

REGENERACIÓN *IN VITRO* DE *Salvia hispanica* L. POR ORGANOGÉNESIS

IN VITRO REGENERATION OF *Salvia hispanica* L. BY ORGANOGENESIS

José C. Crespo-Rosas¹, María Cristina G. López-Peralta^{2*}, Eleodoro Hernández-Meneses², Bartolomé Cruz-Galindo³

¹Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, ²Genética. ³Socio economía, Estadística e Informática-Economía. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (cristy@colpos.mx)

RESUMEN

La Chía (*Salvia hispanica* L.) es un cultivo con importancia económica por su contenido de proteínas y aceites con valor nutritivo para consumo humano, y se requieren técnicas para obtener semilla de alta calidad de materiales élite derivados del mejoramiento genético. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un sistema para la regeneración *in vitro* por organogénesis de tres variedades de *S. hispanica*. Los experimentos se establecieron en diseños completamente al azar simples (germinación y enraizamiento) y en arreglo factorial (inducción y multiplicación de brotes). Las semillas se desinfectaron en solución de hipoclorito de sodio (15% v/v) + Tween®20 (0.5% v/v) por 20 min. La germinación se logró después de 2 semanas en medio MS, con 50% de concentración de sales. La organogénesis se inició con el cultivo de ápices de brote, yemas axilares y segmentos de tallo de plántulas germinadas *in vitro* en medio MS, con 50% de la concentración de sales y dosis equimolares de cinetina y bencilaminopurina (BAP, 2.5-15 μ M). La inducción y multiplicación de brotes se obtuvo con 5 μ M de cinetina a las cuatro semanas; se indujeron 16.3, 14.9 y 10.5 brotes por explante de las variedades "Blanca 54", "Negra 59" y "Pinta". En la multiplicación se formaron 28.6, 28.5 y 23.3 brotes en "Pinta", "Blanca 54" y "Negra 59". El enraizamiento de brotes de 2.5 cm de longitud fue efectivo en medio MS con 50% de concentración de sales y 0.57 μ M de ácido indolacético (AIA) después de dos semanas. La aclimatación de plántulas fue 70% en la variedad "Negra 59" y "Blanca 54" y 80% en "Pinta" en mezcla de turba y perlita (1:1) fertilizadas con solución Steiner 50%.

Palabras clave: regeneración, chía, *Salvia hispanica*, micropropagación, morfogénesis.

ABSTRACT

Chia (*Salvia hispanica* L.) is a crop with economic importance for its content of proteins and oils with nutritional value for human consumption. Techniques are required to obtain high quality seed from elite materials derived from genetic improvement. The objective of this research was to develop a system for *in vitro* regeneration by organogenesis of three varieties of *S. hispanica*. The experiments were established with single (germination and rooting) and factorial arrangement (shoot induction and multiplication) in completely random designs. Seeds were disinfected in sodium hypochlorite solution (15% v/v) + Tween®20 (0.5% v/v) for 20 minutes. Germination was achieved after 2 weeks in MS medium with 50% salt concentration. The organogenesis was initiated with the cultivation of apical buds, axillary buds and stem segments of seedlings germinated *in vitro* in MS medium with 50% of the concentration of salts and equimolar doses of kinetin and benzylaminopurine (BAP, 2.5-15 μ M). Induction and multiplication of buds were obtained with 5 μ M of kinetin at four weeks; 16.3, 14.9 and 10.5 buds were induced per explant of the "Blanca 54", "Negra 59" and "Pinta" varieties. In the multiplication, 28.6, 28.5 and 23.3 buds were formed in "Pinta", "Blanca 54" and "Negra 59", respectively. The rooting of 2.5 cm long buds was effective in MS medium with 50% salt concentration and 0.57 μ M indoleacetic acid (AIA) after two weeks. The acclimatization of seedlings was 70% in "Negra 59" and "Blanca 54" varieties and 80% in "Pinta" in a mixture of peat and perlite (1:1) fertilized with 50 % Steiner solution.

Key words: regeneration, chia, *Salvia hispanica*, micropropagation, morphogenesis.

INTRODUCTION

The increasing demand for healthy, safe, nutritious and beneficial foods for human health with preventive action against diseases, has prompted the study of certain plant

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2018. Aprobado: julio, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 1221-1232. 2019.

INTRODUCCIÓN

El incremento de la demanda de alimentos sanos, inocuos, nutritivos, benéficos para la salud humana y con acción preventiva contra enfermedades ha impulsado el estudio de ciertas especies vegetales para incluirlas en la alimentación (FAO, 2014). *Salvia hispanica* L., conocida como Chía, es una de esas especies con alto contenido de proteínas y aceites, lo cual ha incrementado el interés comercial y de investigación científica para la producción de semilla. Las condiciones climáticas de México son propicias para su cultivo, y la demanda y costos de producción rentables favorecen el cultivo en los estados de Jalisco y Puebla (SIAP, 2016). La demanda actual de esta especie se debe principalmente a su contenido de ácido linoléico, entre otros compuestos (Tosco, 2004).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se han utilizado para la obtención de semillas de alta calidad (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011) y son una herramienta importante en programas de mejoramiento genético porque permiten multiplicar individuos que muestran características agronómicas de interés. En *S. hispanica* estas técnicas se han aplicado para obtener materiales con alto contenido de ácidos grasos (Marconi *et al.*, 2013); sin embargo, la literatura acerca de la regeneración *in vitro* de *S. hispanica* es limitada (Zayova *et al.*, 2016).

Las respuestas morfológicas de la chía al cultivo *in vitro* pueden ser diferentes aun entre variedades o genotipos sobresalientes. Por ello, el objetivo de esta investigación fue estudiar la regeneración *in vitro* de *Salvia hispanica* por organogénesis, sistema que podría emplearse en la propagación de materiales élite derivados de un programa de mejoramiento genético para la obtención de semillas de alta calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado fueron semillas de las variedades “Blanca 54”, “Negra 59” y “Pinta” con un diámetro aproximado de 2 mm, sanas y sin presencia de daños mecánicos. Las semillas fueron donadas por su obtentor el Ing. Guillermo de Rosas, en Acatic, Jalisco, México.

Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo estuvo constituido por sales minerales y vitaminas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado

species for their inclusion in the diet (FAO, 2014). *Salvia hispanica* L., known as Chia, is a species type with high protein and oil contents, which has increased commercial interest and scientific research for seed production. Climatic conditions in Mexico are favorable for its cultivation, and the demand and profitable production costs favor chia cultivation in Jalisco and Puebla states (SIAP, 2016). The current demand for this species is mainly due to its linoleic acid content, among other compounds (Tosco, 2004).

In vitro plant tissue culture techniques have been used to obtain high quality seeds (Pérez-Alonso and Jiménez, 2011) and are an important tool in genetic improvement programs, because they allow to multiply individuals that show agronomic characteristics of interest. In *S. hispanica*, these techniques have been applied to obtain materials with high fatty acid content (Marconi *et al.*, 2013); however, the literature on *in vitro* regeneration of *S. hispanica* is limited (Zayova *et al.*, 2016).

Chia morphogenic responses to *in vitro* culture may be different even among outstanding varieties or genotypes. Therefore, the objective of this research was to study *in vitro* regeneration of *Salvia hispanica* by organogenesis, a system that could be used in the propagation of elite materials, derived from a genetic breeding program, to obtain high quality seeds.

MATERIALS AND METHODS

The plant material used were seeds of the “Blanca 54”, “Negra 59” and “Pinta” varieties of approximately 2 mm in diameter, healthy and without the presence of mechanical damage. The seeds were donated by their breeder, Eng. Guillermo de Rosas, in Acatic, Jalisco, Mexico.

Culture medium and incubation conditions

The culture medium consisted of mineral salts and vitamins from the MS medium (Murashige & Skoog, 1962) added with sucrose (30 g L⁻¹), glycine (2 mg L⁻¹), myo-inositol (100 mg L⁻¹), nicotinic acid (0.5 mg L⁻¹), pyridoxine (0.5 mg L⁻¹), thiamine (0.1 mg L⁻¹) and solidified with agar-agar (Merck, 8.5 g L⁻¹). The pH of the medium was adjusted to 5.7 with NaOH or HCl 1N, using a potentiometer (Thermo Scientific Orion 3 Star Model). Sterilization was performed in a vertical autoclave (AESA 300) at 121 °C and 1.5 kg cm⁻² pressure for 20 min. Cultures were kept in incubation room at 26±2 °C under

con sacarosa (30 g L⁻¹), glicina (2 mg L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹), piridoxina (0.5 mg L⁻¹), tiamina (0.1 mg L⁻¹) y solidificado con agar-agar (Merck®, 8.5 g L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N con el uso de un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star). La esterilización se llevó a cabo en autoclave vertical (AESAs® 300) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min. Los cultivos se mantuvieron en cuarto de incubación a 26±2 °C en condiciones de fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad e intensidad luminosa de 45 μmol m⁻² s⁻¹.

Establecimiento del cultivo aséptico

Por disponibilidad menor de semillas de “Negra 59” la desinfección superficial se evaluó con semillas de las variedades “Blanca 54” y “Pinta”. Las semillas se lavaron con detergente comercial (Roma®) y agua de la llave durante 5 min en agitación continua y se probaron cuatro tratamientos de desinfección. Dos tratamientos consistieron en sumergir las semillas por 20 min en hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®, NaOCl; 20 y 30% v/v) + Tween®20 (0.5% v/v) disueltos en agua esterilizada. Los otros dos tratamientos fueron las mismas concentraciones de NaOCl y + Tween®20 con inmersión de 10 min en mezcla de los fungicidas Benlate® + Captan® (4 g L⁻¹ c/u). En todos los tratamientos las semillas se agitaron continuamente y se enjuagaron cinco veces con agua destilada esterilizada. Las semillas se sembraron en frascos de 45 mL de capacidad con 10 mL del medio de cultivo MS con 50% de la concentración de sales. Después de cuatro semanas se determinaron la supervivencia (%), contaminación total (%), contaminación por bacterias (%) y contaminación por hongos (%). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un frasco con cinco semillas sembradas.

Germinación *in vitro*

Las semillas de las tres variedades se sembraron en el medio MS con 50% de la concentración de sales ya que, para la germinación, las semillas requieren menor cantidad de nutrientes. A las tres semanas se cuantificaron la tasa de germinación (%), inicio y fin de la germinación (días) y altura de plántula (cm). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con diez repeticiones por variedad con cinco semillas en cada frasco como unidad experimental.

Organogénesis: inducción y multiplicación de brotes

Ápices de brote, yemas axilares y segmentos de tallo de 1 cm de longitud se disecaron de plántulas germinadas *in vitro* de 20 d

photoperiod conditions for 16/8 light/dark hours and 45 μmol m⁻² s⁻¹ of luminous intensity.

Aseptic culture establishment

Due to lower availability of “Negra 59” seeds, surface disinfection was evaluated with seeds of the “Blanca 54” and “Pinta” varieties. The seeds were washed with commercial detergent (Roma®) and tap water for 5 min in continuous agitation and four disinfection treatments were tested. Two treatments consisted of immersing the seeds for 20 minutes in commercial sodium hypochlorite (Cloralex®, NaOCl; 20 and 30% v/v) + Tween®20 (0.5% v/v) dissolved in sterile water. The other two treatments were the same concentrations of NaOCl and + Tween®20 with a 10 min immersion in a mixture of Benlate® + Captan® fungicides (4 g L⁻¹ each). Seeds were stirred continuously and rinsed five times with sterile distilled water in every treatment. The seeds were sown in 45 mL capacity flask with 10 mL of MS culture medium at 50% salt concentration. After four weeks, survival (%), total contamination (%), bacterial contamination (%) and fungal contamination (%) were determined. The experiment was established in a completely random design with 10 replicates per treatment and the experimental unit was a flask with five seeds sown.

In vitro germination

The seeds of the three varieties were sown in the MS medium with 50% of the concentration of salts, since seeds require less nutrients for germination. After three weeks, the germination rate (%), the beginning and end of germination (in days) and seedling height (cm) were quantified. The experiment was established in a completely simple random design with ten replicates per variety with five seeds in each flask as experimental unit.

Organogenesis: shoot induction and multiplication

Apical buds, axillary buds and 1 cm long stem segments were dissected from 20-day old *in vitro* germinated seedlings. The sowing was in MS medium with nitrate concentration reduced to 50%, added with eight equimolar concentrations (2.5 to 15 μM) of kinetin (CIN) and 6-Bencylamino purine (BAP), and a medium without plant growth regulators as control. After four weeks, shooting (percentage of explants that generated shoots), number of shoots per explant and length of shoots (cm) were quantified. The experiment was established in a completely random design with a 3×9 factorial arrangement (three varieties of chia and nine concentrations of plant growth regulators),

de edad. La siembra fue en medio MS, con la concentración de nitratos reducida a 50%, adicionado con ocho concentraciones equimolares (2.5 a 15 μM) de Cinetina (CIN) y 6-Bencilamino-purina (BAP) y un medio sin reguladores de crecimiento como testigo. Después de cuatro semanas se cuantificó la brotación (porcentaje de explantes que generaron brotes), número de brotes por explante y la longitud de brotes (cm). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3×9 (tres variedades de chíá y nueve concentraciones de reguladores de crecimiento), con diez repeticiones por tratamiento y dos explantes sembrados en cada frasco de cultivo como unidad experimental.

Para incrementar su cantidad, brotes de 1.5 cm de longitud se sembraron en medio MS, con la concentración de nitratos reducida al 50%, y adicionado con la concentración de citocininas (cinetina o BAP) que mejor favoreció la etapa de inducción. Después de cuatro semanas se cuantificó el número de brotes por explante y longitud de brote (cm).

Enraizamiento *in vitro*

Plántulas de 2.5 cm de longitud de las tres variedades de chíá se cultivaron en medio MS con 50% de la concentración de sales, adicionado con 0.57 μM de AIA y sin reguladores de crecimiento, después de cuatro semanas se cuantificó el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de raíz (cm). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por variedad y cuatro brotes por frasco como unidad experimental.

Aclimatación de plantas

Plantas enraizadas de 5 y 8 cm de altura de las tres variedades de chíá se trasplantaron a una mezcla de sustrato de turba+perlita (1:1), se usaron vasos de poliestireno cristal con cubierta del mismo material y la fertilización se hizo con 50% de la solución Steiner (1984). Después de cuatro semanas se cuantificó el número de hojas, la supervivencia (%) y la altura de planta (cm). El diseño fue completamente al azar con 10 repeticiones por variedad y la unidad experimental fue una planta.

Análisis estadístico

Con los datos de las variables cuantificadas se realizó un análisis de varianza con el uso del programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para comparación de medias.

with ten replicates per treatment and two explants sown in each culture flask as the experimental unit.

In order to increase their quantity, shoots of 1.5 cm in length were established in MS medium, with the concentration of nitrates reduced to 50%, and added with the concentration of cytokinins (kinetin or BAP) that best favored the induction stage. After four weeks, the number of shoots per explant and length of shoots (cm) were quantified.

In vitro rooting

Seedlings of 2.5 cm in length of the three varieties of chia were cultivated in MS medium with 50% of salts concentration, added with 0.57 μM of IAA and without plant growth regulators, and after four weeks the percentage of rooting, number of roots and length of root (cm) were quantified. The experiment was established in a completely random design with 10 repetitions per variety and four shoots per flask as experimental unit.

Plant acclimatization

Rooted plants of 5 and 8 cm in height from the three varieties of chia were transplanted to a mixture of peat + perlite substrate (1:1), polystyrene crystal glasses were used with a cover made of the same material and fertilization was done with 50% of the Steiner solution (1984). After four weeks, the number of leaves, survival (%) and plant height (cm) were quantified. The design was completely random with 10 repetitions per variety and the experimental unit was a plant.

Statistical analysis

With data of all quantified variables, an analysis of variance was carried out using the statistical program SAS (SAS Institute, 2003) and the Tukey test ($p \leq 0.05$) for means comparison.

RESULTS AND DISCUSSION

Aseptic culture establishment

After four weeks of *in vitro* sowing all disinfectant treatments prevented the growth of fungi and bacteria ($p \leq 0.05$). However, the seeds treated with fungicides showed no signs of germination, so the mixture was probably toxic. The best response for aseptic culture was achieved with 20% NaOCl, 95 and 94% survival were obtained in the “Blanca 54” and “Pinta” varieties.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo aséptico

Después de cuatro semanas de la siembra *in vitro* todos los tratamientos desinfectantes impidieron el crecimiento de hongos y bacterias ($p \leq 0.05$). Sin embargo, las semillas tratadas con fungicidas no mostraron señales de germinación por lo que probablemente la mezcla resultó tóxica. La mejor respuesta para el cultivo aséptico se logró con 20% de NaOCl, se obtuvieron 95 y 94% de supervivencia en las variedades “Blanca 54” y “Pinta”.

En un estudio comparativo de propagación *in vitro* y *ex vitro* de *S. hispanica* se observó que la germinación no tuvo problemas de contaminación; la germinación fue del 100% cuando las semillas se trataron con etanol al 70% por 30 s seguido de hipoclorito de sodio comercial (5%, ACE® Procter & Gamble Co., USA v/v) durante 5 min (Zayova *et al.*, 2016). De forma similar, Marconi *et al.* (2013) reportaron 90% de supervivencia en semillas de *S. hispanica* desinfectadas con etanol por 20 s, seguido de inmersión en NaOCl (4% activo) y 0.1% de Triton® X-100 durante 10 min. Los resultados de nuestro estudio indicaron que el hipoclorito de sodio, como único agente desinfectante, es eficiente para obtener hasta 94% semillas de chía libres de microorganismos contaminantes para su establecimiento *in vitro* cuando se tratan con 20% de NaOCl durante 20 min.

Germinación *in vitro*

La germinación *in vitro* en las tres variedades de chía inició al tercer día después de la siembra. “Blanca 54” mostró retraso de un día de diferencia comparada con las demás. Los porcentajes de germinación se comportaron de forma similar en las tres variedades (Figura 1A). En “Negra 59” se presentó el mayor porcentaje con 95%, seguido de “Blanca 54” con 93% y “Pinta” con 92%.

Las semillas usadas en esta investigación tenían 30 d de cosechadas y fueron idóneas para obtener germinación exitosa. En la evaluación del deterioro de semilla de chía, se ha reportado que el porcentaje de germinación disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento hasta ser nula después de 56 días (Buenrostro *et al.*, 2016). Por ello, es importante utilizar semillas de calidad fisiológica

In a comparative study of *in vitro* and *ex vitro* propagation of *S. hispanica*, it was observed that germination had no contamination problems. Germination reached 100% when the seeds were treated with 70% ethanol for 30 seconds followed by commercial sodium hypochlorite (5%, ACE® Procter & Gamble Co., USA v/v) for 5 minutes (Zayova *et al.*, 2016). Similarly, Marconi *et al.* (2013) reported 90% survival in *S. hispanica* seeds disinfected with ethanol for 20 s, followed by immersion in NaOCl (4% active) and 0.1% Triton® X-100 for 10 min. The results of our study indicated that sodium hypochlorite, as the sole disinfecting agent, is efficient in obtaining up to 94% chia seeds free from contaminating microorganisms for their *in vitro* establishment when treated with 20% NaOCl for 20 min.

In vitro germination

In vitro germination of the three chia varieties began on the third day after sowing. “Blanca 54” showed a one-day delay compared to the others. Germination percentages behaved similarly in the three varieties (Figure 1A). “Negra 59” had the highest percentage with 95%, followed by “Blanca 54” with 93% and “Pinta” with 92%.

The seeds used in this research had 30 d of harvest and were ideal for successful germination. In the evaluation of the deterioration of chia seed, it has been reported that the percentage of germination decreases as the storage time increases, germination drops to zero after 56 days (Buenrostro *et al.*, 2016). Therefore, it is important to use seeds of high physiological quality stored in conditions of low humidity (5-7%) and temperatures from 0 to 10 °C (Bewley *et al.*, 2013). Or else, that seeds may be from the most recent harvest coupled with pre-germinative analysis.

Organogenesis: shoot induction and multiplication

The type of explant had a significant effect on the survival rate, shooting, the number of shoots per explant and the size of shoot per explant in all three varieties ($p \leq 0.05$). The axillary bud and apical buds formed shoots in all treatments evaluated, while in the stem segments the response was null. In “Blanca



Figura 1. Regeneración *in vitro* de *Salvia hispanica* por organogénesis. (A) Germinación variedad “Pinta” después de tres días de cultivo. Inducción de brotes a partir de yemas axilares cultivadas con $5 \mu\text{M}$ de cinetina en (B) “Blanca 54”, (C) “Negra 59” y (D) “Pinta”. (E) Multiplicación de brotes en “Blanca 54”, (F) “Negra 59” y (G) “Pinta” con $5 \mu\text{M}$ de cinetina. (H) Enraizamiento de plantas “Blanca 54” en medio MS 50% sin reguladores de crecimiento y en (I) “Blanca 54” con $0.57 \mu\text{M}$ de AIA. (J) Plantas aclimatadas “Blanca 54”, (K) “Negra 59” y (L) “Pinta” después de 4 semanas.

Figure 1. *In vitro* regeneration of *Salvia hispanica* via organogenesis. (A) Germination of “Pinta” variety after three days of culture. Shoot induction from axillary buds cultivated with $5 \mu\text{M}$ of kinetin in (B) “Blanca 54”, (C) “Negra 59” and (D) “Pinta”. (E) Shoot multiplication in “Blanca 54”, (F) “Negra 59” and (G) “Pinta” with $5 \mu\text{M}$ of kinetin. (H) Rooting of “Blanca 54” plants in MS medium, 50% without plant growth regulators and in (I) “Blanca 54” with $0.57 \mu\text{M}$ of IAA. (J) Acclimatized “Blanca 54”, (K) “Negra 59” and (L) “Pinta” plants, after 4 weeks.

alta almacenadas en condiciones de humedad baja (5-7%) y temperaturas de 0 a 10 °C (Bewley *et al.*, 2013). O bien, que las semillas sean de la cosecha más reciente y se realicen análisis pre germinativos.

Organogénesis: inducción y multiplicación de brotes

El tipo de explante tuvo un efecto significativo sobre la tasa de supervivencia, brotación, el número de brotes por explante y el tamaño de los mismos en las tres variedades ($p \leq 0.05$). La yema axilar y los ápices de brote formaron brotes en todos los tratamientos evaluados mientras que en los segmentos de tallo la respuesta fue nula. En las variedades “Blanca 54” y “Pinta” el mayor número de brotes por explante se obtuvo con explantes de yema axilar, en promedio produjeron 17.4 y 12.8 brotes, respectivamente. En “Negra 59” el ápice de brote indujo un promedio mayor de brotes (15.2) (Figura 1B-D). Respecto al tamaño de los brotes, solo se observaron diferencias significativas en “Negra 59” y “Blanca 54” (Cuadro 1). Cabe mencionar que los explantes también generaron callo en su base; sin embargo, se ennegrecieron y no generaron respuesta morfogénica.

Arikat *et al.* (2004) mencionaron que en la micropropagación de salvia silvestre (*Salvia fruticosa* Mill) el mayor número de brotes (3.9) y longitud mayor de los mismos (3.3 cm) se obtuvieron con explantes nodales. Estos valores son cinco veces menores que los obtenidos en esta investigación. En *Salvia corrugata* el número mayor de brotes se alcanzó con explantes de yema apical; los segmentos de tallo produjeron callos y raíces adventicias (Bisio *et al.*, 2016). Estas respuestas fueron similares a las reportadas en *S. officinalis* L. y *S. hispanica* (Avato *et al.*, 2005; Marconi *et al.*, 2013).

En cuanto al efecto producido por las citocininas se observó que, en “Blanca 54” tanto la cinetina como la BAP indujeron la formación de brotes en los ápices de brotes y la yema axilar. El número mayor de brotes (16.3) se obtuvo con 5 μ M de cinetina, mientras que con 5 μ M de BAP el promedio fue de 11.7 brotes (Cuadro 2). Las concentraciones menores o mayores de 5 μ M de ambas citocininas produjeron número menor de brotes en las tres variedades de chí. a.

La respuesta del explante a los tratamientos fue superior a la reportada por Sharma *et al.* (2014) en *Salvia splendens* donde 5 μ M de bencilaminopurina

Cuadro 1. Respuesta *in vitro* de explantes de variedades de *Salvia hispanica* en la inducción de brotes después de cuatro semanas de cultivo.

Table 1. *In vitro* response of explants of *Salvia hispanica* varieties in the shoot induction after four weeks of culture.

Tipo de explante	Supervivencia [†] (%)	Brotación [†] (%)	Brotes [†] (núm)	Longitud [†] (cm)
“Blanca 54”				
Ápice de brote	87.7 a	100 a	13.5 b	1.3 a
Yema axilar	87.7 a	100 a	17.4 a	1.3 a
Segmento de tallo	83.2 b	0 b	0 c	0 b
“Negra 59”				
Ápice de brote	86.3 b	100 a	15.3 a	1.2 b
Yema axilar	87.1 a	100 a	14.9 b	1.3 a
Segmento de tallo	81.5 c	0 b	0 c	0 c
“Pinta”				
Ápice de brote	87.1 a	100 a	12.2 b	1.2 a
Yema axilar	87.0 a	100 a	12.8 a	1.1 b
Segmento de tallo	81.7 b	0 b	0 c	0 c

[†]Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.5$). ♦ Means with different letter indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.5$).

54” and “Pinta” varieties the highest number of shoots per explant was obtained with axillary bud explants, producing 17.4 and 12.8 shoots on average, respectively. In “Negra 59” the apical bud induced a higher average number of shoots (15.2) (Figure 1B-D). Regarding the size of the buds, significant differences were only observed in “Negra 59” and “Blanca 54” (Table 1). It is worth mentioning that the explants also generated callus at their base; however, they blackened and did not generate morphogenic response.

Arikat *et al.* (2004) mentioned that in the micropropagation of wild sage (*Salvia fruticosa* Mill), the highest number of buds (3.9) and longest length of shoots (3.3 cm) were obtained with nodal explants. These values are five times lower than those obtained in this research. In *Salvia corrugata*, the highest number of buds was reached with apical bud explants; the stem segments produced calli and adventitious roots (Bisio *et al.*, 2016). These responses were similar to those reported in *S. officinalis* L. and *S. hispanica* (Avato *et al.*, 2005; Marconi *et al.*, 2013). Regarding the effect produced by cytokinins, it was observed that, in “Blanca 54”, both kinetin and BAP

Cuadro 2. Efecto de concentraciones de citocininas en la inducción de brotes *in vitro* de tres variedades de *Salvia hispanica* después de cuatro semanas de cultivo.

Table 2. Effect of cytokinin concentrations on the *in vitro* shoot induction of three *Salvia hispanica* varieties after four weeks of culture.

Citocininas	μM	Supervivencia [‡] (%)	Brotación [‡] (%)	Brotos [‡] (Núm.)	Longitud [‡] (cm)
"Blanca 54"					
SRC	0	90.7 a	66.7 a	5.5	1.96 a
BAP	2.5	90.2 a	66.7 a	10.67 d	1.30 dc
	5	86 c	66.7 a	11.72 c	1.01 e
	10	83.6 d	66.7 a	9.33 e	0.94 e
	15	82 e	66.7 a	7.16 f	1.21 d
CIN	2.5	90.1 a	66.7 a	12.61 b	1.01 e
	5	87.4 b	66.7 a	16.33 a	1.27 cd
	10	83.9 d	66.7 a	9.55 e	1.37 c
	15	81.7 e	66.7 a	9.67 e	1.62 b
"Negra 59"					
SRC	0	89.1 a	66.7 a	8.16 f	2.04 a
BAP	2.5	88.1 b	66.7 a	12.25 c	1.60 c
	5	85.5 c	66.7 a	13.55 b	0.99 e
	10	83.6 d	66.7 a	8.86 e	1.09 d
	15	79.4 e	66.7 a	6.27 g	1.16 d
CIN	2.5	89 a	66.7 a	9.88 d	0.87 f
	5	87.6 b	66.7 a	14.94 a	0.94 ef
	10	83.5 d	66.7 a	8.88 e	1.39 c
	15	79.2 e	66.7 a	7.77 f	1.6 b
"Pinta"					
SRC	0	89.7 a	66.7 a	6.05 e	1.82 a
BAP	2.5	88 b	66.7 a	8.61 c	1.14 c
	5	86.3 c	66.7 a	10.16 ab	0.96 fg
	10	84.5 d	66.7 a	9.88 b	1.08 cde
	15	80.2 e	66.7 a	5.27 f	1.05 def
CIN	2.5	87.9 b	66.7 a	8.22 c	0.92 g
	5	87 c	66.7 a	10.58 a	0.99 efg
	10	83.8 d	66.7 a	8.57 c	1.14 cd
	15	79.8 e	66.7 a	7.67 d	1.49 b

[‡] Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.5$). SRC: Sin reguladores de crecimiento; BAP: Bencilaminopurina; CIN: Cinetina. ♦ Means with different letter indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.5$). SRC=Without growth regulators; BAP= Bencilaminopurine; CIN=kinetin.

indujeron un máximo de 15 brotes a partir de segmentos nodales. Las concentraciones de BAP y cinetina produjeron un efecto significativo en la longitud de brotes. El medio sin reguladores de crecimiento produjo brotes de longitud mayor (1.96 cm) y fueron de un tamaño menor pero más homogéneo en las concentraciones de citocininas que indujeron el mayor número de brotes por explante (Cuadro 2).

En la interacción del tipo de explante y concentración de citocininas, la mejor respuesta del número de brotes se obtuvo con explantes de yemas axilares

induced the formation of shoots in the apexes of buds and the axillary bud. The highest number of buds (16.3) was obtained with 5 μM kinetin, while with 5 μM BAP the average was 11.7 shoots (Table 2). Concentrations less than or greater than 5 μM of both cytokinins produced fewer shoots in the three chia varieties.

The explant response to treatments was superior to that reported by Sharma *et al.* (2014) in *Salvia splendens*, where 5 μM benzylaminopurine induced a maximum of 15 shoots from nodal segments.

con 5 μM de cinetina. En “Blanca 54” se obtuvieron 30 brotes por explante; 23.8 en “Negra 59” y 18 en “Pinta”.

En la etapa de multiplicación se seleccionaron brotes de 1.5 cm de longitud, los cuales se establecieron en medio MS y 5 μM de CIN. Los callos formados en la base de los brotes en la etapa de inducción se eliminaron. En la variedad “Blanca 54” el número de brotes promedio por explante se mantuvo en 28.5 (Figura 1E) seguido de “Negra 59” con 23.3 brotes (Figura 1F) y “Pinta” con 28.7 brotes (Figura 1G). Los valores de longitud de brote promedio fueron de 0.99, 1.11 y 1.16 cm en “Blanca 54”, “Negra 59” y “Pinta”, respectivamente. En esta etapa se usó la mitad de la concentración de nitratos con la finalidad de reducir la formación de raíces y callos, ya que, en los subcultivos de mantenimiento de germoplasma de chíá se observó que estas respuestas limitaron el crecimiento de brotes con la concentración completa de sales en el medio MS.

Cuenca y Amo-Marco (2000) reportaron que en la multiplicación de brotes en *Salvia blancoana* y *S. valentina* el número mayor de brotes (4.3 y 5.2 brotes para *S. blancoana* y *S. valentina*, respectivamente) se obtuvo con el medio MS y 4.6 μM de cinetina. Arikat *et al.* (2004) mencionaron que en *Salvia fruticosa* Mill la multiplicación fue óptima con 0.75 μM de BAP (3.8 brotes). En nuestro estudio el número de brotes obtenido fue ocho veces superior con la BAP pero con 5 μM . Santos-Gomes *et al.* (2002) indicaron para *Salvia officinalis* que la combinación de 0.2 μM de 2,4-D y 6.6 μM de BAP favoreció mayor número (3.2) y longitud (4.1 cm) de brotes. En otros estudios con *S. officinalis* se ha reportado que 5.0 μM de BAP resultó la concentración óptima para la multiplicación con un promedio de 15 brotes (Petrova *et al.*, 2015); dicho valor es menor de lo alcanzado en este estudio (16.3) para *Salvia hispanica*.

Enraizamiento *in vitro*

Durante las etapas de inducción y multiplicación de brotes los explantes mostraron capacidad morfogénica para generar raíces, por lo que para el enraizamiento sólo se evaluó el AIA. Los efectos producidos por el AIA en el enraizamiento resultaron significativos en las tres variedades de *S. hispanica* ($p \leq 0.05$). El enraizamiento inició al tercer día después de la siembra en el medio con 0.57 μM de AIA y a los seis días en el medio sin reguladores de crecimiento (Figura

Concentrations of BAP and kinetin produced a significant effect on the length of buds. The medium without plant growth regulators produced shoots of greater length (1.96 cm) and were smaller in size, but more homogeneous in concentrations of cytokinins that induced the greatest number of shoots per explant (Table 2).

In the interaction of explant type and cytokinin concentration, the best response in the number of shoots was obtained with axillary bud explants with 5 μM of kinetin. In “Blanca 54”, 30 shoots per explant were obtained: 23.8 in “Negra 59” and 18 in “Pinta”. In the multiplication stage, 1.5 cm long shoots were selected, which were established in MS medium and 5 μM CIN. Calli formed at the base of the shoots in the induction stage were eliminated. In the “Blanca 54” variety the average number of shoots per explant remained at 28.5 (Figure 1E) followed by “Negra 59” with 23.3 shoots (Figure 1F) and “Pinta” with 28.7 shoots (Figure 1G). The average shoot length values were 0.99, 1.11 and 1.16 cm in “Blanca 54”, “Negra 59” and “Pinta”, respectively. In this stage, half of the nitrate concentration was used to reduce the formation of roots and calli, since in the maintenance subcultures of chia germplasm, it was observed that these responses limited the growth of shoots with complete salts concentration in the MS medium.

Cuenca and Amo-Marco (2000) reported that in the multiplication of shoots in *Salvia blancoana* and *S. valentina*, the largest number of shoots (4.3 and 5.2 for *S. blancoana* and *S. valentina*, respectively) was obtained with the MS medium and 4.6 μM kinetin. Arikat *et al.* (2004) mentioned that in *Salvia fruticosa* Mill the multiplication was optimal with 0.75 μM BAP (3.8 shoots). In our study the number of shoots obtained was eight times higher with BAP but using 5 μM instead. Santos-Gomes *et al.* (2002) indicated in *Salvia officinalis* the combination of 0.2 μM 2,4-D and 6.6 μM BAP favored the greater number (3.2) and length (4.1 cm) of shoots. In other studies, in *S. officinalis* it has been reported that 5.0 μM BAP was the optimal concentration for multiplication with an average of 15 shoots (Petrova *et al.*, 2015), such a value is lower than the one reached in this study on *Salvia hispanica* (16.3).

In vitro rooting

During the stages of induction and multiplication of shoots the explants showed morphogenic capacity

1H). En “Blanca 54” se obtuvieron en promedio 16.7 raíces, 17.9 en “Negra 59” y 17.6 en “Pinta”, después de dos semanas de cultivo (Figura 1I). Los brotes cultivados sin reguladores de crecimiento solo generaron 8.5 raíces en “Blanca 54”, 10.5 en “Negra 59” y 10.3 en “Pinta”.

El AIA, además de controlar el alargamiento y la división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y la gravedad (Vega-Celedon *et al.*, 2016), también promueve la inducción de raíces por lo que su uso es frecuente en la propagación asexual de diferentes especies (Taiz *et al.*, 2015). De acuerdo con Zayova *et al.* (2016), en *Salvia hispanica* 100% de los brotes produjeron raíz en medio MS con 50% de la concentración de sales y 42.3 μM de ácido indolbutírico (AIB); la longitud promedio de las raíces fue 1.5 cm después de 14 d de cultivo. Los resultados de nuestro estudio muestran que 50% de la concentración de sales del medio MS y 0.57 μM de AIA promovieron el doble de raíces con una longitud promedio de 2.65 cm en la variedad “Blanca 54”, 2.84 cm en “Negra 59” y 3.11 cm en “Pinta”.

En *Salvia splendens* los brotes *in vitro* forman raíces en concentraciones bajas de AIB (Kabir *et al.*, 2014), pero la respuesta se inhibe cuando se superan 12.5 μM , ya que probablemente estas concentraciones resultan tóxicas para los brotes. Sharma *et al.* (2014) señalaron que el desarrollo de raíces adventicias en *S. splendens* requiere de auxinas exógenas para aumentar su tamaño; ellos reportaron que el medio MS con 50% de concentración de sales y 13.5 μM de AIA promovieron un promedio de 30.6 raíces de 5.9 cm de longitud. En nuestra investigación, los subcultivos *in vitro* de mantenimiento del germoplasma de *S. hispanica*, en medio MS con la concentración completa de sales, indujo la formación abundante de raíces y limitaba el crecimiento de los brotes. Por ello, la respuesta de enraizamiento obtenida con medio MS con 50% de concentración de sales y 0.57 μM de AIA se consideró óptima porque produjo 50% menos raíces y de menor tamaño.

Aclimatación

El tamaño óptimo de la planta enraizada para la climatización fue de 8 cm con una tasa de supervivencia de hasta 80% ($p \leq 0.05$) en las tres variedades después de 4 semanas. Con las plantas de 5 cm de altura se presentó ennegrecimiento del área foliar a los 8 días del proceso y a los 12 días las plantas no

to generate roots, therefore, only the IAA was evaluated for rooting. The effects produced by IAA on rooting were significant in the three varieties of *S. hispanica* ($p \leq 0.05$). Rooting began on the third day after established in the medium with 0.57 μM IAA, and on the sixth day in the medium without plant growth regulators (Figure 1H). In “Blanca 54” an average of 16.7 roots were obtained, 17.9 in “Negra 59” and 17.6 in “Pinta”, after two weeks of culture (Figure 1I). The shoots cultivated without plant growth regulators generated only 8.5 roots in “Blanca 54”, 10.5 in “Negra 59” and 10.3 in “Pinta”. In addition to controlling cellular lengthening and division, tissue differentiation and responses to light and gravity (Vega-Celedon *et al.*, 2016), the IAA also promotes root induction and is therefore frequently used in the asexual propagation of different species (Taiz *et al.*, 2015). According to Zayova *et al.* (2016), 100% *Salvia hispanica* shoots produced root in MS medium with 50% salt concentration and 42.3 μM indolbutyric acid (IBA); the average root length was 1.5 cm after 14 d of culture. The results of our study show that 50% of salt concentration in the MS medium and 0.57 μM IAA promoted twice the number of roots with an average length of 2.65 cm in the “Blanca 54” variety, 2.84 cm in “Negra 59” and 3.11 cm in “Pinta”.

In *Salvia splendens*, *in vitro* shoots form roots with low concentrations of IBA (Kabir *et al.*, 2014), but the response is inhibited when 12.5 μM is exceeded, as these concentrations are likely to be toxic to shoots. Sharma *et al.* (2014) pointed out that the development of adventitious roots in *S. splendens* requires exogenous auxins to increase their size; they reported that the MS medium with 50% salt concentration and 13.5 μM IAA promoted an average of 30.6 roots of 5.9 cm in length. In our research, germplasm maintenance *in vitro* subcultures of *S. hispanica* in MS medium with complete concentration of salts induced abundant root formation and limited bud growth. Therefore, the rooting response obtained with MS medium with 50% salt concentration and 0.57 μM IAA was considered optimal, since it produced 50% fewer and smaller roots.

Acclimatization

The optimal size of the rooted plant for climate control was 8 cm with a survival rate of up to 80%

sobrevivieron. El tamaño de planta resultó crítico en la aclimatación de las tres variedades de chía. Con plantas de 5 cm la supervivencia fue 20% en las variedades “Pinta” y “Blanca 54”, y 10% en “Negra 59”. Con plantas de 8 cm, la supervivencia se incrementó a 80% en la variedad “Pinta” y 70% en las otras dos variedades (Figura 1J-L).

En este estudio, los valores negativos del incremento del número de hojas en la etapa de aclimatación se debieron a la senescencia foliar. Francisco *et al.* (2011) mencionaron que la pérdida de hojas es consecuencia del estrés ocasionado por el cambio de ambiente, del frasco saturado de agua, a otro donde la humedad relativa es menor. En *S. splendens* el proceso de aclimatación fue exitoso con 80 a 90% de supervivencia de plantas enraizadas después de cuatro semanas (Kabir *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). En *S. guaranitica* se reportó 98% de aclimatación exitosa después de tres meses (Echeverrigaray *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

La regeneración por organogénesis de las variedades de *Salvia hispanica* “Blanca 54”, “Negra 59” y “Pinta” se estableció con explantes de yemas axilares disectados de plántulas germinadas *in vitro*.

La inducción y multiplicación de brotes se promovió con 5 μM de cinetina en medio MS con 50% de la concentración de nitratos; el enraizamiento de brotes se indujo con 50% de la concentración de sales del medio MS más 0.57 μM de ácido indolacético.

Agradecimientos

Al Ing. Guillermo de Rosas del Municipio de Acatic, Jalisco, México, por donar el material vegetal de las tres variedades usadas en esta investigación. Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por las instalaciones facilitadas para el desarrollo de la investigación y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca nacional otorgada.

LITERATURA CITADA

- Arikat, N. A., F. M. Jawad, N. S. Karam, and R. A. Shibli. 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia frutescens* Mill.). *Scientia Horticulturae*. 100: 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.07.006>
- Avato, P., I. M. Fortunato, C. Ruta, and R. D’Elia. 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants

($p \leq 0.05$) in all three varieties after 4 weeks. In 5 cm high plants the foliar area blackened 8 days after the process, and after 12 days all plants did not survive. Plant size was critical in the acclimatization of the three chia varieties. With 5 cm plants the survival was 20% in the “Pinta” and “Blanca 54” varieties, and 10% in “Negra 59”. With 8 cm plants, survival increased to 80% in the “Pinta” variety and 70% in the other two varieties (Figure 1J-L).

In this study, the negative values of the increase in the number of leaves in the acclimatization stage were due to foliar senescence. Francisco *et al.* (2011) mentioned that the loss of leaves is a consequence of the stress caused by the change of environment, from the water-saturated flask to another one where the relative humidity is lower. In *S. splendens*, the acclimatization process was successful with 80 to 90% survival of rooted plants after four weeks (Kabir *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). In *S. guaranitica*, 98% of successful acclimatization was reported after three months (Echeverrigaray *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS

The regeneration by organogenesis of the “Blanca 54”, “Negra 59” and “Pinta” *Salvia hispanica* varieties, was established with explants of axillary buds dissected from *in vitro* germinated seedlings. Shoot induction and multiplication was promoted with 5 μM kinetin in MS medium with 50% of nitrate concentration; bud rooting was induced with 50% of salt concentration in MS medium added with 0.57 μM indoleacetic acid.

—End of the English version—

-----*-----

- of *Salvia officinalis* L. *Plant Sci.* 169: 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.004>
- Bewley J. D., K. J. Bradford, H. W. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd Ed. Springer. New York, USA. 392 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Bisio, A., D. Fraternali, A. M. Schito, A. Parricchi, F. Dal P., D. Ricci, M. Giacomini, B. Ruffoni, and N. Tommasi. 2016. Establishment and analysis of *in vitro* biomass from *Salvia corrugata* Vahl. and evaluation of antimicrobial activity. *Phytochemistry*. 122: 276-285. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.12.017>

- Buenrostro, R. R., V. Jiménez V. y E. Martínez-Manrique. 2016. Efecto de la germinación de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre su calidad nutrimental. *Inv. Des. Cienc. y Tecnol. de Alim.* 2: 7-1.
- Cuenca, S., and J. B. Amo-Marco. 2000. *In vitro* propagation of two Spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. *In Vitro Cellular & Develop- Biol. Plant.* 36: 225-229. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0042-2>
- Echeverrigaray, S., R. P. Carrer, and A. L. Bavaresco. 2010. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53: 883-888. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400018>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2014. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/230289/> (Consulta: febrero, 2017).
- Francisco, N. J. J., A. R. Jiménez-Aparicio, A. De Jesús-Sánchez, M. L. Arenas-Ocampo, E. Ventura-Zapata y S. Evangelista-Lozano. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*. *Polibotánica.* 32: 107-117.
- Kabir, M. H., A. N. K. Mamun, P. K. Roy, M. R. Islam, M. T. Jahan, and S. U. Talukder. 2014. *In vitro* mass propagation of salvia (*Salvia splendens*) from nodal explant. *Nuclear Sci. Applic.* 23: 51-54.
- Marconi, P. L., M. C. López, J. Meester, C. Bovjin, and M. A. Álvarez. 2013. *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus. *Biotechnol. Veg.* 13: 203-207.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum.* 15: 473-493.
- Pérez-Alonso, N. y E. Jiménez. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante cultivo *in vitro*. *Biotechnol. Veg.* 11: 195-211.
- Petrova M., M. Nikolova, L. Dimitrova, and E. Zayova. 2015. Micropropagation and evaluation of flavonoid content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. *Genet. Plant Physiol.* 5: 48-60.
- Santos-Gomes, P. C., R. M. Seabra, P. B. Andrade, and M. Fernandes-Ferreira. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* 162: 981-987. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00052-3)
- SAS Institute. 2003. The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Sharma, S., A. Shahzad, J. Kumar, and M. Anis. 2014. *In vitro* propagation and synseed production of scarlet salvia (*Salvia splendens*). *Rendiconti Lincei.* 25: 359-368. <https://doi.org/10.1007/s12210-014-0308-y>
- SIAP (Sistema de información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. <https://www.gob.mx/siap/> (Consulta: agosto 2017).
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *In: Proceedings 6th International Congress on Soilles Culture.* Wageningen. The Netherlands. pp: 633-650.
- Taiz, L., E. Zeiger I., M. Moller, and A. Murphy. 2015. *Plant Physiology and Development.* 6th Ed. Sinauer Associates, Sunderland, CT. 855 p.
- Tosco, G. 2004. Los beneficios de la chía en humanos y animales. Nutrientes de la semilla de chía y su relación con los requerimientos humanos diarios. *Actual. Ornitol.* 119: 7-21.
- Vega-Celedon, P., H. Canchignia M., M. González, y M. Seeger. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3- acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Trop.* 37: 33-39.
- Zayova, E., M. Nikolova, L. Dimitrova, and M. Petrova. 2016. Comparative study of *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* propagated *Salvia hispanica* (chia) plants: morphometric analysis and antioxidant activity. *AgroLife Scient. J.* 5: 166-173.