

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PRODUCCIÓN DE LIMONOIDES EN CULTIVOS *in vitro* DE *Azadirachta indica*

T E S I S
Que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A:
I.I.A. ALEJANDRO CRUZ HERNANDEZ

ASESOR:
Dra. Jacqueline Capataz Tafur.

Co-ASESOR:
Dr. Julián Mario Peña Castro

San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca

2015

La Maestría en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 003131



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 21 de Septiembre de 2015

I.I.A. Alejandro Cruz Hernández

Estudiante de la Maestría en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado en Maestro en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	Presidente
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre	Universidad Autónoma de Aguascalientes	Vocal
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedra-UNPA	Secretario
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo	Cátedra-UNPA	1er Suplente
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.



Dr. Mariño Valera Zaragoza
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Atentamente

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
VoBo.



Ccp. Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Directora de tesis
Ccp. Dr. Julián Mario Peña Castro, Co-director de tesis
Ccp. L.P. Yesenia Barrientos Arenal, Jefa de Servicios Escolares
Ccp. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial. C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria. C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 03 de Noviembre de 2015

L.P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del Ing. Alejandro Cruz Hernández, matrícula 12140006, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Producción de limonoides en cultivos *in vitro* de *Azadirachta Indica***" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular me despido quedando atento ante cualquier duda o aclaración.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dr. Mario Valera Zaragoza
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Ccp. Ing. Alejandro Cruz Hernández.
Ccp. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial. C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales y de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur. La investigación fue realizada con financiamiento del Programa de Mejoramiento del Profesorado (Proyecto PROMEP/ 103.5/ 12/ 7959) y del Fondo de Ciencia Básica del CONACYT (CB 2012-01 No. 183958).

Para la realización de los estudios se contó con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Numero de becario 493156) y con beca de terminación del Proyecto CB 2012-01 No. 183958 (Numero de becario 17033).

DEDICATORIA

Dedico este triunfo a mi familia. En especial mi madre, Luz Guadalupe, a mi padre Gelasio y mi hermano Néstor Noel quienes me han brindado su apoyo para poder cumplir con mis objetivos, por creer en y estar al pendiente de mí.

A la Dra. Jacqueline Capataz por su apoyo incondicional y la paciencia que me brindó, además por ser como una madre.

A mis hermanos: Hoshi, Kary, Gustavo por estar siempre al pendiente del Mogüi, y darle consejos para que no haga las cosas mal.

A mis amigos de maestría: Monse, Marlene, Sandy, Liz, Dianita, Amilcar, Pachis, JJ-33 por convivir estos dos años y aguantar mi genio, por las pláticas muy amenas en todos los ámbitos de la vida.

A mis amigas Alyn, Sara, Chel, M. Concepción, Lupe, al Dr. Magaña a mis compañeros de los laboratorios. A las chicas de Alimentos. A todos por compartir momentos inolvidables en este tiempo.

A Any, por arrancarme sonrisas en momentos difíciles, por darle la vuelta a los problemas, por hacerme olvidar y creer que todo se puede cuando se quiere.

A mi Tía Ade por sus consejos, a mi niña Yammii por brindarme su confianza desde el primer momento y por haber convivido conmigo.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma me ayudaron a culminar este trabajo

AGRADECIMIENTOS

Un sincero agradecimiento a la Dra. Jacqueline Capataz Tafur por su apoyo en este transcurso, por las sugerencias e ideas y su respaldo, y por ser como una madre en este tiempo.

Al Dr. Julián Peña Castro por asesorarme en la parte molecular, y por los tips que fueron de mucha ayuda. De igual manera a la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa por prestarnos sus equipos de Biología Molecular y sus estupendas clases.

Al Dr. Enrique Villalobos Amador por prestarnos su laboratorio en la primera etapa de este trabajo, que fue de mucha importancia para el desarrollo del mismo.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch por recibirme en su equipo de trabajo durante la estancia, y por estar al pendiente del procedimiento en esta investigación.

Al Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo por estar al pendiente de nosotros, a la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia por los consejos y sus pláticas. A la Dra. Yenny Gómez por ser parte de este comité tutorial.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido durante la realización de la tesis.

Por qué podemos lo hacemos...

En el transcurso de la vida, Dios me ha puesto tan grandes personas, a quienes agradezco de todo corazón, por su apoyo, animo, compañía y amistad en las diferentes estepas de mi vida. Sin importar donde estén y si algún día llegasen a leer estas palabras, quiero darles las gracias por estar ahí conmigo y que Dios los bendiga por siempre.

Axel-Mogüiwara

PRODUCTOS DE ESTE TRABAJO FUERON RESENTADOS EN LOS SIGUIENTES CONGRESOS:

2014. Cruz Hernández Alejandro, Osorio-Ramírez Karina, Martínez Galero Nelda Xanath, Capataz-Tafur Jacqueline. RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D de limonoides obtenidos mediante cultivos celulares *in vitro* de *Azadirachta indica* A. Juss. Oral. XIII Congreso Internacional y XIX Congreso Nacional Ciencias Ambientales: una necesidad ante el cambio climático. 11-13 de Junio de 2014. Acapulco, Guerrero. México.

2014. Cruz-Hernández Alejandro, Sánchez Paul Mauricio, Paniagua-Vega David, Peña-Castro Julián Mario, Capataz-Tafur Jacqueline. Producción *in vitro* de azadiractina en cultivos de callos de *Azadirachta indica* A. Juss. Oral. XI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal y VI Conferencia de Desarrollo Agropecuario y Sostenibilidad. 09 -11 de Abril. Cayo Santa María. Cuba.

2014. Cruz-Hernández, Alejandro, Pérez Molphe-Balch, Eugenio, Sánchez Ocampo, Paul Mauricio, Capataz-Tafur, Jacqueline. Cultivo de raíces transformadas de *Azadirachta indica* A. Juss. Poster. XI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal y VI Conferencia de Desarrollo Agropecuario y Sostenibilidad. 09 -11 de Abril. Cayo Santa María. Cuba.

2014. Osorio-Ramírez Karina, **Cruz Hernández Alejandro**, Martínez Galero Nelda Xanath, Capataz-Tafur Jacqueline. Identificación por RMN de azadiractina obtenida mediante cultivos celulares *in vitro* de *Azadirachta indica* A. Juss. Poster. Simposio de Resonancia Magnética Nuclear. 21-24 de Enero de 2014. México D.F. México.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	14
ABSTRACT	15
I.-INTRODUCCIÓN	16
II-. MARCO TEÓRICO	17
2.1.-Azadirachta indica A. Juss.....	17
2.2.- Limonoides.....	18
2.3.- La ruta biosintética.....	19
2.4.-Cultivo de tejidos vegetales	22
2.5.-Producción de limonoides en cultivos <i>in vitro</i> en <i>A. indica</i>	24
2.6.-Variación Somaclonal	26
2.6.1.- Tipos de variación somaclonal.....	26
2.6.1.1.-Variación epigenética	26
2.6.1.2.-Variación genética	28
2.6.2.- Factores que inducen variación somaclonal	28
2.6.2.1.- Tipos de cultivo <i>in vitro</i>	28
2.6.2.2.- Edad del cultivo y subcultivos	29
2.6.2.3.-La composición del medio del cultivo.....	29
2.6.3.1.-Bandas de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPDs).....	30
2.6.3.2.-Polimorfismo de longitud de bandas de restricción (RFLP).....	32
2.6.3.3.-Amplificación de bandas de longitud polimórfica (AFLP)	32
2.6.4.-Estudios de variación somaclonal en <i>A. indica</i>	35
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV.-HIPÓTESIS.....	37
V- OBJETIVOS.....	37
5.1-Objetivo General	37
5.2-Objetivos Específicos.....	37
VI.- METODOLOGÍA	38
6.1.-Material vegetal.....	38
6.2.-Método de desinfección	38
6.3.-Inducción de callos.	38
6.4.- Cinética de crecimiento de los callos.	39
6.5.-Establecimiento de suspensiones celulares.....	40
6.6.- Cinéticas de crecimiento en suspensiones celulares.....	40
6.6.1.-Biomasa y parámetros cinéticos	41
6.6.2.-La viabilidad celular.....	41
6.6.3.- Consumo de sustrato	42
6.7.- Análisis químico.	42
6.7.1.- Preparación de extractos de los cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. indica</i>	42
6.7.2.-Perfiles cromatográficos en capa fina de los extractos de <i>A. indica</i> ...	43
6.7.3.-Cuantificación de AZRL por colorimetría	43
6.8.- Extracción de ADN de los cultivos <i>in vitro</i>	44

6.8.1.-Análisis de RAPD (amplificación del ADN polimórfico al azar)	45
6.8.1.1.-Preparación de los cebadores	45
6.8.1.2.-Amplificación RAPD-PCR	46
6.9.-Análisis estadístico.	47
VII.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1.-Establecimiento de cultivo de callos	48
7.2.-Cinetica de callos friables	51
7.3.-Análisis químicos de limonoides en callos.	53
7.4.- Análisis molecular.	54
7.4.1.- Análisis RAPD en cultivos de callos de hojas.	54
7.4.2- Análisis RAPD en cultivos de callos provenientes de semillas	58
7.4.3- Relación de los reguladores de crecimiento vegetal con respecto a la variación somaclonal y la producción de AZRL en cultivos <i>in vitro</i> de callos de <i>A. indica</i>	62
7.5.- Suspensiones Celulares	64
7.6.- Análisis químicos de limonoides en suspensiones celulares	65
7.7.- Cinética de crecimiento y producción de AZRL en suspensiones celulares.....	67
7.8.- Análisis molecular	70
7.8.1. Variación somaclonal de suspensiones celulares provenientes de callos de hojas	70
7.8.2.- Variación somaclonal de suspensiones celulares provenientes de callos de semillas.....	74
7.8.3.- Relación de la variación somaclonal con respecto a la producción de AZRL con diferentes tipos de reguladores de crecimiento vegetal.	78
VIII.-CONCLUSION.....	79
IX.- RECOMENDACIONES.....	80
X. – BIBLIOGRAFÍA	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (neem).....	17
Figura 2.-Principales limonoides,).	19
Figura 3.-Propuesta de la ruta biosintética para azadiractina.....	22
Figura 4.-Concentraciones relativas de auxinas y citocininas requeridas para el crecimiento y morfogénesis en CCV.....	24
Figura 5.-Metilación de ADN	27
Figura 6.-Técnica molecular RAPD-PCR.	31
Figura 7.-Técnica molecular RFLP.....	32
Figura 8.-Técnica molecular AFLP.....	33
Figura 9.-Árbol del neem.....	38
Figura 10.-Curva de calibración de sacarosa.....	42
Figura 11.-Curva de calibración de azadiractina..	44
Figura 12.-Respuesta de callos provenientes de hojas.....	48
Figura 13.-Callos provenientes de semillas.....	49
Figura 14.-Cinética de crecimiento de callos.	52
Figura 15.- Perfil cromatografico revelado con vainillina: ácido sulfúrico.	53
Figura 16.-Perfiles RAPD de callos provenientes de hojas.....	56
Figura 17.-Dendograma de callos provenientes de hojas basado en Nei 57	57
Figura 18.-Perfiles RAPD de callos provenientes de semillas.....	60
Figura 19.-Dendograma de callos de semillas basado en Nei a madre.	61
Figura 20.-Suspensiones Celulares	65
Figura 21.-Células de <i>A. indica</i> viables en división activa	65
Figura 22.-Perfil cromatográfico de suspensiones celulares, revelado con vainillina: ácido sulfúrico.	66
Figura 23.-Cinética de crecimiento, consumo de sacarosa y de producción de AZRL en suspensiones celulares de <i>A. indica</i>	68
Figura 24.-Perfiles RAPD de suspensiones de callos de hojas.....	72
Figura 25.-Dendograma de suspensiones celulares provenientes de callos de hojas basado en Nei´s	73
Figura 26.-Perfiles RAPD de suspensiones de callos de semillas	76
Figura 27.-Dendograma de suspensiones celulares provenientes de callos de semillas basado en Nei´s.....	77
Figura 28.- Análisis de RAPD.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Clasificación Taxonómica.....	18
Tabla 2.-Producción de AZRL y azadiractina en diferentes tipos de cultivos <i>in vitro</i>	25
Tabla 3.-Estudios de variación somaclonal en cultivos <i>in vitro</i> de callos usando distintas técnicas	34
Tabla 4.-Diseño de tratamientos con el medio basal MS.	39
Tabla 5.-Cebadores polimórficos degenerados para técnica de RAPD	45
Tabla 6.-Mezcla para amplificación de PCR-RAPD	46
Tabla 7.-Condiciones para el programa de PCR.....	46
Tabla 8.-Respuestas de callos provenientes de hojas de <i>A. indica</i>	49
Tabla 9.-Tipos de respuesta provenientes de semillas de <i>A. indica</i>	50
Tabla 10.-Concentración de AZRL en callos de <i>A. indica</i>	54
Tabla 11.-Análisis RAPDs de los callos provenientes de hojas.....	55
Tabla 12.-Identidad genética de Nei´s.....	58
Tabla 13.-Los cebadores utilizados para el análisis RAPD de callos de provenientes de semillas y las características de banda obtenidos para los callos de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores y semillas como planta madre.	59
Tabla 14.-Identidad genética de Nei´s.....	62
Tabla 15.-Relación de RCV con respecto a la variación somaclonal y producción de AZRL en callos de <i>A. indica</i>	63
Tabla 16.-Producción de AZRL en cultivos celulares de <i>A. indica</i>	66
Tabla 17.-Los cebadores utilizados para el análisis RAPD y las características de banda obtenidos de los cultivos en suspensión de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores y hojas como planta madre.....	71
Tabla 18.-Identidad genética de Nei´s de suspensiones de callos de hojas	73
Tabla 19.-Los cebadores utilizados para el análisis RAPD y las características de banda obtenidos para los cultivos en suspensiones de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores y semillas como planta madre.....	75
Tabla 20.-Identidad genética de Nei´s de suspensiones de callos de semillas	77
Tabla 21.-Relación de RCV con respecto a la variación somaclonal y producción de AZRL en suspensiones celulares	78

ABREVIATURAS

ABS	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplificación de bandas de longitud polimórfica
AIA	Ácido Indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
AZA	Azadiractina
AZRL	Limonoides relacionados a la azadiractina
BAP	6-Benziloamilpurina
BSA	Albumina de suero bovino
CCV	Cultivo de células vegetales
CoA	Acetil-coenzima A
DMAPP	Pirofosfato de metilalilo
DNMTs	ADN metiltransferasas
DXP	1-desoxi-D-xilulosa-5 fosfato
GPP	Geranil difosfato
HRMG	3-hidroxi-metilglutaril-coenzima A
IBA	Ácido indolbutírico
IDI	IPP isomerasa
IPP	isopentil difosfato
MeOH	Metanol
MS	Murashige y Skoog
MVA	Ácido Mevalónico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Bandas de ADN polimórficos amplificados al azar
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
RFLP	Polimorfismo de longitud de restricción
SAM	S-adenosilmetionina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
td	Tiempo de duplicación
TLC	Cromatografía en capa fina
μ	Velocidad específica de crecimiento

RESUMEN

Azadirachta indica A. Juss, comúnmente conocido como Neem, produce más de 300 metabolitos secundarios, un tercio de los cuales son limonoides de interés comercial y científico por sus efectos biológicos. El cultivo *in vitro* de *A. indica* es un sistema de amplio de estudio para la producción de limonoides (AZRL). El objetivo fue evaluar la variación somaclonal y la producción de limonoides en cultivos *in vitro* de *A. indica* bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RVC). Para ello, se probaron 5 tratamientos de combinaciones de RCV: T₁ (ANA 2.0 mg/L y BAP 1.0 mg/L), T₂ (ANA 1mg/L y Kin 0.5 mg/L), T₃ (IAA 0.2 mg/L y BAP 0.1 mg/L), T₄ (IBA 8.0 mg/L y BAP 4.0 mg/L), y T₅ (IBA 4.0 mg/L y BAP 1.0 mg/L), y 1 tratamiento sin reguladores como control, (T₀). Para la inducción de callos se utilizaron como explantes hojas juveniles y semillas. Los tratamientos T₁, T₄ y T₅ produjeron callos de tipo friable, mientras que los callos generados en los tratamientos T₂ y T₃ fueron rizogénicos, en los dos tipos de explantes. La producción de AZRL fue máxima en los callos proveniente de semillas generados en el tratamiento T₅ (819.24±0.45 mg AZRL/g. P.S). A partir de los callos originados de los explantes de hojas y semillas en los tratamientos T₁ T₄ y T₅, se establecieron suspensiones celulares, siendo en el tratamiento T₅ donde se alcanzó la mayor producción de AZRL (256.45 mg AZRL/L). La variación somaclonal de los cultivos de callos y suspensiones celulares fue analizada mediante RAPDs. Los callos provenientes de hojas juveniles y semillas mostraron un polimorfismo del 78.8% y 90.8% respectivamente, siendo el cebador OPQ-06 el que mostró mayor número de bandas en ambos casos. Mientras que la variación somaclonal en las suspensiones celulares de hojas y semillas fue de 85.5 y 87.1% respectivamente, siendo los cebadores OPQ-10 y OPA-05 en las suspensiones de hojas y OPQ-06 y OPQ-10 para las suspensiones de semillas los que mostraron mayor polimorfismo. Por consiguiente, los cultivos *in vitro* de *A. indica* presentaron variación tanto somaclonal como en la producción de AZRL en función de la combinación de RCV.

ABSTRACT

Azadirachta indica A. Juss, commonly known as Neem, produces more than 300 secondary metabolites, one third effects are limonoids commercial and scientific interest because their biological effects. *In vitro* culture of *A. indica* is a comprehensive system study for the production of limonoids (AZRL). The aim of this study was to evaluate the variation somaclonal and production of AZRL in *A. indica in vitro* cultures under different combinations of plant growth regulators (PGR). For this, 5 treatments of RCV combinations were used T₁ (ANA 2.0 mg/L and BAP 1.0 mg/L), T₂ (ANA 1mg/L and Kin 0.5 mg/L), T₃ (IAA 0.2 mg/L and BAP 0.1 mg/L), T₄ (IBA 8.0 mg/L and BAP 4.0 mg/L); and T₅ (IBA 4.0 mg/L and BAP 1.0 mg/L),, and one control treatment without regulators (T₀). For callus induction, juvenile leaves and seeds were used as explants. The treatments T₁, T₄ and T₅ produced friable callus type in the two types of explants while in T₂ and T₃ generated rizogenic callus. AZRL production was highest in seeds callus in the T₅ treatment (819.24 ± 0.45 mg AZRL/g. D.W). Cell suspension cultures were established from callus originated from explants leaves and seed in T₁ T₄ and T₅, being in T₅ where did reach the highest production of AZRL (256.45 mg AZRL L). Somaclonal variation in callus and cell suspension culture were analyzed by RAPDs. Callus cultures from juvenile leaves and seeds showed a polymorphism of 78.8% and 90.8% respectively, primer OPQ-06 showed the highest number of bands in both cases. Somaclonal variation in cell suspensions and seed leaves was 85.5 and 87.1% respectively. Primers OPQ-10 and OPA-05 showed greater polymorphism in suspensions from leaves while OPQ-10 and OPQ-06 in seed suspension. Therefore, *in vitro* cultures of *A. indica* presented variation both somaclonal as the production AZRL in function of the combination of PGR.

I.-INTRODUCCIÓN

Azadirachta indica A. Juss se conoce como el árbol del neem o también margosa. Produce más de 300 metabolitos secundarios, un tercio de los cuales son tetranortriterpenoides (limonoides) de interés comercial y científico por sus efectos biológicos (David *et al.*, 2000). Cada parte del árbol tiene propiedades medicinales de interés comercial (Biswas *et al.*, 2002) como actividad anticancerígena, antialérgica, antiséptico, nematocida, insecticida y antimalaria (Stoney, 1997; Raveendra *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004). Los limonoides se encuentran principalmente en semillas y hojas, y su principal compuesto es la azadiractina (C₃₅H₄₄O₁₆), presente en un 0.2–0.6 % en base seca (Orozco-Sánchez y Rodríguez-Monroy 2007). Se han identificado 9 isómeros de esta molécula (Shidu *et al.*, 2003). También presentan otros limonoides estructuralmente relacionados con la azadiractina, lo que podría explicar los efectos *in vivo* para el control de microorganismos e insectos (Kumar *et al.*, 1996). Por lo anterior, se han buscado estrategias biotecnológicas como el cultivo *in vitro* para la producción de estos compuestos.

Se han desarrollado medios de cultivos y propuesto algunas condiciones adecuadas de operación en el establecimiento de cultivos *in vitro* de *A. indica* para la producción de limonoides (Capataz, 2005). Sin embargo, las concentraciones de limonoides son muy variables, por ejemplo, en cultivos de células en suspensión a nivel de matraces, las concentraciones de azadiractina varían entre 0.028 – 0.30% en base seca.

De esta manera, es importante seleccionar un tipo de cultivo (callos, células en suspensión) que presenten baja variabilidad epigenética en las líneas celulares y alta reproducibilidad para la producción de limonoides principalmente azadiractina. Así, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la variación en la producción de limonoides y somaclonal en cultivos *in vitro* de *Azadirachta indica* bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal.

II-. MARCO TEÓRICO

2.1.-*Azadirachta indica* A. Juss

Azadirachta indica A. Juss (neem) es un árbol que pertenece a la familia Meliaceae (Tabla 1), es originaria de la India, localizada en el sur y sureste de Asia, y crece en lugares tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Benge, 1989). El árbol del neem (Figura 1) crece recto y alcanza un grosor hasta 2.5 m, la corteza es de color gris rojizo, puede vivir por más de 200 años. La hoja es peciolada de forma aserrada y de alrededor de 7 a 10 cm de largo, y ancho de 3 a 4 cm. La flor es pequeña aproximadamente de 5mm, de color blanco, crema o amarillenta, es bisexual y crece en racimos de hasta 22 cm de largo de manera axilar. El fruto es una drupa elipsoidal lisa de 1.4 a 2.4 cm de largo producido en racimos; el color de la cascara es al inicio de su formación verde con endocarpio blanco y duro, y al madurar se torna amarillenta.



Figura 1.-*Azadirachta indica* A. Juss (neem) de 5 años de edad (Tomada en la Universidad del Papaloapan por Alejandro Cruz Hernández)

De acuerdo al reporte de Biswas *et al.* (2002), *A. indica* se clasifica de la siguiente manera.

Tabla 1.-Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Trachaeophyta
División:	Pterophyta
Subdivisión:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledonea
Orden:	Geraniales
Familia:	Meliaceae
Subfamilia:	Melioideae
Género:	<i>Azadirachta</i>
Especie:	<i>Azadirachta indica</i>

2.2.- Limonoides

El árbol del neem es conocido por sus propiedades medicinales (Biswas *et al.*, 2002) y por ser una fuente importante de triterpenoides (Kraus, 1995). *A. indica* produce más de 300 metabolitos secundarios, y sólo un tercio de estos metabolitos son limonoides de gran interés biológico (Figura 2, David *et al.*, 2000) y que son compuestos homogéneos estéreo-químicamente con una estructura derivada de un esqueleto 4, 4, 8,-trimetil-17-furanilesteroides como precursor (Roy y Saraf, 2006). Los limonoides son la clase más representativa de metabolitos secundarios en la familia de meliáceas (Ruberto *et al.*, 2002). Uno de los más conocidos es la azadiractina, se le considera como un agente de control biológico a causa de su baja toxicidad en mamíferos (Taiz y Zeiger, 2002). De esta molécula se han identificado 9 isómeros (azadiractina A y B), y se ha demostrado que es efectiva contra 200 especies de insectos (Sidhu *et al.*, 2003). Otros limonoides producidos por *A. Indica* tienen aplicaciones en diferentes campos de estudio; por ejemplo el meliantrol tiene efecto antimalario, el deacetil azadiractinol tiene actividad antihormonal y paraliza el sistema digestivo de algunos insectos (Royal Botanic Gardens, 2009).

El uso de azadiractina y otros terpenoides tienen un gran potencial para el control de plagas y son un medio eficaz a concentraciones relativamente bajas sin contaminar el ambiente (Schmutterer, 1990). Los limonoides del árbol de neem han llamado la atención de los investigadores debido a la citotoxicidad que presenta contra líneas celulares de cáncer humano (Harish *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante resaltar que en el proceso de extracción de Aza a partir de semillas presentan problemas; tales como la variación en el contenido de azadiractina debido a la variabilidad genética y la colección de semillas de diferentes regiones geográficas y climáticas (Kumar, 1997).

La necesidad de producir de forma homogénea y controlada de este metabolito ha llevado a investigaciones a interesarse en el cultivo de células vegetales.

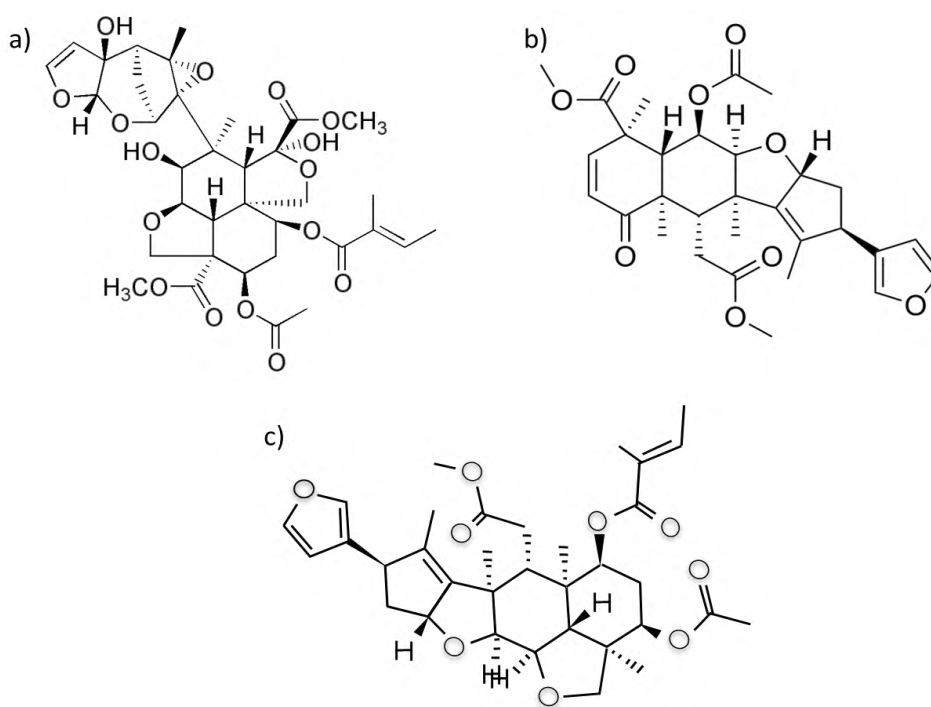


Figura 2.-Principales limonoides, a) azadiractina, b) nimbina, c) salanina. (Koul *et al.*, 2004).

2.3.- La ruta biosintética

La biosíntesis de los terpenoides puede darse por dos rutas, la ruta citoplásmica del mevalonato (MVA) y la ruta plasmídica de la 1-dioxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP).

La primera se considera como la vía universal para la síntesis de isopentil difosfato (IPP) y de dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (León y Guevara-García, 2007), que inicia a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-coenzima A (CoA) por la acción de tres enzimas que producen MVA, que es el cebador intermediario de esta vía. A través de tres enzimas adicionales, el MVA se convierte a IPP y la enzima IPP isomerasa (IDI) utiliza este compuesto para producir el isómero DMAPP. De ciertos estudios de la vía mevalónica destaca la identificación de la enzima 3-hidroxi-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGR) cual es uno de los pasos importantes para indagar sobre la ruta biosintética de limonoides. (Eisenreich *et al.*, 2001).

Se hipotetiza que la ruta de biosíntesis de los limonoides (azadiractina) en plantas de neem debe basarse en la ruta para la producción de isoprenoides en plantas (Figura 3). Existen evidencias experimentales de que algunos limonoides (nimbina y nimbidina) presentes en las hojas de *A. indica*, incorporan en su estructura carbonos del MVA (Akhyla y Rani, 2002). Por otro parte, en cultivos de células en suspensión, mediante la adición de acetato de sodio ($C_2H_3O_2Na$), isopentenil difosfato (IDP, $C_5H_{12}P_2O_7$) y geranil difosfato (GDP, $C_{10}H_{20}P_2O_7$) - estos dos últimos intermediarios de la ruta independiente del MVA y escualeno ($C_{30}H_{50}$) precursor de la producción de terpenoides, se logró incrementar la producción de azadiractina (Balaji *et al.*, 2003).

Debe considerarse además que las reacciones para la síntesis de fitoesteroles a partir del oxidoescualeno, son todas catalizadas en 21 pasos enzimáticos mediante enzimas enlazadas al retículo endoplasmático (Bouvier *et al.*, 2005). Estas enzimas se clasifican en dos grupos, un primer grupo que involucra reacciones con ciclizaciones, alquilaciones, reducciones e isomerizaciones. Las enzimas del segundo grupo catalizan reacciones de oxidación mediante la inserción de oxígeno molecular, catalizadas en parte por la amplia familia de monooxigenasas citocromo P_{450} o por varios miembros de la familia de oxigenasas hierro no hemo, enlazadas a la membrana del retículo. Dayanandan y Ponsamuel (2000) identificaron células secretoras de terpenoides en el neem. Cada célula secretora tiene un citoplasma denso con muchos organelos (vesículas acumuladoras de terpenoides) particularmente abundantes en el

retículo endoplasmático y en ribosomas. Dayanandan y Ponsamuel (2000) sugieren que cada célula secretora debe poseer dos grandes rutas biosintéticas, (1) la ruta de isoprenoides para la biosíntesis de terpenoides, que es común en las plantas superiores y (2) una ruta biosintética para la síntesis de protolimonoides y limonoides. Con base en las rutas para la producción de isoprenoides en plantas (Aharoni *et al.*, 2005) y los reportes anteriores, se propone que las unidades de isopreno necesarias para la síntesis de azadiractina, podrían producirse a nivel de plastido (ruta independiente de MVA) y a nivel de citosol (ruta MVA, reacciones del escualeno y post-escualeno). En el citosol y el retículo endoplasmático, se estarían realizando las reacciones de modificación y oxidación de terpenos, propias de la ruta de protolimonoides y limonoides (Figura .3)

Las células secretoras de terpenoides de neem, se encuentran en las raíces, tallos jóvenes, cortezas, hojas y cotiledones. Sin embargo, los diterpenoides han sido aislados del tallo y de la corteza de la raíz, pero no de las semillas. Por el contrario, la mayoría de los triterpenoides han sido extraídos de las semillas de neem (Dayanandan y Ponsamuel, 2000). Esto sugiere que existe una maquinaria metabólica única en los diferentes órganos del árbol del neem. En cuanto a la compartimentación de la azadiractina en cultivos de células en suspensión, la azadiractina es producida a nivel intracelular y no se excreta fácilmente al medio (Kuruvilla *et al.*, 1999).

A diferencia del árbol del neem, en el cual se han identificado limonoides en todas las partes de la planta, en cultivos de callos y de células en suspensión de *A. indica*, sólo se ha identificado la azadiractina (Orozco-Sánchez y Rodríguez-Monroy, 2007). En algunos estudios de células de *A. indica* en matraz se reportó el contenido de limonoides relacionados con la azadiractina, usando un método colorimétrico que mide la absorción de complejos coloreados después de la reacción de vainillina con terpenoides (Raval *et al.*, 2003; Rafiq y Dahot, 2010). Sin embargo, no se identificaron los limonoides que podían estar presentes en los cultivos, por lo que sería importante caracterizar los compuestos químicos presentes en los cultivos de *A. indica in vitro*

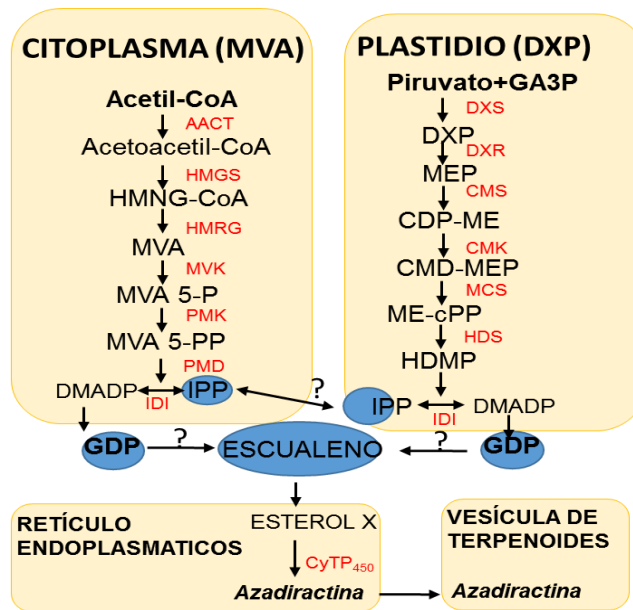


Figura 3.-Propuesta de la ruta biosintética para azadiractina. Adaptado de Aharoni *et al.* (2005) con base en los reportes de Dayanandan y Ponsamuel (2000), Akhyla y Rani (2002), Balaji *et al.* (2003) y Bouvier *et al.* (2005). MVA (ácido mevalónico), IPP (isopentenil difosfato), DMADP (dimetilalil difosfato), FDP (farnesil difosfato), Giald-3P (gliceraldehido 3-fosfato), DXP (deoxixilulosa-5-fosfato), GDP (geranil difosfato), CyTP₄₅₀ (citocromo P₄₅₀ hidroxilasas).

2.4.-Cultivo de tejidos vegetales

Las técnicas biotecnológicas de cultivos *in vitro* de células vegetales (CCV) en condiciones estáticas o de movimiento en medios de cultivo líquido han recibido una gran atención porque permiten obtener cantidades significativas de biomasa en términos económicamente viables (Gerth *et al.*, 2007). El concepto de tejidos vegetales se ha extendido para abarcar el cultivo aséptico de tejidos, células y órganos (Zhong, 2001; Calva, 2005). Para lo anterior, se necesita de un medio que aporte el alimento necesario para su desarrollo, bajo el concepto de que toda célula viviente de un organismo es capaz de desarrollarse si se proporcionan las condiciones externas apropiadas (Negrón, 2004), el tipo de medio, y las combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal.

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) son sustancias orgánicas que a bajas concentraciones influyen en los procesos fisiológicos de las plantas

(Frankenberger y Arshadm., 1995). Un RCV es un compuesto sintético o natural que se aplica para alterar el crecimiento y desarrollo de las plantas o inducir el cultivo de células y tejidos vegetales (Rosas, 2007). Estos RCV han sido clasificados en 5 grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (Machakova *et al.*, 2008). Las auxinas y citocininas son por su eficiencia las más importantes en la regulación de crecimiento y morfogénesis. Por ejemplo, la auxina estimula el alargamiento celular, interviene en el fototropismo, el geotropismo, la dominancia apical y la diferenciación vascular, inhibe la abscisión antes de formarse la capa de la abscisión; estimula la síntesis de etileno e induce la formación de raíces adventicias en los esquejes. (Curtis *et al.*, 2008). El ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (IBA) se utilizan frecuentemente en los medios de cultivo, por ser compuestos que se encuentran naturalmente en la planta (Gaspar *et al* 1996), además se utilizan compuestos artificiales que suelen ser más activos como ácido 2,4-diclorofenoxicético (2,4 D), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido-4-amino-3, 5, 6,-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram) (Pérez *et al.*, 1999).

De la misma forma que las auxinas, las citocininas basan su importancia en su capacidad de estimular la división celular y controlar la morfogénesis. La primera citocinina descubierta fue la cinetina (CIN) y es la que se usa principalmente en cultivo de células vegetales (CCV) además de otras como la 6-benzilaminopurina (BAP) y los diferentes isómeros de la zeatina (ZEA). También existen análogos sintéticos de las citocininas como por ejemplo la 4-alkil aminopteridina y la 6-benzil oxipurina, sin embargo son menos utilizadas.

Tanto las auxinas como las citocininas se necesitan para la generación de callo pues existe una interacción entre ellas que controla la desdiferenciación celular. Por ello, se requiere de un balance auxinas/citocininas adecuado, que resulta específico de acuerdo al tipo de planta que se esté utilizando (Stadel *et al.*, 2008). No obstante, su efecto coordinado puede resumirse de forma general en la Figura 4.

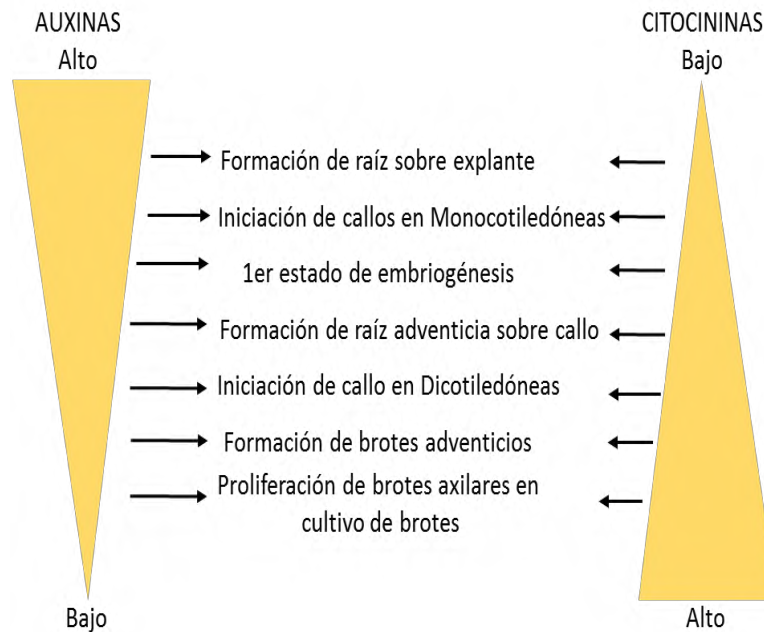


Figura 4.-Concentraciones relativas de auxinas y citocininas requeridas para el crecimiento y morfogénesis en CCV (Tomada de Stadel *et al.*, 2008).

2.5.-Producción de limonoides en cultivos *in vitro* en *A. indica*

Se han desarrollado medios de cultivos y propuesto algunas condiciones adecuadas de operación en el establecimiento de cultivos de *A. indica* para la producción de limonoides (Capataz-Tafur *et al.*, 2005).

En la tabla 2 se muestran algunos estudios de producción de limonoides relacionados con la azadiractina (AZRL) y de azadiractina (Aza) en cultivos *in vitro* de callos provenientes de hojas/semillas, y suspensiones celulares, los cultivos fueron basados en el medio MS (Murashige y Skoog 1962) con diferentes reguladores de crecimiento vegetal en concentraciones variadas. Cabe destacar que las concentraciones de AZRL y de Aza en estos estudios son muy variadas, van desde 16.1 a 266.5 $\mu\text{g/g}$ de peso seco y de 7×10^{-6} hasta 274 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente.

Tabla 2.-Producción de AZRL y azadiractina en diferentes tipos de cultivos *in vitro*

Tipo de Cultivo	Explante	Medio de Cultivo	AZRL (µg/g)	Aza (µg/g)	Referencia
C	Hojas	MS+IBA (4mg/L) +BA (2mg/L)	NC	7x10 ⁻⁶	Allan <i>et al.</i> ,1994
C	Hojas	MS+IBA (4mg/L) +BA (1mg/L)	N.D	N.D	Kearney <i>et al.</i> ,1994
C	Hojas	MS+2,4-D (1mg/L)+ Kn (0.5mg/L) +Glicina (90.3g/L)	NC	2.68 x10 ⁻²	Veeresham <i>et al.</i> ,1998
C	Semillas	MS+ANA (2mg/L) +BA (4mg/L)	NC	1.89X10 ⁻³	Prakash <i>et al.</i> , 2005
C	Hojas	MS+IBA (8mg/L) +BA (4mg/L)	NC	2.3X10 ⁻⁴	Prakash <i>et al.</i> , 2005
C	Semilla	MS +Glucosa +NO ₃	NC	111.12-124.9	Prakash y Srivastava, 2005
C	Hojas	MS +2,4-D (1.0 mg/L) +NAA (0.2mg/L) +BAP (1.0mg/L)	NC	7.46x10 ⁻⁴	Rafa y Umar, 2009
C	Flores	MS +2,4-D (1mg/L) +BAP (1mg/L) +NAA (0.2mg/L)	254.1	NC	Rafiq y Dahot, 2010
C	Hojas	MS +BAP (0.25mg/L) +IAA(0.1mg/L)	16.1	NC	Rafiq y Dahot, 2010
C	Semilla	MS+2,4-D (1mg/L) +BAP (0.5mg/L)	266.5	NC	Rafiq y Dahot, 2010
S	Embrión	MS+ANA (0.1mg/L) + BA (0.5 mg/L)	NC	4	Srividya <i>et al.</i> , 1998
S	Hojas juveniles	MS+ IBA (4mg/L) +BAP 2 mg/L	NC	274	Capataz, 2005

Aza: azadiractina, C. callos, S: suspensiones celulares, NC: no cuantificado, ND: no se encontró producción de Aza.

2.6.-Variación Somaclonal

Se ha observado en muchas plantas obtenidas de cultivos *in vitro* que presentan diferencias fenotípicas, morfológicas o bioquímicas en comparación con el fenotipo de las plantas donadoras de los explantes (Medina *et al.*, 2007). Larkin y Scowcroft (1981) distinguieron dos tipos de causas, la primera es la variación epigenética transitoria, debida probablemente a las condiciones de estrés generadas por las condiciones propias del cultivo de tejidos y células *in vitro*; la segunda se debe a las variaciones genéticas “verdaderas”, producto de mutaciones azarosas, a lo que se le conoce como variación somaclonal. Esta variación se asocia generalmente a varios problemas de calidad fisiológica, epigenética y genética (Cassell y Curry, 2001) y pueden producirse por factores derivados a partir de las condiciones *in vitro* del cultivo (Sedghi *et al.*, 2010).

La variabilidad puede ser importante en el mejoramiento genético, permite obtener características deseables (Mendoza *et al.*, 2012). Por otra parte cuando el objeto es la propagación de una especie o variedad, la variación somaclonal resulta un fenómeno poco deseable (Medina *et al.*, 2007).

2.6.1.- Tipos de variación somaclonal

2.6.1.1.-Variación epigenética

La variación genética es causada por cambios en la expresión de ADN, provocada por alteraciones en la metilación del ADN, esto tienen un efecto en la desacetilación de histonas y la metilación afecta a la estructura de la cromatina en las plantas (Taria y Paszkowski, 2004). Estas modificaciones pueden influir en la transcripción genética, son a menudo temporales y las plantas pueden revertir al fenotipo normal con relativa facilidad, pero algunos casos pueden ser de larga duración, e incluso pueden ser transferidos durante la propagación sexual (Brettell y Dennis, 1991).

Las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas son la metilación del ADN, proceso que participa en la regulación de la expresión genética de dos maneras:

en las modificaciones postraduccionales de las histonas y los pequeños RNAs no codificantes (miRNAs) e indirectamente proporcionando la estructura “cerrada” de la cromatina (Salonzhinet *et al.*, 2005). La metilación del ADN (Figura 5) consiste en la adición de un grupo metilo en el carbono 5' de la citosina de la cadena recién sintetizada que precede a una guanina (dinucleótido CpG), manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula del ADN (Laird 2003; Salonzhinet *et al.*, 2005). Esta reacción es llevada a cabo por unas enzimas denominadas ADN metiltransferasas (DNMTs) que utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como donante de grupos metilo.

En general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando se secuencia CpG adquiere metilación de *ново*, esta metilación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal (Mesa-Cornejo *et al.*, 2006). La metilación del DNA (Figura 5) tiene como función el silenciamiento génico, por tanto, tiene un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y en la organización de la cromatina (Feinberg *et al.*, 2006; Chen y Li, 2006).

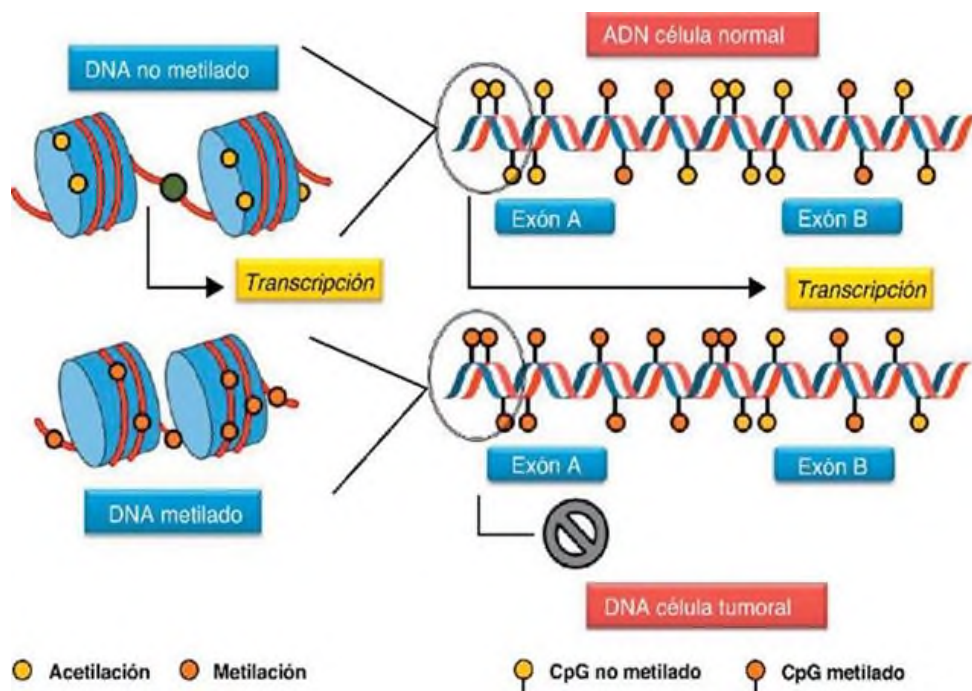


Figura 5.-Metilación de ADN (Menéndez *et al.*, 2012)

2.6.1.2.-Variación genética

Los procesos de desdiferenciación y rediferenciación de células pueden implicar cambios cualitativos y cuantitativos en el genoma, y las diferentes secuencias de ADN pueden amplificarse o borrarse en la reprogramación celular. Además, este proceso está relacionado a la fuente de tejido y el sistema de regeneración (Lee y Phillips, 1988).

Durante las etapas tempranas de la inducción de un cultivo *in vitro* pueden ocurrir cambios importantes en el número de cromosomas (Larkin y Scowcroft, 1981). La variación en el número de cromosomas y estructuras, y las irregularidades cromosómicas (como roturas, acéntrico y bandas céntricos, cromosomas en anillo, supresiones e inversiones) se han observado durante la diferenciación *in vitro* y entre somaclones regenerados (Hao y Deng, 2002; Mujib *et al.*, 2007).

La ocurrencia de la variación somaclonal puede deberse a distintos cambios, citogenéticos como las deleciones, adiciones, translocaciones, inversiones y funciones de la cromátidas no homólogas, (Lee y Phillips, 1988; Sánchez-Teyer *et al.*, 2003; Noro *et al.* 2007). Los transposones, ubicuos dentro de los genomas vegetales, también inducen mutaciones relativamente estables (transponen vía replicación) reteniendo la secuencia en el sitio de inserción, a causa de alteraciones en los patrones de expresión de genes y la estructura de proteínas que codifican. (Heslop-Harrison *et al.*, 1997; Kumar y Bennetzen, 1999).

2.6.2.- Factores que inducen variación somaclonal

2.6.2.1.- Tipos de cultivo *in vitro*

La variación somaclonal se puede generar en todos los métodos empleados para el cultivo *in vitro* de plantas, cultivo de yemas, organogénesis y embriogénesis somática, (George, 1993). Sin embargo, el patrón de desarrollo que sigue un explante durante su morfogénesis *in vitro* es un elemento clave que se relaciona con la variación somaclonal. Por ejemplo, cuando un tejido altamente

diferenciado pasa por una etapa de desdiferenciación con una alta tasa de división celular, se puede generar mayor variación somaclonal que cuando ocurre un desarrollo directo hacia regeneración a partir de yemas apicales, axilares y embriones (Sahijram *et al.*, 2003; Cardone *et al.*, 2004).

2.6.2.2.- Edad del cultivo y subcultivos

La proporción de variantes somaclonales aumenta en cultivos envejecidos y en plantas con varios subcultivos (Cardone *et al.*, 2004). Esto probablemente se debe a la acumulación de alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y mutaciones (Sahijram *et al.*, 2003; Cardone *et al.*, 2004). Sahijram *et al.*, (2003) mencionan que la variación somaclonal puede aparecer después de tres a ocho subcultivos.

2.6.2.3.-La composición del medio del cultivo

La composición del medio de cultivo es otro de los factores que puede inducir variación somaclonal. Se ha encontrado que los reguladores de crecimiento, principalmente aquellos con naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN, causando así cambios epigenéticos, (Rakozy-Trojanowska, 2002; Sahijram *et al.*, 2003). El estado físico del medio de cultivo (líquido o sólido) también puede influir en la aparición de variantes somaclonales, ya que un mismo tejido se comporta de diferente manera frente a los factores físicos asociados (oxigenación, tensión superficial y daños mecánicos).

2.6.3.-Métodos de detección de variación somaclonal

El cultivo de tejidos se puede utilizar para propagar material de élite o generar nueva variabilidad por la variación somaclonal, un término utilizado para definir la variabilidad inducida por el cultivo de tejidos (Larkin y Scowcroft, 1981) que es un resultado de una combinación de ambos, variación genética y epigenética (Duncan, 1992). El nivel de dicha variabilidad puede ser evaluada utilizando marcadores moleculares.

Varias técnicas de marcadores moleculares se pueden mencionar, por ejemplo los Polimorfismos de Longitud de Restricción (RFLP), Bandas de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD) y la Amplificación de bandas de longitud polimórfica (AFLP). Todos ellos evalúan los cambios a nivel de ADN basados en PCR que amplifican usando cebadores inespecíficos, y en algunos casos dirigidos a amplificar elementos repetitivos en el genoma. Las técnicas moleculares, tales como RFLP, RAPD y AFPL con frecuencia se favorecen sobre el estudio fenotípico tradicional o mediciones citológicas y, en general, evalúan incluso pequeñas variaciones del genoma.

2.6.3.1.-Bandas de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPDs)

Los RAPDs se basan en que el ADN eucariótico puede contener segmentos aleatorios emparejados que son complementarios a decanucleótidos, se utilizan cebadores individuales de secuencia de oligonucleótidos arbitrarios. Para iniciar la síntesis del ADN (Belaj *et al.*, 2001-Bhojwani y Dantu, 2013), se amplifican las secuencias de ADN con un iniciador de longitud con cebadores de 10 pb (pares de base) (Araújo *et al.*, 2001). Esta técnica se describe en la Figura 6. El cebador se hibridará al azar en el genoma. Si dos sitios de hibridación están cerca en dos hebras de ADN, esta hebra se amplificará, (el individuo A). Sin embargo, si estos dos sitios están demasiado separados (individuo B), el fragmento no puede ser amplificado. Por lo tanto, se observará la presencia de una banda de más en el gel para A y la ausencia de esta misma banda para B.

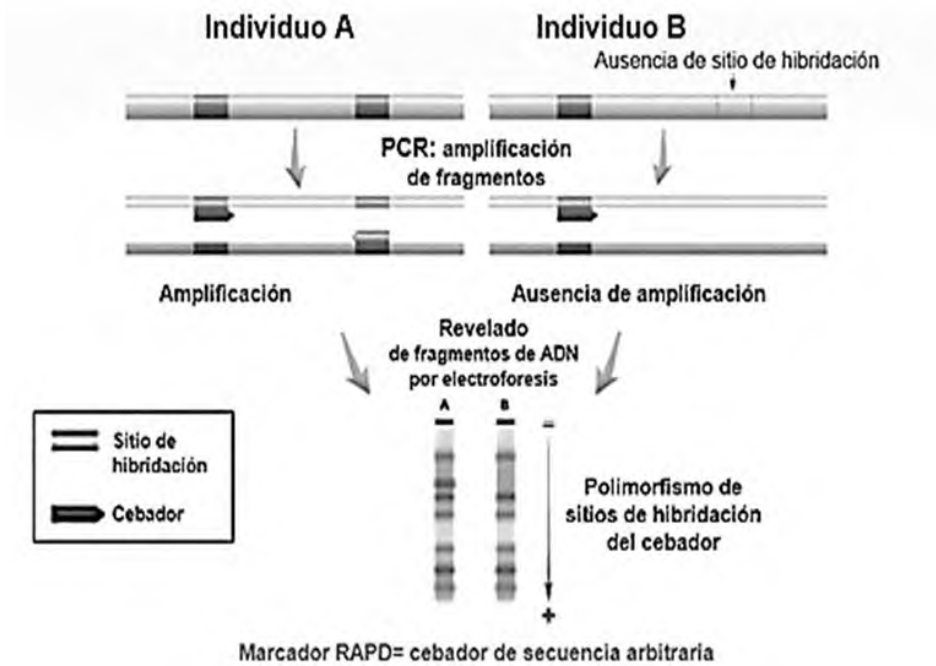


Figura 6.-Técnica molecular RAPD-PCR. (Belaj et al., 2001; Bhojwani y Dantu, 2013)

La técnica RAPD, es la versión más simple de PCR con cebadores arbitrarios utilizados para la detección de la variación del ADN por conveniencia. Las ventajas es que no requiere la digestión con una enzima de restricción, no hay transferencia a una membrana, ni preparación de sonda radiactiva (Weising *et al.*, 2005). Además de proporcionar análisis eficientes de polimorfismos, permite la rápida identificación y el aislamiento de bandas de ADN específicos del cromosoma, es una técnica muy útil para el mapeo genético, el ADN de huellas dactilares, plantas y la cría de animales (Venkatachalam *et al.*, 2008). El uso de marcadores RAPD es especialmente benéfico para discriminar entre los materiales que son genéticamente similares, para evaluar la variabilidad genética dentro de una colección y elegir al núcleo de la colección (Piola *et al.*, 1999; Bernardo y Itoiz 2004). Es una técnica que en la actualidad es muy empleada por su facilidad, su bajo costo y corto tiempo de ejecución (Carvalho *et al.*, 2004).

2.6.3.2.-Polimorfismo de longitud de bandas de restricción (RFLP)

La técnica de RFLP es utilizada para el análisis del genoma de los organismos, proporcionando una base molecular para cualquier diferencia observada. Se basa en la digestión del ADN crudo del organismo con endonucleasas de restricción. Esta técnica usa sondas que hibridan a secuencias conocidas (Polaco *et al.*, 2002) (Figura 7).

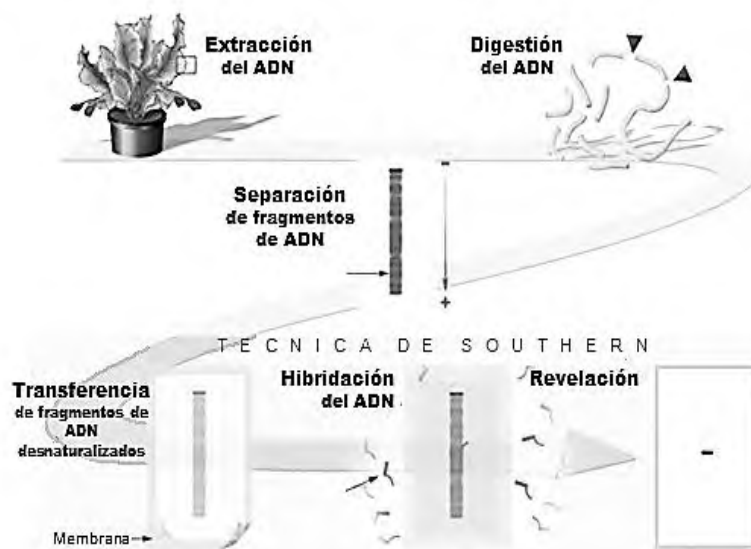


Figura 7.-Técnica molecular RFLP. (Polaco *et al.*, 2002)

Los marcadores de RFLP son sensibles a las metilaciones que diferencian entre callos embriogénicos, son útiles para la detección precoz de la variación somaclonal, es decir son altamente polimórficos y reproducibles (Jaligot *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2008). Esta es una técnica que consume tiempo, es costosa, utiliza gran cantidad de tejido vegetal para su análisis y requiere de ADN complementario o sondas de ADN (Piola *et al.*, 1999).

2.6.3.3.-Amplificación de bandas de longitud polimórfica (AFLP)

AFLP es una combinación de RFLP y PCR, se basa de un procedimiento de impresión de ADN sobre la base de una amplificación selectiva por PCR de

bandas de restricción de la digestión de ADN genómico (Polanco y Ruiz 2002; Picca *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2008).

En AFLP, el ADN genómico se digiere con dos endonucleasas de restricción, típicamente uno con una secuencia de reconocimiento de 6 pb (por lo general EcoRI) y el otro con una secuencia de reconocimiento de 4 pb (generalmente MseI). A partir de entonces, los adaptadores de secuencia conocida se ligan a los adaptadores complementarios de doble cadena de los extremos de los bandas de restricción (Figura 8). Este tipo de análisis es fácil de realizar, es altamente reproducible (Azofeifa-Delgado, 2006) y utiliza pequeñas cantidades de ADN, una vez que se ha terminado la fase de la amplificación mediante PCR se visualiza en geles de poliacrilamida (Picca *et al.*, 2004).

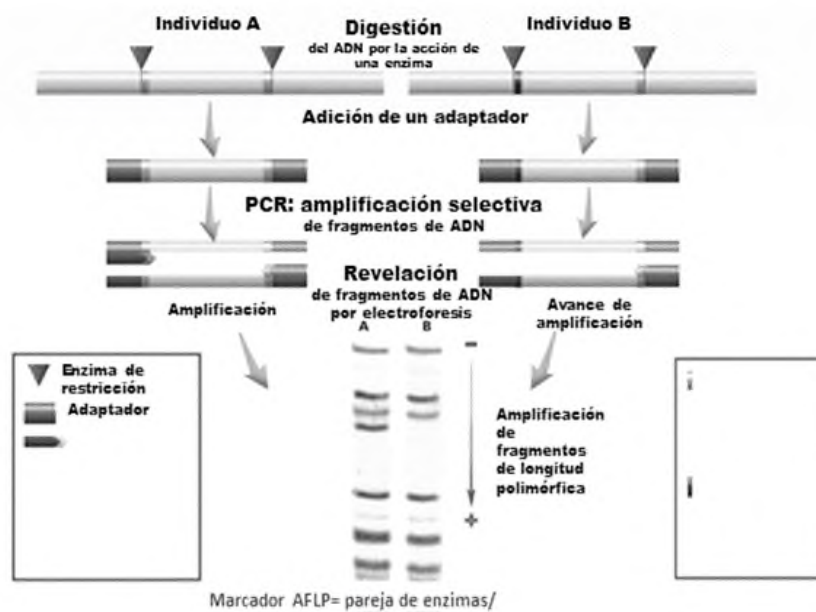


Figura 8.-Técnica molecular AFLP. (Azofeifa-Delgado, 2006)

Un subconjunto de las bandas de restricción es entonces amplificado utilizando dos cebadores complementarios a los bandas adaptadores y sitios de restricción para dos rondas sucesivas de PCR que utilizan cebadores que coinciden con los adaptadores en el extremo EcoRI y MseI final de los bandas más uno de nucleótidos extra. Estas rondas de amplificación selectiva reducen el conjunto de bandas de ADN resultantes a un tamaño más manejable para el análisis (Vos *et al.*, 1995).

El número de bandas para cada ensayo AFLP depende del número de nucleótidos selectivos en la combinación de cebadores AFLP, la composición de nucleótidos, el contenido de GC, el tamaño físico del genoma, y su complejidad (Agarwal *et al.*, 2008). Las técnicas AFLP generan huellas digitales de ADN de cualquier fuente, incluso sin ningún conocimiento previo de la secuencia de ADN. Un estudio reciente mostró que puede ser utilizado para distinguir individuos estrechamente relacionados a nivel subespecies (Althoff *et al.*, 2007).

En la tabla 3 se observan algunos estudios que se han realizado en cultivos *in vitro* de callos mediante la técnicas para observar si existe variación somaclonal de distintos cultivos de callos de diferentes especies.

Tabla 3.-Estudios de variación somaclonal en cultivos *in vitro* de callos usando distintas técnicas

Especies	Tipo de cultivo	Método	Variabilidad	Referencia
<i>Allium sativum</i>	Callos	RAPD	Si	Al-Zahim <i>et al.</i> , 1999
<i>Ouercus suber</i>	Callos	RAPD	No	Gallego <i>et al.</i> , 1997
<i>Prunus pérsica</i>	Callos	RAPD	Si	Hashmi <i>et al.</i> , 1997
<i>Oryza sativa var. indica</i>	Callos	RAPD	Si	Godwin <i>et al.</i> , 1997
<i>Begonia x hiemalis</i>	Callos	RAPD	No	Bouman y Deklerk, 2001
<i>Citrus sinensis</i>	Callos	RAPD	No	Hao y Deng, 2002
<i>Codonopsis lanceolata Benth</i>	Callos	RAPD	Si	Guo <i>et al.</i> , 2006
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Callos	RAPD	No	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2008
<i>Brassica oleraceae</i>	Callos	RAPD	Si	Qin <i>et al.</i> , 2007
<i>Citrus limon</i>	Callos	RAPD	Si	Orbovic <i>et al.</i> , 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Callos	AFLP	No	Polaco y Ruiz, 2009
<i>Freesia hybrida</i>	Callos	AFLP	No	Gao <i>et al.</i> , 2010

2.6.4.-Estudios de variación somaclonal en *A. indica*

En *A. indica* existen algunos reportes sobre variación somaclonal. Deshwal *et al.* (2005) evaluaron la variación genética de árboles provenientes de 29 regiones de la India usando marcadores RAPD y observaron que existe variación entre las diferentes regiones. El cebador OPA-18 presentó el 80% de polimorfismo.

Kota *et al.* (2006) observaron variación somaclonal mediante la técnica RAPD en plantas con alto y bajo contenido de azadiractina A y cultivos *in vitro* (callos y plántulas) encontrado un 100% de polimorfismo usando los cebadores OPA-09 y OPA-11, indicando que *A. Indica* sufre variación somaclonal al someterse al CTV.

Sin embargo, no existen estudios sobre la variación somaclonal y la producción de limonoides en cultivos *in vitro* de *A. indica* bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

III. JUSTIFICACIÓN

Los seres humanos han encontrado en los compuestos sintetizados por las plantas beneficios como medicinas, saborizantes, bioinsecticidas, alimentos entre otros. El árbol del neem (*Azadirachta indica A. Juss*) es una especie importante debido a sus propiedades medicinales como anti-inflamatorio, antibacterial, anti úlceras gástricas y diurético. Adicionalmente, tiene un gran interés para la producción de bioinsecticidas debido a que posee metabolitos secundarios bioactivos como los limonoides. El más importante para esta especie es la azadiractina por su acción contra hongos e insectos. Se ha probado la producción de este metabolito en diversos sistemas de CCV sin embargo, los cultivos presentan variaciones en la producción de limonoides, lo cual puede estar relacionado con los reguladores de crecimiento vegetal, tipo de explante, algunas modificaciones del medio de cultivo, elicitores y precursores. El objetivo de este trabajo es estudiar la variación somaclonal de cultivos *in vitro* de *A. indica* y evaluar la producción de limonoides en relación a reguladores de crecimiento vegetal.

IV.-HIPÓTESIS

En los cultivos *in vitro* de *Azadiractha indica* la combinación de reguladores de crecimiento vegetal inducirán variación tanto somaclonal como en la producción de limonoides.

V- OBJETIVOS

5.1-Objetivo General

Evaluar la variación somaclonal y la producción de limonoides en cultivos *in vitro* de *Azadiractha indica* bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal.

5.2-Objetivos Específicos

1. Establecer y seleccionar líneas de callos de *A. indica* bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal.
2. Establecer y caracterizar los cultivos en suspensión de *A. indica*.
3. Determinar el efecto de las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal en la producción de limonoides en los cultivos *in vitro* de *A. indica*.
4. Evaluar la variación somaclonal en los cultivos *in vitro* de *A. indica* bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal.

VI.- METODOLOGÍA

6.1.-Material vegetal

El material vegetal se tomó del árbol *A. indica* de aproximadamente 5 años de edad (Figura 9) que se encuentra ubicado en la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec a una Latitud Norte 18°04'52", Longitud Oeste 96°07'07" y una altura de 20 msnm.



Figura 9.-Árbol del neem. (Universidad del Papaloapan)

6.2.-Método de desinfección

Las semillas y las hojas juveniles de *A. indica* se lavaron con jabón comercial durante 3 minutos, se enjuagaron 3 veces con agua estéril y se desinfectaron con etanol al 70% durante 1 min, se enjuagaron con agua estéril 5 veces y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2% durante 15 min y finalmente, se enjuagaron nuevamente con agua destilada estéril 3 veces. (Capataz-Tafur *et al.*, 2007).

6.3.-Inducción de callos.

La inducción de callos se realizó utilizando como explante semillas y hojas juveniles de *A. indica*, en un medio con sales de Murashige y Skoog con mínimos

orgánicos (Murashige y Skoog, 1962) (M5519, Sigma, 4.4 g/L) suplementado con sacarosa (3% p/v) y Phytigel (2 g/L). Para ello se realizó un diseño por bloques al azar, con 6 tratamientos utilizando diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) con 5 réplicas (Tabla 4).

Tabla 4.-Diseño de tratamientos con el medio basal MS.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento vegetal
T ₀	Sin reguladores de crecimiento
T ₁	ANA (2.0 mg/L) – BAP (1.0 mg/L)
T ₂	ANA (1.0 mg/L) – Kinetina (0.5 mg/L)
T ₃	IAA (0.2 mg/L) – BAP (0.1 mg/L)
T ₄	IBA (8.0 mg/L) – BAP (4.0 mg/L)
T ₅	IBA (4.0 mg/L) – BAP (1.0 mg/L)

Para los 6 tratamientos el pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.8 y se esterilizaron en una autoclave a 121°C por 20 min.

Se prepararon 10 frascos Gerber con 20 mL de medio por cada tratamiento, en cada frasco se colocaron 3 semillas o 3 hojas juveniles de *A. indica* (con pequeñas incisiones) previamente desinfectadas en una campana de flujo laminar. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 25 ± 2 °C. Los callos se separaron de los explantes y se subcultivaron cada 15 días en el mismo medio de cultivo. Una vez inducido el crecimiento de callos, se incubaron en condiciones de oscuridad a 25 ± 2 °C. A los 5 meses de edad se les determinó la producción de AZRL para seleccionar las mejores líneas de callos.

6.4.- Cinética de crecimiento de los callos.

Para realizar la caracterización cinética del crecimiento de los callos provenientes de hojas y semillas, se sembró 1 g de biomasa fresca en frascos Gerber con 20 mL de medio de cultivo, de los tratamientos que presentaron 100% de inducción de callos friables (T₁, T₄ y T₅) y en condiciones de oscuridad.

La cantidad de biomasa seca (g) fue determinada cada 7 días durante 28 días. El peso en seco (P.S) se determinó colocando los callos que estaban en el frasco sobre un papel de aluminio con peso conocido y constante y se secaron hasta peso constante (70°C, 2 días). Los resultados son el promedio de 5 muestras \pm el error estándar (E.E).

6.5.-Establecimiento de suspensiones celulares.

Para el establecimiento de células en suspensión se utilizó la misma formulación de los medios empleados para el cultivo de los callos, pero sin el agente gelificante. Se sembró 1 g de callo friable (en base fresca) proveniente de hojas y de semillas en matraces (Erlenmeyer de 125 mL) con 25 mL de medio de cultivo de callos de los tratamientos T₁, T₄ y T₅, que presentaron mayor acumulación de AZRL. Los cultivos se colocaron en una agitadora orbital (PRENDO Modelo AGO 9060, México) a 110 rpm, 25 \pm 2 °C y en oscuridad. Cada 7 días se realizó una resiembra de los cultivos seleccionando los agregados más finos.

Una vez establecidos los cultivos en suspensión de *A. indica*, los subcultivos se realizaron al 5% de peso fresco (g P.F/V) cada 21 días, en matraces de diferentes tamaños (100 mL con 20 mL de medio, 250 mL con 50 mL de medio de cultivo). Estos matraces se mantuvieron con tapones de papel aluminio. El pH del medio de cultivo se ajustó a 6.11 previo a la esterilización. El pH obtenido después de la esterilización fue de 5.8. A todas las suspensiones celulares de 4 meses de edad se les determinó la producción de AZRL.

6.6.- Cinéticas de crecimiento en suspensiones celulares.

Se utilizó medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con el 3% P/V de sacarosa, IBA (4.0 mg/L) y BAP (1.0 mg/L) para crecer a las suspensiones celulares que presentaron mayor contenido de AZRL (T₅). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad, temperatura de 25 \pm 2 °C y 110 rpm de agitación orbital. El pH del medio de cultivo se ajustó a 6.11 previo a la esterilización.

El inóculo utilizado en los experimentos se tomó de matraces de 250 mL con 50 mL de cultivo que contenían aproximadamente 12.5 g P.F por matraz con una edad de 21 días. Se inocularon 5 mL de suspensión celular en matraces (Erlenmeyer de 100 mL) con 15 mL de medio de cultivo. Se tomaron 3 muestras cada 3 días durante 12 días para determinar el peso seco, el consumo de sustrato y de producción de AZRL (Capataz *et. al.*, 2007). Los resultados son el promedio de 3 muestras \pm el error estándar (E.E)

6.6.1.-Biomasa y parámetros cinéticos

La cantidad de biomasa seca (P.S) se determinó por filtración de alícuotas de 5 mL de suspensión celular a través de un filtro de papel Whatman N° 1 de peso seco conocido. Las células se secaron hasta peso constante (70°C, 1 día) y el P.S se calculó por una diferencia de peso.

La velocidad de crecimiento (μ) se obtuvo mediante un método gráfico, donde los valores de biomasa de la fase lineal del crecimiento se transformaron a logaritmo (\ln) y se graficaron contra el tiempo, la gráfica se ajustó a una línea recta y donde la pendiente correspondió a μ y se calculó el tiempo de duplicación (t_d) utilizando la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

6.6.2.-La viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el colorante de azul de Evans (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999). Las células se incubaron con 0.25% p/v de azul de Evans (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Se contaron un total de 500 células en un microscopio con el objetivo de 10 X. El porcentaje de viabilidad se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{número de células viables (no teñidas)}}{\text{número total de células}}$$

6.6.3.- Consumo de sustrato

El consumo de sustrato se determinó mediante el método de fenol-sulfúrico propuesto por Dubois *et al.* (1956). Se colocaron 500 μ L de medio del filtrado (libre de células) en tubos de ensayo, se adicionó 1 mL de la solución de fenol al 5 % y 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se midió en un espectrofotómetro a 490 nm en celdas de cuarzo. Se realizó una curva patrón con sacarosa (Figura 10) de 0 a 0.20 mg/mL, por triplicado. Los resultados son el promedio de 3 muestras \pm el error estándar (E.E)

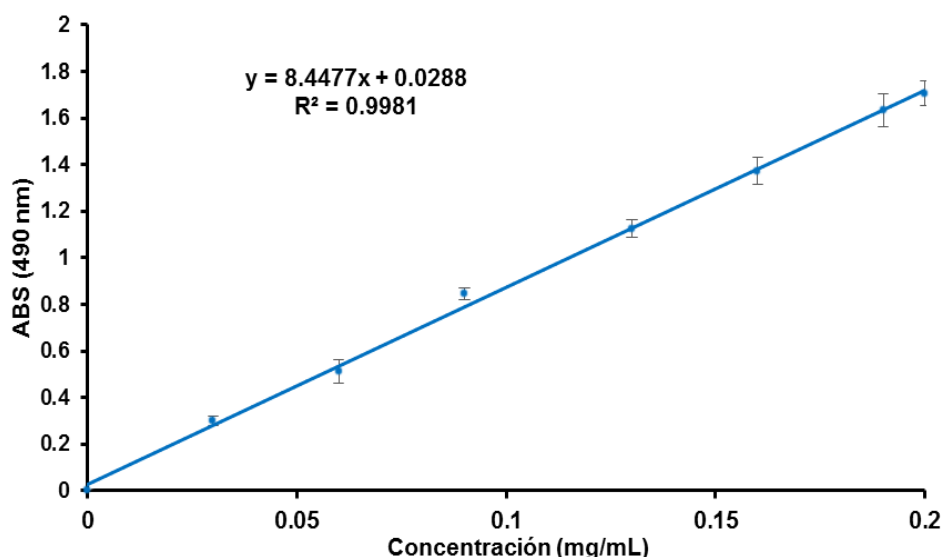


Figura 10.-Curva de calibración de sacarosa. Las barras de error representan el E.E (n=3).

6.7.- Análisis químico.

6.7.1.- Preparación de extractos de los cultivos *in vitro* de *A. indica*.

Los extractos de los cultivos *in vitro* se prepararon a partir de 1 g del material vegetal y se dejaron secar en una estufa a 30-45 $^{\circ}C$ y se le agregaron 15 mL de metanol (MeOH) para extracción (se realizó tres veces hasta tener un volumen de 45 mL de MeOH), se le adicionaron 15 mL de H_2O destilada. Luego los extractos MeOH- H_2O se extrajeron 3 veces con 15 mL de diclorometano

(CH₂Cl₂). De cada extracción se retiraron la fase MeOH-H₂O (superior) y las fases del CH₂Cl₂ se juntaron y se concentraron en un rotovapor a 40 rpm a una temperatura de 30 °C. El extracto seco se resuspendió en 1 mL de CH₂Cl₂, y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

6.7.2.-Perfiles cromatográficos en capa fina de los extractos de *A. indica*

Los perfiles cromatográficos se obtuvieron utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck-KGaA), se aplicaron alícuotas de 10 µL del extracto en la parte inferior de las placas por carril, utilizando azadiractina como estándar (A7430, Sigma, USA). Se utilizó como fase móvil diclorometano: metanol (9.5:0.5, V/V). Las placas se revelaron con una mezcla etanol: ácido sulfúrico: vainillina (100 mL: 1.5 mL 98%: 1.5 g) (Sinha *et al.*, 1999). El factor de retención se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

6.7.3.-Cuantificación de AZRL por colorimetría

La cuantificación de limonoides relacionados a la azadiractina (AZRL) se realizó mediante el método propuesto por Dai *et al.* (1999), el cual consta de una mezcla de reacción con 700 µL de muestra o de solución estándar en diclorometano, más 200 µL de la solución vainillina-metanol (0.02 mg/mL) y se agitó suavemente por 2 min. Posteriormente se adicionaron 300 µL de ácido sulfúrico al 95% (en cantidades de 100 µL hasta completar el volumen) se agitó por 10 s durante cada aplicación, y finalmente se agregaron 700 µL MeOH (hasta desarrollar una coloración azul-verdosa). Se dejó reposar por 5 min y se midió la absorbancia a 577 nm en un espectrofotómetro UV/VIS.

La curva de calibración se elaboró con un estándar de azadiractina (A7430, Sigma, USA) en concentraciones de 0.00-100 µg/mL disueltos en diclorometano

y como blanco se utilizó el diclorometano (Figura 11). Los resultados son el promedio de 3 muestras \pm el error estándar (E.E).

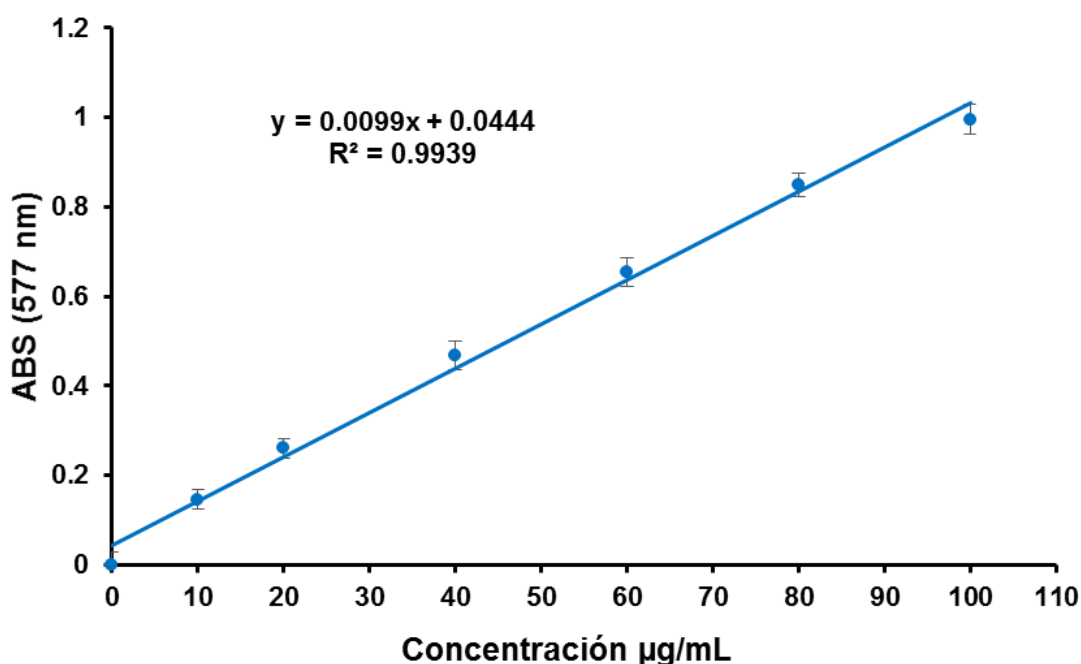


Figura 11.-Curva de calibración de azadiractina. Las barras de error representan el E.E (n=3).

6.8.- Extracción de ADN de los cultivos in vitro.

Se colocaron 100 mg de material vegetal en tubos eppendorff y se maceraron con nitrógeno líquido y se adicionaron 500 μL de Buffer EB (solución de EDTA 50 mM, NaCl 500 mM y Tris 100 mM), se mezcló y se incubó por 30 min a 65°C en un Thermoblock-TB2. Se agregaron 500 μL de una solución de cloroformo-etanol 24:1, se mezcló y se centrifugó por 10 min a 14800 rpm.

El sobrenadante fue retirado a un tubo nuevo, se adicionaron 500 μL de isopropanol, se mezcló en vórtex y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó por 15 min a 14800 rpm y se retiró el sobrenadante. Luego, se agregaron 750 μL de etanol al 70% V/V, se mezcló y se centrifugó por 7min a 14800 rpm. El etanol fue retirado y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Para asegurar la calidad del ADN se agregaron 30 μL de ARNasa al 1X (100mg/mL) y se dejó incubar a 35 °C por 1 h. Las muestras se almacenaron

a -20 °C hasta su uso. Para determinar la calidad y cantidad de ADN genómico se usó un espectrofotómetro (Nanodrop Technologies). Asimismo, se efectuó la carga de ADN en geles de agarosa al 0.8% (p/v) y se corrió en una cámara de electroforesis a 80 voltios durante 30 min en buffer de TAE al 1X (Tris base; ácido acético glacial; EDTA 0.5M) y finalmente se reveló con bromuro de etidio.

6.8.1.-Análisis de RAPD (amplificación del ADN polimórfico al azar)

6.8.1.1.-Preparación de los cebadores

Se utilizaron 26 cebadores para el análisis de RAPD (Promega) (Tabla 5). De cada uno de los cebadores se prepararon soluciones stock de 100 µM. Para la amplificación por RAPD-PCR se preparó una solución al 10 µM diluidos con agua desionizada estéril.

Tabla 5.-Cebadores polimórficos degenerados para técnica de RAPD

Cebador	Secuencia	Cebador	Secuencia
OPA-05	(5'AGGGGTCTTG3')	OPQ-12	(5'AGTAGGGCAC3')
OPA-08	(5'GTGACGTAGG3')	OPQ-13	(5'GGAGTGGACA3')
OPA-09	(5'GGGTAACGGG3')	OPQ-15	(5'GGGTAACGTG3')
OPA-10	(5'GTGATCGCAG3')	OPQ-16	(5'AGTGCAGCCA3')
OPA-20	(5'GTTGCGATCC3')	OPQ-17	(5'GAAGCCCTTG3')
OPB-01	(5'GTTTCGCTCC3')	OPQ-18	(5'AGGCTGGGTG3')
OPB-04	(5'GGACTGGAGT3')	OPR-04	5'CCCGTAGCAC3')
OPH-09	(5'TGTAGCTGGG3')	OPR-09	(5'TGAGCACGAG3')
OPK-04	(5'CCGCCCAAAC3')	OPS-02	(5'CCTCTGACTG3')
OPQ-02	(5'TCTGTCTGGTC3')	OPS-04	(5'CACCCCCTTG3')
OPQ-04	(5'AGTGCCTGA3')	OPS-08	(5'TTCAGGGTGG3')
OPQ-06	(5'GAGCGCCTTG3')	OPS-10	(5'ACCGTTCCAG3')
OPQ-10	(5'TGTGCCCGAA3')	OPG-11	(5'TGCCCGTCGT3').

6.8.1.2.-Amplificación RAPD-PCR

Las mezclas de reacción se realizaron mediante el método propuesto por Singh *et al.*, (2005) agregando BSA. (Tabla 6).

Tabla 6.-Mezcla para amplificación de PCR-RAPD

Reactivos PCR	Volumen utilizado por tubo (µL)
Taq-Polimerasa (Green-Taq-Promega)	10
Agua	7
Cebadores	2
ADN (Dilución)	1
BSA (0.67mg/mL)	1
Total	21 µL

Posteriormente, las mezclas de reacción se colocaron en un Termociclador Tecne para su amplificación. El protocolo del ciclado de PCR se tomó de Singh *et al.*, (2005 -Tabla 7). Al finalizar la amplificación se realizó una electroforesis, los productos (mezcla de reacción) se colocaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) y se dejó correr 45 min a 120 voltios. El tamaño de los productos de amplificación se estimaron utilizando un marcador molecular de 100 pb (GenRuler 100pb plus ladder, catálogo G2101, Promega). Finalmente se analizaron en un fotodocumentador digital con luz UV.

Tabla 7.-Condiciones para el programa de PCR

Numero de ciclos	Condiciones	
	T (° C)	Tiempo (min)
1	95	2
40	94	1
	37	1
	72	2
1	72	7

El análisis e interpretación de los datos obtenidos fue realizado según la metodología reportada por Picó y Pérez, 2012 (Anexo 1).

6.9.-Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante Minitab Statistical 16 mediante una prueba de Tukey con una confiabilidad del 95%.

Para el análisis de RAPDs se realizó una matriz binaria, asignándole valores de 1 a cada banda presente y 0 si la banda estuvo ausente con respecto al control (Anexo 2). Se realizaron mediante el Software PHYLIP 3.69 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html>) y con MEGA versión 6 (<http://www.megasoftware.net/>) para realizar el dendograma UPGMA.

VII.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.-Establecimiento de cultivo de callos

En este trabajo se evaluó la producción de callos de cultivos *in vitro* mediante distintas combinaciones y concentraciones de auxinas/citocininas usando hojas juveniles y semillas maduras como explantes. Se observó formación de callos a los primeros 15 días de incubación en los tratamientos en oscuridad total, después de los 30 días de incubación, se resembraron en medios de cultivos nuevos. En la Figura 12, se muestran los diferentes tipos de callos obtenidos a partir de explantes de hojas. Los tratamientos T₁, T₄ y T₅ generaron callos friables con un 90%, 80% y 100% de respuesta, respectivamente. Mientras que los tratamientos restantes T₂ y T₃ presentaron un 80% de respuesta. Los tratamiento T₂ y T₃, generaron callos con pequeñas raíces y ligeramente oxidados. Bajo el tratamiento T₀ sin reguladores no se obtuvieron respuesta, (Tabla 8).

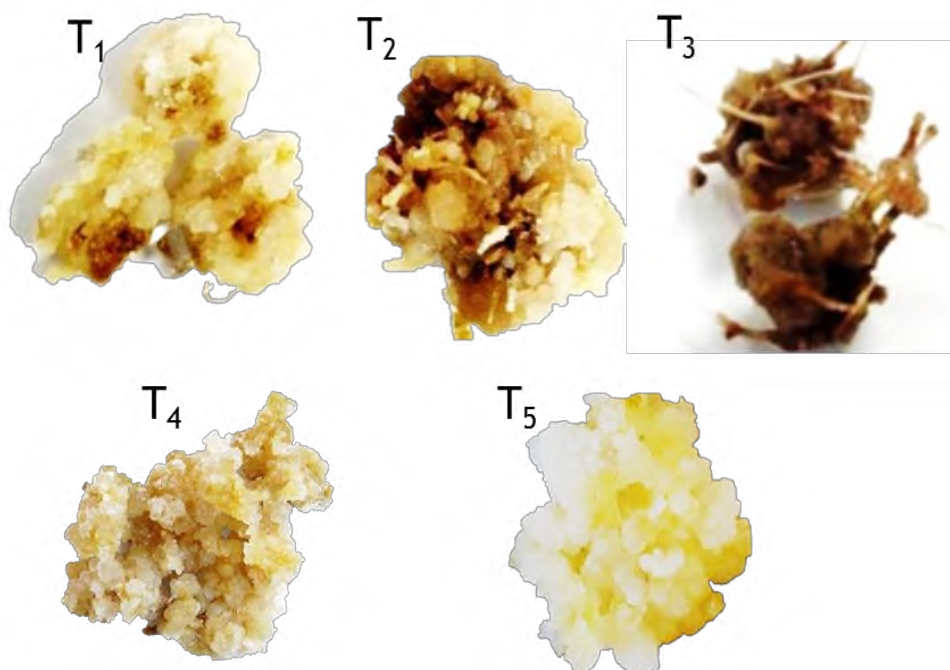


Figura 12.-Respuesta de callos provenientes de hojas, T₁) callo friable, T₂) callo con ligeras raíces, T₃) callo con raíces diferenciadas, T₄) callo friable y T₅) callo friable.

Tabla 8.-Respuestas de callos provenientes de hojas de *A. indica*

Tratamiento	% Callos	% Brotes	% Raíz	Tipo de callos
T ₀	0±0.0 ^d	0±0.0 ^a	0±0.0 ^a	NR
T ₁	90±0.4 ^{ab}	0±0.0 ^a	0±0.0 ^a	Callo friable de color amarillo
T ₂	80±0.3 ^{bc}	0±0.0 ^a	0±0.0 ^a	Callo con pequeñas raíces
T ₃	80±0.5 ^{bc}	0±0.0 ^a	0±0.0 ^a	Callos oxidados con raíces diferenciadas
T ₄	80±0.3 ^{bc}	0±0.0 ^a	0±0.0 ^a	Callo friable
T ₅	100±0.4 ^a	0±0.0 ^a	0±0.0 ^a	Callo friable de color crema

Se expresan los valores de la media ± el error estándar (n=5). Letras diferentes por columna indican que hay diferencias significativas por el método de Tukey con p< 0.05. NR: no registrado.

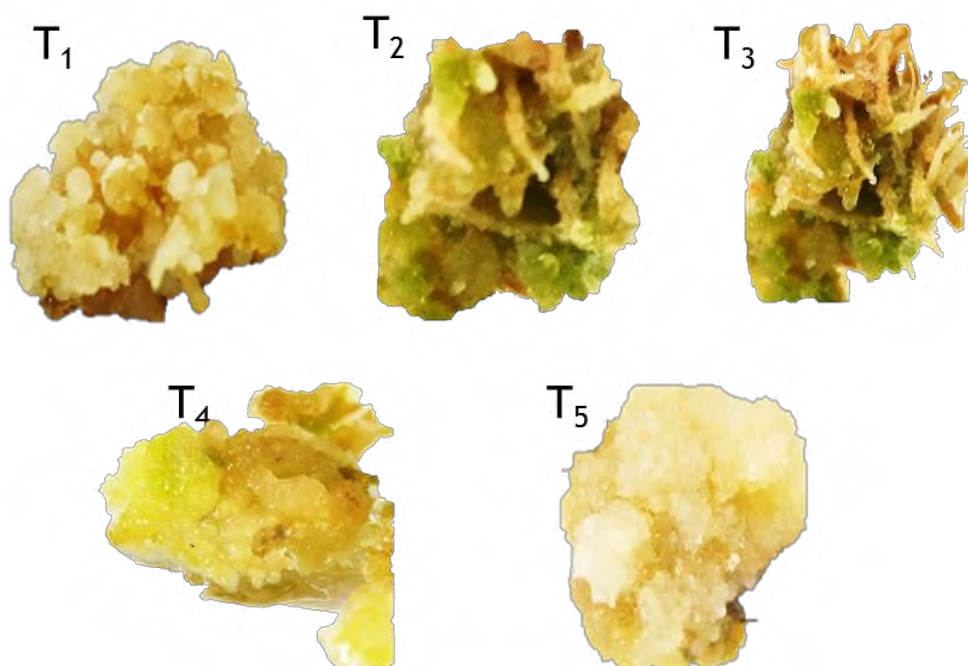


Figura 13.-Callos provenientes de semillas. T₁ (callo friable), T₂-T₃ (Rizogénicos), T₄ (embriogénico) y T₅ (friable).

En lo que respecta a la respuesta de callogénesis de los cultivos *in vitro* provenientes de semillas (Figura 13 y Tabla 9), los tratamientos T₁, T₄ T₅ mostraron un callo de tipo friable, de color amarillo-cremoso y de crecimiento

rápido con una inducción de 100%, 60% y 80% respectivamente. Mientras que los tratamientos T₂ y T₃ generaron callos con raíces diferenciadas con 80% y 30% en respuesta a la callogénesis, respectivamente. En el tratamiento T₀ no obtuvieron respuesta, los explantes sufrieron necrosis a los primeros 10 días de su incubación.

Tabla 9.-Tipos de respuesta provenientes de semillas de *A. indica*

Tratamiento	% Callos	% Brotes	% Raíz	Tipo de callo
T ₀	0±0.0 ^d	100±0.02 ^a	100±0.32 ^a	NR
T ₁	100±0.23 ^a	80±0.21 ^b	70±0.030 ^b	Callos friable
T ₂	80±0.30 ^b	60±0.030 ^{cd}	20±0.40 ^c	Callo con pequeñas raíces
T ₃	30±0.12 ^d	30±0.30 ^e	90±0.01 ^a	Callos con raíces diferenciadas
T ₄	60±0.15 ^c	70±0.01 ^{bcd}	30±0.05 ^c	Callo friable
T ₅	80±0.30 ^b	70±0.12 ^{bcd}	30±0.25 ^c	Callos friable

Se expresan los valores de la media ± el error estándar (**n=5**). Letras diferentes por columna indican que hay diferencias significativas por el método de Tukey con p< 0.05. NR: no registrado

La inducción de callos es un requisito previo para el establecimiento de cultivo de células vegetales, estudio de modificaciones genéticas y selección de líneas sobre-productoras y la producción a gran escala de metabolitos secundarios. La morfología y el porcentaje de respuesta varía de acuerdo con el crecimiento exógeno a la naturaleza de la citocinina y a la relación de auxina/citocinina (Martin, 2002).

Los tratamientos T₁, T₄ y T₅ presentaron alta respuesta de callogénesis a partir de explantes de hojas y semillas. Kearney *et al.*, (1994) y Capataz, 2005 reportaron un 100% de callogénesis friable a partir de hojas utilizando el tratamiento T₅ (IBA-BAP: 4.0 mg/L: 1.0 mg/L) pero no reportaron inducción de callos friables utilizando explantes de semillas.

Rafiq y Dahot (2010) obtuvieron callos friables a partir de hojas y semillas maduras con igual porcentaje de inducción que el aquí reportado en medio MS suplementado con 3% de sacarosa y 0.25 mg/L de IAA/BAP. Por otra parte Singh

y Chatuverdi (2013) probaron una serie de tratamientos para la inducción de callos provenientes de hojas utilizando distintos RCV, encontrando que la combinación MS + BAP (2.0 μ M) - ANA (5.0 μ M) y MS+BAP (5.0 μ M) indujeron un 20.3 y 100 % de callos friables. Cabe destacar que al igual a este trabajo, el control (sin reguladores) no obtuvo respuesta.

7.2.-Cinetica de callos friables

Se realizaron cinéticas de crecimiento de los cultivos de callos provenientes de hojas y semillas. En la Figura 14a se observa el comportamiento de los distintos callos proveniente de hojas, donde todos alcanzaron su máxima biomasa a los 28 días de cultivo. El tratamiento T₅ fue el que generó mayor biomasa, con 533.37 mg P.S, seguido de T₁ y de T₄ con 399.92 mg P.S, y 378.95 mg P.S, respectivamente.

En los callos de tipo rizogénicos, el T₃ y T₂ solo alcanzaron una biomasa de 277.00 mg P.S y 255.40 mg P.S, respectivamente. En la cinética de callos proveniente de semillas (Figura 14b), se observó el mismo comportamiento de los callos provenientes de hojas. El tratamiento T₅ alcanzó 724.13 mg P.S de biomasa, seguido del tratamiento T₁ y T₄ con 635.66 mg P.S y 462.93 mg P.S, respectivamente. Finalmente, los tratamientos T₂ y T₃ alcanzaron 304 mg P.S y 195.47 mg P.S, respectivamente. Durante la inducción de los cultivos de callos provenientes de hojas y semillas, se determinó que el tratamiento T₅ proveniente de semillas es el más efectivo debido a su mayor producción de biomasa y por ser de tipo friable. Los reportes indican que al utilizar la combinación BAP e IBA (T₅) demuestran un callo con características similares y de crecimiento rápido, (Kearney *et al.*, 1994; Capataz., 2005)

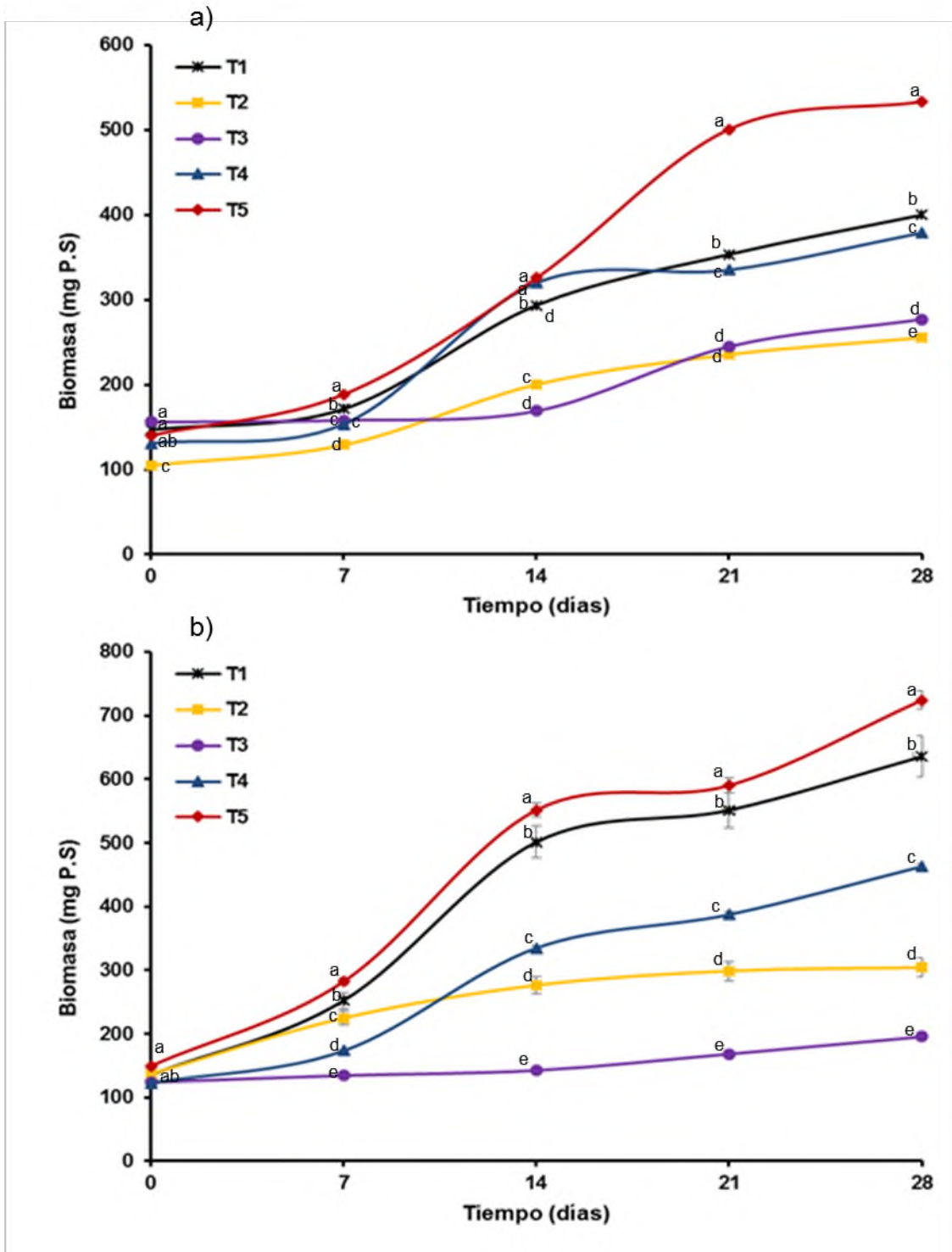


Figura 14.-Cinética de crecimiento de callos. a) Callos provenientes de hojas. b) Callos provenientes de semillas. Las barras de error representan el E.E (n=5). Letras diferentes indican que hay diferencias significativas por el método de Tukey con $p < 0.05$

7.3.-Análisis químicos de limonoides en callos.

En la Figura 15 se muestra el perfil cromatográfico de los extractos obtenidos a partir de los diferentes tipos de callos en su máximo día de crecimiento. Evidenciando que todos los callos acumularon azadiractina, presentado un R_f de 0.52 similar al del estándar (Aza). Así mismo se observaron la presencia de más bandas que pueden corresponder a otros limonoides.

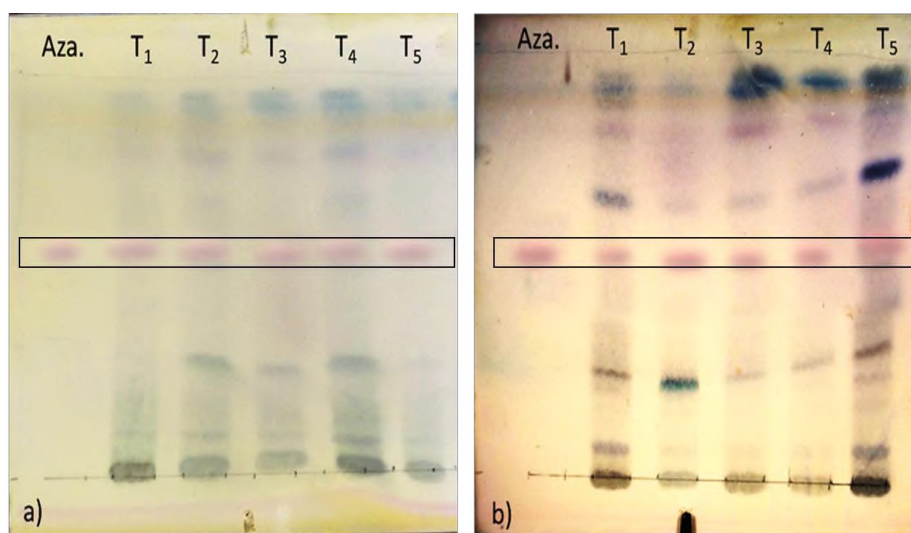


Figura 15.- Perfil cromatografico revelado con vainillina: ácido sulfúrico. a) Callos provenientes de hojas y b) Callos provenientes de semillas; Aza corresponde al estándar de azadiractina, T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅ son los tratamientos.

En la Tabla 10 se muestra la cuantificación de limonoides relacionados con la azadiractina (AZRL), la cual fue cuantificada en el día máximo crecimiento de los callos. Observándose que el tratamiento T₅ tanto en hojas como de semillas presentó la mayor acumulación de AZRL, con 819.240 μg AZRL/g P.S y 786.676 μg AZRL/g P.S, respectivamente. El tratamiento T₄ acumuló 738.431 μg AZRL/g P.S y 723.856 μg AZRL/g P.S en callos provenientes de semillas y hojas respectivamente. Los tratamientos con menor producción fueron T₂ y T₃ tanto en callos de hojas y semillas (Tabla 10).

Tabla 10.-Concentración de AZRL en callos de *A. indica*

Fuente	Hojas	Semillas
Tratamiento	µg AZRL/g P.S	µg AZRL/g P.S
T₁	762.96±1.01 ^b	770.18±0.81 ^b
T₂	681.35±0.65 ^e	710.82±1.81 ^d
T₃	714.86±1.12 ^{dc}	667.53±1.16 ^e
T₄	723.85±1.34 ^c	738.43±1.91 ^c
T₅	786.67±0.21 ^a	819.24±0.45 ^a

Se expresan los valores de la media ± el error estándar (n=5). Letras diferentes por columna indican que hay diferencias significativas por el método de Tukey con p< 0.05.

En el presente trabajo, la producción de AZRL fue mayor a los reportados en otras investigaciones. Rafiq y Dahot (2010) en cultivo de callos de hojas juveniles encontraron 16.1 µg AZRL/g P.S y 132.66 µg AZRL /g P.S en medio MS con 3% de sacarosa mediante las combinación de RCV de 0.25 mg/L de BAP- 0.1 mg/L de IAA y 0.25 mg/L de BAP e IAA, respectivamente. Además, la producción de AZRL en callos provenientes de semillas fue de 266.5 µg AZRL/g P.S cuando el medio de cultivo estaba suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP. El contenido de AZRL puede variar con la fuente de explante y la respuesta de la diferenciación celular. Se ha reportado que la mayor acumulación de los limonoides de *A. indica*, en especial la azadiractina se encuentra en las semillas, hojas, seguido de los cultivos de embriones cigóticos, y los cultivos de ovario (Govindachari *et al.*, 1992). Dai *et al.*, (1999), reportó que el contenido de Aza en relación a la producción de AZRL en semillas fue del 54.9%.

7.4.- Análisis molecular.

7.4.1.- Análisis RAPD en cultivos de callos de hojas.

Se realizó un análisis de variación somaclonal a los callos *in vitro* provenientes de los diferentes tratamientos de cultivos de callos *in vitro*. En los callos

obtenidos de los diferentes tratamientos se pudieron detectar un total de 99 bandas en 19 marcadores de los 26 analizados. La frecuencia promedio fue de 5.2 bandas por cebador. De las cuales el 78.8% corresponden a bandas polimórficas (Tabla 11). Se observaron 7 cebadores con 100% de bandas polimórficas (OPG-11, OPQ-2, OPQ-10, OPQ-12, OPQ-15, OPQ-16, OPQ-17) entre 200 y 3000 pb de peso molecular. Del total de 19 cebadores, solo dos presentaron un 100% de bandas monomórficas, el OPA-09 con tres bandas de un peso molecular de 1000 a 3000pb y OPQ-4 con 1 banda de 1000pb. El número de productos amplificados varió entre 1 (OPQ-4) a 12 (OPQ-6) con un tamaño de 100 a 3000 pb aproximadamente. La mayoría de los perfiles muestran similitud de bandeo en los tratamientos T₄ y T₅, con respecto a los demás tratamientos y la planta madre. Ambos tratamientos fueron inducidos con IBA y BAP pero con distintas concentraciones (Figura 16).

Tabla 11.-Análisis RAPDs de los callos provenientes de hojas

Cebadores	N. Total de bandas	Bandas polimórficas	% de bandas polimórficas.
OPA-05	5	1	20.0
OPA-08	4	3	75.0
OPA-09	3	0	0.0
OPA-10	4	3	75.0
OPA-20	3	2	66.7
OPG-11	7	7	100.0
OPB-01	4	3	75.0
OPH-09	6	6	100.0
OPK-04	7	5	71.4
OPQ-02	5	5	100.0
OPQ-04	1	0	0.0
OPQ-06	12	8	66.7
OPQ-10	6	6	100.0
OPQ-12	8	8	100.0
OPQ-13	3	2	66.7
OPQ-15	3	3	100.0
OPQ-16	6	6	100.0
OPQ-17	4	4	100.0
OPS-04	8	6	75.0
TOTAL	99	78	

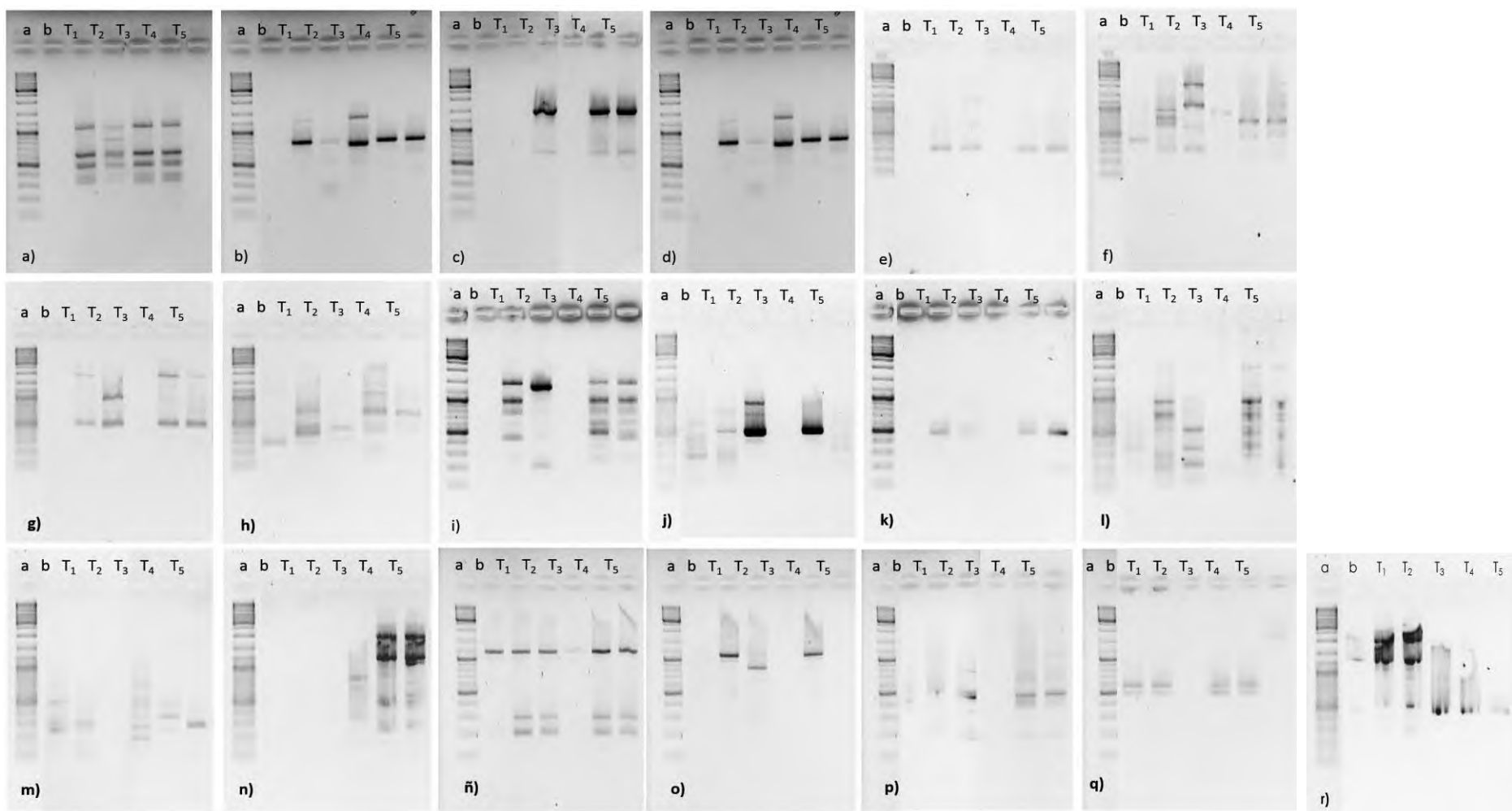


Figura 16.-Perfiles RAPD de callos provenientes de hojas en gel de agarosa al 2%; a) OPA-05, b) OPA-08, c) OPA-09, d) OPA-10, e) OPA-20, f) OPG-11, g) OPB-01, h) OPH-09, i) OPK-04, j) OPQ-02, k) OPQ-04, l) OPQ-06, m) OPQ-10, n) OPQ-12, ñ) OPQ-13, o) OPQ-15, p) OPQ-17, q) OPQ-18, r) OP.S-4. Dentro de cada perfil; a= marcador de peso molecular, GenRuler 100pb plus ladder, b= ADN y los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅).

En el dendograma podemos observar dos grupos, el primero está dado por todos los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅) y el segundo dado por el ADN de la planta madre, evidenciando que los cebadores seleccionados para este estudio fueron capaces de detectar la variación genética en los cultivos *in vitro* de callos provenientes de hojas obtenidos con respecto al ADN de la planta madre (Figura 17).

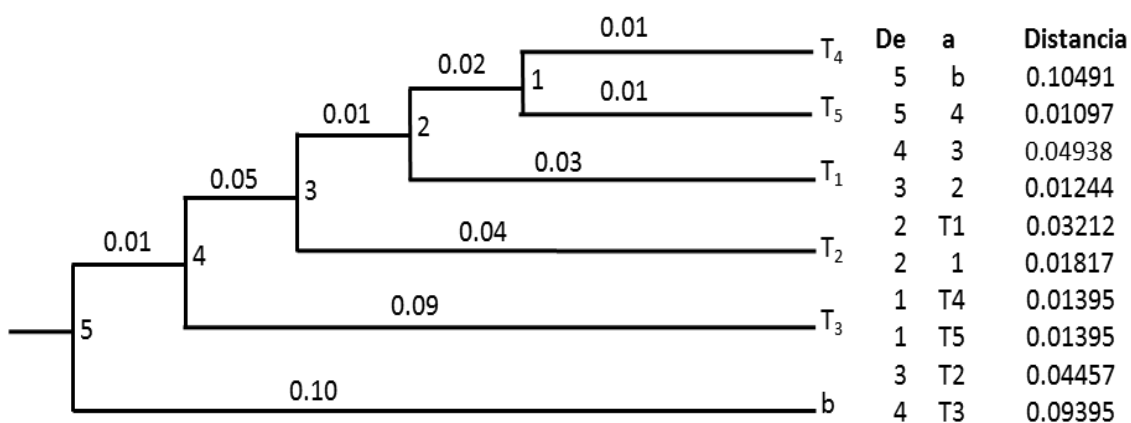


Figura 17.-Dendograma de callos provenientes de hojas basado en Nei (1979). Distancia genética entre ADN de tratamientos de callos de hojas juveniles en medio MS con diferentes concentraciones de RCV y el ADN de la planta madre usando UPGMA-MEGA 6 y PHYLIP Versión 3.69. T₁ a T₅ corresponde a ADN de tratamientos, el ADN genómico de planta madre se denomina b

Se calculó la distancia de similitud en relación a la planta madre (Tabla 12), donde la más alta similitud fue de 0.260 para el tratamiento T₃ suplementado con IAA (0.2 mg/L) – BAP (0.1 mg/L), por otra parte la similitud más baja fue de (0.028) con el tratamiento T₄ y T₅ suplementados con IBA (8 mg/L) – BAP(4 mg/L) e IBA (4.0 mg/L) - BAP(2.0 mg/L), respectivamente (Tabla 13).

Tabla 12.-Identidad genética de Nei (por encima de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) entre los tratamientos de ADN de callos provenientes de hojas en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal

Muestra de ADN	B	T₁	T₂	T₃	T₄	T₅
B	0.198	0.193	0.260	0.194	0.204
T₁	0.198	0.077	0.155	0.058	0.071
T₂	0.193	0.077	0.242	0.084	0.107
T₃	0.260	0.155	0.242	0.148	0.207
T₄	0.194	0.058	0.084	0.148	0.028
T₅	0.204	0.071	0.107	0.207	0.028

B: Planta madre

7.4.2- Análisis RAPD en cultivos de callos provenientes de semillas

En los callos provenientes de semillas se observó un 90% de polimorfismo. Con un total de 109 bandas en 18 cebadores de los 26 analizados (Tabla 13), con una frecuencia de 6 bandas por cada cebador aproximadamente.

De los 18 cebadores solo 10 mostraron 100% de polimorfismo (OPA-05, OPK-4, OPQ-10, OPG-11, OPB-1, OPQ-2, OPQ-12, OPQ-13, OPQ-15 y OPQ-4). El cebador con mayor número de bandas fue el OPQ-6, con 10 bandas, 9 de ellas fueron polimórficas y 1 monomórfica. Por otra parte, los cebadores OPA-08 y OPQ-17, fueron los que mostraron menos bandas amplificadas (2 bandas) siendo una de ellas polimórfica. Todas las bandas amplificadas estuvieron en el rango de 200 a 6000 pb, respectivamente (Figura 18).

Tabla 13.-Los cebadores utilizados para el análisis RAPD de callos de provenientes de semillas y las características de banda obtenidos para los callos de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores y semillas como planta madre.

Cebadores	N. Total de bandas	Bandas polimórficas	% de bandas polimórficas
OPA-05	8	8	100.0
OPA-08	2	1	50.0
OPA-09	5	4	80.0
OPA-10	8	7	87.5
OPA-20	7	6	85.7
OPG-11	6	6	100.0
OPB-01	5	5	100.0
OPH-09	9	8	88.9
OPK-04	8	8	100.0
OPQ-02	5	5	100.0
OPQ-04	4	4	100.0
OPQ-06	10	9	90.0
OPQ-10	7	7	100.0
OPQ-12	5	5	100.0
OPQ-13	5	5	100.0
OPQ-15	5	5	100.0
OPQ-16	8	5	62.5
OPQ-17	2	1	50.0
TOTAL	109	99	

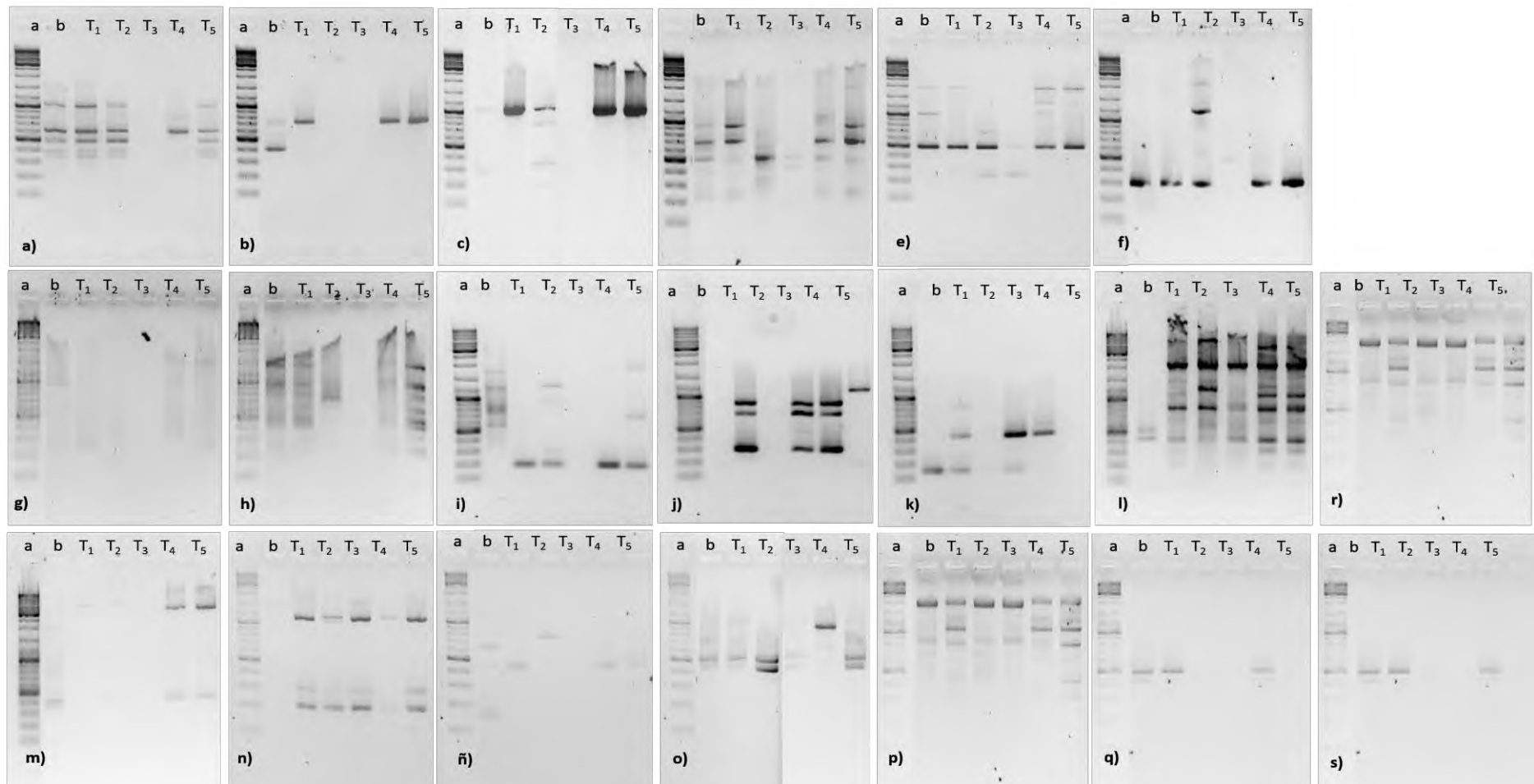


Figura 18.-Perfiles RAPD de callos provenientes de semillas. a) OPA-05, b) OPA-08, c) OPA-09, d) OPA-10, e) OPA-20, f) OPG-11, g) OPB-01, h) OPH-09, i) OPK-04, j) OPQ-02, k) OPQ-04, l) OPQ-06, m) OPQ-10, n) OPQ-12, ñ) OPQ-13, o) OPQ-15, p) OPQ-16, q) OPQ-17, r) OP.S-4, s) OP.S-2. Dentro de cada perfil; a= marcador de peso molecular, GenRuler 100pb plus ladder, b= ADN y los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅).

En el dendograma (Figura 19) se observan dos grupos. El primero está dado por los tratamientos T₅, T₄, T₁, b, y T₂. Por otro lado, el segundo grupo está dado por T₃. Dentro del primer grupo, el tratamiento T₄ y T₅ tienen una distancia genética de 0.02, seguido del tratamiento es el T₁ con una distancia de 0.04. Siendo estos más cercanos a la planta madre (b).

En la Tabla 14 se observa la matriz de similitud, donde la menor similitud se encuentra en el tratamiento T₃, suplementado con IAA (0.2 mg/L) – BAP (0.1 mg/L) y ADN de la planta madre. La mayor similitud se observa en los tratamientos T₄ y T₅ con 0.044 suplementado con RCV IBA (8mg/L) – BAP (4mg/L), IBA (4mg/L) – BAP (1mg/L), respectivamente.

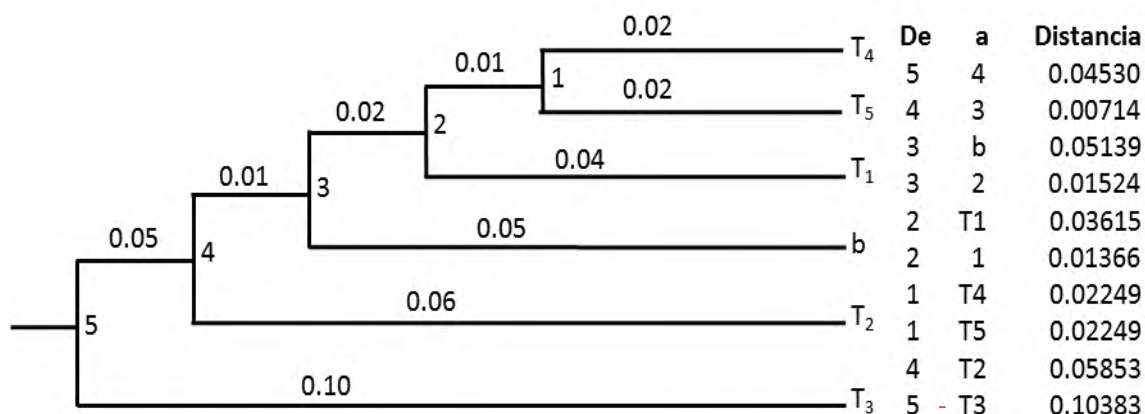


Figura 19.-Dendograma de callos de semillas basado en Nei (1979). Distancia genética entre ADN de tratamientos de callos de hojas juveniles en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores y el ADN de la planta madre usando UPGMA-MEGA 6 y PHYLIP Versión 3.69. T₁ a T₅ corresponde a ADN de tratamientos, (b) es ADN genómico de planta madre.

Tabla 14.-Identidad genética de Nei (por encima de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) entre los tratamientos de ADN de callos provenientes de semillas en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal y el ADN genómico extraído de la planta madre.

Muestra de ADN	B	T₁	T₂	T₃	T₄	T₅
B	0.086239	0.112370	0.312914	0.125255	0.096837
T₁	0.086239	0.102394	0.154745	0.075207	0.069400
T₂	0.112370	0.102394	0.152719	0.139630	0.113816
T₃	0.312914	0.154745	0.152719	0.184122	0.235803
T₄	0.125255	0.075207	0.139630	0.184122	0.044984
T₅	0.096837	0.069400	0.113816	0.235803	0.044984

7.4.3- Relación de los reguladores de crecimiento vegetal con respecto a la variación somaclonal y la producción de AZRL en cultivos *in vitro* de callos de *A. indica*

En la tabla 15 se observa la relación de los RCV con respecto a la variación somaclonal y la producción de AZRL en los cultivos *in vitro* de callos de *A. indica*.

En los cultivos *in vitro* provenientes de hojas se observa una relación a la variación somaclonal con respecto al medio de cultivo (RCV). La distancia genética es mayor cuando el medio de cultivo esta suplementado con los RCV: IBA y BAP. En los tratamientos T₅ y T₄ se identificó que la variación genética fue similar, sin embargo, al disminuir la concentración de RCV la producción se vio favorecida al Tratamiento T₅. No así para los cultivos *in vitro* provenientes de semilla, donde la distancia genética se ve afectada por los RCV.

Tabla 15.-Relación de RCV con respecto a la variación somaclonal y producción de AZRL en callos de *A. indica*

Tratamientos	CH		CS	
	DG	AZRL µg AZRL/g P.S	DG	AZRL µg AZRL/g P.S
Planta madre	10.49	20989.86	5.13	65069.60
T ₁ : ANA(2.0 mg/L) - BA(1.0 mg/L)	3.21	759.59	3.61	770.17
T ₂ : ANA(1.0 mg /L) - KIN(0.5 mg/L)	4.45	754.90	5.85	756.19
T ₃ : IAA(0.2 mg/L) – BAP(0.1 mg/L)	9.39	683.93	10.38	771.71
T ₄ : IBA(8.0 mg/L) – BAP(4.0 mg/L)	1.39	730.73	2.24	738.43
T ₅ : IBA(4.0 mg/L) - BAP(1.0 mg/L)	1.39	782.68	2.24	819.24

CH: Callos provenientes de hojas, CS: Callos provenientes de semillas

DG: Distancia genética (Nei's).

La variación somaclonal ha sido muy estudiada en otras especies vegetales, pero estos son muy escasos para *A. indica*. Algunos reportes demuestran variación genética en hojas mediante cebadores (SPAR) en conjugación de ISSR (Singhet *et al.*, 2002), así mismo (2003) Singh *et al.*, mediante marcadores RAPD identificaron variación somaclonal en árboles de *A. indica* de 29 regiones agroecológicas de la India, de 24 cebadores aleatorios solo 14 mostraron polimorfismo generando un total de 79 bandas. Por otro lado, Kota *et al.*, 2006, reportaron variación somaclonal de árboles de *A. indica* que con alto y bajo contenido de azadiractina, así como polimorfismo en el ADN mediante cebadores RAPD en hojas tiernas, plántulas *in vitro* y callos a partir de explantes.

En este estudio se encontró variación somaclonal de los callos provenientes de hojas y de semillas y variación en la producción de AZRL dado por las combinaciones de RCV. De manera que, a mayor distancia genética mayor es la producción de AZRL en callos de hojas no así para callos de semillas.

Por otra parte, en estudios de otras especies vegetales se ha reportado una alta variabilidad relacionada a los reguladores de crecimiento vegetal con respecto al

ADN de la planta madre, de forma similar a los resultados obtenidos en esta investigación utilizando cebadores RAPD. En callos de *Nicotiana tabacum* se encontró variabilidad generada por los subcultivos y la exposición de los explantes a RCV durante periodos largos (Ghartavol *et al.*, 2010). Por otro lado, se observó variabilidad genética en cultivos de callos de *Jatropha curcas* usando diferentes combinaciones de RCV, generando 91.12% de polimorfismo en callos, con una distancia de 0.82 de la planta madre con respecto a los demás tratamientos de callos que fueron mantenidos en medio MS suplementados con IBA 0.4mg/L- BAP 4mg/L, y 0.53 de distancia cuando la combinación fue MS suplementado con IBA 0.2 mg/L y 2.0 mg/L BAP (Jose *et al* 2012).

Estos datos sugieren que la disponibilidad de los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo regula el patrón genético. Los marcadores RAPD pueden utilizarse para detectar la variación somaclonal con el fin de identificar el efecto de la auxina y/citoquinina en el ARN poliadenilado de la incorporación de los cambios genéticos.

7.5.- Suspensiones Celulares

Se establecieron suspensiones celulares a partir de los callos provenientes de los tratamientos T₁ T₄ y T₅, originados de explantes de hojas y semillas. Los cultivos celulares del tratamiento T₅ fueron de color amarillos y de crecimiento rápido, las del tratamiento T₄ las células fueron de color crema, y su disgregación fue tardía. Las células del T₁ fueron de color blanquecinas, de crecimiento y disgregación rápida, en general todos los cultivos comenzaron a disgregarse a los primeros 3 días en medio líquido (Figura 20a). Después de 2 semanas de cultivo, las células fueron transferidas a nuevo medio de cultivo (Figura 20b). Las suspensiones celulares fueron subcultivadas cada 15 días por adición de un medio de cultivo nuevo.

En general, todas las suspensiones celulares de *A. indica* establecidas presentaron una viabilidad entre el 80- 85% (células sin tinción con el colorante) (Figura 21).

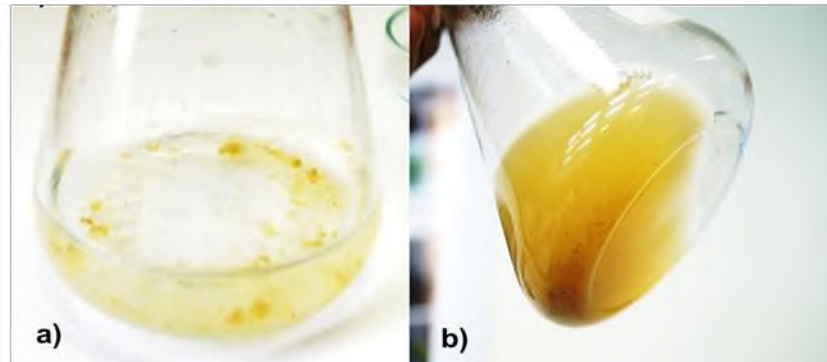


Figura 20.-Suspensiones Celulares a) células a los 3 días de la inoculación, b) células a los 14 días de la inoculación.



Figura 21.-Células de *A. indica* viables en división activa (tinción con azul de Evans) a (10x)

7.6.- Análisis químicos de limonoides en suspensiones celulares

Se realizó un perfil cromatográfico de las suspensiones celulares de *A. indica*, observándose la presencia de azadiractina (Aza) en todos los cultivos (Figura 22) con un factor de retención de 0.52. También se observaron la presencia de más bandas que quizás correspondan a otros limonoides.

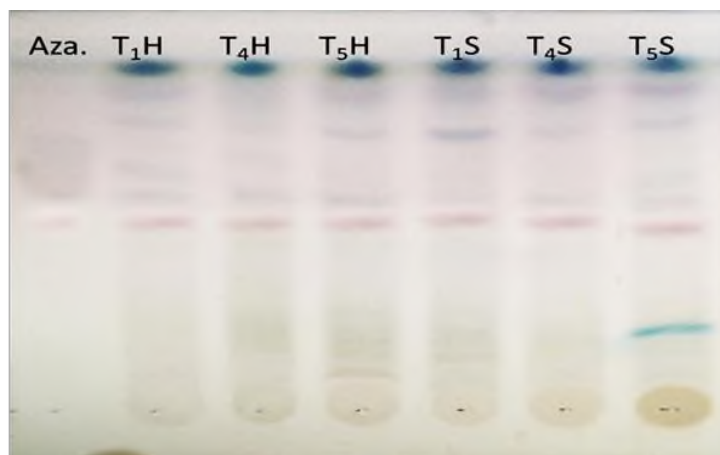


Figura 22.-Perfil cromatográfico de suspensiones celulares, revelado con vainillina: ácido sulfúrico ; Aza corresponde al estándar de Azadiractina, T₁, T₄ y T₅ son los tratamientos de hojas y semillas.

Se realizó la cuantificación de AZRL de los cultivos celulares de *A. indica* (Tabla 16). La suspensiones celulares del tratamiento T₅ provenientes de callos de semillas, mostraron la mayor producción de AZRL (256.45 mg AZRL/L), seguido del tratamiento T₁ con una producción de 221.82 mg AZRL/L. Mientras que las suspensiones de generadas a partir de los callos provenientes de hojas en los tratamientos T₁ y T₅ obtuvieron una producción de 194.98 mg AZRL/L y 212.29 mg AZRL/L respectivamente.

Tabla 16.-Producción de AZRL en cultivos celulares de *A. indica*.

Tratamiento	CH	CS
	mg AZRL/L	mg AZRL/L
T ₁	194.98±0.1 ^b	221.82±0.4 ^b
T ₄	171.89±0.5 ^c	175.93±0.7 ^c
T ₅	212.29±0.2 ^a	256.45±0.4 ^a

CH: suspensiones a partir de callos provenientes de hojas

CS: suspensiones a partir de callos provenientes de semillas.

Se expresan los valores de la media ± la desviación estándar. Letras diferentes por columna indican que hay diferencias significativas por el método de Tukey con p < 0.05.

La producción de AZRL en las suspensiones obtenidas en el tratamiento T₅ fueron mayor a los resultados mostrados por Raval *et al.*, (2003) quienes reportaron una producción máxima de 2.7 mg AZRL/L y 4.5 mg AZRL/L en sistemas de producción en una y dos etapas respectivamente. Rafiq y Dahot (2010) obtuvieron 351.2 µg AZRL/ 50 mL en suspensiones celulares provenientes de hojas mantenidos en medio MS con 3% de sacarosa.

Existen reportes donde solo cuantifican el limonoide Aza en suspensiones celulares utilizando la misma combinación de RCV en la cual se obtuvo mayor producción de AZRL. La producción de Aza en suspensiones celulares de cultivos de callos proveniente de hojas fue de 5.36 mg / L (Kuruvilla *et al.*, 1999) mientras que Capataz (2005), alcanzó una producción de Aza a de 27.31 mg/L.

7.7.- Cinética de crecimiento y producción de AZRL en suspensiones celulares.

Se realizó una cinética de crecimiento y de producción de AZRL en las suspensiones celulares provenientes de callos de semillas (Figura 23). En la figura 23a puede apreciarse la fase lag de aproximadamente 3 días, una fase de crecimiento exponencial entre los 3 y 9 días aproximadamente, donde la mayor producción de biomasa fue de 12.13 g P.S/L (día 9). Con una velocidad máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de 0.82 d⁻¹ con un tiempo de duplicación de 0.84 días. Los cultivos celulares no presentaron fase estacionaria y la fase de muerte se presentó a partir del día 12. El contenido de sustrato fue disminuyendo de manera gradual hasta llegar al día 12 con una concentración de 8.94 g/L.

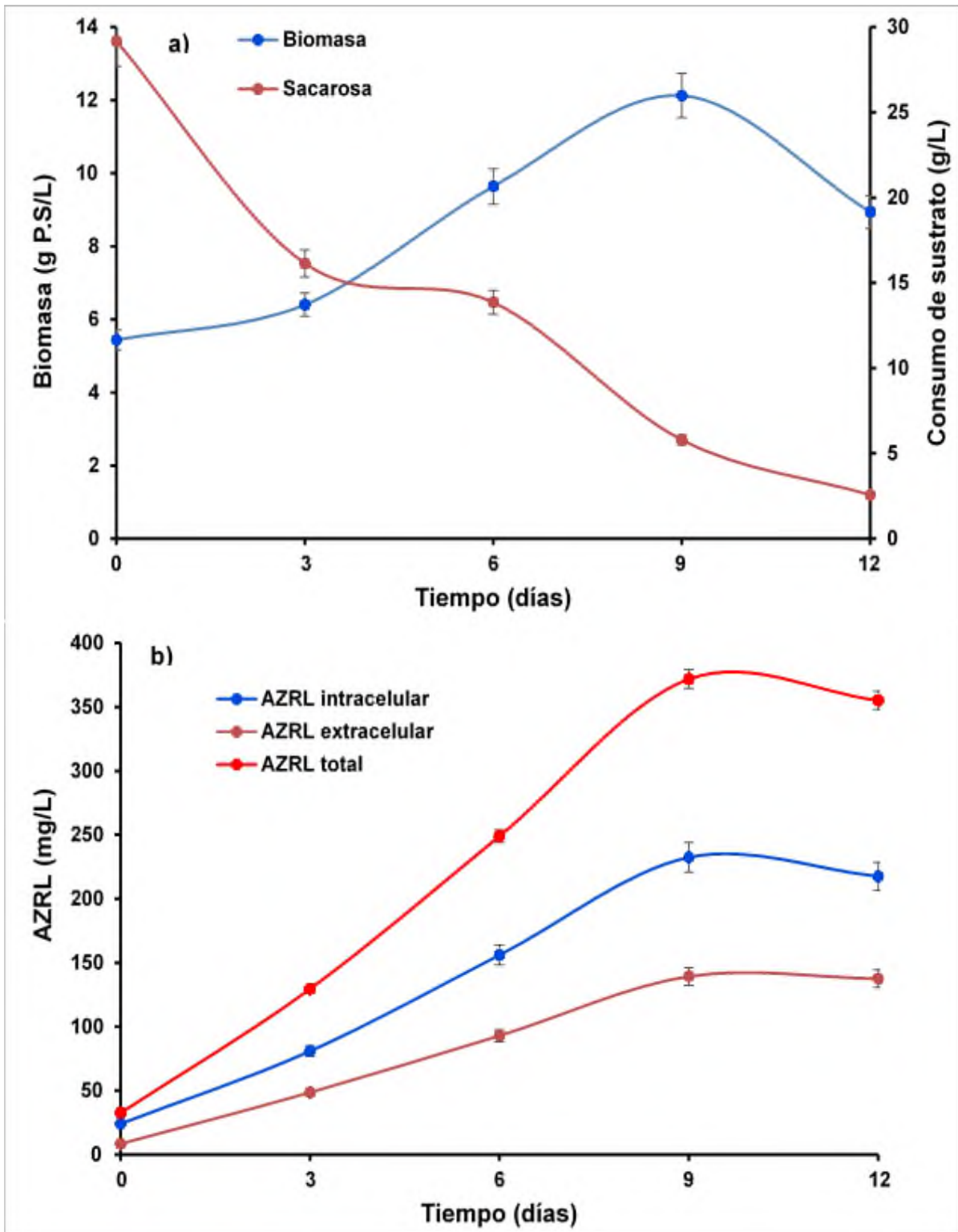


Figura 23.-Cinética de crecimiento, consumo de sacarosa y de producción de AZRL en suspensiones celulares de *A. indica*. Las barras de error representan el E.E (n=3)

En la Figura 23b se muestra el comportamiento de la producción de AZRL. La producción de AZRL fue máxima en el día 9 del cultivo, alcanzando un contenido total de 371.86 mg/L, donde 232.44 mg/L fueron producidos a nivel intracelular y 139.42 mg/L a nivel extracelular.

Los resultados son similares a lo reportado por Balaji *et al.*, (2003) donde la cinética no presentó fase estacionaria, y la fase exponencial se observó en los días 5 a 10, el mayor crecimiento de biomasa fue al día 10, mientras que la máxima producción de Aza fue a los 7 días, sin embargo el medio de cultivo fue completamente diferente, ½ B5 suplementado con 2.0 mg/L de dicamba y 1.0 mg/L Kin.

Otros autores realizaron estudios de producción de AZRL, observando la máxima producción a partir de la 4ta semana a la inoculación (Sujanya *et al* 2008; Rafiq y Dahot, 2010), por otra parte Babu *et al.*, (2006) reportaron que la fase exponencial fue a partir de los 9 a 15 días después de inoculación y la máxima producción, al igual a lo que reporta Wewetzer (1998), donde reportó la máxima concentración de Aza a finales de la fase exponencial. Estos datos concuerdan con los de esta investigación, al observar la máxima concentración de limonoides al final de la fase exponencial; sin embargo las células de T₅ se duplicaron de manera rápida, ya que en la fase exponencial fue de 5 a 10 días.

Comparando con otras especies vegetales el valor de $\mu_{\text{máx}}$ encontrado en este estudio para crecimiento de células en suspensión fue mayor. En suspensiones celulares de *Panax ginseng* se ha reportado una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.17 d⁻¹ (Wu *et al.*, 2005), *Taxus chinensis* de 0.12 d⁻¹ (Dong y Zhong, 2002) y *Thevetia peruana* de 0.17 d⁻¹ (Arias *et al.*, 2009).

7.8.- Análisis molecular

7.8.1. Variación somaclonal de suspensiones celulares provenientes de callos de hojas

Se observó un 85.5% de polimorfismo en los tratamientos de cultivos celulares en suspensión de callos friables provenientes de, T₁, T₄ y T₅ comparados con ADN de hojas. Los tratamientos fueron mantenidos en medios de cultivos suplementados con RCV en distintas combinaciones. Se probaron 26 cebadores de los cuales 20 mostraron bandas (bandas), con una frecuencia de 5.6 bandas por cebador aproximadamente (Tabla 17). Al menos 12 cebadores mostraron 100% de bandas polimórficas, dentro de las que destacan son OPQ-13, OPQ-16 y OPA-09 con 10 y 9 bandas amplificadas respectivamente. El OPQ-13 y OPQ-10 mostraron más bandas, mientras que el OPB-1, OPG-11, OPB-1, OPH-9 y OPK-4 solo 2 bandas.

En la Figura 24 se observan los perfiles RAPDs, donde la variabilidad entre tratamientos de cultivos en suspensión es notoria, las bandas oscilan de 200 pb a 6000 pb respectivamente. En OPQ-16, los tratamientos T₁, T₄ y T₅ amplificaron de 3 a 4 bandas, mientras el control (6 bandas) todas fueron polimórficas. El OPQ-17 amplificó 6 bandas de 200 a 6000pb, el T₅ y T₄ comparten una banda de 200pb y 2500pb, y el control tiene bandas de las cuales no coinciden con bandas de los tratamientos. En OPQ-05 los tratamientos T₁, T₄ y T₅ mostraron 6 bandas amplificadas en distintos tamaños de peso molecular, no así para el control. En OPQ-08 el T₅ y T₄ comparten una banda con el control de un peso molecular de 300pb (el T₁ no amplificó).

Tabla 17.-Los cebadores utilizados para el análisis RAPD y las características de banda obtenidos de los cultivos en suspensión de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores y hojas como planta madre.

Cebadores	N. Total de bandas	Bandas polimórficas	% De bandas polimórficas.
OPA-05	10	9	90.0
OPA-08	4	3	75.0
OPA-09	9	9	100.0
OPA-20	4	2	50.0
OPG-11	2	1	50.0
OPB-01	2	2	100.0
OPH-09	2	2	100.0
OPK-04	2	2	100.0
OPQ-02	5	5	100.0
OPQ-04	5	5	100.0
OPQ-06	9	7	77.8
OPQ-10	10	9	90.0
OPQ-12	1	1	100.0
OPQ-13	10	10	100.0
OPQ-15	7	7	100.0
OPQ-16	9	9	100.0
OPQ-17	6	5	83.3
OPQ-18	4	4	100.0
OPR-4	9	2	22.2
OP.S-2	3	3	100.0
Total	113	97	

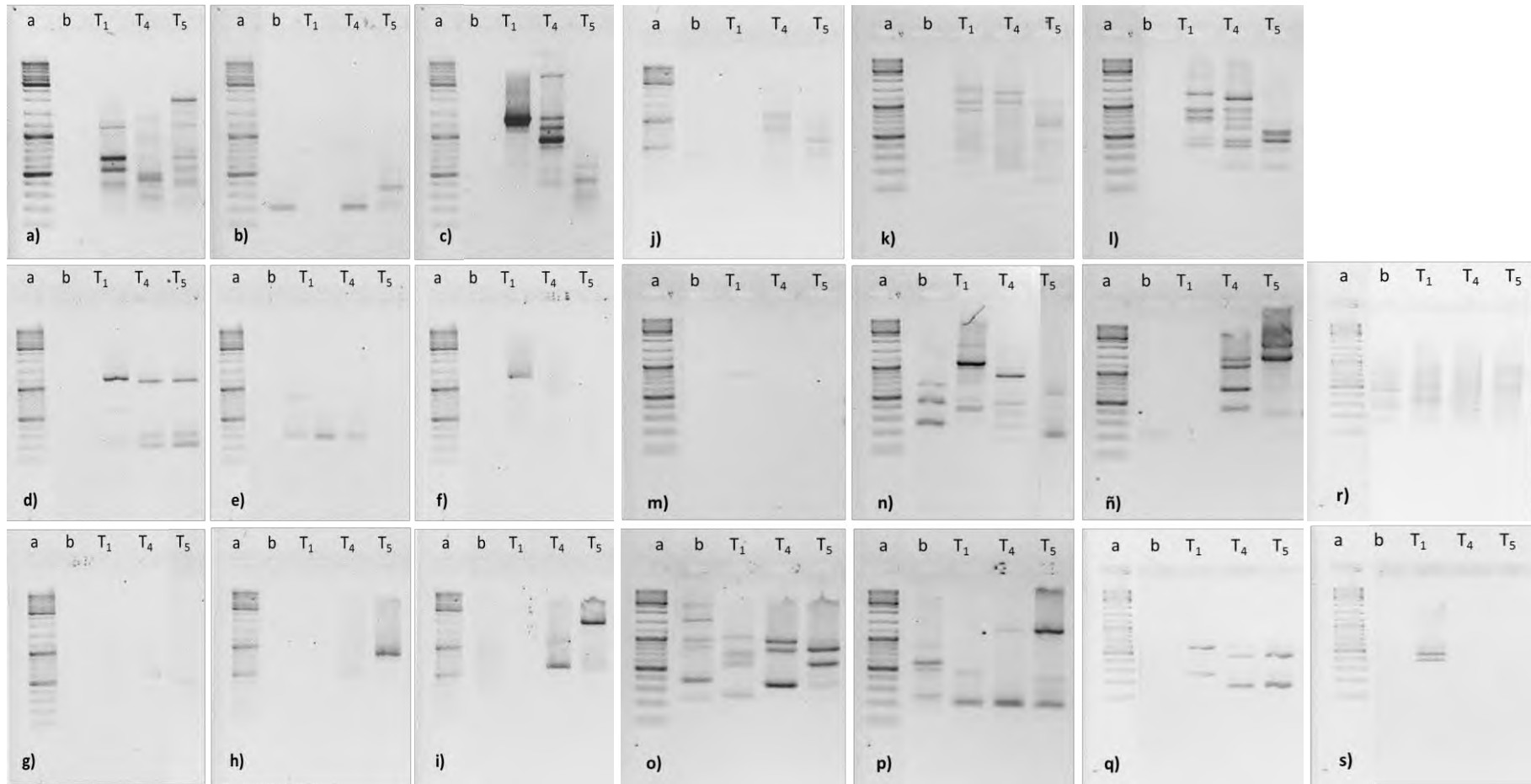


Figura 24.-Perfiles RAPD de suspensiones de callos de hojas; a) OPA-05, b) OPA-08, c) OPA-09, d) OPA-10, e) OPA-20, f) OPG-11, g) OPB-01, h) OPH-09, i) OPK-02, j) OPQ-04, k) OPQ-06, l) OPQ-10, m) OPQ-12, n) OPQ-13, ñ) OPQ-15, o) OPQ-16, p) OPQ-17, q) OPQ-18, r) OP.S-4, s) OP.S-2. Dentro de cada perfil; a= marcador de peso molecular, GenRuler 100pb plus ladder, b= ADN y los tratamientos (T₁, T₂, T₅)

Respecto al dendograma (Figura 25) se observan dos grupos; el primero está dado por los tratamientos (T₄, T₅ y T₁), el segundo grupo sólo está representado por el ADN de la planta madre. Los tratamientos T₅ y T₄ tienen una distancia mayor con respecto a la planta madre.

La mayor distancia de similitud fue de 0.207 cuando el T₅ y la muestra de la planta madre (b) y la menor similitud fue de 0.088 T₅ con y T₄ respectivamente (Tabla 18)

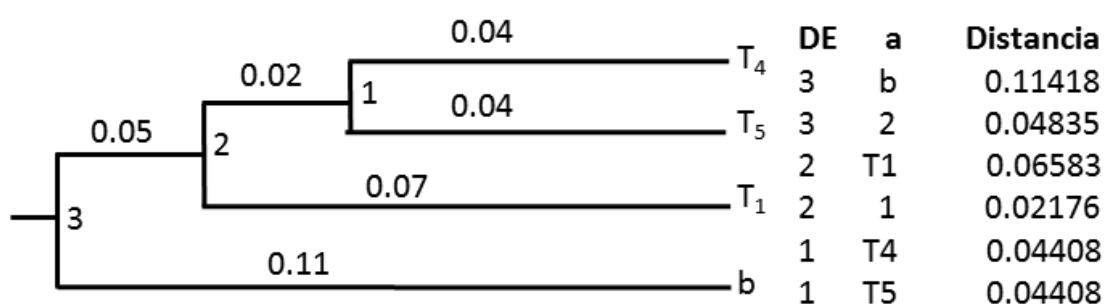


Figura 25.-Dendograma de suspensiones celulares provenientes de callos de hojas basado en Nei's (1979). Distancia genética entre ADN de tratamientos de callos de hojas juveniles en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores y el ADN de la planta madre usando UPGMA-MEGA 6 y PHYLIP Versión 3.69. T₁ a T₅ corresponde a ADN de tratamientos, (b) es ADN genómico como planta madre.

Tabla 18.-Identidad genética de Nei (por encima de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) entre los tratamientos de ADN de suspensiones de callos de semillas en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal y

Muestra de ADN	B	T ₁	T ₄	T ₅
B	0.229779	0.248046	0.207274
T ₁	0.229779	0.116674	0.146661
T ₄	0.248046	0.116674	0.088156
T ₅	0.207274	0.146661	0.088156

7.8.2.- Variación somaclonal de suspensiones celulares provenientes de callos de semillas.

En lo que respecta a los RAPDs de suspensión de callos de semillas, los tratamientos T₁, T₄ y T₅, mostraron 87% de polimorfismo en 16 cebadores de 26 analizados (Tabla 19). En 9 cebadores se observó 100% de polimorfismo, en el perfil de OPQ-6 y OPQ-18 con 10 bandas polimórficas, OPQ-15 con 9 bandas, OPQ-16 con 7, OPH-9 con 6, OPK-4 con 5 y OPA-08, OPA-20, con 4 bandas polimórficas.

El OPQ-6 y OPQ-18 mostraron el mayor número de bandas (10), todas polimórficas, el OPQ-10 también tiene 10 bandas y solo 3 son monomórfica y el resto corresponden a bandas polimórficas, el OPQ-17 fue el que amplificó menos bandas (2) siendo todas monomórficas. Con un total de 101 bandas amplificadas entre polimórficas y monomórficas.

El cebador OPA-05 (Figura 26) se puede observar el T₅ muestran bandas adicionales de aproximadamente 2000pb con respecto a los T₁ y T₄, muy diferentes del control (b), el T₁ y T₄ presentan bandas del mismo peso molecular. El OPA-08 amplificó bandas similares en T₁ y T₄ de aproximadamente 2500pb con respecto al control, no así para el T₅ que amplificó una banda de 750pb. En el OPA-09 el tratamiento T₁ y T₄ comparten 2 bandas de igual peso molecular con respecto al control de 750, 1000 y 1250pb respectivamente, no así con el T₅ que solo comparte 2 bandas con el resto de los tratamientos, en algunos geles de agarosa no se observaron amplificación de bandas en los tratamientos como por ejemplo en OPA-20.

El cebador OPQ-17 mostró 2 bandas en T₁, T₄ y T₅ de igual peso molecular de aproximadamente 750 a 1000pb que corresponden a bandas monomórficas, no así para el control.

Tabla 19.-Los cebadores utilizados para el análisis RAPD y las características de banda obtenidos para los cultivos en suspensiones de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores y semillas como planta madre

Cebadores	N. Total de bandas	Bandas polimórficas	% De bandas polimórficas.
OPA-05	7	6	85.7
OPA-08	4	4	100.0
OPA-09	4	2	50.0
OPA-20	4	4	100.0
OPG-11	5	5	100.0
OPB-01	8	6	75.0
OPH-09	6	6	100.0
OPK-04	5	5	100.0
OPQ-04	7	5	71.4
OPQ-06	10	10	100.0
OPQ-10	10	7	70.0
OPQ-13	3	2	66.7
OPQ-15	9	9	100.0
OPQ-16	7	7	100.0
OPQ-17	2	0	0.0
OPQ-18	10	10	100.0
Total	101	88	

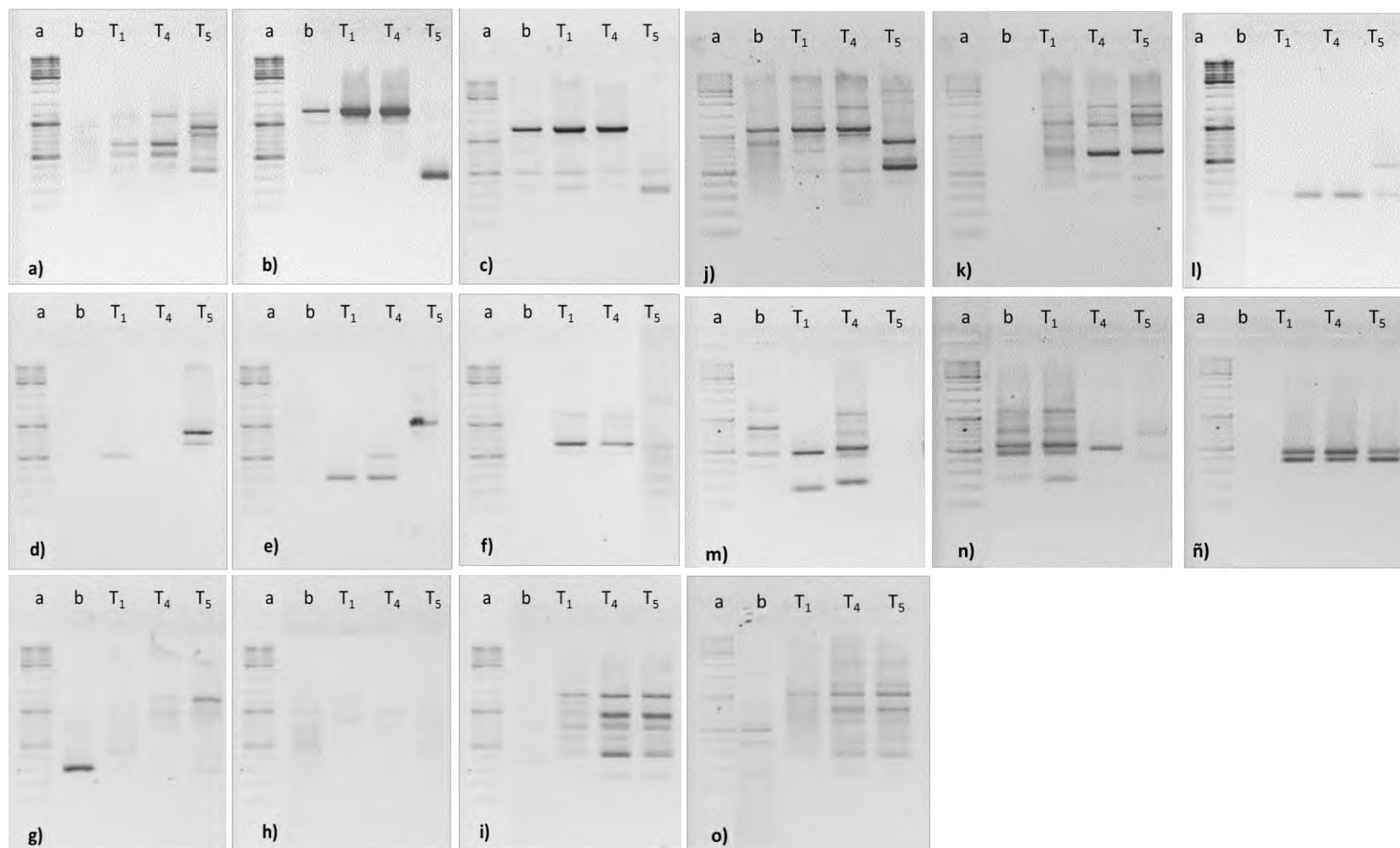


Figura 26.-Perfiles RAPD de suspensiones de callos de semillas; a) OPA-05, b) OPA-08, c) OPA-09, d) OPA-20, e) OPG-11, f) OPB-1, g) OPQ-09, h) OPK-04, i) OPQ-04, j) OPQ-06, k) OPQ-10, l) OPQ-13, m) OPQ-15, n) OPQ-16, ñ) OPQ-17, o) OPQ-18. Dentro de cada perfil; a= marcador de peso molecular, GenRuler 100pb plus ladder, b= ADN y los tratamientos (T₁, T₂, T₅)

Mediante el dendograma (UPGMA- Figura 27) se observa que se divide en dos grupos, el primero está dado por los tratamientos T₅, T₄ y T₁, el segundo está el ADN de la planta madre. Estos dos grupos se unieron a un nivel de distancia de 0.08. De acuerdo a los datos de similitud (Tabla 20) se identifica la mayor distancia genética está dada entre El ADN de la plata madre y el T₅ con una distancia de 0.171085 y la menor distancia es de 0.084544 en muestras de T₄ y T₅ respectivamente.

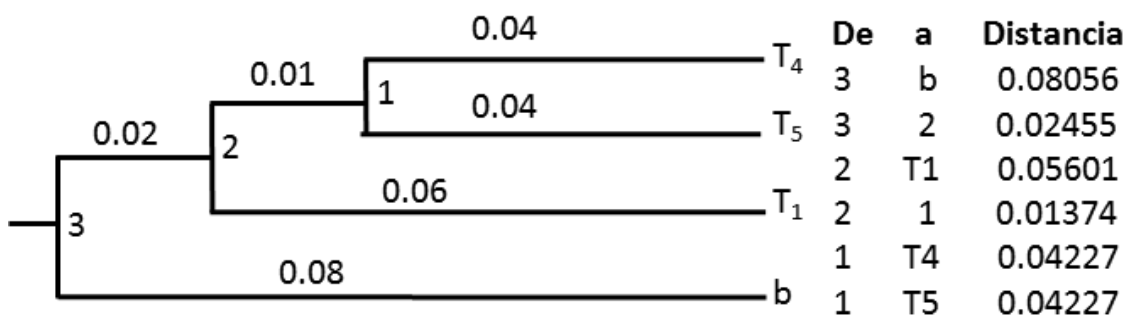


Figura 27.-Dendograma de suspensiones celulares provenientes de callos de semillas basado en Nei's (1979). Distancia genética entre ADN de tratamientos de callos de hojas juveniles en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores y el ADN de la planta madre usando UPGMA-MEGA 6 y PHYLIP Versión 3.69. T₁ a T₅ corresponde a ADN de tratamientos, (b) es ADN genómico de planta madre.

Tabla 20.-Identidad genética de Nei's de suspensiones de callos de semillas (por encima de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) entre los tratamientos de ADN de suspensiones de callos de semillas en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal y el ADN genómico extraído de la planta madre

Muestra de ADN	B	T ₁	T ₄	T ₅
B	0.149533	0.162714	0.207274
T ₁	0.149533	0.093279	0.130752
T ₄	0.162714	0.093279	0.084544
T ₅	0.171085	0.130752	0.084544

7.8.3.- Relación de la variación somaclonal con respecto a la producción de AZRL con diferentes tipos de reguladores de crecimiento vegetal.

La variación somaclonal en suspensiones celulares provenientes de callos de hojas/semillas se ven afectadas por la combinación de RCV y la producción de AZRL, se observándose en la tabla 21, que a más alta distancia genética la producción de AZRL es mayor cuando los tratamientos tienen IBA(4.0 mg/L), BAP(1.0 mg/L) en su composición.

Tabla 21.-Relación de RCV con respecto a la variación somaclonal y producción de AZRL en suspensiones celulares

TRATAMIENTOS	SUSPENSIONES (C/H)		SUSPENSIONES (C/S)	
	DG	AZRL	DG	AZRL
T ₀ : S/R	11.41	NR	8.05	NR
T ₁ : ANA(2.0 mg/L) - BA(1.0 mg/L)	6.58	194.98	5.60	221.82
T ₄ : IBA(8.0 mg/L) – BAP(4.0 mg/L)	4.4	171.89	4.22	175.93
T ₅ : IBA(4.0 mg/L) - BAP(1.0 mg/L)	4.4	212.29	4.22	256.45

DG: Distancia genética (Nei's), S/R: Sin reguladores de crecimiento vegetal, NR: Sin Respuesta, C/H: callos de hojas, C/S: callos de semillas.

La variación somaclonal en suspensiones celulares resultó una propuesta interesante, ya que en la literatura no existen reportes para *A. indica*. Mientras que para otras especies los estudios son amplios. Los resultados en esta investigación indican que la combinación de los RCV inducen variación somaclonal y en la producción AZRL en *A. indica*. Jikku *et al.*, (2012) reportaron en suspensiones celulares de *Jatropha curcas* la variación somaclonal debida a la combinación de RCV. Mientras que Fu *et al.*, (2012) reportaron en suspensiones celulares de *Taxus sp.*, variación somaclonal inducida por los subcultivos y hubo correlación con la disminución en la producción de paclitaxel (taxol). En ambos casos se observó que existe relación del efecto de los RCV para inducir metabolitos secundarios y variación somaclonal.

VIII.-CONCLUSION

Los cultivos *in vitro* de *Azadirachta indica* presentaron variación tanto somaclonal como en la producción de limonoides relacionados con la azadiractina en función de la combinación de reguladores de crecimiento vegetal.

IX.- RECOMENDACIONES

1. Cuantificar e identificar Aza y otros limonoides en los cultivos *in vitro* de callos y suspensiones.
2. Conocer los eventos bioquímicos y moleculares involucrados en los mecanismos de transducción de las señales, así como la vía de la biosíntesis de limonoides; lo que permitirá plantear estrategias para estimular la acumulación de limonoides en especial de Aza.
3. Evaluar la actividad biológica de los e cultivos *in vitro* de callos y suspensiones celulares de *A. indica*.

X. – BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H., 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27:617–631
- Allan, E. J., Eeswara J. P., Johnson, J., Mordue, A. J., Morgan E. D., T. Stuchbury.,1994. The production of azadirachtin by *in vitro* tissue culture of neem, *Azadirachta indica*. *Pesti. Sci.* 42: 147-152.
- Althoff, D. M., Gitzendanner, M. A., Segraves, K. A., 2007. The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Syst. Biol.* 56:477–484.
- Balaji, K., Veeresham, C. K., Srisilam., Kokate, C., 2003. Azadirachtin, a novel biopesticide from cell cultures of *Azadirachta indica*. *J. Plant. Biotech.* 5(2): 121-129.
- Belaj, A., Trujilo, I., Rosa, R., Rallo, L., Giménez, M. J., 2001. Polymorphic and discrimination capacity of random y amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:64-71.
- Benge, M. D., 1989. Cultivation and propagation of the neem tree. In: M. Jacobson. *Focus on Phytochemical Pesticides, The neem Tree.* CRC Press, Boca Raton, USA. 1-18.
- Bernardo, R. J., Itoiz, R., 2004. Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus domestica Borkh.*) and the congruence among classifications. *Genet Resour Crop Evol* 51:153–160
- Bhattacharya, S., Dey, T., Bandopadhyay, T., Ghosh, P., 2008. Genetic polymorphism analysis of somatic embryo-derived plantlets of *Cymbopogon flexuosus* through RAPD assay. *Plant Biotechnol Rep* 2:245–252
- Bhojwani, S. S., and. Dantu, P., K., 2013. Somaclonal variation. In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text DOI: 10.1007/978-81-322-1026-912, *Springer India.* 141-154.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R. K., Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Sci.* Vol. 82, No. 11.
- Bouman, H., De Klerk, G. J., 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theor Appl Genet* 102:111–117
- Brettell, R., Dennis, E. S., 1991. Reactivation of silent Ac following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern. *Mol Gen Genet*, 229(3):365:372.
- Calva, G., y Pérez J., 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro, *Revista Digital Universitaria*, 6(11):1-16.

- 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. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 67 p.
- Capataz-Tafur J., Fernando O. S., Rodrigo V. R., Rodrigo H. S., 2007. Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith en condiciones de laboratorio *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 60:3703-3715.
- Cardone, S., Olmos, S., Echeneque, V. 2004. Variación somaclonal. In Echeneque, V., Rubinstien, C., Mroginski, L. Eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la Biotecnología. *Ediciones INTA, Argentina.* p. 81-96
- Carvalho, L. C., L. Goulao, C., Oliveira, J. C., Goncalves, Amancio, C., 2004. RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* 77: 23-27.
- Cassells, A. C., Curry, R. F., 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* 64: 145- 15
- Chen, T., and Li, E., 2006. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol.* 301:179-201
- Dai, J., Yaylayan, V., Vijaya, G. S., and Pare, J., 1999. Extraction and colorimetric determination of azarachtin-related limonoids in neem seed kernel. *J. of Agri. and Food Chem.* 47: 3738-3742.
- Dayana, P., and Ponsamuel, J., 2000. Ultrastructure of terpenoid secretory cells of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). In: Gupta, P.D. y Yamamoto, H. Eds. *Electron Microscopy in Medicine and Biology.* 179-195.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28:350–356
- Duncan, R. R., 1992. Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv Agron,* 58:201-240.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., Henikoff, S., 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 7: 21-33
- Gao, X., Yang, D., Cao, D., Ao, M., Sui, X., Wang, Q., Kimatu, J., Wang, L., 2010. *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. *J. Plant Growth Regul.* 29:257–267
- Gerth, A. D., Schmidt, Wilken, D., 2007. The production of plant secondary metabolites using bioreactors. *ISHS Acta Horticult* 764: 95-104.
- Godwin, ID., Sangduen, N., Kunanuvatchaidach, R., Piperidis, G., Adkins, S. W., 1997 RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice

- (*Oryza sativa* var. *indica*) somaclonal progenies. *Plant Cell Rep* 16:320–324
- Guo, W. L., Gong L., Ding, Z. Li, Y., Li, F., Zhao, S., Liu, B., 2006 Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers. *Plant Cell Rep* 25:896–906
- Hao, Y. J., Deng, X. X., 2002. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus. *In Vitro Cellular and Develop Bio Plant*, 38(5):472-476
- Harish, K. G., Chandra, M. K. V., Jagannadha, R. A., Naginis, S., 2009. Nimbolide a limonoid from *Azadirachta indica* inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells. *Invest. New Drugs*. 27:246–252
- Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L., Hammerschlag, F., 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Rep* 16:624–627
- Heslop-Harrison, J.S., A. Brandes, S., Taketa, T., Schmidt, A. V., Vershinin, E. G., Alkhimova, A., Kamm, R. L., Doudrick, T., Schwarzacher, A., Katsiotis, S., Kubis, A., Kumar, S. R., Pearce, A. J., Flavell, y Harrison, G. E., 1997. The chromosomal distributions of Ty1-copia group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetic* 100: 197-204
- Huang, Z., Shi, P.; Dai, J., and Du, J., 2004. Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. *Pest Bioche and Phy* 80, 85–93
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). *Folleto Técnico* 2004.
- Jaligot E, Beule´ T, Rival A., 2002. Methylation-sensitive RFLPs: Characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theor Appl Genet* 104: 1263–1269
- Jose, J. K., Nimisha, M. A., Anu, Nambisan, P., 2012. Evaluation of somaclonal variation in callus cultures of *Jatropha curcas* maintained on different hormonal combinations using RAPD markers. *World J. of Agric Sci* 8 (6): 616-623
- Kearney, M. L., Allan, E., Hooker, J. E., and Mordue, J., 1994. Antifeedant effects of *in vitro* culture extracts of neem tree, *Azadirachta indica* against the desert locust (*Schistocerca gregaria* (Fosskal)) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37, 67 – 71
- Kota, S., Raghupati Rao, N. D., and Parvathi, C., 2000. *In vitro* response of select regions of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) as elucidated by biochemical and molecular variations. *Current Sci*, Vol. 91, No. 6, 25
- Koul, O., Singh, G., Singh, R., Singh, J., Daniewski, M. W., Berlozecki, S., 2004. Bioefficacy and mode of action of some limonoids of salannin group from

- Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. *J. Biosci.* Pag. 409-416.
- Kraus, W., Cramer, R., Sawitzki, G., 1995. Tetranortriterpenoids from the seeds of *Azadirachta indica*. *Phytochem* 20: 117-120.
- Kumar, I., and Parmar, B. S., 1996. Physicochemical and chemical variation in neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura* L. *J Agric Food Chem.* 44(8):2137-2143.
- Kumar, J., Parmar, B. S., 1997. Neem oil content and its key chemical constituents in relation to the agroecological factors and regions of India. *Pestic. Res. J.* 9(2):216- 225.
- Kumar, J., Parmar B. S., 1999. Stabilization of azadirachtin A in neem formulations: effect of some solid carriers, neem oil, and stabilizers. *J. of Agric. Food Chem.* 47, 1735-1739.
- Kuruvilla, T., P. Komaraiah, Ramakrishna, S. V., 1999. Enhanced secretion of azadirachtin by permeabilized margosa (*Azadirachta indica*) cells. *Ind. J. Exp. Bot.* 37: 89-91.
- Laird, P. W., 2003. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Rev Genet.* 3: 253-266
- Larkin, P. J., Scowcroft, W. R., 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet,* 60:197-214
- Lee M., Phillips, R. L., 1988. The Chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:413-437
- León, P., Guevara-García A., 2007. Síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXX1. 79-90
- Medina, C., García I., Caro M., Aristizábal F. A., 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Revista colombiana de ciencias, Químico Farmacéuticas.* Vol. 36, (1):70-80
- Menéndez, P., Villarejo, P., Padilla, D., Menéndez, J. M., Rodríguez-Montes J. A., 2012. Epigenética y cáncer colorrectal. *Elsevier Doyma, Cir. Esp.*; 90 5: 277-283.
- Morgan, D. E., Jarvis A. P., Jones, G., 2000. Ratio of products formed on photo-oxidation of the neem triterpenoids nimbin and salannin. *Arkivoc.* 312-319.
- Mujib, A., Banerjee, S., Ghosh, P., 2007. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture raised *hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). *Propa of Ornam Plants;* 7:169-174.
- Murashige, T., Skoog. F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Phys* 15, 473-497.
- Neem Foundation, (2006). Growing Neem. Disponible en internet:<http://www.neemfoundation.org/contact.htm>

- Negrón B., Juan, A., 2004. Cultivo de tejido vegetal in vitro de un segmento de hoja de la planta *Kalanchoepeltata*. *Universidad Interamericana de Puerto Rico*, 5-7.
- Nei, M., Li, W. H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *P. of Nat Aca of Sci USA*, 7: 5269-5273.
- Noro, Y., Takano-Shimizu, T., Syono, K., Kishima, Y., Sano, Y., 2007. Genetic variations in rice in vitro cultures at the EP.SP.S–RP.S20 region. *Theor Appl Genet* 114:705–711
- Orbovic, V. C., Calovic, M., Vilorio, Z., Nielsen, B., Gmitter, F. G., Castle W. S., Grosser J. W., 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161:329–335
- Orozco-Sánchez, F., Rodríguez-Monroy., 2007. Cell suspensión culture of *Azadirachta indica* for production of a bioinsecticide. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 6 3. 251-258.
- Picó Sirvent, M. B., Pérez De Castro, A. M. 2012. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA). Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. <https://riunet.upv.es/handle/10251/17047>
- Piola, F., Rohr, R., Heizmann, P., 1999. Rapid detection of genetic variation within and among in vitro propagated cedar (*Cedrus libani Loudon*) clones. *Plant Sci* 141:159–163.
- Polanco, C., Ruiz, ML. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in ArabidoP.Sis thaliana regenerated plants. *Plant Sci* 162:817–824
- Prakash, G., and Srivastava, A. K., 2007. Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. *Process Biochem* 42(1), 93-97.
- Prakash, G., Emmanuel, C. J. S. K., Srivastava, A. K., 2005. Variability of. Azadirachtin in *Azadirachta indica* (neem) and batch kinetics studies of cell suspension culture. *Biotech and Biop Engin.* 10(3) 198-204
- Qin, Y., Li, H.L., Guo, Y. D., 2007. High- frequency embryogenesis, regeneration of Broccoli (*Brassica oleracea* var. italic) and analysis of genetic stability by RAPD, *Sci Hortic*, 111, 203-208.
- Rafiq, M., Dahot, U. M., 2010. Callus and azadirachtin related limonoids production through in vitro culture of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *African J. of Biotech* Vol. 9: 449-453
- Rakozy-Trojanowska, M., 2002. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of variation of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cellular and Molecular Biology letters* 7(4):1111-1120
- Raval, K. N., Hellwig, S., Prakash, G., Ramos-Plasencia A. R., Srivastava, A., Buchs J., 2003. Necessity of a Two-Stage process for the production of

- azadirachtin-related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. *J. of Bioc and Bioeng*, 96(1): 16-22.
- Raveendra, M., Acharya, L. D., Udupa, N., 2004. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel - a 6-week clinical study. *J. of Ethnopharmacology* 90, 99–103.
- Roy, A., S. Saraf, S., 2006. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plant kingdom. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 29:191–201
- Royal Garden Botanic., 2009. Kew. Disponible en internet: http://www.plantcultures.org.uk/plants/neem_landing.html. Consultado el 10 de Noviembre de 2014.
- Ruberto, G.; Renda, A.; Tringali, C.; Napoli, E. M.; Simmonds, M. S. 2002. Citrus limonoids and their semisynthetic derivatives as antifeedant agents against *Spodoptera frugiperda* larvae. A structure activity relationship study. *J of Agric and Food Chem* 50 (23): 6766-6774
- Sahijram, L., Soneji, J.R., Bollamma, K. T., 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cell Dev Biol. Plant* 39: 551–556
- Schmutterer, H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Ann. Rev. Entomol.* 35: 271-297.
- Sedghi, G. N., Bakhshi Khaniki, G., Karimi, F., 2010. Evaluation of somaclonal variation during repetitious subcultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) callus. *Iranian J. of Plant Phys.*1(2): 69-72
- Sidhu, O. P.; Kumar, V., Behl H. M., 2003. Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. *J. of Agric and Food Chem.* 51, 910-915.
- Singh, Deshwal, R. P., Singh, R., Malik, K., Randhawa, G. J., 2005. Assessment of genetic diversity and genetic relationship among 29 populations of *Azadirachta indica* A. Juss. using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 52: 285-292
- Singh, M., Chaturvedi, R., 2013. Sustainable production of azadirachtin from differentiated in vitro cell lines of neem (*Azadirachta indica*). DOI: 10.1093/aobpla/plt034
- Stoney, C., 1997. *Azadirachta indica* - neem, a versatile tree for the tropics and subtropics. Forest, Farm, and Community Tree Network (FACT Net). Arkansa, USA. Disponible en: <http://foodsecurity.info/foodsecurity.info/Winrock%20Archive/neem.htm>
- Sujanya, S. B., Poornasri, I., Sai, 2008. *In vitro* production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. *J. Biosci.* 33(1): 1-6
- Taiz, L., Zeiger, E., 2002. Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I. Vol. II. Edi. III: 1030-1045
- Veeresham, Kumar M. R., Sowjanya, D., Kokate, C. K., Apte, S. S., 1998. Production of azadirachtin from callus cultures of *Azadirachta indica*. *Fitoterapia* 69, 423-424

- Venkatachalam, L., Sreedhar, R. V., Bhagyalakshmi, N., 2008. The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationship among banana cultivars. *Mol Phylogenet Evol* 47:974–985
- Weeden, N.F., M. Timmerman, M., Hermmat, B. E., Kneen, Lodhi, M. A., 1992. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. *Symposium Proceeding, Minneapolis*: 12-17
- Weising, K., Nybom H., Wolff K., Kahl, G., 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. *CRC Press, New York*
- Wewetzer, A., 1998. Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin. *Phytoparasitica* 26:47–52

ANEXOS

Anexo 1.- Análisis de RAPDs.

Todos los geles se analizaron y las bandas monomórficas y polimórficas se contabilizaron. Las **bandas monomórficas** fueron la (s) banda (s) del mismo peso molecular que se repite en los diferentes tratamientos y las **bandas polimórficas** fueron la (s) banda (s) ausentes. La presencia de una banda fue indicado por un uno (1) y la ausencia como cero (0) para realizar una matriz binaria.

A continuación se muestra un ejemplo del análisis de bandeo para el cebador OPA-15 (Figura 28 a). En la posición **1** se identifica en el primer bandeo que todos los tratamientos comparten bandas del mismo peso molecular, asignándole 1 a cada banda, es decir hay bandas monomórficas en todos los tratamientos. En la posición **2** se observó que la banda esté ausente en b y T₃, a las cuales se les asignó 0, es decir que estas bandas son polimórficas. De esta manera se realizó la matriz binaria (Figura 28 b) de un solo primer. Y posteriormente se indexo en el Software PHYLIP 3.69.

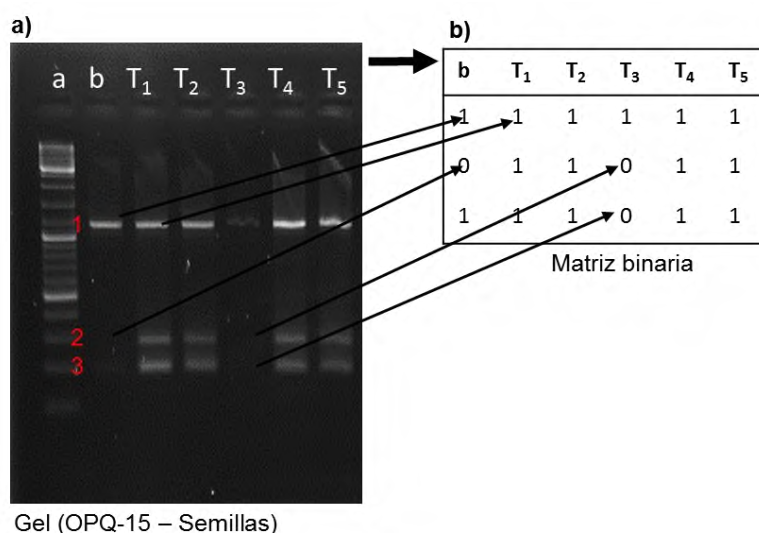


Figura 28.- Análisis de RAPD. a) Gel con los tratamientos para el cebador OPA-15, b) Matriz binaria

