimetrada quanto ao comprimento caulinar e de raiz.

## Resultados

A germinação sempre foi maior em sementes cultivadas em cultivo com sacarose (figura 1).



**Figura 1.** Porcentagem de germinação de sementes de *Salvia hispanica* em meios de cultivo MS modificado. Sementes germinadas em meio de cultivo com sacarose (barra azul) e sem sacarose (barra vermelha).

Do mesmo modo, em plântulas cultivadas partir de 14 dias de cultivo *in vitro*, observou-se maior crescimento da parte aérea e radicular em meio MS com sacarose (Tabela 1).

**Tabela 1.** Crescimento do hipocótilo e de parte radicular de plântulas de *Salvia hispanica* em meio de cultivo *in vitro*. DP=desvio padrão.

hipocótilo	após 7 dias	após 14 dias	após 21 dias
trat 1	1,2b	1,7b	2,1b
trat 2	1,6b	2,8a	3,5a
DP	0,282843	0,777817	0,989949

Raiz	após 7 dias	após 14 dias	após 21 dias
trat 1	1,1c	1,8b	2,2b
trat 2	1,2c	4,5a	4,7a
DP	0,070711	1,909188	1,767767

O enovelamento observado na figura 2 mostra que a ausência de sacarose promove variação somaclonal em chia. Observou-se que a parte do hipocótilo + raiz se desenvolve primeiro que a parte aérea, na presença de sacarose. E, plântulas mantidas sem sacarose apresentam desenvolvimento rápido da parte aérea e enovelamento da parte do hipocótilo.



**Figura 2.** Morfologia de plântulas de *Salvia hispanica* cultivadas em meio MS modificado para sacarose e ausência de Agar.

A propagação *in vitro* de plantas proporciona rapidez na obtenção de mudas, praticidade e o plantio de mudas saudáveis. Apesar das vantagens desta tecnologia, muitas plantas tem restrição ao crescimento por não se conhecer as exigências dessas plantas *in vitro*.

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação-padrão, mas o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies.

Segundo Souza (2003), dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação do meio com sacarose. Porém, pode ser que ao se adicionar sacarose ao meio de cultura, consiga-se manter a plântula *in vitro* por um período de tempo maior.

A maior germinação de embriões em meio nutritivo WPM 50% deve-se, provavelmente, à diminuição do potencial osmótico promovido pela redução das concentrações de macro e micronutrientes do referido meio, que é menos concentrado, em comparação aos outros meios utilizados. O uso de ágar em meio de cultivo para *S. hispanica* mostrou o mesmo efeito quando comparado com o tratamento de meio MS sem sacarose e sem agar.

O mesmo pode ser concluído para as maiores chances de germinação de embriões, as quais foram observadas na presença de sacarose. A presença de sais e de carboidratos possivelmente interferiu na regulação osmótica do meio de cultura e, conseqüentemente, na disponibilidade de água para o processo de embebição na germinação. A ausência de sacarose no meio WPM 50% disponibilizou mais água para o explante, desencadeando o processo de protusão da radícula, devido à retomada do crescimento do embrião acionada pela embebição.

Os valores observados na germinação de sementes de murici-pequeno podem estar associados ao tegumento, o qual parece retardar o processo germinativo, ocasionando a baixa porcentagem de germinação. Esse pode ter servido como uma barreira para a entrada de água, inibindo, assim, a ativação de enzimas responsáveis pela germinação.

Azevedo (2003) obteve maiores porcentagens de germinação *in vitro* em sementes de copaíba (*Copaiba langsdorffii*) em meio de cultura MS na ausência de sacarose. Resultados semelhantes também foram obtidos em sementes de *Annona glabra* (DECETTI, 2000).

Sementes de moreira (*Maclura tinctoria*), no entanto, germinaram em maior porcentagem quando cultivadas em meios com sacarose, porém, em menores concentrações (GOMES, 1999).

## CONCLUSÃO

A sacarose afeta diretamente o desenvolvimento de plântulas de chia e pode comprometer o crescimento normal e promover variação somaclonal.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALL, NM et al. The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. **Journal of Biomedical Biotechnology**;171-956, 2012.

BUENO, M., DI SAPIO, O., BAROLO, M., VILLALONGA, M. E., BUSILACCHI, H., SEVERIN, C. *In vitro* response of different *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) explants. **Molecular Medicinal Chemistry** 21: 125-126, 2010.

DALMASO, E.G.D. et al. Salinidade na germinação e desenvolvimento inicial de sementes de chia. **Cultivando o Saber**. Cascavel, 6(3):26-39, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 183-260, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 15(3):473-497, 1962.

SOUZA, A. V. de. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica [*Lychnophora pinaster* (Mart.)]**. 2003. 126 p. Dissertação (mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.