



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Salvia hispanica* L.

JOSÉ CARLOS CRESPO ROSAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe JOSÉ CARLOS CRESPO ROSAS, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Salvia hispanica* L.

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 18 de ABRIL de 2018



Firma del
Alumno (a)



DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada "*Morfogénesis in vitro de Salvia hispanica L.*", realizada por el alumno: **José Carlos Crespo Rosas**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA _____



DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA

ASESOR _____



DR. ELEODORO HERNÁNDEZ MENESES

ASESOR _____



M.Sc. BARTOLOMÉ CRUZ GALINDO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril 2018.

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Salvia hispanica* L.

José Carlos Crespo Rosas, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La Chía (*Salvia hispanica* L.) es un cultivo de gran importancia económica por su alto contenido de proteínas y aceites de alto valor nutritivo para la alimentación humana; sin embargo se requieren técnicas que permitan obtener semilla de alta calidad. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un sistema eficiente para la morfogénesis *in vitro* vía organogénesis de tres variedades de *S. hispanica* y evaluar la viabilidad económica y financiera de su implementación. La desinfección de las semillas se hizo con hipoclorito de sodio (15% v/v) + Tween®20 (0.5% v/v) por 20 min. La germinación se logró en medio MS a la mitad de concentración de sales después de dos semanas. Para inducir la organogénesis ápices de brote, yemas axilares y segmentos de tallo de plántulas germinadas *in vitro* se cultivaron en medio MS con 50% de la concentración de nitratos adicionado con cinetina y bencilaminopurina (2.5 -15 μ M). Después de cuatro semanas, 5 μ M de Cinetina produjeron 16.3 brotes por explante para la variedad "Blanca 54", 14.9 brotes para la variedad "Negra 59" y 10.5 brotes para la variedad "Pinta". La multiplicación de brotes también resultó efectiva con 5 μ M de Cinetina; se generaron 28.5 brotes para la variedad "Blanca 54", 23.3 brotes para la variedad "Negra 59" y 28.6 brotes para la variedad "Pinta". Brotes de 2.5 cm de longitud se enraizaron en medio MS al 50% de concentración de sales adicionado con 0.57 μ M de AIA después de dos semanas. La aclimatación de plántulas de 5 y 8 cm fue de 70% para la variedad "Negra 59" y "Blanca 54" y 80% para la variedad "Pinta" en mezcla de turba y perlita (1:1) y regadas con solución Steiner 50%. El análisis financiero del proceso morfogénico descrito resultó viable económica y financieramente, con una R B/C de 1.27, con un costo por planta aclimatada de \$2.1.

Palabras clave: Organogénesis, Chía, micropropagación, económico, financiero.

In vitro MORFHOGENESIS OF *Salvia hispanica* L.

José Carlos Crespo Rosas, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The Chia (*Salvia hispanica* L.) is a crop of great economic importance for its high content of proteins and oils of high nutritional value for human diet. The great relevance of this species requires the implementation of techniques that allow obtaining high quality seed. The objective of this study was to develop an efficient system for *in vitro* morphogenesis via organogenesis of three varieties of *S. hispanica* and to evaluate the economic and financial viability of its implementation. The disinfection of the seeds was done with sodium hypochlorite (15% v / v) + Tween®20 (0.5% v / v) for 20 min. Germination was achieved in MS medium at half salt concentration after two weeks. To induce organogenesis shoot apices, axillary buds and stem segments from germinated seedlings *in vitro* were cultured in MS medium with 50% of the nitrate concentration added with kinetin and benzylaminopurine (2.5 -15 μ M). After four weeks of culture, 5 μ M of Kinetin produced 16.3 shoots per explant for variety "Blanca 54", 14.9 shoots for variety "Negra 59" and 10.5 shoots for variety "Pinta". The shoots multiplication was also effective with 5 μ M of Kinetin; 28.5 shoots were generated for variety "Blanca 54", 23.3 shoots for variety "Negra 59" and 28.6 shoots for variety "Pinta". Shoots of 2.5 cm in length were rooted in MS medium at 50% concentration of salts added with 0.57 μ M of IAA after two weeks. The acclimatization of 5 and 8 cm seedlings was 70% for the variety "Negra 59" and "Blanca 54" and 80% for variety "Pinta" in a mixture of peat and perlite (1: 1) and watered with 50% of Steiner solution. The financial analysis of the described morphogenic process was economically and financially viable, with a CBR of 1.27, with a cost per acclimatized plant of \$ 2.1.

Key Words: Organogenesis, Chia, micropropagation, economic, financial.

DEDICATORIA

A mis padres

Ángel Crespo Cruz y Telesfora Rosas Méndez, por ser mis guías y benefactores, quienes me brindaron su confianza, sustento material y espiritual, quienes me alentaron y sirvieron de ejemplo en rectitud, responsabilidad y honestidad para lograr con éxito la culminación de este trabajo.

A mis hermanos

Cesar, Rosalía, Cecilia, Angélica y Cristina porque siempre han estado a mi lado brindándome su apoyo y cariño lo que ha me ha dado el impulso para terminar mis metas.

A mi Familia, Amigos y Profesores

Por el apoyo incondicional que me brindaron cuando lo necesite y sobre todo por el cariño y la amistad que nunca me faltó.

A una persona muy especial e importante en mi vida

Mi esposa Juana Guevara; por brindarme siempre ese gran amor incondicional en mi vida que me inspira a continuar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme y protegerme en todo momento y lugar; por concederme este éxito en mi vida.

Al Colegio de Posgraduados por brindarme la oportunidad de cursar los estudios de posgrado, por el apoyo y facilidades prestadas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) quien me proporcionó el sustento económico para poder culminar mis estudios de postgrado.

A mis padres y mi familia quienes siempre me han brindado su apoyo.

A mi esposa Juana quien me alienta e inspira para continuar, por su gran amor incondicional que siempre me ha brindado.

Dra. Ma. Cristina López Peralta, muchas gracias por su asesoría, comprensión y apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

Dr. Eleodoro y M. C. Bartolomé por su paciencia, asesoría, tiempo y por compartir sus conocimientos que fueron valiosos para concluir este proceso.

A todos mis amigos y amigas quienes fueron un gran apoyo emocional durante esta estadía, y me ayudaron a cumplir esta meta.

Muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
LISTA DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problemática	2
1.2 Importancia económica	3
1.3 Importancia como cultivo en México.....	3
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
2.3 Hipótesis.....	6
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
3.1 Generalidades de la Chía	7
3.1.1 Descripción taxonómica y botánica	8
3.1.2 Características morfológicas de la Chía	9
3.1.3 Tipos de propagación en especies del género <i>Salvia</i>	11
3.1.4 Cultivo de Chía.....	11
3.1.5 Requerimientos ambientales.....	12
3.2 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	13
3.2.1 Selección y acondicionamiento de la planta madre	13
3.2.2 Establecimiento del cultivo aséptico	14
3.2.3 Desarrollo y multiplicación de brotes	14
3.2.4 Enraizamiento y aclimatación a condiciones <i>ex vitro</i>	15
3.3 Morfogénesis <i>in vitro</i>	16

3.3.1 Organogénesis	16
3.3.2 Embriogénesis somática	16
3.4 Factores que influyen en la morfogénesis <i>in vitro</i>	17
3.4.1 Medio de cultivo.....	17
3.4.2 Explante	18
3.4.3 Reguladores de crecimiento vegetal.....	18
3.4.4 Genotipo	19
3.4.5 Temperatura.....	19
3.4.6 Luz.....	19
3.4.7 Humedad.....	20
3.5 Cultivo <i>in vitro</i> de chía	20
3.6 Análisis financiero del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i>	22
3.6.1 Concepto de Costo	22
3.6.2 Eficiencia económica: Punto de equilibrio.....	23
3.6.3 Indicadores de rentabilidad.....	23
3.6.4 Procedimiento de cálculo	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Material vegetal.....	29
4.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación	30
4.3 Establecimiento del cultivo aséptico	30
4.3.1 Desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) y fungicidas	30
4.3.2 Desinfección sólo con NaOCl	31
4.3.3 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	32
4.3.4 Germinación y cinética de crecimiento	32
4.4 Inducción de brotes	33
4.4.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	34
4.5 Multiplicación de brotes	34
4.5.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	35
4.6 Enraizamiento de brotes	35

4.6.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	36
4.7 Aclimatación de plantas.....	36
4.7.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico.....	37
4.8 Análisis financiero de la propagación <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i>	37
4.8.1 Costos de producción	37
4.8.2 Ingresos.....	37
4.8.3 Eficiencia económica: Punto de equilibrio.....	38
4.8.4 Indicadores de rentabilidad.....	38
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
5.1 Establecimiento del cultivo aséptico	42
5.1.1 Desinfección con NaOCl y fungicidas.....	42
5.1.2 Desinfección sólo con NaOCl	43
5.1.3 Germinación <i>in vitro</i> y cinética de crecimiento.....	46
5.2 Inducción de brotes	50
5.3 Multiplicación de brotes	62
5.4 Enraizamiento.....	66
5.5 Aclimatación.....	68
5.6 Análisis financiero	71
5.6.1 Costos de producción	73
5.6.2 Ingresos.....	73
5.6.3 Punto de equilibrio.....	74
5.6.4 Flujo de efectivo.....	74
5.6.5 Indicadores financieros	74
VI. CONCLUSIONES.....	78
VII. RECOMENDACIONES.....	80
VIII. LITERATURA CITADA	81
IX. APÉNDICE.....	89

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) y tiempos de inmersión evaluados en la desinfección de semillas de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i>	31
Cuadro 2. Concentraciones de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) y tiempo de inmersión evaluados en la desinfección de semillas de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i>	32
Cuadro 3. Concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (CIN) evaluadas en la inducción de brotes de tres variedades de <i>Salvia hispánica</i>	34
Cuadro 4. Concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (CIN) evaluados en la multiplicación de brotes de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i>	35
Cuadro 5. Efectividad del hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial en la desinfección y supervivencia de semillas de <i>Salvia hispanica</i> Variedad Chía “Blanca 54” después de cuatro semanas de cultivo.....	44
Cuadro 6. Efectividad del hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial en la desinfección y supervivencia de semillas de <i>Salvia hispanica</i> Variedad Chía “Pinta” cultivada durante cuatro semanas.....	45
Cuadro 7. Altura de plántulas <i>in vitro</i> de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> germinadas en medio MS a la mitad de concentración de sales después de cuatro semanas de cultivo.....	50
Cuadro 8. Respuesta del tipo de explante de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> en la inducción de brotes después de cuatro semanas de cultivo.....	51
Cuadro 9. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la inducción de brotes <i>in vitro</i> de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> después de cuatro semanas de cultivo.....	53
Cuadro 10. Efecto de la interacción entre tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la inducción de brotes <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i> Variedad Chía “Blanca 54” después de cuatro semanas de cultivo.....	56
Cuadro 11. Efecto de la interacción entre el tipo explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la inducción de brotes <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i> variedad Chía “Negra 59” cultivados durante cuatro semanas.....	58
Cuadro 12. Efecto de la interacción entre tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la supervivencia, brotación y tamaño de brotes <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i> variedad Chía “Pinta” después de cuatro semanas de cultivo.....	60
Cuadro 13. Efecto del ácido indol acético (AIA) en el enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> después de dos semanas de cultivo.....	67
Cuadro 14. Análisis financiero del establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i>	72

Cuadro 15. Punto de equilibrio de la producción de planta de <i>S. hispanica</i> mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	74
Cuadro 16. Indicadores financieros de evaluación del cultivo <i>in vitro</i> de <i>S. hispanica</i>	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de tres variedades de <i>S. hispanica</i> usadas para la germinación <i>in vitro</i> . (A) Chía “Blanca 54”, (B) Chía “Negra 59” y (C) Chía “Pinta”.....	29
Figura 2. Explantes de <i>S. hispanica</i> para la inducción de brotes disecados de plantas germinadas <i>in vitro</i> de 20 días de edad. (A) Ápice de brote, (B) Yema axilar y (C) Segmento de tallo.....	33
Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología empleada en la regeneración <i>in vitro</i> de <i>S. hispanica</i> (Fases 1-5) y análisis financiero (Fase 6).	41
Figura 4. Semillas de <i>Salvia hispanica</i> Variedad Chía “Blanca 54” tratadas con NaOCl y fungicidas libres de contaminación después de cuatro semanas.	42
Figura 5. Contaminación por hongos durante el establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de <i>Salvia hispánica</i> . (A) Variedad Chía “Blanca 54” después de seis días de cultivo; (B) Variedad Chía “Pinta” a los 13 días de cultivo.....	44
Figura 6. Porcentaje de germinación de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> cultivadas en medio MS a la mitad de concentración de sales después de cuatro semanas.....	47
Figura 7. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Salvia hispanica</i> . (A) Variedad Chía “Blanca” y (B) Variedad Chía “Pinta” a los tres días después de la siembra.	47
Figura 8. Crecimiento <i>in vitro</i> de la radícula de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> germinadas en medio MS a la mitad de concentración de sales a los 20 días de cultivo.	48
Figura 9. Crecimiento <i>in vitro</i> de la parte aérea en plántulas de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> germinadas en medio MS a la mitad de concentración de sales a los 30 días de cultivo.....	49
Figura 10. Respuesta <i>in vitro</i> de segmentos de tallo en la inducción de brotes de <i>Salvia hispanica</i> (A) Explante inicial y (B) Explante después de cuatro semanas de cultivo en medio MS adicionado con 5 μ M de cinetina.....	52
Figura 11. Efecto del tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en el número de brotes <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i> Variedad Chía “Blanca 54” después de cuatro semanas de cultivo. SRC=Sin reguladores de crecimiento.....	55
Figura 12. Efecto del tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en el número de brotes <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i> variedad Chía “Negra 59” cultivados durante cuatro semanas. SRC=Sin reguladores de crecimiento.....	57
Figura 13. Efecto del tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en el número de brotes <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i> variedad Chía “Pinta” cultivados durante cuatro semanas. SRC=Sin reguladores de crecimiento.	59

Figura 14. Inducción de brotes en diferentes explantes de <i>Salvia hispanica</i> cultivados con 5 μ M de cinetina después de cuatro semanas. (A, C, E) Yema axilar y (B, D, F) Ápice de brote disecados de plántulas germinadas <i>in vitro</i> de las variedades (A, B) Chía “Blanca 54”, (C, D) Chía “Negra 59” y (E, F) Chía “Pinta”	62
Figura 15. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la multiplicación y longitud de brotes de <i>Salvia hispanica</i> variedad Chía “Blanca 54” después de cuatro semanas de cultivo.	63
Figura 16. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la multiplicación de brotes <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i> variedad Chía “Negra 59”, después de cuatro semanas de cultivo.....	64
Figura 17. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la multiplicación de brotes de <i>Salvia hispanica</i> variedad Chía “Pinta” después de cuatro semanas de cultivo.	65
Figura 18. Multiplicación de brotes de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> con 5 μ M de cinetina después de cuatro semanas de cultivo. (A) Chía “Blanca 54”, (B) Chía “Negra 59” y (C) Chía “Pinta”.	66
Figura 19. Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de <i>Salvia hispanica</i> variedad Chía “Blanca 54” después de dos semanas de cultivo. (A) Raíces formadas sin reguladores de crecimiento; (B) Raíces inducidas con 0.57 μ M de AIA.	68
Figura 20. Aclimatación de plantas de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> . (A) Variedad Chía “Blanca 54”, (B) variedad Chía “Negra 59” y (C) variedad Chía “Pinta” después de cuatro semanas de aclimatación.....	69
Figura 21. Supervivencia de plantas de tres variedades de <i>Salvia hispanica</i> obtenidas <i>in vitro</i> después de cuatro semanas de aclimatación.	70
Figura 22. Número de hojas presentes en plantas de tres variedades de <i>S. hispanica</i> después de cuatro semanas de aclimatación.	70

I. INTRODUCCIÓN

Debido al incremento del consumo de alimentos sanos, inocuos, de alto valor nutritivo, benéficos para la salud de las personas y que posean una acción preventiva contra enfermedades, se ha impulsado al estudio de distintas especies vegetales que brinden estas características al incluirlos en una alimentación diaria (FAO, 2014). La Chía (*Salvia hispanica* L.) es una de esas especies con un alto contenido de proteínas y aceites y por ello se ha incrementado el interés comercial y de investigación científica para la producción de semilla. Las condiciones climáticas de México son propicias para su cultivo; además, su alta demanda en el mercado y los bajos costos de producción, son factores importantes que favorecen su crecimiento como cultivo en los estados de Jalisco y Puebla (SIAP, 2016). Actualmente, es una especie con alta demanda debido a que contiene principalmente grandes cantidades 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 y Jiménez, 2011) y han sido una herramienta importante en programas de mejoramiento genético para multiplicar individuos que muestren características agronómicas deseables. En *S. hispanica* 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* L. es limitada (Zayova *et al.*, 2017). Es preciso señalar que al establecer un método de regeneración de plantas y propagación *in vitro* es importante hacer un análisis financiero para valorar los costos y beneficios sociales de la técnica (Pence, 2011).

Con estos antecedentes, la presente investigación tuvo la finalidad de estudiar la respuesta *in vitro* de *Salvia hispanica*, para obtener un método eficiente de regeneración y propagación *in vitro*, que podría ser empleado en su mejoramiento genético y para la obtención de semillas de alta calidad. Además, serviría para comprender el

comportamiento *in vitro* de la especie para la producción de ácidos grasos, así como determinar la viabilidad económica de la técnica de propagación *in vitro*.

1.1 Problemática

La semilla de chía es un alimento que ha cobrado gran importancia económica por sus propiedades intrínsecas. Su contenido de proteínas y aceites es mayor que otros granos, y estas características la convierten en una fuente de alimento muy atractiva para países en desarrollo (FAO, 2014). En México 1.5 millones de niños padecen de desnutrición (INSP, 2012) y la Chía puede desarrollarse para considerarla como un elemento más para combatir este problema social. En los últimos años se ha incrementado la búsqueda de fuentes vegetales subutilizadas, a partir de las cuales puedan obtenerse aceites que contengan elevada proporción de ácidos grasos de alto valor nutricional. En este sentido, las semillas de chía son una fuente interesante ya que su aceite es rico en ácidos grasos esenciales, cuya incorporación en la dieta permitiría disminuir la incidencia de enfermedades cardíacas y otras como la diabetes, síndrome metabólico, enfermedades de la piel, procesos inflamatorios, desórdenes del sistema inmunológico, cáncer, depresión, entre otros padecimientos (Gómez y Nader, 2012).

En el estado de Jalisco se ha detectado gran diversidad de germoplasma de Chía en las zonas de producción y que simplemente los productores la clasifican visualmente. Sin embargo, dentro de esta diversidad se encuentran genotipos que son valiosos por ser altamente productivos en términos de rendimiento de semilla, cantidad de proteína, contenido de aceite y adaptabilidad, por lo que pueden considerarse como variedades superiores, que se pueden aprovechar para aumentar la rentabilidad económica del cultivo. Es por ello que se busca generar un protocolo de reproducción asexual, con el fin de obtener semilla de alta calidad.

1.2 Importancia económica

La Chía en la época prehispánica fue una planta importante; sus semillas, su harina y su aceite fueron altamente apreciados por sus propiedades medicinales, alimenticias, artísticas y religiosas (Cahill, 2003). Actualmente, debido a la composición de la semilla, ha sido posible que tanto la semilla como los subproductos derivados de ella (aceite, harina, aceite microencapsulado) puedan ser incorporados a diferentes matrices alimentarias como panificación, bebidas, cereales, mezclas secas, entre otras, para dar un valor agregado (Carrillo *et al.*, 2017).

El alto valor nutricional de la semilla de chía, dado por el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, fibra, proteína y antioxidantes, ha representado una alternativa viable para incorporarlos a la dieta humana (Valenzuela y Valenzuela, 2014). Por lo que a partir de la década de 1990's comenzó a cultivarse en diferentes países como Argentina, Uruguay y México (FAO, 2014).

Con estadísticas del año 2014 se ubicó a Argentina, Paraguay y Bolivia como principales productores con el 80% de la producción mundial, seguidos por México, Nicaragua, Australia, Perú y Ecuador. Las exportaciones mundiales sumaron 36,300 toneladas y U\$S 142.7 millones. Las cifras del año 2014 sitúan a Bolivia, Paraguay y Argentina como los productores de más de dos tercios de las exportaciones mundiales. Entre los años 2011 y 2014 el volumen de exportaciones creció siete veces, registrando una tasa de crecimiento promedio anual de 94%. Las importaciones para el año 2014 reflejaron que los principales compradores son Estados Unidos (53%) y la Unión Europea (17%) (ACEE, 2014).

1.3 Importancia como cultivo en México

La Chía, se cultiva en México desde tiempos prehispánicos al formar parte de la dieta en esa época (Hernández y Miranda, 2008); sin embargo, en la época colonial disminuyó la superficie sembrada rápidamente. Fue hasta la década de 1990 que se

retomó el interés por este cultivo y no solo a nivel nacional sino también a nivel internacional. Sus características nutricionales sobresalientes y su capacidad de adaptación favorecieron rápidamente su propagación a nivel mundial (Hernández y Miranda, 2008).

En México, para el año 2016 se reportó una superficie cosechada de 5,555 ha, con una producción de 3,567 t. El principal productor fue el estado de Jalisco con una superficie cosechada de 4,734 ha y una producción total de 2,940 t., lo que representó 85 % de la producción nacional. En segundo lugar, se ubicó el estado de Puebla, con una superficie sembrada de 373 ha, pero con una producción de 287 t. (SIAP, 2016). El rendimiento promedio nacional se ubica en 0.64 t ha⁻¹ que es 20 kg mayor al rendimiento de Jalisco; por su parte el estado de Puebla tiene un rendimiento promedio de 0.77 t ha⁻¹ que es 130 kg mayor al nacional (SIAP, 2016). Estas diferencias probablemente se deban al manejo del cultivo y a que la Chía es un cultivo que alcanza su óptimo desarrollo en zonas de clima templado (Cahill, 2003).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

- Desarrollar un sistema eficiente para la morfogénesis *in vitro* (organogénesis) de tres variedades élite de *Salvia hispanica* (Chía) cultivadas en diferentes zonas productoras de Jalisco.
- Evaluar la rentabilidad financiera (Costo-Beneficio) de la producción de plantas de *Salvia hispanica* con el uso de las Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un procedimiento de desinfección de semillas efectivo para establecer el cultivo aséptico de tres variedades de chía.
- Evaluar la capacidad morfogénica *in vitro* de diferentes tipos de explantes de tres variedades de chía.
- Determinar las condiciones de medio de cultivo y de reguladores de crecimiento óptimas para la inducción y multiplicación de brotes de tres variedades de Chía vía organogénesis.
- Definir las condiciones de medio de cultivo y de reguladores de crecimiento óptimas para el enraizamiento de plantas de variedades élite de Chía.
- Establecer los requerimientos de aclimatación de plantas *in vitro* a condiciones de invernadero.
- Evaluar la rentabilidad financiera de la producción de plantas *in vitro* de *Salvia hispanica*.

2.3 Hipótesis

- Es factible encontrar diferentes respuestas morfogénicas en variedades élites de Chía cultivadas en diferentes zonas de producción.
- Las respuestas morfogénicas de variedades élite de *Salvia hispanica* dependen del tipo de explante, así como de las combinaciones de reguladores de crecimiento utilizadas en cada una de las etapas de la ruta morfogénica.
- Es factible la aclimatación de plantas de Chía multiplicadas *in vitro*.
- La rentabilidad financiera (Costo-Beneficio) de la regeneración *in vitro* de *Salvia hispanica* vía las Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* puede ser viable.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades de la Chía

El vocablo náhuatl “Chía” o “Chan” agrupa varias especies botánicas de los géneros *Salvia*, *Hyptis*, *Amaranthus* y *Chenopodium*. Su cultivo y utilización fueron considerados por Kirchhoff (1960) como un elemento esencial de la cultura mesoamericana. Las descripciones de sus formas de uso indican que es probable que el conocimiento y la domesticación de estas plantas se remonte a una etapa previa a la época prehispánica (Gillet, 1981).

La Chía es un cultivo anual que se distribuye de manera natural en la zona montañosa de la vertiente del Océano Pacífico, desde Chihuahua en México, hasta Centroamérica, sobre el eje Neovolcánico Transversal y las sierras Madre Occidental, del Sur y de Chiapas. Los pueblos asentados en esas regiones la consumen desde los tiempos precolombinos, siendo parte preponderante de su nutrición diaria. Probablemente exista una amplia diversificación entre poblaciones naturales de *S. hispanica*, aun así, solo se han descrito dos ideotipos identificados como: Variedad *Chionocalyx* y Variedad *Intosa Fernald* (Hernández y Miranda, 2008).

De acuerdo con Ayerza y Coates (2006) habitualmente se pueden encontrar semillas de color blanco puro, marrón o negro puro; aunque Rovati *et al.* (2012) describen tres colores en la semilla, gris jaspeado (con manchas irregulares de color castaño-rojizo oscuro), blanco y marrón uniforme.

El cultivo de la Chía se ha introducido a varios países como Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador, Paraguay y Perú, encontrándose las mayores plantaciones en el norte argentino en las provincias de Catamarca, Salta y Tucumán y en Bolivia en la zona de Santa Cruz (Lobo *et al.*, 2011). En México, para el año 2016 se reportó una superficie sembrada de 5,555 ha, con una producción de 3,567 t. El principal productor

fue el estado de Jalisco con una superficie sembrada de 4,734 ha, seguido de Puebla con una superficie sembrada de 373 ha (SIAP, 2016).

Existen empresas cooperativas de productores dedicadas al cultivo e industrialización de la chía en Australia, Bolivia y Argentina; donde desde hace 10 años han desarrollado la red de valor de chía y actualmente ofertan semillas seleccionadas, así como aceite, harina, fibra y cápsulas de aceite. Mientras tanto, en México, uno de los centros de origen de la chía, apenas hace cinco años se retomó el cultivo en los municipios de Acatic, Cuquío y Zapotlanejo, en Jalisco, donde actualmente se obtiene 85 % de la producción nacional (SIAP, 2016). También en este estado existen varias empresas, algunas en asociación con productores agrícolas, que procesan y exportan la semilla de Chía y sus derivados, principalmente hacia Estados Unidos, donde su demanda es creciente.

La chía es una planta que tolera muy bien la sequía y suelos con baja o mediana fertilidad. Las precipitaciones pluviales apenas superiores a los 450 mm son suficientes para su cultivo; con densidades de siembra de cuatro kg de semilla por hectárea y dosis de fertilización de 70 kg de nitrógeno y 46 de fósforo, se logran rendimientos de 1.2 t ha⁻¹ de semilla de chía.

Según la Coordinación Nacional de las Funciones Produce, A.C. (COFUPRO), señala que la utilidad del cultivo puede incrementarse mediante la aplicación de labranza mínima, que implica el ahorro del orden de 2,500 pesos por hectárea al no incluir labores como el barbecho y rastreo (COFUPRO, 2013).

3.1.1 Descripción taxonómica y botánica

- Reino: Plantae
- Sub-reino: Tracheobionta
- Super división: Spermatophyta

- División: Magnoliophyta.
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Lamiales
- Familia: Lamiaceae
- Género: *Salvia*
- Especie: *hispanica*

Fuente: Hentry *et al.* (1990).

La Chía es una especie anual que pertenece a la familia Lamiaceae que a su vez está constituida por 7 subgéneros y comprende 300 géneros con alrededor de 7,500 especies (Di Sapio *et al.*, 2012). Esta familia ha tomado importancia debido a la presencia de compuestos con actividad tanto bacteriana como bioinsecticida. El género *Salvia* es el más numeroso de esta familia y tiene propiedades digestivas, protectoras hepáticas, antitusivos y dermopáticas. Entre las especies exóticas, las clusas de *S. hispanica* contienen ácidos linoleicos y linolénico, que representan la mayor fuente natural de ácidos omega-6 y omega-3 (Gómez y Colín, 2008), que son de gran importancia para la nutrición humana, ya que reducen los riesgos de enfermedades cardiovasculares, además poseen un alto contenido de antioxidantes, ricas en fibra y no poseen gluten.

3.1.2 Características morfológicas de la Chía

La Chía es una planta herbácea anual que mide de 1 a 1.5 m de altura, su tallo es ramoso, ramificado, aromático de sección cuadrangular, pubescentes de 1-4 cm de diámetro promedio. En tallos jóvenes se observan estomas sobre elevados cuyas células anexas poseen cutículas estriadas (Di Sapio *et al.*, 2012).

Sus hojas son simples, opuestas, enteras. Lámina oval-elíptica, algo di colora, 8-12 cm de longitud por 4-7 cm de ancho, base cuneada a subcorbada, ápice agudo, margen dentado aserrado, pinnadas, nervaduras prominentes en el envés, pubescentes. Pecíolo

corto, 1-3 cm, en la parte superior de la planta y 5-7 cm en las ramificaciones inferiores, pubescentes (Gómez y Colín., 2008)

El tallo es sufrútice, ramoso, ramificado, aromático con tallos cuadrangulares, pubescentes de 1-(2)-4 cm de diámetro promedio. El indumento es abundante y de similares características exomorfológicas a las descritas para la epidermis abaxial de la lámina foliar. En tallos jóvenes se observan estomas sobreelevados cuyas células anexas poseen cutícula estriada (Di Sapio *et al.*, 2012).

El fruto proveniente de cada flor es un carcérulo que a la madurez produce pequeños mericarpos indehiscentes denominados núculas o clusas, en número de 1-4, incluidas en el cáliz frecuentemente acrescente; son monospermas, obovoides, de simetría dorsiventral y tamaño de 1.5-2 mm de longitud y 1-1.2 mm en el diámetro medio. Cara ventral subtrígona con una pequeña cresta originada en el hilio, cara dorsal convexa. En mayor porcentaje se presentan de color pardo grisáceo con abundantes manchas de contornos muy irregulares de color castaño oscuro y que se destacan más en los límites de las areolas. En menor proporción se observan clusas de color blanquecino con la inserción basal y los límites de las areolas, de color castaño claro (Rovati, 2012).

El arreglo epidérmico del pericarpio le confiere una superficie glabra, brillante, generalmente lisa o apenas tuberculada y dividida en áreas irregulares que originan numerosas areolas delimitadas por surcos muy suaves. En general, las células epidérmicas poseen contorno poligonal, de paredes radiales no visibles y tangencial externa lisa. Poseen inserción basal con hilio blanquecino de contorno subcircular y crateriforme, localizado en la base de la cara ventral. La microescultura presente en el hilio, de acuerdo con la terminología propuesta por Barthlott *et al.* (1998), está conformada por ceras epicuticulares de tipo cristaloides como placas cúbicas y granulosas (Ayerza y Coates, 2006).

La semilla es horizontal, albuminosa, sólo una por clusa y ocupa todo el volumen del fruto. Su contorno es oblongo-elíptico, forma levemente navicular, con el extremo

radicular angosto y el extremo cotiledonal ancho; superficie opaca, reticulada, de color amarillo-ocráceo (Di Sapio *et al.*, 2012) En función de la variedad, su color puede ser blanco o negro grisáceo (Hernández y Miranda, 2008) con manchas irregulares asemejándose a un color rojo oscuro. La polinización es entomófila.

3.1.3 Tipos de propagación en especies del género *Salvia*

Segui (2010) define la propagación vegetal como la producción de las plantas controladas por el hombre para perpetuar individuos seleccionados o grupos de plantas que tienen para él un valor específico. La mayoría de las plantas cultivadas son formas mejoradas que deben la continuidad de su existencia al hecho que han sido propagadas en condiciones controladas.

Diversas especies del género *Salvia*, incluida la Chía, se propagan de forma sexual y asexual. En especies como *S. officinalis*, una especie de uso medicinal, su propagación de manera sexual es complicada lo que ha obligado a desarrollar técnicas de reproducción asexual, específicamente mediante estacas (Lemes *et al.*, 2000). *S. hispanica* no se ha reproducido asexualmente de manera comercial, pues su reproducción por semilla es más viable económicamente, lo que no ha incentivado a buscar formas de reproducción asexuales. Sin embargo, como lo menciona Jamboonsri *et al.* (2012) un problema importante es que a mayores latitudes *S. hispanica* no puede producir semillas, por lo que algunos autores han desarrollado técnicas de propagación *in vitro* (Zayova, 2017).

3.1.4 Cultivo de Chía

Los primeros productores mesoamericanos seleccionaron líneas con características agronómicas sobresalientes; conservación y rendimiento de semilla uniforme, ésta última en particular, es una desventaja para la conservación en el medio silvestre. Es considerado un alimento funcional y su área de distribución ecológica se está expandiendo rápidamente de México y Guatemala a otras partes del mundo, debido a

su capacidad de adaptación a los entornos semiáridos. La Chía podría ser una alternativa para los cultivos de verano en ambientes mediterráneos, aunque su sensibilidad al fotoperiodo pudiera ser un factor limitante (Bochicchio *et al.*, 2015).

En México, las zonas más apropiadas para producir Chía de temporal se localizan en el Centro, Occidente y algunas partes del sur del país, pero principalmente en las partes altas de los estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán, Morelos, Puebla, Estado de México, Guerrero y Oaxaca. No obstante, el tipo de suelo, la precipitación pluvial y la altitud son factores determinantes en la definición de zonas de óptimo o subóptimo potencial del cultivo de Chía (Lobo, 2011).

La Chía se propaga esencialmente por semilla botánica. Los rendimientos de Chía muestran una gran variación entre las selecciones y los sitios, lo que implica una interacción marcada por el ambiente seleccionado (Ayerza, 2008). No obstante, la elevada pureza y bajo porcentaje de germinación, no presentan alteraciones en el contenido de los ácidos grasos, pero sí altera la capacidad dietaria y medicinal (Bueno *et al.*, 2010). Los días para la emergencia dependen de su interacción genotipo-ambiente, y del manejo agronómico del cultivo; está relacionada con la calidad de la semilla, profundidad de siembra, temperatura, humedad, concentración de oxígeno, cantidad y calidad de luz solar (Ruiz y Armendáriz, 2017).

Cahill y Ehdade (2005) reportaron que la mayor parte de la variación fenotípica medida entre accesiones silvestres y cultivadas de *Salvia hispanica* tiene una base genética que es heredable.

3.1.5 Requerimientos ambientales

La planta de Chía requiere un clima templado, es decir, temperaturas de 14 a 20°C (Cahill, 2003). Es posible cultivarse con precipitaciones desde 400 a 1,100 mm (Ayerza y Coates, 2006; Arellano y Galicia, 2007), pero no es tolerante a las heladas y sus principales amenazas son la lluvia y el granizo (Ayerza y Coates, 2005). La capa de gel

(mucílago), que tienen las semillas de Chía sirve para protegerla en climas áridos y calientes donde se cultiva (Capitani *et al.*, 2013).

La Chía se desarrolla mejor en suelos arenoso-limoso, aunque puede crecer en los arcillosos-limosos si tiene un buen drenaje y de moderada fertilidad, tolera suelos con cierta acidez y los mejores rendimientos se obtienen cuando se cultiva en suelos con buena fertilidad (Arellano y Galicia, 2007).

3.2 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* permite el cultivo de material vegetal en frascos de vidrio que lo separan del ambiente exterior y lo mantienen en condiciones controladas y asépticas. Entre las diversas técnicas de cultivo *in vitro* destaca la micropropagación, que consiste en la producción clonal de plantas a partir, generalmente, de ápices o explantes nodales de una planta madre. La gran producción de nuevas plantas se ve favorecida gracias al rápido crecimiento del material vegetal *in vitro* y a la proliferación de brotes durante los subcultivos. (Sava, 2016)

De acuerdo con Murashige (1974) y Debergh y Maene (1981) un sistema de micropropagación puede comprender las siguientes etapas:

- Etapa 0: Selección y acondicionamiento de la planta madre
- Etapa I: Tratamientos de asepsia y establecimiento del cultivo
- Etapa II: Desarrollo y multiplicación de los brotes
- Etapa III: Enraizamiento o acondicionamiento de los brotes para su aclimatación a condiciones *ex vitro*
- Etapa IV: Aclimatación a condiciones *ex vitro*

3.2.1 Selección y acondicionamiento de la planta madre

George *et al.* (2008) mencionan que se debe prestar atención a la selección de la planta madre, de estar libre de cualquier síntoma de enfermedad, e incluso puede ser necesario la aplicación de tratamientos para detectar y reducir o eliminar enfermedades

bacterianas y virales, siendo esta parte esencial y desafortunadamente a menudo omitida. Además, la planta madre debe ser característica de la variedad o especie, todo esto como parte fundamental para lograr que el proceso de regeneración *in vitro* sea exitoso (Debergh y Meane, 1981).

3.2.2 Establecimiento del cultivo aséptico

Consiste en la desinfección de los explantes (generalmente con hipoclorito de sodio, entre otros) y su posterior adaptación al medio artificial para inducir callo, brote, raíz o embrión somático, según se desee. Se requiere desinfectar superficialmente el material vegetal seleccionado para evitar que en el medio de cultivo crezcan microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que compiten ventajosamente con el explante (Razdan, 2003).

Para establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para ello, es recomendable mantener a las plantas madre (planta donadora de yemas u otros explantes) durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Sathyanarayana y Verghese, 2007)

El establecimiento del cultivo aséptico de tejidos vegetales tiene varios propósitos que incluyen la limpieza de virus y otros patógenos, multiplicación clonal masiva, resistencia a plagas y enfermedades, resistencia a la toxicidad y otras condiciones ambientales adversas Intercambio y la conservación de germoplasma (González, 2013)

3.2.3 Desarrollo y multiplicación de brotes

El objetivo de la Etapa II es lograr la producción de nuevos brotes de plantas, que sean capaces de dar lugar a plantas completas (Sathyanarayana y Verghese, 2007). De

acuerdo con el procedimiento *in vitro* que se siga la multiplicación puede ser dada por los brotes axilares o adventicios, embriones somáticos, u órganos propagativos. En algunos métodos de micropropagación, la Etapa II puede incluir la inducción previa de centros meristemáticos de donde pueden desarrollarse los órganos adventicios. Algunos de los propágulos producidos en la Etapa II (especialmente brotes) también se pueden utilizar como base para otros ciclos de multiplicación en que por lo general se pueden cultivar de nuevo (subcultivo) para aumentar su número (Razdan, 2003).

3.2.4 Enraizamiento y aclimatación a condiciones *ex vitro*

Los brotes o las plántulas obtenidos en la Etapa II aún no son capaces de sostenerse por sí mismos en el suelo o el compost. En la Etapa III, se toman medidas para cultivar plántulas individuales o en grupos de plántulas, capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, y la supervivencia sin un suministro artificial de carbohidratos. Algunas plántulas necesitan un tratamiento especial en esta etapa para que no se atrofien o adormezcan cuando se las saca del ambiente de cultivo *in vitro*. La Etapa III incluye el enraizamiento *in vitro* de los brotes antes de su transferencia al suelo. El enraizamiento de brotes es una parte muy importante de cualquier esquema de propagación *in vitro*. Algunas especies forman raíces adventicias en los brotes durante el transcurso de la etapa III de cultivo, pero generalmente es necesario adoptar un procedimiento de enraizamiento separado utilizando medios especiales o métodos para inducir la formación de raíces. A veces los brotes pueden necesitar ser especialmente alargados antes de intentar el enraizamiento. Para reducir los costos de la micropropagación, muchos laboratorios ahora eliminan brotes sin raíces del entorno *in vitro* y los extraen del recipiente de cultivo. Por lo tanto, en cultivos donde la micropropagación se basa en brotes adventicios o axilares, la Etapa III a menudo se divide convenientemente, como sugirieron Debergh y Maene (1981), en:

- Etapa IIIa, el alargamiento de brotes o brotes formados durante la Etapa II, para proporcionar brotes de un tamaño adecuado para la Etapa IIIb;

- Etapa IIIb, el enraizamiento de los brotes de la Etapa IIIa *in vitro*. Los procedimientos utilizados para inducir el enraizamiento se analizan en capítulos posteriores.

3.3 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis vegetal *in vivo* e *in vitro* es un proceso complejo del desarrollo. Se define como un cambio fisiológico y/o morfológico que permite la especialización de una célula, tejido, órgano o planta entera durante su desarrollo. La morfogénesis incluye el desarrollo de células que difieren de la célula madre y tanto la diferenciación como el arreglo de estas células se efectúan en un orden definido, el cual es resultado de la división celular de acuerdo a un plan y secuencias específicas y ordenadas. La organogénesis y embriogénesis somática representan los dos tipos de regeneración *de novo* de plantas superiores a partir de tejidos y células (Ramage y Williams, 2002).

3.3.1 Organogénesis

Es un proceso mediante el cual ocurre la formación de estructuras adventicias a partir de tejido ya diferenciado no meristemático; también se refiere a ella como organogénesis *in vitro* o diferenciación de brotes adventicios (Radice, 2004). La obtención de estos brotes puede ser de forma directa o indirecta. En la primera se pueden formar brotes adventicios directamente del explante, sin la formación de callo. La segunda, se describe como la formación de callos en primer lugar y de ahí se generan los brotes adventicios (Zhang y Lemaux, 2004).

3.3.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual las células somáticas se diferencian en embriones somáticos y conservan íntegramente el genotipo de la planta donante. Los métodos para la realización de este tipo de morfogénesis se han descrito en un gran número de especies de plantas, cada una con sus propias características. Este proceso se produce con cierta frecuencia en la naturaleza, produciéndose de forma

espontánea en más de 60 familias botánicas, algunas tan importantes como las Compuestas, Crucíferas, Cucurbitáceas, Gramíneas, Rosáceas, Leguminosas, Arecáceas, entre otras. Es un proceso tan natural como la embriogénesis cigótica, con casos tan conocidos como el de los cítricos, en los que ambos tipos de embriogénesis ocurren casi simultáneamente en el interior de la semilla. Se ha utilizado como una herramienta en programas de mejoramiento con transformación genética, así como para aumentar la germinación de progenies híbridas utilizadas en las estrategias de mejoramiento convencional. Sin embargo, el mayor interés se centra en su aplicación práctica para la propagación de plantas a escala comercial. Para ello, es necesario lograr tasas superiores de germinación y conversión de plantas, así como obtener embriones de calidad con un desarrollo morfológico sincrónico (García *et al.*, 2016).

3.4 Factores que influyen en la morfogénesis *in vitro*

Son varios los factores que tienen efectos sobre la morfogénesis *in vitro*; básicamente se agrupan en factores químicos, físicos e intrínsecos. Dentro de los químicos se encuentra la composición química de los medios de cultivo que incluye los componentes inorgánicos: (macronutrientes y micronutrientes), componentes orgánicos (fuentes de carbono, vitaminas, mezclas de sustancias no definidas) y otros componentes como las hormonas vegetales: (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno) además del pH. Los factores físicos se refieren al entorno en el que crecen los cultivos que incluyen la temperatura, humedad relativa y luz. El factor intrínseco agrupa los relacionados con el genotipo, edad de la planta, edad del órgano o tejido, estado fisiológico de la planta, estado fitosanitario, tamaño del explante, entre otros (Trigiano y Gray, 2011).

3.4.1 Medio de cultivo

Antes de hacer la asepsia del material vegetal que se va a introducir *in vitro*, es necesario disponer de medios de cultivo esterilizados y dosificados en recipientes adecuados. Una parte importante del cultivo *in vitro* son los medios de cultivo ya que en ellos se

encuentran las sustancias necesarias para el desarrollo (crecimiento y diferenciación) de los tejidos vegetales.

Un medio de cultivo es una solución acuosa en donde se encuentran disueltas sales minerales que aportan los elementos esenciales macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co). Normalmente es imprescindible una fuente de carbono, generalmente la sacarosa, debido a la escasa actividad fotosintética del tejido *in vitro*. Además, el medio puede ser enriquecido con aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento. Los medios de cultivo se preparan a partir de soluciones concentradas 10 o 100 veces (Soluciones Madre o Stock). En la solución madre se pueden mezclar varias sales minerales siempre que no se produzcan problemas de precipitación. Algunos elementos, como el Fe, se utilizan en forma de quelatos para mantener su disponibilidad durante el cultivo. Los medios de cultivo se pueden utilizar de forma líquida o con un agente gelificante como el agar (Roca y Mroginsky, 1993).

3.4.2 Explante

El tipo de explante y su etapa de desarrollo, parecen ser los factores más importantes que determinan la capacidad morfogénica de los cultivos. Los esfuerzos por elegir el mejor explante se han centrado en la búsqueda de tejidos con células competentes capaces de inducir la organogénesis en respuesta a la aplicación de estímulos externos. La organogénesis puede inducirse a partir de varios tipos de explantes: plántulas y sus fragmentos, pecíolos, hojas, raíz, ápices de brotes, entre otros (Martínez, 2016).

3.4.3 Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal son compuestos producidos por las plantas y regulan su respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad, participando en los procesos esenciales para el desarrollo de las plantas por lo que constituyen uno de los estímulos externos más importantes que inducen una ruta morfogénica de desarrollo específica. Auxinas y citocininas, son ampliamente usadas,

ya que adicionadas al medio de cultivo participan activamente en el ciclo celular y desencadenan las divisiones celulares. La concentración de reguladores de crecimiento vegetal, es un factor determinante en los procesos celulares, dado que dosis demasiado bajas no pueden desencadenarlos y las muy altas pueden ser tóxicas, sobre todo cuando se usan fenoxi-auxinas (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético). La composición y concentración relativa de reguladores de crecimiento determinan tanto la habilidad del explante para responder, así como el modo de reacción morfogénico (Calva, 2005).

3.4.4 Genotipo

El genotipo es uno de los factores más importantes, pues existen mecanismos reguladores de la información genética que causan que la morfogénesis se active o inactiva o se pierda por completo durante el subcultivo, esto genera diferencias en la regeneración de plantas. A su vez, la diversidad de respuesta que existe entre los distintas taxas puede reflejarse en los requerimientos nutricionales y de reguladores de crecimiento necesarios para la obtención de alguna respuesta (Trigiano y Gray, 2000).

3.4.5 Temperatura

La temperatura es un factor ambiental que se puede controlar en cultivo de tejidos, de lo cual depende la reproducción de los resultados, sin embargo, no existe un patrón de temperatura único para todas las especies, no obstante, el promedio oscila entre 25-28 °C (Bonilla *et al.*, 2016).

3.4.6 Luz

La iluminación es un factor ambiental que por lo general es proporcionada por lámparas de luz blanca fría fluorescente, la cual dependiendo de la etapa de propagación *in vitro* puede variar entre 40 a 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Bajo condiciones *in vitro* ha sido posible observar que la luz tiene efecto sobre la formación de yemas cuando se usa luz roja, además estimula la formación de flores y cuando se usa luz azul se ha inducido la formación de brotes (Trigiano y Gray, 2000).

3.4.7 Humedad

La humedad es la cantidad de vapor presente en el aire, se puede expresar como absoluta (HA), o relativa (HR). La HR dentro de un frasco de cultivo puede alcanzar 100%, (cuando las gotas de agua se condensan en las paredes). Sin embargo, la HR aceptable es de 70%, pues a medida que se incrementa también lo hace el riesgo de contaminación (Dutta y Yasuomi, 2006).

3.5 Cultivo *in vitro* de chía

Bueno *et al.* (2010) lograron la organogénesis *in vitro* de *S. hispanica* evaluaron como explantes hojas jóvenes, cotiledones y segmentos uninodales con dos yemas axilares cultivados en medio MS adicionado con 0.1 μM de ácido naftalenacético (ANA); 0.1 μM de ácido giberélico (AG_3) y 0, 0.5 0.75 o 1 μM de 6-benciladenina (BAP). El mayor porcentaje de brotes se obtuvo a partir de segmentos nodales (78%); las hojas y cotiledones no resultaron eficientes. La mayor tasa de supervivencia de los brotes y una mayor proliferación de las hojas / plántula se observó con 0.75 y 1 μM de BAP.

En *S. officinalis* L., otra especie del género *Salvia*, la organogénesis se logró a partir de secciones internodales que presentaban al menos dos yemas axilares. Los explantes se sembraron en medio MS (1962), suplementado con sacarosa (30 g L^{-1}), ácido cítrico (100 mg L^{-1}) y ácido ascórbico (150 mg L^{-1}). La mejor respuesta morfogénica se obtuvo con cinetina en concentraciones de 0.5, 2.5 y 5.0 mg L^{-1} que indujeron 33, 25 y 41% la formación de callos, respectivamente. Para los tratamientos con cinetina a 2.5 y 5.0 mg L^{-1} , se obtuvo un 15 y 10% de formación de brotes, respectivamente.

Por su parte, Skala *et al.* (2014), establecieron la organogénesis *in vitro* en *Salvia przewalskii*, utilizando como explantes hipocotilos, cotiledones, raíces, hojas (divididos en pecíolo y lámina), células y callos. Para la obtención de explantes germinaron semillas en medio MS (1962) suplementado con 3% de sacarosa, ácido giberélico (0.1 mg L^{-1}) cinetina (0.02 mg L^{-1}) y agar (0.7%). Los hipocotilos, cotiledones, raíces y hojas

(peciolo y lamina) fueron sembrados en dos medios MS (1962) complementado con ácido indol-3-acético (AIA, 0.5 mg L⁻¹) y 6-benciladenina (BA 1.0 mg L⁻¹); y en un medio Woody Plant (WP) (Lloyd y McCown, 1980) suplementado con 2,4-D (0.5 mg L⁻¹) y agar, mientras que las células fueron sembradas en medio líquido WP (1980) suplementado con 2,4-D (0.5 mg L⁻¹) y BA (0.2 mg L⁻¹)

Los hipocotilos y pecíolos de las hojas formaron callos con alta frecuencia (~ 90%); 54% en el caso de la lámina de la hoja, 0-65% en los cotiledones y 0-40% en raíces, en función de los medios de basales empleados WP (1980) o MS (1962).

En células en suspensión de *S. przewalskii* (SC1 y SC2) el crecimiento de la línea SC1, que se obtuvo con 16 h luz, fue casi exponencial entre el tercer y duodécimo día después del cultivo, con una tasa de crecimiento de 0.17% por día y un tiempo de duplicación(td) de 4 días; los valores correspondientes para la línea celular SC2, cultivadas en la oscuridad, la tasa de crecimiento fue de 0.15 % y un td de 4.7 días, durante el sexto y decimoquinto día del ciclo de crecimiento (Skala *et al.*, 2014).

Zayova *et al.* (2017) reportaron un método de micropropagación para *Salvia hispanica* a partir de semillas *in vitro*. La germinación de 100% se obtuvo en medio MS (1962) adicionado con 0.4 mg L⁻¹ de ácido giberélico y 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico después de una semana de cultivo. El número máximo de brotes por explante fue de 2.7 en medio MS (1962) adicionado con 2 mg L⁻¹ de BAP después de cinco semanas de cultivo. Para la etapa de enraizamiento se usó medio MS (1962) a la mitad de la concentración de sales adicionado con 0.1 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico después de cuatro semanas de cultivo. Los brotes desarrollados y enraizados fueron aclimatados exitosamente con 95% de supervivencia. Después de seis meses en campo, se evaluaron características morfométricas de las plantas aclimatadas, así como de plantas cultivadas *in vivo*. Algunas características morfológicas evaluadas fueron altura de la planta, tamaño de la hoja, número de ramas y hojas por planta las cuales fueron influenciadas por la forma de propagación.

3.6 Análisis financiero del cultivo *in vitro* de *Salvia hispanica*

Hernández *et al.* (2005) define un análisis financiero como una técnica de evaluación del comportamiento operativo de una empresa, facilitando el diagnóstico de la situación actual y la predicción de acontecimientos futuros, orientado hacia la consecución de objetivos preestablecidos. La importancia de un análisis financiero radica en que éste permite identificar los aspectos económicos financieros que muestran las condiciones en que opera la empresa con respecto al nivel de liquidez, solvencia endeudamiento, eficiencia, rendimiento y rentabilidad, facilitando la toma de decisiones, económicas y financieras en actividades empresariales. Nava (2009) menciona que para el desarrollo del análisis financiero se requiere del cálculo de ciertos indicadores financieros también llamados razones financieras, que permiten, como también lo menciona Rubio (2007), generar una serie de medidas y relaciones que son significativas y útiles en la toma de decisiones, dado que la información registrada en los estados financieros por sí sola no resulta del todo suficiente para realizar una planificación financiera pertinente.

En la micropropagación de especies vegetales es importante entonces realizar un análisis financiero para la valoración de los costos y beneficios sociales del proyecto; como una forma para la estimación de la viabilidad del mismo, dichos análisis se han realizado en algunas especies principalmente ornamentales y en peligro de extinción (Pence, 2011)

3.6.1 Concepto de Costo

- a) Costos fijos. Son aquellos derivados al momento de adquirir insumos fijos, que serán utilizados en el proceso productivo a corto, mediano y largo plazo. Estos costos no pueden ser reducidos independientemente del nivel de producción, como son el costo predial, seguros, depreciación, amortización e intereses de crédito (Hansen, 2003).

- b) Costos variables. Se refiere al gasto realizado en la compra de insumos variables que, en general son empleados en un solo ciclo productivo. A largo plazo todos los insumos son variables (Gómez, 2001).
- c) Costos totales. En el corto plazo es la suma de los costos variables y los costos fijos, es decir, los costos totales realizados para llevar a cabo la producción (Horngren *et al.*, 2012).

3.6.2 Eficiencia económica: Punto de equilibrio.

Al punto de equilibrio también se le conoce con el nombre de producción mínima económica o umbral económico, representa la producción mínima donde los costos e ingresos son iguales. El punto de equilibrio se define como el volumen mínimo de producción o ingreso mínimo, que la empresa debe generar para que los ingresos totales obtenidos sean iguales a los costos totales. Para que un productor no tenga pérdidas debe producir al menos en el punto de equilibrio (Hernández *et al.*, 2005)

El cálculo del punto de equilibrio se puede realizar en términos de ingresos o cantidad de producción. La cantidad de equilibrio y el ingreso de equilibrio proporcionan el punto de equilibrio, que es el nivel mínimo en que debe de estar funcionando la empresa para que sus ingresos sean iguales a sus costos (Ramírez, 2008).

3.6.3 Indicadores de rentabilidad

La evaluación de los proyectos puede ser *ex ante* o *ex post*, los indicadores que se calculan y los niveles en que se realizan (*privado* o *social*) son similares. Esta fase se concentra principalmente en la comparación de los costos y beneficios actualizados y los indicadores de evaluación que se evalúan son: valor actual neto (VAN), relación beneficios costos (B/C) y tasa interna de retorno (TIR) (Nava, 2009).

- a) Valor actual neto (VAN). EL VAN es igual al valor actualizado de la corriente de beneficios menos el valor actualizado de la corriente de costo. El VAN refleja la utilidad neta actualizada atribuible al proyecto, con el criterio del VAN es posible

una clasificación aceptable de proyectos independientes, ya que constituye una medida absoluta, no relativa (Mete, 2014). El VAN es también el criterio preferido de selección para escoger entre proyectos que se excluyen entre sí, debido que un posible error en la aplicación de la medida de la tasa de rentabilidad interna a tales proyectos. Si los beneficios netos se actualizan a la tasa de interés a la cual se financia la inversión, el VAN permanece igual, ya sea que se compute antes o después del financiamiento, ello proporciona una ventaja del VAN sobre TIR (Hernández *et al.*, 2005).

- b) Tasa interna de rentabilidad (TIR). La TIR es la tasa de actualización que hace que el VAN, flujo de fondos, de un proyecto sea igual a cero y representa la rentabilidad mínima del capital utilizado en la vida útil de un proyecto. La determinación de la TIR es muy útil para considerar las inversiones de proyectos agrícolas, este indicador proporciona una medida relativa y no absoluta, por lo que el criterio de decisión para la aceptación de proyectos, consistente en aprobar la ejecución de todos aquellos proyectos cuya TIR este por arriba del costo de oportunidad del capital (tasa de interés) (Altuve, 2004).
- c) Relación beneficio costo (B/C). La relación B/C se obtiene dividiendo el valor actual de la corriente de beneficio entre el valor actual de la corriente de costo, es decir representa la relación entre beneficio y costo. La relación B/C menor a uno, representa la ganancia o pérdida por peso invertido en la empresa o proyecto (Gómez, 2001).
- d) Factor de descuento. Es la tasa de descuento que representa el costo de oportunidad del capital y se define tomando encuentra la tasa de interés más alta que se paga a los ahorradores (Garay y González, 2007). En México el factor de descuento es la tasa de interés que se paga por la compra de certificado de la tesorería de la federación (CETES) después de identificar la tasa de interés más alta se procede a definir el factor de descuento, puede ser utilizada la tasa de interés nominal o real dependiendo si la información que se va utilizar para realizar la evaluación está en términos corrientes o constantes (Morales, 2008).

3.6.4 Procedimiento de cálculo

a) Valores totales. Los valores totales se refieren a la suma de los valores parciales, los cuales se obtienen de la siguiente manera:

$$VT = \sum VP$$

Dónde:

VT: Valor total

VP: Valor parcial

b) Costos totales. Se refiere a la suma de los costos parciales de los diferentes tipos de costos, los cuales se obtienen de la siguiente manera:

$$CT = CFT + CVT$$

Dónde:

CT: Costo total

CFT: Costos fijos totales

CVT: Costos variables totales

c) Ingresos totales. Se refiere a la suma de los ingresos parciales que se obtiene en una empresa o unidad de producción. En términos de una ecuación se representa como:

$$IT = P * Q$$

Dónde:

IT: Ingreso total

P: Precio

Q: Cantidad producida

d) Punto de equilibrio. Se refiere al punto de funcionamiento de una empresa o unidad de producción en donde los ingresos son iguales a los costos. El punto de equilibrio se puede calcular en términos de ingresos o en términos de cantidades producidas (Hernández, 2011).

El cálculo del punto de equilibrio, en términos de ingreso, se realiza con la fórmula siguiente:

$$PE = \frac{CF}{1 - \left(\frac{CV}{IT}\right)}$$

Dónde:

PE: Punto de equilibrio

CF: Costos fijos

CV: Costos variables

IT: Ingreso Total

El punto de equilibrio también se puede obtener en términos de cantidades, para lo cual se utiliza la fórmula siguiente:

$$CE = \frac{CFT}{Pu \left(1 - \frac{CVT}{IT}\right)}$$

Dónde:

CE: Cantidad de equilibrio

CFT: Costos fijos totales

Pu: Precio de venta unitario

CVT: Costos variables totales

IT: Ingreso total

e) Valor actual neto. Es la diferencia entre los ingresos totales y los costos totales actualizados. Su fórmula matemática es:

$$VAN = \sum_{t=1}^{t=n} \frac{(Bt - Ct)}{(1 + i)^n} > 0$$

Dónde:

Bt: Beneficios totales

Ct: Costos totales

i: Tasa de actualización

n: Número de periodos

El criterio de selección del VAN es:

VAN = 0, indica que el proyecto es indeterminado

VAN > 0, indica que el proyecto se acepta

VAN < 0, indica que el proyecto se rechaza

f) Tasa Interna de rentabilidad. La Tasa Interna de Rentabilidad se refiere a la tasa de interés que igualan los ingresos actualizados con los costos actualizados. Se representa matemáticamente de la siguiente manera:

$$TIR = \sum_{t=1}^{t=n} \frac{(Bt - Ct)}{(1 + i)^n} = 0$$

Dónde:

i: TIR buscada

Bt: Beneficios totales

Ct: Costos totales

n: Número de periodos

El criterio de selección es aceptar todos aquellos proyectos que tengan una Tasa Interna de Rentabilidad igual o mayor a la tasa de interés seleccionada, en caso contrario se rechaza.

g) Relación beneficio costo. La Relación Beneficio Costo se refiere a la relación entre los ingresos y los costos actualizados. Su fórmula matemática es la siguiente:

$$R B/C = \sum_{t=1}^{t=n} \left(\frac{BT}{CT} / (1 + i)^n \right) < > 0$$

Dónde:

BT: Beneficios totales

CT: Costos totales

i: Tasa de actualización

n: Número de periodos

El criterio de selección es aceptar todos aquellos proyectos con una B/C igual o mayor que uno y rechazar a aquellos que tienen un B/C menor que uno. En términos resumidos:

$B/C > 1$, significa que el proyecto se acepta

$B/C < 1$, significa que el proyecto se rechaza

$B/C = 1$, significa que el proyecto es indeterminado

La $B/C - 1$ representa la utilidad o pérdida por cada peso invertido en el proyecto.

h) Determinación del factor descuento

El factor de descuento se refiere a la tasa de interés con que se va a actualizar los ingresos y costos más uno. La fórmula del factor de descuento es:

i) Utilizando tasa de interés nominal

$$Fd = \frac{1}{(1 + i)^n}$$

Dónde:

Fd: Factor de descuento

i: Tasa de interés o de descuento nominal

n: Número de periodos

j) Utilizando tasa de interés real

$$Fd = \frac{1}{(1 + r)^n}$$

Dónde:

Fd: Factor de descuento

r: Tasa de interés o de descuento real

n: Número de periodos

Con el factor de descuento es posible transformar los valores corrientes (o valores constantes) a valores presentes, que son necesarios para realizar la evaluación de proyectos; es decir, calcula el valor de una cantidad de dinero futuro a valores presentes (Lenz, 2010).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

4.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de tres variedades de *Salvia hispanica* denominadas Chía "Blanca 54", Chía "Negra 59" y Chía "Pinta", mismas que fueron proporcionadas por su obtentor el Ing. Guillermo de Rosas del Municipio de Acatic, Jalisco, México (Figura 1).

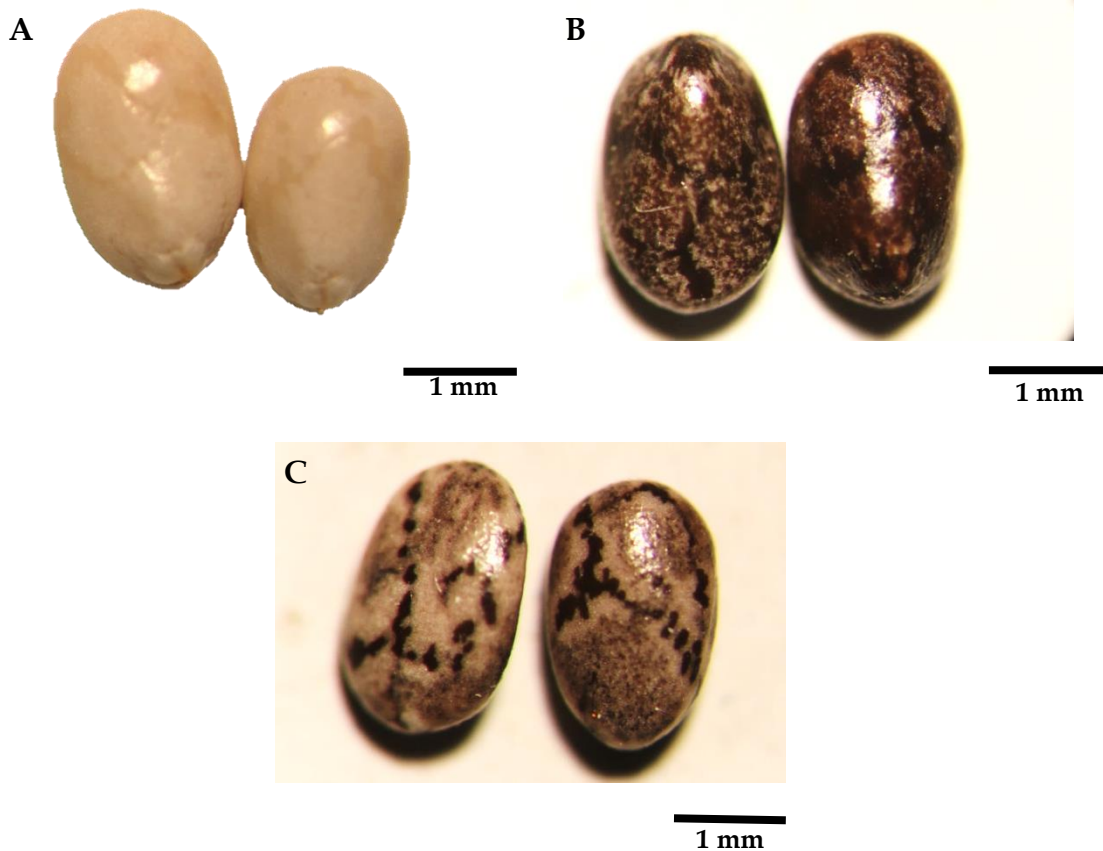


Figura 1. Semillas de tres variedades de *S. hispanica* usadas para la germinación *in vitro*. (A) Chía "Blanca 54", (B) Chía "Negra 59" y (C) Chía "Pinta".

4.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo empleado estuvo constituido por las sales minerales y vitaminas del medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962) (Apéndice 1) adicionado con sacarosa (30 g L⁻¹). El pH del medio se ajustó 5.7 con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star) y se gelificó con agar-agar (Merck®, 8.5 g L⁻¹). 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.

4.3 Establecimiento del cultivo aséptico

4.3.1 Desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) y fungicidas

Para definir el método de desinfección se seleccionaron 200 semillas de Chía “Pinta” y “Blanca” sanas sin daños mecánicos ni de insectos y de tamaño uniforme, las cuales se colocaron en un frasco de vidrio de 45 mL para lavarlas con detergente comercial (Roma®) y agua de la llave durante 5 minutos en agitación continua. A los frascos con las semillas se les colocó una tela fina sujeta con una liga para retirar completamente los residuos de detergente y después enjuagarlas cinco veces con agua destilada esterilizada. Bajo condiciones de asepsia (campana de flujo laminar horizontal VECO®) se aplicaron cuatro tratamientos de desinfección usando hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial (Cloralex®), en agitación continua (Cuadro 1). A cada tratamiento de NaOCl se le adicionó surfactante Tween®20 (0.5 % v/v).

Cuadro 1. Concentraciones de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) y tiempos de inmersión evaluados en la desinfección de semillas de tres variedades de *Salvia hispanica*.

Tratamiento (Núm.)	NaOCl (% _{v/v})	Tiempo (min.)	Semillas (Núm.)
1	20	15	50
2	20	20	50
3	30	15	50
4	30	20	50

Después de los tratamientos de NaOCl las semillas se sumergieron en solución fungicida compuesta de Benlate® + Captán® (4 g L⁻¹ c/u) + Tween®20 (0.5% v/v), durante 10 min en agitación continua. Posteriormente, las semillas se sembraron en grupos de cinco en frascos de 45 mL de capacidad con 10 mL del medio de cultivo MS a la mitad de concentración de sales.

4.3.2 Desinfección sólo con NaOCl

De acuerdo con los resultados de los primeros tratamientos de desinfección con NaOCl y fungicidas, se evaluaron nuevamente los tratamientos del Cuadro 1 pero sin la adición de fungicidas. Además, se establecieron otros cuatro tratamientos que incluyeron la reducción de dosis de NaOCl y tiempos de inmersión (Cuadro 2). Las semillas se sembraron en grupos de cinco en frascos de 45 mL de capacidad con 10 mL del medio de cultivo MS a la mitad de concentración de sales.

Cuadro 2. Concentraciones de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) y tiempo de inmersión evaluados en la desinfección de semillas de tres variedades de *Salvia hispanica*.

Tratamiento (Núm.)	NaOCl (%)	Tiempo (min)	Semillas (Núm.)
1	10	10	50
2	10	15	50
3	15	10	50
4	15	15	50
5	15	20	50
6	20	15	50
7	20	20	50
8	30	15	50
9	30	20	50

4.3.3 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Cada cuatro días, durante un periodo de cuatro semanas, se hicieron observaciones en cada uno de los tratamientos para determinar: tasa de supervivencia (%), tasa de contaminación total (%), contaminación por bacterias (%), contaminación por hongos (%), inicio de la contaminación (número de días) y término de contaminación (número de días).

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento cuya unidad experimental fue un frasco de cultivo con cinco semillas sembradas. El análisis de varianza de los resultados obtenidos para cada variedad de Chía, se realizó con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.3.4 Germinación y cinética de crecimiento

Para conocer la tasa de germinación y la cinética de crecimiento se sembraron semillas de las variedades “Blanca 54”, “Negra 59” y “Pinta” en medio de cultivo MS a la mitad de la concentración de sales.

4.3.4.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Cada tercer día, por un período de tres semanas, se hicieron observaciones en cada variedad para determinar: tasa de germinación (%), inicio y término de germinación (número de días) y altura de plántula (cm).

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con diez repeticiones por tratamiento con cinco semillas sembradas en cada frasco de cultivo como la unidad experimental. Los resultados de cada variable cuantificada se sometieron a una ANOVA usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.4 Inducción de brotes

Para la inducción de brotes en los tres materiales de Chía se evaluaron tres tipos de explantes que consistieron en ápices de brote, yema axilar y segmentos de tallo (1 cm de longitud) (Figura 2) disecados de plántulas de 20 días de edad germinadas *in vitro*. Los explantes se sembraron en medio MS (Apéndice 1) modificado a la mitad de la concentración de nitrógeno adicionado con bencilaminopurina (BAP) y cinetina (CIN) (Cuadro 3).



Figura 2. Explantes de *S. hispanica* para la inducción de brotes disecados de plantas germinadas *in vitro* de 20 días de edad. (A) Ápice de brote, (B) Yema axilar y (C) Segmento de tallo.

Cuadro 3. Concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (CIN) evaluadas en la inducción de brotes de tres variedades de *Salvia hispanica*.

Tratamiento (Núm.)	BAP		CIN	
	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
1	0	0	0	0
2	0.563	2.5	-	-
3	1.126	5	-	-
4	2.252	10	-	-
5	3.378	15	-	-
6	-	-	0.538	2.5
7	-	-	1.077	5
8	-	-	2.155	10
9	-	-	3.232	15

4.4.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Las observaciones se hicieron cada cuatro días por un periodo de cuatro semanas y se cuantificaron el oscurecimiento del explante (%); brotación (%), definida como el número de explantes que generaron brotes; días en que se presentó respuesta (número de días); número de brotes por explante y tamaño de brote (cm).

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con doce repeticiones por tratamiento con dos explantes sembrados en cada frasco de cultivo como unidad experimental. Los datos obtenidos se analizaron con un arreglo factorial 3X9= 27 tratamientos en total. El análisis de varianza de los datos se realizó con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de medias.

4.5 Multiplicación de brotes

En esta etapa, brotes de 1.5 cm de longitud, de las variedades de Chía: “Blanca 54”, “Negra 59” y “Pinta”, se establecieron en medio MS (Apéndice 1) modificado a la mitad

de la concentración de Nitrógeno adicionado con las mismas concentraciones de BAP y CIN evaluadas en la etapa de inducción (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y cinetina (CIN) evaluados en la multiplicación de brotes de tres variedades de *Salvia hispanica*.

Tratamiento (Núm.)	BAP		CIN	
	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
1	0	0	0	0
2	0.563	1.25	-	-
3	1.126	2.5	-	-
4	2.252	5	-	-
5	3.378	10	-	-
6	-	-	0.538	1.125
7	-	-	1.077	2.5
8	-	-	2.155	5
9	-	-	3.232	10

4.5.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Las observaciones de las respuestas se hicieron cada cuatro días por un periodo de cuatro semanas y se cuantificó la brotación (%), número de brotes por explante y tamaño de brote (cm). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con doce repeticiones por tratamiento con dos brotes sembrados en cada frasco de cultivo como unidad experimental. El análisis de varianza de los datos se realizó con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de medias.

4.6 Enraizamiento de brotes

Brotes de 2.5 cm de las tres variedades de Chía se subcultivaron en medio de cultivo MS a la mitad de concentración de sales adicionado con ácido indol-3-acético (AIA) y sin reguladores de crecimiento como testigo, con la finalidad de inducir el

enraizamiento. Se usaron frascos de 235 mL de capacidad con 40 mL de medio de cultivo.

4.6.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Las observaciones de las respuestas se hicieron cada cuatro días por un periodo de 20 días para determinar los días en que se presentó la respuesta, porcentaje de enraizamiento (%), número de raíces por explante y longitud de raíz (cm). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones con cuatro plantas sembradas en cada frasco de cultivo como unidad experimental. El análisis de varianza de los resultados obtenidos para cada material de Chía, se realizó con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.7 Aclimatación de plantas

Se seleccionaron plantas *in vitro* enraizadas de 5 y 8 cm de altura de las tres variedades de Chía. Las plantas se extrajeron de los frascos y las raíces se lavaron con agua destilada estéril para retirar los residuos del medio de cultivo. Después se plantaron en vasos de poliestireno expandido de 175 ml de capacidad con sustrato artificial constituido por turba y perlita en proporción 1:1, y se regaron con solución Steiner (1984) al 50%.

Después del trasplante las plantas se cubrieron con vasos de poliestireno cristal (GPPS) de 9x15 cm (diámetro/alto) sellados con un domo del mismo material, con perforaciones en el extremo superior, para favorecer la circulación de aire. Las plántulas se colocaron a temperatura ambiente promedio de 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 12 h ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 80 % de humedad relativa y se fertilizó con la solución Steiner (1984) al 50% cada 5 días. Las plantas se descubrieron a los 15 y 30 días después del trasplante (ddt) y se mantuvieron en la cámara de crecimiento durante dos semanas

más recibiendo la fertilización en riegos efectuados con solución Steiner (1984) cada 3 días.

4.7.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

A los 15 y 30 días se contabilizó: tasa de supervivencia (%), número de hojas, y altura de planta (cm). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple y los datos obtenidos se analizaron con un ANOVA para cada variedad. Cada tratamiento estuvo representado por 10 repeticiones y la unidad experimental fue una planta, el análisis de varianza se hizo para cada variable y variedad de Chía con el Software de Análisis estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.8 Análisis financiero de la propagación *in vitro* de *Salvia hispanica*

El análisis financiero se llevó a cabo con información proporcionada en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

4.8.1 Costos de producción

Los costos de producción del cultivo *in vitro* de Chía se hicieron por lote de producción anual, para dar un panorama general sobre este cultivo, así mismo conocer la rentabilidad de usar las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* para la propagación de esta especie.

4.8.2 Ingresos

Los ingresos se calcularon considerando un precio unitario de \$ 5.00 por planta y una producción mensual estimada de 25,000 plantas.

4.8.3 Eficiencia económica: Punto de equilibrio

El punto de equilibrio se calcula en términos de ingresos o en términos de cantidades producidas. Para esta investigación se usó la siguiente metodología:

Se calculó el punto de equilibrio en términos de ingreso mediante la siguiente fórmula:

$$PE = \frac{CF}{1 - \left[\frac{CV}{IT}\right]}$$

Dónde:

PE: Punto de equilibrio

CF: Costos fijos

CV: Costos variables

IT: Ingreso Total

4.8.4 Indicadores de rentabilidad

La evaluación de rentabilidad se concentra principalmente en la comparación de los costos y beneficios actualizados y los indicadores de estimación que se evalúan son: valor actual neto (VAN), relación beneficios costos (B/C) y tasa interna de retorno (TIR).

a) Valor Actual Neto (VAN)

Para Calcular el Valor Actual Neto (VAN), se utilizó la fórmula matemática:

$$VAN = \sum_{t=1}^{t=n} \frac{(Bt - Ct)}{(1 + i)^n} > 0$$

Dónde:

Bt: Beneficios totales

Ct: Costos totales

i: Tasa de actualización

n: Número de periodos

Se consideró el criterio de selección del VAN como:

VAN = 0, indica que el proyecto es indeterminado

VAN > 0, indica que el proyecto se acepta

VAN < 0, indica que el proyecto se rechaza

b) Tasa interna de rentabilidad (TIR)

La Tasa Interna de Rentabilidad se calculó de la siguiente manera:

$$TIR = \sum_{t=1}^{t=n} \frac{(BT - CT)}{(1 + i)^n} = 0$$

Dónde:

i: TIR buscada

BT: Beneficios totales

CT: Costos totales

n: Número de periodos

El criterio de selección utilizado fue aceptar si el valor de la Tasa Interna de Rentabilidad era igual o mayor a la tasa de interés seleccionada, en caso contrario se rechazaría.

c) Relación beneficio Costo (B/C)

La Relación Beneficio Costo se calculó de acuerdo a la fórmula matemática siguiente:

$$R B/C = \sum_{t=1}^{t=n} \frac{[BT]}{[CT] (1 + i)^n} < > 0$$

Dónde:

BT: Beneficios totales

CT: Costos totales

i: Tasa de actualización

n: Número de periodos

El criterio de selección que se utiliza es aceptar con una B/C igual o mayor que uno y rechazar si tienen un B/C menor que uno. En términos resumidos:

$B/C > 1$, significa que el proyecto se acepta

$B/C < 1$, significa que el proyecto se rechaza

$B/C = 1$, significa que el proyecto es indeterminado

La B/C representa la utilidad o pérdida por cada peso invertido en el proyecto.

En resumen, la presente investigación se desarrolló en seis fases, las cuales comprenden la regeneración *in vitro* de tres variedades de *S. hispanica* que abarca desde germinación de semillas en condiciones asépticas hasta la aclimatación de las plántulas multiplicadas bajo estas condiciones (1-5) y un análisis financiero (6) que involucra todo el proceso desarrollado (Figura 3).

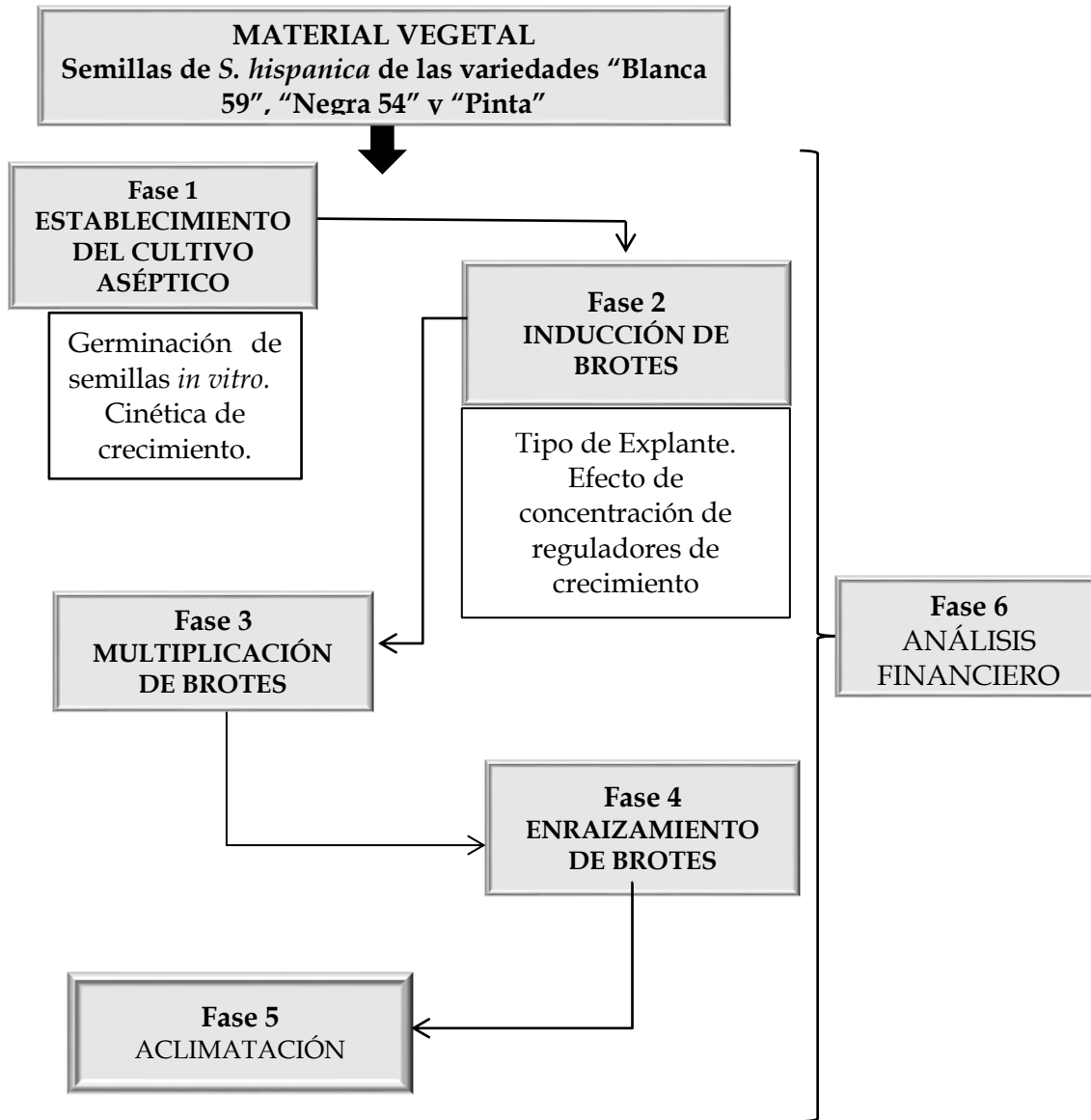


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología empleada en la regeneración *in vitro* de *S. hispanica* (Fases 1-5) y análisis financiero (Fase 6).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento del cultivo aséptico

5.1.1 Desinfección con NaOCl y fungicidas

Después de cuatro semanas del establecimiento de los cultivos *in vitro* con materiales de Chía “Blanca” y “Pinta”, todos los tratamientos con NaOCl y fungicidas impidieron el crecimiento de microorganismos contaminantes (hongos y bacterias). Sin embargo, en ninguno de los tratamientos las semillas mostraron señales de germinación por lo que probablemente resultaron tóxicos. Se observó que el mucílago que liberan las semillas de chía al entrar en contacto con el agua adquirió una coloración blanquecina, producto de la unión con el fungicida, y esa capa formada fue la que impidió la emergencia de la radícula (Figura 4).



Figura 4. Semillas de *Salvia hispanica* Variedad Chía “Blanca 54” tratadas con NaOCl y fungicidas libres de contaminación después de cuatro semanas.

En muchas especies la utilización de fungicidas como agente desinfectante es común en los procesos de desinfección de explantes y semillas. Sin embargo, en algunas otras los fungicidas muestran un efecto negativo en los explantes. En *Melica violacea* se ha reportado efecto negativo provocado por el uso de Captán® (Doll *et al.*, 2013); en esta

especie, se probaron diferentes tratamientos pre-germinativos y observaron que 1 g L⁻¹ de Captán® inhibió el proceso de germinación *in vitro*. Mientras que en trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) la mezcla de cuatro fungicidas (Captán 20% i.a., carboxina 20% i.a., thiram 20.0% i.a. y tebuconazole 0.6% i.a.) afectó la viabilidad de la semilla, ocasionando retraso en la germinación, aun cuando las semillas se sembraron en condiciones que les permitían expresar su más alto potencial de germinación (Lozano *et al.*, 2006). Este efecto concuerda con lo reportado por Jeffs (1986) y Warham *et al.* (1996), quienes señalan la importancia de realizar pruebas preliminares para identificar posibles efectos fitotóxicos en la semilla causados por tratamientos químicos. Por otra parte, el mucilago que secretan las semillas de *S. hispanica* cuando se encuentran en un medio húmedo (Capitani *et al.*, 2015) juega un papel importante, ya que, al realizar la inmersión de las semillas en los tratamientos, el mucilago de Chía tiende a solubilizarse fácilmente en agua formando soluciones altamente viscosas a bajas concentraciones (Ávila *et al.*, 2015) y con la capacidad de formar una película (Muñoz *et al.*, 2012). Cuando las semillas de Chía se lavaron con agua destilada estéril dicha película impide en cierto grado retirar el excedente tanto de NaOCl como de los fungicidas, provocando efectos fitotóxicos en la semilla.

5.1.2 Desinfección sólo con NaOCl

Debido al efecto negativo observado en las semillas de chía con la aplicación del fungicida Captan posterior a la inmersión en NaOCl, se evaluó la efectividad del hipoclorito de sodio como único agente desinfectante. De los nueve tratamientos de desinfección evaluados, la mejor respuesta para el establecimiento del cultivo aséptico se logró cuando las semillas se trataron durante 20 min con 15 y 20% de NaOCl; en estos tratamientos se obtuvo 95 % de supervivencia en chía Blanca sin que se presentara contaminación (Apéndice 2; $P \leq 0.05$; Cuadro 5).

Cuadro 5. Efectividad del hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial en la desinfección y supervivencia de semillas de *Salvia hispanica* Variedad Chía “Blanca 54” después de cuatro semanas de cultivo.

NaOCl (%)	Tiempo de inmersión (min)	Supervivencia [†] (%)
10	10	34 c
10	15	55 b
15	10	91 a
15	15	91 a
15	20	95 a
20	15	94 a
20	20	90 a
30	15	60 b
30	20	52 bc

[†]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5).

Cuando se sumergieron las semillas de Chía durante 15 minutos en 10% de hipoclorito de sodio se presentó contaminación por hongos, tanto en la variedad “Blanca 54” como en la “Pinta”; en la primera la contaminación se presentó a los seis días después de la siembra, mientras que en chía “Pinta” a los 13 días (Figura 5). En ambas variedades la contaminación inició en la periferia de las semillas por lo que el tratamiento no resultó efectivo para la desinfección.

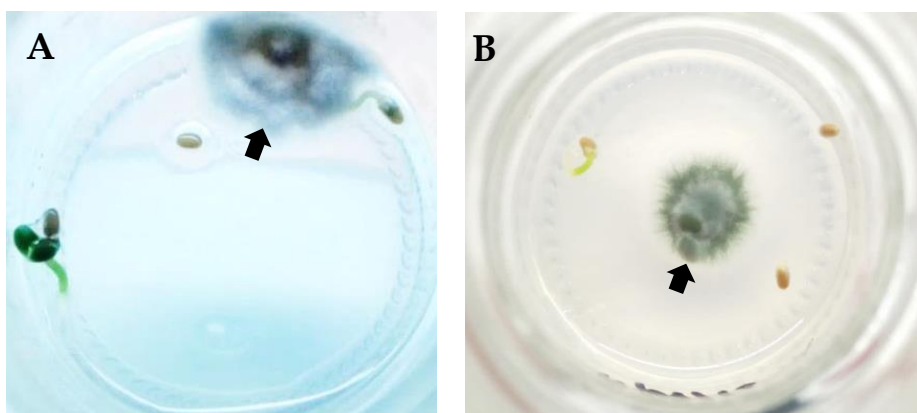


Figura 5. Contaminación por hongos durante el establecimiento *in vitro* de semillas de *Salvia hispanica*. (A) Variedad Chía “Blanca 54” después de seis días de cultivo; (B) Variedad Chía “Pinta” a los 13 días de cultivo.

Conforme se aumentó la concentración de NaOCl se incrementó la efectividad en el control de la contaminación; sin embargo, disminuyó el porcentaje de supervivencia de las semillas germinadas, por lo que a partir del 30% también el NaOCl resultó fitotóxico para las semillas de *S. hispanica*.

Los resultados en la variedad “Pinta” fueron similares a la “Blanca 54”, la utilización de 15 y 20% de NaOCl mostraron una respuesta positiva sobre la desinfección de las semillas ($P \leq 0.05$; Apéndice 3). En promedio, la tasa de supervivencia fue de 94% cuando las semillas se trataron con 15% de NaOCl durante 20 minutos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efectividad del hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial en la desinfección y supervivencia de semillas de *Salvia hispanica* Variedad Chía “Pinta” cultivada durante cuatro semanas.

NaOCl (%)	Tiempo de inmersión (min)	Supervivencia [¶] (%)
10	10	51 c
10	15	66 b
15	10	87 a
15	15	93 a
15	20	94 a
20	15	92 a
20	20	92 a
30	15	56 c
30	20	48 c

[¶]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5).

La respuesta del tratamiento con 30% de NaOCl en la variedad “Pinta” fue eficiente para la desinfección de las semillas, sin embargo, también resultó tóxico como se observó en la variedad “Blanca 54”. Este efecto fue reportado por Borges *et al.* (2009) para *Dioscorea alata* donde al incrementarse la concentración de hipoclorito de sodio, la supervivencia de las semillas disminuye.

Un estudio comparativo de propagación *in vitro* y *ex vitro* de *S. hispanica* reportó que en la germinación de las semillas no se presentaron problemas de contaminación y se

alcanzó una tasa de 100% cuando las semillas se trataron con etanol al 70% por 30 segundos seguida de hipoclorito de sodio comercial (5%, ACE® Procter & Gamble Co., USA v/v) durante 5 minutos (Zayova, 2017). De forma similar, Marconi *et al.* (2013) reportaron la desinfección de semillas por inmersión durante 20 segundos en etanol, seguido de un tratamiento de 10 minutos con una solución de hipoclorito de sodio (4% activo) más 0.1% de Triton® X-100, con lo que la contaminación fue menor de 10%. Los resultados del presente estudio indican 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 15% de NaOCl durante 20 minutos.

5.1.3 Germinación *in vitro* y cinética de crecimiento

5.1.3.1 Germinación *in vitro*

La germinación *in vitro* en las tres variedades de Chía evaluadas (“Blanca 54”, “Negra 59” y “Pinta”) inició a los tres días después de la siembra y se determinó como la emergencia de la radícula. La variedad “Blanca 54” solo mostró un día de diferencia en comparación con las demás (Apéndice 3). Los porcentajes de germinación se comportaron de forma similar; en chía “Negra 59” se presentó el mayor porcentaje de germinación (95 %) y el más bajo se obtuvo en la variedad “Pinta” (92%) ($P \leq 0.05$; Figura 6 y 7).

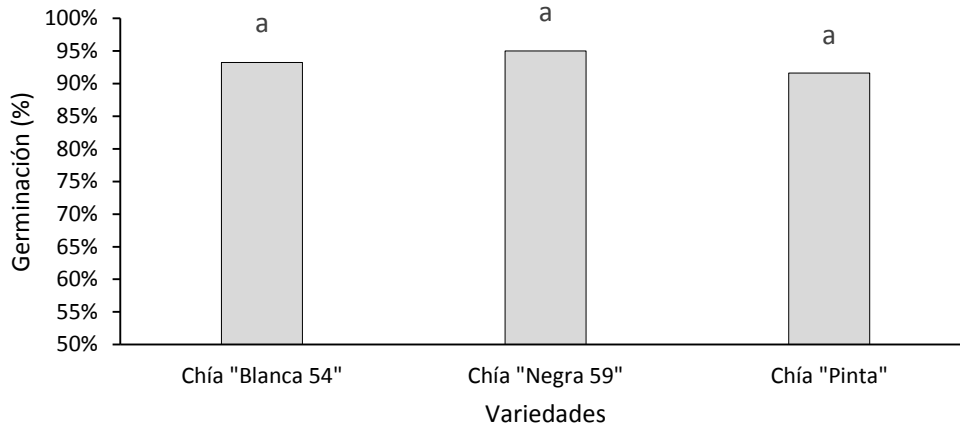


Figura 6. Porcentaje de germinación de tres variedades de *Salvia hispanica* cultivadas en medio MS a la mitad de concentración de sales después de cuatro semanas.

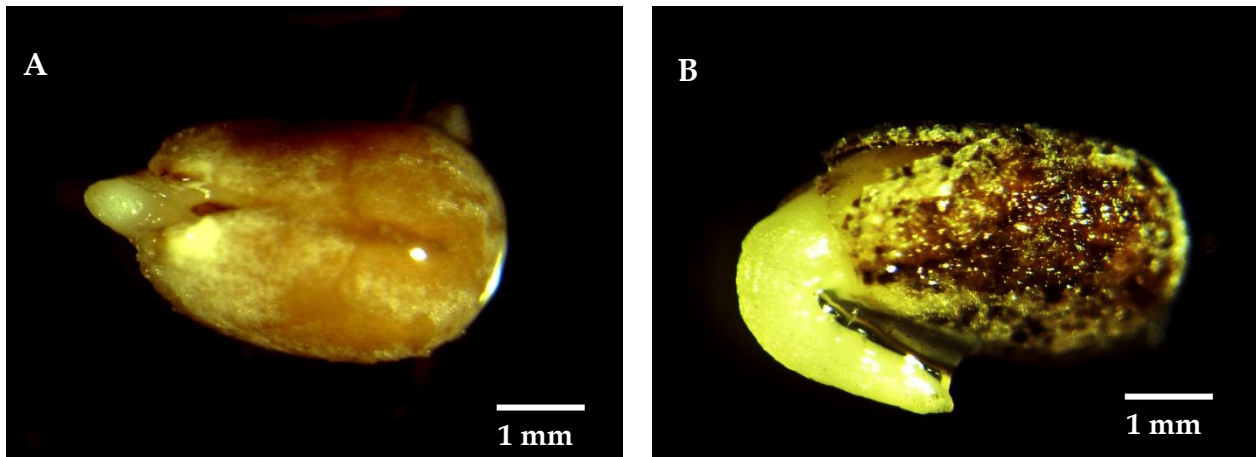


Figura 7. Germinación *in vitro* de semillas de *Salvia hispanica*. (A) Variedad Chía "Blanca" y (B) Variedad Chía "Pinta" a los tres días después de la siembra.

Rovati *et al.* (2012) reportaron ensayos de germinación sobre papel absorbente a 25°C y luz constante, obtuvieron porcentajes de germinación que variaron entre 86 y 87% para semillas blancas y de 86 a 94 % para semillas negras. En otro estudio, Bueno *et al.* (2010) obtuvieron 96% de germinación para semillas blancas y 100% para semillas negras.

Las semillas utilizadas en esta investigación tenían una edad de 30 días de cosechadas cuyo tiempo es idóneo para tener una germinación exitosa, como lo mencionan Buenrostro *et al.* (2016) en un estudio sobre el deterioro de semilla de Chía donde

observaron que el porcentaje de germinación disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento hasta ser nula después de 56 días; esta respuesta se presenta si se usan condiciones de almacenamiento con una humedad de 75% en cajas cerradas herméticamente a una temperatura de 40°C. Por esta razón, es importante utilizar semilla de alta calidad fisiológica almacenada en condiciones de baja humedad (5 - 7%) y temperaturas de 0 a 10 °C (Ellis *et al.*, 1985) o que sean lo más recientemente cosechados acompañado de pruebas de análisis pregerminativos.

5.1.3.2 Cinética de crecimiento

Para conocer la cinética de crecimiento de las plántulas de *Salvia hispanica* en condiciones *in vitro*, se implementó una metodología que consistió en evaluar el comportamiento germinativo para obtener una curva sigmoideal de la radícula y parte aérea. En la radícula se observó un crecimiento potencial entre los días 5 y 15 después de su siembra *in vitro* para las variedades "Negra 59" y "Pinta"; para la variedad "Blanca 54" hubo un ligero desfase en tiempo, sin embargo, fue la que mayor crecimiento de radícula alcanzó (Figura 8).

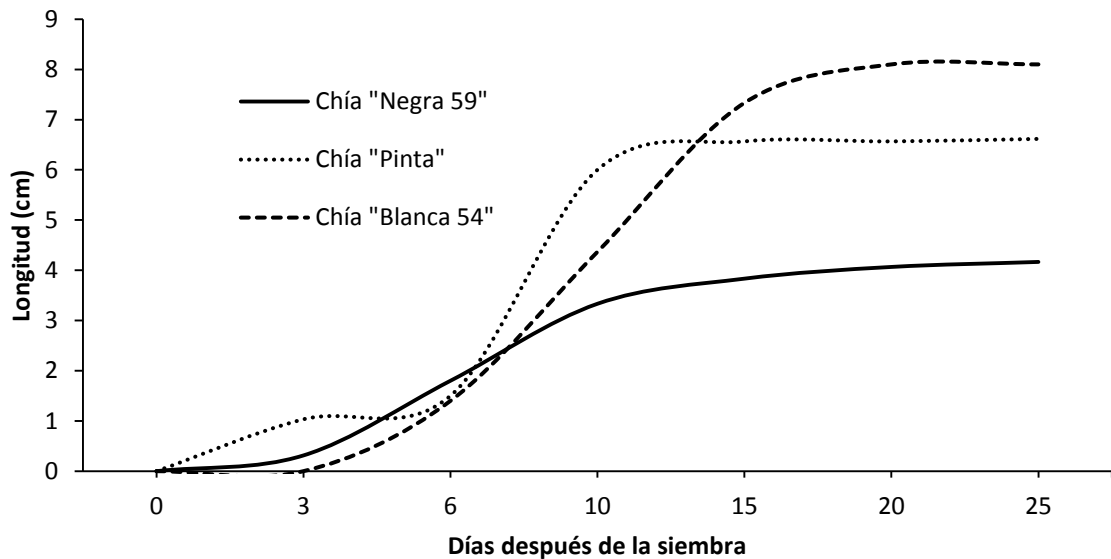


Figura 8. Crecimiento *in vitro* de la radícula de tres variedades de *Salvia hispanica* germinadas en medio MS a la mitad de concentración de sales a los 20 días de cultivo.

En la parte aérea el resultado fue similar en las tres variedades de chía, solo se observó una ligera diferencia de crecimiento para la Variedad "Blanca 54" con 0.5 cm promedio mayor que la Variedad "Negra 59" (Figura 9). Las tres variedades mostraron crecimiento de la plántula a partir del tercer día, el crecimiento continuó siendo exponencial-lineal hasta los 20 días, donde se presentó una desaceleración, y a los 25 días se presentó un ennegrecimiento progresivo en las hojas más maduras. Estos resultados permitieron determinar que el tamaño promedio de las plántulas usadas como donadoras de explantes debe ser de 6 cm de parte aérea con un número promedio de tres entrenudos y 20 días de edad.

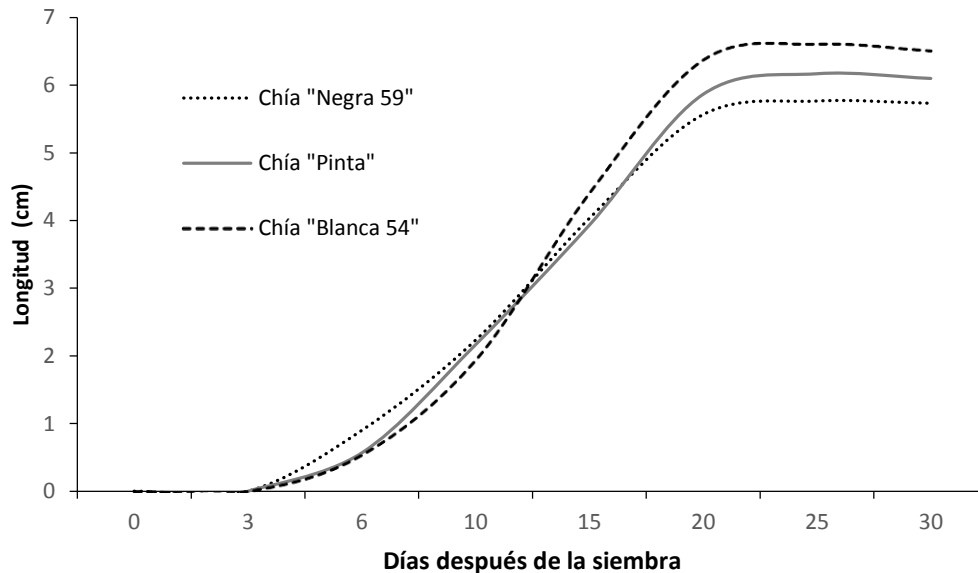


Figura 9. Crecimiento *in vitro* de la parte aérea en plántulas de tres variedades de *Salvia hispanica* germinadas en medio MS a la mitad de concentración de sales a los 30 días de cultivo.

El análisis de varianza mostró que la variedad Chía "Blanca 54" alcanzó una altura de planta promedio significativamente mayor al de las otras variedades (6.37 cm) ($P \leq 0.05$; Apéndice 4; Cuadro 7).

Cuadro 7. Altura de plántulas *in vitro* de tres variedades de *Salvia hispanica* germinadas en medio MS a la mitad de concentración de sales después de cuatro semanas de cultivo.

Variedad	Altura de planta [†] (cm)
“Blanca 54”	6.37 a
“Negra 59”	5.87 b
“Pinta”	5.57 b

[†]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5).

El crecimiento se define como el aumento constante en el tamaño de un organismo, acompañado de procesos como la morfogénesis y la diferenciación celular (Taiz *et al.*, 2015). En ese sentido, el comportamiento de un proceso biológico se puede describir mediante una curva, misma en la que se identifican cinco fases (Hunt, 1990): Fase uno: logarítmica (fase inicial del crecimiento), fase dos: exponencial, fase tres: logarítmica o lineal, fase cuatro: desaceleración negativa y fase cinco: estacionaria. En *Salvia hispanica* el análisis de esta curva permitió evaluar el crecimiento en función del tiempo y ayudó a establecer el momento óptimo de obtención de explantes para la regeneración *in vitro* de cada variedad de chía en estudio.

5.2 Inducción de brotes

El análisis de varianza demostró que el tipo de explante tuvo un efecto significativo sobre la tasa de supervivencia, brotación, el número de brotes obtenidos y el tamaño de los mismos en las tres variedades de *S. hispanica* después de cuatro semanas de cultivo. Los explantes de yema axilar y 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 se obtuvo cuando se utilizaron explantes de yema axilar, en promedio produjeron 17.4 y 12.8 brotes respectivamente ($P \leq 0.05$; Apéndice 5 y 7), mientras en la Variedad “Negra 59” el ápice de brote indujo un promedio mayor de brotes (15.26) ($P \leq 0.05$; Apéndice 6). Respecto al tamaño promedio de los brotes, se observaron ligeras diferencias significativas en la variedad “Negra 59” y “Blanca 54”, y fueron insignificantes en “Blanca 54” (Cuadro 8).

Naser *et al.* (2004) mencionan en su estudio sobre micropropagación de salvia silvestre (*Salvia fruticosa* Mill.) que los brotes de mayor longitud (3.3 cm) así como el mayor número de brotes (3.9) se obtuvieron a partir de explantes nodales. Estos valores son cinco veces menores que lo obtenido en esta investigación. Por su parte, Bisio *et al.* (2016) reportaron que el mejor resultado en el número de brotes de *Salvia corrugata* Vahl. se alcanza cuando se utilizan brotes apicales como explantes. En cambio, cuando se usan segmentos de tallos las respuestas morfogénicas son callos y raíces adventicias, resultados que también fueron reportados por Pinarosa *et al.* (2005) y Marconi *et al.* (2013) en *S. officinalis* y *S. hispanica*, respectivamente.

Cuadro 8. Respuesta del tipo de explante de tres variedades de *Salvia hispanica* en la inducción de brotes después de cuatro semanas de cultivo.

Tipo de Explante	Supervivencia [¶] (%)	Brotación [¶] (%)	Brotes [¶] (Núm)	Tamaño [¶] (cm)
Variedad "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
Variedad "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
Variedad "Pinta"				
Ápice de brote	87.1 a	100 a	12.2 b	1.2 a
Yema axilar	87 a	100 a	12.8 a	1.1 b
Segmento de tallo	81.7 b	0 b	0 c	0 c

[¶]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5).

Marconi *et al.* (2013) mencionan que los segmentos de tallo de *S. hispanica* (sin que especifique la variedad evaluada) generan callos cuando se cultivan tanto en condiciones de luz como de oscuridad, además de la formación de raíces adventicias. Resultados similares fueron consistentes en esta investigación en todos los tratamientos evaluados (Figura 10).

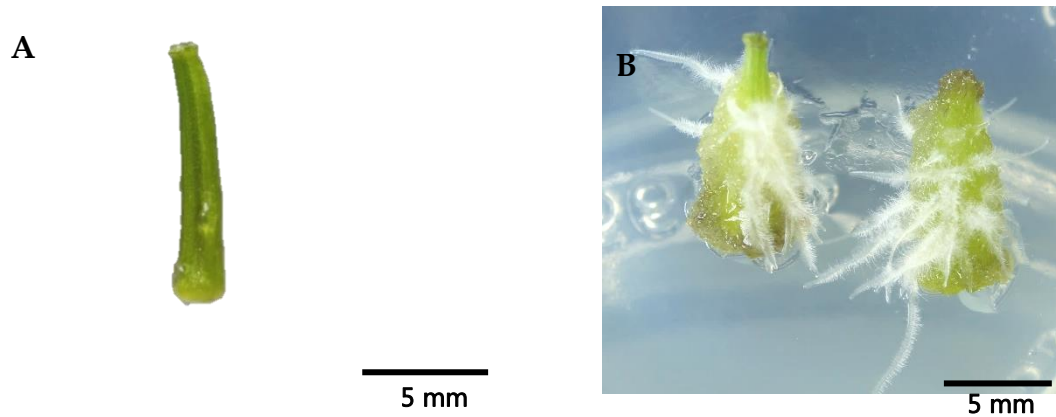


Figura 10. Respuesta *in vitro* de segmentos de tallo en la inducción de brotes de *Salvia hispanica* (A) Explante inicial y (B) Explante después de cuatro semanas de cultivo en medio MS adicionado con 5 μ M de cinetina.

En cuanto al efecto producido por las citocininas se observó que, en la Variedad “Blanca 54” tanto la cinetina como la bencilaminopurina indujeron en los ápices de brotes y la yema axilar la formación de brotes; el mayor promedio de brotes se obtuvo cuando el medio se suplementó con 5 μ M de cinetina con un promedio de 16.3 brotes, mientras que el medio suplementado con 5 μ M de bencilaminopurina, el promedio fue de 11.7 brotes. (Cuadro 9). Se observó que las concentraciones menores o mayores de 5 μ M de ambas citocininas produjeron una tendencia negativa en el número de brotes inducidos en las tres variedades evaluadas.

La respuesta del explante a los tratamientos fue superior a lo reportado por Sharma *et al.* (2014) donde en un medio adicionado con 5 μ M de bencilaminopurina, lograron un máximo de 15 brotes a partir de segmentos nodales de *Salvia splendens*. Para este estudio en *S. hispanica* la tendencia fue similar. Las concentraciones de citocininas (BAP y CIN) causaron un efecto significativo en la longitud de brotes. Cuando el medio no se suplementó con reguladores de crecimiento, se obtuvieron brotes de mayor longitud (1.96 cm). En cambio, en las concentraciones donde se indujo el mayor número de brotes por explante, éstos fueron de un tamaño menor pero más homogéneo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la inducción de brotes *in vitro* de tres variedades de *Salvia hispanica* después de cuatro semanas de cultivo.

Citocininas	μM	Supervivencia [¶] (%)	Brotación [¶] (%)	Brotes [¶] (Núm)	Longitud [¶] (cm)
Variedad "Blanca 54"					
SRC	0	90.7 a	66.7 a	5.5 g	1.96 a
BAP	2.5	90.2 a	66.7 a	10.67 d	1.30 dc
	5	86.0 c	66.7 a	11.72 c	1.01 e
	10	83.6 d	66.7 a	9.33 e	0.94 e
	15	82.0 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
Variedad "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	89.0 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	1.60 b
Variedad "Pinta"					
SRC	0	89.7 a	66.7 a	6.05 e	1.82 a
BAP	2.5	88.0 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	87.0 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 la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5). SRC=Sin reguladores de crecimiento.

En la variedad "Negra 59" se observaron diferencias significativas en los tratamientos de cinetina y bencilaminopurina sobre supervivencia (%), número de brotes y longitud de brote (cm). El mayor número de brotes por explante (14.9) se obtuvo en el medio suplementado con 5 μM de cinetina, mientras que en el medio suplementado con 5 μM

de bencilaminopurina, el promedio fue de 13.5 brotes (Cuadro 9). El medio sin reguladores de crecimiento también promovió la inducción de brotes y fue superior a los obtenidos en los tratamientos con 15 μM de bencilaminopurina y cinetina a excepción de Variedad “Blanca 54”.

En la Variedad “Pinta” el efecto de 5 μM y 10 μM tanto de cinetina como de bencilaminopurina, a diferencias de las otras variedades evaluadas (54 y 59), no existe diferencia significativa sobre la inducción de brotes. Es decir, el medio adicionado con 5 μM de BAP indujo un máximo de 10.1 brotes, mientras que con 5 μM de cinetina fue de 10.5 brotes, y estos a su vez no tienen un efecto diferente de lo producido por 10 μM de BAP con un promedio de 9.88 brotes (Cuadro 9).

Se observó que la concentración óptima de BAP y CIN en las tres variedades de *Salvia hispanica* fue de 5 μM , similar a lo que determinado por Sharma *et al.* (2014) en la propagación *in vitro* de *Salvia splendens*. En esta especie, el número máximo de brotes obtenidos fue solo de 6.6, utilizando segmentos nodales cultivados en medio MS adicionado con 5 μM de BAP después de cuatro semanas cuando se aumentó la concentración de BAP a 7.5 μM disminuyó el promedio de brotes a 4.6.

En las tres variedades de Chía evaluadas las concentraciones de citocininas que indujeron menor número de brotes promovieron una mayor longitud de los mismos y esta respuesta es similar con lo reportado por Zayova *et al.* (2017) para *Salvia hispanica* quien reporta la inducción de brotes con una longitud promedio de 1.4 cm y 2.7 brotes por explantes en un medio MS suplementado con 8.8 μM de BAP, que es consistente con el tamaño promedio obtenido en esta investigación.

La mejor combinación entre tipo de explante y citocininas fue la de yema axilar cultivadas con 5 μM de cinetina; en promedio se indujeron 30 brotes por explante para la Variedad “Blanca 54” (Cuadro 10; Figura 11). Por su parte Zayova *et al.* (2017) reportaron 2.7 brotes por explante con 8.8 μM de BAP utilizando como explantes ápices de brote de plantas germinadas *in vitro* de *Salvia hispanica* de 20 días de edad.

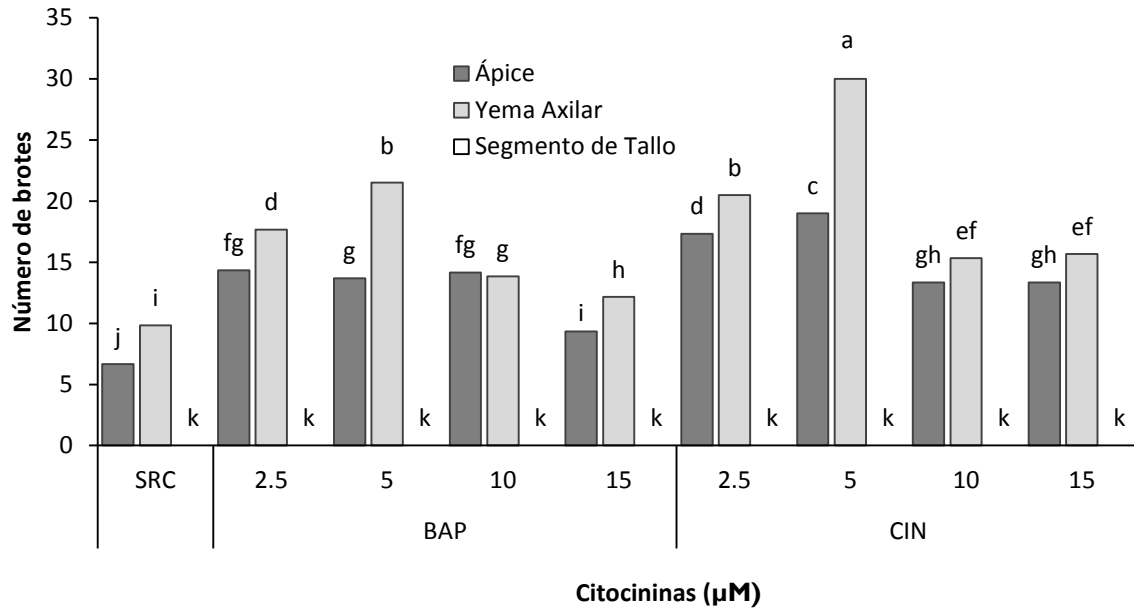


Figura 11. Efecto del tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en el número de brotes *in vitro* de *Salvia hispanica* Variedad Chía "Blanca 54" después de cuatro semanas de cultivo. SRC=Sin reguladores de crecimiento.

Cuadro 10. Efecto de la interacción entre tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la inducción de brotes *in vitro* de *Salvia hispanica* Variedad Chía "Blanca 54" después de cuatro semanas de cultivo.

Tipo de Explante	BAP	CIN	Supervivencia [¶] (%)	Brotación [¶] (%)	Tamaño [¶] (cm)
	μM				
Ap	0	0	91.2 a	100 a	2.01 a
	2.5	-	91.0 a	100 a	1.2 def
	5	-	88.0 cd	100 a	1.1 fgh
	10	-	85.9 ef	100 a	1.05 ghi
	15	-	83.7 fgh	100 a	1.26 h
	-	2.5	91.1 a	100 a	0.97 hi
	-	5	89.2 b	100 a	1.23 def
	-	10	85.4 fg	100 a	1.25 def
	-	15	83.9 fg	100 a	1.53 c
Ya	0	0	91.5 a	100 a	1.92 a
	2.5	-	90.3 b	100 a	1.36 cd
	5	-	88.0 cd	100 a	0.92 ji
	10	-	86.0 ef	100 a	0.83 j
	15	-	83.7 hi	100 a	1.16 efg
	-	2.5	90.8 b	100 a	1.05 ghi
	-	5	90.4 b	100 a	1.31 de
	-	10	85.4 ef	100 a	1.5 c
	-	15	83.1 hi	100 a	1.71 b
Ta	0	0	89.4 b	0 b	0 k
	2.5	-	89.3 b	0 b	0 k
	5	-	82.1 i	0 b	0 k
	10	-	78.9 jk	0 b	0 k
	15	-	78.5 jk	0 b	0 k
	-	2.5	88.5 cd	0 b	0 k
	-	5	82.8 hi	0 b	0 k
	-	10	81.2 j	0 b	0 k
	-	15	78.1 k	0 b	0 k

[¶]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5). Ap= Ápice de brote; Ya= Yema axilar; Ta= Segmento de Tallo

En la Variedad "Negra 59" la mejor combinación entre explante y citocininas fue la yema axilar con 5μM de cinetina, con un promedio de 23.8 brotes por explante (Figura 12). Con las concentraciones más altas de ambas citocininas el número de brotes fue menor y hubo mayor formación de callo en la base del explante que estuvo en contacto con el medio.

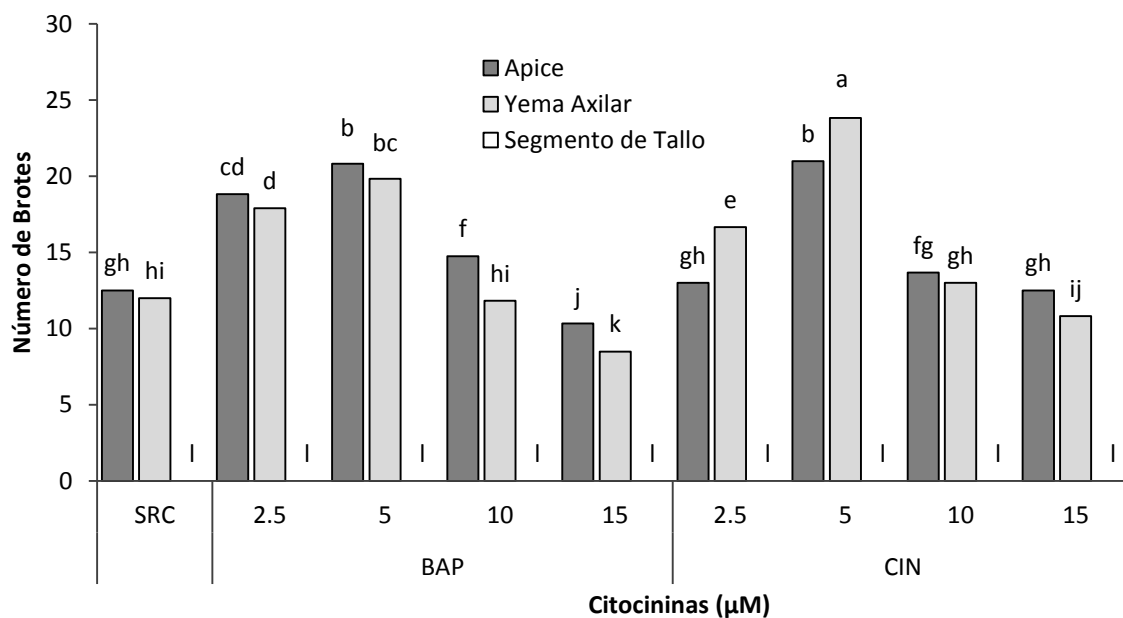


Figura 12. Efecto del tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en el número de brotes *in vitro* de *Salvia hispanica* variedad Chía "Negra 59" cultivados durante cuatro semanas. SRC=Sin reguladores de crecimiento.

Respecto a la longitud de los brotes en esta variedad, se observó que fue inversamente proporcional al número inducido, es decir, la mayor longitud de brotes se alcanzó en las dosis de citocininas donde se indujo menor número de brotes. Por ejemplo, en el tratamiento de yema axilar donde no se usaron reguladores de crecimiento el promedio de la longitud de brotes fue de 2.1 cm, mientras que en el tratamiento con 5µM de cinetina el promedio fue de 0.94 cm (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto de la interacción entre el tipo explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la inducción de brotes *in vitro* de *Salvia hispanica* variedad Chía “Negra 59” cultivados durante cuatro semanas.

Tipo de Explante	BAP	CIN	Supervivencia [¶] (%)	Brotación [¶] (%)	Tamaño [¶] (cm)
	(μM)				
Ap	0	0	90.4 a	100 a	1.90 b
	2.5	-	90.4 a	100 a	1.57 d
	5	-	86.9 de	100 a	0.98 g
	10	-	84.5 i	100 a	1.18 f
	15	-	81.2 j	100 a	1.18 f
	-	2.5	90.6 a	100 a	0.84 h
	-	5	87.9 c	100 a	0.89 gh
	-	10	84.7 hi	100 a	1.22 f
	-	15	80.7 j	100 a	1.47 de
Ya	0	0	90.8 a	100 a	2.19 a
	2.5	-	89.9 b	100 a	1.36 e
	5	-	88.5 c	100 a	1.00 g
	10	-	85.9 fg	100 a	1.01 g
	15	-	81.5 j	100 a	1.15 f
	-	2.5	90.6 a	100 a	0.90 gh
	-	5	90.4 a	100 a	0.99 g
	-	10	85.4 hi	100 a	1.56 d
	-	15	81.4 j	100 a	1.73 c
Ta	0	0	86.2 e	0 b	0 i
	2.5	-	84.2 i	0 b	0 i
	5	-	81.2 j	0 b	0 i
	10	-	80.2 j	0 b	0 i
	15	-	75.5 k	0 b	0 i
	-	2.5	85.8 gh	0 b	0 i
	-	5	84.5 hi	0 b	0 i
	-	10	80.6 j	0 b	0 i
	-	15	75.5 k	0 b	0 i

[¶]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5). Ap= Ápice; Ya= Yema axilar; Ta= Segmento de Tallo

Para la variedad “Pinta” la combinación de yema axilar y 5 μ M de cinetina indujo un promedio de 18 brotes, mientras que con la misma concentración equimolar pero de BAP se obtuvo un promedio de 14 brotes. En cambio, el ápice de brote en combinación de 5 μ M de cinetina indujo un promedio de 14 brotes y con 5 μ M de BAP se obtuvieron en promedio de 16 brotes (Figura 13).

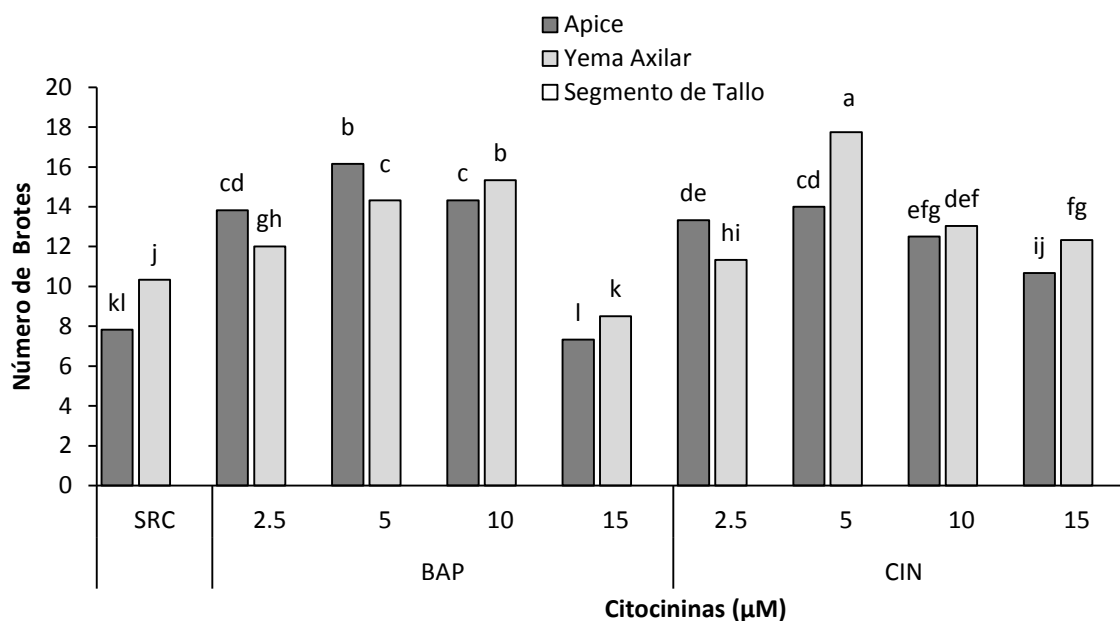


Figura 13. Efecto del tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en el número de brotes *in vitro* de *Salvia hispanica* variedad Chía “Pinta” cultivados durante cuatro semanas. SRC=Sin reguladores de crecimiento.

La longitud de los brotes en la variedad “Pinta” presentó la misma tendencia que en las otras dos variedades; el medio sin reguladores de crecimiento fue donde se obtuvieron brotes de mayor longitud (1.8 cm). Además, los brotes presentaron un tamaño más uniforme en las dosis de reguladores de crecimiento donde el promedio de número de brotes fue más alto (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto de la interacción entre tipo de explante y Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la supervivencia, brotación y tamaño de brotes *in vitro* de *Salvia hispanica* variedad Chía "Pinta" después de cuatro semanas de cultivo.

Tipo de Explante	BAP	CIN	Supervivencia [¶] (%)	Brotación [¶] (%)	Tamaño [¶] (cm)
	(μM)				
Ap	0	0	90.8 b	100 a	1.83 a
	2.5	-	90.7 b	100 a	1.27 c
	5	-	88.2 de	100 a	0.96 f
	10	-	85.7 f	100 a	1.03 ef
	15	-	81.7 jk	100 a	1.02 ef
	-	2.5	90.8 b	100 a	0.78 g
	-	5	89.0 d	100 a	1.03 ef
	-	10	85.4 f	100 a	1.21 cd
	-	15	81.5 jk	100 a	1.54 b
Ya	0	0	92.7 a	100 a	1.81 a
	2.5	-	89.8 c	100 a	1.02 ef
	5	-	87.5 e	100 a	0.97 f
	10	-	85.8 f	100 a	1.13 cde
	15	-	82.3 jk	100 a	1.08 def
	-	2.5	89.3 cd	100 a	1.07 def
	-	5	88.7 d	100 a	0.96 f
	-	10	84.8 f	100 a	0.98 f
	-	15	82.0 jk	100 a	1.44 b
Ta	0	0	85.5 f	0 b	0 h
	2.5	-	83.5 hi	0 b	0 h
	5	-	83.1 hi	0 b	0 h
	10	-	82.0 j	0b	0 h
	15	-	76.6 l	0 b	0 h
	-	2.5	83.8 gh	0 b	0 h
	-	5	83.4 hi	0 b	0 i
	-	10	81.5 k	0 b	0 i
	-	15	75.7 l	0 b	0 i

[¶]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5). Ap= Ápice; Ya= Yema axilar; Ta= Segmento de Tallo.

En *Salvia hispanica* se ha reportado que las citocininas, particularmente BAP o Zeatina, son importantes para la multiplicación *in vitro*. Además, mencionan que la BAP aumenta la formación y tamaño de brotes y esta respuesta similar se ha demostrado en *Salvia santolinifolia* donde la adición de 8.8 y 13.2 μM de BAP produjo el número máximo de brotes (Tour y Khatoon, 2014). El mismo efecto del BAP se reportó en medio MS en la morfogénesis en *S. officinalis* (Wielgus *et al.*, 2011; Cristea *et al.*, 2014). Para la inducción de brotes y crecimiento de plantas de especies de *Salvia* se ha señalado que son necesarias altas concentraciones de citocininas del tipo adenina (Kintzios, 2000). La efectividad de la cinetina en especies del género *Salvia* no se ha reportado con frecuencia. Kabir *et al.* (2014) reportó la obtención de 8.0 brotes en *S. splendens* con la implementación de 4.44 μM de BAP + 2.32 μM de Cinetina. En el presente estudio la mejor respuesta se alcanzó con el uso de cinetina, en las tres variedades de *Salvia hispanica* evaluadas usando como explantes yemas axilares (Figura 14).

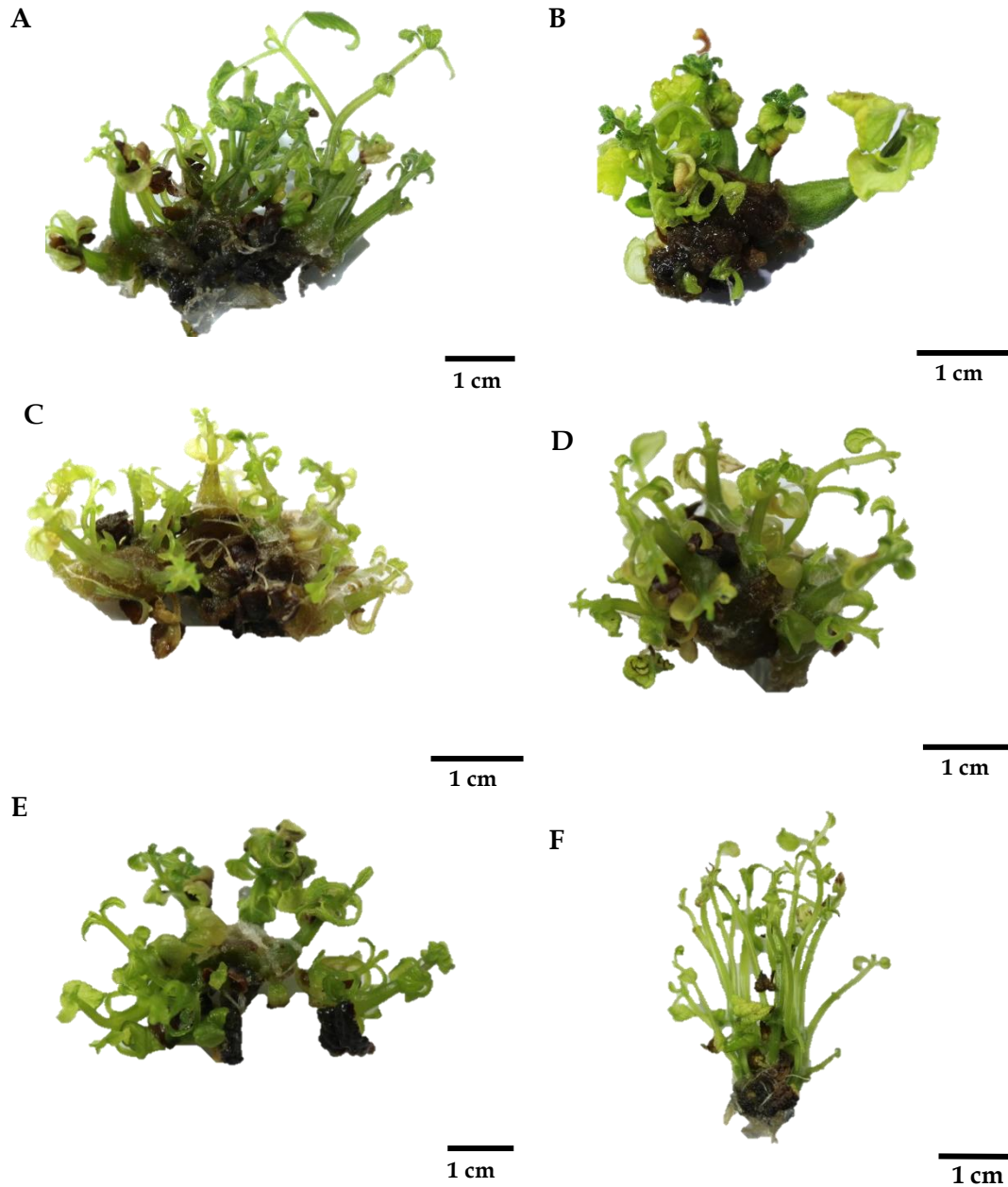


Figura 14. Inducción de brotes en diferentes explantes de *Salvia hispanica* cultivados con 5 μ M de cinetina después de cuatro semanas. (A, C, E) Yema axilar y (B, D, F) Ápice de brote disecados de plántulas germinadas *in vitro* de las variedades (A, B) Chía "Blanca 54", (C, D) Chía "Negra 59" y (E, F) Chía "Pinta".

5.3 Multiplicación de brotes

Los callos de la base de los brotes obtenidos en la etapa de inducción se retiraron y se seleccionaron brotes de un tamaño promedio de 1.5 cm, los cuales se establecieron en

medio MS adicionado con varias concentraciones de BAP y CIN. Las respuestas obtenidas de número de brotes por explante y el tamaño de los mismos fueron afectadas significativamente por las concentraciones de citocininas evaluadas en las tres variedades de chía ($P \leq 0.05$; Apéndices 8- 10). En la variedad “Blanca 54” la mayor cantidad de brotes (28.5 brotes) se obtuvo en el medio suplementado con 5 μM de cinetina. El promedio más bajo se presentó con 1.25 μM de BAP donde el promedio de brotes fue de 15.1; mientras que, en la misma concentración, pero de cinetina se obtuvieron 22.3 brotes. Por ello, para la variedad “Blanca 54” la cinetina tiene un efecto más significativo en la multiplicación de brotes. Los brotes desarrollados en un medio suplementado con 10 y 1.25 μM de BAP y CIN respectivamente, fueron los que mayor altura mostraron (Figura 15).

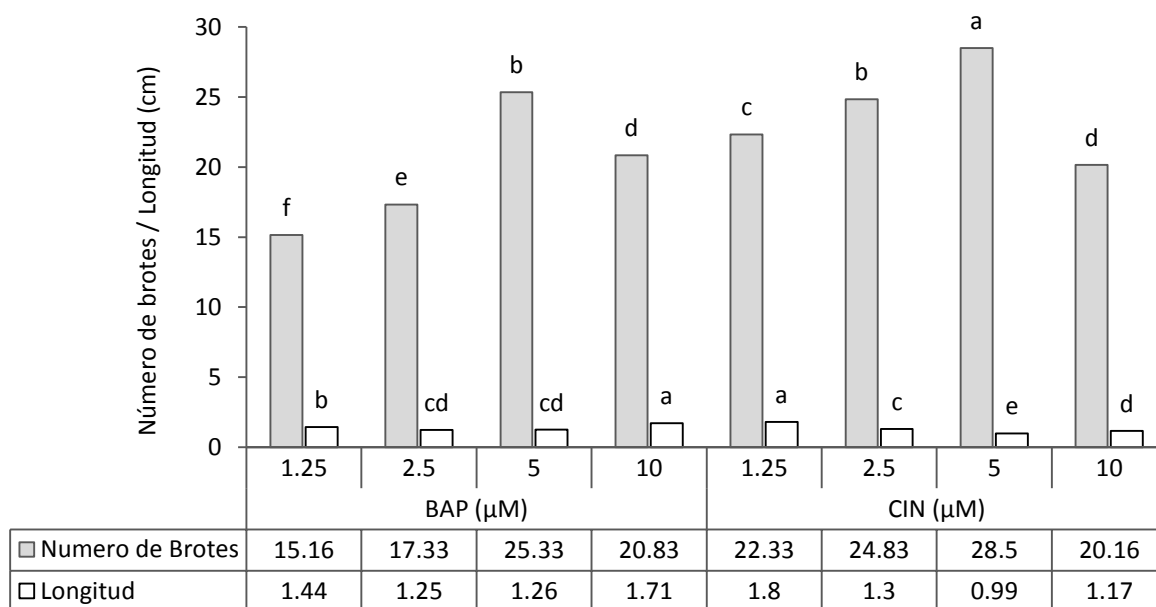


Figura 15. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la multiplicación y longitud de brotes de *Salvia hispanica* variedad Chía “Blanca 54” después de cuatro semanas de cultivo.

En la variedad “Negra 59” la mejor respuesta de número de brotes por explante también se obtuvo con 5 μM de cinetina y en promedio se generaron 23.3 brotes. En cambio, la mayor longitud de los mismos se alcanzó en la dosis de 1.25 μM de BAP

(Figura 16). En la variedad “Negra 59”, en el medio suplementado con 1.25 μM de cinetina se desarrollaron los brotes con la mayor longitud (1.7 cm) (Figura 16).

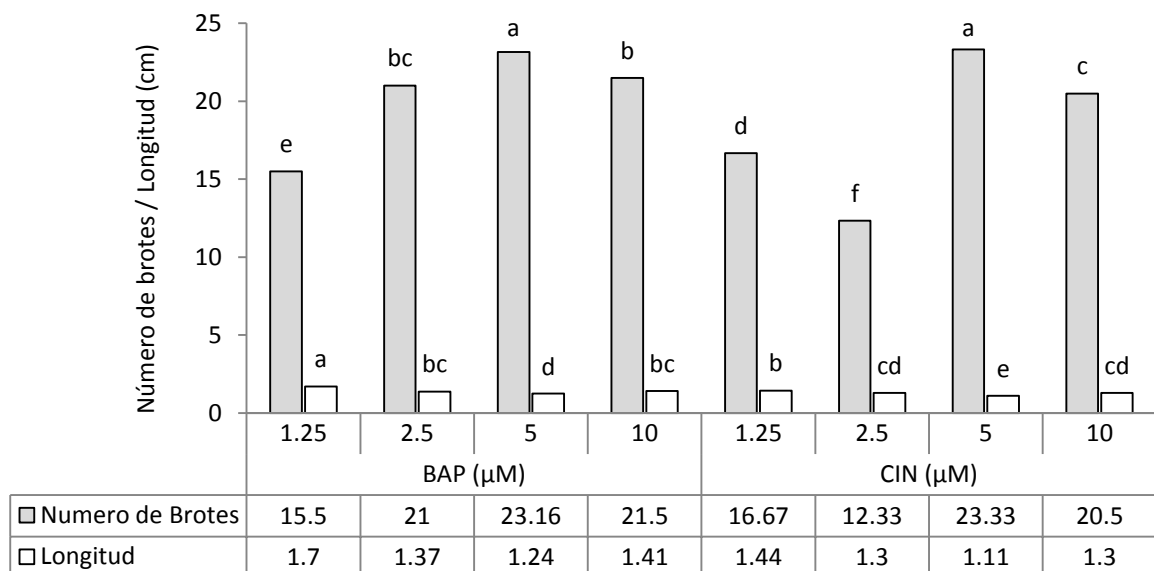


Figura 16. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la multiplicación de brotes *in vitro* de *Salvia hispanica* variedad Chía “Negra 59”, después de cuatro semanas de cultivo.

Cuenca y Amo (1999) reportaron que, durante la multiplicación de brotes en dos especies de salvia (*S. blancoana* y *S. valentina*) la longitud máxima de brotes (2.7 cm) se obtuvo en un medio MS suplementado con 4.9 μM de dos isopentil adenina. Mientras que la tasa más alta de multiplicación se obtuvo en un medio MS suplementado con 4.6 μM de cinetina, obteniendo 4.3 y 5.2 brotes para *S. blancoana* y *S. valentina* respectivamente. Por otro lado, también señala que el aumento de la concentración de cinetina tiende a promover la formación de múltiples brotes. Resultados similares se obtuvieron en esta investigación, por ejemplo, para la variedad “Pinta” el mayor número de brotes se alcanzó en el medio suplementado con 5 μM de cinetina, de forma consistente con la respuesta obtenida en las otras dos variedades (“Blanca 54” y “Negra 59”). En promedio se obtuvieron con esta concentración 28.7 brotes con una longitud de 1.16 cm, mientras que los brotes de mayor longitud se desarrollaron en un medio suplementado con 1.25 μM de BAP (2.33 cm; Figura 17).

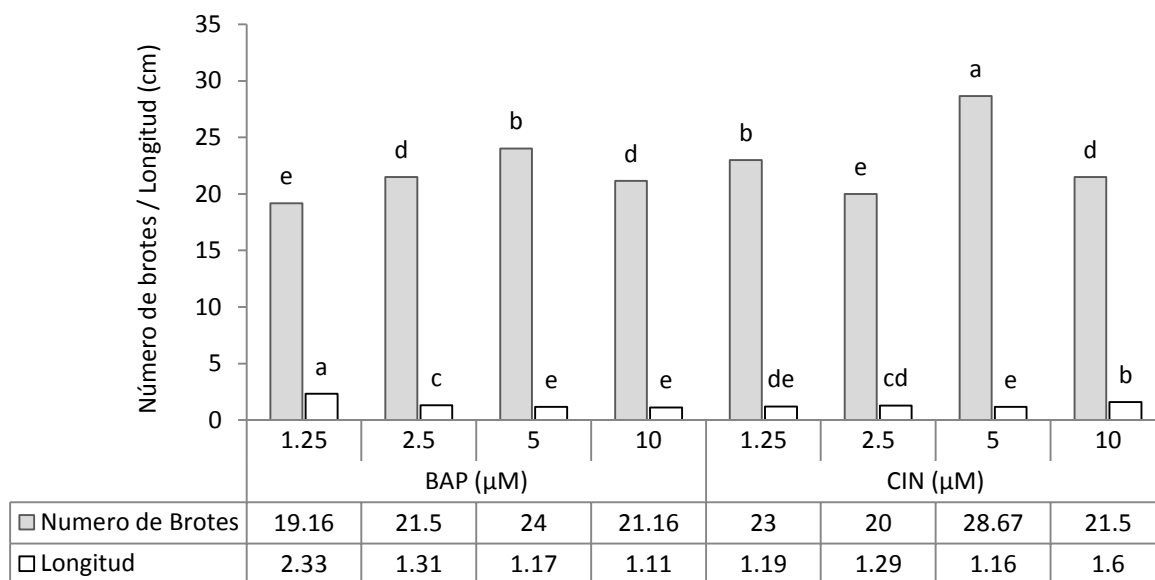


Figura 17. Efecto de Bencilaminopurina (BAP) o Cinetina (CIN) en la multiplicación de brotes de *Salvia hispanica* variedad Chía "Pinta" después de cuatro semanas de cultivo.

Naser (2004) menciona que en *Salvia fruticosa* Mill la multiplicación de brotes se da utilizando 6-bencil aminopurina ($0,75 \mu\text{M}$) con una tasa de multiplicación de 3.8 brotes. En el presente estudio se obtuvieron ocho veces más brotes en esta etapa utilizando el mismo regulador de crecimiento, pero a una concentración de $5 \mu\text{M}$ en brotes de *Salvia hispanica* (Figura 18). Por su parte Santos *et al.* (2002) reportaron para *Salvia officinalis* L. que la combinación de $0.2 \mu\text{M}$ de 2,4-D con $6.6 \mu\text{M}$ de bencilaminopurina, proporcionó el mayor número (3.2) y longitud (4.1 cm) de brotes, Sin embargo, menciona que no hay diferencias con el efecto causado por la combinación de $0.2 \mu\text{M}$ de 2,4-D y $6.96 \mu\text{M}$ de cinetina. Otros autores reportan para la misma especie (*S. officinalis* L.) a la misma concentración de cinetina ($6.96 \mu\text{M}$) un crecimiento de los brotes en la etapa de multiplicación de 1 cm (Olszowska y Furmanowa, 1990) lo cual es dos veces menor a lo alcanzado en este estudio para *Salvia hispanica*.

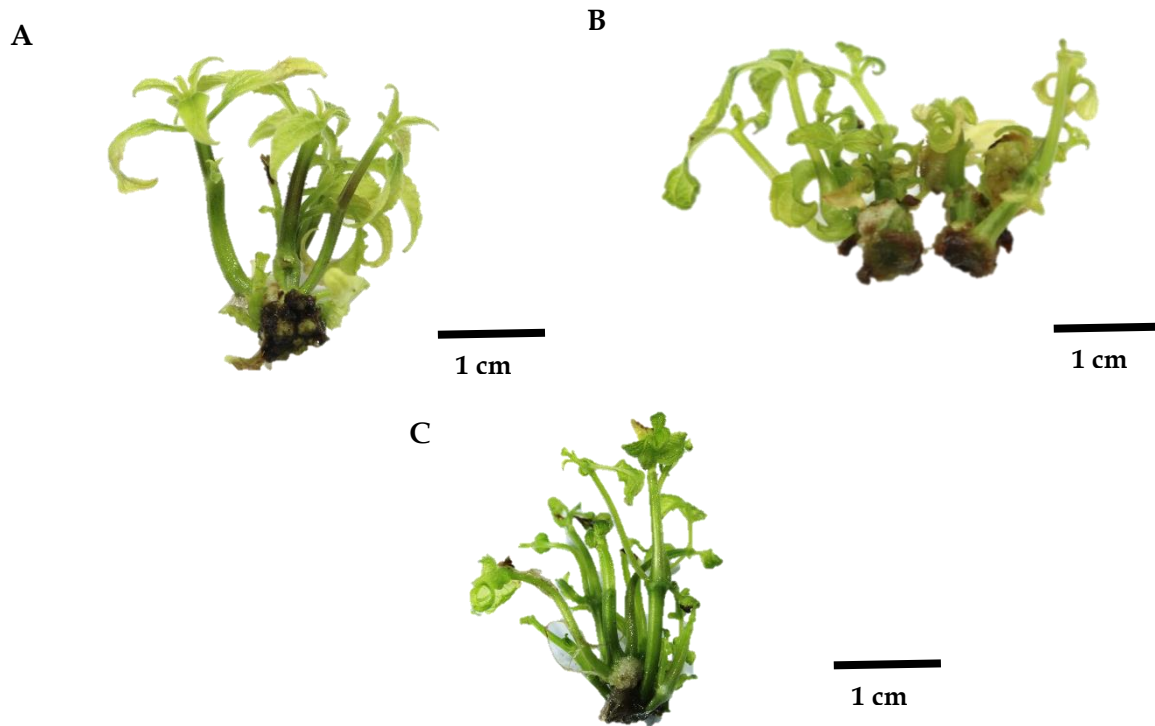


Figura 18. Multiplicación de brotes de tres variedades de *Salvia hispanica* con 5 μ M de cinetina después de cuatro semanas de cultivo. (A) Chía "Blanca 54", (B) Chía "Negra 59" y (C) Chía "Pinta".

5.4 Enraizamiento

Durante el desarrollo de ésta investigación los explantes mostraron gran capacidad morfológica para generar raíces, por lo que en esta etapa sólo se establecieron dos tratamientos utilizando ácido indol acético. Los resultados del ANOVA mostraron diferencias significativas en los efectos producidos por el AIA en el enraizamiento de tres variedades de *Salvia hispanica* (Apéndices 11-13). El enraizamiento en las tres variedades inició desde el tercer día después de la siembra en el medio suplementado con 0.57 μ M de AIA y a los seis días en el medio sin reguladores de crecimiento. En la variedad "Blanca 54", se obtuvieron en promedio 16.75 raíces, 17.95 para la variedad "Negra 59" y 17.6 para la variedad "Pinta", después de 2 semanas de evaluación, mientras que los brotes sembrados en el medio sin reguladores de crecimiento solo se generaron 8.5 raíces en la variedad "Blanca 54", 10.5 en la variedad "Negra 59" y 10.35 en la variedad "Pinta" (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto del ácido indol acético (AIA) en el enraizamiento *in vitro* de brotes de tres variedades de *Salvia hispanica* después de dos semanas de cultivo.

AIA (μM)	Enraizamiento [¶] (%)	Raíces [¶] (Núm.)	Longitud de raíz [¶] (cm)
Variedad "Blanca 54"			
0	100 a	8.55 b	1.55 b
0.57	100 a	16.75 a	2.65 a
Variedad "Negra 59"			
0	100 a	10.5 b	1.33 b
0.57	100 a	17.95 a	2.84 a
Variedad "Pinta"			
0	100 a	10.35 b	1.74 b
0.57	100 a	17.60 a	3.11 a

[¶]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.5).

El AIA controla diversos procesos fisiológicos como la elongación y división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y la gravedad (Vega, 2016). Además, promueve la inducción de raíces por lo que es ampliamente usado en diferentes especies para la propagación asexual (Amador, 2012).

Zayova *et al.* (2017) reportaron para *Salvia hispanica* que, en la etapa de inducción de raíz, el 100% de los brotes produjeron raíz cuando se cultivaron en medio MS a la mitad de la concentración de sales y suplementado con 42.31 μM de ácido indol butírico (IBA); la longitud promedio de las raíces fue de 1.5 cm después de 14 días de cultivo. Los resultados obtenidos en esta investigación, después de dos semanas de cultivo en medio MS a la mitad de la concentración de sales y suplementado con 0.57 μM de AIA, proporcionó el doble de raíces con una longitud promedio de 2.65 cm para la variedad "Blanca 54", 2.84 cm para la variedad "Negra 59" y 3.11 cm para la variedad "Pinta" (Figura 19).

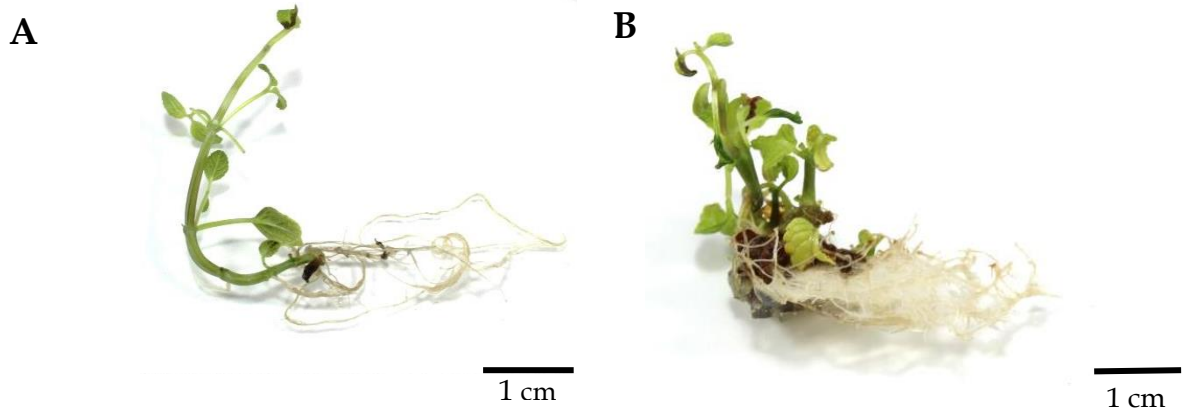


Figura 19. Enraizamiento *in vitro* de brotes de *Salvia hispanica* variedad Chía "Blanca 54" después de dos semanas de cultivo. (A) Raíces formadas sin reguladores de crecimiento; (B) Raíces inducidas con 0.57 μM de AIA.

Kabir *et al.* (2014) mencionaron que brotes *S. splendens* obtenidos *in vitro* responden bien a la inducción de raíz con bajas concentraciones de IBA no así cuando son superiores a 12.5 μM . Esto indica que el efecto a esas dosis resulta tóxico para los brotes. Tanto *S. splendens* como *S. hispanica* han mostrado gran capacidad de enraizamiento *in vitro*. Sharma *et al.* (2014) señalaron que *S. splendens* para desarrollar raíces adventicias, requiere la aplicación de auxinas exógenas para aumentar el tamaño de las mismas, y reportan que en un medio MS al 50% suplementado con 13.5 μM de AIA, da un promedio de 30.6 raíces adventicias con una longitud de 5.9 cm, mientras que en esta investigación con el uso de 0.57 μM de AIA se obtuvo 50% menos tanto del número de raíces como del tamaño de éstas.

5.5 Aclimatación

Para definir las condiciones de aclimatación, en este estudio se probaron dos tamaños de planta (5 y 8 cm). Se determinó que 8 cm fue el tamaño de plántula enraizada óptimo para la climatización con una tasa de supervivencia de hasta el 80% ($P \leq 0.05$; Apéndices 14-16). La misma tendencia de respuesta de supervivencia se observó en las tres variedades evaluadas después de cuatro semanas (Figura 20). Cuando se sembraron plántulas enraizadas con un promedio de 5 cm de altura, se presentó ennegrecimiento

del área foliar a los ocho días de observación, y a los 12 días se extendió en toda la plántula.

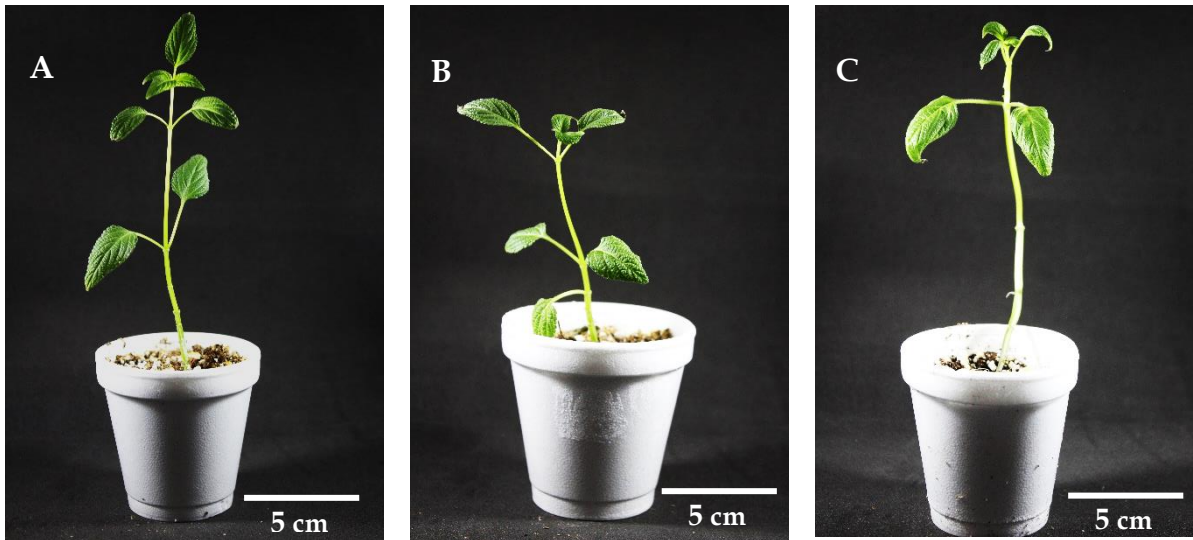


Figura 20. Aclimatación de plantas de tres variedades de *Salvia hispanica*. (A) Variedad Chía “Blanca 54”, (B) variedad Chía “Negra 59” y (C) variedad Chía “Pinta” después de cuatro semanas de aclimatación.

El tamaño de plántula resultó una variable significativa en la aclimatación de las tres variedades de Chía; se observó que se complica la supervivencia cuando se usaron plántulas de un tamaño menor de 5 cm, con un porcentaje de 20% para las variedades “Pinta” y “Blanca 54”, y en un 10% de supervivencia para la variedad “Negra 59”. Por otro lado, cuando se usan plántulas mayores a 8 cm, el porcentaje es significativamente mayor, de 80% para la Chía “Pinta”, 70% para las variedades “Blanca 54” y “Negra 59” (Figura 21).

El número de hojas y la altura de las plántulas aclimatadas fue mayor a medida que se incrementó la altura después del transplante. Como lo mencionan Chacon *et al.* (2005) los valores negativos del incremento del número de hojas, de plántulas removidas del cultivo *in vitro*, está relacionado a un proceso de senescencia, causado entre otros factores, por el estrés de un cambio de atmósfera saturada de agua permanentemente a una donde la humedad relativa es sustancialmente menor (Figura 22).

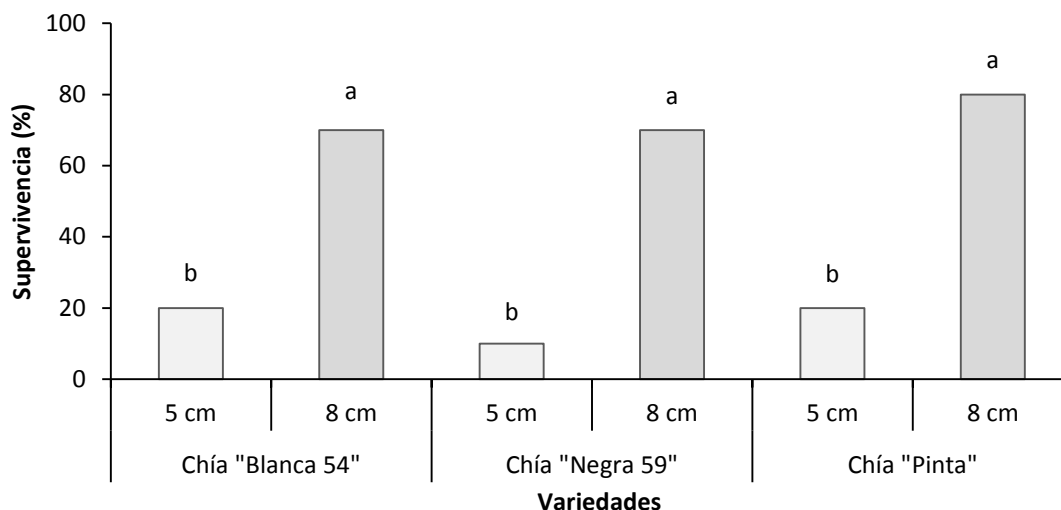


Figura 21. Supervivencia de plantas de tres variedades de *Salvia hispanica* obtenidas *in vitro* después de cuatro semanas de aclimatación.

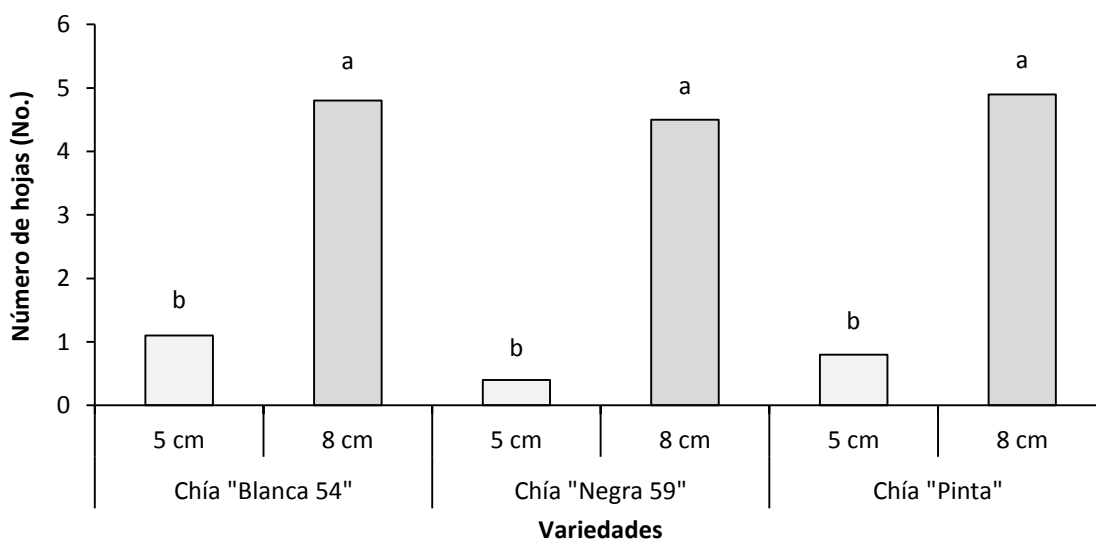


Figura 22. Número de hojas presentes en plantas de tres variedades de *S. hispanica* después de cuatro semanas de aclimatación.

Sharma *et al.* (2014) reportaron el proceso de aclimatación exitoso de plántulas desarrolladas y enraizadas de *Salvia splendens* donde 90 % de supervivencia fue posible después de cuatro semanas, mientras que Kabir *et al.* (2014) reportaron para la misma especie un 80% de plántulas aclimatadas después de 30 días de observación. En *S.*

guaranitica se ha reportado un porcentaje de aclimatación exitosa del 98% de plántulas enraizadas después de 6 meses de subcultivo obteniendo 35 plantas aclimatadas por explante después de 3 meses (Echeverrigaray *et al.*, 2010). Por su parte Zayova *et al.* (2017) mencionaron para *S. hispanica* una supervivencia de 95 %. Para *S. brachyodon* se ha reportado que la aclimatación de brotes enraizados se dio con una tasa de supervivencia de 75 % sin que se presentara alguna deformación morfológica (Mišić *et al.*, 2006). Dichos autores no especifican la altura a la cual fueron aclimatadas las plántulas.

5.6 Análisis financiero

Llevar a cabo un análisis financiero resulta fundamental para valorar la situación y el ejercicio económico y financiero existente de una empresa, detectar problemas y aplicar soluciones adecuadas para solventarlos (Rosillon *et al.*, 2009). Los estudios financieros en el ámbito del cultivo *in vitro* están centrados especialmente en especies de tipo ornamental, forestal o con alguna utilidad medicinal, como lo son especies para la producción de metabolitos secundarios (Haisnain *et al.*, 1987; Pérez y Jiménez, 2011); sin embargo, es de vital importancia la realización de un análisis financiero en todas las especies propagadas por esta técnica, pues resulta trascendental conocer la viabilidad económica-financiera del protocolo de regeneración en cuestión. Para *S. hispanica* no se tiene reportado algún análisis de este tipo, por lo que se llevó a cabo uno con información proporcionada por cotizaciones realizadas a diferentes empresas proveedoras de equipo y reactivos, para laboratorios de investigación en México, en base a lo empleado en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (Cuadro 14). Para llevar a cabo un proyecto de propagación *in vitro* de *Salvia hispanica* se necesita una inversión total de \$ 2,103,903.00 con un periodo de recuperación a los 3 años (Cuadro 14; Apéndice 17)

Cuadro 14. Análisis financiero del establecimiento *in vitro* de *Salvia hispanica*.

CONCEPTO	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO	TOTAL	FUENTE		TOTAL
					SOCIOS	GOBIERNO	
ACTIVOS FIJOS							
Terreno	m ²	200	1,300	260,000	260,000		260,000
Proyecto arquitectónico	Proyecto	1	4,800	4,800		4,800	4,800
Edificio	Lote	1	256,000	256,000		256,000	256,000
Cercado	Lote	1	10,000	10,000		10,000	10,000
Cuarto de crecimiento	Equipo	1	18,244	18,244		18,244	18,244
Cuarto de transferencia	Equipo	1	189,656	189,656		189,656	189,656
Cuarto de preparación de medios	Equipo	1	77,000	77,000		77,000	77,000
Cuarto de autoclave	Equipo	1	129,290	129,290		129,290	129,290
Cristalería	Equipo	1	481,722	481,722		481,722	481,722
Instrumental	Equipo	1	7,650	7,650		7,650	7,650
Equipo de óptica	Equipo	1	8,500	8,500		8,500	8,500
Mobiliario y equipo	Equipo	1	18,000	18,000		18,000	18,000
SUBTOTAL				1,460,862	260,000	1,200,862	1,460,862
CAPITAL DE TRABAJO							
Semilla	Kilogramo	1	100	100		100	100
Reactivos	Lote	1	195,941	195,941		195,941	195,941
Insecticidas	Lote	1	1,500	1,500		1,500	1,500
Fungicidas	Lote	10	2,850	28,500		28,500	28,500
Gastos de ventas	Año	10	5,000	50,000		50,000	50,000
Laboratorista	Jornal	520	500	260,000	260,000		260,000
Luz	Año	10	2,200	22,000	22,000		22,000
Gasolina	Año	10	8,500	85,000	85,000		85,000
SUBTOTAL				643,041	367,000	276,041	643,041
TOTAL				2,103,903	627,000	1,476,903	2,103,903
				100%	29.8%	70.2%	

5.6.1 Costos de producción

En los que refiere a los costos de producción a nivel nacional, México ofrece costos significativamente menores en comparación con países representantes de la industria en los siguientes rubros: investigación y desarrollo en biotecnología, pruebas clínicas, pruebas de producto y fabricación de productos farmacéuticos (Trejo, 2010), por ejemplo, en comparación con Estados Unidos de Norteamérica, los costos de la implementación de un laboratorio para propagación *in vitro* serían más bajos en México, dado especialmente por la mano de obra calificada (Deberth y Zimmermann *et al.*, 1991) Conforme a las condiciones de estudio, los costos de producción anual por lote de 300,000 plantas de *Salvia hispanica*, es de \$3.2 al primer año y de \$2.1 en los siguientes años de evaluación, por planta aclimatada después de 16 semanas desde inducción, con un tamaño promedio de 12 cm de altura; es importante señalar que al momento no existe reportado el costo que generaría producir una planta *in vitro* de esta especie. Sin embargo, Kaur y Sandhu (2015) describen la estimación de costos para la micropropagación de la caña de azúcar en cinco etapas en la India, con un costo unitario de US\$ 0.12 que a la tasa de cambio actual serían \$2.16. Por otro lado, según lo reportado por Chen (2016) para un análisis de costos para el cultivo *in vitro* de *phaleanopsis* el costo más grande corresponde a mano de obra calificada para transferir plántulas (61.7%), seguido por el costo eléctrico del aire acondicionado (23%). Para este estudio el costo más representativo lo constituyen la mano de obra (41%) seguido de los reactivos utilizados (31%), mientras que la electricidad representa el 13% de los costos totales.

5.6.2 Ingresos

El precio de plantas propagadas *in vitro* varía según la especie, el destino de mercado y sobre todo la demanda de esta, para este estudio se estimó un precio de \$5 el cual es el mínimo de venta en varias empresas de esta índole, lo que arroja un ingreso de \$1,500,000.00 considerando una producción de 300,000 plantas por año. Este valor se

alcanza al segundo año de operación, dado que en el primero se consideran 5 meses de gracia, en los cuales no se tiene producción, proporcionando un ingreso al primer año de \$1, 000,000. 00.

5.6.3 Punto de equilibrio

El punto de equilibrio en esta investigación se obtuvo por año, que es cuando se registran los ingresos por venta de planta de *S. hispanica* (Cuadro 15).

Cuadro 15. Punto de equilibrio de la producción de planta de *S. hispanica* mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

	Año 1	Año 2
P.E. Valor de ventas (\$)	\$ 322,455.58	\$ 229,413.13
P.E. Vol. de producción (No)	64,491	45,883
P.E. % de ventas	32%	15%

El análisis se proyectó a diez años (Apéndice 17-18), en el primer año se requiere un valor de ventas de \$322,455.58, que se obtiene con un volumen de producción de 64,491 plantas que representa un 32 % del volumen de ventas, punto en el cual no se generan ganancias ni pérdidas.

5.6.4 Flujo de efectivo

El flujo de efectivo que genera la venta de las plantas al primer año de trabajo es de \$365,609.00. Este estado financiero, sirve para la toma de decisiones en la propagación *in vitro* ya que muestra la dinámica del efectivo con relación en sus entradas y salidas, así como su aplicación en un periodo determinado (Apéndice 18).

5.6.5 Indicadores financieros

A partir de los datos económicos del cultivo *in vitro* de *S. hispanica* se obtienen los indicadores financieros que muestran la rentabilidad de esta técnica, a su vez proporciona una herramienta teórica para facilitar recomendaciones.

a. Valor Actual Neto

Dentro de los indicadores financieros, el Valor Actual Neto (VAN) arrojo un resultado de \$1, 830,743.00, valor positivo, que, de acuerdo a la regla de decisión, realizar una inversión en este proyecto es favorable para el valor total del capital, a una tasa de descuento del 12%, por lo tanto, se concluye que la técnica descrita para el cultivo *in vitro* de *S. hispanica* es rentable (Cuadro 16).

b. Relación Beneficio Costo

La relación beneficio costo es de 1.278, que de acuerdo a la regla de decisión para este indicador se concluye que por cada peso invertido se tendrá una ganancia de 28 centavos por lo que el proyecto es rentable (Cuadro 16).

c. Tasa Interna de Rentabilidad

Considerando una tasa de rendimiento mínima aceptable de 12%, la tasa interna de retorno es de 37.63%, que representa la tasa de rendimiento a la cual el Valor Actual Neto de un valor de cero, es decir este proyecto excede el rendimiento requerido y representa una oportunidad de inversión rentable (Cuadro 16).

Cuadro 16. Indicadores financieros de evaluación del cultivo *in vitro* de *S. hispanica*.

Indicadores de Evaluación	Valores Obtenidos
Valor Actual Neto (VAN)	1,830,734
Relación Beneficio Costo (B/C)	1.278
Tasa Interna de Retorno (TIR)	37.63%

Con base en lo anterior, del capítulo financiero se concluye que la aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de *S. hispanica* es rentable bajo las condiciones de este estudio. Puesto que, como lo menciona Chen (2016) la rentabilidad de un protocolo de propagación está influenciado en gran parte por la especie en

cuestión y por los subcultivos que existan en él, es decir al aumentar el número de subcultivos se eleva el costo de producción y viceversa. En este sentido, una forma esencial de promover la capacidad de trabajo calificado y disminuir los costos significativamente, es la capacitación de la mano de obra. Además, mejorar la tasa de multiplicación de brotes, el desarrollo de mejores tecnologías como nuevos métodos de corte, nuevo criterio de selección para brotes útiles y controlar el entorno, son formas prometedoras para reducir costos.

Por lo que bajo el esquema descrito en esta investigación es posible emplear de manera comercial el protocolo generado para propagar *in vitro* material de *S. hispanica* Con la posible aplicación en otras especies de *Salvia*.

En la figura 23 se muestra el diagrama de flujo que sintetiza la metodología empleada y los resultados significativos en la regeneración *in vitro* de *S. hispanica*.

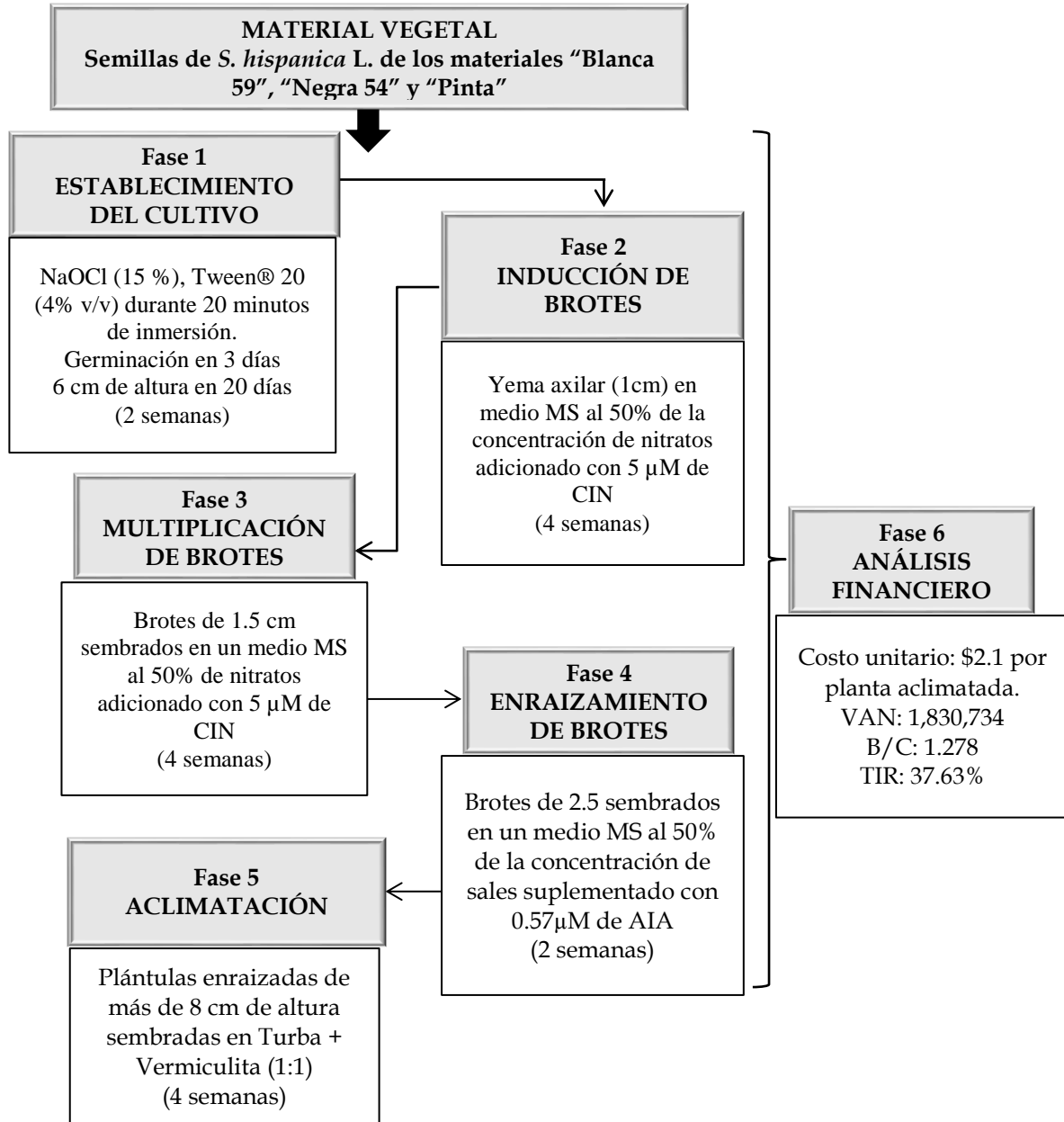


Figura 23. Diagrama de flujo de la metodología empleada y resultados significativos en la regeneración *in vitro* de *S. hispanica* (Fases 1-5) y análisis financiero (Fase 6).

VI. CONCLUSIONES

- El establecimiento del cultivo aséptico de las tres variedades de *Salvia hispanica* se logró a partir de la desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio comercial (15 %), Tween® 20 (4% v/v) durante 20 minutos de inmersión.
- El empleo de Fungicidas para el establecimiento del cultivo aséptico de semillas de *Salvia hispanica* tiene efectos negativos en la germinación.
- La germinación de las tres variedades de *Salvia hispanica* (Chía “Blanca 54”, Chía “Negra 59” y Chía “Pinta”) se presentó tres días después de la siembra en un medio MS a la mitad de la concentración de sales, alcanzando una altura superior a los 5.5 cm a los 20 días de cultivo.
- La utilización de ápices de brote y yemas axilares de 1 cm de longitud como explantes es eficiente para la regeneración *in vitro* de las tres variedades evaluadas de *Salvia hispanica* (Chía “Blanca 54”, Chía “Negra 59” y Chía “Pinta”); sin embargo, los segmentos de tallo formaron únicamente callo y raíces adventicias.
- La organogénesis directa de las tres variedades de *Salvia hispanica* (Chía “Blanca 54”, Chía “Negra 59” y Chía “Pinta”) se obtuvo con la utilización de Cinetina o Bencilaminopurina.
- La mejor respuesta de inducción de brotes en las variedades de Chía “Blanca 54”, Chía “Negra 59” y Chía “Pinta” se obtuvo sembrando yemas axilares como explantes en un medio MS a la mitad de la concentración de nitratos, con 5 μ M de Cinetina, cultivados durante 4 semanas. Se lograron en promedio 25 brotes por explante.
- La multiplicación de brotes en las variedades de Chía “Blanca 54”, Chía “Negra 59” y Chía “Pinta” fue mejor con 5 μ M de Cinetina en un medio MS a la mitad de la concentración de nitratos, cultivados durante 4 semanas.
- Con el sistema de regeneración *in vitro* desarrollado es posible obtener en un lapso de 3 meses, 448 brotes por explante para la Variedad Chía “Blanca 54”, 322 brotes

para la variedad Chía “Negra 59” y 308 brotes para la variedad Chía “Pinta” en un medio suplementado con 5 μ M de Cinetina.

- El enraizamiento de los brotes de *Salvia hispanica* (Chía “Blanca 54”, Chía “Negra 59” y Chía “Pinta”) fue posible en un medio MS a la mitad de la concentración de sales adicionado con 0.57 μ M de Ácido Indolacético.
- La supervivencia de *Salvia hispanica* Variedad Chía “Blanca 54” y Chía “Negra 59” durante la aclimatación fue de 70% y para la variedad Chía “Pinta” de 80%; en las tres variedades se emplearon plántulas de 8 cm de altura.
- El costo del cultivo *in vitro* de *S. hispanica* es de \$2.1 por planta aclimatada.
- El punto de equilibrio en función del volumen de producción se encuentra cuando se produce un total de 64,491 plantas al año que representa el 32% del volumen producido.
- La relación beneficio costo es de 1.278, que indica que el cultivo es rentable, y que por cada peso invertido se tendrá una ganancia de 28 centavos
- Con base en los indicadores financieros calculados (VAN, TIR y R B/C) es viable la producción comercial de *Salvia hispanica* (Chía “Blanca 54”, Chía “Negra 59” y Chía “Pinta”) *in vitro* bajo las condiciones de estudio, como un protocolo de regeneración para fines comerciales.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros métodos de desinfección para reducir al máximo la contaminación *in vitro* de *Salvia hispanica*.
- Mejorar la tasa de germinación de semillas de *Salvia hispanica* mediante pruebas de viabilidad y calidad fisiológicas *in vivo* previas a los tratamientos de desinfección.
- Establecer otras condiciones de cultivo *in vitro* a partir de explantes de frutos para inducir la regeneración *in vitro* de *Salvia hispanica*.
- Evaluar métodos de corte y selección de brotes útiles para la propagación *in vitro* de *Salvia hispanica* con el fin de disminuir costos de producción.

VIII. LITERATURA CITADA

- ACEE. Asociación Civil de Estudios Económicos. 2014. Caracterización y diagnóstico de la cadena de valor de la chía en la Argentina. <http://www.acee.org.ar/> (Consulta: Marzo 2017).
- Altuve, J., G. 2004. El uso del valor actual neto y la tasa interna de retorno para la valoración de las decisiones de inversión. *Revista Actualidad Contable Faces*. 20: 2-5.
- Amador, K., A., J. Díaz G., S. Loza C., E., y C. Bivián. 2012. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*. 35:109-131.
- Arellano, J., and J. Galicia 2007. Yield and plant and panicle traits in amaranth in response to nitrogen and seeding rate. *Agricultura Técnica en México*. 33: 251-258.
- Ávila, G., R., J. Álvarez R., E.J. Vernon C., H. Carrillo N., and C. Pérez A. 2015. Viscoelasticity of chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage dispersion in the vicinity of an oil-water interface. *Food Hydrocolloids*. 49:200-207.
- Ayerza, R. 2008. Chia as a new source of omega-3 fatty acids Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention. Totowa, N. J. California. USA. 571 p.
- Ayerza, R., y W. Coates 2006. Chía redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas. Del Nuevo extremo. Buenos Aires, Argentina. 52 p.
- Barthlott, W., C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meuse, I. Theisen, and H. Wilhelmi. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot J Linn Soc*. 126: 237 - 260.
- Bisio, A., D. Fraternalb., A. M. Schitoc., A. Parricchia., F. Dal., P., Donata., M., Giacomini, B. Ruffonif, and N. De Tommasi. 2016. Establishment and analysis of *in vitro* biomass from *Salvia corrugata* Vahl. and evaluation of antimicrobial activity. *Phytochemistry*. 122: 276-285.
- Bochicchio, R., R. Labella, M. Saraceno, and M. Amato. 2015. Agronomic evaluation of the chia *Salvia hispanica* L. An ancient crop from the new world. *Italian Journal of Agronomy*. 22: 11-16.
- Bonilla, M., M. Mancipe C., and A. Aguirre. 2016. *In vitro* conservation: a perspective for the management of phylogenetic resources. *Rev. de Inv. Agraria y Ambiental*. 28: 15-22.
- Borges, M., E. Estrada A., I. Pérez R., y S. Meneses R. 2009. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Discorea alata*. I. clon coroqueño *Rev. Colombiana Biotec*. 11: 127-135.
- Bueno, M., O. Di Sapio, M. Barolo, H. Busilacchi, M. Quiroga, y C. Severin. 2010. Análisis de la calidad de los frutos de *Salvia hispanica* L. Lamiaceae comercializados en la ciudad de

- Rosario Santa Fe, Argentina. Boletín Lat. y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. 9: 1-9.
- Buenrostro, R., R. Vera J., y M. Martínez E. 2016. Efecto de la germinación de semillas de chíá (*Salvia hispanica* L.) sobre su calidad nutrimental. Inv. Des. en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2: 7-1.
- Cahill, J., P. 2003. Ethnobotany of Chia, *Salvia hispanica* L. Lamiaceae Economic Botany. 57: 604-618.
- Cahill, J., P., and Ehdade B. 2005. Variation and heritability of seed mass in chia *Salvia hispanica* L. Genetic Resources and Crop Evolution. 52: 201-207.
- Calva, G. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro., DGSCA-UNAM. 1: 202-226.
- Capitani, M., V. Ixtaina, S. Nolasco, and M. Tomas. 2013. Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia *Salvia hispanica* L. nutlets from Argentina. Journal of the Science of Food and Agriculture. 93: 3856-3862.
- Capitani, M., L. J. Corzo R., L. A. Chel G., D. A. Betancur A., S. M. Nolasco, and M. C. Tomas. 2015. Rheological properties of aqueous dispersions of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage Journal of Food Engineering. 149: 70-77p.
- Carrillo, S. C., M. Gutierrez C., M. Muro V., y R. Martinez H. 2017. La chíá como súper alimento y sus beneficios en la salud de la piel. El residente. 12:18-28.
- Chacon, A., L. Gómez, S. Torres, y F. Saborio. 2005. Aclimatación de plántulas de Yampí (*Dioscorea trifida*) y Ñame (*D. alata*) producidas *in vitro*. Agronomía Costarricense. 29: 47-58.
- Chen C. 2016. Cost analysis of plant micropropagation of *Phaleonopsis*. Plant Cell Tiss Organ Cult. 126: 167-175.
- COFUPRO, Cordinacion Nacional de las Fundaciones Produce 2013. La Chíá un cultivo muy rentable http://www.cofupro.org.mx/cofupro/cofupro_web.php?idseccion=1226 (Consulta: Mayo, 2017).
- Cristea, O. T., M. Prisecaru, S. Ambarus, M. Calin, C. Brezeanu, M. Brezeanu, and G. Florin. 2014. Vegetative multiplication of *Salvia officinalis* L. for the obtaining of true totypic plants. Biologie. 23: 104-107 p.
- Cuenca, S., and J. B. Amo M. 1999. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 36: 225-229 p.
- Debergh, P. C., and R. Zimmerman H. 1991. Economic considerations in micropropagation de Metsenaere (R.E. A. S) Spriger Dordrecht. 7: 94-109.

- Debergh, P. C., and J. Maene L. 1981. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hortic.* 14: 335-345.
- Di Sapia, O., M. Bueno, H. Busilacchi, M. Quiroga, y C. Severin. 2012. Caracterización morfológica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L. Lamiaceae. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas.* 11: 249-255.
- Doll, U., M. Fredes V., y C. Soto V. 2013. Efecto de distintos tratamientos pregerminativos sobre la germinación de seis especies nativas de la región mediterránea de Chile. *Idesia.* 31: 721-747.
- Dutta, G., and I. Yasuomi. 2006. *Plant Tissue Culture Engineering.* Springer. Dordrecht, The Netherlands. 480 p.
- Echeverrigaray, S., R. Postinger C., and L. Bavaresco A. 2010. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. Through axillary shoot proliferation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53: 1453-1470p.
- Edwin, G., M. Hall, and D. Klerk. 2008. *Plant Propagation by tissue culture.* Springer. Dordrecht, The Netherlands. 504 p.
- Ellis, R., T. D. Hong E., and H. Roberts. 1985. *Handbook of Seed Technology for Genebanks and Methodology.* Handbooks for Genebanks: Ed. 2. IBPGR Secretariat, Roma. 210 p.
- 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).
- Garay, U., y M. González. 2007. *Fundamentos de finanzas.* Ediciones IESA. Caracas, Venezuela. 290 p.
- García, C., R. Gómez, Y. Alvarado, M. Zoe, M. Hernández, J. Vílchez, M. Reyes, B. Pérez, y C. Alexis. 2016. Efecto de la densidad de inoculación de embriones somáticos en la obtención de plántulas de plátano cv. 'FHIA-21' AAAB. *Cultrop.* 37: 335-342.
- George, E., M. Hall A., and G. De Klerk J. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition.* Springer. 501 p.
- Gillet, H. 1981. Le chia graine mucilagineuse mexicaine, fait son apparition en France. *J. Agric. Trad. Bot.* 28: 183-187.
- Gómez, J. H., and S. M. Colín. 2008. Morphological characterization of chia (*Salvia hispanica*). *Revista Fitotecnia Mexicana.* 31:105-113.
- Gómez, L., y M. Nader. 2012. Productos elaborados con semillas de chía y sésamo: composición química, aceptabilidad, satisfacción y conocimiento sobre sus propiedades nutricionales. *Actualización en nutrición.* 13: 231-238.
- Gómez, O. 2001. *Contabilidad de costos.* McGraw-Hill. España. 150 p.

- González, A. M. 2013. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. 1ra Edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Costa Rica. 204 p.
- Hansen, D., y M. Mowen M. 2003. Administración de costos contabilidad y control. 5ª ed. Thomson Learning México. 952 p.
- Hartmann, H., y D. Kester. 1999. Propagación de plantas: Principios y prácticas. 7ª ed. México D.F.: Compañía Editorial Continental S. A. 760 p.
- Hasnain, S., and W. Cheliak. 1987. Tissue culture in forestry: economic and genetic potential. Division of biological sciences. National Research of Canada. Ottawa, Canada. 525 p.
- Hentry, H., M. Mittleman, and P. McCrohan. 1990. Introducción de la chía y la goma de tragacanto en los Estados Unidos. En Avances en Cosechas Nuevas. Prensa de la Madera, Pórtland, USA. 320 p.
- Hernández, M. R. 2011. Análisis Económico de Experimentos Agrícolas con Presupuestos parciales: re-enseñando el uso de este enfoque. La Calera. 2: 40-48.
- Hernández, A., A. Hernández V., y A. Hernández S. 2005. Formulación y evaluación de proyectos de inversión.: Ediciones Paraninfo, México. 452 p.
- Hernández, J., y S. Miranda C. 2008. Caracterización morfológica de chía *Salvia hispanica*. Rev. Fitotecnia. 31:105-113.
- Horngren, T., G. Rajan V., y S. Datar M. 2012. Contabilidad de costos: un enfoque gerencial. Pearson educación. México. 728 p.
- Hunt, R. 1990. Basic growth analysis, Plant growth analysis beginners. London Unwin Hyman Ltd. 1st edition. London UK. 111 p.
- INSP, Instituto Nacional de Salud Pública. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. <https://www.insp.mx/> (Consulta: Enero 2017).
- Jamboonsri, W., Phillips T., D. Geneve R., L. Cahill P., and D. Hildebran F. 2012. Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L., a new & ω -3 source. Genetic Resources and Crop Evolution. 59: 171-178.
- Jeffer, K. A. 1986. Seed treatment. Second Edition. The British Crop Protection Council. Thornton Heath, United Kingdom. 332 p.
- Kabir, M. H., A. N. Mamun K., 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. Atomic Energy Research Establishment. 23: 51-54.
- Kaur, A., and J. S. Sandhu. 2015. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Costanalysis for agri-business industry. Plant Cell Tiss Organ Cult. 120:339-350.

- Kintzios, S. 2000. *Salvia* sp. Tissue culture, somatic embryogenesis, micropropagation and biotransformation. In Kintzios S. (ed.), Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Approaches: The genus *Salvia*. Harwood Publishers, Amsterdam. 243-250 p.
- Kirchhoff, P. 1960. Mesoamérica: Sus Límites Geográficos, Composición Étnica y Caracteres Culturales. Supl. Rev. Tlatoani. 3: 15.
- Lemes, C. M., C. A. Rodríguez F., y I. Echevarría. 2000. Establecimiento de un método de propagación vegetativa para *Salvia officinalis* L. Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 5: 10-13.
- Lenz, R. 2010. Análisis de costos en evaluaciones económicas en salud: aspectos introductorios. Rev. médica de Chile. 138, 88-92.
- Lloyd, G., and B. McCown. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*), by use of shoot tip culture. Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-427.
- Lobo, R., M. Alcocer, W. Rodriguez, M. Morandini y M. Devani. 2011. Desarrollo del cultivo de Chía en Tucumán República de Argentina. Avance Agroindustrial. 32:27-30.
- Lozano, N., M. Mezzalama, A. Carballo C., y A. Hernández L. 2006. Efectos de Fungicidas en la Calidad Fisiológica de la Semilla de Trigo Harinero (*Triticum aestivum* L.) y su eficacia en el control de *Fusarium graminearum* Schwabe [*Gibberella zeae* (Schwein.) Petch.] y *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker [*Cochliobolus sativus*. Ito y Kurib.] Rev. Mexicana de Fitopatología. 24:115-121.
- Marconi, P. L., M. López C., J. Meester, C. Bovjin, and M. Álvarez A. 2013. *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus. Bio. Vegetal. 13: 2074.
- Martínez, M. 2016. Revisión bibliográfica *Stevia rebaudiana* Bert. Bertoni. Cultivos Tropicales. 36: 5-15.
- Mete, M. R. 2014. Valor Actual Neto y Tasa de Retorno: Su Utilidad como Herramientas para el Análisis y Evaluación de Proyectos de Inversión. Fides et Rev. de Difusión cultural y científica de la Universidad La Salle en Bolivia. 7: 67.
- Mišić, D., D. Grubišić, and R. Konjević. 2006. Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. Biologia Plantarum. 50: 473-476.
- Morales, A. 2008. Pronósticos mediante redes neuronales artificiales y modelos arima: el caso de los cetes en México. UNAM, México. 794 p.
- Mroginski, L., P. Sansberro, y E. Flaschland. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Echenique, Ediciones INTA. Argentina. 340 p.
- Muñoz, L. A., J. M. Aguilera, L. Rodríguez T., A. Cobos, and O. Díaz. 2012. Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate., Journal of Food Engineering. 111: 511-518.

- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-66.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum.* 15: 473-493.
- Naser, A., A. Fawzia., M. Jawadb N., S. Karama R., and A. Shibli. 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae.* 100: 193-202.
- Nava, M. A. 2009. Análisis financiero: una herramienta clave para una gestión financiera eficiente. *Rev. venezolana de Gerencia.* 14: 48-56.
- Niedz, R. P., and Evens T. J. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant.* 43: 370-381.
- Olszowska, O., and M. Furmanowa. 1990. Micropropagation of *Salvia officinalis* by shoot buds. *Planta Med.* 56: 637.
- Pence, V. 2011. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 47:176-187.
- Pérez, N., y E. Jiménez. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante cultivo *in vitro* *Biotecnología vegetal.* 14: 195-211.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores.: Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 301 p.
- Pinarosa, A., I. Morone F., C. Ruta, and R. D'Elia. 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science.* 169: 29-36.
- Radice, S. 2004. Morfogénesis *in vitro* en Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. INTA. Buenos Aires, Argentina. 226 p.
- Ramage, C. M., and R. Williams R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant.* 38: 116-124.
- Ramírez, D. N. 2008. Contabilidad administrativa. Mc GrawHill. México. 595 p.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to tissue culture. Science Publishers. USA. 367 p.
- Roca, W., y L. Mroginsky. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 1039 p.
- Rosillon, N., y A. Marbelis. 2009. Análisis Financiero: una herramienta clave para una gestión financiera eficiente *Rev. Venezolana de Gerencia.* 48: 606-628.
- Rovati, A., E. Escobar, y C. Prado. 2012. Particularidades de la semilla de chía. *Rev. Avance Agroindustrial.* 33: 39-43.
- Rubio, P. 2007. Manual de Análisis Financiero. Universidad de Málaga, España. 220 p.

- Ruiz, A., y H. Araméndiz. 2017. Efecto del almacenamiento en la calidad fisiológica de semilla de moringa *Moringa oleifera* Lam. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 20: 79-89.
- Santos, P., R. Seabra, P. Andrade, and M. Fernandes F. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). Plant Science. 162: 981-987.
- SAS, Institute 2003. The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Sathyanarayana, B. N., and D. Verghese B. 2007. Plant Tissue Culture Practices and new experimental protocols. I. K. Internacional Publishing House. New Delhi, India. 292 p.
- Sava, C. 2016. *Gentiana lutea* L. Considerations for a successful protocol on micropropagation. Stu. comunicări. Științele Naturii. 32: 187-190.
- Seguí, J. M. 2010. Biología y biotecnología reproductiva de las plantas. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 448 p.
- Sharma, S., A. Shahzad, J. Kumar, and M. Anis. 2014. *In vitro* propagation and synseed production of scarlet salvia (*Salvia splendens*). Rend. Fis. Acc. Lincei. 25:359-368.
- SIAP, Sistema de información Agroalimentario y Pesquero 2016. <https://www.gob.mx/siap/> (Consulta: Agosto 2017).
- Skala, E., M. Wojciech and H. Wysokińska. 2014. Tanshinones in Culture of *Salvia Przewalskii* Maxim *in Vitro*. Acta Biologica Cracoviensia S. Botanica. 56: 23-30
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. In: Proceedings 6th International Congress on Soilles Culture. Wageningen. The Netherlands. 633-650 p.
- Taiz, L., E. Zeiger I., M. Moller, and A. Murphy. 2015. Plant Physiology and Development. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland, CT. 855 p.
- Tour, J., and K. Khatoon. 2014. *In vitro* regeneration of *Salvia santolinifolia*. Pakistan Journal of Botany. 46. 325-328 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. Actualidades Ornitológicas. 119 7-21 p.
- Trejo, S. 2010. La Biotecnología en México, situación de la biotecnología en el mundo y situación de la biotecnología en México, su factibilidad de desarrollo, Centro de estudios de biotecnología aplicada, Instituto Politécnico Nacional (IPN). México. 1512 p.
- Trigiano, R., and D. Gray. 2000. Plant Tissue Culture Concepts and laboratory Exercises. CRC Press United States of America. 455 p.
- Trigiano, R., and D. Gray. 2011. Plant Tissue Culture, Development, Biotechnology. CRC Press United States of America. 573 p.
- Valenzuela, A., y R. Valenzuela. 2014. Ácidos grasos omega-3 ¿Cómo aportarlos? Rev. chilena de nutrición. 41:205-211.

- Vega, C., P. Canchignia M., H. González M., y M. Seeger. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*. 37: 33-39.
- Warham, E., J. Butler L., y D. Sutton B. 1996. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT, México, D. F. 84 p.
- Webera, C., W. Gentrya H., S. Kohlheppa E., and M. Peter R. 1991. The nutritional and chemical evaluation of Chia seeds. *Ecology of Food and Nutrition*. 26: 23 -33.
- Wielgus, K., A. Luwanska, M. Szalata, S. Mielcarek, A. Gryszczynska, D. Lipinski, and R. Slomski. 2011. Phytochemical estimation of Sage (*Salvia officinalis* L.) cultivated *in vitro* flavonoids and phenolic acids. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*. 1: 8-11 p.
- Zayova, E., M. Nikolova, L. Dimitrova, and M. Petrova. 2017. Comparative study of *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* propagated *Salvia hispanica* chia plants: morphometric analysis and antioxidant activity. *AgroLife Scientific Journal*. 5: 166-173.
- Zhang, S., and G. Lemaux P. 2004. Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci*. 23: 325-335.

IX. APÉNDICE

1. Composición química del Medio de Cultivo Básico de Murashige y Skoog (1962) (MS)

SALES INORGÁNICAS	
Macronutrientes	
	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
VITAMINAS	
Myo-inositol	100
Acido Nicotínico	0.5
Piridoxina.HCl	0.5
Tiamina.HCl	0.1
Sacarosa	30

2. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la supervivencia *in vitro* en *Salvia hispanica* Var Chía "Blanca 54"

Fuente de variación	Supervivencia (%)
NaOCl+ tiempo	0.53*
Error	0.021
C.V.	19.87
R ²	0.71
Media	0.73

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

3. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la supervivencia *in vitro* en *Salvia hispanica* Var Chía "Pinta"

Fuente de variación	Supervivencia (%)
NaOCl+ tiempo	0.39*
Error	0.006
C.V.	10.57
R ²	0.86
Media	0.75

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

4. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la altura de planta de *S. hispanica* germinadas *in vitro* de las variedades Chía "Blanca 54", Chía "Negra 59" y Chía "Pinta".

Fuente de variación	Altura de planta (cm)
Variedad	1.63*
Error	0.097
C.V.	5.27
R ²	0.57
Media	5.93

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

5. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de brotes *in vitro* de *S. hispanica* Var Chía "Blanca 54".

Fuente de variación	Numero de Brotes
Citocinina	353.90*
Explante	8982.67*
Citonina/Explante	875.63*
Error	0.59
C.V.	7.47
R ²	0.99
Media	10.28

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

6. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de brotes *in vitro* de *S. hispanica* Variedad Chía "Negra 59".

Fuente de variación	Numero de Brotes
Citocinina	300.63*
Explante	8213.37*
Citonina/Explante	779.24*
Error	0.59
C.V.	7.69
R ²	0.99
Media	10.06

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

7. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de brotes *in vitro* en diferentes explantes de *S. hispanica* Variedad Chía "Pinta".

Fuente de variación	Numero de Brotes
Citocinina	116.72*
Explante	5633.33*
Citonina/Explante	494.99*
Error	0.37
C.V.	7.37
R ²	0.99
Media	8.33

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

8. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la multiplicación de brotes *in vitro* de *S. hispanica* Variedad Chía "Blanca 54".

Fuente de variación	Numero de Brotes
Citocinina	230.42*
Error	0.47
C.V.	3.15
R ²	0.97
Media	21.81

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

9. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la multiplicación de brotes *in vitro* de *S. hispanica* Variedad Chía Negra 54.

Fuente de variación	Numero de Brotes
Citocinina	359.88*
Error	0.51
C.V.	3.74
R ²	0.96
Media	19.22

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

10. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la multiplicación de brotes *in vitro* de *S. hispanica* Variedad Chía "Pinta".

Fuente de variación	Numero de Brotes
Citocinina	105.5*
Error	0.54
C.V.	3.3
R ²	0.93
Media	22.37

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

11. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de raíz *in vitro* de *S. hispanica* Variedad Chía "Blanca 54".

Fuente de variación	Numero de Brotes
AIA	672.4 *
Explante	72.9 *
AIA/Explante	249.63 *
Error	3.56
C.V.	14.91
R ²	0.85
Media	12.65

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

12. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de raíz *in vitro* de *S. hispanica* Variedad Chía "Negra 59".

Fuente de variación	Numero de Brotes
AIA	555.02*
Explante	42.02*
AIA/Explante	201.42 *
Error	1.90
C.V.	9.71
R ²	0.89
Media	14.22

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

13. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la inducción de raíz *in vitro* de *S. hispanica* Variedad Chía "Pinta"

Fuente de variación	Numero de Brotes
AIA	525.62 *
Explante	156.02 *
AIA/Explante	227.29*
Error	3.91
C.V.	14.16
R ²	0.82
Media	13.97

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

14. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la aclimatación de brotes de *S. hispanica* Variedad Chía "Blanca 54"

Fuente de variación	Supervivencia
Altura de Planta	1.25*
Error	0.205
C.V.	100.75
R ²	0.25
Media	0.45

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

15. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la aclimatación de brotes de *S. hispanica* Variedad Chía "Blanca 54".

Fuente de variación	Supervivencia
Altura de Planta	1.8*
Error	0.16
C.V.	102.06
R ²	0.37
Media	0.4

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

16. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la aclimatación de brotes de *S. hispanica* Variedad Chía "Pinta".

Fuente de variación	Supervivencia
Altura de Planta	1.8*
Error	0.17
C.V.	84.32
R ²	0.36
Media	0.5

*=Significativo ($p \leq 0.05$); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación.

17. Flujo de efectivo del cultivo *in vitro* de *Salvia hispanica* a 10 años de evaluación.

Concepto		Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10	TOTAL
Aportaciones	SOCIOS	\$627,000.00											
	GOBIERNO	\$ 1,476,902.80											
		\$2,103,902.80											
Ingresos por venta		1,000,000.00	1,500,000.00	1,500,000.00	1,500,000.00	600,000.00	1,500,000.00	1,500,000.00	1,500,000.00	1,500,000.00	1,500,000.00	1,500,000.00	9,600,000.00
Total entradas		\$2,103,902.80											
Concepto	Concepto	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10	
Inversiones	Activos Fijos	1,460,862.00											
	Capital de Trabajo	643,040.80											
	Total	2,103,902.80											
Costos	Concepto												
Costos Variables	Planta		\$100.00	\$100.00	\$100.00	\$100.00	\$100.00	\$100.00	\$100.00	\$100.00	\$100.00	\$100.00	
	Reactivos	31%	\$195,940.80	\$195,940.80	\$195,940.80	\$195,940.80	\$195,940.80	\$195,940.80	\$195,940.80	\$195,940.80	\$195,940.80	\$195,940.80	
	Insecticidas	0.24%	\$1,500.00	\$1,500.00	\$1,500.00	\$1,500.00	\$1,500.00	\$1,500.00	\$1,500.00	\$1,500.00	\$1,500.00	\$1,500.00	
	Fungicidas	0.45%	\$2,850.00	\$2,850.00	\$2,850.00	\$2,850.00	\$2,850.00	\$2,850.00	\$2,850.00	\$2,850.00	\$2,850.00	\$2,850.00	
	Laboratorista	41%	\$260,000.00	\$260,000.00	\$260,000.00	\$260,000.00	\$260,000.00	\$260,000.00	\$260,000.00	\$260,000.00	\$260,000.00	\$260,000.00	
Subtotal Costos Variables		460,390.80	460,390.80	460,390.80	460,390.80	460,390.80	460,390.80	460,390.80	460,390.80	460,390.80	460,390.80	460,390.80	4,603,908.00
Costos Fijos	Gastos de ventas		50,000.00	50,000.00	50,000.00	50,000.00	50,000.00	50,000.00	50,000.00	50,000.00	50,000.00	50,000.00	500,000.00
	Gasolina	2%	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	120,000.00
	Luz	13%	85,000.00	85,000.00	85,000.00	85,000.00	85,000.00	85,000.00	85,000.00	85,000.00	85,000.00	85,000.00	850,000.00
Subtotal Costos Fijos		147,000.00	147,000.00	147,000.00	147,000.00	147,000.00	147,000.00	147,000.00	147,000.00	147,000.00	147,000.00	147,000.00	1,470,000.00
Costos Financieros, Impuestos	Gastos de administración.		12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	120,000.00
	Gastos de constitución		15,000.00										15,000.00
Subtotal Costos Financieros		27,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	12,000.00	135,000.00
Total Costos Fijos		174,000.00	159,000.00	159,000.00	159,000.00	159,000.00	159,000.00	159,000.00	159,000.00	159,000.00	159,000.00	159,000.00	1,605,000.00
Total De Salidas		2,103,902.80	634,390.80	619,390.80	619,390.80	619,390.80	619,390.80	619,390.80	619,390.80	619,390.80	619,390.80	619,390.80	6,208,908.00
Reinversiones						618,662.00	0.00	8,500.00	636,662.00	0.00	0.00	627,162.00	

Valores Residuales											576,426.67
Recuperación Del Capital De Trabajo											607,390.80
Flujo Neto De Efectivo	-2,103,902.80	365,609.20	880,609.20	880,609.20	1,499,271.20	-19,390.80	889,109.20	1,517,271.20	880,609.20	880,609.20	2,691,588.67
Flujo De Efectivo Acumulado	-2,103,902.80	365,609.20	1,246,218.40	2,126,827.60	3,626,098.80	3,606,708.00	4,495,817.20	6,013,088.40	6,893,697.60	7,774,306.80	10,465,895.47

18. Punto de equilibrio durante un periodo de operación a diez años.

CONCEPTOS	PERIODO DE OPERACIÓN DEL PROYECTO (años)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Costos Variables Totales (Cvt)	460,391	460,391	460,391	460,391	460,391	460,391	460,391	460,391	460,391	460,391	460,391
Costos Fijos Totales (Cft)	174,000	159,000	159,000	159,000	159,000	159,000	159,000	159,000	159,000	159,000	159,000
Costos Totales De Producción	634,391	619,391	619,391	619,391	619,391	619,391	619,391	619,391	619,391	619,391	619,391
Costos Total Unitario	3.2	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
Costo Variable Unitario	2.30	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53
Costo Fijo Unitario	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Volumen Anual De Producción	200,000	300,000	300,000	300,000	300,000	300,000	300,000	300,000	300,000	300,000	300,000
Ingresos Totales (It) (\$)	1,000,000	1,500,000	1,500,000	1,500,000	1,500,000	1,500,000	1,500,000	1,500,000	1,500,000	1,500,000	1,500,000
Precio De Venta	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
P.E. Valor De Ventas (\$)	\$322,455.58	\$229,413.13	\$29,413.13	\$229,413.13	\$29,413.13	\$229,413.13	\$229,413.13	\$229,413.13	\$229,413.13	\$229,413.13	\$229,413.13
P.E. Vol. De Producción (Núm.)	64,491	45,883	45,883	45,883	45,883	45,883	45,883	45,883	45,883	45,883	45,883
P.E. % De Ventas	32%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%