



**Universidad de Carabobo**  
**Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología**  
**Departamento de Biología**



**Establecimiento del sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* A. Juss a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de azadiractina *in vitro*.**

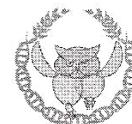
Trabajo Especial de Grado presentado por la **Br. Valeria Montilla**, ante la ilustre Universidad de Carabobo para optar por el título de Licenciada en Biología

Tutor: **Dr. Rafael Fernández Da Silva**

Valencia, Mayo de 2017.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

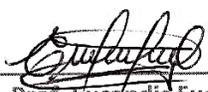


ACTA

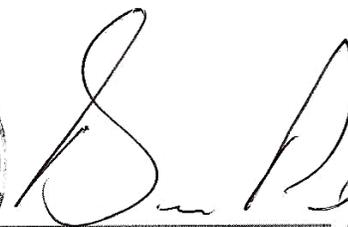
Mediante la presente se deja constancia que el (la) **Br. Valeria Montilla**, Cédula de Identidad N° 20.876.632, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT) de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: **“Establecimiento del sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* A. Juss a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de Azadiractina *in vitro*”, en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo el (la) bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.**

En Valencia, a los 31 días del mes de mayo del año 2017.

  
Prof. Rafael Fernández Da Silva  
Tutor

  
Prof. Eucandis Fuentes  
Jurado Principal



  
Prof. Domenico Pavone  
Jurado Principal

Dedicado a todos los árboles de neem que me regalaron sus semillas, pero fueron cortados debido a trabajos de construcción.

Gracias en verdad, por haber sido mis muestras todo este tiempo. Que sus almas sigan el camino en paz.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a mis padres, Tibisay y Jeroh, ya que ellos fueron mis primeros mentores, gracias a los cuales descubrí y fue creciendo cada vez más mi amor por la Biología. Gracias por todo su cariño, motivación y apoyo, por siempre asegurarse que no me faltaran cosas, y por brindarme sus consejos en todo momento. Gracias también a mis demás familiares (abuelos, tíos, tías, hermano, primos), por todos sus buenos deseos y apoyo.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Rafael Fernández Da Silva, por la confianza que depositó en mí, por siempre cuidar que yo tuviese todos los materiales que requirieron mis experimentos, por acompañarme a revisar mis muestras en horas avanzadas de la tarde o los fines de semana, y por su guía durante todo el desarrollo de este trabajo. Agradezco también al profesor Mario Palacios, por su asesoría y observaciones respecto a la parte estadística, y también agradezco a todos los que fueron mis profesores durante la carrera, por contribuir a mi formación durante todos estos años.

Agradezco varios del personal técnico: Vincenzo Storaci, Esther Torquati, Yudethzi Marcano, Liliana Nieto, Liaska Cuamo, Luis Gavia y Doris Reyes, los cuales me prestaron su ayuda para este proyecto, ya fuese con materiales, consejos en los protocolos, o sus continuas palabras de ánimo en los momentos difíciles.

Agradezco a todos mis amigos por su apoyo, día a día, durante todos estos años de carrera. Gracias por ayudarme a crecer, ya fuese como persona o como futura profesional, gracias por darme experiencias memorables, por motivarme en mis objetivos, por levantarme luego de mis caídas, y por brindarme una sonrisa y un abrazo en todo momento. Especialmente, agradezco a dos de mis amigos: a Carlos Coronel, por todas sus maravillosas ideas para la mejora de protocolos y los gráficos, y por prestarme su estufa improvisada (la arrocera) por varios meses, ya que sin ella no hubiese logrado procesar muchas de mis muestras histológicas; y a Humberto Dominique, por ser esa voz que te hace poner los pies en la tierra y actuar, que te hace hablarle al mundo con soltura y total confianza en uno mismo. Gracias a ambos.

Por último, pero no menos importante, gracias también a Fradniev González, quien dice que llegó tarde a ayudar, pero para mí, llegó en el momento justo. Sus palabras de ánimo todos los días, sobre todo en esos momentos y horas de la noche donde las cosas me parecían demasiado difíciles e inalcanzables, me dieron fuerzas para poder terminar mis experimentos y este trabajo escrito.

A todos... gracias por ser la luz que poco a poco me fue indicando el camino, permitiéndome llegar a este instante y lugar.

## RESUMEN

El neem (*Azadirachta indica* A. Juss) es una especie vegetal leñosa perteneciente a la familia Meliaceae. Esta ha sido descrita como un “árbol multipropósito” debido a su aprovechamiento en diversas áreas, especialmente, gracias a la presencia del metabolito secundario azadiractina. Este metabolito, únicamente sintetizado por esta especie, presenta un gran interés agrícola debido a sus propiedades insecticidas. Problemas asociados tanto al cultivo en campo de la planta, como a la extracción de la azadiractina, han hecho necesaria la búsqueda de métodos alternativos de propagación y extracción de los metabolitos secundarios del neem, fundamentados en la biotecnología. Se evaluó entonces la diferenciación de embriones somáticos, a partir de suspensiones celulares de callos embriogénicos de cotiledón y hoja, expuestas a distintas concentraciones de citocinina (BAP) y auxinas (2,4-D y AIA), y a un agente estresante (cultivo sin recambio de medio); por otra parte, se evaluó la producción de azadiractina a partir de callos no embriogénicos de hoja en suspensión, determinando el efecto de distintas proporciones de nitrato/amonio del medio MS y de dos sustancias precursoras (acetato de sodio y escualeno). Se logró la formación de embriones somáticos (45 embriones/frasco) en un medio con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA, sometido a estrés, luego de 5 meses de cultivo. Por otra parte, se logró la máxima síntesis de azadiractina (52,53 mg/L) a los 14 días de cultivo, empleando un medio MS de tipo nítrico, y aplicando el acetato de sodio y escualeno en simultaneo, a 10 mg/L cada precursor.

**Palabras clave:** Estrés, neomorfos, nitrato, precursores, regeneración.

## ABSTRACT

The Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) is a woody plant species, belonging to the Meliaceae family. It has been described as a “multipurpose tree” due to its use in many areas, especially as a result of the presence of the secondary metabolite azadirachtin. This metabolite, only synthesized by this species, has a great agricultural interest due to its insecticidal properties. Problems related to the field cultivation of the plant and the azadirachtin extraction, have made necessary to search for alternative methods of propagation and extraction of Neem’s secondary metabolites, based on biotechnology. The differentiation of somatic embryos was evaluated from embryogenic calli cell suspensions (from cotyledons and leaves), exposed to different concentrations of cytokinin (BAP) and auxin (2,4-D and AIA), and to a stressor (culture without medium replacement); on the other hand, the production of azadirachtin was evaluated from non-embryogenic calli (from leaves) in suspension, determining the effect of MS medium with different nitrate/ammonium ratios, and two precursor substances (sodium acetate and squalene). The formation of the somatic embryos (45 embryos/flask) was achieved in the treatment with BAP 2 mg/L + AIA 1 mg/L, under a stressed condition, after 5 months culture. Additionally, the maximum azadirachtin synthesis (52,53 mg/L) was achieved after 14 days of culture, using a nitric MS medium, and adding sodium acetate and squalene simultaneously, at 10 mg/L each precursor.

**Keywords:** Stress, neomorphs, nitrate, precursors, regeneration.

## Índice general.

	<b>Pág.</b>
I. Introducción. ....	11
II. Planteamiento del problema. ....	14
III. Justificación. ....	17
IV. Objetivos. ....	18
4.1. Objetivo general. ....	18
4.2. Objetivos específicos. ....	18
V. Marco teórico. ....	19
5.1. Origen y distribución de <i>A. indica</i> . ....	19
5.2. Taxonomía. ....	19
5.3. Descripción botánica, morfología y desarrollo de <i>A. indica</i> . ....	20
5.4. Ecología. ....	21
5.5. Depredadores y patógenos. ....	22
5.6. Importancia. ....	22
5.7. Propagación. ....	24
5.8. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales. ....	25
5.9. Embriogénesis somática. ....	26
5.10. Metabolitos secundarios en <i>A. indica</i> . ....	28
5.11. Azadiractina. ....	29
5.12. Biosíntesis de la Azadiractina. ....	31
5.13. Producción <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios. ....	33
VI. Antecedentes. ....	35
6.1. Embriogénesis somática en neem. ....	35
6.2. Producción de azadiractina <i>in vitro</i> . ....	37
VII. Materiales y métodos. ....	41
7.1. Material vegetal. ....	41
7.2. Medios de cultivo de inducción para explantes y vitro-plantas. ....	41
7.3. Establecimiento de las vitro-plantas. ....	41
7.3.1. Desinfección de las semillas. ....	41

7.3.2. Obtención de las vitro–plantas. ....	42
7.4. Inducción del callo embriogénico y no embriogénico.....	42
7.5. Inducción y evaluación de la embriogénesis somática en medio líquido.....	43
7.6. Evaluación morfoanatómica. ....	44
7.7. Producción y extracción de azadiractina. ....	45
7.8. Análisis estadístico. ....	47
VIII. Resultados y discusión.....	48
8.1. Evaluación morfoanatómica. ....	48
8.2. Inducción y evaluación de la embriogénesis somática.....	58
8.3. Producción y extracción de azadiractina. ....	64
IX. Conclusiones. ....	73
X. Recomendaciones. ....	74
XI. Bibliografía.....	75
XII. Anexos. ....	90

## Índice de figuras.

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Morfología del neem.....	20
Figura 2. Estructura química de la azadiractina .	30
Figura 3. Primeras etapas de la biosíntesis de la azadiractina, en la cual se producen el IPPF y DMAPF .....	32
Figura 4. Biosíntesis del lanosterol a partir del DMAPF e IPPF .....	33
Figura 5. Morfología del proceso de callogénesis en neem .	50
Figura 6. Histología del proceso de callogénesis en neem .....	52
Figura 7. Morfología e histología del proceso de organogénesis en neem .....	53
Figura 8. Morfología del proceso de embriogénesis somática en neem .....	55
Figura 9. Histología del proceso de embriogénesis somática en neem .....	57
Figura 10. Morfología de los distintos tipos celulares y de agregados, presentes en los cultivos en suspensión .....	60
Figura 11. Variaciones en el número de células y agregados viables por mililitro (ml), en los medios evaluados, durante un periodo de 5 meses .	61
Figura 12. Morfología de los agregados celulares y estructuras embriogénicas en los medios sometidos a condiciones de estrés .....	64
Figura 13. Cambios en la concentración de azadiractina en el medio, para cada uno de los tratamientos, durante las 5 semanas .....	65
Figura 14. Variaciones en el pH de cada uno de los tipos de medio MS, durante las 5 semanas de estudio .....	67
Figura 15. Concentración de azadiractina sintetizada en cada uno de los tratamientos, medida en la segunda semana .....	69
Figura 16. Concentración de azadiractina sintetizada a la segunda semana, agrupando los resultados según los tipos y concentraciones de precursores y medio MS empleado .....	71

## Índice de cuadros.

	<b>Pág.</b>
Cuadro 1. Algunas variables estudiadas (entre 1999 – 2007) para el cultivo en suspensión de callos de <i>A. indica</i> , enfocado en la producción de azadiractina .....	38
Cuadro 2. Medio de inducción para segmentos de hoja obtenidos de vitro–plantas y cotiledones .....	42
Cuadro 3. Medios de inducción de embriogénesis para suspensiones celulares derivadas de cotiledones . .....	43
Cuadro 4. Medios de inducción de embriogénesis para suspensiones celulares derivadas de segmentos foliares .....	43
Cuadro 5. Tratamientos evaluados para la producción de azadiractina .....	45
Cuadro 6. Combinaciones de acetato de sodio y escualeno evaluadas .....	46
Cuadro 7. Relaciones nitrato:amonio evaluadas .....	46
Cuadro 8. Concentraciones de azadiractina obtenidas en el presente estudio y en otros trabajos realizados en <i>A. indica</i> .....	72

## Anexos.

	<b>Pág.</b>
1. Estadística descriptiva aplicada a los tratamientos para la producción de azadiractina, considerando todas las semanas evaluadas .....	90
2. Estadística descriptiva aplicada a los tratamientos para la producción de azadiractina, considerando sólo los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra) .....	90
3. Prueba de ANOVA de dos vías (muestras repetidas) para evaluar el efecto de los dos factores considerados (“tratamiento” y “tiempo”) en la producción de azadiractina durante las 5 semanas .....	91
4. Prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada para los 15 tratamientos durante la primera semana de estudio .....	91
5. Prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada para los 15 tratamientos durante la segunda semana de estudio .....	92
6. Prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada para los 15 tratamientos durante la tercera semana de estudio .....	92
7. Prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada para los 15 tratamientos durante la cuarta semana de estudio .....	93
8. Prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada para los 15 tratamientos durante la quinta semana de estudio .....	93
9. Prueba de ANOVA de una vía para evaluar la producción de azadiractina, considerando sólo los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra) .....	94
10. Prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada para los 15 tratamientos, considerando los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra)..	94
11. Prueba de ANOVA de dos vías (sin muestras repetidas), considerando sólo los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra), para evaluar el efecto de los dos factores considerados (“precursor” y “tipo de MS”) en la producción de azadiractina .	94
12. Prueba de comparación múltiple de Tukey, considerando los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra) .....	95

## I. Introducción.

El neem (*Azadirachta indica* A. Juss) es un árbol perteneciente a la familia Meliaceae, conocido también comúnmente como nim, margosa y lilo de la India. Se caracteriza por presentar un tamaño medio (entre 15 – 20 m), con un tronco semi–recto de corteza agrietada o escamosa, ramas ampliamente extendidas, y copa redonda u ovalada. Posee hojas compuestas e imparipinnadas, flores blancas que crecen en panículas axilares, y frutos drupáceos elipsoidales, de coloración verde claro cuando jóvenes, y amarilla cuando maduros (Schmutterer, 2002; Dhillon *et al.*, 2009). Aunque es nativo del sudeste asiático, actualmente presenta una amplia distribución alrededor del mundo, cultivándose en al menos 80 países (Schmutterer, 2002; Koul, 2004). Su introducción en Venezuela se produjo hace aproximadamente 17 años, siendo reportado en el 2009 la existencia de más de dos millones de árboles de neem sembrados a lo largo del territorio nacional, los cuales son utilizados como planta ornamental y en programas de reforestación de zonas áridas (Reyes *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2009a).

Esta especie ha sido descrita como un “árbol multipropósito”, debido a su uso en diversas áreas. A nivel agro–forestal, su alta tolerancia y adaptabilidad a condiciones de estrés hídrico y diversos tipos de suelos y climas, hacen del neem una opción ideal para ser utilizada en programas de reforestación y de recuperación de suelos degradados (Ogbuewu *et al.*, 2011). Partes como las hojas y frutos pueden ser procesadas para la fabricación de fertilizantes orgánicos y alimento para ganado y aves domésticas, mientras que el tronco y ramas pueden ser utilizados como material base en la industria maderera (Parrotta y Chaturvedi, 1994; Elteraifi, 2004; Ogbuewu *et al.*, 2011). El aceite y el polvo de hojas son empleados además a nivel industrial en preparaciones cosméticas, tales como cremas, aceite y esmalte para uñas, jabones, crema dental y productos para cuidado del cabello (Ogbuewu *et al.*, 2011).

El neem se caracteriza por presentar propiedades insecticidas, las cuales comprenden el principal atractivo comercial de la especie. Los extractos de partes como las hojas y semillas presentan compuestos que afectan el desarrollo, crecimiento y fisiología de varias especies de insectos que actúan como plagas de cultivos de importancia, siendo a su vez no–tóxicos para el hombre y para varias especies de insectos beneficiosas (Koul, 2004; Mordue, 2004). Esta planta también es ampliamente investigada a nivel de sus propiedades medicinales. El neem ha sido reconocido desde hace más de 4500 años en la medicina tradicional India por su gran valor terapéutico, propiedad que se origina gracias a la presencia de diversos metabolitos secundarios, los cuales se sintetizan y acumulan en las distintas partes del árbol (hojas, frutos, flores, corteza y raíces). Investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, han reportado que los extractos de neem (o sus metabolitos purificados) presentan propiedades antiinflamatorias, moduladoras de la fertilidad, antimicrobianas, hipoglicémicas, inmunoestimulantes, anticancerígenas, antioxidantes y hepatoprotectivas (Parrotta y Chaturvedi, 1994; Tomar y Singh, 2008; Atawodi y Atawodi, 2009).

Los metabolitos secundarios presentes en esta especie se clasifican tradicionalmente en 2 grandes grupos: compuestos no-isoprenoides (los cuales abarcan a los polisacáridos, proteínas, flavonoides, taninos, entre otros) e isoprenoides (los cuales engloban a una amplia variedad de sustancias con propiedades bioactivas). Entre los isoprenoides destaca la presencia del limonoide azadiractina, únicamente producido por *A. indica*, el cual es responsable de la mayor parte de las propiedades insecticidas características de la planta, así como de diversas propiedades medicinales. La azadiractina puede obtenerse a nivel industrial mediante el procesamiento de las semillas del neem, extrayendo el aceite de estas a través de un sistema de prensado; tratamientos posteriores del aceite con disolventes permiten obtener fracciones ricas en el metabolito. Tanto el aceite crudo como las fracciones purificadas han sido empleados para la fabricación de insecticidas comerciales, así como de algunos productos cosméticos (Koul, 2004; Srivastava y Srivastava, 2008; Tan y Luo, 2011; Nagin y Vidya, 2014).

Debido a los problemas asociados al uso de insecticidas sintéticos, el interés en el uso de compuestos naturales con propiedades insecticidas, como la azadiractina, ha ido en constante incremento. Gran parte de los insecticidas de uso común presentan extrema persistencia en el ambiente, bioacumulación, y toxicidad hacia organismos benéficos no-objetivos, siendo necesario por tanto su reemplazo por otros compuestos que presenten un menor impacto ambiental, manteniendo la eficiencia en la eliminación de plagas (Morgan, 2004). La azadiractina, debido a su efectividad a diversos estados del desarrollo del insecto, sus propiedades “amigables con el medioambiente” y la salud humana, su naturaleza biodegradable, y su bajo impacto en las especies no-objetivo, presenta un alto potencial para su uso en programas de manejo de plagas (Mordue *et al.*, 2010). Sin embargo, actualmente, la producción de compuestos con base en esta se encuentra fuertemente limitada, debido a problemas existentes durante el proceso de cultivo de la planta, colecta de materia prima, y extracción del metabolito usando el sistema de prensado.

Por otra parte, el carácter “multipropósito” del árbol de neem (tanto a nivel de la producción de insecticidas como de otras áreas) ha generado a su vez aumentos en la demanda de especímenes, a fin de utilizarlos como materia prima. Normalmente, el neem se propaga a través del cultivo de sus semillas; sin embargo, el carácter recalcitrante de estas deriva en una rápida pérdida de viabilidad desde que el fruto es cosechado, así como en bajos porcentajes de germinación, dificultando la obtención de ejemplares adultos productivos. Los métodos de propagación vegetativa tradicionales, tales como el uso de esquejes, acodos e injertos, también presentan bajos porcentajes de éxito (Dogra y Thapliyal, 1996; Schmutterer, 2002).

Estas complicaciones han hecho necesaria la búsqueda y aplicación de métodos de propagación alternativos, como vienen a ser el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y la inducción de embriogénesis somática, los cuales permiten obtener plantas libres de microorganismos, además de líneas celulares clonales élites, evitando las variaciones causadas por la fertilización (Bhojwani y Dantu, 2013). Por otra parte, las técnicas de cultivo *in vitro* en

el neem, además de ser utilizadas para el establecimiento de sistemas de propagación efectivos, también pueden ser implementadas para la producción continua y con calidad estandarizada de metabolitos secundarios de importancia, normalmente producidos por la planta, como por ejemplo, la azadiractina.

Así, el presente estudio buscó evaluar distintas condiciones de cultivo *in vitro* en neem, las cuales permitirán, por una parte, inducir y estimular el proceso de embriogénesis somática, y por otra parte la síntesis y posterior obtención del metabolito azadiractina. Para ello, en ambos casos se emplearon cultivos en medio líquido; en el caso de la inducción de embriogénesis somática, se analizó el efecto combinado de dos reguladores del crecimiento vegetal, en suspensiones celulares finas (de callos derivados de hoja y cotiledón), y en el caso de la síntesis de azadiractina, se usaron callos derivados de hoja, y se evaluó el efecto de variaciones en la composición mineral del medio, así como de la adición de dos sustancias que actúan como precursores en la ruta biosintética de este metabolito.

## II. Planteamiento del problema.

El reconocimiento mundial de la importancia del neem y sus metabolitos secundarios, ya sea a nivel agroquímico, farmacéutico, industrial, cosmético, entre otros, ha derivado en un incremento en la demanda de especímenes que sirvan como materia prima, a fin de alcanzar niveles de producción comercialmente viables. Para ello, es común la obtención de nuevos árboles mediante procedimientos de propagación sexual (semillas) o vegetativa (injertos y esquejes). Sin embargo, ambos sistemas presentan diversos problemas asociados:

En el caso de la vía sexual, las semillas de neem se caracterizan por ser recalcitrantes, derivando en rendimientos pobres al momento de germinación. Una vez germinadas, las plántulas pasan por un periodo juvenil prolongado, el cual retrasa la obtención de ejemplares adultos aprovechables. Además de esto, los árboles originados presentan una alta heterocigosis debido a las diferencias genéticas inherentes entre las semillas de las que derivan, dada la forma de reproducción del neem, la cual involucra la polinización cruzada y recombinación sexual (Schmutterer, 2002; Singh y Chaturvedi, 2013). En el caso de la propagación por vía vegetativa, aunque este método sí permite una preservación de la integridad genética, presenta bajos porcentajes de éxito (Dogra y Thapliyal, 1996).

Todas estas complicaciones, junto a otras como la disponibilidad de la tierra, condiciones geopolíticas, incidencia de enfermedades, y las limitaciones de agua, hacen que sea imposible seguir el ritmo de la creciente demanda de la planta sólo a través de métodos convencionales de propagación, por lo que se ha optado por la implementación de técnicas pertenecientes al campo de la biotecnología de tejidos vegetales. Entre estas, destaca especialmente la regeneración a través del proceso de embriogénesis somática *in vitro*, debido a ventajas tales como la alta proliferación de embriones una vez se han establecido las condiciones óptimas de cultivo, la baja frecuencia de quimeras, el desarrollo directo del embrión sin necesidad de una fase de enraizamiento intermedia, los limitados niveles de variación somaclonal, y el uso potencial de estos en la fabricación de semillas sintéticas (Solís-Ramos *et al.*, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013).

Aunque existen varios reportes de la inducción de embriogénesis somática en *A. indica*, su uso todavía no es habitual debido a ciertas limitaciones que dificultan su utilización a nivel comercial: (1) los cultivos embriogénicos de neem no presentan una sincronización espontánea, siendo reportada frecuentemente una alta heterogeneidad en las etapas de desarrollo, y una heterogeneidad morfológica eventual al final del desarrollo del embrión. (2) Es muy común la aparición de anomalías morfológicas tales como la pluricotiledonia, fusión de cotiledones, y ausencia de cotiledones, junto a otras anomalías tales como la germinación monopolar (formación de sólo brotes o raíces) y la presencia de haces vasculares poco desarrollados entre los ejes (Shrikhande *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1997; Chaturvedi *et al.*, 2004; Singh y Chaturvedi, 2013). Para evadir estos obstáculos, se hace

necesaria la optimización de los medios de cultivo utilizados para la iniciación y mantenimiento del proceso embriogénico, tomando en cuenta variables como el tipo de explante y las concentraciones de los reguladores del crecimiento añadidos, así como la aplicación de condiciones que faciliten la disponibilidad de agua, nutrientes y de estas sustancias reguladoras, a fin de aumentar entonces la productividad de los cultivos y lograr un normal desarrollo de los embriones.

Por otra parte, los problemas relacionados a la propagación y cultivo del neem también afectan la producción de metabolitos secundarios. Actualmente, la producción de compuestos formulados con base en la azadiractina se ve limitada por la insuficiente oferta de esta, debido a los problemas existentes durante el proceso tradicional de cultivo, colecta de la materia prima y extracción. Las semillas del neem, únicas partes utilizadas en la extracción de la azadiractina (debido a la alta concentración del metabolito en ellas, a 0,1 – 0,9% p/p), solo son producidas al iniciarse la fase reproductiva del árbol, la cual aparece luego de 5 – 6 años de haber sido plantado. La fructificación del neem ocurre desde entonces una sola vez al año, produciendo cada árbol una media de 20 kg de frutos / año; sin embargo, los rendimientos económicamente viables se obtienen es a la edad de 10 – 15 años, donde el árbol alcanza una máxima producción de alrededor de 50 kg de frutos / año (National Research Council, 1992). Luego de la colecta y descarte de la pulpa, si las semillas no son secadas y almacenadas en las condiciones adecuadas, se puede producir la degradación de la azadiractina. Trabajos como el de Yakkundi *et al.* (1995) indican una reducción hasta valores del 32% (p/p) luego de 4 meses de almacenamiento. Por otra parte, los agentes patógenos presentes en la superficie de la semilla (adquiridos durante el almacenamiento) pueden producir y acumular metabolitos tóxicos que se extraen posteriormente junto a la azadiractina, como por ejemplo, algunas aflatoxinas (Puri, 2003). Entre otras complicaciones importantes a considerar, está el hecho de que el árbol de neem no crece o presenta una pobre producción de frutos en climas con bajas temperaturas y/o heladas (Schmutterer, 2002), lo que dificulta la obtención de plantaciones productivas en diversas zonas del mundo. El tipo de suelo y la altitud también afectan el contenido de azadiractina, trayendo como consecuencia, variaciones en las propiedades insecticidas de los extractos; aunado a ello, se observan además variaciones estacionales y anuales (Sidhu *et al.*, 1996; Koul y Wahab, 2004).

Aunque la tecnología necesaria para preparar un extracto de semilla de neem es relativamente simple, la intensidad del trabajo de colecta y almacenamiento es alta, siendo común el uso de solo 1/3 del total de frutos colectados, debido a problemas operacionales y consideraciones de calidad (Singh y Chaturvedi, 2013). Por otra parte, a pesar de que la ruta sintética de la azadiractina ya se encuentra establecida, y el proceso de síntesis química está actualmente completo, la síntesis química total de esta molécula aun no es viable económicamente debido a su estructura compleja (Srivastava y Srivastava, 2008).

A fin de alcanzar un constante suministro de azadiractina, de calidad estandarizada, es apropiado usar un enfoque biotecnológico para su producción. La obtención comercialmente viable de moléculas vegetales químicamente complejas, como la azadiractina, se puede hacer factible a través de técnicas como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Para alcanzar cantidades de producto similares a las existentes en el proceso tradicional de extracción, primeramente es necesario el establecimiento de cultivos en laboratorio y optimizar las condiciones aplicadas a estos, considerando tanto la composición mineral del medio como la ruta metabólica a través de la cual se sintetiza la azadiractina (y las moléculas precursoras que intervienen en esta), a fin de inducir una mayor producción del metabolito, abriendo las puertas a un posterior escalado del proceso hasta un nivel industrial.

### III. Justificación.

El carácter “multipropósito” del árbol de neem ha generado que esta especie sea un foco de atención en distintas áreas, destacando las de tipo agrícola y farmacéutica, debido a la capacidad del árbol para sintetizar una extensa variedad de compuestos bioactivos. El amplio espectro de actividad de la azadiractina a bajas concentraciones, acoplado con su modo de acción único contra los insectos plaga, y su baja toxicidad hacia los mamíferos y especies beneficiosas, la hacen un candidato ideal para usos insecticidas, permitiendo reducir la dependencia hacia insecticidas sintéticos tóxicos.

Teniendo en cuenta los inconvenientes de los métodos actuales de propagación del neem y producción de azadiractina, se hace necesario el desarrollo de sistemas alternativos de propagación y para la producción mejorada y continua de metabolitos, que sean independientes de las fluctuaciones medioambientales y condiciones geopolíticas. La aplicación de técnicas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, tienen el potencial de eliminar las desventajas comúnmente existentes en los sistemas tradicionales de cultivo y extracción de metabolitos, permitiendo satisfacer la creciente demanda. Los cultivos celulares permiten un mayor control y optimización de las condiciones y variables, ofreciendo a su vez mayor selectividad y rendimientos, y además, evitando la contaminación con compuestos tóxicos de patógenos.

Procesos *in vitro* como la embriogénesis somática, al establecerse las condiciones óptimas para su inducción y mantenimiento, permitirían la obtención de una gran cantidad de ejemplares adultos con bajos niveles de variabilidad genética, los cuales presenten las mismas características que sus contrapartes generados en la naturaleza, pero habiéndose producido en espacios reducidos y controlados. Además de usarse con fines de propagación, la embriogénesis somática también podría emplearse en investigaciones posteriores centradas en el mejoramiento del cultivo, ya sea a través de selección celular o mediante la regeneración de plantas genéticamente modificadas. Por otra parte, en relación a la producción de azadiractina, el empleo de estrategias como el cultivo *in vitro* puede resolver los problemas de dependencia directa del recurso natural, permitiendo además una producción constante y de alta calidad del metabolito.

#### **IV. Objetivos.**

##### **4.1. Objetivo general.**

- Establecer el sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* A. Juss, a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de azadiractina *in vitro*.

##### **4.2. Objetivos específicos.**

- Evaluar el proceso de embriogénesis somática en suspensiones celulares en relación al tipo de explante y a la combinación y concentración de reguladores del crecimiento.
- Caracterizar morfo-anatómicamente el sistema de regeneración por embriogénesis somática en suspensiones celulares.
- Evaluar la producción de azadiractina a partir de callos no embriogénicos de hoja en medio líquido, en función del tipo de precursor y variaciones en la relación nitrato:amonio del medio de cultivo.

## V. Marco teórico.

### 5.1. Origen y distribución de *A. indica*.

El neem es una especie nativa del sudeste asiático, la cual ha sido introducida y establecida en los trópicos y subtropicos. Debido al cultivo generalizado que ha experimentado en el sudeste de Asia, existen varias discrepancias sobre su zona de origen, siendo la India y/o Birmania los dos principales países señalados. En la India, se señala a los bosques del estado de Karnataka (sur de la India) (Vartak y Ghante, 1990), mientras que en Birmania se señala las zonas boscosas de la zona centro y norte, en el distrito de Prome (Pyap) (Brandis, 1921; Jacobs, 1961). Más recientemente, Schmutterer (2002) señala a Birmania, indicando que la gran diversidad morfológica que se ha reportado para este árbol en la zona apoya la hipótesis de que este es el lugar de origen de la especie.

Actualmente, el neem presenta una amplia distribución, siendo cultivado en casi 80 países alrededor del mundo, con un estimado global de más de 91 millones de árboles para el 2004 (Koul, 2004), destacándose las zonas áridas tropicales y subtropicales de Australia, Oriente, África, el sudeste de Asia y América del Sur, y existiendo además reportes de algunas plantaciones exitosas de pequeña escala en Europa y Estados Unidos (Schmutterer, 2002; Kumar y Navaratnam, 2014). En Venezuela, el neem fue introducido aproximadamente en 1998, presentándose mayormente en la parte occidental del país, y creciendo en zonas que se encuentran entre 0–100 msnm (Aristeguieta, 2003; Reyes *et al.*, 2003).

### 5.2. Taxonomía.

Esta especie fue descrita en 1830 por Adrien Henri Laurent de Jussieu como *Azadirachta indica*. De acuerdo a Jacobs (1961), *A. indica* presenta 3 sinónimos:

- *Melia azadirachta* L.
- *Melia indica* (A. Juss) Brandis.
- *Antelaea azadirachta* (L.) Adelb.

Su clasificación taxonómica según ITIS (2016) es:

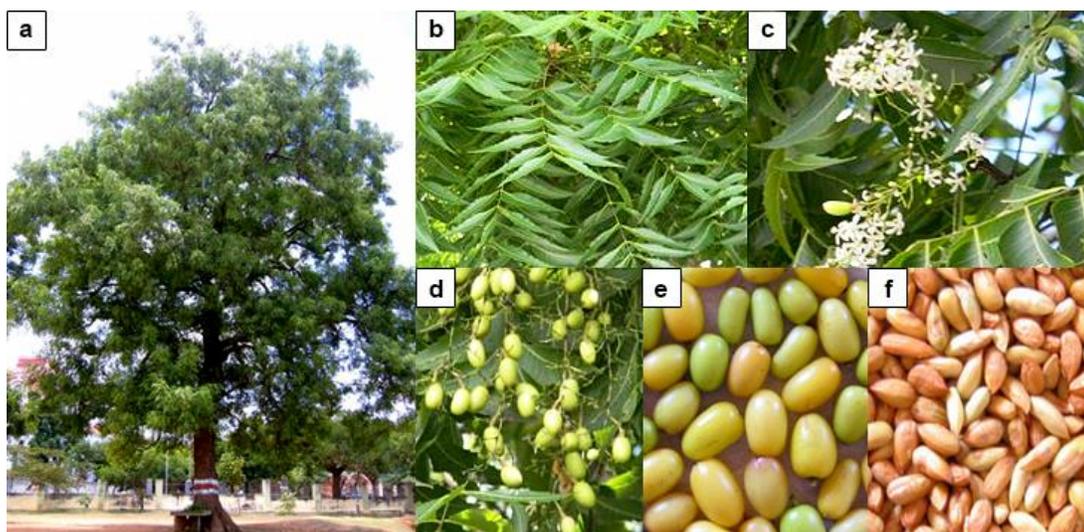
- Reino: Plantae.
- División: Traqueofita.
- Clase: Magnoliopsida.
- Superorden: Rosanae.
- Orden: Sapindales.
- Familia: Meliaceae.
- Género: *Azadirachta*.
- Especie: *Azadirachta indica* A. Juss.

El género *Azadirachta* sp. comprende solamente 2 especies: *Azadirachta indica* A. Juss y *A. excelsa* (Jack) Jacobs. Morfológicamente, ambas puede diferenciarse a nivel de las flores y hojas (Arora, 1993). El neem suele ser confundido (y muchas veces falsificado) con el lirio

de Persia (*Melia azederach* L.), ya que presentan características similares. El neem y el lirio de Persia comparten la misma familia (Meliaceae), sin embargo, ambas son especies distintas, y pueden diferenciarse morfológicamente a nivel de sus hojas, semillas y flores (Chowdhary y Singh, 2009; Ghedira y Goetz, 2014).

### 5.3. Descripción botánica, morfología y desarrollo de *A. indica*.

El neem es un árbol de tamaño medio, con alturas entre 15 – 20 m. El 66% del crecimiento del árbol ocurre durante los primeros 3 años, durante los cuales alcanza 4 – 7 m, y continúa su desarrollo hasta los 5 – 11 m en los próximos 5 años. Aunque es un árbol perenne, bajo circunstancias de sequía extrema puede perder parte o la totalidad de sus hojas (Schmutterer, 2002). El tronco es semi-recto, de corteza gruesa, agrietada o escamosa; la albura es de color grisáceo, mientras que la parte más interna es rojiza o café. Puede alcanzar diámetros de hasta 3 m. El sistema radicular se compone de una fuerte raíz principal y raíces laterales bien desarrolladas, las cuales pueden alcanzar más de 18 m. Posee una copa redonda u ovalada y ramas ampliamente extendidas. Las hojas son compuestas e imparipinnadas, de 20 – 40 cm de largo; presentan 15 folíolos alternados, cada uno de entre 3 – 8 cm de largo, con una forma estrecha, asimétrica y lanceolada, de márgenes dentados; en la etapa más joven, presentan una coloración rojiza o púrpura. El folíolo terminal se encuentra a menudo ausente (Figura 1a y b) (Schmutterer, 2002; Dhillon *et al.*, 2009; Varela, 2010).



**Figura 1.** Morfología del neem. **a.** Copa del árbol. **b.** Hojas. **c.** Flores. **d.** Frutos inmaduros en el árbol. **e.** Frutos colectados en distintas etapas de madurez (verdes: inmaduras, amarillas: maduras). **f.** semillas despulpadas (sin mesocarpio). Imágenes modificadas de: Girish y Bhat (2008), y Patel *et al.* (2016).

Esta especie es de tipo andromonoecia, ya que un mismo árbol puede producir flores tanto bisexuales como masculinas; estas cuelgan de inflorescencias axilares de aproximadamente 15 cm, de tipo panícula. Cada flor mide de 5 – 6 mm de largo y posee 5 pétalos blancos, oblongos y redondeados, 10 estambres unidos en un tubo, y (en el caso de las flores bisexuales) un pistilo con un ovario redondeado y un estilo delgado. Presentan un olor similar a la miel, el cual atrae a insectos polinizadores. La floración y posterior producción de frutos ocurre normalmente cuando el árbol alcanza los 3 – 5 años de edad; en su área de distribución natural esta se presenta anualmente entre marzo y mayo, sin embargo, puede variar de acuerdo a la zona geográfica. El fruto es una drupa suave y elipsoidal, de 1 – 2 cm de largo, lisa, indehisciente, de color verde claro cuando joven y amarillo-verdoso a amarillo cuando se encuentra madura. Contiene una semilla elíptica (ocasionalmente se pueden presentar 2 o 3) rodeada de una pulpa dulce. La producción de frutos es máxima cuando los árboles alcanzan aproximadamente los 10 años. Las semillas poseen un epicarpio delgado, un mesocarpio fibroso de color blanco-amarillento, y un endocarpio duro (Figura 1c – f) (Parrotta y Chaturvedi, 1994; Gupta *et al.*, 1995; Shanthi *et al.*, 1996; Schmutterer, 2002; Dhillon *et al.*, 2009).

#### **5.4. Ecología.**

El neem es tolerante a la mayor parte de los tipos de suelo, pudiendo crecer en suelos poco profundos, secos y pedregosos, suelos lateríticos, alcalinos, arcillosos, calcáreos y en arenas altamente lixiviadas. Sin embargo, su crecimiento es pobre en los sitios inundados o muy húmedos, ya que se presentan problemas de marchitez y muerte gradual de las raíces. En suelos con alto contenido de arena fina o limo se puede presentar deficiencia de nutrientes y la muerte de los árboles. Los suelos óptimos para el desarrollo del neem son de tipo arenoso, bien drenados y profundos, donde el nivel del agua subterránea fluctúa entre una profundidad aproximada de 3 – 5 m a través de todo el año. Respecto al pH, aunque el nivel óptimo se encuentra de 6.0 – 6.5, puede crecer en suelos con pH entre 5.0 – 8.5. Esta especie ve comprometido su crecimiento en suelos pobres en potasio y/o zinc, debido a que se produce clorosis en las puntas y márgenes de las hojas, seguida por necrosis (Parrotta y Chaturvedi, 1994; Schmutterer, 2002; Tomar y Singh, 2008).

Debido a su sistema radicular profundo, que se adapta para la retención de agua y nutrientes, y su uso eficiente del agua, el neem presenta una alta resistencia a la sequía. Normalmente se desarrolla en áreas con una precipitación anual entre 400 – 1200 mm. Puede crecer en regiones con una precipitación anual inferior a los 400 mm, pero en estos casos depende fuertemente del agua subterránea. Existen reportes de árboles de neem en regiones con precipitaciones de más de 2500 mm anuales, donde la presencia de suelos bien drenados evita la acumulación del agua y pudrición de las raíces. Crece en temperaturas medias entre 21 – 32°C, aunque puede tolerar temperaturas muy altas, entre 40 – 50°C. Las temperaturas por debajo de 4°C y las heladas resultan en la caída de las hojas y muerte de las plantas

jóvenes. El neem prospera en altitudes que van hasta los 700 – 800 msnm, y ocasionalmente a 1000 msnm. A alturas mayores se dificulta el crecimiento del árbol y la producción de frutos, debido a las bajas temperaturas y altas precipitaciones (National Research Council, 1992; Parrotta y Chaturvedi, 1994; Schmutterer, 2002; Tomar y Singh, 2008).

### **5.5. Depredadores y patógenos.**

Aunque los frutos y hojas del neem presentan diversos compuestos que repelen o producen la muerte de insectos, inhiben el crecimiento de hongos y bacterias, y limitan la infectividad de virus, esta especie se presenta vulnerable al ataque de diversos organismos. Los artrópodos usualmente actúan como depredadores, atacando principalmente las hojas y brotes. En Asia se reportan daños graves debido a las formas adulta y ninfa de *Helopeltis antonii* (orden: Hemiptera), así como debido a la polilla *Adoxophyes aurata* (orden: Lepidoptera). En diversas zonas de los trópicos y subtropicos (especialmente en África) se reportan daños a los brotes y hojas por *Aonidiella orientalis* (orden: Hemiptera). En el caso de las termitas (orden: Isoptera), algunas especies como *Microtermes thoracalis* y *Macrotermes bellicosus* pueden encontrarse habitando la madera y corteza, aunque por lo general no atacan el tejido vivo. De las hormigas, destaca el género *Acromyrmex* spp. en Centroamérica y América del Sur, ya que estas actúan como defoliadores comunes en arboles jóvenes y plántulas. Respecto a otros artrópodos reportados como especies dañinas, destaca el ácaro *Schizotetranychus hindustanicus*, el cual causa manchas en la parte inferior de la hoja. Aunque también existen moluscos, aves y mamíferos que actúan como depredadores, estos no suelen generar daños graves (National Research Council, 1992; Parrotta y Chaturvedi, 1994; Schmutterer, 2002).

En lo relacionado a patógenos microbianos, se reportan afecciones como la pudrición de la raíz (causada por *Ganoderma lucidum*), tizón en tallos y ramas (*Corticium salmonicolor*), manchas en las hojas (*Cercospora subsessilis* y *Glomerella cingulata*), y oídio (*Oidium* sp.). En plántulas de semilleros, se destaca el ataque por parte de hongos de los géneros *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, los cuales causan marchitamiento, pudrición y roya. También se han reportado patógenos bacterianos como *Pseudomonas azadiractae*, la cual causa una roya bacteriana caracterizada por la aparición de manchas foliares (National Research Council, 1992; Kaushik y Nandal, 2009).

### **5.6. Importancia.**

El neem ha sido descrito como un “árbol multipropósito” debido a su uso en diversas áreas: agroforestal, médico, veterinario, cosmético, industrial, entre otros. La importancia del neem ha sido reconocida por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, la cual publicó un reporte en 1992, titulado: “Neem – Un Árbol para resolver Problemas Mundiales” (“Neem: A Tree for Solving Global Problems”) (National Research Council, 1992).

A nivel agroforestal, la alta resistencia del neem a climas calurosos, estrés hídrico y suelos poco fértiles, hacen que sea una elección ideal para la recuperación de zonas donde es difícil el crecimiento de otras especies vegetales. Cruz (1993) señala que el neem permite prevenir la erosión y aumentar la retención del agua en las zonas donde es plantado. Existen reportes de su uso en Nigeria para programas de reforestación, donde comprendió un 90% de los árboles utilizados en plantaciones forestales realizadas en 12 estados con zonas de sabana (Ogbuewu *et al.*, 2011). En Venezuela, el neem ha sido implementado en sistemas de reforestación y prevención de la erosión del suelo, en los estados Falcón, Trujillo, Zulia y Mérida (Reyes *et al.*, 2003; Romero y Vargas, 2005).

Diversas partes del neem pueden ser empleadas en la fabricación de fertilizantes orgánicos. Gajalakshmi y Abbasi (2004) indican que las hojas pueden ser utilizadas para la preparación de vermicompost, teniendo tanto capacidad fertilizante como propiedades insecticidas. Por otra parte, las costras de las semillas pueden ser utilizadas para corregir el suelo junto a abonos inorgánicos, ya que facilitan la liberación y un uso gradual y más eficiente del nitrógeno inorgánico por las siembras (Parrotta y Chaturvedi, 1994). En la India, las hojas verdes son utilizadas como forraje para el ganado en la estación seca. La “torta de semillas” de neem (un subproducto de la extracción industrial del aceite de neem, conformado por la pulpa y restos de semillas), es ampliamente utilizada como alimento para aves domésticas y ganado vacuno y porcino, mientras que el aceite puede utilizarse para complementar la alimentación de aves domésticas (Ogbuewu *et al.*, 2011).

El uso más destacado del neem es a nivel de sus propiedades insecticidas. Tradicionalmente, las hojas secas del neem se han empleado en las zonas rurales de la India para alejar insectos dañinos de las camas y almacenes de granos (Kumar y Navaratnam, 2014). Investigaciones realizadas en los extractos de las partes de esta planta (hojas, frutos, flores, entre otras), han señalado la presencia de una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales afectan el desarrollo, crecimiento y fisiología de varias especies de insectos que actúan como plagas de cultivos, siendo a su vez no-tóxicos para el hombre y para varias especies de insectos beneficiosas (Koul, 2004; Mordue, 2004). Diversos productos insecticidas, fabricados en base a los metabolitos secundarios extraídos del neem, son empleados a nivel internacional en los programas de manejo de plagas, debido a su efectividad y sus propiedades “amigables con el medioambiente”, permitiendo una reducción en el uso de pesticidas sintéticos dañinos para el ambiente y salud humana (Koul, 2004).

El neem también puede ser utilizado como material base en la industria maderera, debido a que el árbol no es muy exigente en su crecimiento, y la madera producida es resistente y no es fácilmente infestada por las termitas u otros insectos (Parrotta y Chaturvedi, 1994; Elteraifi, 2004). Entre otros usos, este árbol se emplea como barrera natural contra el viento en zonas donde este alcanza altas velocidades (Girish y Bhat, 2008), y también se emplea como un “purificador de la atmósfera”, ya que presenta una alta tasa fotosintética, lo

cual permite que libere más oxígeno que otras especies arbóreas (Nigam *et al.*, 1994). El aceite y el polvo de hojas son empleados en la fabricación de algunas marcas de crema dental comercializadas en la India y Europa, así como en preparaciones cosméticas tales como cremas, esmalte para uñas, jabones y champú (Ogbuewu *et al.*, 2011).

En las zonas del sur de Asia, el neem se considera un árbol sagrado debido a su capacidad para prevenir enfermedades. Este ha sido utilizado por más de 4500 años en la India como planta medicinal, existiendo documentos de su uso en tratamientos de la medicina Ayurvédica, considerada el sistema médico más antiguo (Kumar y Navaratnam, 2014). En las zonas rurales, se reporta el uso de decocciones de las hojas para el tratamiento de diversas dolencias estomacales y de piel (acné, verrugas, psoriasis), así como el uso de la corteza y raíz para el tratamiento de fiebres intermitentes, y de cataplasmas de hojas para el tratamiento de heridas (Parrotta y Chaturvedi, 1994; Thas, 2008; Kumar y Navaratnam, 2014). Varias investigaciones, tanto *in vitro* como *in vivo*, han indicado que los extractos de neem presentan metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes, hepatoprotectivas, antibacteriales, anticancerígenas, hipoglicémicas, entre otras (Atawodi y Atawodi, 2009; Ogbuewu *et al.*, 2011). Por otra parte, así como presenta beneficios para la salud humana, se reporta también su uso y efectividad en el tratamiento de parásitos, úlceras e infecciones cutáneas en animales (Girish y Bhat, 2008).

## **5.7. Propagación.**

La propagación natural (sin intervención humana) se produce durante la temporada de fructificación. Las semillas presentes en los frutos son dispersadas gracias a las lluvias y el consumo de la pulpa por parte de aves y mamíferos, ocurriendo posteriormente su germinación en el suelo, y el establecimiento de la planta joven (Schmutterer, 2002). En lo que respecta a la propagación con intervención humana, el neem se puede propagar tanto vegetativa como sexualmente.

En la propagación sexual, los frutos maduros son colectados, despulpados y sembrados inmediatamente debido al carácter recalcitrante de las semillas, existiendo riesgos de pérdida de viabilidad y bajos porcentajes de germinación si el tiempo antes de la siembra se prolonga (Schmutterer, 2002). La viabilidad puede extenderse por algunos meses mediante la eliminación del mesocarpio, y el posterior secado y almacenamiento de la semilla en condiciones controladas de humedad y temperatura, existiendo reportes de semillas viables hasta por 6 – 8 meses (Saxena, 2004; Tomar y Singh, 2008). La germinación ocurre entre los 4 – 10 días después de la siembra. Esta puede realizarse en semilleros, trasplantándose posteriormente la planta joven a la zona definitiva (Parrotta y Chaturvedi, 1994). En el caso de la reproducción por la vía vegetativa, esta se emplea mayormente en la preservación y propagación de especímenes con características sobresalientes en producción y contenido de sustancias bioactivas, ya que en este proceso se generan individuos genéticamente idénticos a

la planta donante. Los métodos de propagación tradicional incluyen injertos, y esquejes de raíces y tallos. La propagación vegetativa del neem también se puede dar a través del cultivo de tejidos, por medio del cultivo *in vitro* de yemas axilares, brotes adventicios, y la embriogénesis somática (Punia *et al.*, 2008; Tomar y Singh, 2008).

### **5.8. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales comprende una serie de técnicas heterogéneas, cuyo objetivo consiste en el aislamiento de una porción de la planta y su posterior cultivo en un medio estéril, el cual presenta las condiciones físicas y químicas necesarias para inducir determinadas respuestas morfogénicas en la muestra, que pueden ir desde la formación de órganos específicos y de embriones, hasta la regeneración de una planta completa o la síntesis de un metabolito (Thorpe, 2007). Estas técnicas se fundamentan alrededor del concepto de la totipotencia de las células vegetales, las cuales tienen la capacidad única de regenerar plantas completas (y partes de ellas), indiferentemente de la fuente del explante y el nivel de ploidía (Bhojwani y Dantu, 2013; Singh y Chaturvedi, 2013). De acuerdo a la muestra vegetal utilizada, se pueden diferenciar algunos tipos de cultivos: (1) cultivo de embriones aislados, (2) de órganos específicos, (3) de porciones de tejidos o de callos, y (4) de células aisladas o en pequeños agregados dispersos en medio líquido (en suspensión). El tipo de cultivo afecta el crecimiento celular y, en caso de inducirse la síntesis de un metabolito específico, afecta también la formación del producto y su purificación (Sajc *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2009b).

Los explantes pueden obtenerse tanto de plantas cultivadas en campo, como de plantas crecidas en un medio estéril *in vitro* (denominadas “vitro–plantas”). Cuando estos se originan de plantas crecidas en campo, existe la desventaja de la presencia de microorganismos endófitos y epífitos, siendo necesario implementar un sistema de desinfección. Este por lo general consiste en tratar al explante con alcohol isopropílico e hipoclorito de sodio (Leifert *et al.*, 1991), siendo ambos compuestos comúnmente reportados para la desinfección de explantes de neem. También se ha reportado el uso de bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), el cual presenta una alta capacidad de desinfección; sin embargo, tiene la desventaja de ser tóxico y altamente contaminante, pudiendo afectar la viabilidad del explante (Herrera *et al.*, 2011). Cuando el explante proviene de una vitro–planta, no es necesaria la etapa de desinfección, ya que estas se han desarrollado completamente en un ambiente estéril, sin tener contacto con contaminantes microbianos externos.

El crecimiento, desarrollo y respuesta morfogénica de un explante en el medio de cultivo va a depender de las características genéticas de la muestra, y de la composición química y características físicas del medio. Bhojwani y Dantu (2013), señalan que el medio debe presentar todos los macro y micronutrientes necesarios para el desarrollo, además de vitaminas y aminoácidos. Debe poseer una fuente de carbono, siendo usualmente utilizadas sacarosa o glucosa. También es necesario agregar reguladores del crecimiento vegetal, para

activar determinados tipos de diferenciación (o desdiferenciación) celular en el explante. El tipo y cantidad agregada de estos va a depender de la especie, tejido considerado y del tipo de cultivo. Otros parámetros importantes en la fabricación del medio de cultivo son el pH (recomendándose valores de 5,8), y su estado físico (líquido o sólido).

Dos de las principales respuestas morfogénicas que pueden obtenerse a través del cultivo de tejidos son la organogénesis, donde las células somáticas se diferencian en órganos específicos (por ejemplo: raíces y/o brotes), y la embriogénesis somática, donde células somáticas se diferencian en embriones. Ambos procesos implican la obtención de estructuras organizadas. También puede darse la formación de masas desorganizadas de tejido, conocidas como “callos”, las cuales surgen debido a la desdiferenciación y proliferación acelerada del tejido vegetal (Jiménez, 2001; Bhojwani y Dantu, 2013).

### **5.9. Embriogénesis somática.**

La embriogénesis es un modo especializado de desarrollo, en el cual el óvulo fertilizado, a través de una serie de patrones de división y diferenciación celular, forma un embrión, el cual es precursor de la siguiente generación (Bhojwani y Dantu, 2013). En las plantas superiores, el proceso de doble fertilización genera simultáneamente el embrión y el endospermo, siendo este desarrollo en conjunto lo que origina las semillas. El cigoto fertilizado se alarga y se divide asimétricamente, generando una célula basal y una apical. Las posteriores divisiones de la célula basal resultan en la formación del suspensor, el centro quiescente, la caliptra y el meristemo de la raíz; todos los demás elementos del embrión cigótico, como el meristemo apical del brote, el hipocotilo y los cotiledones, se derivan de la célula apical. Este proceso se denomina “embriogénesis cigótica”, y se caracteriza por ser profundamente dependiente de los tejidos maternos (Hecht *et al.*, 2001).

Se tiene entonces que la fertilización origina el fenómeno de la embriogénesis cigótica. Sin embargo, en algunas plantas superiores se producen desviaciones de este proceso, donde la fertilización no comprende el evento desencadenante de la embriogénesis. Un ejemplo viene a ser la apomixis, la cual consiste en la formación asexual del embrión y la semilla a partir de los tejidos maternos del óvulo, evitando los procesos de meiosis y fertilización (Bicknell y Koltunow, 2004). La embriogénesis somática comprende otra vía para la formación asexual de embriones, en la cual estos se originan de células somáticas fuera del saco embrionario (al contrario de la apomixis), en cultivo *in vitro*, siendo su origen (usualmente) unicelular. El desarrollo de embriones somáticos es muy similar al de los embriones cigóticos, tanto morfológica como espacialmente, y su inducción puede ocurrir tanto directamente de la superficie de un tejido organizado, como indirectamente luego de una fase intermedia de callo (Singh y Chaturvedi, 2013). Los embriones somáticos también pueden iniciarse a partir de otros embriones somáticos pre-existentes, proceso denominado “embriogénesis cíclica” (Inpuay y Te-chato, 2012).

Este proceso inicia una vez la célula ha adquirido el potencial embriogénico, con lo cual comienza a dividirse hasta formar una agrupación en forma circular, que comprende el primer estado de la embriogénesis o “fase globular”. Posteriores divisiones asimétricas a lo largo del eje permiten la formación de los cotiledones y el hipocotilo, y el inicio del desarrollo de la radícula, adoptando el embrión una forma “acorazonada”, denominada “fase de corazón”. La continua división y elongación de las células a lo largo del eje embrionario permiten que este pase a “fase de torpedo”, y luego a “fase de plántula”, en la cual se presentan los cotiledones e hipocotilo bien diferenciados, además de una radícula (Lynn, 1993; Jiménez, 2001). La embriogénesis somática presenta varias diferencias respecto a otros procesos regenerativos *in vitro*, tales como la organogénesis del brote o caulogénesis. En este último, las células del explante se diferencian en una estructura denominada “brote”, que presenta un sistema vascular unido a los tejidos parentales; en contraste, la embriogénesis produce un sistema vascular independiente del tejido madre. Otra diferencia fundamental entre ambos procesos, es que en el caso de la formación de brotes se debe inducir una fase de enraizamiento posterior, mientras que, en la embriogénesis, los embriones formados disponen ya de un sistema radicular (Jiménez, 2001; Bhojwani y Dantu, 2013). Mediante el proceso de embriogénesis se produce además una menor frecuencia plantas quiméricas, y niveles limitados de variación somaclonal (Ahloowalia, 1991; Henry *et al.*, 1998).

La activación o inicio de la embriogénesis somática requiere el cumplimiento de ciertos criterios: la especie o genotipo vegetal debe tener la capacidad para formar embriones a partir de células somáticas, y una o unas pocas células del explante tienen que ser competentes para recibir una señal (endógena o exógena) que active la vía de desarrollo embrionario (Fehér, 2005). En la mayor parte de las especies vegetales, la competencia embriogénica está mayormente restringida a ciertos tejidos de un determinado genotipo. Esta disminuye continuamente durante la ontogénesis del organismo, siendo el potencial embriogénico más alto en los tejidos de origen embrionario, y menor hacia las estructuras con mayor grado de diferenciación, como las hojas y raíces (Bhojwani y Dantu, 2013).

Una vez captada la señal, las células somáticas entran en ciclo celular, cambiando a un estado desdiferenciado, caracterizado por una reorganización de la fisiología celular y metabolismo (Domoki *et al.*, 2006). Este proceso puede ser inducido mediante cambios en las condiciones de cultivo, usando reguladores del crecimiento vegetal. Las auxinas y citocininas presentan usualmente un rol crítico en la inducción de la embriogénesis somática, en el sentido que proveen a las células de la flexibilidad necesaria a nivel de procesos de desarrollo (Fehér *et al.*, 2003). Las células desdiferenciadas que presenten potencial embriogénico, pueden volver a diferenciarse en embriones somáticos. Los cambios fisiológicos y bioquímicos durante todo este proceso se deben a la modulación transcripcional de diversos genes (mediada por las señales endógenas o exógenas), ocurriendo la expresión de proteínas

relacionadas con la reorganización celular, respuesta al estrés y transporte intracelular de membrana (Fehér, 2005; Zhu *et al.*, 2008).

### **5.10. Metabolitos secundarios en *A. indica*.**

Los metabolitos secundarios consisten en compuestos de bajo peso molecular, distintos de los intermediarios y productos del metabolismo primario (división celular, crecimiento, respiración y reproducción). Históricamente, estos se han definido como productos que no poseen un papel bioquímico vital en el proceso de construcción y el mantenimiento de las células vegetales. Sin embargo, se ha determinado que son importantes para la supervivencia de la planta, ya que participan en los procesos de adaptación de ésta a las condiciones del ambiente circundante (nivel de exposición UV, intensidad de luz, temperatura, nutrientes minerales), así como en las respuestas generadas cuando se encuentran sometidas a condiciones de estrés, tales como la depredación por parte de herbívoros, el ataque de microorganismos, y la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas (Briskin, 2000; Bourgaud *et al.*, 2001; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

La base de datos NeeMDB (<http://www.vmsrfdatabase.org/index.php>) (Hatti *et al.*, 2014), la cual provee información sobre los metabolitos secundarios presentes en *A. indica*, señala, para el 2014, la existencia de 250 metabolitos diferentes reportados. Algunos autores clasifican los metabolitos secundarios presentes en esta especie en 2 grandes grupos: terpenos o isoprenoides, y compuestos no-isoprenoides. Los isoprenoides agrupan a los diterpenoides y triterpenoides. De estos, los triterpenoides son los más abundantes, encontrándose en todas las partes del neem, especialmente en las hojas y semillas. Entre los triterpenoides destacan los llamados tetranortriterpenoides o limonoides, ya que constituyen aproximadamente un tercio de los constituyentes fitoquímicos en el neem, siendo también compuestos muy comunes en el resto de la familia Meliaceae. En el caso del grupo conformado por los compuestos de tipo no-isoprenoides, este abarca a los flavonoides, taninos, ácidos grasos, coumarinas, entre otros (Tan y Luo, 2011; Nagin y Vidya, 2014).

Los metabolitos secundarios del neem presentan una gran variedad de propiedades biológicas y farmacológicas. Una de las más frecuentemente investigadas es la actividad insecticida de los extractos contra especies que actúan como plagas de cultivos, las cuales se ven afectadas a nivel de su desarrollo y/o reproducción. Análisis fitoquímicos y fraccionamientos guiados por bioensayos sugieren que estas propiedades son mediadas por grupos de compuestos como los limonoides y meliatetraolenonas, destacando el papel de la azadiractina (Siddiqui *et al.*, 2000; Koul, 2004).

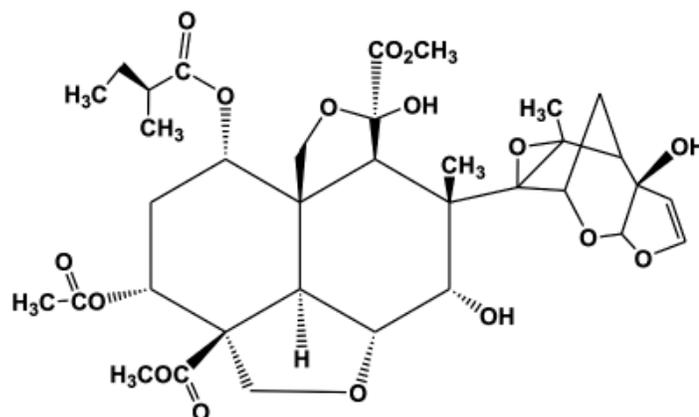
Investigaciones realizadas con extractos de diversas partes del árbol han señalado propiedades antioxidantes (Gupta *et al.*, 2004) y hepatoprotectivas (Chattopadhyay, 2003). Algunos compuestos presentes en los extractos, como la azadirona (Nanduri *et al.*, 2003) y las

flavonas preniladas (Tepsuwan *et al.*, 2002), presentan actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Estudios realizados en extractos etanólicos de hoja, han demostrado también efectos protectores contra la carcinogénesis inducida en ratones (Subapriya *et al.*, 2004). Entre las propiedades antimicrobianas, se reporta que varios tipos de extractos de neem presentan actividad antibacterial contra especies patógenas como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella infantis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otras (Almas, 1999; Sairam *et al.*, 2000; Vanka *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2002; Alzoreky y Nakahara, 2003). También se ha reportado actividad antiviral contra el virus del dengue tipo 2 (Parida *et al.*, 2002) y el grupo B de los Coxsackievirus (Badam *et al.*, 1999), y actividad fungistática y fungicida contra hongos fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Curvularia lunata* y *Schlerotium rolfsii* (Bhonde *et al.*, 1999), y hongos dermatofitos como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton violaceum* y *Epidermophyton floccosum* (Natarajan *et al.*, 2002). Estudios fitoquímicos han relacionado gran parte de esta actividad antimicrobiana a los tetranortriterpenoides presentes en los extractos (Atawodi y Atawodi, 2009).

Omar *et al.* (2003) reportan que los extractos purificados de *A. indica* y otros miembros de la familia Meliaceae que contienen genudina, muestran una actividad antimálarica significativa *in vitro*, pero pobre al evaluarla *in vivo*. También se ha estudiado el efecto de los extractos de neem contra el parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. Yanes *et al.* (2004) indica que el extracto clorofórmico de hoja de neem inhibe marcadamente el crecimiento de *T. cruzi*. Otras propiedades reportadas para estos metabolitos son de tipo antidiabético, debido a la capacidad hipoglucémica de los extractos en modelos animales de diabetes inducida (Halim, 2003). Los metabolitos del neem también tienen efectos a nivel de la fertilidad; se ha determinado que los extractos de hoja presentan propiedades espermicidas y efectos negativos en los niveles de testosterona sérica (Parshad *et al.*, 1994; Kasturi *et al.*, 2002). En lo relacionado a la fertilidad femenina, los extractos de semillas presentan propiedades moduladoras de tipo contraceptivo (Mukherjee *et al.*, 1999).

### 5.11. Azadiractina.

La azadiractina, de fórmula química  $C_{35}H_{44}O_{16}$ , es un limonoide presente en diversas partes del árbol de neem (Figura 2). Se encuentra conformada por 8 anillos condensados, de los cuales 3 son de tipo carbocíclico, y 5 de tipo heterocíclico. Presenta una gran cantidad de grupos funcionales de oxígeno. Es fotolábil, soluble en solventes orgánicos polares, y ligeramente soluble en agua. Actualmente existen 17 análogos estructurales reportados, de los cuales la azadiractina-A y azadiractina-B constituyen aproximadamente el 99% de las azadiractinas presentes en el neem, siendo responsables además de la bioactividad que presentan varios de los extractos de la planta. El 1% restante comprende otros análogos, denominados desde la C hasta la Q (Ley *et al.*, 1993; Morgan, 2009; Kusari *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Estructura química de la azadiractina. Fuente: Srivastava y Srivastava (2008).

Uno de los principales atractivos de este compuesto es que es un “insecticida natural”, pudiendo afectar la alimentación, crecimiento, reproducción y metamorfosis de más de 200 especies de insectos de diversos órdenes (Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Homoptera, Lepidoptera, Orthoptera, entre otros), y presentando actividad incluso a concentraciones de 10 ppm para algunas especies (Srivastava y Srivastava, 2008). La azadiractina actúa como inhibidor del crecimiento, mediante la inducción de un desbalance hormonal (Barnby y Klocke, 1990). También presenta un efecto antialimentario, debido a que estimula quimiorreceptores específicos en las piezas bucales, que suprimen el proceso de alimentación, además de interferir en la percepción de fagoestimulantes por otros quimiorreceptores, pudiendo derivar en la muerte del insecto por desnutrición. Otros efectos negativos, como la reducción del crecimiento, mudas anormales o retardadas, y fecundidad reducida o esterilidad, son causados por su acción directa sobre los tejidos somáticos y reproductivos del insecto, e indirectamente a través de la disrupción del proceso endocrino. A nivel celular, la azadiractina interviene en el proceso de síntesis de proteínas, mediante la alteración o prevención de los procesos de transcripción y/o traslación (Mordue, 2004).

Aunque el efecto insecticida ha sido el más estudiado para este compuesto, la azadiractina también afecta el crecimiento de diversos hongos y virus (Sharma *et al.*, 2003), y presenta propiedades anticancerígenas (Paul *et al.*, 2011) y antiplasmodiales (Jones *et al.*, 1994). Diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han sugerido que la azadiractina presenta ninguna o poca toxicidad para los vertebrados a concentraciones altas, y genera un bajo impacto en insectos que actúan como polinizadores (Salehzadeh *et al.*, 2002; Mordue *et al.*, 2010). Raizada *et al.* (2001) indican la ausencia de efectos negativos al administrar la azadiractina en dosis de 1500 mg.kg<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> a ratas por vía oral durante 90 días. En lo que respecta a los efectos fitotóxicos, estos se han observado mayormente a concentraciones superiores a 200 ppm (Mordue *et al.*, 2010).

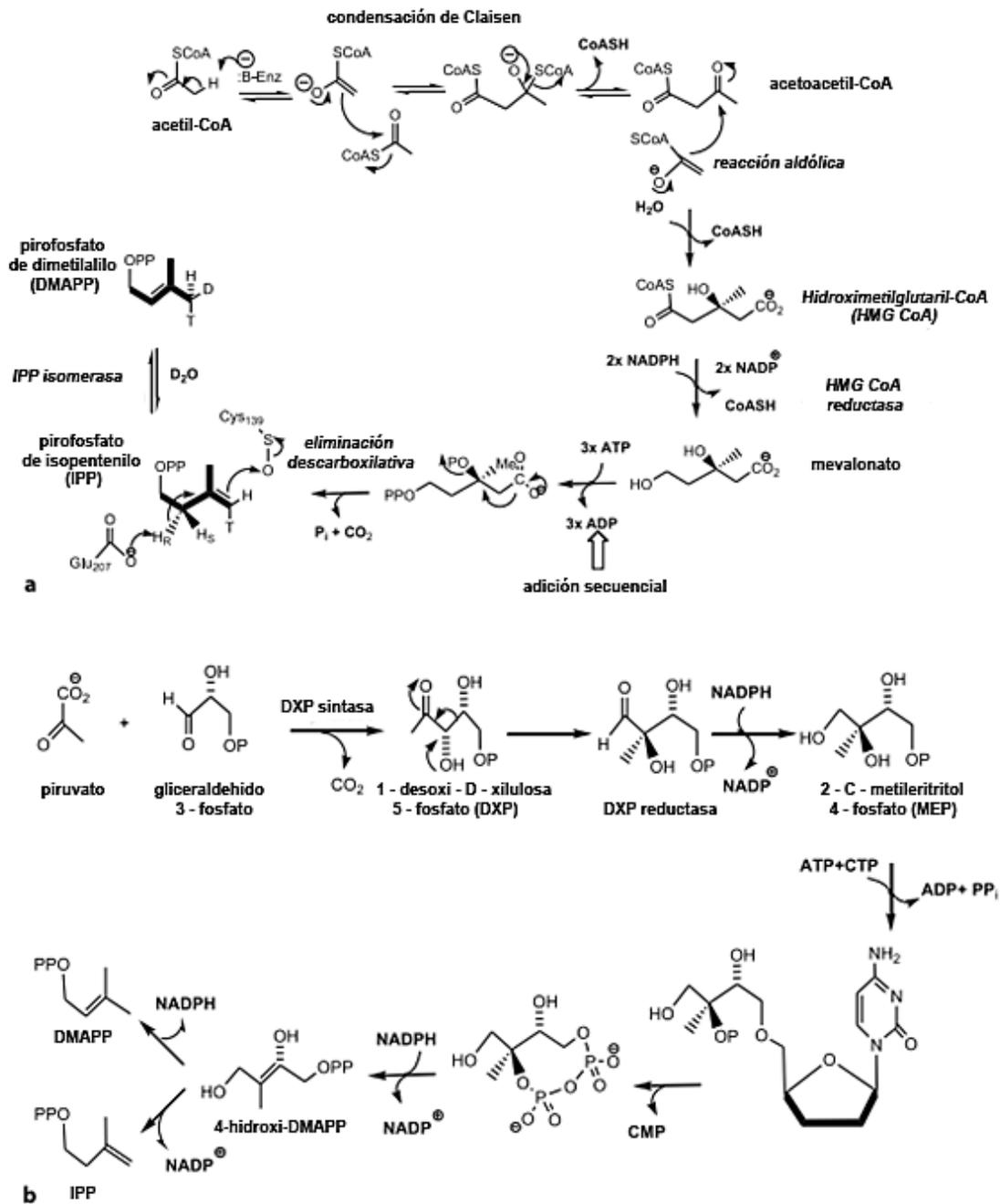
Esta se extrae comercialmente de las semillas, las cuales son colectadas y despulpadas; los granos, una vez limpios, son prensados para extraer los aceites que contienen, purificándose posteriormente la azadiractina mediante la aplicación de disolventes al aceite y a la parte sólida (Koul, 2004). La mayor parte de los insecticidas basados en neem se realizan en base a los aceites crudos, o la azadiractina parcialmente purificada. Aunque se ha logrado producir la azadiractina por medio de la síntesis química, su producción por esta vía aun presenta diversas limitaciones. La quiralidad compleja de la molécula, junto a la presencia de varios enlaces de hidrógeno internos, y sensibilidad a condiciones alcalinas, ácidos muy fuertes, y luz solar, hacen que el proceso de síntesis química no sea rentable a nivel comercial (Srivastava y Srivastava, 2008; Morgan, 2009).

El primer insecticida de neem comercial, “Margosan-O®”, fue registrado por la Agencia de Protección al Medioambiente (EPA, por sus siglas en inglés; *Environmental Protection Agency*) en julio de 1985, para su uso en cultivos no-alimentarios. Desde entonces, diversos productos insecticidas basados en neem han sido formulados y vendidos por empresas, tanto en la India como en otros países. Entre ellos, se encuentran algunos como “Green Gold®”, “Turplex™” y “Neemix” (Copping y Menn, 2000; Srivastava y Srivastava, 2008; Morgan, 2009). Estos se han utilizado también en cultivos alimentarios; en California (Estados Unidos), existen reportes del uso de insecticidas de neem en más de 60 cultivos alimentarios, especialmente lechuga y tomate (Isman, 2004).

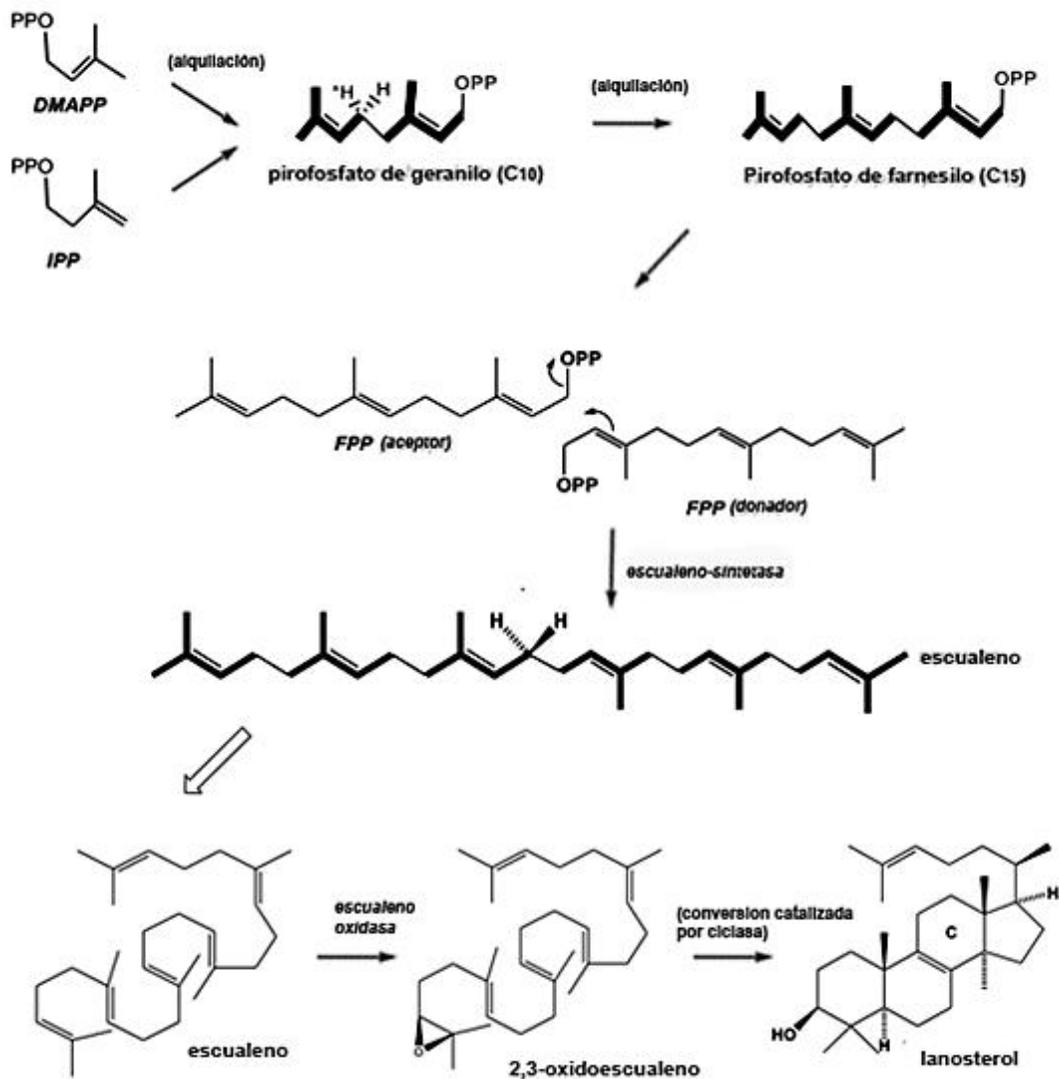
### **5.12. Biosíntesis de la Azadiractina.**

Los triterpenoides como la azadiractina pertenecen al grupo de los isoprenoides, los cuales son sintetizados a través de la condensación de dos unidades distintas de isopreno: el isopentenilpirofosfato (IPPF), y su isómero, el dimetilalilpirofosfato (DMAPF). Se conocen 2 rutas distintas para la biosíntesis de estos dos precursores: la vía del mevalonato y la vía de 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato (Figura 3) (Rohmer *et al.*, 1993; Srivastava y Srivastava, 2008).

La síntesis de la azadiractina inicia con la alquilación del DMAPF por el IPP (ambas, de 5 carbonos), dando lugar al pirofosfato de geranilo, una molécula de 10 carbonos; esta posteriormente se somete a otra alquilación con el IPPF, dando lugar al farnesil pirofosfato (FPP), una molécula de 15 carbonos. El acoplamiento cabeza-cabeza de dos unidades de FPP, catalizado por la enzima escualeno sintasa, genera una molécula de escualeno, de 30 carbonos. El escualeno es posteriormente oxidado a 2,3-oxidoescualeno por la escualeno oxidasa; esta molécula forma a continuación el lanosterol por medio de su ciclación, catalizada por la adenilato de 2,3-oxidoescualeno, la cual establece el sistema de anillo, característico de todos los esteroides (Figura 4). La azadiractina se produce por medio de modificaciones posteriores en el lanosterol, siendo los detalles de este proceso aún desconocidos, aunque se presume que ocurre a través de la escisión oxidativa del anillo esteroide (Srivastava y Srivastava, 2008).



**Figura 3.** Primeras etapas de la biosíntesis de la azadiractina, en la cual se producen el IPPF y DMAPP. En la imagen se muestran las dos rutas seguidas para esta síntesis: **(a)** Ruta del mevalonato y **(b)** ruta del 1-desoxi-xilulosa-5. Imágenes modificadas de: Srivastava y Srivastava (2008).



**Figura 4.** Biosíntesis del lanosterol a partir del DMAPP e IPP. Imágenes modificadas de: Srivastava y Srivastava (2008).

### 5.13. Producción *in vitro* de metabolitos secundarios.

El cultivo de células vegetales puede ser implementado como una vía alternativa para la producción de metabolitos secundarios de interés. Tradicionalmente, a nivel comercial, estos compuestos se obtienen mediante el procesamiento de plantas completas o partes de ellas, utilizando grandes cantidades de material para la formación del producto. El cultivo de tejidos se presenta como un método más ventajoso para la obtención continua de metabolitos, en especial, cuando se dispone de poca materia prima (especies silvestres o amenazadas), o

cuando se requieren largos periodos de cultivo por métodos tradicionales, los rendimientos de metabolitos son bajos, o no se cuenta con procesos de síntesis química. Además de esto, el sistema de cultivo de tejidos tiene la ventaja de que la producción es independiente de factores externos, como la disponibilidad de tierra, clima y condiciones geopolíticas, y que es posible controlar con mayor precisión las condiciones de cultivo, alcanzando mayor rendimiento y calidad (Rao y Ravishankar, 2002; Bhojwani y Dantu, 2013).

Los metabolitos secundarios pueden producirse empleando suspensiones celulares originadas a partir de callos, o por medio del uso de órganos diferenciados, tales como raíces en cabellera (Bourgau *et al.*, 2001). Para maximizar la producción se emplean diversas técnicas como: (1) manipulación de los parámetros químicos y físicos del medio, (2) aplicación de precursores, y (3) elicitación. La manipulación de los aspectos físicos y los elementos nutricionales en un cultivo es posiblemente el enfoque más fundamental para la optimización de la productividad (Mulabagal y Tsay, 2004). Muchos productos se acumulan en las células mantenidas *in vitro* a niveles mayores que en las plantas nativas, a través de la optimización del medio. Ejemplo de esto viene a ser la producción de taxol (compuesto anticancerígeno) por *Taxus mairei*; naturalmente, el taxol se produce en bajas cantidades en el árbol (300 mg de taxol cada 3 kg de corteza), siendo además una especie de crecimiento lento. Al establecer cultivos en suspensión de *T. mairei*, se pueden alcanzar niveles de hasta 200 mg de taxol por litro de suspensión (Neumann *et al.*, 2009). En el caso del uso de precursores y/o elicitores, estos actúan estimulando la actividad biosintética; el concepto del primero (precursor) se basa en la idea de que cualquier compuesto, que es un intermediario en o en el comienzo de una ruta de biosíntesis de metabolitos secundarios, cuando es agregado al medio, puede aumentar el rendimiento del producto final, dado que existe una mayor cantidad de “material base” para la síntesis del producto (Mulabagal y Tsay, 2004). Los elicitores, por otra parte, comprenden señales (químicas o físicas) que desencadenan los procesos de biosíntesis. La producción de metabolitos secundarios en la planta siempre es inducida por una señal que es percibida por un receptor de la membrana, iniciando una cascada de señales que conducen a la activación de factores de transcripción, que regulan la expresión de genes implicados en el metabolismo secundario (Zhao *et al.*, 2005). Los elicitores se clasifican en bióticos (micelio de hongos, varios extractos de proteínas) y abióticos (temperatura, luz UV, metales pesados, pH) (Bourgau *et al.*, 2001).

## VI. Antecedentes.

### 6.1. Embriogénesis somática en neem.

La inducción de embriogénesis somática, tanto directa como indirecta, ha sido reportada previamente en cultivos *in vitro* de neem. Sin embargo, esta no se ha logrado a través de un único grupo de condiciones de cultivo, sobre todo en lo referente al tipo y cantidad de reguladores del crecimiento añadidos. A nivel del explante, se reporta el cultivo de embriones cigóticos en determinadas fases de maduración, regiones específicas del embrión (cotiledones e hipocotilo), y tejidos adultos como hojas, segmentos nodales y raíces.

El primer reporte de un intento de inducción de embriogénesis somática en neem fue realizado por Muralidharan y Mascarenhas (1989). El cultivo fue inducido en medio B5, utilizando cotiledones como explante, y 6-bencilamonopurina (BAP) como regulador del crecimiento. Bajo estas condiciones, se produjo la formación de estructuras nodulares de apariencia bipolar, similares a embriones, las cuales desarrollaron posteriormente una raíz y estructuras similares a hojas. Sin embargo, en este estudio no se realizaron análisis histológicos para confirmar la naturaleza embrionaria de las estructuras formadas. Shrikhande *et al.* (1993), utilizaron también cotiledones inmaduros para la inducción de embriogénesis, empleando un medio MS suplementado con hidrolizado de caseína, sacarosa al 5%, y ácido indolacético (AIA) y BAP como reguladores de crecimiento. Luego de 1 – 2 semanas de incubación, sólo los explantes cultivados con ambas sustancias de crecimiento de forma simultánea, mostraron respuesta embriogénica, evaluándose esta mediante un análisis histológico.

En un ensayo posterior realizado por Su *et al.* (1997), evaluando un medio con igual composición a la indicada por Shrikhande *et al.* (1993), no se lograron obtener estructuras embriogénicas, observándose sólo la producción de brotes. La formación de callo potencialmente embriogénico sólo se evidenció en un medio suplementado con ácido 1-naftalenacético (ANA) y BAP, desarrollándose estructuras embriogénicas al transferir los callos a un medio líquido con BAP y AIA. Estas estructuras fueron posteriormente transferidas a un medio semisólido, libre de reguladores, para el desarrollo de los embriones. Se considera que esta fue la primera prueba concluyente de embriogénesis somática *in vitro* en neem.

El trabajo de Su *et al.* (1997) también constituye uno de los pocos reportes del uso de un medio líquido para estimular la respuesta embriogénica en *A. indica*. El otro reporte fue hecho por Murthy y Saxena, en 1998, utilizando como explante embriones maduros. Primeramente, se indujo la formación de callo embriogénico a partir del explante, utilizando un medio MS sólido suplementado con el regulador Thidiazurón (TDZ). El callo formado se transfirió y cultivó por varias semanas en un medio líquido suplementado con el mismo regulador (en menor concentración), para ser transferido finalmente a un medio semisólido libre de reguladores, donde ocurrió la formación de los embriones.

Exceptuando por esos dos trabajos mencionados, todos los demás intentos de inducir una respuesta embriogénica en neem han sido realizados exclusivamente en medio sólido. Estudios en otras especies vegetales han señalado una mayor eficiencia en el proceso de embriogénesis somática ocurrido en medio líquido, al comparar el mismo cultivo realizado en medio sólido, tanto a nivel del número de embriones producidos como en el desarrollo de estos. Fki *et al.* (2003), por ejemplo, reportaron un aumento de hasta 20 veces en la respuesta embriogénica de *Phoenix dactylifera*, usando como explantes hojas e inflorescencias, cuando los callos inducidos fueron subcultivados en medio líquido en vez de sólido. Otro ejemplo viene a ser un estudio realizado por Yang *et al.* (2010) en *Brassica oleracea*, en el cual se encontró que los explantes de raíz, cotiledón e hipocotilo de esta planta mostraban (para cada caso) una mayor respuesta embriogénica cuando se cultivaban en medio líquido, en comparación con su cultivo en el mismo medio pero en estado sólido. Respuestas similares también han sido señaladas para otras especies de interés comercial, como el café (Hermoso-Gallardo y Menéndez-Yuffá, 2000) y cultivares híbridos de plátano (Gómez *et al.*, 2002), al eliminar el agente solidificante del medio.

Retomando los trabajos realizados en el neem, Akula *et al.* (2003), evaluaron diversos tipos de explante (hojas, nodos y raíces) en la inducción de embriogénesis. Los explantes foliares mostraron embriogénesis somática por vía indirecta al ser cultivados en un medio MS, suplementado con TDZ y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Otras hormonas como el BAP no produjeron respuesta embriogénica al encontrarse solas en el medio, aunque si produjo cuando se agregaba en combinación con el 2,4-D.

Chaturvedi *et al.* (2004), evaluaron la inducción de embriogénesis somática empleando como explantes embriones cigóticos en distinto estado de desarrollo, en un medio MS suplementado con diversos reguladores (BAP, AIA, 2,4-D y ANA). El estadio con mayor respuesta (número de embriones somáticos formados) fue el dicotiledóneo, seguido por el torpedo. En el medio MS con BAP y AIA, 100% de los explantes exhibieron embriogénesis somática secundaria. Rout (2005), evaluó el proceso embriogénico asexual al usar como explante embriones cigóticos inmaduros, de 30, 40 y 50 días, y reguladores como la cinetina (K), BAP, ANA y 2,4-D, encontrando que la intensidad de la proliferación del callo estuvo relacionada en gran medida con el BAP en combinación con el 2,4-D, en comparación con otras combinaciones de reguladores de crecimiento, no obstante, solo se observó respuesta embriogénica en el callo derivado de embriones de 40 días.

Shekhawat *et al.* (2009) reportan la obtención de embriogénesis somática a partir de tejido foliar. El callo embriogénico se observó en un medio MS suplementado con cinetina y AIA, apareciendo todos los estados embriogénicos. Asimismo, Singh y Chaturvedi (2009) estudiaron la embriogénesis somática primaria y secundaria en neem, utilizando como explante embriones en estado dicotiledóneo temprano. La máxima embriogénesis primaria se produjo en un medio MS suplementado con los reguladores TDZ y ácido abscísico (ABA),

mientras que la embriogénesis secundaria ocurrió en el medio MS suplementado con BAP y AIA. Das (2011) reporta el uso de cotiledones inmaduros para la inducción de embriogénesis somática, empleando un medio MS con diversos reguladores de crecimiento (BAP o kinetina, y ANA o 2,4-D), señalando la máxima proliferación de callo en el medio con BAP y 2,4-D.

En una revisión realizada por Singh y Chaturvedi (2013), se indica que el uso de los embriones somáticos de neem todavía no se ha hecho habitual debido a limitaciones tales como el desarrollo asincrónico, anomalías morfológicas, pobre maduración, y la baja conversión en plántulas. Aunado a esto, en varias publicaciones donde se reporta la inducción de embriogénesis somática, las estructuras descritas como “embriones” no presentan la apariencia y/o comportamiento de un embrión somático típico, por ejemplo, con ejes raíz-brote definidos, y presencia de un hipocotilo y 2 cotiledones. En los medios de germinación, muchos de estos embriones mostraron una germinación monopolar, generando sólo brotes (Shrikhande *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1997) o raíces (Chaturvedi *et al.*, 2004), y señalándose además, en los análisis histológicos, la presencia de haces vasculares pobremente desarrollados. Más recientemente, Fernández Da Silva *et al.*, en 2016, reportan la obtención de embriogénesis somática a partir de tejido foliar y cotiledonar, empleando respectivamente los reguladores BAP y AIA, y BAP y 2,4-D.

En ninguno de los reportes de embriogénesis somática en neem se ha observado un desarrollo sincrónico de los embriones somáticos, existiendo una heterogeneidad temporal en las etapas de desarrollo, así como una heterogeneidad morfológica hacia las fases finales de su desarrollo (Singh y Chaturvedi, 2013). De igual manera, Chaturvedi *et al.* (2004) indican la ocurrencia de anomalías morfológicas tales como la pluricotiledonia, fusión de cotiledones, y ausencia de cotiledones, además de germinación precoz. Además de esto, la posterior germinación y recuperación de plantas a partir de embriones somáticos no ha sido muy exitosa, exceptuando casos como el descrito por Shekhawat *et al.* (2009), el cual comprende el máximo valor reportado (82%).

## **6.2. Producción de azadiractina *in vitro*.**

La producción de azadiractina en cultivos *in vitro* de neem ha sido reportada principalmente para callos y suspensiones celulares, aunque también existen reportes de su síntesis en cultivo de raíces en cabellera (Srivastava y Srivastava, 2013). El estudio de las variables que afectan la producción de este metabolito se realiza desde un tiempo relativamente reciente (menos de 25 años), en comparación con los estudios realizados en otras especies vegetales con metabolitos de interés comercial (Orozco y Rodríguez, 2007).

A fin de aumentar la producción de azadiractina en el cultivo *in vitro*, se han estudiado diversos parámetros, tales como el tipo de cultivo, condiciones lumínicas, reguladores de crecimiento, tiempo de cultivo, y el empleo de precursores y elicitores. Así, Orozco y Rodríguez (2007), en una revisión sobre investigaciones realizadas entre 1999 – 2007 sobre la

producción de azadiractina, empleando cultivos en suspensión (Cuadro 1), señala que, aunque muchos de estos reportes tienen en común el uso del medio Murashige y Skoog (1962) (medio MS) y sacarosa a 30 g/L, no hay consistencia en los reguladores de crecimiento empleados o sus concentraciones, así como tampoco en la fuente del explante (semillas, hojas, flores y corteza) utilizado para la iniciación del cultivo. Los contenidos de azadiractina producida son además muy variables, yendo desde 2,5 a 72,81 mg/L.

**Cuadro 1.** Algunas variables estudiadas (entre 1999 – 2007) para el cultivo en suspensión de callos de *A. indica*, enfocado en la producción de azadiractina.

Sistema de cultivo	Variable	Descripción	Biomasa máx. (g/L)	Aza máx. (mg/L)	Referencia
Matraz	Agente permeabilizante	Tritón X-100	-	10	Kuruvilla <i>et al.</i> , 1999
Matraz	Precursor	Acetato de sodio, Escualeno, Isopentenil pirofosfato	-	64,94 72,81 51,63	Balaji <i>et al.</i> , 2003
Matraz	Etapas de cultivo	Una y dos etapas / crecimiento y producción	6,5 16	2,5 4,5	Raval <i>et al.</i> , 2003
Matraz	Medio de cultivo	Optimización N, P y C	15,02	45	Prakash y Srivastava, 2005
Matraz	Luz y temperatura	Oscuridad 15°C, Luz 35°C	20,02 24,6	27,4 4,4	Capataz <i>et al.</i> , 2005
Biorreactor	Biorreactor	Columna burbujeante 2-4L, Tanque agitado 3L	17,8 15,5	81,3 50	Prakash y Srivastava, 2005
Tanque agitado 3L	Modo de cultivo	Lote, lote alimentado	15,52 20,06	45 82	Prakash <i>et al.</i> , 2005
Tanque agitado 3L	Tipo de impulsor	Setric. Centrífugo	15,0 18,7	45 71	Prakash y Srivastava, 2007

Fuente: Orozco y Rodríguez (2007).

Entre las investigaciones iniciales relacionadas con la producción de azadiractina, Kuruvilla *et al.* (1999), a fin de solucionar la baja productividad observada en cultivos en suspensión (debido a la baja capacidad secretora de las células vegetales), indica el uso de agentes permeabilizantes como el Tritón X-100, evitando la necesidad de romper las membranas y paredes de las células para extraer el producto. Unos años después, Balaji *et al.* (2003), en un cultivo en suspensión establecido partir de callos de pétalos florales, reportan un aumento significativo en la producción de azadiractina, al añadir precursores al medio de cultivo, tales como acetato de sodio, escualeno, isopentenil pirofosfato (IPP) y geranil pirofosfato (GPP).

Posteriormente, Prakash *et al.* (2005), realizaron un análisis de la producción de azadiractina en callos de hojas y embriones cigóticos de *A. indica*, seleccionando y multiplicando posteriormente las líneas celulares más productivas. Se obtuvo que las líneas celulares establecidas a partir de embriones presentaron una concentración de azadiractina mayor que las derivadas de hojas. Asimismo, estos autores determinaron además el efecto de diferentes medios de cultivo vegetal de uso común (MS, B5, White, Nitsch y Eriksson) en estas líneas celulares, encontrando que el medio MS permite un mayor crecimiento y producción de azadiractina. Ese mismo año, el trabajo de Prakash y Srivastava (2005) en suspensiones celulares (derivadas de embriones cigóticos de *A. indica*), señala que variaciones en los niveles de nitrógeno normales del medio MS pueden afectar de forma positiva el crecimiento celular y la concentración de azadiractina.

Seguidamente, Prakash y Srivastava (2007), observaron que la velocidad de agitación a la cual se encuentra expuesta el cultivo en suspensión de neem, afecta marcadamente la viabilidad celular, viéndose esta reducida a velocidades superiores a 125 rpm. Bedoya y Hoyos (2010), reportan resultados similares, recomendando el uso de una velocidad de agitación de 120 rpm, ya que velocidades superiores afectan la producción de metabolitos por parte del cultivo, disminuyendo la concentración de azadiractina intracelular a medida que la velocidad incrementa. Otros trabajos como el de Orozco *et al.* (2011) determinaron que el consumo de oxígeno limita el crecimiento *in vitro* de células de neem en suspensión, debido a la alta velocidad de consumo de oxígeno de esta especie a nivel celular. La ocurrencia de anoxia puede derivar en reducción de la viabilidad celular, así como en una menor producción de metabolitos. De igual manera, Prakash y Srivastava (2011), señalan que el uso simultáneo de inductores, precursores y agentes permeabilizantes, además de un cultivo continuo y renovación de nutrientes, puede resultar en una mayor producción de biomasa y azadiractina, y en una liberación más fácil de este metabolito secundario al medio.

Más adelante, Villarroel (2012), estudió la producción de azadiractina empleando suspensiones celulares, de callos tanto regenerativos como no regenerativos, derivados de 3 tipos de explantes de neem: hojas de vitro-plantas, cotiledones y esquejes. También estudió el efecto del precursor acetato de sodio, el agente permeabilizante Tritón X-100, y la

presencia o ausencia de luz sobre la síntesis de azadiractina. Concluyó que la mayor concentración del metabolito se produce al utilizar callos no embriogénicos de secciones de hoja de vitro-plantas, el acetato de sodio como precursor, y oscuridad continua. Singh y Chaturvedi (2013), por otra parte, al emplear callos no regenerativos y regenerativos, obtenidos a partir de explantes de hoja, óvulos y embriones cigóticos, en condiciones de iluminación constante, obtuvieron la mayor concentración de azadiractina en los callos derivados de embriones cigóticos inmaduros.

Más tarde, Rodríguez *et al.* (2014), analizaron el efecto de distintos elicitores sobre la producción de azadiractina, variando sus concentraciones y tiempos de cultivo. Emplearon como explante callos cotiledonares en suspensión, con una agitación de 90 rpm. Como resultado, se obtuvo una interacción significativa ante los elicitores en función del tiempo, expresándose concentraciones más altas del metabolito al añadir jasmonato de metilo como elicitador. También, Salomón (2014) determinó la producción de azadiractina empleando suspensiones celulares, de callos tanto regenerativos como no regenerativos, derivados de hojas de vitro-plantas y cotiledones, evaluando además el efecto de 2 precursores (acetato de sodio y escualeno) y el agente permeabilizante Tritón X-100. La producción más alta de azadiractina (42,9 mg/L) se observó en los cultivos derivados de callos no embriogénicos de explantes foliares, donde además se adicionó de forma combinada los precursores.

## **VII. Materiales y métodos.**

### **7.1. Material vegetal.**

Para evaluar la inducción de embriogénesis somática, se utilizaron como explantes segmentos foliares y cotiledonares, mientras que, para evaluar la producción de azadiractina, sólo se emplearon segmentos foliares. Los segmentos cotiledonares se obtuvieron de semillas inmaduras de *Azadirachta indica* A. Juss (neem), mientras que los foliares se obtuvieron de vitro-plantas de neem, germinadas a partir de semillas maduras. Ambos grupos de semillas (maduras e inmaduras) se colectaron de ejemplares de 3 a 5 metros de altura, ubicados en Naguanagua, Edo. Carabobo.

### **7.2. Medios de cultivo de inducción para explantes y vitro-plantas.**

Los medios de cultivo se prepararon utilizando como base las sales de Murashige y Skoog (1992) (medio MS), y se suplementaron con las vitaminas tiamina – HCl (1 mg/L) y piridoxina (0,5 mg/L), y los aminoácidos glicina (2 mg/L), y cisteína-L (100 mg/L), este último añadido como agente anti-oxidante; por otra parte, como fuente de carbono, se añadió sacarosa (azúcar de mesa) al 3% p/v. En el caso del medio sólido, se utilizó como agente solidificante Agar Powder al 0,8% p/v. La concentración y tipos de reguladores de crecimiento, empleados para la formación de vitro-plantas, callo y embriogénesis somática, dependieron del tipo de explante y respuesta morfogénica a inducir, siguiendo la composición de medios optimizados por Villarreal (2012). El pH se ajustó a un intervalo de 5,85 – 5,87, realizándose la posterior esterilización de los medios de cultivo en un autoclave vertical Kalstein® AMR-18/75A, a 121°C, 15 Lb, durante 15 min.

En el caso de las vitro-plantas, se utilizaron frascos de vidrio (7,5 x 14 cm) con tapas de papel aluminio y 30 mL de medio sólido. Para los callos de segmentos foliares se utilizaron placas de Petri de vidrio (100 x 15 mm) con 15 mL de medio sólido, mientras que para los callos de cotiledones se emplearon frascos de vidrio (4 x 8 cm) con tapas de papel aluminio y 30 mL de medio sólido. Las suspensiones (ya fuese para la determinación de azadiractina o para la inducción de embriogénesis somática) se establecieron en medio líquido, empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de medio de cultivo, cubiertos con tapones de algodón y gasa.

### **7.3. Establecimiento de las vitro-plantas.**

#### **7.3.1. Desinfección de las semillas.**

Todos los frutos de neem se procesaron el mismo día de su colecta, realizándose la desinfección en una campana de flujo laminar horizontal. Para la extracción del embrión cigótico, se retiró primeramente el epicarpio y mesocarpio. El endocarpio se desinfectó mediante 2 lavados (2 min cada uno) con agua destilada estéril y detergente líquido comercial

(Dodecilsulfonato de sodio, Clic®, Fácil Química C. A.). Posteriormente, se realizó un lavado con alcohol isopropílico al 70% v/v durante 30 segundos y con agua destilada estéril por 1 min, otro lavado con una solución de cloro comercial (3,5% v/v de hipoclorito de sodio) al 20% v/v y Tween 20 (1 gota/ 10 mL) por 5 min, y finalmente 3 lavados con agua destilada estéril (1 min cada uno) para eliminar el cloro y etanol remanentes. Por último, antes de la extracción del embrión cigótico, las semillas se sumergieron en una solución de cisteína al 1% p/v en agua destilada estéril durante 30 min, para reducir la oxidación del explante.

### 7.3.2. Obtención de las vitro–plantas.

Las vitro–plantas se obtuvieron a través del desarrollo del embrión cigótico en el medio de cultivo. A las semillas maduras (previamente desinfectadas) se les retiró el endocarpio por medio de su disección con un bisturí estéril, extrayendo el embrión cigótico. Este se cultivó en un medio de regeneración sólido con la composición descrita en la sección 7.2, suplementado con 0,2 mg/L de BAP. Las muestras se mantuvieron en oscuridad continua y temperatura ambiente hasta el desarrollo de la raíz y apertura de los cotiledones, luego de lo cual se mantuvieron bajo iluminación para estimular el desarrollo de la planta.

### 7.4. Inducción del callo embriogénico y no embriogénico.

Las hojas (completamente expandidas y no senescentes) se obtuvieron de las vitro–plantas germinadas, por medio de su disección con un bisturí estéril, mientras que los cotiledones se extrajeron de las semillas inmaduras previamente desinfectadas con el método descrito en la sección 7.3.1. Ambos tipos de muestra se sembraron en medios sólidos con la composición y recipiente contenedor descrito en la sección 7.2, suplementados con los reguladores del crecimiento BAP, AIA y 2,4–D, a las combinaciones y concentraciones recomendadas por Villarreal (2012) (Cuadro 2). En el caso de las hojas, se sembraron 4 – 5 de estas por placa, mientras que los cotiledones se sembraron de forma individual en cada frasco. Las muestras se mantuvieron en oscuridad continua y temperatura ambiente hasta la formación del callo.

**Cuadro 2:** Medio de inducción para segmentos de hoja obtenidos de vitro–plantas y cotiledones.

Tipo de explante	Regulador de crecimiento (mg/L)		
	BAP	2,4–D	AIA
Sección foliar	1	-	0,4
Sección cotiledonar	1	0,4	-

BAP: 6-N-bencil-aminopurina. 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético. AIA: ácido índol acético.

En el caso de los explantes de secciones foliares, los callos embriogénicos se utilizaron para la inducción de embriogénesis somática, mientras que los callos no embriogénicos se utilizaron para la producción de azadiractina. En el caso de los explantes cotiledonares, solo se utilizaron los callos embriogénicos, para la inducción de embriogénesis somática. Para la diferenciación de ambos tipos de callos, tanto en cotiledones como hojas, se consideró la descripción reportada por Villarroel (2012), respaldada por una evaluación morfoanatómica (sección 7.6.). Los callos mixtos inducidos (callos con morfología heterogénea, caracterizándose por presentar zonas embriogénicas y no embriogénicas) se diseccionaron con un bisturí estéril para separar estas zonas, cultivándose luego por separado en medios nuevos.

### 7.5. Inducción y evaluación de la embriogénesis somática en medio líquido.

El establecimiento de las suspensiones celulares se realizó utilizando el protocolo propuesto por Fernández Da Silva *et al.* (2005). Se emplearon medios líquidos con la composición y tipo de reguladores de crecimiento presente en los Cuadros 3 y 4, realizándose 3 réplicas por tratamiento. Los callos embriogénicos de hoja y cotiledón se pesaron y se disgregaron con una pinza y/o bisturí estéril en segmentos pequeños, transfiriéndose 1 g de tejido disgregado a matraces Erlenmeyer con 100 mL de medio líquido. Las muestras se mantuvieron en oscuridad, temperatura ambiente, y agitación continua a 150 rpm, para producir la disgregación de los agregados. Posteriormente, a las 2 semanas, la suspensión gruesa formada se pasó a través de un tamiz de malla de acero (150 mesh), obteniéndose una suspensión fina. Todas las muestras se dejaron en agitación continua a 100 rpm, realizándose un recambio de medio cada 15 días.

**Cuadro 3.** Medios de inducción de embriogénesis para suspensiones celulares derivadas de cotiledones.

Reguladores (mg/L)	Nombre del medio						
	M0c	M1c	M2c	M3c	M4c	M5c	M6c
BAP	1	2	4	6	2	4	6
2,4-D	0,4	1	1	1	2	2	2

BAP: 6-N-bencil-aminopurina. 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

**Cuadro 4.** Medios de inducción de embriogénesis para suspensiones celulares derivadas de segmentos foliares.

Reguladores (mg/L)	Nombre del medio						
	M0f	M1f	M2f	M3f	M4f	M5f	M6f
BAP	1	2	4	6	2	4	6
AIA	0,4	1	1	1	2	2	2

BAP: 6-N-bencil-aminopurina. AIA: ácido índol acético.

El estado de cada cultivo se monitoreó durante aproximadamente 5 meses (150 días). Cada 15 días, antes del recambio de medio, se tomaron muestras de cada tratamiento, analizándose la morfología de las células (células embriogénicas y no embriogénicas) y agregados formados, además de contabilizarlos. Para este último punto, se adaptó el protocolo de conteo (para cultivos vegetales en suspensión) descrito por Ramírez-Villalobos y de García (2008), estableciéndose 2 categorías: (1) células individuales y (2) agregados, este último con dos subgrupos, agregados pequeños (de 2 – 10 células) y agregados grandes (más de 10 células). Se contabilizó la cantidad de cada grupo por mililitro de muestra, mediante un hematocitómetro, considerándose únicamente las estructuras viables; para el caso de los agregados, estos se consideraron como “viables” cuando la mayor parte de sus células lo fueron. La viabilidad de las células se evaluó por medio de su tinción con Azul de Tripano al 0,4 % v/v, por 3 min a temperatura ambiente, debido a que este colorante no puede atravesar las membranas de las células viables (ya que no presentan rupturas), tiñendo únicamente de azul a las células muertas.

Adicionalmente, para algunos de los cultivos evaluados (estos se especifican en la sección 8.2, en resultados y discusión), se realizaron 3 réplicas extra, las cuales, a partir del día 45 de cultivo, se mantuvieron en agitación y sin realizarse el recambio quincenal del medio por el resto del ensayo. Al final de los 5 meses, se analizó la presencia de microcallos y embriones somáticos (primarios y secundarios).

#### **7.6. Evaluación morfoanatómica.**

Se realizó una caracterización histológica y morfológica de los callos y embriones somáticos inducidos, empleando los protocolos propuestos por Fernández Da Silva *et al.* (2016). Las muestras se colectaron de los medios de inducción, transfiriéndose a una solución de formol al 10% v/v por 24 horas. Posteriormente, estas se deshidrataron en una batería de etanol con concentraciones ascendentes (10, 30, 50, 70, 90 y 100% v/v), manteniéndose 30 min en cada concentración. Las muestras deshidratadas se colocaron luego por 3 horas en xilol para aclarar el tejido, y posteriormente, se sumergieron durante 8 horas en parafina sintética fundida.

Los callos se cortaron con un micrótopo de rotación Leica® RM2265, en secciones de aproximadamente 0,3 µm de grosor. Las muestras de tejido se colocaron en una rejilla de corte, transfiriéndose estas a una estufa a 66°C para permitir la fusión de la parafina. Posteriormente, los tejidos se hidrataron por medio de 3 cambios de xilol (5 min cada uno), seguidos de 2 cambios en etanol al 100% v/v (3 min), y finalmente en agua. Estos se tiñeron a continuación mediante una coloración mixta ácido–base Hematoxilina–Eosina, para observar la forma y distribución de las células en el tejido, así como características del citoplasma; la Hematoxilina tiñe estructuras con carga negativa en tonos azul y púrpura (como por ejemplo, los núcleos celulares), mientras que la Eosina tiñe estructuras o zonas de cargas positivas en

tonos de color rosa (como por ejemplo, el citoplasma). Para esta tinción, primeramente se agregaron gotas de Hematoxilina a la muestra, dejándose actuar por 5 min, luego de lo cual se realizó un lavado con agua destilada. Posteriormente, se añadieron unas gotas de Eosina durante 30 seg, seguido de un último lavado con agua destilada.

Además de esta coloración, también se realizó una tinción con solución de Lugol para evidenciar la presencia de gránulos de almidón en el tejido, debido a la afinidad de las moléculas de yodo de este colorante con este tipo de polisacárido. Para esta tinción, se aplicó el protocolo propuesto por Johansen (1940): Se añadieron gotas de una solución concentrada de Lugol al tejido, dejándose actuar por 3 min antes de lavar con agua destilada. Todas las muestras se dejaron secar para su posterior observación. Se tomó además un registro fotográfico con una cámara Canon Powershot® 570 de los tejidos y estructuras formadas, empleando un microscopio óptico Leica® DM1000 y una lupa Leica® MZ75.

### 7.7. Producción y extracción de azadiractina.

Para la extracción de azadiractina se siguió el protocolo utilizado por Villarroel (2012). La producción de este metabolito secundario, bajo las distintas condiciones fijadas, se evaluó una vez por semana, durante 5 semanas consecutivas, realizándose 3 réplicas por tratamiento. Para cada condición, se tomó 1 g de callo no embriogénico de hoja, colocándose estos por separado en matraces con un medio líquido con la composición descrita en la sección 7.2, suplementado con 10 mg/L de Tritón X-100 (agente permeabilizante de la membrana). Se dispusieron 15 tratamientos distintos (Cuadro 5), en los cuales se evaluó el efecto de los precursores acetato de sodio y escualeno de forma combinada, a las concentraciones que se indican en el Cuadro 6. También se evaluó el efecto de la fuente de nitrógeno, incrementando la relación nitrato/amonio presente en el medio MS, por medio de variaciones en la concentración de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) y nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (Cuadro 7). Para la formulación de los tratamientos, se modificó sólo la fuente nitrogenada, manteniendo las dosis de los otros componentes igual a la formulación original. Todas los matraces se mantuvieron en agitación continua a 120 rpm y en oscuridad, con una temperatura entre 25 – 30°C.

**Cuadro 5.** Tratamientos evaluados para la producción de azadiractina.

Variable	Tratamiento														
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
Prec.	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P4	P4	P4	P5	P5	P5
$\text{NO}_3^-$ / $\text{NH}_4^+$	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
	40:20	50:10	nítrico	40:20	50:10	nítrico	40:20	50:10	nítrico	40:20	50:10	nítrico	40:20	50:10	nítrico

Prec. = combinación de precursores.  $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$  = relación nitrato:amonio.

**Cuadro 6.** Combinaciones de acetato de sodio y escualeno evaluadas.

Combinación	Precursor (mg/L)	
	Acetato de sodio	Escualeno
P1	-	-
P2	10	10
P3	10	50
P4	50	10
P5	50	50

**Cuadro 7.** Relaciones nitrato:amonio evaluadas.

Relación y concentraciones (mM)	Tipo de medio MS		
	MS <sub>40:20</sub>	MS <sub>50:10</sub>	MS <sub>nitrato</sub>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	40:20	50:10	60
KNO <sub>3</sub>	20	40	60
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20	10	-

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = relación nitrato:amonio.

Para determinar la cantidad de azadiractina producida, se tomó 1 mL de medio y se transfirió a un tubo de centrifuga; a este se le adicionaron 5 mL de etanol al 96% v/v, luego de lo cual se agitó por inversión y se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos. El etanol se evaporó a temperaturas entre 60–120°C, resuspendiéndose la muestra posteriormente en 1 mL de agua destilada estéril. Esta se almacenó a -70°C hasta el momento de la evaluación. Para la evaluación por espectrofotometría, se tomaron 0,35 mL de la muestra almacenada, a los cuales se les añadió 0,1 mL de solución de metanol de vainillina (0,02 mg/mL). Esta se agitó por inversión, dejándose reposar por 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 0,15 mL de ácido sulfúrico a 0,1M en 3 partes de 0,05 mL, agitándose por inversión durante 10 segundos con cada adición. Luego de esto, se agregaron 0,35 mL de metanol, dejándose reposar la muestra por 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Genesys™ 10, UV-Vis) a 577 nm. Los datos obtenidos se evaluaron por medio de su comparación con una curva estándar de azadiractina, la cual se realizó utilizando soluciones patrón de azadiractina en diclorometano, entre 0,01 – 1 mg/mL (7 medidas).

## 7.8. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con los software GraphPad Prism (versión 6.01, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) y PAST (versión 3.15, Hammer Ø., Museo de Historia Natural, Universidad de Oslo, Noruega). Para la inducción de embriogénesis somática en medio líquido, por las características de los datos resultantes, se reporta únicamente el valor de la media ( $\pm$  sd) de los embriones somáticos formados. En el caso de la producción de azadiractina, tomada a través del tiempo y en función del tratamiento, esta se evaluó por medio de una prueba de ANOVA de dos vías (con muestras repetidas), utilizando la prueba *a posteriori* de Tukey para determinar cuantitativamente las diferencias entre muestras.

Adicionalmente, debido al interés en los datos de producción de azadiractina tomados en la 2da semana, se realizaron 2 réplicas extra para este punto ( $n = 5$ ), sometiéndose los resultados a una prueba de ANOVA de una vía y de dos vías (sin muestras repetidas), para evaluar, respectivamente, las diferencias entre tratamientos, y el efecto de las variables consideradas para cada uno (combinación y concentración de precursores  $\times$  tipo de medio MS), aplicándose en ambos casos la prueba *a posteriori* de Tukey. Todas las muestras fueron sometidas previamente a un análisis de normalidad por medio de la prueba de Shapiro-Wilk, y a un análisis de la homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Levene. Las diferencias se consideraron como significativas cuando  $p < 0,05$ . En los diagramas de líneas, los puntos son representados por la media  $\pm$  sd; en el caso del diagrama de caja, este está constituido por la mediana, el 1er y 3er cuartil, y el valor mínimo y máximo de la distribución.

## VIII. Resultados y discusión.

### 8.1. Evaluación morfoanatómica.

Para ambos tipos de explantes, se observaron distintas respuestas *in vitro*, en la mayoría de los casos de forma simultánea: callogénesis, organogénesis y embriogénesis somática. Luego de 2 – 3 semanas de cultivo en sus respectivos medios de inducción, tanto el explante de hoja como el de cotiledón comenzaron a exhibir cambios en su estructura, los cuales derivaron en el crecimiento de una masa de células desdiferenciadas (callo) a lo largo de todo el tejido, así como de brotes, raíces y embriones somáticos, tanto directamente (a partir del explante) como indirectamente (a partir del callo). Estas respuestas diversas se fundamentan en la naturaleza totipotente de las células vegetales. Todas las plantas, incluidas las de la familia Meliaceae, conservan durante su desarrollo el potencial para revertir sus células (independientemente de su nivel de especialización o de ploidía) a un estado meristemático, al ser expuestas a determinadas condiciones en un medio *in vitro*, pudiendo formar posteriormente estructuras diferenciadas, o un organismo completo, a partir de estas. Este fenómeno es fuertemente dependiente del tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento presentes, aunque también, pueden influir algunas variables tales como el genotipo de la planta donadora, la composición mineral del medio de cultivo y el estado físico del mismo (Phillips, 2004; Neelakandan y Wang, 2012).

En el caso del proceso de callogénesis evidenciado en el presente trabajo, se encontraron callos con morfología externa homogénea, así como callos con alta heterogeneidad en su aspecto (mixtos). Bhojwani y Dantu (2013) señalan que los callos normalmente presentan una alta heterogeneidad celular, debido a la naturaleza multicelular del explante, junto a las variaciones a nivel genético causadas por las condiciones de cultivo (variación somaclonal). Ambos factores dan lugar a estas diferencias en el color, textura, grado de compactación y potencial morfogénico.

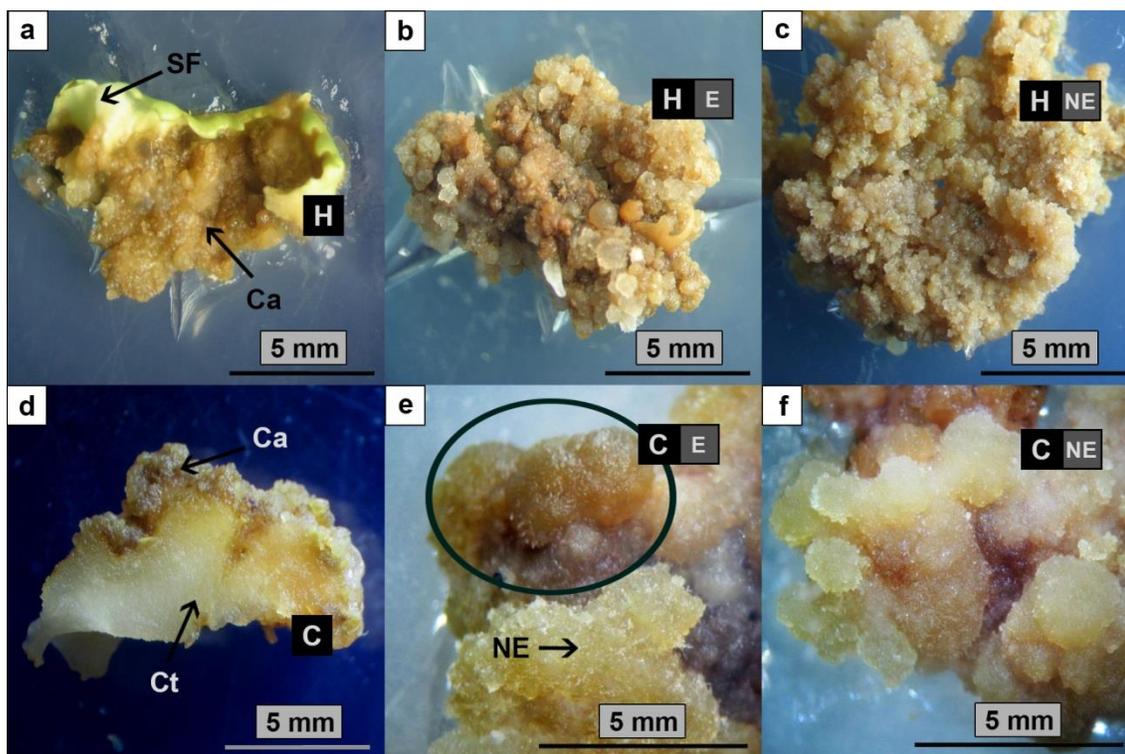
De acuerdo al tipo de explante, se observaron diferencias en el proceso de aparición y la morfología general del callo: en el caso del explante foliar, los folíolos presentaron un agrandamiento a las 2 semanas de haber sido sembrados en el agar, así como deformaciones en su estructura (aspecto arrugado y abultamientos). Posteriormente, cerca de la 3ra semana, inició el crecimiento del callo en los bordes del folíolo y zonas donde se realizaron los cortes (Figura 5a), así como un aclaramiento en la coloración de la hoja. Las masas celulares fueron aumentando en tamaño en los días subsiguientes, hasta ocupar toda la superficie hacia la 4ta – 5ta semana. Este callo presentó inicialmente un color beige – amarillo claro, superficie rugosa y consistencia suave, para luego dar lugar a dos tipos de callo hacia la 7ma semana: uno de coloración beige – marrón, consistencia dura y diversas agrupaciones globulares lisas en su superficie (Figura 5b), características reportadas por Fernández Da Silva *et al.* (2016) para los callos embriogénicos en neem. El otro callo observado presentó una coloración menos

oscura, entre beige y marrón claro (en algunos casos, con zonas blancas y translúcidas); este mantuvo la consistencia suave y superficie rugosa, sin agrupaciones globulares en su superficie (Figura 5c). Todas estas características son reportadas por el mismo autor para un callo de tipo no embriogénico.

Carvalho *et al.* (2013) señalan que es usualmente fácil distinguir las zonas embriogénicas y no embriogénicas de un callo en base a la estructura morfológica, características celulares y el color del tejido; sin embargo, como se observó para el callo derivado de hoja, la apariencia externa puede variar a lo largo de las semanas de cultivo, haciendo necesario por tanto, esperar cierto tiempo para que se produzca una definición completa del tipo de tejido. Un fenómeno similar fue descrito por Jiménez y Bangerth (2001) en trigo, donde algunos callos derivados de cotiledón, en principio de apariencia no embriogénica, adquirieron características embriogénicas luego de la 3ra semana de cultivo (4 semanas antes que las necesarias en este estudio), manteniéndose estas características en cultivos subsiguientes. Estos autores además señalan la presencia de cuerpos globulares y consistencia firme como características usualmente indicadoras de los callos embriogénicos, mientras que las zonas no embriogénicas se caracterizan por su aspecto rugoso, friable y translucido. Otros investigadores, como Chai *et al.* (2011) y Silveira *et al.* (2013) también señalan esas características como puntos clave para identificar la naturaleza del callo en explantes de *Zoysia matrella* y *Saccharum officinarum*, respectivamente, destacando la presencia de estructuras compactas y nodulares como indicativos de una naturaleza embriogénica.

Respecto al fenómeno de oscurecimiento del tejido, Azofeifa (2009) indica que este se produce por la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como de compuestos fenólicos; este último proceso se caracteriza por la producción de quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas que pueden ocasionar daño y muerte celular. Tang y Newton (2004) señalan además que el oscurecimiento de tejidos es una característica típica del cultivo de callos derivados de explantes maduros, en varias plantas leñosas. Este usualmente es contraproducente, ya que reduce el crecimiento e inhibe la formación de brotes adventicios, lo cual explica el reducido tamaño de los callos derivados de explantes foliares (más oscuros) en relación con los callos derivados de cotiledón (de los cuales se hablara más adelante), y su reducido crecimiento incluso luego de varios subcultivos. Sin embargo, como se observó en el presente trabajo, este fenómeno no fue un impedimento para el proceso de embriogénesis somática. Algunos estudios señalan que, para algunas especies vegetales, el oscurecimiento del callo estimula la producción de embriones somáticos, como reportan Neuenschwander y Baumann (1992) para callos de *Coffea arabica*. Así, Azofeifa (2009) señala que, en el cultivo *in vitro*, los agentes oxidantes no necesariamente generan siempre un efecto negativo, pudiendo activar determinadas respuestas morfogénicas, entre ellas, la embriogénesis somática.

En el caso del explante cotiledonar, este también presentó un aumento en su tamaño a las 2 semanas de haber sido sembrado en el medio, así como la pérdida de su coloración verde. Posteriormente, hacia la 4ta semana, inició el crecimiento del callo en la parte externa del cotiledón (Figura 5d), extendiéndose durante las semanas siguientes por toda la superficie. Uno de los tipos de callos presentó coloración beige – marrón, superficie lisa y con formaciones globulares en su superficie (Figura 5f), aspecto que se corresponde al reportado por Fernández Da Silva *et al.* (2016) para un callo de tipo embriogénico. También, en algunos casos, se observó el crecimiento de un callo friable, de coloración beige – amarillenta, superficie rugosa y consistencia suave (Figura 5e), características similares a las reportadas por este mismo autor para un callo de tipo no embriogénico. En ambos casos, el callo no varió su coloración o consistencia en subcultivos posteriores, y su tamaño fue mayor que los callos derivados de explantes de hoja.



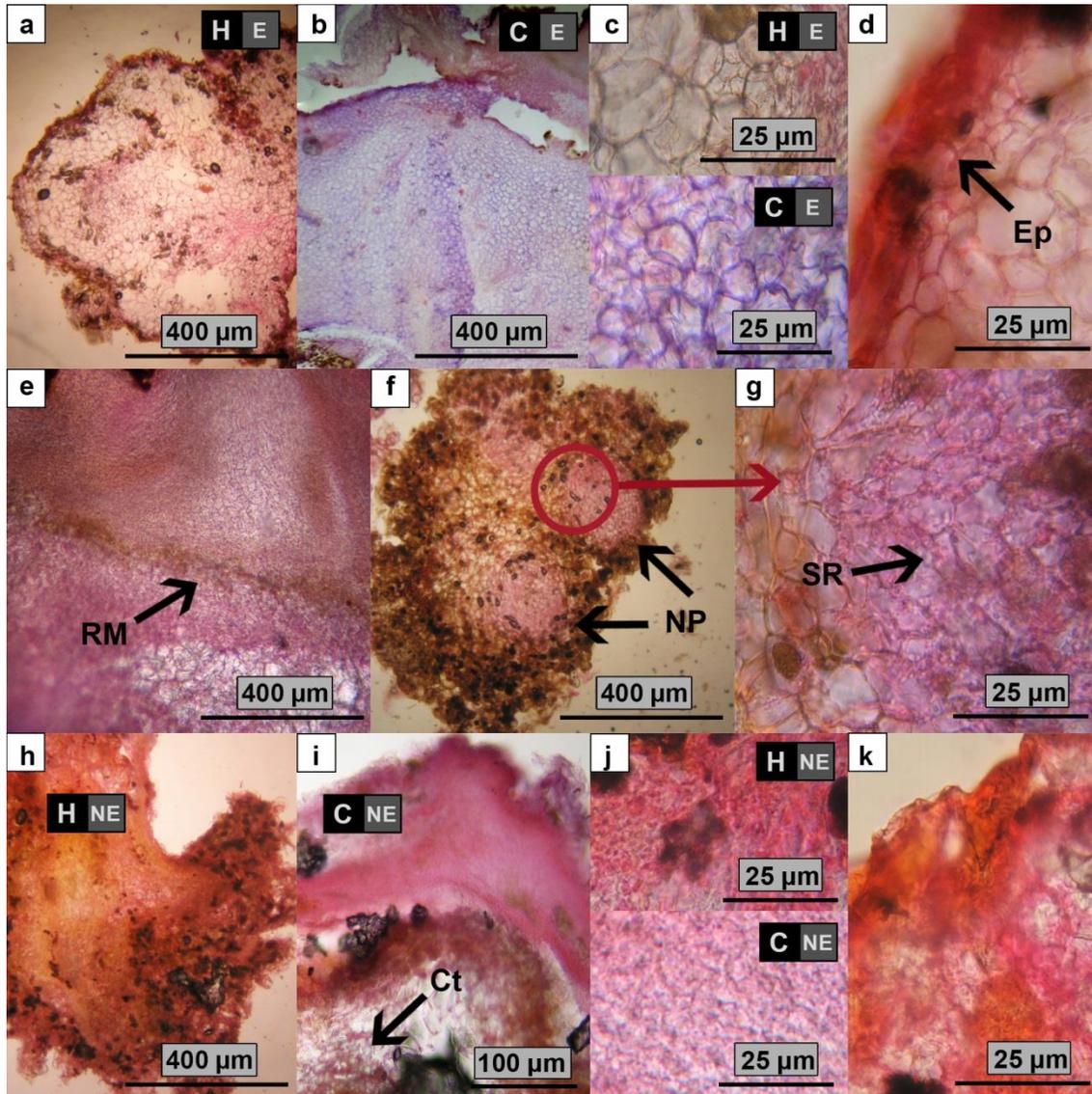
**Figura 5.** Morfología del proceso de calogénesis en neem: sección foliar (SF) y cotiledón (Ct); callo (Ca) derivado de un explante foliar (H) o de cotiledón (C); callo de tipo embriogénico (E), y de tipo no embriogénico (NE). **a.** Callo comenzando a crecer a partir del explante foliar (3 semanas de formación). **b.** Callo embriogénico derivado de un explante foliar (7 semanas). **c.** Callo no embriogénico del mismo tipo de explante (7 semanas). **d.** Callo comenzando a crecer a partir del explante cotiledonar (4 semanas). **e.** Porción embriogénica (señalada) de un callo mixto derivado de cotiledón (7 semanas). **f.** Callo no embriogénico del mismo explante (7 semanas).

Al realizar el análisis histológico de los callos de tipo embriogénico, se encontró una composición celular heterogénea para ambos explantes; no obstante, estos presentaron varias características similares: el tejido fue de tipo parenquimatoso, compuesto de células isodiamétricas (Figuras 6a – 6c). Se observó además un recubrimiento grueso de células aplanadas en la periferia de las muestras, la cual corresponde a la epidermis (Figura 6d). En algunas zonas se detectaron centros de actividad meristemática, los cuales se caracterizan por presentar células de menor tamaño y con un mayor contenido citoplasmático (Figura 6e). Adicionalmente, en el caso del callo derivado de hoja, también se encontraron sacos o nódulos proembriogénicos en su interior, los cuales consisten en agrupaciones de células embriogénicas, con alto contenido citoplasmático y presencia de sustancias de reserva (Figuras 6f – 6g). Al contrario de lo señalado por Salomón (2014), estos nódulos solo se encontraron en los callos derivados de explantes foliares, estando ausentes en los derivados de cotiledón.

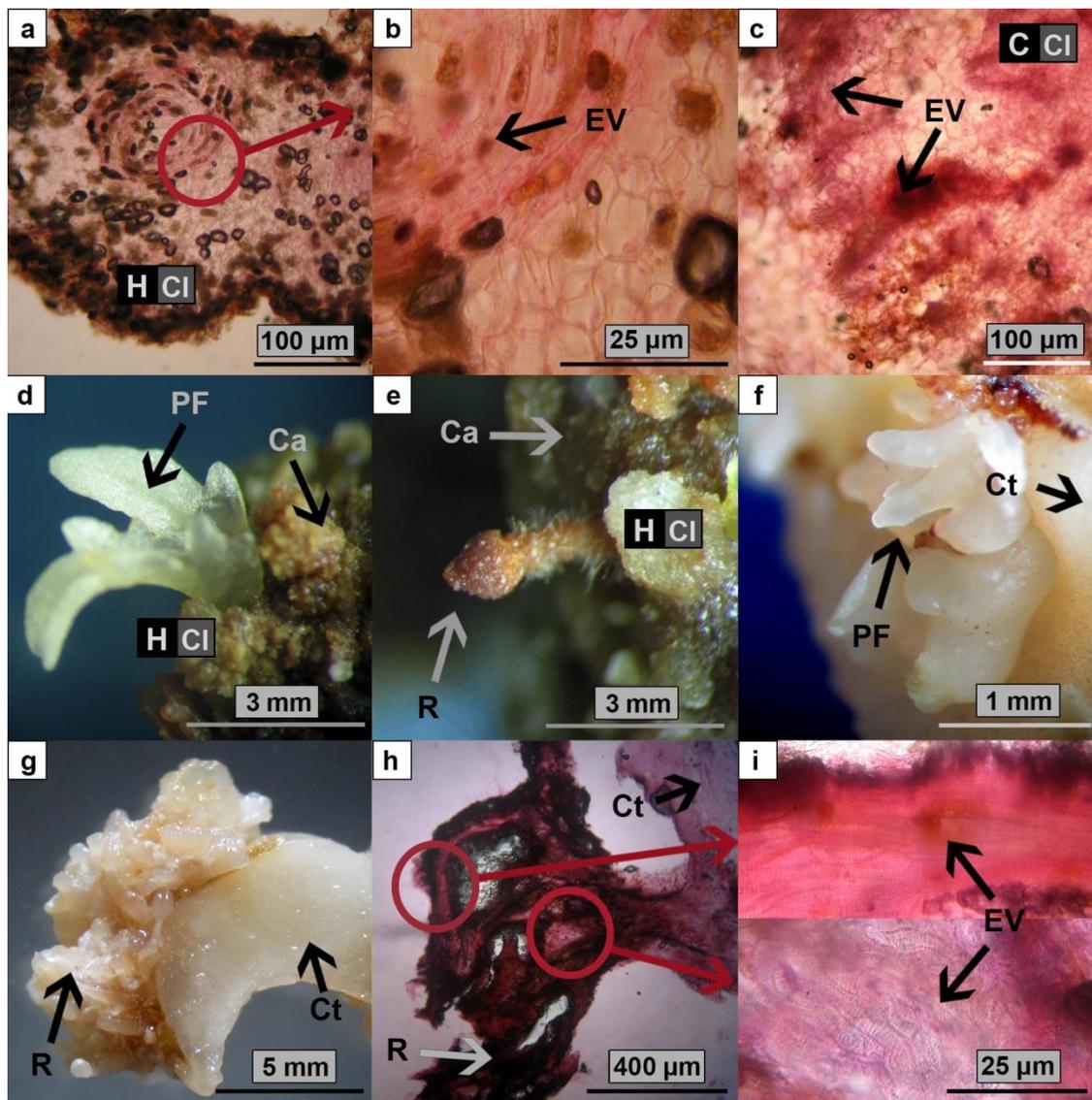
En el caso del callo no embriogénico, este se caracterizó (para ambos explantes) por presentar células alargadas, laxas y desorganizadas, sin una epidermis visible (Figura 6h – 6k). Silveira *et al.* (2013), coinciden con estas observaciones para los dos tipos de callo, señalando que el callo no embriogénico, a nivel histológico, se caracteriza por presentar células alargadas y desorganizadas, mientras que el callo embriogénico exhibe una estructura y morfología más organizada, compuesta por células isodiamétricas.

También, se observaron algunos tipos celulares diferenciados, tales como elementos traqueales (Figuras 7a – 7c); estos se encontraron con mayor frecuencia en callos organogénicos, donde se evidenció abundante crecimiento de brotes y raíces, así como en algunos callos embriogénicos. En relación a las respuestas organogénicas, en las Figuras 7d y 7e se puede observar la formación, a partir de callo de origen foliar, de primordios foliares y raíces (respectivamente), estas últimas con presencia de tricomas en su superficie. En el caso del callo de cotiledón, el proceso de organogénesis ocurrió solo de forma directa, por medio de la formación de primordios foliares y raíces a partir de los tejidos externos, sin ser necesaria una fase intermedia de formación de callo (Figuras 7f y 7g). Thomas y Chaturvedi (2008) destacan la importancia de la aparición de elementos traqueales en este proceso organogénico, ya que su formación y organización en elementos vasculares facilita la diferenciación de los brotes o raíces, tal como puede verse en las Figuras 7h y 7i.

Respecto al proceso de embriogénesis somática, en el caso de los explantes foliares esta ocurrió sólo de forma indirecta (Figura 8a), a partir de la superficie del callo embriogénico; las estructuras formadas presentaron una coloración blanca – amarillenta, con superficie lisa y compacta. Para el explante de cotiledón, el proceso de embriogénesis somática ocurrió de forma directa a partir de los tejidos del explante (Figura 8b), no observándose el desarrollo de estas estructuras blanquecinas a partir del callo; similar al caso anterior, presentaron una superficie lisa y compacta. En ambos casos, los embriones fueron fácilmente separables del tejido parental.



**Figura 6.** Histología del proceso de calogénesis en neem: tejido original del cotiledón (Ct); callo derivado de un explante foliar (H) o de cotiledón (C), pudiendo ser este de tipo embriogénico (E), o no embriogénico (NE); epidermis (Ep); región meristemática (RM); nódulos pro-embriogénicos (NP); sustancias de reserva (SR). **a.** Callo embriogénico de hoja. **b.** Callo embriogénico de cotiledón. **c.** Detalle de las células en los callos embriogénicos de hoja (arriba) y cotiledón (abajo). **d.** Epidermis en un callo embriogénico. **e.** Región meristemática (zona más oscura) en un calló embriogénico. **f.** Nódulos pro-embriogénicos encontrados en un callo de explante foliar. **g.** Detalle de las células de los nódulos, señalándose las sustancias de reserva presentes. **h.** Callo no embriogénico de hoja. **i.** Callo no embriogénico de cotiledón. **j.** Detalle de las células en los callos no embriogénicos de hoja (arriba) y cotiledón (abajo). **k.** Borde de un callo no embriogénico, con ausencia de epidermis.



**Figura 7.** Morfología e histología del proceso de organogénesis en neem: tejido original del cotiledón (Ct); callo (Ca) derivado de un explante foliar (H) o de cotiledón (C), de tipo caulogénico (Cl); primordio foliar (PF); raíz (R); elemento vascular (EV). **a.** Callo caulogénico derivado de un explante foliar. **b.** Detalle de los elementos vasculares en el callo caulogénico de hoja. **c.** Detalle de elementos vasculares en un callo caulogénico de cotiledón. **d.** Callo con primordio foliar. **e.** Callo con crecimiento de raíces. **f.** Superficie del cotiledón con crecimiento directo de primordios foliares. **g.** Cotiledón con crecimiento directo de raíces. **h.** Corte longitudinal de la porción del cotiledón con crecimiento de raíces. **i.** Detalles de los elementos vasculares en las raíces.

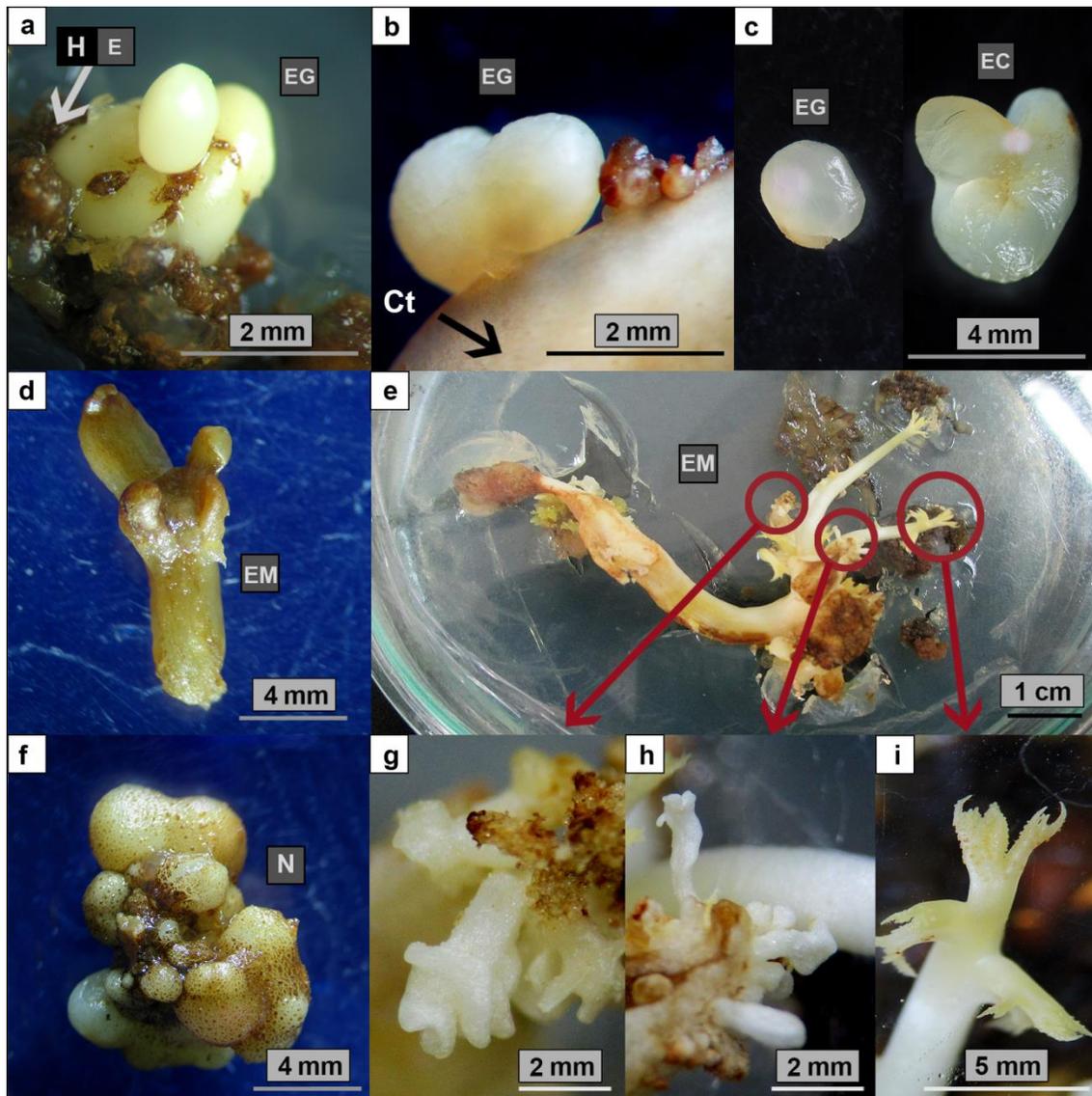
Las estructuras embriogénicas crecieron de forma asincrónica, observándose a distintos estados de desarrollo. Inicialmente presentaron una forma redondeada, pasando luego a un aspecto acorazonado (Figura 8c). En etapas más avanzadas de su desarrollo, estos embriones blanquecinos se alargaron y adquirieron una polarización definida, diferenciándose las zonas correspondientes a la radícula y cotiledones (Figura 8d). Como señalan Smertenko y Bozhkov

(2014), las etapas de la embriogénesis somática en especies dicotiledóneas abarcan las etapas claves de la embriogénesis cigótica en este mismo grupo: una forma inicial globular, seguida por una etapa donde el embrión presenta una forma acorazonada, debido al inicio de la formación de los cotiledones, para finalmente alargarse hasta adquirir forma de torpedo. Los embriones somáticos maduros se asemejan a los cigóticos, tanto morfológica como fisiológicamente, presentando las estructuras típicas: radícula, hipocotilo y cotiledones.

Aunque algunas de las formaciones blanquecinas globulares derivaron en un embrión completo y germinado, estos presentaron varias anomalías en su estructura. En la Figura 8e, se puede observar uno de los embriones germinados, en el cual se presentan zonas características tales como la raíz, tallo y cotiledones, y múltiples agrupaciones foliares surgidas a partir de la zona de separación de estos últimos (detalle de esta última zona en la Figura 8i). A nivel del tallo y cotiledones se aprecia una leve formación de un callo marrón oscuro, de consistencia suave. También se observa un proceso de embriogénesis cíclica (Figuras 8g – 8h), con nuevos embriones somáticos creciendo directamente a partir de algunas zonas del cotiledón. Esto se corresponde con el reporte realizado por Merkle *et al.* (1990), donde se señala que los embriones somáticos secundarios suelen crecer más comúnmente a partir de las células superficiales de los cotiledones o hipocotilo de los embriones somáticos primarios.

Pocas de las estructuras embriogénicas alcanzaron este estado avanzado en su desarrollo. Cuando se dejaron unidas al tejido madre, este se detuvo en la etapa globular o acorazonada, incluso luego de subcultivar el callo, sin presentarse tampoco un aumento en el tamaño. La progresión hasta una fase de torpedo sólo se produjo cuando fueron separadas del callo y subcultivadas en un medio fresco. Sin embargo, este fue un fenómeno muy raro, siendo lo más usual que estas mostraran un aumento en el tamaño, desarrollaran malformaciones (abultamientos) (Figura 8f) y, en algunos casos, desarrollaran además estructuras globulares de apariencia embriogénica en su superficie, también fácilmente separables. Estas malformaciones, de comportamiento altamente proliferativo y similar al de un callo, mantuvieron sus características originales (blanquecinas, de superficie brillante, lisa y dura).

Diversos autores señalan la aparición de estas estructuras anormales durante el cultivo *in vitro* de varias especies vegetales, siendo comúnmente denominadas como “neomorfos”. Krikorian y Smith (1992) definen a los neomorfos como los productos terminales de un procesamiento o distribución inadecuados de varias señales, necesarias para un correcto desarrollo embriogénico, con lo cual los embriones no se desarrollan directamente en plántulas, manteniendo en cambio un estado aberrante. Adicionalmente, Merkle *et al.* (1990) señala que, al ocurrir este fallo en la maduración de los embriones somáticos, es muy común la aparición de una embriogénesis somática secundaria, ocurriendo ciclos sucesivos de producción de embriones, lo cual se corresponde con lo observado en el presente trabajo, donde los embriones deformados presentaron un abundante desarrollo de nuevas estructuras globulares.



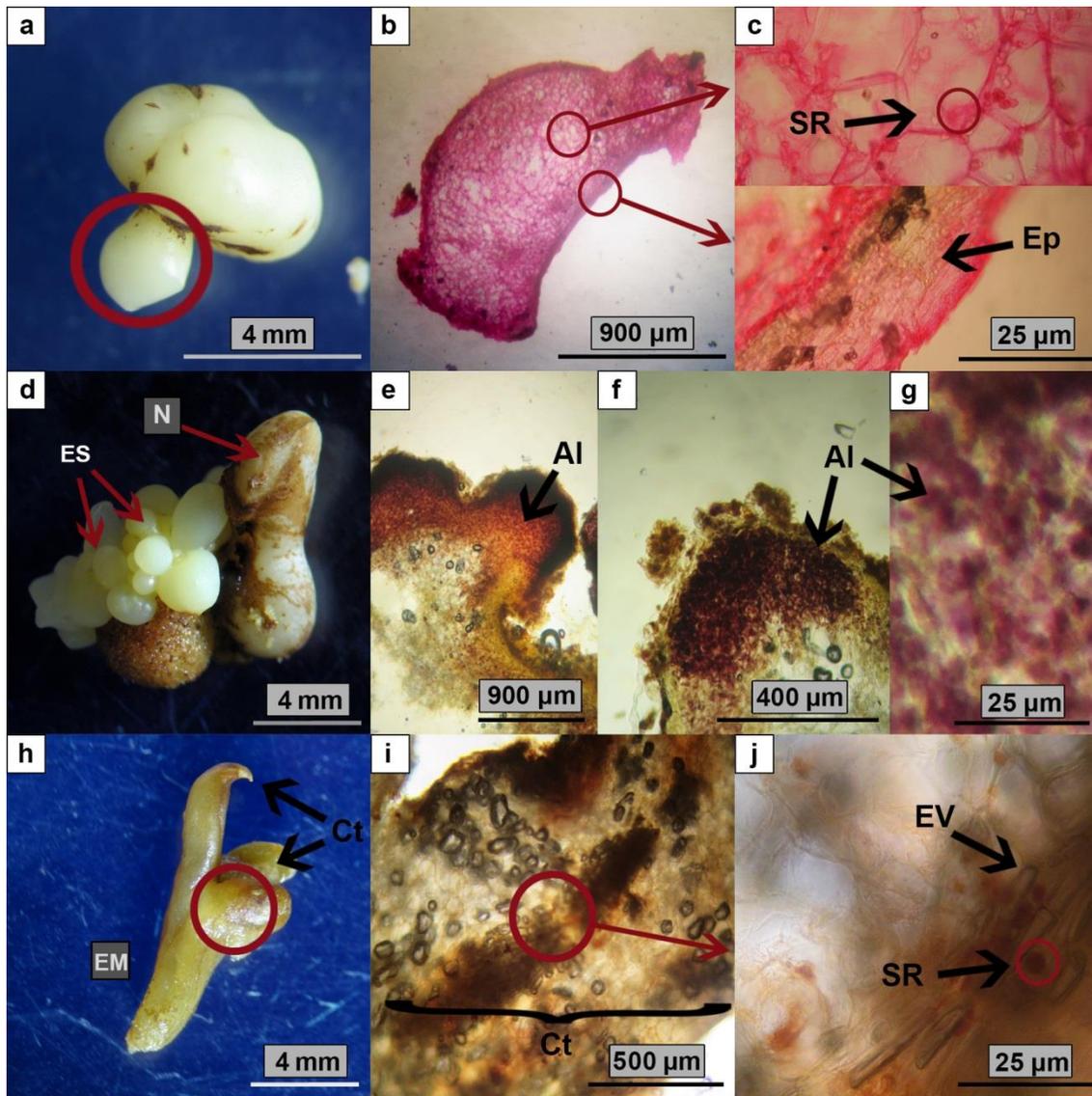
**Figura 8.** Morfología del proceso de embriogénesis somática en neem: tejido original del cotiledón (Ct); callo derivado de un explante foliar (H), de tipo embriogénico (E); embrión globular (EG); embrión acorazonado (EC); embrión maduro (EM); neomorfo (N). **a.** Callo embriogénico de hoja, con embriones somáticos globulares en su superficie. **b.** Cotiledón con embriones somáticos globulares en su superficie. **c.** Embrión somático globular (izquierda) y acorazonado (derecha). **d.** Embrión somático maduro. **e.** Embrión somático maduro germinado. **f.** Embrión somático anormal o neomorfo. **g** y **h.** Embriones somáticos secundarios. **i.** Hojas iniciales de la plántula.

Pese a su común aparición en investigaciones *in vitro* para *A. indica*, son escasos los reportes donde se han analizado o se ha continuado el cultivo de estos embriones anormales. Chaturvedi *et al.* (2004), fueron los primeros en destacar este fenómeno para el neem, encontrando, luego de análisis histológicos, que se trataban de embriones suprimidos. Los

neomorfos obtenidos presentaron una coloración verdosa (debido a las condiciones de iluminación en su ensayo), con una superficie lisa y brillante, y un interior sólido, siendo su origen epidérmico. Estos presentaron haces provasculares en varios casos, cuestión que no fue observada en el presente estudio. Chaturvedi y su grupo de investigación lograron la regeneración de plantas completas a partir de neomorfos, vía organogénesis (brotes), en un medio rico en BAP como único regulador. Posteriores investigaciones respecto a la embriogénesis somática en *A. indica* no han ahondado en estas estructuras, existiendo solo menciones en el trabajo de Arora *et al.* (2009).

Las formaciones blanquecinas separadas del callo, en su etapa inicial de formación (Figura 9a), presentaron células isodiamétricas pequeñas, con gránulos de sustancias de reserva en su interior, mostrando además una capa de células aplanadas en la periferia, que corresponde a la epidermis, y como se mencionó anteriormente, ausencia de tejido vascular (Figuras 9b – 9c). En la Figura 9d se puede apreciar un embrión somático aberrante, luego de ser separado y subcultivado (permitiendo su crecimiento), con desarrollo de múltiples nuevos embriones somáticos globulares en su superficie. Estos embriones somáticos secundarios presentaron también células isodiamétricas pequeñas, aunque con un citoplasma más denso y coloreado que el de las células del tejido parental (Figura 9e) y abundante presencia de almidón como sustancia de reserva (Figura 9f y 9g). Asimismo, los gránulos de almidón no se detectaron en los tejidos más centrales del embrión somático primario, estando solamente hacia las zonas periféricas donde se ubicaban los embriones somáticos secundarios.

Las sustancias de reserva, tales como lípidos, proteínas y el almidón, juegan un papel importante durante los procesos morfogénicos implicados en la embriogénesis somática, ya que su síntesis y acumulación permite al embrión su desarrollo y subsiguiente germinación, y el establecimiento de las plántulas (Rocha *et al.*, 2016). Así, Martín *et al.* (2000) destacan la importancia del polisacárido almidón, señalando que el inicio y progresión de este desarrollo embriogénico *in vitro* requiere grandes cantidades de energía, siendo utilizado el almidón como una de sus fuentes principales, ya que el catabolismo de esta molécula da lugar a la formación de intermediarios glicolíticos, los cuales pueden ser empleados en la síntesis del ATP necesario para el metabolismo celular. Existen diversas investigaciones que reportan la síntesis *de novo* y abundante presencia de esta molécula (junto a gránulos lípidos y de proteínas) en las fases tempranas de la embriogénesis somática en dicotiledóneas como la guayaba y la parchita (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2015), presentando estas células un tamaño reducido, gran núcleo y forma isodiamétricas, similares a las encontradas en este estudio para los embriones somáticos secundarios.



**Figura 9.** Histología del proceso de embriogénesis somática en neem: cotiledón (Ct); neomorfo (N); embrión somático secundario (ES); embrión maduro (EM); sustancias de reserva (SR); almidón (Al); epidermis (Ep); elementos vasculares (EV). **a.** Estructuras embriogénicas recién separadas del callo. **b.** Corte longitudinal de una estructura embriogénica. **c.** Detalle de las células de una estructura embriogénica, destacando la presencia de sustancias de reserva (arriba), y de una epidermis (abajo). **d.** Neomorfo con embriones somáticos secundarios globulares en su superficie. **e.** Corte longitudinal de los embriones somáticos globulares secundarios en el neomorfo. **f** y **g.** Corte longitudinal de un embrión somático secundario en inicio de formación, destacándose la presencia de gránulos de almidón. **h.** Embrión somático maduro. **i.** Corte longitudinal del embrión somático maduro, mostrándose la zona del cotiledón. **j.** Detalle de las células de la región del cotiledón, señalándose los elementos vasculares y sustancias de reserva.

De igual manera, Wang *et al.* (2014) señalan que la presencia y distribución del almidón experimenta cambios a lo largo de las etapas embriogénicas de *Tapiscia sinensis*, siendo estos gránulos muy abundantes durante las primeras fases de diferenciación; posteriormente, al formarse por completo un estadio globular, los gránulos de almidón desaparecen de las capas más internas. En etapas posteriores se reporta una reducción aún más marcada de estos gránulos, encontrándose solamente en células de la región periférica y tejidos provasculares. Esto se corresponde con lo encontrado en el presente estudio, donde los embriones somáticos que alcanzaron la etapa de torpedo (Figura 9h), al realizarles un análisis histológico, no presentaron casi estos gránulos en sus tejidos, estando mayormente concentrados en la zona vascular (Figura 9i – 9k).

## **8.2. Inducción y evaluación de la embriogénesis somática en medio líquido.**

En relación a las suspensiones celulares, como se mencionó anteriormente en los métodos a seguir, estas fueron establecidas a partir de 2 tipos de callos embriogénicos: de cotiledón y de hoja. El callo de cotiledón, debido a su consistencia suave (más que el de hoja), fue fácilmente disgregable en el medio por medio del uso de pinzas, obteniéndose una suspensión gruesa concentrada (ligeramente turbia, de coloración beige claro) a los pocos días de agitación continua. En el caso del callo embriogénico de origen foliar, se seleccionó para estos ensayos el callo blanquecino – beige derivado de los neomorfos, debido a su alta capacidad de proliferación (mayor crecimiento que el callo embriogénico de hoja típico, para un mismo intervalo de tiempo), y su alto potencial embriogénico. Como señalan Chaturvedi *et al.* (2004), estas formaciones, surgidas durante el cultivo *in vitro* de *A. indica*, consisten en embriones somáticos suprimidos. Los tejidos provenientes de los neomorfos, al ser utilizados como explantes, pueden ser inducidos a desdiferenciarse, generándose un estado en el cual, si las condiciones circundantes generan las señales correctas en el interior celular, se puede inducir la formación de embriones somáticos a partir de ellos (Krikorian y Smith, 1992). Durante el establecimiento de este cultivo, debido a la dureza del callo de neomorfo, su disgregación fue más difícil y requirió el uso de un bisturí, obteniéndose al final una suspensión menos concentrada (menor turbidez) que en el caso de la derivada del callo de cotiledón.

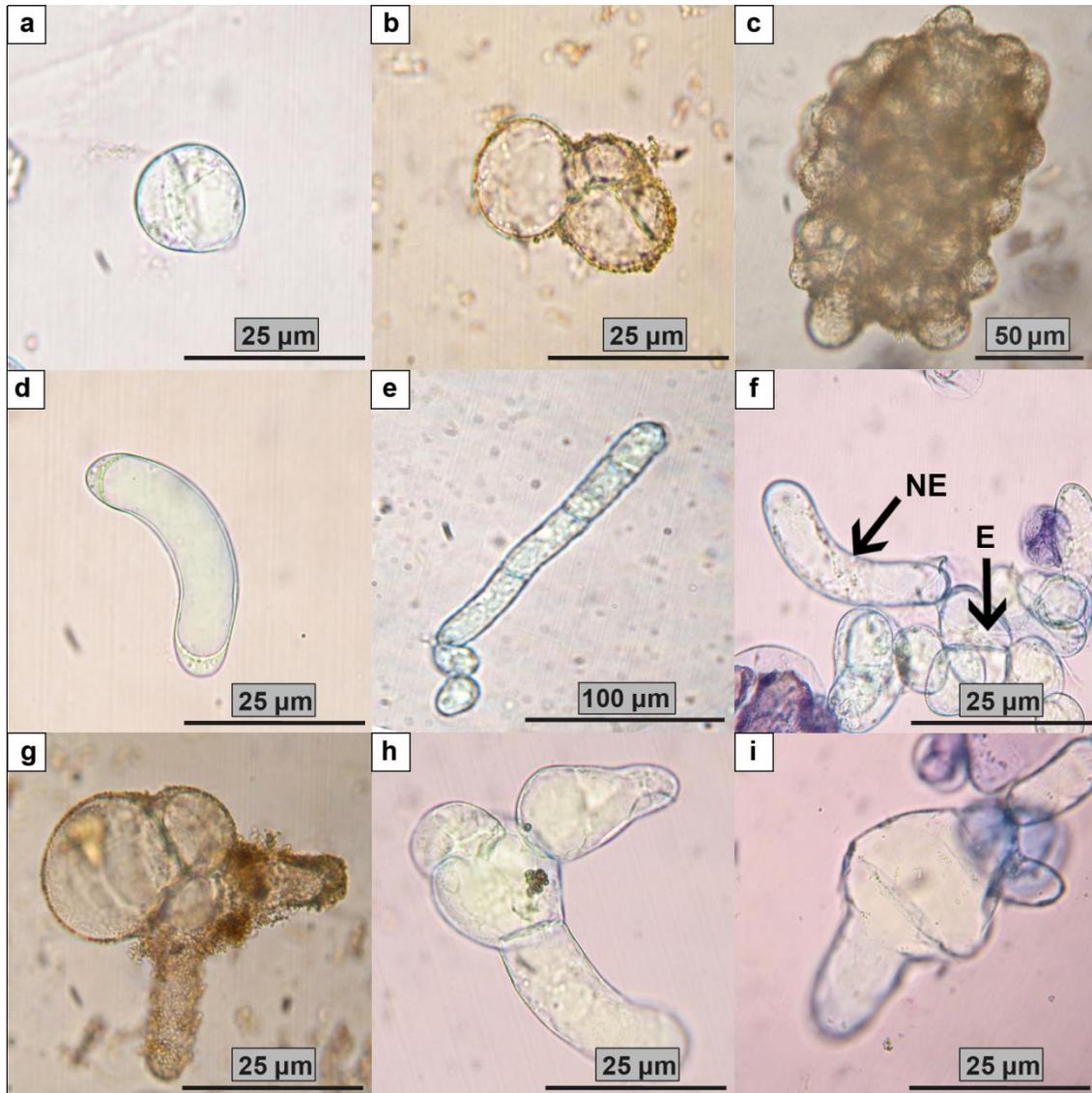
Es importante destacar que, pese a que los callos presentaban una morfología de tipo embriogénica, esto no excluye la posible presencia de pequeños “parches” de tejido no embriogénico en ellos. Esto queda confirmado al observar las suspensiones finas obtenidas, luego de filtrar el tejido disgregado, las cuales presentaron una composición celular heterogénea. Para ambos tipos de muestra, se observaron células embriogénicas, caracterizadas por su forma redondeada u ovoide y pequeño tamaño, entre 10 – 20  $\mu\text{m}$  (con algunos casos puntuales de células de 25  $\mu\text{m}$ ). Estas se encontraron de forma individual (células aisladas) (Figura 10a) o formando agregados pequeños de 2 a 10 células (Figura 10b) y agregados grandes de más de 10 células (Figura 10c). Se observaron también células no

embriogénicas, las cuales presentaron una forma alargada y de mayor tamaño que el grupo anterior, entre 20 – 50  $\mu\text{m}$  (en la Figura 10f se pueden observar ambos tipos de células juntas, para comparación). Estas no se observaron en agregados grandes para cualquiera de los tratamientos o tiempos evaluados, encontrándose solamente en forma individual (Figura 10d) o formando agregados pequeños y laxos (menos compactos que los agregados embriogénicos), usualmente de entre 3 – 5 células (Figura 10e). Todas estas características han sido previamente reportadas para células embriogénicas y no embriogénicas en suspensión, en cultivos derivados de callos de *Coffea arabica* (Hermoso-Gallardo y Menéndez-Yuffá, 2000) y *Musa* sp. (Ramírez-Villalobos y de García, 2008). De los dos tipos celulares, las células no embriogénicas se encontraron además en menor proporción, debido a la morfología embriogénica predominante del callo de origen, conformando el 22 – 26% de las células totales, en el caso de las suspensiones de tejido de hoja (neomorfos), y el 30 – 39% para las suspensiones de tejido de cotiledón.

Además de los tipos de agregados mencionados, también se observaron agregados celulares con patrones de división asimétrica, es decir, donde un lado de este estuvo compuesto de células embriogénicas redondeadas, y el otro de una o varias células no embriogénicas alargadas (Figura 10g – i). Este fenómeno ha sido reportado previamente en cultivos en suspensión, derivados de callo embriogénico de *Coffea arabica* (Fernández Da Silva *et al.*, 2005), *Agave tequilana* (Santacruz–Ruvalcaba y Portillo, 2009), y de otras especies vegetales (Fehér, 2005). Asimismo, Toonen *et al.* (1994), en un seguimiento de los patrones de división de células de zanahoria inmovilizadas, en un medio formulado para inducir la formación de embriones somáticos, observó también este fenómeno. Luego de iniciada la división asimétrica, unas de las células hijas derivadas, de características embriogénicas (redondeada), se continúa dividiendo activamente, formando una agrupación de células ricas en citoplasma a partir de las cuales se desarrolla el embrión somático. En el caso de la otra célula inicial (usualmente alargada), esta se expande, dando lugar a una o varias células vacuoladas de gran tamaño, las cuales se mantienen unidas al embrión somático.

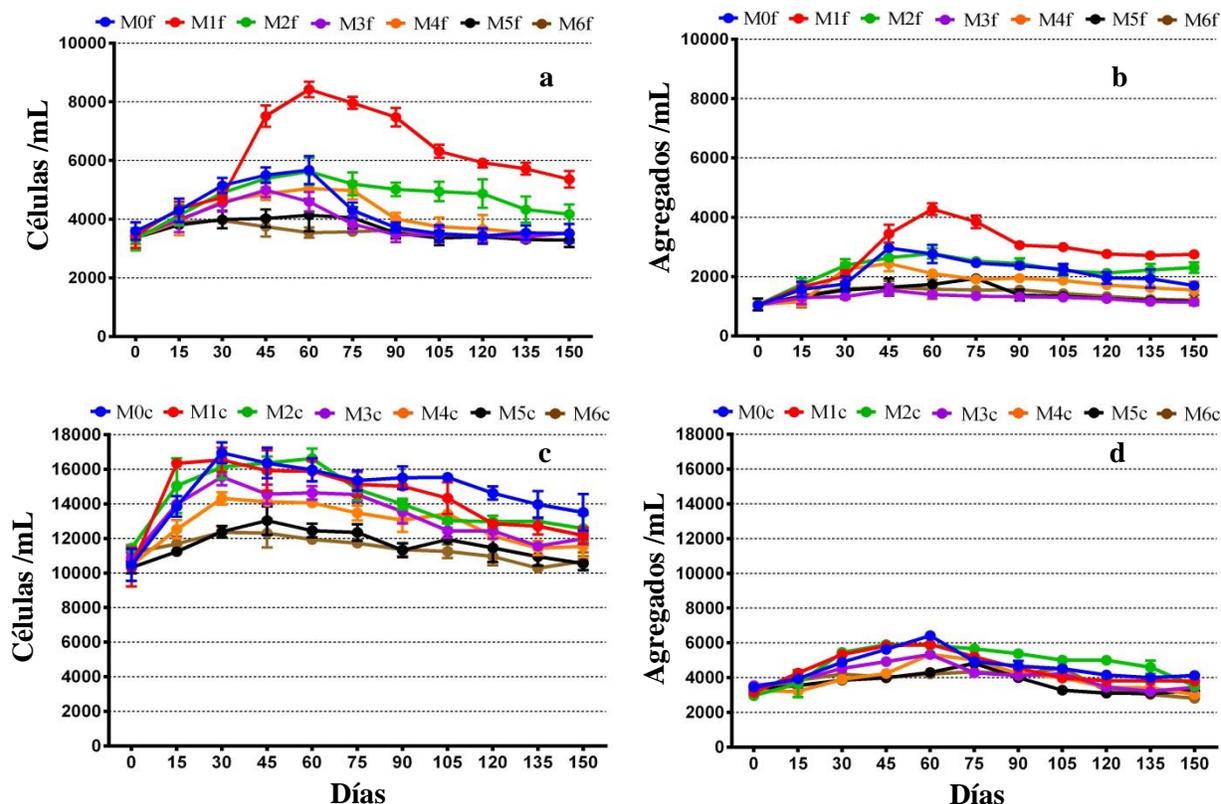
Respecto a la influencia de los reguladores del crecimiento en la inducción de embriogénesis somática, los seleccionados en el presente estudio, la citocinina BAP y las auxinas 2,4-D y AIA, han sido empleados en varias investigaciones previas en *A. indica* que reportan la inducción de embriogénesis somática (en medio sólido) (Su *et al.*, 1997; Chaturvedi *et al.*, 2004; Rout, 2005; Shekhawat *et al.*, 2009; Das, 2011; Fernández Da Silva *et al.*, 2016). Sin embargo, no se logró la formación de estructuras embriogénicas en las diferentes condiciones establecidas, las cuales solo presentaron crecimiento de microcallos (entre 1 – 2 mm) de consistencia suave y forma irregular. El seguimiento de las células del cultivo, realizado quincenalmente (Figura 11), confirmó que esta ausencia de formación de embriones somáticos no se debió a la pérdida de viabilidad de los cultivos (ya que, durante los 5 meses evaluados, se observaron células viables); sin embargo, también se observó que, para

la mayor parte de los tratamientos y tipo de suspensión, el cultivo presentó un crecimiento lento, lo cual puede implicar que las células de *A. indica* no lograron adaptarse de forma eficiente al medio líquido. Este escaso crecimiento destaca especialmente en los tratamientos M5f, M6f, M5c y M6c, donde se emplearon altas concentración de BAP (4 o 6 mg/L) y AIA o 2,4-D (a 2 mg/L).



**Figura 10.** Morfología de los distintos tipos celulares y de agregados, presentes en los cultivos en suspensión: célula embriogénica (E), célula no embriogénica (NE). **a.** Célula embriogénica individual. **b.** Agregado pequeño de células embriogénicas (3 células). **c.** Agregado grande de células embriogénicas (más de 10 células). **d.** Célula no embriogénica individual. **e.** Agregado pequeño de células no embriogénicas (4 células), con algunas células embriogénicas unidas (redondas y de menor tamaño). **f.** Células embriogénicas y no embriogénicas juntas y viables (coloración transparente); se observan además algunas células embriogénicas muertas (coloración azul oscuro). **g – i.** Células redondeadas (embriogénicas) mostrando patrones de división asimétrica.

Se teoriza entonces que, los reguladores del crecimiento seleccionados, a las concentraciones utilizadas, no fueron suficientes (en la mayor parte de las condiciones) para estimular la división celular y crecimiento de las células en suspensión, hasta el punto de formar embriones somáticos o lograr una división celular rápida y constante. Como señalan Singh y Chaturvedi (2013), desde las primeras investigaciones *in vitro* en *A. indica*, respecto a la regeneración vía embriogénesis somática, la inducción, crecimiento y posterior maduración de estos embriones somáticos ha sido un problema común, el cual debe ser superado para hacer de este un método viable para la propagación del neem. Cuestiones como una baja cantidad de embriones somáticos formados, además de diversas anomalías en los mismos, aunado a bajos porcentajes de regeneración, están entre las complicaciones frecuentemente mencionadas.



**Figura 11.** Variaciones en el número de células y agregados viables por mililitro (mL), en los medios evaluados, durante un periodo de 5 meses. **a.** Número de células en suspensión de callo derivado de hoja (neomorfos) por mL, para cada tratamiento aplicado. **b.** Número de agregados celulares en suspensión de callo derivado de hoja (neomorfos) por mL, para cada tratamiento aplicado. **c.** Número de células en suspensión de callo derivado de cotiledón por mL, para cada tratamiento aplicado. **d.** Número de agregados celulares en suspensión de callo derivado de cotiledón por mL, para cada tratamiento aplicado.

Debido a la mayor proliferación de células y agregados, se seleccionó a los medios M0f – M2f y M0c – M2c para determinar el efecto de un cultivo en agitación sin reemplazo de

medio, una condición estresante, sobre la aparición de la embriogénesis somática. Como señala Fehér (2015), el “interruptor” o señal que activa la embriogénesis somática, se desencadena en células que se exponen transitoriamente a condiciones fuertes de estrés y/o altas concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal. En el primer caso, son frecuentemente reportadas: estrés osmótico, aplicación de metales pesados, alta o baja temperatura, hipoxia, radiación ultravioleta, tratamientos mecánicos o químicos, entre otros.

Las suspensiones celulares seleccionadas, al establecerse y ser cultivadas sin recambio del medio, presentaron un leve oscurecimiento a los 30 días de cultivo, debido a la acumulación de sustancias de desecho y compuestos fenólicos. En el caso del medio M1f, este oscurecimiento fue especialmente destacado, presentando una coloración marrón oscuro al final de los 5 meses, a diferencia de los otros medios, los cuales mantuvieron una coloración beige oscuro. Al analizar la morfología celular de las suspensiones, se observó, durante el 2do – 3er mes de estudio, para el tratamiento M1f, la presencia de agregados de células embriogénicas (Figura 12b y 12c) con mayor compactación que en el caso de los tratamientos donde se aplicó el recambio de medio (Figura 12a). Aunque estos agregados compactos fueron observados también en los otros medios sometidos a estrés, se encontraron con menor frecuencia (comprendieron entre el 10 – 20% de los agregados celulares grandes), siendo más común la presencia de agregados laxos.

Al finalizar los 5 meses propuestos, se observó la presencia de microcallos en los cultivos sometidos a estrés, siendo estos (para la mayor parte de los medios) de consistencia suave, forma irregular, y con tamaños entre 1 – 3mm (Figura 12e). En el caso del medio M1f, pese al destacado oscurecimiento (oxidación) en la suspensión, si se observaron estructuras embriogénicas en distintas etapas de desarrollo: globular (Figura 12g), alargada (similar a un embrión somático en etapa torpedo) (Figura 12i), y con ocurrencia de embriogénesis somática secundaria (Figura 12h). Se obtuvo un promedio de  $45 \pm 8$  embriones somáticos por frasco, donde entre 63 – 68% comprendieron estructuras globulares, y el 20 – 30% estructuras alargadas; el 4 – 9% restante comprendió embriones somáticos alargados con embriogénesis somática secundaria (embriones más pequeños adheridos a su superficie, los cuales a su vez comprendieron el 2% de los embriones somáticos totales). En el caso de los microcallos formados en el medio M1f, estos presentaron una consistencia dura y superficie lisa, además de una forma esférica, de mayor tamaño que los microcallos presentes en el resto de los medios (se observaron estructuras de hasta 5 – 6 mm) (Figura 12f).

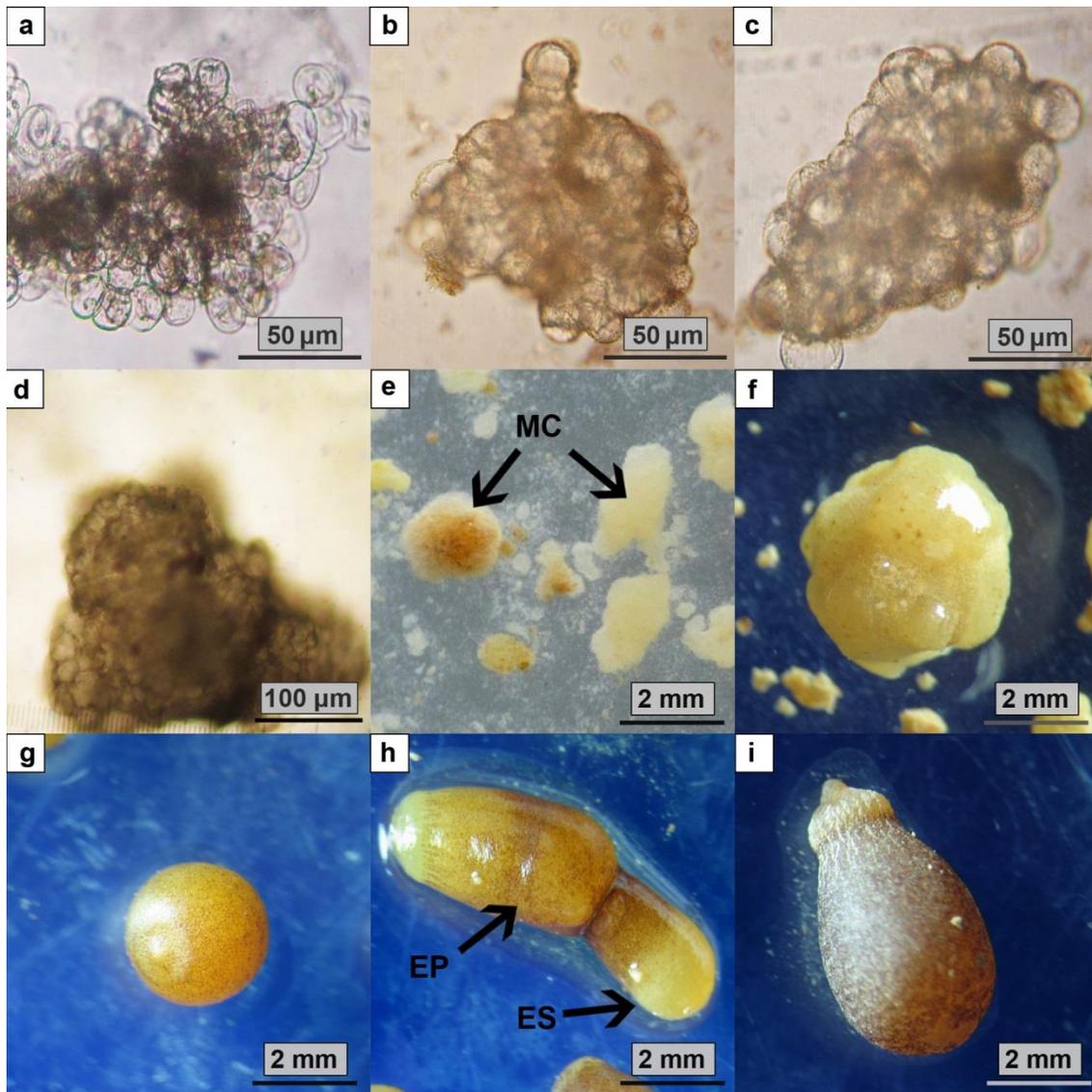
Estos resultados parecieran indicar que la aplicación de un tratamiento estresante, como es el cultivo sin recambio, en un medio rico en compuestos fenólicos, estimula la ocurrencia de embriogénesis somática en *A. indica*, al menos, a la combinación de reguladores de crecimiento presentes en el medio M1f (2 mg/L de BAP + 1 mg/L de AIA). La oxidación derivada por la producción compuestos fenólicos y el sucesivo oscurecimiento de los tejidos implicados, es un fenómeno común en el cultivo *in vitro* de varias plantas leñosas, estando

típicamente relacionado con la escasa o nula ocurrencia de procesos morfogénicos como la organogénesis y la embriogénesis somática. De tal manera, Laukkanen *et al.* (2000), en un estudio sobre el efecto de los fenoles secretados durante el cultivo *in vitro* de callos de *Pinus sylvestris* L., señalan la ocurrencia de diversos cambios en la estructura celular debido a este oscurecimiento, entre ellos, la acumulación de taninos en las paredes celulares, espacios intercelulares y el citoplasma, junto a una alta desorganización en el citoplasma, y la muerte eventual de la célula. Sin embargo, pese a la usual asociación de la aparición *in vitro* de este oscurecimiento con el “daño” o “muerte” del cultivo, otros investigadores como Reis *et al.* (2008) señalan que el rol de los compuestos fenólicos debe ser analizado más cuidadosamente.

Varias investigaciones señalan que la presencia de compuestos fenólicos puede, en ciertos casos, promover algunos procesos morfogénicos, lo que explicaría el desarrollo de estos embriones somáticos. Entre los ejemplos, se puede mencionar la proliferación de brotes en varios genotipos de papa (Sarkar y Naik, 2000) y el enraizamiento de brotes de *Pterocarpus marsupium* (Husain y Anis, 2007). En el caso de la embriogénesis somática, Reis *et al.* (2008), en un estudio del efecto de algunos compuestos fenólicos en callos embriogénicos de *Feijoa sellowiana*, una planta leñosa, encontraron que la inclusión de los fenoles floroglucinol y ácido caféico, a concentraciones específicas en el medio, incrementaban los niveles de inducción de embriogénesis somática. Por otra parte, puede mencionarse nuevamente el estudio realizado por Neuenschwander y Baumann (1992) en explantes de café, donde los callos embriogénicos solo se desarrollaron luego del oscurecimiento del explante inicial, en un proceso similar a la necrosis, que no afectó la generación de embriones somáticos.

En otras investigaciones como la de Anthony *et al.* (2004) en *Conostephium pendulum*, encontraron que el aumento en el oscurecimiento en el callo (y la aparente necrosis del tejido), bajo determinadas condiciones de cultivo, no afectaba la producción de embriones somáticos. Por otro lado, en una investigación realizada por Kouakou *et al.* (2007), estos encontraron que la inducción de embriogénesis somática en *Gossypium hirsutum* estuvo fuertemente relacionada al contenido de metabolitos secundarios como el ácido caféico, ferúlico y salicílico, y a la aparición de ácido p-cumárico, ácido benzoico, transresveratrol, catequina y naringenina.

A pesar de la existencia de todos estos reportes, que señalan un efecto positivo (aunque no para todos los cultivos o especies vegetales) del estrés causado por los compuestos fenólicos en la embriogénesis somática, aún no se han dilucidado cuáles son las vías específicas por medio de la cual este agente estresante activa el desarrollo de los embriones somáticos, no existiendo además trabajos previos de este tipo realizados en neem. Por otra parte, a pesar de la escasa cantidad de estructuras embriogénicas obtenidas, este resultado comprende el primer reporte de la formación de estas a partir de suspensiones celulares finas de *A. indica*.

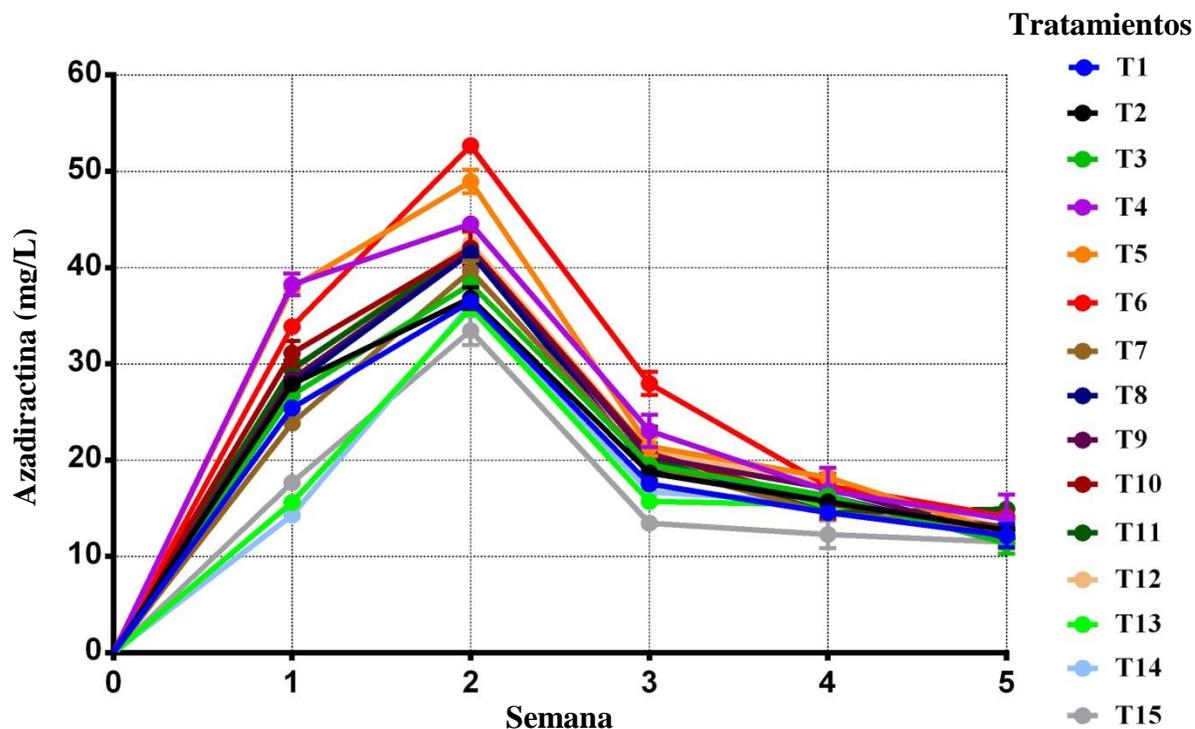


**Figura 12.** Morfología de los agregados celulares y estructuras embriónicas en los medios sometidos a condiciones de estrés. MC = microcallo; EP = embrión somático primario; ES = embrión somático secundario. **a.** Agregado celular (derivado de tejido de cotiledón) poco compacto, presente en el medio M2c. **b - d.** Agregados celulares compactos presentes en el medio M1f. **d.** Microcallos formados luego de 5 meses de cultivo, para los medios sometidos a recambio. **e - f.** Microcallos formados luego de 5 meses de cultivo, para el medio M1f. **g - i.** Estructuras embriónicas encontradas en el medio M1f (**g:** embrión somático globular; **h:** embrión somático alargado, con embrión somático secundario diferenciado en su superficie; **i:** embrión somático alargado).

### 8.3. Producción y extracción de azadiractina.

La producción de azadiractina, para todos los tratamientos, varió durante las 5 semanas consideradas. Las 15 condiciones (T1 – T15) presentaron una tendencia similar en las curvas: inicialmente, durante la 1ra y 2da semana, se observó un incremento en la concentración del

metabolito secundario en el medio, alcanzándose en cada condición una producción máxima a la 2da semana. Posteriormente, entre la 3ra – 5ta semana, todos los tratamientos mostraron una reducción progresiva en la concentración de azadiractina (Figura 13).



**Figura 13.** Cambios en la concentración de azadiractina en el medio, para cada uno de los 15 tratamientos, durante las 5 semanas. En estos (T1 – T15) se combinan distintos tipos de medio MS (40:20, 50:10 y 60:0 o “nitrógeno”) con distintas combinaciones de los precursores acetato de sodio (a 0, 10 y 50 mg/L) y escualeno (a 0, 10 y 50 mg/L).

En el caso de las muestras del control (tratamiento T1), las cuales estuvieron sólo bajo la influencia del Tritón X-100, en un medio MS estándar ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  a una relación 40:20), sin precursores añadidos, se registraron concentraciones del metabolito entre  $12,16 \pm 1,21$  y  $36,47 \pm 0,58$  mg/L. Aunque la azadiractina puede ser secretada al medio líquido circundante por las células del callo, sin requerir intervención al respecto, investigaciones como la de Sujanya *et al.* (2008) señalan que más de la mitad de la azadiractina total sintetizada se mantiene en el interior celular. El Tritón X-100 añadido al medio actúa entonces como un agente permeabilizante, teniendo la capacidad de aumentar el tamaño de poro en uno o más de los sistemas de membrana de la célula vegetal, lo cual permite el paso de varias moléculas dentro y fuera de la célula. De tal manera, que su adición al medio permite la liberación de la azadiractina acumulada, así como un aumento en la transferencia de los sustratos requeridos para los procesos metabólicos hacia el interior celular (Srivastava y Srivastava, 2008).

En la 1ra semana evaluada, la mitad de los tratamientos no presentaron diferencias significativas al compararlos con el control (T1) ( $p \geq 0,1255$ ) respecto a la concentración del metabolito secundario en el medio. Sólo se observaron diferencias en los tratamientos del T4 al T6, y el T10 (superiores al control) ( $p \leq 0,0018$ ), y los tratamientos desde el T13 al T15 ( $p < 0,0001$ ) (inferiores al control). Al avanzar hasta la 2da semana, los tratamientos T5 y T6 continuaron presentando concentraciones de azadiractina superiores a las del control ( $p < 0,0001$ ) y a la mayoría de los demás tratamientos ( $p \leq 0,0002$ ), existiendo sólo similitud con el tratamiento T4 (T5 vs T4,  $p = 0,0557$ ). En el caso de los tratamientos del T13 al T15 (antes inferiores), presentaron en esta semana concentraciones estadísticamente similares a las del control ( $p \geq 0,5711$ ), aunque aún inferiores a las de varios de los otros tratamientos.

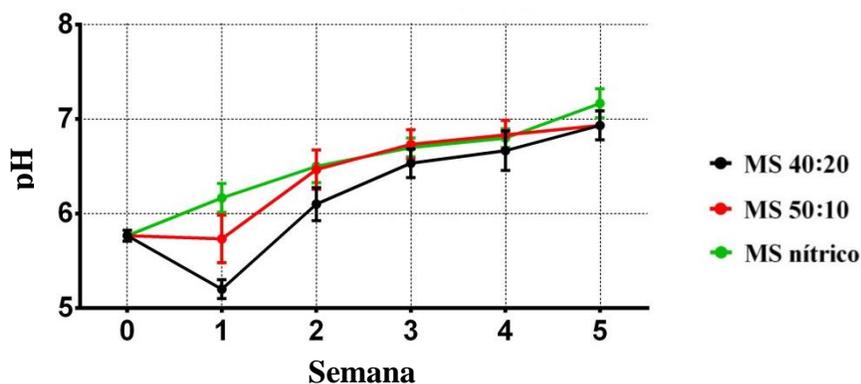
La mayor cantidad de las diferencias estadísticamente significativas encontradas, respecto al control y entre tratamientos, se concentraron entre la 1ra y 2da semana de estudio; en la 3ra semana, junto a la reducción en la concentración del metabolito, también se observó un aumento en la similitud de las concentraciones medidas para cada tratamiento, sólo destacando el tratamiento T6, donde la concentración de azadiractina continuó siendo significativamente superior a las de los demás tratamientos ( $p \leq 0,0162$ ), y el tratamiento T15, donde fue inferior a la observada para la mayoría ( $p \leq 0,0066$ ). Este aumento en la similitud progresó hasta alcanzar la 5ta semana, donde ningún tratamiento presentó diferencias significativas respecto al control o los otros ( $p \geq 0,2793$ ). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas respecto al control, en ninguna de las semanas evaluadas, para los tratamientos T2 (sin precursores, medio MS 50:10), T3 (sin precursores, medio MS nítrico) y T7 (10 mg/L de acetato de sodio + 50 mg/L de escualeno, medio MS 40:20); (respectivamente:  $p \geq 0,8379$ ,  $p \geq 0,9719$ ,  $p \geq 0,4532$ ). Todos los demás tratamientos si presentaron diferencias significativas respecto al control en al menos una de las semanas.

El comportamiento observado en la Figura 13, donde ocurre un aumento progresivo en la cantidad de azadiractina en el medio, seguido de una reducción en su concentración luego de un tiempo determinado, ha sido reportado en cultivos en suspensión de callos de neem por Prakash *et al.* (2005), empleando callos derivados de semillas, y por Salomón (2014), para callos no embriogénicos de hoja. En el presente estudio, luego de que, en la 2da semana, se obtuvieran valores promedio de azadiractina entre  $52,68 \pm 0,80$  mg/L (en T6) y  $33,47 \pm 1,52$  mg/L (en T15) (máximo y mínimo para esa semana, respectivamente), se obtuvieron valores promedio hasta tres veces inferiores en la 5ta semana, entre  $14,92 \pm 0,84$  mg/L (en T11) y  $11,35 \pm 1,07$  mg/L (en T3) (máximo y mínimo para esa semana). Prakash *et al.* (2005) sugieren que esta reducción en el contenido de azadiractina, durante el cultivo en matraces, puede deberse a la combinación de tres factores: (1) una menor tasa de producción, debido a que se alcanza una fase estacionaria, con menor o nula síntesis del producto, (2) la iniciación de un proceso de degradación del producto, y (3) a cambios en la estructura química del metabolito secundario, derivando este en otros compuestos no-detectables. En su estudio, la

cantidad de azadiractina en el medio aumentó hasta el día 12 (casi dos semanas), presentando posteriormente una reducción en su concentración; algo similar ocurrió con la biomasa, la cual aumentó también hasta el día 12, permaneciendo posteriormente sin cambios (fase estacionaria), lo cual puede sugerir una relación entre la síntesis de azadiractina y el crecimiento celular (producción asociada al crecimiento).

Prakash *et al.* (2005) atribuyen la ocurrencia de estos 3 factores a los cambios en la composición del medio. Nutrientes como el azúcar, nitrógeno, fósforo, entre otros, son progresivamente consumidos por las células; los callos disponen entonces cada vez menos de los materiales necesarios para continuar con sus procesos metabólicos de forma normal, afectándose la síntesis de sustancias como la azadiractina. En trabajos similares al del presente estudio, como el de Raval *et al.* (2003), realizado con callos derivados de brotes de *A. indica*, se reporta que, para el día 12, más de la mitad del nitrato presente en el medio había sido consumido por los callos, así como el total de la fuente de carbono (sacarosa).

Aunado a la menor cantidad de material necesario para los procesos metabólicos, Prakash *et al.* (2005) reportan que la absorción del nitrógeno inorgánico puede alterar fuertemente el pH del medio, lo cual afecta a la azadiractina sintetizada. En el caso más específico de los iones  $\text{NO}_3^-$ , presentes en el nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) del medio MS, su consumo resulta en un incremento del pH del medio. La azadiractina es una molécula estable en disoluciones acuosas medianamente ácidas, con un pH entre 4 y 6, siendo inestable en soluciones fuertemente ácidas o alcalinas, e incluso muy cercanas a pH 7 (Saxena y Kumar, 2008). En la Figura 14, se puede observar que el pH, efectivamente, no se mantuvo igual durante las 5 semanas evaluadas para los 3 tipos de medio MS (40:20, 50:10 y nítrico), mostrando un aumento progresivo hasta valores cercanos o superiores a un pH 7. Variaciones similares se observan en los trabajos de Raval *et al.* (2003) y Prakash *et al.* (2005). En ambos, el pH (inicialmente en 5,8) presenta una reducción durante los primeros 10 días hasta valores entre 4,5 – 5, para luego aumentar nuevamente, alcanzando valores de hasta 6,2 en el día 16. También, es posible que estas variaciones en el pH se deban al consumo de otros iones presentes en el medio, y a la excreción de sustancias de desecho.



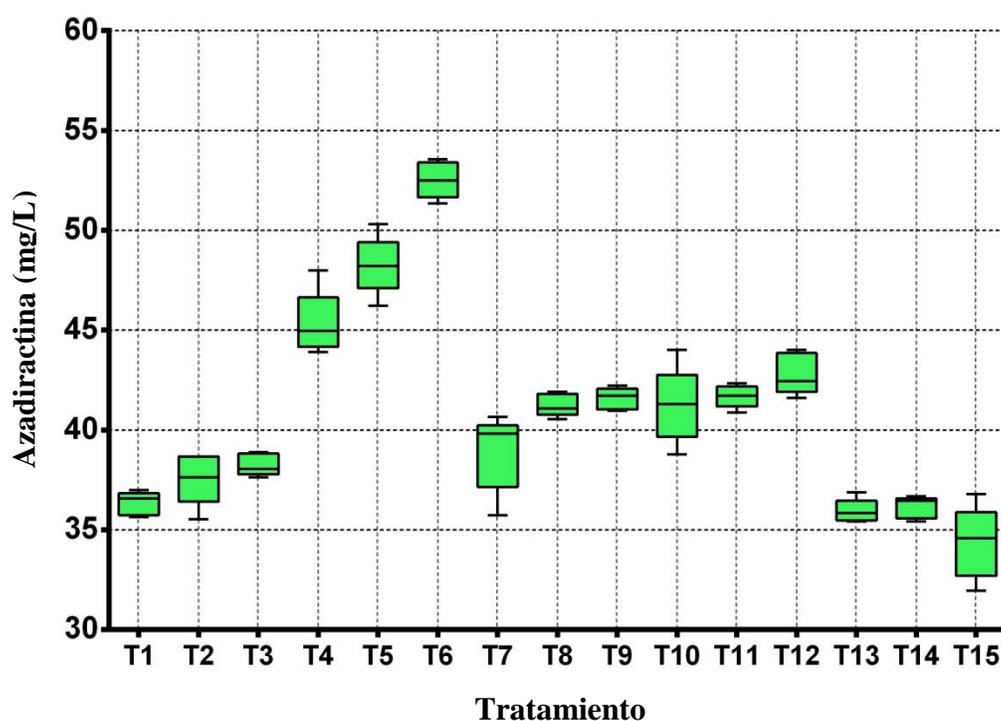
**Figura 14.** Variaciones en el pH de cada uno de los tipos de medio MS, durante las 5 semanas de estudio.

Al analizar nuevamente la producción de azadiractina en la segunda semana, considerando un mayor número de muestras, se obtuvieron resultados similares a los del primer ensayo. La prueba de ANOVA de una vía señaló que la media de al menos uno de los tratamientos fue significativamente diferente al resto ( $p < 0,001$ ); al realizar la prueba a posteriori de Tukey, se encontró que las concentraciones de azadiractina en los tratamientos T2, T3 y T7 nuevamente no difirieron de las presentadas por el control ( $p \geq 0,0624$ ). También, destacaron nuevamente las condiciones T4, T5 y T6, en las cuales se aplicó acetato de sodio y escualeno de forma simultánea, a 10 mg/L cada precursor (Figura 15). El tratamiento T6 presentó la mayor producción de azadiractina, con un valor promedio de  $52,53 \pm 0,90$  mg/L, siendo esta significativamente superior a la de todos los demás tratamientos evaluados ( $p \leq 0,0002$ ); los tratamientos T4 y T5 le siguieron, con valores promedio de  $45,32 \pm 1,59$  y  $48,25 \pm 1,46$  mg/L de azadiractina, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Salomón en 2014, para el mismo tipo de callo y empleando iguales concentraciones de precursores; esta señala que la producción de azadiractina a esta condición (10 mg/L de acetato de sodio + 10 mg/L de escualeno) fue superior que cuando se aplicaron los precursores de forma separada (a 10 mg/L), o de forma simultánea pero a altas concentraciones (50 mg/L cada uno). Srivastava y Srivastava (2013) también señalan una mayor síntesis del metabolito secundario al ser añadidos estos precursores (aunque de forma individual, sin estudiarse el efecto combinado) a la concentración de 10 mg/L, en comparación con 50 mg/L y superiores.

Salomón (2014) reporta un valor promedio máximo de 42,69 mg/L de azadiractina. Este es levemente inferior al obtenido en el presente estudio ( $45,32 \pm 1,59$  mg/L) para la misma condición (MS estándar 40:20, 10 mg/L de acetato de sodio + 10 mg/L de escualeno), tiempo (segunda semana) y tipo de callo, pudiendo esto deberse a las condiciones de aireación empleadas. En su trabajo, se reporta el uso de cubiertas de aluminio, mientras que en el presente estudio se emplearon tapones de gasa. Orozco *et al.* (2011) señalan que las células de *A. indica*, al ser cultivadas en medio líquido, presentan un consumo de oxígeno superior al que tienen las células de otras plantas, como *Beta vulgaris*, cultivadas en condiciones similares. La aireación, en un cultivo celular, tiene la función de suplementar el oxígeno necesario para los procesos metabólicos, así como de eliminar ciertos metabolitos volátiles que se acumulan y pueden afectar el crecimiento celular, tales como el CO<sub>2</sub> y el etileno. Al emplear matraces con tapa de aluminio, estos autores reportan niveles de azadiractina (0,52 mg/L) inferiores a los obtenidos al utilizar tapones de algodón (1 mg/L), así como un crecimiento reducido de los callos y agregados celulares.

Al evaluar la influencia de las dos variables dispuestas para cada tratamiento, combinación de metabolitos y relación nitrato/amonio, se encontró que la mayor parte de la varianza, 85,58%, se debe a la adición de precursores en el medio. En este orden de ideas, Srivastava y Srivastava (2008), plantean cómo los precursores influyen en la producción de

azadiractina, dividiendo primeramente a estos en dos grupos: naturales y obligados. Los primeros, como en el caso del acetato de sodio, no son miembros de la ruta biosintética de la azadiractina, como pudo observarse en las Figuras 4 y 5 (ver: marco teórico). Este precursor debe ser primeramente tomado y transformado por la célula en ácido acético, y posteriormente incorporarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, permitiendo un incremento en los niveles de acetil CoA, el cual comprende el primer paso en la ruta del mevalonato. En el segundo caso, los precursores obligados si son miembros directos de la ruta de síntesis de la azadiractina, siendo incorporados a esta sin ser previamente transformados; este es el caso del escualeno, el cual, como se puede apreciar en la Figura 5, participa en las fases finales de esta ruta, siendo transformado en 2,3-oxidoescualeno, luego lanosterol, y de allí pasa por otros productos intermedios hasta llegar a la azadiractina. Investigaciones como las de Balaji *et al.* (2003) y Prakash y Srivastava (2011), describen que el escualeno, agregado de forma individual, permite una mayor síntesis de azadiractina en comparación con el acetato de sodio. Sin embargo, otras investigaciones, como la de Srivastava y Srivastava (2013), reportan mejores resultados al emplear acetato de sodio.



**Figura 15.** Concentración de la azadiractina sintetizada en cada uno de los tratamientos, medida en la segunda semana.

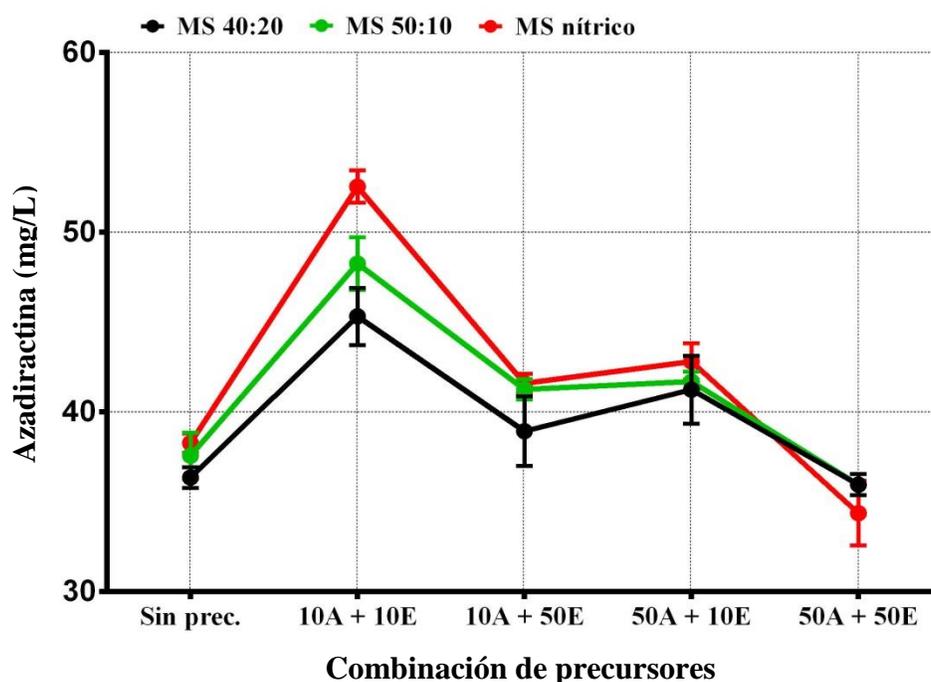
Aunque el acetato de sodio y el escualeno actúan a niveles diferentes de la ruta de biosíntesis de la azadiractina, estos pueden aplicarse de forma simultánea y aumentar la producción del metabolito secundario. Sin embargo, como señalan Srivastava y Srivastava

(2013), el total de azadiractina sintetizada va a depender de que ambos se encuentren a concentraciones óptimas en el interior celular, ya que pueden causar una inhibición por retroalimentación. De los tratamientos donde se aplicaron el acetato de sodio y escualeno a diferentes concentraciones (del T7 al T12), la mayor parte de estos presentaron una concentración del metabolito superior a la del grupo control (sin precursores) ( $p < 0,0001$ ); sin embargo, sus resultados fueron inferiores a los de los tratamientos donde se aplicaron ambos precursores a bajas concentraciones (T4 – T6) ( $p \leq 0,0009$ ) (exceptuando T4 vs T12,  $p = 0,0774$ ), pudiendo esto ser evidencia del proceso de inhibición por retroalimentación antes mencionado (Figura 13). Srivastava y Srivastava (2013), en un estudio sobre la producción de azadiractina en raíces en cabellera de *A. indica*, reportan la ocurrencia de esta inhibición en el caso del escualeno, cuando son evaluadas concentraciones de 50 mg/L (obtuvieron 30,75 mg/L de azadiractina al usar 10 mg/L del precursor; y 24,29 mg/L del metabolito al usar 50mg/L). Sin embargo, reportan que este efecto no ocurre con el acetato de sodio a las mismas concentraciones, 10 y 50 mg/L, observándose en cambio un aumento (aunque muy leve) en la concentración del metabolito secundario en el medio (40,49 mg/L de azadiractina en el primer caso, y 47 mg/L en el segundo).

Los tratamientos del T8 al T12 no mostraron diferencias significativas entre ellos ( $p \geq 0,7258$ ) respecto a la concentración de azadiractina. En el caso del tratamiento T7, este presentó una concentración del metabolito secundario significativamente inferior ( $p = 0,0004$ ) al tratamiento T12, así como a los tratamientos T9 y T11 ( $p = 0,0462$  y  $p = 0,0314$ , respectivamente). En el caso de los tratamientos T13, T14 y T15, donde se aplicaron acetato de sodio y escualeno en simultáneo a altas concentraciones (50 mg/L cada uno), se observó una producción de azadiractina igual a la del control (sin diferencias significativas,  $p \geq 0,3492$ ). Esto puede estar relacionado con lo anteriormente mencionado, en que las altas concentraciones de los precursores añadidos afectan el proceso de síntesis del metabolito secundario. En el caso del tratamiento T15 (50 mg/L de acetato de sodio + 50 mg/L de escualeno, medio MS nítrico), la cantidad de azadiractina producida (valor promedio de  $34,35 \pm 1,80$  mg/L) es además significativamente inferior ( $p \leq 0,0053$ ) a la observada para todos los demás tratamientos donde se emplearon menores cantidades de ambos o de alguno de los precursores.

Por último, en el caso de las variaciones en la relación nitrato/amonio, estas solo explicaron alrededor del 3,9% de la varianza observada, mientras que la interacción entre ambos factores (precursores x relación nitrato/amonio) explicó el 5,9%. Si se consideran agrupaciones de tratamientos según los precursores, se tienen 5 grupos en total: (1) sin precursores, (2) con 10 mg/L de acetato de sodio + 10 mg/L de escualeno, (3) con 10 mg/L de acetato de sodio + 50 mg/L de escualeno, (4) con 50 mg/L de acetato de sodio + 10 mg/L de escualeno, y (5) con 50 mg/L de acetato de sodio + 50 mg/L de escualeno, como se puede observar en la Figura 16. En la mayor parte de estos grupos, internamente, no se encontraron

diferencias significativas respecto a la síntesis de azadiractina al variar la proporción nitrato/amonio. Esta fue significativa ( $p \leq 0,0006$ ), principalmente en el caso del segundo grupo (T4 – T6), donde el aumento de esta proporción derivó en una mayor producción del metabolito secundario. En el caso del tercer grupo (T7 – T9), también se observó una mayor producción del metabolito al aumentar la proporción nitrato/amonio (medio MS 40:20 vs medio MS 50:10,  $p = 0,0078$ ; medio MS 40:20 vs medio MS nítrico,  $p = 0,0021$ ); sin embargo, los medios MS 50:10 y nítrico no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p = 0,8949$ ) respecto a la cantidad de azadiractina.



**Figura 16.** Concentración de la azadiractina sintetizada a la segunda semana, agrupando los resultados según los tipos y concentración de precursores y medio MS empleado. Sin prec. = medio sin precursores; 10A = 10 mg/L de acetato de sodio; 10E = 10 mg/L de escualeno; 50A = 50 mg/L de acetato de sodio; 50E = 50 mg/L de escualeno.

Ramage y Williams (2002) y Sivakumar *et al.* (2005) destacan la importancia de esta proporción en un cultivo *in vitro*. Aunque el  $\text{NH}_4^+$  del nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) suele ser la fuente de nitrógeno preferida por las células vegetales, debido a que su metabolismo requiere menos energía que en el caso del ion  $\text{NO}_3^-$  del nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), sólo pocas especies vegetales pueden desarrollarse bien cuando el  $\text{NH}_4^+$  es proporcionado como fuente de nitrógeno mayoritaria, debido a efectos negativos sobre el crecimiento y morfogénesis, y sobre la producción de metabolitos secundarios. Mejores resultados en este último punto (síntesis de metabolitos secundarios) suelen ser obtenidos cuando se suministran ambos iones en

simultáneo, estando el  $\text{NO}_3^-$  en mayor proporción, y, en algunos casos, cuando este es la única fuente de nitrógeno en el medio. Como ejemplos de esto, se puede mencionar la producción de Jaceosidina por *Saussurea medusa*, al aplicar una proporción 5:1 de nitrato:amonio (Zhao *et al.*, 2001); la producción de artemisina por *Artemisia annua*, al aplicar una proporción 5:1 (Wang y Tan, 2002); y la producción de ginsenosidos por *Panax ginseng*, al aplicar un medio nítrico (Sivakumar *et al.*, 2005). En el caso de *A. indica*, Prakash y Srivastava (2005), para callos derivados de semillas inmaduras, reportan un aumento en la producción de azadiractina (así como en la producción de biomasa) al aumentar la proporción de nitrato respecto a la de amonio, obteniendo la mayor producción del metabolito secundario (12,49 mg/L) cuando el nitrato fue utilizado como única fuente de nitrógeno.

En el Cuadro 8, se comparan algunas de las concentraciones de azadiractina encontradas en el presente estudio (para la segunda semana, considerando las 5 réplicas), con las de varios de los trabajos anteriormente citados.

**Cuadro 8.** Concentraciones de azadiractina obtenidas en el presente estudio y en otros trabajos realizados en *A. indica*. Se señalan las concentraciones de precursores y tipo de medio MS utilizado en cada uno.

<b>Trabajo comparado</b>	<b>Azadiractina (mg/L)</b>	<b>Tipo de explante</b>	<b>Tipo de callo</b>	<b>Precursor y tipo de MS</b>
Prakash <i>et al.</i> (2005)	12,49	Semillas	-	Sin precursores + MS nítrico
Villarroel (2012)	31,00	Foliar	NE	Acetato de sodio 10 mg/L + MS 40:20
Salomón (2014) (control)	35,50	Foliar	NE	Sin precursores + MS 40:20
Este estudio (Control)	36,35	Foliar	NE	Sin precursores + MS 40:20
Salomón (2014)	42,69	Foliar	NE	Acetato de sodio y escualeno a 10 mg/L + MS 40:20
Srivastava y Srivastava (2013)	47,06	Raíces	-	Acetato de sodio 50 mg/L + MS 40:20
Este estudio (T6)	52,53	Foliar	NE	Acetato de sodio y escualeno a 10mg/L + MS nítrico
Balaji <i>et al.</i> (2003)	72,8	Semillas	-	Escualeno a 10 mg/L + MS 40:20

En este sentido, es importante resaltar que en esta investigación se logró un mayor rendimiento de azadiractina a partir de callo no embriogénico derivado de tejido foliar, combinando ambos precursores en MS nítrico, lo que potencia la realización de otros estudios *in vitro* a nivel de biorreactores, a fin de obtener de manera continua este metabolito secundario de importancia bioinsecticida.

## IX. Conclusiones.

En concordancia con los objetivos propuestos para este trabajo, y considerando los resultados obtenidos, se concluye:

- Los explantes sembrados presentaron crecimiento de callo, tanto embriogénico como no embriogénico. En el caso del callo de hoja, se generó además un tercer tipo de callo, el cual presentó un aspecto abultado y superficie blanquecina, lisa y dura. Este callo (neomorfo) se caracterizó por su rápido crecimiento y la abundante formación de estructuras embriogénicas en su superficie.
- Se lograron establecer suspensiones celulares embriogénicas de *A. indica*, las cuales se mantuvieron viables durante un periodo de 5 meses. Sin embargo, ninguna de las condiciones donde se aplicó el recambio de medio mostró desarrollo de embriones somáticos, solo observándose la formación de agregados y microcallos.
- Se regeneraron embriones somáticos a partir de las suspensiones celulares derivadas de los neomorfos, en un medio con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA, al someter a las células de estas a un cultivo sin recambio de medio. Se obtuvo un promedio de  $45 \pm 8$  embriones por frasco, correspondiendo la mayor proporción (63 – 68%) a embriones somáticos en etapa globular. Se observaron además embriones somáticos alargados o en etapa torpedo (20 – 30%) y con embriogénesis secundaria (4 – 9%).
- Las mayores concentraciones de azadiractina fueron encontradas al emplear simultáneamente acetato de sodio y escualeno a bajas concentraciones (10 mg/L cada uno). Por otra parte, pese a tener una influencia más baja que la generada por la adición de precursores, se encontró que el tipo de medio MS seleccionado también influye en la síntesis de azadiractina.
- Al utilizar un medio MS nítrico, con acetato de sodio y escualeno a 10 mg/L cada precursor, la producción de azadiractina se incrementó hasta  $52,53 \pm 0,90$  mg/L, la mayor registrada en este trabajo. La adición de estos precursores a altas concentraciones (50 mg/L cada precursor), empleando un medio MS nítrico, disminuyó la cantidad de azadiractina sintetizada.
- La cantidad más alta de azadiractina producida se registró, para todos los tratamientos evaluados, a los 14 días de cultivo; los siguientes días se observó una reducción en la concentración del metabolito en el medio.

## **X. Recomendaciones.**

Debido a la baja respuesta observada para los ensayos de inducción de embriogénesis somática, en cultivos de células en suspensión, se hace necesario evaluar otros tipos, combinaciones y concentraciones de auxinas y citoquininas, a fin de optimizar la formación de embriones somáticos por esta técnica. Por otra parte, se hace necesario un estudio más profundo del efecto que tienen las condiciones estresantes durante el cultivo *in vitro*, tales como la deficiencia de nutrientes y presencia de compuestos fenólicos, en la activación de los procesos de formación de embriones somáticos en *A. indica*.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, se recomienda, para conseguir una mayor cantidad de azadiractina, trabajar con callos no embriogénicos de explantes foliares, cultivados en un medio MS líquido de tipo nítrico, adicionando los precursores acetato de sodio y escualeno (a 10 mg/L cada uno), el agente permeabilizante Tritón X-100, y permitiendo además la aireación del cultivo, empleando para esto último una cubierta de algodón y gasa. Es necesaria la evaluación de otras variables, además de las ya estudiadas, tales como la acción de otras sustancias precursoras, elicitores, y variaciones de otros nutrientes presentes en el medio MS, con el objetivo de continuar optimizando la síntesis de este metabolito secundario.

Para una producción continua de azadiractina, es necesario escalar el cultivo de callos en suspensión de *A. indica* a un nivel de biorreactor, considerando las condiciones óptimas encontradas. Se debe establecer además un sistema eficiente de aireación en el biorreactor, para suplir el oxígeno que necesitan las células para sus procesos metabólicos. Aunado a esto, se debe considerar el punto de mayor producción de azadiractina en el tiempo, y la posterior disminución de la concentración de este metabolito secundario en el medio, a fin de establecer un sistema eficiente de reemplazo de nutrientes y la recuperación de la azadiractina ya sintetizada.

## XI. Bibliografía.

Ahloowalia, B. S. (1991). Somatic embryos in monocots. Their genesis and genetic stability. *Rev. Cytol. Biol. Veget-Bot.* 14(3-4):223-235.

Akula, C., A. Akula y R. Drew. (2003). Somatic embryogenesis in clonal neem, *Azadirachta indica* A. Juss. and analysis for *in vitro* azadirachtin production. *In Vitro Cell. Dev. Pl.* 39(3):304-310.

Almas, K. (1999). The antimicrobial effects of extracts of *Azadirachta indica* (Neem) and *Salvadora persica* (Arak) chewing sticks. *Indian J. Dent. Res.* 10(1):23-26.

Alzoreky, N. S. y K. Nakahara. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int. J. Food Microbiol.* 80(3):223-230.

Anthony, J. M., T. Senaratna, K. W. Dixon y K. Sivasithamparam. (2004). The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* (Ericaceae). *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 78(3):247-252.

Arias, D., G. Vázquez, W. Acosta, L. Montañez, R. Álvarez y V. Pérez. (2009a). Determinación del azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*). *Rev. Ingeniería UC.* 16(3):22-26.

Arias, M., A. Aguirre, M. Angarita, C. Montoya y J. Restrepo. (2009b). Aspectos Ingenieriles del Cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna.* 76(157):109-121.

Aristeguieta, L. (2003). Estudio dendrológico de la flora de Venezuela. Volumen 38. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Caracas. Venezuela. 571 p.

Arora, K., M. Sharma y A. K. Sharma. (2009). Control of pattern of regenerant differentiation and plantlet production from leaflet segments of *Azadirachta indica* A. Juss.(neem). *Acta Physiol. Plant.* 31(2):371-378.

Arora, R. K. (1993). Genetic diversity and Ethnobotany. En: Randhawa N. S. y B. S. Parmar (Eds.). *Neem Research and Development.* Society of Pesticide Science. Nueva Delhi. India. 33-37 pp.

Atawodi, S. E. y J. C. Atawodi. (2009). *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. *Phytochem. Rev.* 8(3):601-620.

Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agro. Meso.* 20(1):153-175.

Badam, L., S. P. Joshi y S. S. Bedekar. (1999). 'In vitro' antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract against group B coxsackieviruses. *J. Commun. Dis.* 31(2):79–90.

Balaji, K., C. Veeresham, K. Srisilam y C. Kokate. (2003). Azadirachtin, a novel biopesticide from cell cultures of *Azadirachta indica*. *J. Plant Biotechnology.* 5(2):121–129.

Barnby, M. A. y J. A. Klocke. (1990). Effects of azadirachtin on levels of ecdysteroids and prothoracicotropic hormone-like activity in *Heliothis virescens* (Fabr.) larvae. *J. Insect. Physio.* 36(2):125–131.

Bedoya, J. y R. Hoyos. (2010). Efecto de la relación agitación aireación sobre el crecimiento células y la producción de azadiractina en cultivos celulares de *Azadirachta indica* A. Juss. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín.* 63(1):5293–5305.

Bhojwani, S. S. y P. K. Dantu. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text.* Springer Science & Business Media. New York. USA. 309 p.

Bhonde, S. B., S. G. Deshpande y R. N. Sharma. (1999). *In vitro* evaluation on inhibitory nature of some Neem formulations against plant pathogenic fungi. *Hindustan Antibiot. Bull.* 41(1–4):22–24.

Bicknell, R. A. y A. M. Koltunow. (2004). Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell.* 16(1):228–245.

Biswas, K, R. K. Chattopadhyay, U. Banerjee y U. Bandyopadhyay. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr. Sci.* 82(11):1336–1345.

Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi y E. Gontier. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161(5):839–851.

Brandis, D. (1921). *Indian Trees.* Constable and Company Ltd. Londres. Reino Unido. 812 p.

Briskin, D. P. (2000). Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiol.* 124(2):507–514.

Cangahuala-Inocente, G. C., N. Steiner, M. Santos y M. P. Guerra. (2004). Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma.* 224(1-2):33–40.

Capataz, J. (2005). Efecto de elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *Azadirachta indica* y su efecto sobre *Spodoptera* sp.

Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Medellín, Colombia. 67 p.

Carvalho, M. A. F., R. Paiva, E. Alves, R. C. Nogueira, V. C. Stein, E. M. de Castro, P. D. de Oliveira y D. P. Vargas. (2013). Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. *Braz. J. Bot.* 36(2):141–151.

Chai, M., Y. Jia, S. Chen, Z. Gao, H. Wang, L. Liu, P. Wang y D. Hou. (2011). Callus induction, plant regeneration, and long-term maintenance of embryogenic cultures in *Zoysia matrella* [L.] Merr. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 104(2):187–192.

Chattopadhyay, R. R. (2003). Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: part II. *J. Ethnopharmacol.* 89(2–3):217–219.

Chaturvedi, R., M. K. Razdan y S. S. Bhojwani. (2004). *In vitro* morphogenesis in zygotic embryo cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Plant Cell. Rep.* 22(11):801–809.

Chowdhary, A. y V. Singh. (2009). Geographical Distribution, Ethnobotany and Indigenous Uses of Neem. En: Singh K. K., S. Phogat, A. Tomar y R. S. Dhillon (Eds). *Neem. A Treatise*. I. K. International. Nueva Delhi. India. 16–29 pp.

Copping, L. G y J. J. Menn. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci.* 56(8):651–676.

Cruz, D. (1993). *Nim: Programa para promover el desarrollo rural en Venezuela*. Fundación Friedrich Naumann. Caracas. Venezuela. 15 p.

Das, P. (2011). *In Vitro* Somatic Embryogenesis in Some Oil Yielding Tropical Tree Species. *Am. J. Plant Sci.* 2(1):217–222.

Dhillon, R. S., K. S. Ahlawat y J. S. Pundeer. (2009). Botany of Neem. *Neem: a treatise*. En: Singh K. K., S. Phogat, A. Tomar y R. S. Dhillon (Eds). *Neem. A Treatise*. I. K. International. Nueva Delhi. India. 30–43 pp.

Dogra, P. D. y R. C. Thapliyal. (1996). Gene resources and breeding potential. En: Randhawa, N. S. y B. S. Parmar (Eds). *Neem. New Age International*. Nueva Delhi. India. 27–32 pp.

Domoki, M., J. Györgyey, J. Bíró, T. P. Pasternak, Á. Zvara, S. Bottka, L. G. Puskás, D. Dudits y A. Fehér. (2006). Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast derived alfalfa cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1759(11–12):543–55.

Elterai, I. (2004). Variability in growth, oil and limonoids in Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) from different ecozones in Sudan. Tesis de Doctorado. Universidad Gezira, Facultad de Ciencias Agrícolas, Medani, Sudan. 140 p.

Fehér, A. (2005). Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos?. En: Mujib, A. y J. Šamaj (Eds.). Somatic Embryogenesis. Springer Science & Business Media. Berlín. Heidelberg. 85-101 pp.

Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* 1849(4):385–402.

Fehér, A., T. P. Pasternak y D. Dudits. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell. Tiss. Org.* 74(3):201–228.

Fernández Da Silva, R., L. Hermoso–Gallardo y A. Menéndez–Yuffa. (2005). Primary and Secondary Somatic Embryogenesis in Leaf Sections and Cell Suspensions of *Coffea Arabica* cv. Catimor. *Interciencia.* 30(11):694–698.

Fernández–Da Silva, R., A. Villarroel, L. Cuamo y V. Storaci. (2016). Evaluación de un Sistema de Regeneración por Embriogénesis Somática de Neem (*Azadirachta Indica*). *Acta biol. Colomb.* 21(3):581–592.

Fki, L., R. Masmoudi, N. Drira y A. Rival. (2003). An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour. *Plant Cell. Rep.* 21(6):517-524.

Gajalakshmi, S. y S. A. Abbasi. (2004). Neem leaves as a source of fertilizer-cum-pesticide vermicompost. *Bioresour. Technol.* 92(3):291–296.

Ghedira, K. y P. Goetz. (2014). *Azadirachta indica* A. Juss. Neem, Meliaceae. *Phytothérapie.* 12(4):252–257.

Girish, K. y S. Bhat. (2008). A Green Treasure. *Electronic Journal Biology.* 4(3):102–111.

Gómez, R., M. de Fera, L. Posada, T. Gilliard, F. Bernal, M. Reyes, M. Chávez y E. Quiala. (2002). Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell. Tiss. Org.* 68(1):21–26.

Gupta, P. K., R. S. Pal y C. J. Emmanuel. (1995). Initial flowering and fruiting of the Neem – National Provenance Trial. *Indian For.* 121(11):1063–1068.

Gupta, S., M. Kataria, P. K. Gupta, S. Murganandan y R. C. Yashroy. (2004). Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. *J. Ethnopharmacol.* 90(2–3):185–189.

Halim, E. M. (2003). Lowering of blood sugar by water extract of *Azadirachta indica* and *Abroma augusta* in diabetes rats. *Indian J. Exp. Biol.* 41(6):636–640.

Hatti, K. S., L. Muralitharan, R. Hegde y A. Kush. (2014). NeeMDB: Convenient Database for Neem Secondary Metabolites. *Bioinformation.* 10(5):314–315.

Hecht, V., J. P. Vielle-Calzada, M. V. Hartog, E. D. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus y S. C. de Vries. (2001). The Arabidopsis *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* Gene is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. *Plant Physiol.* 127(3):803–816.

Henry, R. J. (1998). Molecular and biochemical characterization of somaclonal variation. En: Jain, S. M., D. S. Brar y B. S. Ahloowalia (Eds.). *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Países Bajos. 485–499 pp.

Hermoso-Gallardo, L. y A. Menéndez-Yuffá. (2000). Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. *Acta Cient. Venez.* 51(2):90–95.

Herrera, P. M. Villegas y R. López. (2011). Evaluación de la respuesta morfogénica y tamizaje fitoquímico de callo obtenido a partir de disco de hoja *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). *Rev. Invest. Univ. Quindío.* 22(1):100–112.

Husain, M. K., M. Anis y A. Shahzad. (2007). *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev-Pl.* 43(1):59–64.

Inpuay, K. y S. Te-chato. (2012). Primary and secondary somatic embryos as tool for the propagation and artificial seed production of oil palm. *J. Agric. Technol.* 8(2):597–609.

Isman, M. B., (2004). Factors limiting commercial success of neem insecticides in North America and Western Europe. En: Koul, O. y S. Wahab (Eds.). *Neem: Today and in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers. Londres. Reino Unido. 33–41 pp.

ITIS, (2016). Clasificación taxonómica de *Azadirachta indica*: Integrated Taxonomic Information System Taxonomic Hierarchy of *Azadirachta indica* A. Juss. Disponible en: [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic =TSN&search\\_value=29012](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic =TSN&search_value=29012). [Consultado el 3 de febrero de 2015].

Jacobs, M. (1961). The Genetics Identity of *Melia excelsa*. *Gard. Bull. Singapore*. 18(1):71–75.

Jiménez, V. M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13(2):196– 223.

Jiménez, V. M. y F. Bangerth. (2001). Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell. Tiss. Org.* 67(1):37–46.

Johansen, D. (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill. New York. USA. 523 p.

Jones, I. W., A. A. Denholm, S. V. Ley, H. Lovell, A. Wood y R. E. Sinden. (1994). Sexual development of malaria parasites is inhibited *in-vitro* by the neem extract azadirachtin, and its semisynthetic analogs. *FEMS Microbiol. Lett.* 120(3):267–273.

Kasturi, M., R. N. Ahamed, K. M. Pathan, B. Manivannan y R. H. Aladakatti. (2002). Ultrastructural changes induced by leaves of *Azadirachta indica* (neem) in the testis of albino rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 13(4):311–328.

Kaushik, J. C. y D. P. S. Nandal. (2009). Diseases of Neem: An Overview. En: Singh K. K., S. Phogat, A. Tomar y R. S. Dhillon (Eds). *Neem. A Treatise*. I. K. International. Nueva Delhi. India. 146–154 pp.

Kouakou, T. H., P. Waffo-Téguo, Y. J. Kouadio, J. Valls, T. Richard, A. Decendit y J. M. Mérillon. (2007). Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 90(1):25–29.

Koul, O. (2004). Neem: A Global Perspective. En: Koul, O. y S. Wahab (Eds.). *Neem: Today and in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers. Londres. Reino Unido. 1–19 pp.

Koul, O. y S. Wahab. (2004). *Neem Biotechnology – A Synthesis*. En: Koul, O. y S. Wahab (Eds.). *Neem: Today and in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers. Londres. Reino Unido. 243–259 pp.

Krikorian, A. D. y D. L. Smith. (1992). Somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota*). En: Lindsey, K. (Ed.). *Plant Tissue Culture Manual*. Springer US. Dordrecht. Países Bajos. 19–50 pp.

Kumar, V. y V. Navaratnam. (2014). Neem (*Azadirachta indica*): Prehistory to contemporary medicinal uses to Humankind. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3(7):505–514.

Kuruville, T., P. Komaraiiah y V. Ramakrishna. (1999). Enhanced secretion of azadirachtin by permeabilized margosa (*Azadirachta indica*) cells. *Indian J. Exp. Biol.* 37(1):89–91.

Kusari, S., V. C. Verma, M. Lamshoeft y M. Spiteller. (2012). An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(3):1287–1294.

Laukkanen, H., L. Rautiainen, E. Taulavuori y A. Hohtola. (2000). Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree physiol.* 20(7):467–475.

Leifert, C., J. Y. Ritchie y W. M. Waites. (1991). Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World J. Microb. Biot.* 7(4):452–469.

Ley, S. V., A. A. Denholm y A. Wood. (1993). The chemistry of azadirachtin. *Nat. Prod. Rep.*, 10(2):109–157.

Lynn, J. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *Plant Cell.* 5(10):1411–1423.

Martín, A. B., Y. Cuadrado, H. Guerra, P. Gallego, O. Hita, L. Martín, A. Dorado y N. Villalobos. (2000). Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Sci.* 154(2):143–151.

Merkle, S. A., W. A. Parrott y E. G. Williams. (1990). Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. En: Bhojwani, S. S. (Ed.). *Plant tissue culture: applications and limitations*. Elsevier. Amsterdam. Países Bajos. 67–101 pp.

Mordue, A. J. (2004). Present Concepts of the Mode of Action of Azadirachtin From Neem. En: Koul, O. y S. Wahab (Eds.). *Neem: Today and in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers. Londres. Reino Unido. 229–242 pp.

Mordue, A. J., U. K. Aberdeen, E. D. Morgan y A. J. Nisbet. (2010). Azadirachtin, a Natural Product in Insect Control. En: Gilbert, L. I. y S. S. Gill (Eds.). *Insect Control. Biological and Synthetic Agents*. Academic Press. Londres. Reino Unido. 185–203 pp.

Morgan, E. D. (2004). The Place of Neem Among Modern Natural Pesticides. En: Koul, O. y S. Wahab (Eds.). *Neem: Today and in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers. Londres. Reino Unido. 21–32 pp.

Morgan, E. D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.* 17(12):4096–4105.

Mukherjee, S., S. Garg y G. P. Talwar. (1999). Early post implantation contraceptive effects of a purified fraction of neem (*Azadirachta indica*) seeds, given orally in rats: possible mechanisms involved. *J. Ethnopharmacol.* 67(3):287–296.

Mulabagal, V. y H. S. Tsay. (2004). Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2(1):29–48.

Muralidharan, E. M. y A. F. Mascarenhas. (1989). *In vitro* Morphogenesis in *Azadirachta indica* A. Juss. and *Eucalyptus citriodora* Hook. En: Kukreja, A. K., A. K. Mathur, P. S. Ahuja y R. S. Thakur (Eds.). Tissue Culture and Biotechnology of medicinal and aromatic plants. Paramount Publishing House. Nueva Delhi. India. 49–55 pp.

Murashige, T. y F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15(3):473–497.

Murthy, B. y P. Saxena. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Plant Cell. Rep.* 17(6–7):469–475.

Nagin, S. y R. Vidya. (2014). *Azadirachta indica* (Neem) and Neem Limonoids as Anticancer Agents: Molecular Mechanisms and Targets. En: Oommen, O. V. y M. Radhakrishna (Eds). Perspectives in Cancer Prevention – Translational Cancer Research. Springer Science & Business Media. New York. USA. 45–60 pp.

Nanduri, S., S. S. Thunuguntla, V. K. Nyavanandi, S. Kasu, P. M. Kumar, P. S. Ram, S. Rajagopal, R. A. Kumar, D. S. Deevi, R. Rajagopalan y A. Venkateswarlu. (2003). Biological investigation and structure–activity relationship studies on azadirone from *Azadirachta indica* A. Juss. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13(22):4111–4115.

Natarajan, V., S. Pushkala, V. P. Karuppiah y P. V. Prasad. (2002). Anti dermatophytic activity of *Azadirachta indica* (neem) by *in vitro* study. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 45(3):311–313.

National Research Council. (1992). Neem: A tree for solving global problems. National Academy Press. Washington D.C. USA. 141 p.

Neelakandan, A. K. y K. Wang. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell. Rep.* 31(4):597–620.

Neuenschwander, B. y T. W. Baumann. (1992). A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell. Rep.* 10(12):608–612.

Neumann, K. H., A. Kumar y J. Imani. (2009). *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology. Basics and Application*. Springer Science & Business Media. Berlín. Alemania. 342 p.

Nigam, S. K., G. Misra y A. Sharma. (1994). Neem: A promising natural insecticide. *Applied Bot. Abstr.*, 14(1):35–46.

Ogbuewu, I., H. Odoemenam, H. Obikaonu, M. Opara, O. Emenalom, M. Uchegbu, I. Okoli, B. Esonu y M. Iloeje. (2011). The growing importance of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in agriculture, industry, medicine and environment: a review. *Res. J. Med. Plant*. 5(3):230–245.

Omar, S., J. Zhang, S. MacKinnon, D. Leaman, T. Durst, B. J. Philogene, J. T. Arnason, P. E. Sanchez-Vindas, L. Poveda, P. A. Tamez y J. M. Pezzuto. (2003). Traditionally-used antimalarials from the Meliaceae. *Curr. Top. Med. Chem.* 3(2):133–139.

Orozco, F., G. Sepulveda, G. Trejo, A. Zamilpa y M. Rodríguez. (2011). Oxygen limitations to grow *Azadirachta indica* cell culture in shake Flasks. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 10(3):343–352.

Orozco, F., y M. Rodríguez. (2007). Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 6(3):251–258.

Parida, M. M., C. Upadhyay, G. Pandya y A. M. Jana. (2002). Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol.* 79(2):273–278.

Parrotta, J. y A. Chaturvedi. (1994). *Azadirachta indica* A. Juss. neem, margosa. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. SO-ITF-SM-70. New Orleans, LA: U.S. 65–72 pp.

Parshad, O., P. Singh, M. Gardner, C. Fletcher, E. Rickards y E. Choo-Kang. (1994). Effect of aqueous neem (*Azadirachta indica*) extract on testosterone and other blood constituents in male rats: a pilot study. *West Indian Med. J.* 43(3):71–74.

Patel, S., K. Venkata, P. Bhattacharyya, G. Sethi y A. Bishayee. (2016). Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. *Semin. Cancer Biol.* 40(1):100-115.

Paul, R., M. Prasad y N. K. Sah. (2011). Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): a mini review. *Cancer Biol. Ther.* 12(6):467–476.

Phillips, G. C. (2004). *In vitro* morphogenesis in plants—recent advances. *In Vitro Cell. Dev-Pl.* 40(4):342–345.

Prakash, G. y A. K. Srivastava. (2005). Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures. *Process Biochem.* 40(12):3795–3800.

Prakash, G. y A. K. Srivastava. (2011). Integrated yield and productivity enhancement strategy for biotechnology production of azadirachtin by suspension culture of *Azadirachta indica*. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 6(1):129–137.

Prakash, G. y P. Srivastava. (2007). Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspensions culture. *Process Biochem.* 42(1):93–97.

Prakash, G., C. Emmanuel y A. K. Srivastava. (2005). Variability of azadirachtin in *Azadirachta indica* (Neem) and batch kinetics studies of cell suspensions culture. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10(3):198–204.

Punia, M. S., R. S. Dhillon, R. P. Saharan, K. S. Ahlawat y J. S. Pundeer. (2008). Tissue Culture: An Indispensable Tool in Neem Improvement. En: Singh K. K., S. Phogat, A. Tomar y R. S. Dhillon (Eds). *Neem. A Treatise*. I. K. International. Nueva Delhi. India. 128–145 pp.

Puri, H. S. (2003). *Neem: The Divine Tree Azadirachta indica*. CRC Press. Amsterdam. Países Bajos. 166 p.

Raizada, R. B., M. K. Srivastava, R. A. Kaushal y R. P. Singh. (2001). Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. *Food Chem. Toxicol.* 39(5):477–483.

Ramage, C. M. y R. R. Williams. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 38(2):116–124.

Ramírez-Villalobos, M. y E. de García. (2008). Obtainment of embryogenic cell suspensions from scalps of the banana CIEN-BTA-03 (*Musa* sp., AAAA) and regeneration of the plants. *Electron. J. Biotec.* 11(5):6–7.

Rao, S. R. y G. A. Ravishankarb. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20(2):101–153.

Raval, K. N., S. Hellwig, G. Prakash, A. Ramos-Plasencia, A. K. Srivastava y J. Biiichs. (2003). Necessity of a two-stage process for the production of azadirachtin-related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. *J. Biosci. Bioeng.* 96(1):16–22.

Reis, E., M. T. Batista y J. M. Canhoto. (2008). Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma.* 232(3–4):193–202.

Reyes, E. C., S. W. Valero y D. A. Garay. (2003). Estudio preliminar de las propiedades físicas de la especie *Azadirachta indica* (neem), procedente del estado Falcón (Venezuela). *Revista Forest. Venez.* 47(2):23–29.

Rocha, D. I., E. Kurczyńska, I. Potocka, D. A. Steinmacher y W. C. Otoni. (2016). Histology and Histochemistry of Somatic Embryogenesis. En: Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo (Eds.). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer International Publishing. Zug, Suiza. 471–494 pp.

Rodríguez, M., R. Festucci-Buselli, L. Campos y W. Campos. (2014). Azadirachtin biosynthesis induction in *Azadirachta indica* A. Juss cotyledonary calli with elicitor agents. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 57(2):155–162.

Rohmer, M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter y H. Sahm. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295(2):517–524.

Romero, C. y M. Vargas. (2005). Extracción del aceite de la semilla de neem (*Azadirachta indica*). *Ciencia.* 13(4):464–474.

Rout, G. R. (2005). *In vitro* somatic embryogenesis in callus cultures of *Azadirachta indica* A. Juss. – a multipurpose tree. *J. For. Res.* 10(4):263–267.

Sairam, M., G. Ilavazhagan, S. K. Sharma, S. A. Dhanraj, B. Suresh, M. M. Parida, A. M. Jana, K. Devendra y W. Selvamurthy. (2000). Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). *J. Ethnopharmacol.* 71(3):377–382.

Sajc, L., D. Grubisic y G. Vunjak-Novakovic. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochem. Eng. J.* 4(2):89–99.

Salehzadeh, A., A. Jabbar, L. Jennens, S. V. Ley, R. S. Annadurai, R. Adams y R. H. Strang. (2002). The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. *Pest Manag. Sci.* 58(3):268–276.

Salomón, J. (2014). Optimización de la producción de Azadiractina *in vitro* en suspensiones celulares de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Tesis de Pregrado. Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias y Tecnología, Carabobo, Venezuela. 93 p.

Santacruz-Ruvalcaba, F. y L. Portillo. (2009). Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Ind. Crops Prod.* 29(2):609–614.

Sarkar, D. y P. S. Naik. (2000) Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 60(2):139–149.

Saxena, N. y Y. Kumar. (2008). Chemistry of Azadirachtin and other Bioactive Isoprenoids from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). En: Singh K. K., S. Phogat, A. Tomar y R. S. Dhillon (Eds). *Neem. A Treatise*. I. K. International. Nueva Delhi. India. 208–231 pp.

Saxena, R. C. (2004). Neem for Ecological Pest and Vector Management in Africa: Outlook For The New Millennium. En: Koul, O. y S. Wahab (Eds.). *Neem: Today and in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers. Londres. Reino Unido. 43–64 pp.

Schmutterer, H. (2002). The Tree and its Characteristics. En: Schmutterer, H. (Ed). *The Neem Tree*. 2<sup>nd</sup> edition. The neem Foundation. Bombay. India. 1–34 pp.

Sepúlveda-Jiménez, G., H. Porta-Ducoing y M. Rocha-Sosa. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21(3):355–363.

Shanthi, K., L. Manimuthu y B. G. Singh. (1996). Genetic significance of late flowering forms in neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) as reflected by germination studies. *Indian For.* 122(3):263–264.

Sharma, V., S. Walia, J. Kumar, M. G. Nair y B. S. Parmar. (2003). An efficient method for the purification and characterization of nematocidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. *J. Agric. Food Chem.* 51(14):3966–3972.

Shekhawat, G. S., S. Mathur y A. Batra. (2009). Role of phytohormones and nitrogen in somatic embryogenesis induction in cell culture derived from leaflets of *Azadirachta indica*. *Biol. Plant.* 53(4):707–710.

Shrikhande, M., S. R. Thengane y A. F. Mascarenhas. (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Azadirachta indica* A. Juss. *In Vitro Cell. Dev. Pl.* 29(1):38–42.

Siddiqui, B. S., F. Afshan, Ghiasuddin, S. Faizi, S. N. Naqvi y R. M. Tariq. (2000). Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry.* 53(3):371–376.

Sidhu, O. P. y H. M. Behl. (1996). Seasonal variation in Azadirachtins in seeds of *Azadirachta indica*. *Cur. Sci.* 70(12):1084–1086.

Silva, G. M., A. C. F. Cruz, W. C. Otoni, T. N. S. Pereira, D. I. Rocha y M. L. da Silva. (2015). Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 51(5):539–545.

Silveira, V., A. M. de Vita, A. F. Macedo, M. F. R. Días, E. I. S. Floh y C. Santa-Catarina. (2013). Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 114(3):351–364.

Singh, M. y R. Chaturvedi. (2009). An efficient protocol for cyclic somatic embryogenesis in Neem (*Azadirachta indica* A Juss.). *Int. J. Environ. Sci. Eng.* 1(1):49–51.

Singh, M. y R. Chaturvedi. (2013). Somatic Embryogenesis in Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.): Current Status and Biotechnological Perspectives. En: Aslam, J., P. S. Srivastava y M. P. Sharma (Eds.). *Somatic embryogenesis and Gene expression*. Narosa Publishing House. Nueva Delhi. India. 35–55 pp.

Sivakumar, G., K. Yu y K. Paek. (2005). Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Eng. Life Sci.* 5(4):333–342.

Smertenko, A. y P. V. Bozhkov. (2014). Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. *J. Exp. Bot.* 65(5):1343–1360.

Solís-Ramos, L., A. Andrade-Torres, C. Salín, E. de la Serna, L. Carbonell, C. Oropeza y E. Castaño. (2012). Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants, Embryogenesis, Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/35967. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-in-recalcitrant-plants>.

Srivastava, S. y A. K. Srivastava. (2008). *In vitro* Azadirachtin Production. En: Ramawat, K. G. y J. M. Mérillon (Eds.). *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. Springer Science & Business Media. New York. USA. 243–255 pp.

Srivastava, S. y A. Srivastava. (2013). Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in Hairy Root culture of *Azadirachta indica*. *Appl. Biochem. Biotech.* 172(4):2286–2297.

Su, W. W., W. I. Hwang, S. Y. Kim y Y. Sagawa. (1997). Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. *Plant Cell. Tiss. Org.* 50(2):91–95.

Subapriya, R., R. Kumaraguruparan, S. K. Abraham y S. Nagini. (2004). Protective effects of ethanolic neem leaf extract on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Drug Chem. Toxicol.* 27(1):15–26.

Sujanya, S., B. P. Devi y I. Sai. (2008). *In vitro* production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. *J. Biosci.* 33(1):113–120.

Tan, Q. G. y X. D. Luo. (2011). Meliaceous Limonoids: Chemistry and Biological Activities. *Chem. Rev.* 111(11):7437–7522.

Tang, W. y R. J. Newton. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Sci.* 167(3):621–628.

Tepsuwan, A., P. Kupradinun y W. R. Kusamran. (2002). Chemopreventive Potential of Neem Flowers on Carcinogen-Induced Rat Mammary and Liver Carcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 3(3):231–238.

Thas, J. J. (2008). Siddha medicine—background and principles and the application for skin diseases. *Clin. Dermatol.* 26(1):62–78.

Thomas, T. y R. Chaturvedi. (2008). Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 93(1):1–14.

Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Mol. Biotechnol.* 37(2):169–180.

Tomar, A. y K. K. Singh. (2008). Neem: An Introduction. En: Singh K. K., S. Phogat, A. Tomar y R. S. Dhillon (Eds). *Neem. A Treatise.* I. K. International. Nueva Delhi. India. 3–15 pp.

Toonen, M. A., T. Hendriks, E. D. Schmidt, H. A. Verhoeven, A. Kammen y S. C. Vries. (1994). Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta.* 194(4):565–572.

Vanka, A., S. Tandon, S. R. Rao, N. Udupa y P. Ramkumar. (2001). The effect of indigenous Neem *Azadirachta indica* mouth wash on *Streptococcus mutans* and lactobacilli growth. *Indian J. Dent. Res.* 12(3):133–144.

Varela, C. W. (2010). La familia Meliaceae en los herbarios de Venezuela. Clave para los géneros venezolanos. *Acta Bot. Venez.* 33(1):137–150.

Vartak, V. D. y V. Ghate. (1990). Ethnobotany of Neem. *Biology India.* 1(1):55–59.

Villarroel, A. (2012). Optimización del sistema de propagación de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), acoplado a la producción de Azadiractina *in vitro*. Tesis de Pregrado. Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias y Tecnología, Carabobo, Venezuela. 111 p.

Wang, J. y R. Tan. (2002). Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium. *Biotech. Lett.* 24(14):1153–1156.

Wang, Y., F. Chen, Y. Wang, X. Li y H. Liang. (2014). Efficient Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Embryos of *Tapiscia sinensis* Oliv., an Endemic and Endangered Species in China. *Hort. Sci.* 49(12):1558–1562.

Yakkundi, S. R., R. Thejavathi y B. Ravindranath. (1995). Variation of azadirachtin content during growth and storage of neem (*Azadirachta indica*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 43(9):2517–2519.

Yanes, A., H. J. Finol y M. Hasegawa. (2004). Effects of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts from leaves on *Trypanosoma cruzi* growth and ultrastructure. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 36(2):149–154.

Yang, J., E. Seong, M. Kim, B. Ghimire, W. Kang, C. Yu y C. Li. (2010). Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) root explants. *Plant Cell. Tiss. Org.* 100(1):49–58.

Zhao, D., J. Xing, M. Li, D. Lu y Q. Zhao. (2001). Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 67(3):227–234.

Zhao, J., L. C. Davis y R. Verpoorte. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23(4):283–333.

Zhu, H. G., L. L. Tu, S. X. Jin, L. Xu, J. F. Tan, F. L. Deng y X. L. Zhang. (2008). Analysis of genes differentially expressed during initial cellular dedifferentiation in cotton. *Chinese Sci. Bull.* 53(23):3666–3676.

## XII. Anexos.

1. Estadística descriptiva aplicada a los tratamientos para la producción de azadiractina, considerando todas las semanas evaluadas.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
<b>Número de valores</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Mínimo</b>	12,16	12,75	11,35	13,87	12,37	14,15	12,96	11,81	12,02	13	14,53	12,89	13,07	12,12	11,49
<b>Mediana</b>	17,54	18,69	19,49	23,06	21,42	27,63	19,49	19	20,37	25,71	20,23	20,93	15,62	15,65	13,45
<b>Máximo</b>	36,47	36,82	38,29	44,54	48,94	52,68	39,69	41,54	41,57	42,03	41,96	42,52	35,81	36,23	33,47
<b>Media</b>	21,23	22,37	22,44	27,31	27,77	29,20	22,1	23,3	23,89	25,47	24,22	24,62	19,12	19	17,68
<b>Desviación estándar</b>	9,878	9,878	10,48	13,46	15,17	15,36	10,73	11,76	11,54	11,84	11,6	11,67	9,395	9,783	9,143
<b>Error estándar de la media</b>	4,418	4,418	4,687	6,021	6,783	6,868	4,798	5,26	5,161	5,296	5,188	5,218	4,201	4,375	4,089
<b>p valor para la prueba de normalidad (Kolmogórov-Smirnov)</b>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0019	0,0112	0,1731
<b>Pasada la prueba de normalidad? (alfa &lt; 0.05)</b>	Si	No	No	Si											
<b>Resumen del p valor</b>	Ns	**	*	ns											

**ns: No hay diferencias significativas. \*: Existen diferencias significativas.**

2. Estadística descriptiva aplicada a los tratamientos para la producción de azadiractina, considerando sólo los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
<b>Número de valores</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Mínimo</b>	35,63	35,53	37,62	43,91	46,22	51,35	35,74	40,56	40,98	38,78	40,87	41,61	35,42	35,42	31,97
<b>Mediana</b>	36,58	37,62	38,04	44,96	48,21	52,51	39,83	41,08	41,71	41,29	41,71	42,45	35,84	36,47	34,59
<b>Máximo</b>	37,00	38,67	38,88	48,00	50,31	53,55	40,66	41,92	42,24	44,02	42,34	44,02	36,89	36,68	36,79
<b>Media</b>	36,35	37,56	38,25	45,32	48,25	52,53	38,92	41,25	41,59	41,53	41,69	42,80	35,95	36,16	34,35
<b>Desviación estándar</b>	0,5807	1,291	0,5496	1,587	1,457	0,8997	1,932	0,5575	0,5415	1,892	0,5565	1,020	0,5835	0,5446	1,799
<b>Error estándar de la media</b>	0,2597	0,5775	0,2458	0,7097	0,6516	0,4024	0,8640	0,2493	0,2422	0,8460	0,2489	0,4564	0,2610	0,2435	0,8046
<b>p valor para la prueba de normalidad (Kolmogórov-Smirnov)</b>	0,2	0,2	0,2	0,133	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,109	0,2
<b>Pasada la prueba de normalidad? (alfa &lt; 0.05)</b>	Si														
<b>Resumen del p valor</b>	ns														

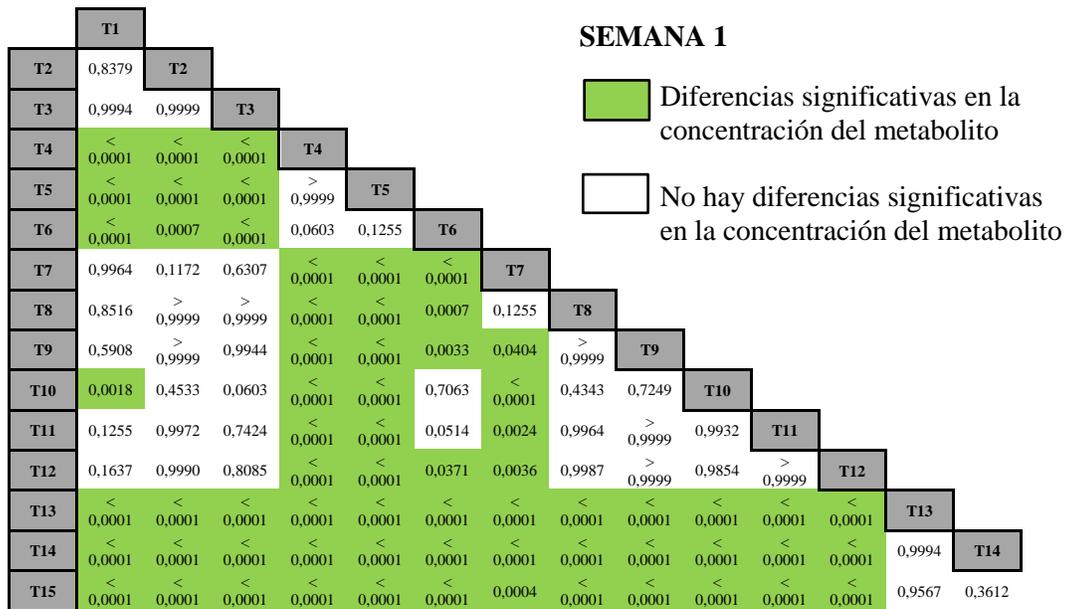
**ns: No hay diferencias significativas.**

3. Prueba de ANOVA de dos vías (muestras repetidas) para evaluar el efecto de los dos factores considerados (“tratamiento” y “tiempo”) en la producción de azadiractina durante las 5 semanas.

Fuente de variación	Sum. de Cuad.	Grad. de libert.	Cuad. de la Media	Porcentaje (%) total de variación	p valor	Resumen del p valor	Significativo?
Tratamiento	2302	14	164,5	8,565	< 0,0001	****	Si
Tiempo	22547	4	5637	83,87	< 0,0001	****	Si
Interacción	1658	56	29,61	6,159	< 0,0001	****	Si

\*: Existen diferencias significativas.

4. Prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada para los 15 tratamientos durante la primera semana de estudio. En la figura se muestran los p valor para cada comparación.







9. Prueba de ANOVA de una vía para evaluar la producción de azadiractina, considerando sólo los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra).

Fuente de variación	Sum. de Cuad.	Grad. de libert.	Cuad. de la Media	F	p valor	Resumen del p valor	Significativo?
Entre grupos	1731	14	123,7	88,76	< 0,0001	****	Si
Dentro de grupos	83,59	60	1,393				
Total	1815	74					

\*: Existen diferencias significativas.

10. Prueba de comparación múltiple de Tukey, realizada para los 15 tratamientos, considerando los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra). Del lado derecho de la tabla, se muestran los p valor para cada comparación, estando remarcados los tratamientos con diferencias significativas en la concentración del metabolito

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
T1		0,9452	0,4196	0,0001	0,00015	0,0001	0,0624	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	1	1	0,3492
T2	2,303		0,9998	0,0001	0,00015	0,0001	0,8783	0,0007	0,0002	0,0008	0,0002	0,0001	0,6891	0,8529	0,0053
T3	3,614	1,31		0,0001	0,00015	0,0001	0,9998	0,0127	0,0031	0,0138	0,002	0,0002	0,1514	0,2711	0,0003
T4	17	14,69	13,38		0,01635	0,0001	0,0001	0,0002	0,0006	0,0002	0,0009	0,0774	0,0001	0,0001	0,0001
T5	22,55	20,25	18,94	5,559		0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
T6	30,66	28,35	27,04	13,66	8,101		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
T7	4,884	2,581	1,271	12,11	17,67	25,77		0,1421	0,0462	0,1514	0,0314	0,0004	0,0138	0,0314	0,0002
T8	9,292	6,989	5,678	7,704	13,26	21,36	4,408		1	1	1	0,7436	0,0001	0,0001	0,0001
T9	9,927	7,624	6,314	7,068	12,63	20,73	5,043	0,6353		1	1	0,9452	0,0001	0,0001	0,0001
T10	9,252	6,949	5,639	7,743	13,3	21,4	4,368	0,0397	0,675		1	0,7258	0,0001	0,0001	0,0001
T11	10,13	7,823	6,512	6,87	12,43	20,53	5,242	0,8339	0,1985	0,8736		0,9733	0,0001	0,0001	0,0001
T12	12,23	9,927	8,617	4,765	10,32	18,42	7,346	2,938	2,303	2,978	2,105		0,0001	0,0001	0,0001
T13	0,7545	3,058	4,368	17,75	23,31	31,41	5,639	10,05	10,68	10,01	10,88	12,98		1	0,7076
T14	0,3574	2,66	3,971	17,35	22,91	31,01	5,242	9,649	10,28	9,61	10,48	12,59	0,3971		0,5144
T15	3,772	6,075	7,386	20,77	26,33	34,43	8,657	13,06	13,7	13,02	13,9	16	3,018	3,415	

11. Prueba de ANOVA de dos vías (sin muestras repetidas), considerando sólo los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra), para evaluar el efecto de los dos factores considerados (“precursor” y “tipo de MS”) en la producción de azadiractina.

Fuente de variación	Sum. de Cuad.	Grad. de libert.	Cuad. de la Media	Porcentaje (%) total de variación	P valor	Resumen del P valor	Significativo?
Precursor	1553	4	388,3	85,58	< 0,0001	****	Si
Tipo de MS	70,21	2	35,10	3,869	< 0,0001	****	Si
Interacción	107,9	8	13,48	5,944	< 0,0001	****	Si

\*: Existen diferencias significativas.

12. Prueba de comparación múltiple de Tukey, considerando los datos del metabolito producido en la segunda semana (+ réplicas extra). En la tabla se agrupan los tratamientos según los precursores utilizados, comparando los resultados de los subgrupos con un tipo de medio MS distinto.

<b>Prueba de comparación múltiple de Tukey</b>	<b>Diferencias en la media</b>	<b>Significativo?</b>	<b>Resumen</b>	<b>P valor ajustado</b>
<b><u>Sin precursores</u></b>				
Medio MS 40:20 vs. Medio MS 50:10	-1,216	No	ns	0,2415
Medio MS 40:20 vs. Medio MS nítrico	-1,908	Si	*	0,0347
Medio MS 50:10 vs. Medio MS nítrico	-0,6916	No	ns	0,6258
<b><u>10mg/L Acetato de sodio + 10mg/L Escualeno</u></b>				
Medio MS 40:20 vs. Medio MS 50:10	-2,935	Si	***	0,0006
Medio MS 40:20 vs. Medio MS nítrico	-7,211	Si	****	< 0,0001
Medio MS 50:10 vs. Medio MS nítrico	-4,276	Si	****	< 0,0001
<b><u>10mg/L Acetato de sodio + 50mg/L Escualeno</u></b>				
Medio MS 40:20 vs. Medio MS 50:10	-2,326	Si	**	0,0078
Medio MS 40:20 vs. Medio MS nítrico	-2,662	Si	**	0,0021
Medio MS 50:10 vs. Medio MS nítrico	-0,3354	No	ns	0,8949
<b><u>50mg/L Acetato de sodio + 10mg/L Escualeno</u></b>				
Medio MS 40:20 vs. Medio MS 50:10	-0,461	No	ns	0,8111
Medio MS 40:20 vs. Medio MS nítrico	-1,572	No	ns	0,0972
Medio MS 50:10 vs. Medio MS nítrico	-1,111	No	ns	0,3037
<b><u>50mg/L Acetato de sodio + 50mg/L Escualeno</u></b>				
Medio MS 40:20 vs. Medio MS 50:10	-0,2094	No	ns	0,9576
Medio MS 40:20 vs. Medio MS nítrico	1,593	No	ns	0,0915
Medio MS 50:10 vs. Medio MS nítrico	1,803	Si	*	0,0487

**ns: No hay diferencias significativas. \*: Existen diferencias significativas.**