

Influencia de reguladores de crecimiento sobre el establecimiento de cultivos *in vitro* de *Salvia hispanica* L. (“chía”) y sobre su contenido de ácidos grasos

Martín Bari¹, Marconi Patricia^{1,2}, López María Cristina³, Álvarez María Alejandra^{1,2*}

¹Laboratorio 603, Facultad de Ciencias de la Salud - CEBBAD, Universidad Maimónides, Hidalgo 775 (CABA).

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

³Laboratorio de Agroalimentos del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

*Autor a quien dirigir la correspondencia: alvarez.mariaalejandra@maimonides.edu

Resumen

Salvia hispanica L. (Labiatae), comúnmente conocida como “chía”, es una especie herbácea anual cuyo cultivo está ampliamente extendido por América del Sur. Es utilizada como cultivo industrial y para la elaboración de alimentos funcionales por su contenido en proteínas, antioxidantes, fibras y lípidos esenciales. El aceite de sus semillas contiene la mayor proporción (68 %) de omega-3 que cualquier fuente vegetal conocida. El objetivo de este trabajo fue establecer cultivos *in vitro* de “chía” y analizar la influencia de diferentes reguladores de crecimiento sobre la inducción de callos, sobre el crecimiento de estos y sobre su contenido de ácidos grasos. Se iniciaron cultivos de callos *in vitro* a partir de explantos de tallos sin nudos y de hojas de plántulas axénicas de 20 días de edad, utilizando 3 tratamientos de reguladores de crecimiento diferentes. El medio Murashige & Skoog modificado (MSRT) con el agregado de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a una concentración de 2,25 μM y un fotoperíodo de 16 horas fueron las condiciones óptimas para la inducción de callos. Para el mantenimiento de los callos el tratamiento más adecuado resultó ser bencilaminopurina (BAP) a una concentración de 1 μM . La cinética de crecimiento se caracterizó por un período de latencia hasta el día 20 de cultivo, seguido de un período de crecimiento exponencial entre los días 20 y 54. El tratamiento con 2,4-D (2,25 μM) mostró la más alta velocidad específica de crecimiento ($0,22 \pm 0,01$ /día), el tiempo de duplicación más bajo ($31,51 \pm 1,00$ día) y la mayor biomasa máxima ($1,46 \pm 0,01$ g PF). El contenido de ácidos grasos en los callos de “chía” fue 0,83 % en promedio de todos los tratamientos después de 6 meses en cultivo y no mostró variaciones significativas (0,2 % - 0,3 %) entre los tratamientos aplicados ($p < 0,05$).

Influence of Plant Growth Regulators on the Establishment of *in vitro* Cultures of *Salvia Hispanica* L. (“Chía”) and on its Fatty Acid Content

Summary

Salvia hispanica L. (Labiatae), whose vulgar name is chia, is an annual herb cultured in South America. Recently, their content of proteins, antioxidants, fibers and essential lipids has promoted its exploitation as an industrial culture and to produce functional food. The seed oils contain the highest proportion (68 %) of omega-3 in the plant kingdom. The aim of this work was to establish *in vitro* cultures of chia and to analyze

Palabras clave: “chía” - cultivo *in vitro* - *Salvia hispanica* - reguladores de crecimiento vegetal.

Key words: “chía” - *in vitro* culture - *Salvia hispanica* - plant growth regulators.

the influence of different plant growth regulators on the establishment of calli, their growth, and their fatty acids content. *In vitro* cultures were initiated from 20 days-old plantlets with different plant growth regulators relationship. The media Murashige & Skoog (MSRT) modified added by 2,4-dichlore phenoxyacetic acid (2,4-D) at 2.25 μM , and a photoperiod of 16 h were the optimal conditions for starting the cultures. For their maintenance the optimal conditions were with the addition of the plant growth regulator benzylaminopurine (BAP) at 1.00 μM . The kinetic of growth presented a lag period of 20 days followed by an exponential period of 34 days. The treatment with 2,4-D (2.25 μM) produced the highest specific growth rate ($0.22 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$), the lowest duplication time ($31.51 \pm 1.00 \text{ d}$) and the highest maximal biomass ($1.46 \pm 0.01 \text{ g}$). The mean fatty acid content was 0.83 % for all the conditions after 6 months in culture without significant differences (0.2 % - 0.3 %) among the different treatments ($p < 0.05$).

Introducción

Salvia hispanica L. (Labiatae), comúnmente conocida como “chía”, es una especie herbácea anual nativa del sur de México y norte de Guatemala que fue, en tiempos precolombinos, parte de la dieta básica así como fuente de aceite y medicinas para los mesoamericanos. Hoy en día es utilizada para la producción de bebidas y alimentos por su contenido nutricional de lípidos esenciales, proteínas, antioxidantes y fibras. Sus semillas tienen aproximadamente entre 25 % y 39 % de aceite respecto de su peso y éste contiene la mayor proporción (68 %) de ácido omega-3-linolénico (omega-3, un ácido graso poli insaturado esencial) que cualquier fuente vegetal conocida. Además, las semillas de “chía” contienen niveles más altos de proteína (19 - 23 %) que los de cereales tradicionales como el “trigo” (*Triticum aestivum* L. -Poaceae-), “maíz” (*Zea mays* L. -Poaceae-), “arroz” (*Oryza sativa* L. -Poaceae-) y “avena” (*Avena sativa* L. -Poaceae-) (Marconi y col., 2013).

La importancia nutricional y sanitaria del omega-3 reside en los siguientes efectos beneficiosos para la salud: 1) posee una actividad antioxidante comparable a la de la vitamina E; 2) inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis en algunos modelos de tumores murinos; y 3) previene la enfermedad cardiovascular, una de las enfermedades crónicas con mayor prevalencia en las culturas occidentales (Yuriko y Darshan, 2010).

Estudios de investigación celular y molecular indican que los efectos cardioprotectores de los ácidos grasos omega-3 son el resultado de una sinergia entre múltiples mecanismos complejos que involucran: la reducción de los triglicéridos, efectos

antiinflamatorios, efectos antitrombóticos y efectos antiarrítmicos. Estos efectos están relacionados con la modulación tanto de la síntesis de mediadores para la disolución de lípidos como de los canales iónicos cardíacos. Ésta última es el resultado de la interacción del omega-3 con microdominios de membrana y la consecuente influencia en las vías de señalización que estos desencadenan. Ejemplos de ello son: a) la inhibición de la actividad del factor nuclear κB , involucrado en las vías de señalización inflamatorias; b) la regulación de la expresión de genes de síntesis de esteroides y de la proteína C; y c) la regulación de la expresión de genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos, como la activación del receptor α que promueve la proliferación de peroxisomas (Yuriko y Darshan, 2010).

Simopoulos (2009) refiere que la relación omega-6 / omega-3 de la dieta debería tener valores cercanos a 1. En las dietas occidentales la relación es entre 15/1 y 16,7/1 debido a que son deficientes en omega-3 y tienen cantidades excesivas de omega-6. Estas dietas promueven la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo enfermedad cardiovascular, cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Simopoulos, 2009).

Actualmente, a nivel comercial, la “chía” se cultiva en la Argentina (donde gradualmente está reemplazando a la soja, uno de sus cultivos más extendidos y rentables) (Bueno y col., 2010), Bolivia, Ecuador, Guatemala, México y Australia. En el año 2008, Australia fue el principal productor del mundo de esta especie, con un área sembrada de 1700 ha, lo que representa dos tercios de su producción mundial (Ixtaina y col., 2010). En la Argentina el

rendimiento promedio de esta especie en plantaciones comerciales es de alrededor de 500 - 600 kg/ha, aunque se ha logrado obtener hasta 1260 kg/ha. En parcelas experimentales de la provincia de Salta, con la implementación de riego y fertilización nitrogenada, se han registrado rendimientos de 2500 kg/ha (Ixtaina y col., 2010). Debido a las características del cultivo agronómico y a la importancia sanitaria de la semilla de "chía" es que el desarrollo de cultivos *in vitro* de esta especie resulta de interés para la industria farmacéutica y alimentaria. La desaparición de las especies nativas por destrucción de sus hábitats naturales, así como las dificultades de domesticar especies salvajes de interés biotecnológico, reducen la biodisponibilidad de estas fuentes. La biotecnología aparece entonces como una herramienta capaz de salvar este tipo de obstáculos a través del cultivo *in vitro* de vegetales como una alternativa para la producción de biocompuestos. Las ventajas de producción a partir cultivos *in vitro* residen en que éstos permiten la producción sistemática y regulada de biomoléculas con calidad estandarizada (metabolitos primarios y secundarios), el cultivo en condiciones definidas, controladas y óptimas, que permiten independizarse de las condiciones de cultivo en campo y la consistencia de los resultados. Además, el cultivo *in vitro* puede ser utilizado para el análisis de la fisiología de una especie, el cultivo de una especie no domesticada aún, el mejoramiento genético de una especie para aumentar la producción de una molécula propia y la manipulación genética para que una especie produzca nuevas biomoléculas (organismo genéticamente modificado) (Álvarez, 2014).

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos capaces de influir en procesos fisiológicos (crecimiento y diferenciación) a bajas concentraciones (Vega Aguilar, 2011; Álvarez y col., 2009; Grostin, 2008). No es posible generalizar los tipos y cantidades adecuadas de reguladores de crecimiento para el desarrollo de cultivos *in vitro*, razón por la cual se debe realizar un análisis caso por caso (Álvarez y col., 1993; Álvarez, 2014). Teniendo en cuenta el potencial económico de la "chía" en las industrias farmacéutica y alimentaria, el establecimiento de cultivos *in vitro* aparece como una alternativa para obtener una biomasa uniforme en relación al genotipo, el contenido proteico y el contenido porcentual de aceite (junto con su perfil de ácidos grasos). Los resultados obtenidos a partir de la evaluación del

comportamiento de los callos pueden, entonces, ser el puntapié inicial en el desarrollo de nuevos métodos de producción de omega-3 (Marconi y col., 2013).

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de diferentes reguladores de crecimiento (6-bencil-amino-purina -BAP-; ácido 2,4-diclorofenoacético -2,4-D- y kinetina -KIN-) sobre el establecimiento de callos de *S. hispanica* y sobre su contenido de ácidos grasos; y determinar la influencia de la concentración de macro y micro nutrientes y de un regulador de crecimiento (AIA) sobre la micropropagación *in vitro* de plántulas *S. hispanica*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las semillas fueron recolectadas en la localidad de La Merced, provincia de Salta (coordenadas geográficas: 25° S, 65° 5' O), Argentina, durante enero de 2011. Muestras del material de referencia se conservan en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Departamento de Investigaciones Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Maimónides.

Para su estratificación se las colocó en un vaso de precipitado conteniendo 50 mL de agua destilada el cual se conservó entre 2 y 8 °C durante 48 horas.

Desinfección de las semillas: se sumergieron las semillas durante 20 segundos en etanol 96°, luego se dejaron en remojo durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de cloro activo de 4 % y, por último, fueron sometidas a 3 enjuagues con agua destilada hasta la completa eliminación de los agentes esterilizantes.

Germinación: se trabajó en cabina de flujo laminar, se colocaron 40 semillas en 10 frascos conteniendo 50 mL de medio Murashige y Skoog modificado (MSRT) (Murashige & Skoog, 1962; Khanna y Staba, 1968). Estos frascos se mantuvieron en oscuridad a 24 ± 2 °C durante 10 días. Las plántulas germinadas se mantuvieron en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas (generado con lámparas fluorescentes de $1,8 \text{ wm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ de irradiancia: $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Micropropagación

Una vez establecido el cultivo axénico se comenzó con la etapa de multiplicación. Para ello se

seccionaron plántulas de 20 días de edad y 10 cm de altura y se hicieron cortes a nivel de sus entrenudos. Para determinar la influencia de la concentración de macro y micronutrientes del medio MSRT en el desarrollo de plántulas, 30 explantos fueron sembrados en dos medios de cultivo diferentes: 15 fueron sembrados en medio MSRT conteniendo ácido indol acético (AIA) a una concentración de 5,71 μM y los otros 15 en el mismo medio de cultivo pero con los macro y micronutrientes reducidos a la mitad de su concentración original (MSRT/2). Los cultivos en etapa de propagación se mantuvieron en frascos de 330 mL con 50 mL de medio de cultivo y fueron cultivados en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas más arriba.

Inducción de callos

Explantos de hojas y de tallos obtenidos de las plántulas establecidas como se indicó en el punto anterior se colocaron en frascos con medio MSRT suplementado con 3 % de sacarosa y con 3 tratamientos diferentes de reguladores de crecimiento: 2,4-D 2,25 μM ; BAP 1,00 μM ; o la combinación 2,4-D: KIN (0,45 μM : 0,46 μM) y se mantuvieron en cámara de cultivo en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas más arriba. Después de 30 - 45 días, los tejidos callosos en formación se separaron del explanto que los originó y se transfirieron a medio de cultivo fresco con la misma composición. Para su mantenimiento los callos se subcultivaron a medio fresco cada 30 días durante un período total de 10 meses.

Curva de crecimiento

Se elaboró una curva de crecimiento para los callos mantenidos en medio de cultivo MSRT con BAP [1,00 μM], con 2,4-D [2,25 μM] o con 2,4-D: KIN [0,45 μM : 0,46 μM] a partir de la variación del área de los mismos con el tiempo. La determinación del área se realizó mediante el software "Image J".

Determinaciones analíticas

El peso fresco (PF) y el peso seco (PS) se determinaron el día inicial y el día final de cada ensayo. Para la determinación del PS, las muestras fueron secadas en estufa a 80 °C hasta peso constante (48 horas).

Análisis de ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos en los callos se determinó por hidrólisis ácida de acuerdo con el Método Oficial 925.32 de la Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (AOAC por sus siglas en inglés) el cual incluye la extracción de los mismos.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA y los tratamientos se contrastaron mediante el test "post hoc" de Tuckey ($p < 0,05$). Los cálculos se realizaron con el software GraphPadPrism 5.

Resultados y discusión

Germinación de las semillas

Después de 8 días en oscuridad la tasa de germinación de las semillas de *S. hispanica* fue de 30 %, sin observarse contaminación.

Micropropagación

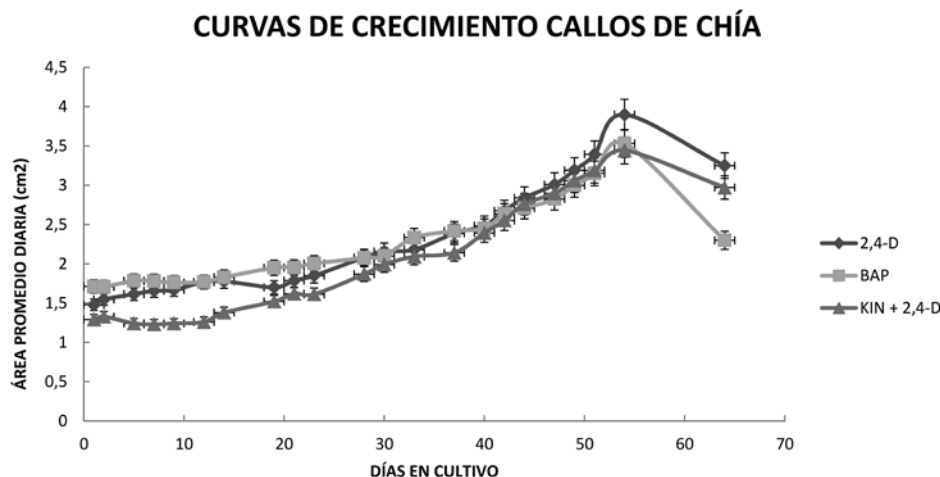
La tasa de multiplicación en medio MSRT fue mayor (75 %) que en medio MSRT/2 (32 %) resultando el crecimiento en altura menor en el medio MSRT/2 (Tabla 1). Las plántulas pudieron mantenerse *in vitro* por períodos de tiempo de hasta 4 meses sin subcultivos a medio fresco cuando se utiliza AIA (5,71 μM) como regulador de crecimiento.

Inducción de callos

Los mejores resultados, callos verdes y friables, se obtuvieron utilizando BAP (1,00 μM) como regulador

Tabla 1.- Influencia de la concentración de los macro y micro nutrientes del medio de cultivo sobre las características de las plántulas de chía desarrolladas *in vitro* y sobre la tasa de multiplicación

Medio de cultivo	Color	Altura final	Tasa de multiplicación
MSRT	Verde intenso	8 cm	75%
MSRT/2	Verde claro	5 cm	32%

Figura 1.- Influencia de reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de callos de *Salvia hispánica* L. (“chía”)

Los cultivos están mantenidos en cámara de cultivo a 24 °C y con un fotoperiodo de 16 horas (irradiancia 1,8 wm^{-2} seg^{-1}).

de crecimiento. Los callos tratados con 2,4-D (2,25 μM) o con la combinación 2,4-D: KIN (0,45 μM : 0,46 μM) resultaron rizogénicos, como ya fue observado para otras especies anteriormente (Álvarez y col., 1993; Álvarez, 2014). Los explantos provenientes de la hoja no resultaron eficientes para iniciar cultivos de callos *in vitro*. Estos resultados concuerdan con lo informado por Bueno y col. (2010).

Curva de crecimiento

Tal como se aprecia en la figura 1, el período latencia de estos cultivos se extiende hasta los 19 días, la fase de crecimiento exponencial se observa entre los 20 y los 54 días seguida por una fase estacionaria de 5 días ingresando luego en la fase de muerte del cultivo. Los valores de la velocidad específica de crecimiento máximo ($\mu_{\text{máx}}$), el tiempo de duplicación (td) y la biomasa máxima ($X_{\text{máx}}$) se observan en la tabla 2.

La biomasa máxima más alta, la mayor velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación más bajo

fueron obtenidos utilizando 2,4-D (2,25 μM) como regulador de crecimiento. El análisis de ANOVA y test de Tukey no muestran diferencias significativas entre los otros tratamientos ($P < 0,05$).

Análisis de ácidos grasos

Los valores de ácidos grasos determinados en las muestras de los diferentes tratamientos ($n = 11$) se pueden observar en la tabla 3. Como se puede ver en la tabla, los contenidos de ácidos grasos no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre callos que han sido cultivados con los diferentes reguladores de crecimiento. El presente estudio fue llevado a cabo en el laboratorio de agroalimentos del INTI.

Conclusiones

Se establecieron cultivos de *in vitro* de *S. hispánica* (“chía”) y se determinó que 2,4-D (2,25 μM) como regulador del crecimiento, una temperatura de

Tabla 2.- Parámetros de crecimiento obtenidos a partir del análisis de las curvas de crecimiento

Índice de crecimiento	BAP (1 μM)	2,4-D (2,25 μM)	2,4-D: kin (0,45: 0,46 μM)
$\mu_{\text{máx}}$ (días^{-1})	0,014 \pm 0,01	0,022 \pm 0,01	0,013 \pm 0,01
td (días)	49,51 \pm 1,00	31,51 \pm 1,00	53,32 \pm 1,00
$X_{\text{máx}}$ (g)	1,38 \pm 0,01	1,46 \pm 0,01	1,12 \pm 0,01

Tabla 3.- Efecto de reguladores de crecimiento en medio MSRT sobre el contenido de ácidos grasos en callos de “chía” (*Salvia hispanica* L.)

	Regulador de crecimiento (μM)		
	BAP [1]	2,4-D [2,25]	2,4-D: kin [0,45: 0,46]
Materia grasa (%)	0,8 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1

24 \pm 2 °C y un fotoperíodo de 16 horas, fueron las condiciones óptimas para la inducción de callos. Para el mantenimiento de los callos en condiciones friables resultó más adecuado BAP (1 μM), no obstante su menor velocidad de crecimiento. En cuanto al contenido de ácidos grasos (0,83 % en promedio) es significativamente más bajo que el de las semillas (56 % aproximadamente) después de 6 meses en cultivo.

Respecto del cultivo de plántulas este fue posible aun cuando los nutrientes de este medio se encuentran reducidos a la mitad de su concentración original. Para lograr diseñar un proceso productivo de omega-3 a partir de cultivos *in vitro* de “chía” en futuros trabajos se debería encarar el análisis del efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y otros componentes del medio de cultivo (fuentes de carbono y nitrógeno, entre otras) o sobreexpresar las enzimas clave para la biosíntesis de omega-ácidos mediante ingeniería genética.

Referencias bibliográficas

- Álvarez, M.A. (2014). “*In vitro* Plant Cultures as Biofactories” en *Plant Biotechnology for Health: From Secondary Metabolites to Molecular Farming* Cap. 4. Springer International Publishing Switzerland (1ª ed): 33-59.
- Álvarez, M.A.; Nigra, H.M.; Giuliotti, A.M. (1993). “Solasodine production by *Solanum eleagnifolium* Cav. *in vitro* cultures: Influence of plant growth regulators, age and inoculum size. Large-scale production”. *Natural Product Letters* 2 (1): 9-19.
- Álvarez, M.A.; Fernandez Eraso, N.; Pitta Alvarez, S.I.; Marconi, P.L. (2009). “Two-stage culture for producing berberine by cell suspension and shoot cultures of *Berberis buxifolia* Lam.”, *Biotechnology Letters* 31: 457-463.
- Bueno, M.; Di Sapio, O.; Barolo, M.; Villalonga, M.; Busilacchi, H.; Severin, C. (2010). “In vitro response of different *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) explants”. *Molecular Medicinal Chemistry* 21: 125 -126.
- Grostein, I. (2008). “Effects of different plant hormones of *Salvia officinalis* cultivated in vitro”. *International Journal of Botany* 4 (4): 430-436.
- Ixtaina, V. (2010). “Caracterización de la semilla y el aceite de Chía obtenido mediante distintos procesos. Aplicación en tecnología de Alimentos”. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina [en línea: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2679>].
- Khanna, P.; Staba, J.E. (1968). “Antimicrobials from plant tissue cultures”. *Lloydia* 31 (2): 180-189.
- Journal of the Association of Official Agricultural Chemists (1975). “Método Oficial 925.32 AOAC”. 58, 314.
- Marconi, P.L.; López, M.C.; De Meester, J.; Bovjin, C.; Álvarez, M.A. (2013). “*In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus”. *Biotechnology vegetal* 13 (4): 203-207.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Simopoulos, A. (2009). “The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases”. *Experimental Biology and Medicine Journal* 6: 674-688.
- Vega Aguilar, A. (2011). “Efecto del 2,4-D y de AIA en la callogénesis de zanahoria (*Daucus carota*)”, Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Yuriko, A.; Darshan, K. (2010). “Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega 3 polyunsaturated fatty acids”. *Journal of Nutritional Biochemistry* 21: 781-792.