

# Evaluation of the *in vitro* production of azadirachtin in Neem according to the type of callus and chemical agents

Rafael Fernández-Da Silva \* , Jessica Salomón , Adrián Villarroel , Valeria Montilla 

Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (Facyt), Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela

 <https://doi.org/10.54139/revinguc.v28i2.27>

**Abstract.-** The neem (*Azadirachta indica* A. Juss; Meliaceae) is a multipurpose woody tree species of great beneficial versatility in agriculture, environment, and medicine. In the agricultural field, azadirachtin (AZA), a secondary metabolite, has an important role as an insect pest bio-controller. To obtain the optimal concentration required for such purposes using conventional techniques, a large amount of plant raw material is needed. Mainly seeds, which are a limiting factor during a period of the year. However, tissue culture techniques can significantly improve the yield of AZA, regardless of the season. Therefore, this study aimed to evaluate the *in vitro* production of AZA, as a function of the type of callus (embryogenic “E” and non-embryogenic “NE”) derived from two different explants (cotyledon and leaf), with the action of chemical agents (precursors; sodium acetate “AC”; and squalene “SQ”; in different levels and combinations). The highest AZA production was obtained after 14 days of culture in cell suspension, from calluses NE from leaf sections, with only 50 mg/L of SQ (39 mg/L AZA) or with the combination of 10 mg/L of SA with 10 mg/L of SQ (44,2 mg/L AZA).

**Keywords:** Cell suspension; non-embryogenic callus; leaf segment; sodium acetate; squalene.

## Evaluación de la producción *in vitro* de azadiractina en Neem según el tipo de callo y los agentes químicos

**Resumen.-** El neem (*Azadirachta indica* A. Juss; Meliaceae), es una especie arbórea leñosa multipropósito, de gran versatilidad benéfica en agricultura, ambiente y medicina. Para el agrícola, la azadiractina (AZA) como metabolito secundario presenta un importante rol biocontrolador de insectos plaga, cuya concentración óptima para ello, mediante técnicas convencionales, requiere mucha materia prima, principalmente semillas, siendo limitante estas por un periodo de tiempo al año, sin embargo, mediante técnicas de cultivo de tejidos se puede mejorar significativamente el rendimiento de la producción de dicho compuesto, independientemente de la estación del año, por lo cual el objetivo de este trabajo fue evaluar la producción *in vitro* de AZA en función del tipo de callo (embriogénico “E” y no embriogénico “NE”) derivado de dos diferentes explantes (cotiledón y hoja), con la acción de agentes químicos (precursores; acetato de sodio “AC” y escualeno “ES” en diferentes niveles y combinaciones). La mayor producción de AZA se obtuvo a los 14 días de cultivo en suspensión celular, a partir de callo NE proveniente de secciones de hoja, con solo 50 mg/L de ES (39 mg/L de AZA) o con la combinación de 10 mg/L de AC con 10 mg/L de ES (44,2 mg/L de AZA).

**Palabras clave:** acetato de sodio; callo no embriogénico; escualeno; segmento foliar; suspensión celular.

Recibido: 20 de mayo, 2021.

Aceptado: 16 de julio, 2021.

### 1. Introducción

La especie de habito arbóreo *Azadirachta indica* A. Juss, conocido como Neem, margosa, nimba

o lila de la India, perteneciente a la familia Meliaceae, cuyo centro de origen es el sub continente Indio, se distribuye al resto de Asia, Australia, América tropical y el Caribe [1]. Esta planta es el símbolo cultural e histórico de la India, debido a sus diversos usos médicos desde el año 4.500 AC, conociéndose actualmente como una especie vegetal multipropósito ancestral [2]. En Venezuela esta planta ha sido empleada en programas de reforestación, recuperación de suelos, producción de abono y como bioinsecticida

\* Autor para correspondencia:

Correo-e: rafaelfer21031970@gmail.com (R. Fernández-Da Silva)

[1]. En el siglo XXI, esta planta medicinal es una de la más versátiles, por su amplia gama de actividades biológicas, ya que los extractos de partes vegetativas (corteza, hojas y semillas) y reproductivas (flores) [3], están conformados por metabolitos secundarios, con poca presencia de metabolitos protóxicos alérgicos [4], que se utilizan en medicina popular para el tratamiento de enfermedades tales como: lepra, psoriasis, reumatismo, irregularidades digestivas, artritis, viruela, malaria, diabetes, mal de chagas, afecciones dermatológicas, así como antihelmínticos, antiinflamatorios, antisifilíticos, anticonceptivo [5], anticancerígena y antitumoral [6]. Adicionalmente, esta planta es utilizada como biocontroladora de plagas como los insectos [7], dado al papel bioinsecticida de un importante metabolito secundario que esta planta sintetiza de manera exclusiva, la azadiractina (AZA) [8], que se extrae convencionalmente a partir de semillas, sin embargo, dado su producción estacional (una vez al año), requiere grandes extensiones de terreno para obtener mayor cantidad de materia prima, encareciendo el producto y disminuyendo las tierras de cultivo para otros rubros.

Por lo cual, la técnica de cultivo *in vitro*, permite masificar la producción de compuestos bioactivos como la AZA [9], fundamentándose en la totipotencialidad de las células vegetales, generando de una célula, una planta completa, a través del proceso de desdiferenciación, dan origen al callo, que es una masa de células indiferenciada en constante división celular [10], clasificándose en dos tipos: embriogénico (E) y no embriogénico (NE), donde el primero solo regenera plantas, pero ambos producen metabolitos secundarios [11].

La producción de AZA en cultivos *in vitro* de neem es una vía altamente eficiente [12], que ya ha sido reportada en callo, suspensiones celulares y en raíces en cabellera por diversos investigadores [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19], estudiando las variables que lo afectan, sin embargo, en comparación con otras especies con metabolitos de interés comercial, estos hallazgos tienen menos de 25 años [20]. En este sentido, la producción de AZA varía de 2,5 a 72,81 mg/L, en función de parámetros tales como: explante, tipo y tiempo

de cultivo, condiciones lumínicas, reguladores de crecimiento, precursores y elicitores. Así tenemos que cronológicamente los estudios se inician en 1999, primero evaluando el agente permeabilizante Tritón X-100, que evita la necesidad de romper las membranas y paredes de las células, extrayendo el producto sin dañar las mismas, manteniendo el rendimiento de su producción [21]. Posteriormente en el 2003, se reporta un aumento significativo en la producción de AZA, al añadir al medio de cultivo, los precursores, acetato de sodio, escualeno, isopentenil pirofosfato (IPP) y geranil pirofosfato (GGP) [22], no encontrándose diferencias en su producción al evaluar el número de etapas de cultivo [23]. En 2005, se indica que es mayor la producción de AZA en suspensiones celulares de embriones cigóticos que de hojas empleando medio MS [24], mejorándose ésta, aumentando los niveles de nitrógeno [25]. Para el 2008, se describe que velocidades de agitación superiores a 125 rpm afectan la viabilidad celular y por ende la producción de AZA [26], recomendándose una velocidad de 120 rpm en el 2010 [27], señalándose a partir del 2011, que el nivel de oxígeno es fundamental, ya que bajos niveles de este, reduce la viabilidad celular y subsecuentemente disminuye el nivel del metabolito [11][16, 17]. Asimismo, en 2011, se recomienda usar simultáneamente inductores, precursores y agentes permeabilizantes, en cultivo continuo con renovación de nutrientes, ya que aumenta la biomasa y con ello la producción de AZA [28]. Es para el 2013, que se menciona al tipo de callo, indicándose que la producción de AZA de éste, depende de las características regenerativas del mismo, así como del explante que le dio origen, siendo mayor en callo regenerativo derivado de embriones cigóticos [29]. Seguidamente, en 2014, se describe una mayor producción de AZA en función del tiempo, con callos (sin especificar tipo) cotiledonares, con el elicitador jasmonato de metilo [30]. En 2015, se reporta en bioreactores un rendimiento de AZA cuatro veces mayor (41,4 mg/L), empleando la combinación de elicitores, ácido salicílico, ácido jasmonico y quitosano [31]. Posteriormente, en 2016 se indican en tanque con agitación, un mayor

rendimiento de AZA (42,13 mg/L) a partir de suspensiones celulares de callos friable de semillas [32], pero un año más tarde, se reporta una mayor concentración (71,6 mg/L) en suspensiones celulares de callo friable (amarillo-verde) de flores, empleando los precursores pirofosfato geranil y isopentil pirofosfato, así como altos niveles de nitrógeno [33].

A pesar del amplio conocimiento de la producción *in vitro* de azadiractina, se conoce poco en función a las características morfo anatómicas y funcionales del callo en relación a los agentes químicos de su síntesis, planteándose que si el tipo de callo está relacionado al explante de su inducción, así como al mayoritario grupo de células que lo conforman hacia una predominante ruta morfogénica, que esta concatenada a una determinada ruta bioquímica de metabolitos secundarios, entonces pueden activarse y/o mejorarse para la biosíntesis de los mismos mediante agentes químicos, donde el nivel de producción *in vitro* de azadiractina como metabolito secundario, variara de acuerdo al tipo de callo donde se derivan las suspensiones celulares, en correspondencia al tipo, concentración y combinación de agentes precursores, estableciéndose como objetivo de esta investigación, evaluar la producción *in vitro* de azadiractina en Neem de acuerdo al tipo de callo y a los agentes químicos.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Material biológico

Frutos inmaduros de árboles fitosanitariamente sanos de Neem (*Azadiractha indica* A. Juss) de los jardines del Campus de Bárbula de la Universidad de Carabobo (Estado Carabobo-Venezuela), fueron cultivados *in vitro* en diferentes ensayos durante el año 2017.

### 2.2. Desinfección

A partir de frutos inmaduros, procesados el mismo día de su colecta, se realizó la desinfección en una campana de flujo laminar horizontal, extrayendo el embrión cigótico, retirando primero el epicarpio y mesocarpio, quedando solo el endocarpio, el cual se lavó dos veces (2 min

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

### 2.3. Obtención de las vitro plantas

De las semillas inmaduras previamente desinfectadas, se retira el endocarpio por medio de su disección con un bisturí estéril, extrayendo el embrión cigótico, a partir del cual se desarrolla la *vitro planta* en un medio de cultivo salino básico MS suplementado con 0,2 mg/L de BAP (6-N-bencil-aminopurina), en oscuridad continua y temperatura ambiente (25 °C) hasta el desarrollo de la raíz y apertura de los cotiledones, luego de lo cual se mantuvo bajo iluminación continua (120  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^1$ ) para estimular el desarrollo de la planta.

### 2.4. Explantes e inducción de callo

A partir de *vitro plantas* de 2 semanas se obtiene el cotiledón y la hoja, de donde se indujo la formación de callo embriogénico (E) y no embriogénico (NE). Por medio de la disección con un bisturí estéril, se obtienen las secciones cotiledonares de semillas inmaduras desinfectadas, mientras que los segmentos foliares fueron obtenidos de hojas completamente expandidas y no senescentes desarrolladas de *vitro plantas*.

Ambos explantes se sembraron en placas de Petri, con medio salino MS sólido suplementado con distintos tipos y niveles de reguladores del crecimiento, medios de cultivo óptimos establecidos por Artigas y Fernandez [34] y Fernandez *et al.* [35] en oscuridad continua y temperatura ambiente (25 °C). Para cotiledón

se empleó la combinación de 1 mg/L de BAP con 0,4 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), mientras que para hoja se utilizó 1 mg/L de BAP con 0,4 mg/L de AIA (ácido índol acético).

### 2.5. *Suspensión celular*

El establecimiento se basó en el protocolo de Fernández *et al.* [36]. En matraces Erlenmeyer con 100 mL de medio líquido con la misma composición óptima para el desarrollo de callo, de acuerdo al tipo de explante, se colocó 1 g de segmentos pequeños de callo NE o E disgregado con una pinza y/o bisturí estéril. El cultivo se mantuvo en oscuridad continua y a temperatura ambiente (25 °C), con agitación continua de 150 rpm, para facilitar una mayor disgregación de los agregados celulares. Posteriormente, a las 2 semanas, la suspensión celular gruesa, se pasó a través de un tamiz de malla de acero (150 mesh), obteniéndose una suspensión fina, que se dejó en agitación a 100 rpm. A partir de la suspensión celular fina en cultivo (sin reposición de medio) a temperatura ambiente (25 °C) y a oscuridad continua (a menos incidencia de luz, mayor es la producción de terpenoides como la azadiractina “AZA”, ya que al ser este fotosensible se degrada con dicho estímulo [37]. Se evaluó el efecto de la producción del metabolito secundario azadiractina (AZA) en función del tipo de callo (E y NE) y los agentes químicos (precursores: acetato de sodio “AC” y escualeno “ES”) en diferentes niveles y combinaciones.

### 2.6. *Evaluación morfo anatómica*

La caracterización histológica y morfológica de los callos embriogénicos (E) y no embriogénicos (NE), se realizó siguiendo el protocolo establecido por Fernández *et al.* [35, 36, 37] y Artigas y Fernández [34][38]. Las muestras se fijaron en una solución de formol al 10 % por 24 horas, luego de las cuales, se deshidrataron en una batería de etanol con concentraciones ascendentes (10, 30, 50, 70, 90 y 100 % v/v), manteniéndose 30 min en cada concentración. Las muestras deshidratadas se colocaron luego por 3 horas en xilol para aclarar el tejido, y posteriormente se

sumergieron durante 8 horas en parafina sintética fundida. Los callos se cortaron con un micrótopo de rotación Leica®RM2265, en secciones de aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$ , que se colocaron en una rejilla de corte, transfiriéndose estas a una estufa a 66 °C para permitir la fusión de la parafina. Posteriormente, los tejidos se hidrataron por medio de 3 cambios de xilol (5 min cada uno), seguidos de 2 cambios en etanol al 100 % v/v (3 min) y finalmente en agua destilada. Posteriormente, se tiñeron a continuación mediante una coloración mixta ácido–base Hematoxilina–Eosina (1:1), donde primero se agregaron unas gotas de Hematoxilina a la muestra, dejándose actuar por 5 min, luego de lo cual se realizó un lavado con agua destilada, seguido a ello se añadieron unas gotas de Eosina durante 30 seg, para finalmente realizar un último lavado con agua destilada. El montaje realizado fue de tipo semi permanente, sellando los cortes con gelatina glicerina [39]. Para el registro fotográfico se empleó un microscopio estereoscópico Leica MZ75 y para el estudio anatómico se empleó un microscopio compuesto Leica DM1000.

### 2.7. *Producción y extracción de azadiractina (AZA)*

La producción de AZA, se evaluó una vez por semana, durante 4 semanas consecutivas en un cultivo, de la misma composición descrita anteriormente para suspensión celular, pero suplementada con 10 mg/L de Tritón X–100 (agente permeabilizante de la membrana), en función de las siguientes variables: a) tipo de callo (E y NE) y b) agentes químicos precursores (AC:0, 10, 50 y 100 mg/L; ES: 0, 10, 50 y 100 mg/L) solo o combinados, realizándose treinta (30) replicas por tratamiento.

La AZA producida se determinó de manera económica, rápida y exacta mediante espectrofotometría UV-visible, teniendo en cuenta el patrón de concentración conocida del metabolito [40], siguiendo la metodología de vainillina validada para limonoides relacionados a AZA [41]. Para ello se tomó 1 mL de medio de cultivo, que se transfirió a un tubo de centrifuga Falcon cónico de 10 mL, donde se adicionó 5 mL etanol

al 9% v/v, para luego mezclar por inversión, centrifugándose a 7000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se evaporó el etanol de la muestra en un baño de María a 75 °C, resuspendiéndose la muestra posteriormente en 1 mL de agua destilada estéril, que se almacenó a –80 °C hasta el momento de la evaluación por espectrofotometría, la cual se realizó tomando 0,35 mL de la muestra almacenada, a los cuales se les añadió 0,1 mL de solución de metanol de vainillina (0,02 mg/mL), agitándose por inversión, y dejándose reposar por 2 minutos. Luego, se agregaron 0,15 mL de ácido sulfúrico concentrado al 97% (v/v) en 3 partes de 0,05 mL, agitándose por inversión durante 10 segundos con cada adición. Luego de esto, se agregaron 0,35 mL de metanol, dejándose reposar la muestra por 15 min a temperatura ambiente (25 °C). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Genesys™10, UV-Vis) a 577 nm. Los datos obtenidos se evaluaron por medio de su comparación con una curva estándar de AZA, la cual se realizó utilizando soluciones patrón de azadiractina en diclorometano, entre 0,01–1 mg/mL, que permitió validar la exactitud del método espectrofotométrico que se utilizó para determinar la AZA en este estudio [42].

### 2.8. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de la producción de AZA en función de las variables tipo de callo (NE y E), así como con el tipo, concentración y combinación de precursores (AC y ES), aplicando una ANOVA de dos vías una vez corroborado que los datos cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, utilizando el programa de análisis estadístico PAST (versión 3.15, Hammer Ø., Museo de Historia Natural, Universidad de Oslo, Noruega). También se realizaron comparaciones puntuales a posteriori mediante la prueba de Tukey. En todos los casos, se utilizó como criterio un valor de significancia de  $p < 0,05$  [43]. Los resultados (concentración de AZA versus tratamiento con agentes químicos, en función del tipo de callo) se visualizan mediante gráficas de barra.

### 3. Resultados y discusión

Los callos utilizados en la evaluación de producción de azadiractina (AZA) en este trabajo, fueron inducidos de dos distintos explantes: segmentos de cotiledón y secciones foliares de *vitro plantas*. A partir de las zonas de corte del explante cotiledonar y foliar se formó de manera indirecta, una masa de células indiferenciada denominada callo, que se distinguían por presentar diferentes características morfológicas y anatómicas, que permitieron a su vez catalogar dos tipos de callo, uno de naturaleza regenerativa de plantas llamado callo embriogénico (E) y otro sin dicha capacidad llamado callo no embriogénico (NE), aspecto poco descrito en los trabajos de establecimiento de protocolos de regeneración de plantas *in vitro* de Neem, limitándose solamente a indicar callos regenerativos o no regenerativos, aunado a ello, tampoco se describe claramente, el tipo de callo empleado para la obtención de suspensiones celulares para la producción de metabolitos secundarios, lo cual es fundamental, ya que es probable que acuerdo a las características morfo histológicas de estos, las células están relacionados en mayor grado a un determinado proceso metabólico, a decir, a los eventos de diferenciación vegetal en el proceso regenerativo en el callo E, o en la producción de ciertos metabólicos típicos en células indiferenciadas del callo NE. De tal manera, que debe haber una distinción en la producción de AZA según el tipo de explante y de callo derivado de este.

En este sentido, al realizar la evaluación morfológica de los callos generados en los explantes, generalmente se encontraron callos mixtos tanto para cotiledón como para hoja, conformados por una zona compacta, globular, de superficie lisa y de color amarillo claro, catalogado como callo E tal como se muestra en las Figuras 1a, 1c, y otra parte friable (fácil de disgregar), de superficie rugosa y de color amarillo más oscuro, denominado como callo NE mostrado en las Figuras 1b, 1d, que se sub cultivaron por separado, para aumentar la masa de estos. En relación a las características histológicas de los callos E y NE, no se encontró diferencia en función del explante

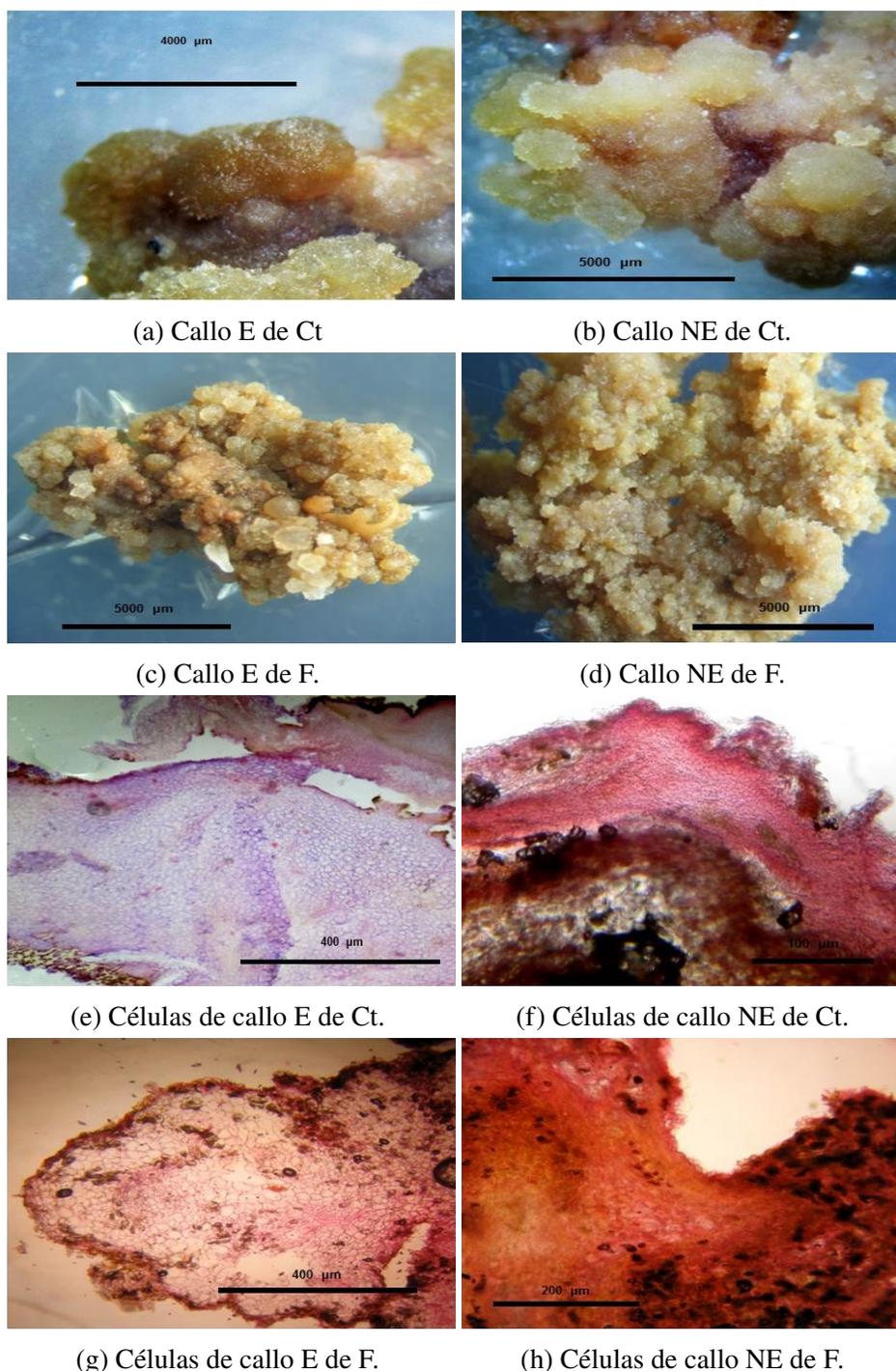


Figura 1: Morfología e histología de callo embriogénico (E) y no embriogénico (NE) en explantes cotiledonares (Ct) y foliares (F) de *Azadiractha indica*

que le dio origen, pero si en el tipo celular de cada clase de callo, siendo las células pequeñas poco densas en citoplasma y de forma isodiamétricas distribuidas en todo el callo, bordeado por una epidermis uniestratificada, las típicas del callo E observada en las Figuras 1e, 1g, mientras que

las del callo NE fueron pequeñas, densas de contenido citoplasmático y de forma irregular, no observándose una epidermis como tal como se muestra en las Figuras 1f, 1h.

En concordancia al tipo de callo y el explante que le dio origen, se evidenciaron diferencias

significativas ( $p$  valor  $< 0,05$ ) en la producción de AZA, en función de los precursores químicos ensayados en los cultivos en suspensión celular, tal como se muestra en la Figura 2. Al realizar análisis de varianza de dos vías, se encontró también diferencias significativas ( $p$  valor  $< 0,05$ ) en la mayor producción de AZA a los 14 días de cultivo (segunda semana) en callos derivados de tejido foliar, y a su vez en callos NE, declinando el nivel de AZA en las subsiguientes dos semanas de cultivo.

Asimismo, realizando comparaciones por pares (entre semanas y luego entre todos los tratamientos en la semana dos) se encontraron diferencias significativas ( $p$  valor  $< 0,05$ ) entre estos, resaltando en todos los casos una mayor producción de AZA en respuesta a los tratamientos 2, 6 y 8 (correspondientes a 10 mg/L de acetato de sodio, 50 mg/L de escualeno y 10 mg/L acetato de sodio + 10 mg/L escualeno respectivamente) a las dos semanas, anexando el tratamiento 5 que presentó igual producción de AZA que el tratamiento 2 solo para CE de cotiledón.

En cuanto a los valores puntuales por tratamiento en la segunda semana, la AZA en callo E de cotiledón fue 17,7 mg/L (T2), 18,4 mg/L (T6) y 20,5 mg/L (T8), para callo NE fue 23,9 mg/L (T2), 25,5 mg/L (T6) y 25,6 mg/L (T8). Mientras que la AZA en callo E de hoja fue 28,7 mg/L (T2), 27,9 mg/L (T6) y 28,7 mg/L (T8), mucho menor a los valores encontrados en callo NE de hoja, de 34,8 mg/L, 39 mg/L y 43,9 mg/L para los tratamientos 2, 6 y 8 respectivamente, siendo estos últimos los más altos encontrados, en especial para el tratamiento 8.

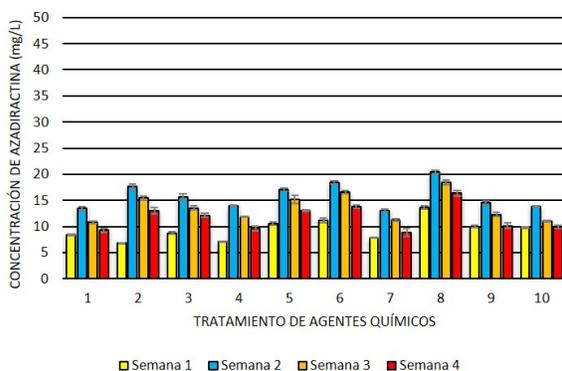
La producción de AZA fue mayor en el callo inducido de explantes foliares que de cotiledón, dado a que dicho explante fue competente en el desarrollo de callo con un metabolismo dirigido a la síntesis de una elevada concentración de metabolitos secundarios, tal como lo han señalado Singh y Chaturvedi [29]. En este sentido, el primer trabajo de AZA obtenida de callo a partir de tejido foliar, se realizó sin describirlo [44]. No obstante, al inducir callo de corteza y hojas, este se describe como friable y de color amarillo claro, donde la concentración de AZA (64 mg/L) fue superior en callo derivado de tejido foliar [45].

En estudios de cultivo de tejidos vegetales, son pocos los trabajos donde se blindan los resultados cuantitativos encontrados ya sea en regeneración *in vitro* como en la producción de metabolitos secundarios, con los estudios morfo histológicos respectivos, aspecto que se también se observa en Neem, sin embargo, pocos estudios hallados son de gran valor a la hora de explicar ciertos fenómenos en este tipo de investigaciones. En este orden de ideas, en cultivo *in vitro* independientemente del explante, se inducen dos tipos de callo, uno de carácter regenerativo de plantas (embriogénico “E”) y otro no regenerativo (no embriogénico “NE”). Por lo general, la morfología del primero es de naturaleza compacta, de superficie lisa y de color blanco crema, siendo sus células isodiamétricas, mientras que el segundo es “friable” (frágil al disgregarse), de superficie rugosa y de color amarillo, constituido histológicamente por células de forma irregular [46]; además ambos tipos se caracterizan por producir metabolitos secundarios en función del estímulo hormonal o el estrés (hídrico, salino, etc) a que son sometidos, en particular el de tipo no regenerativo [37].

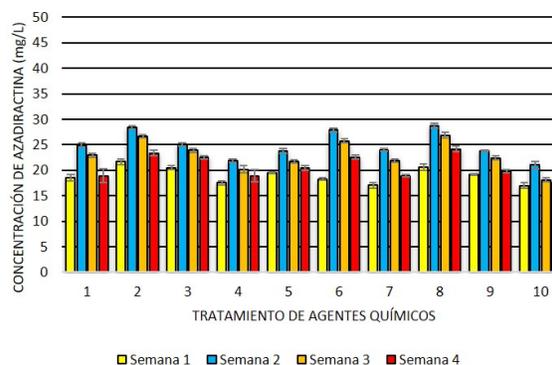
A pesar de los escasos estudios morfo anatómicos de los distintos tipos de callo formados en Neem, se ha corroborado recientemente la descripción antes mencionada en los trabajos realizados por Fernández *et al.* [35] y Artigas y Fernández [34][38], donde de manera detallada describen tres tipos de callo: callo E, callo organogénico (caulogénico o de brotes, rizogénico o con raíces) y callo NE.

Posteriormente, algunos investigadores describen el callo de segmentos nodales, como friable, de color amarillo brillante, e histológicamente constituido por un grupo compacto de células pequeñas en constante división celular hacia el centro, alargándose estas a medida que se acerca a la periferia, siendo la zona compacta la de potencial regenerativo (callo E), mientras que la periférica (Callo NE) es ideal para la eficiente producción de metabolitos secundarios, dada la fácil disgregación de este tipo de callo, asumiéndose que el callo descrito es mixto, coincidiendo esto con los resultados encontrados en este trabajo [47].

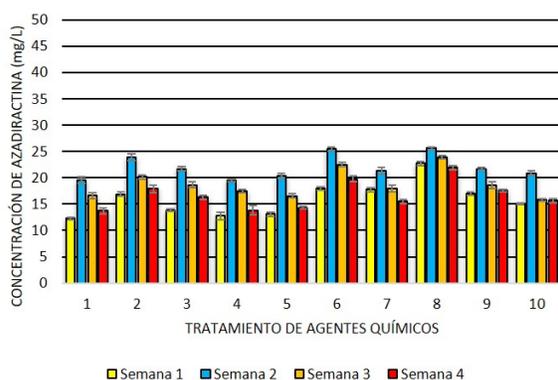
Otros investigadores solo clasifican de acuerdo



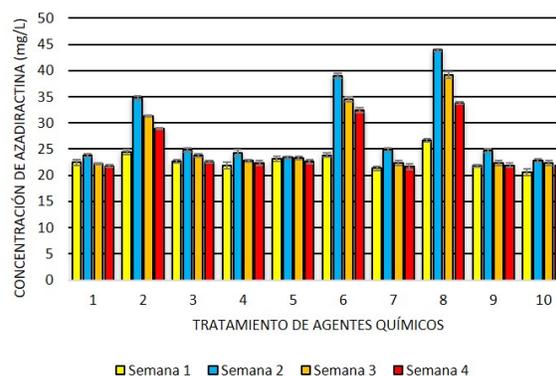
(a) Callo E de cotiledon



(b) Callo E de Hoja



(c) Callo NE de Cotiledon



(d) Callo NE de Hoja

Figura 2: Producción *in vitro* de azadiractina en el tiempo (semanas) en función del tipo de callo (embriogénico “E” y no embriogénico “NE”) de dos explantes (COTILEDON y HOJA) y agentes químicos (precursores en mg/L: acetato de sodio “AC” y escualeno “ES”). Tratamientos: 1: 0 AC+0 ES; 2: 10 AC; 3: 50 AC; 4: 100 AC; 5: 10 ES; 6: 50 ES; 7: 100 ES; 8: 10 AC+ 10 ES; 9: 50 AC+ 50 ES; 10: 100 AC+ 100 ES

al color (verde, marrón y crema), tres tipos de callo originados de hoja de *vitro plantas*, pero a través del registro fotográfico, se aprecia que los mismos son NE, al visualizarse friables y de superficie rugosa, por lo cual la producción de AZA fue en función del estímulo hormonal; detectándose altos niveles de esta (214,5 mg/L) en el verdoso, seguido del marrón (51,56 mg/L) y por último el crema (28,49 mg/L), donde la citocinina Tidiazuron (0,6 mg/L TDZ) influyó en la formación del callo verde, mientras que los otros dos fueron inducidos por la auxina 2,4-D (0,6 mg/L), planteando que por mecanismos no claros, que el 2,4-D inhibe la síntesis de metabolitos secundarios. De tal manera, que los resultados descritos en esta investigación concuerdan con el

planteamiento anterior, ya que se indujo callos con una mayor concentración de citocinina (1 mg/L de BAP) que de auxina (0,4 mg/L de 2,4-D o AIA), favoreciendo la síntesis del AZA, pero al usarse adicionalmente a la auxina el 2,4-D en cotiledón, pudo ser inhibida parcialmente su producción, y ser menor que la obtenida en callo generado de tejido foliar donde se usó como auxina el AIA [48].

Asimismo, en *Boesenbergia rotunda*, al realizar la comparación cuantitativa y cualitativa en la producción de metabolitos primarios y secundarios en callos regenerativos (callo E y organogénico) y no regenerativos (NE) en cultivo *in vitro* de raíces, determinó un mayor nivel de metabolitos primarios (fenilalanina, prolina y triptófano, etc) en callos regenerativos, debido a que estos

compuestos son fundamentales para el proceso de diferenciación de embriones u órganos, mientras que la concentración de metabolitos secundarios (alcaloides, fenoles, etc) fue mucho mayor en el callo NE. Por lo cual, se reafirma los resultados encontrados en esta investigación, donde el tipo de callo influye en la producción de metabolitos secundarios, siendo el callo NE el ideal para tal fin, ya que no está comprometida la maquinaria metabólica para los complejos y diversos procesos de diferenciación, que requieren una elevado gasto de ATP en la síntesis de gran cantidad de metabolitos primarios, y muy baja de metabolitos secundarios ya que no son requeridos para dichos procesos [46].

La producción metabolitos secundarios tipo limonoides como la AZA, es mejorada potenciando su ruta metabólica de síntesis, a través de precursores, que son compuestos químicos que actúan como intermediarios en la misma [49], donde el tiempo de cultivo es crítico, ya que en cultivos en suspensión celular sin reposición de medio, se agotan los nutrientes como el fósforo o nitrógeno, impactando el crecimiento celular y por ende su biomasa, conllevando a la afectación de la síntesis, reportándose así un pico máximo de la misma a los 12 días, en callo NE derivado de brotes [23], debido a la reducción del 50 % del nitrato y el 100 % de la fuente de carbono (sacarosa), luego del cual declina su síntesis [23][30], siendo similar esta tendencia a la encontrada en este trabajo, donde a los 14 días (2 semanas) se halló la máxima producción de AZA, independientemente del tipo de callo y tratamiento con precursores.

Algunos investigadores [24] sugieren que la reducción de AZA, durante el cultivo en matraces, puede deberse a la combinación de tres factores:

- (1) se alcanza una fase estacionaria, con menor o nula síntesis del producto,
- (2) iniciación de un proceso de degradación del producto, y
- (3) cambios en la estructura química del metabolito secundario, derivando este en otros compuestos no-detectables.

Atribuyendo la ocurrencia de estos, a los cambios en la composición del medio de cultivo, donde particularmente, el azúcar, el nitrógeno y el fósforo, son progresivamente consumidos por las células del callo, disponiendo de menos nutrientes para continuar el proceso metabólico de síntesis.

Los precursores, que influyen en la producción de AZA, se dividen en dos grupos: naturales y obligados. Los primeros, como en el acetato de sodio (AC), no son miembros de la ruta biosintética de la AZA; este debe ser primeramente tomado y transformado por la célula en ácido acético, y posteriormente incorporarse al ciclo de los ácidos tricarbónicos, permitiendo un incremento en los niveles de acetil CoA, el cual comprende el primer paso en la ruta del mevalonato, se forman moléculas intermedias que generan farnesil pirofosfato, la cual da lugar al escualeno por la acción de la enzima escualeno sintasa. Los segundos, son miembros directos de la ruta de síntesis de la AZA, siendo incorporados a esta sin ser previamente transformados; este es el caso del escualeno (ES), que participa en las fases finales de esta ruta, siendo transformado en 2,3-oxidoescualeno, luego lanosterol, y de allí pasa por otros productos intermedios hasta llegar a la AZA [50].

Otros investigadores [22], reportaron un incremento en la síntesis de AZA de 16 veces (72,8 mg/L), usando ES a 10 mg/L, una mayor concentración a la obtenida en este estudio, no obstante, hay que destacar que los autores no hacen referencia al peso usado en las muestras de callos. Asimismo, otros autores [19], señalan que el AC aumentaba los niveles de AZA en mayor grado que el ES, 47,06 y 32,71 mg/L respectivamente, cuando se utilizaban individualmente en los cultivos, aspecto no observado en este trabajo, pudiendo atribuirse a que las concentraciones ensayadas no fueron las mismas. Sin embargo, al combinar AC y ES se incrementa la concentración de AZA, ya que estos actúan en diferentes niveles de la cascada de la síntesis de triterpenoides [20, 21], aspecto evidenciado en esta investigación a las concentraciones ensayadas.

El aumento de la producción de AZA por la adición de 2 precursores necesita que sea a

una concentración óptima dentro de la célula al momento de la síntesis, ya que pueden causar inhibición por retroalimentación en la ruta biosintética [19][28][50], lo cual, se verificó en este trabajo al combinar AC y ES a concentraciones de 50 y 100 mg/L, donde la producción de AZA se vio disminuida.

#### 4. Conclusiones

Finalmente, se puede concluir que este es el primer estudio en Neem que evidencia la importancia de las características morfo anatómicas del callo y del explante que le dio origen, en relación a los agentes químicos, en la producción de AZA, donde la mayor producción se obtuvo a los 14 días de cultivo en suspensión celular, principalmente de callo no embriogénico (NE) proveniente de secciones de hoja, con solo 50 mg/L de ES (39 mg/L de AZA) o con la combinación de 10 mg/L de AC con 10 mg/L de ES (44,2 mg/L de AZA), ya que ha mayores concentraciones de precursores solos o combinados y tiempo de cultivo declina significativamente la producción del metabolito secundario. Estos resultados pueden ser la base para futuras investigaciones en bioreactores, donde se produzca masivamente este importante metabolito secundario.

#### Agradecimientos

Al Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo (Naguanagua-Edo. Carabobo), por el apoyo en el estudio morfo-histológico y de cultivo *in vitro* en esta investigación.

#### 5. Referencias

- [1] J. Urdaneta, *Manual Técnico. Agrotécnico 25 Aniversario de la División de Extensión Agrícola (DEA), Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia*. Maracaibo, Venezuela: Tipografía Mundo S. A., 2001, Manual Técnico Neem: Un árbol milagroso.
- [2] M. Vanisree, C. Lee, S. Lo, S. Nalawade, C. Lin, and H. Tsay, "Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures," *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. 45, no. 1, pp. 1–22, 2003.
- [3] K. Biswas, I. Chattopadhyay, and R. Banerjee, "Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*)," *Current Science*, vol. 82, no. 11, pp. 1336–1345, 2002.
- [4] R. Bijauliya, S. Alok, D. Chanchal, M. Sabharwal, and R. Yadav, "An Updated review of pharmacological studies on *Azadirachta indica* (Neem)," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 9, no. 7, pp. 2645–2655, 2018.
- [5] S. Akbar, *Handbook of 200 Medicinal Plants a comprehensive review of Their traditional medical uses and scientific justifications*, 1st ed. Suiza: Springer, 2020.
- [6] S. Agrawala, D. Poplib, K. Sircarb, and A. Chowdhry, "A review of the anti cancer activity of *Azadirachta indica* (Neem) in oral cancer," *Journal of Oral Biology Craniofacial Research*, vol. 10, pp. 206–209, 2020.
- [7] J. Dougoud, S. Toepfer, M. Bateman, and W. Jenner, "Efficacy of homemade botanical insecticides based on traditional knowledge. A review," *Agronomy of Sustainable Development*, vol. 39, no. 4, pp. 37–57, 2019.
- [8] M. Gowda, S. Ambardar, and C. Kole, *The Neem Genome*. Switzerland: Springer International Publishing, 2019.
- [9] N. Joshee, A. Sadanand, and D. Parajuli, *Medicinal Plants From Farm to Pharmacy*, 1st ed. Switzerland: Springer, 2019.
- [10] T. Çalişkan, R. Hatipoğlu, and S. Kirici, "Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under *In vitro* Conditions," *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, vol. 7, no. 7, pp. 971–980, 2019.
- [11] F. Orozco-Sánchez, G. Sepúlveda-Jiménez, G. Trejo-Tapia, A. Zamilpa, and M. Rodríguez-Monroy, "Oxygen limitations to grow *Azadirachta indica* cell culture in shake flasks," *Revista mexicana de ingeniería química*, vol. 10, no. 3, pp. 343–352, 2011.
- [12] D. Thakore and A. Srivastava, "Review: Production of biopesticide azadirachtin using plant cell and hairy root cultures," *Engineering in Life Sciences*, vol. 17, pp. 997–1005, 2017.
- [13] S. Srivastava and A. Srivastava, "Statistical medium optimization for enhanced azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*," *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 48, pp. 73–84, 2012.
- [14] S. Srivastava and A. Srivastava, "Azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in a modified stirred tank reactor," *Bioprocess and Biosystem Engineering*, vol. 35, no. 9, pp. 1549–1553, 2012.
- [15] S. Srivastava and A. Srivastava, "In Vitro azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in nutrient mist bioreactor," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 166, no. 2, pp. 365–378, 2012.

- [16] S. Srivastava and A. Srivastava, "Strategies to overcome oxygen transfer limitations during hairy root cultivation of *Azadirachta indica* for enhanced azadirachtin production," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 167, no. 6, pp. 1818–1830, 2012.
- [17] R. Palavalli, S. Srivastava, and A. Srivastava, "Development of a Mathematical Model for Growth and Oxygen Transfer in *In Vitro* Plant Hairy Root Cultivations," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 167, pp. 1831–1844, 2012.
- [18] S. Srivastava and A. Srivastava, "Production of the biopesticide azadirachtin by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in liquid-phase bioreactors," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 171, no. 6, pp. 1351–1361, 2013.
- [19] S. Srivastava and A. Srivastava, "Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 172, no. 4, pp. 2286–2297, 2014.
- [20] F. Orozco-Sánchez y M. Rodríguez-Monroy, "Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida," *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 6, no. 3, pp. 251–258, 2007.
- [21] T. Kuruvilla, P. Komaraiiah, and V. Ramakrishna, "Enhanced secretion of azadirachtin by permeabilized margosa (*Azadirachta indica*) cells," *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 37, pp. 89–91, 1999.
- [22] K. Balaji, C. Veeresham, K. Srisilam, and C. Kokate, "Azadirachtin, a novel biopesticide from cell cultures of *Azadirachta indica*," *Journal of Plant Biotechnology*, vol. 5, no. 2, pp. 121–129, 2003.
- [23] K. Raval, S. Hellwig, G. Prakash, A. Ramos-Plasencia, A. Srivastava, and J. Büchs, "Necessity of a two-stage process for the production of azadirachtin-related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 96, no. 1, pp. 16–22, 2003.
- [24] G. Prakash, C. Emmanuel, and A. Srivastava, "Variability of azadirachtin in *Azadirachta indica* (Neem) and batch kinetics studies of cell suspensions culture," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 10, no. 3, pp. 198–204, 2005.
- [25] G. Prakash and A. Srivastava, "Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures," *Process and Biochemistry*, vol. 40, no. 12, pp. 3795–3800, 2005.
- [26] G. Prakash and A. Srivastava, "Production of biopesticides in an *in situ* cell retention bioreactor," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 151, no. 2–3, pp. 307–318, 2008.
- [27] J. Bedoya y R. Hoyos, "Efecto de la Relación Agitación-Aireación sobre el Crecimiento Celular y la Producción de Azadiractina en Cultivos Celulares de *Azadirachta indica* A. Juss," *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía (Medellin)*, vol. 63, no. 1, pp. 5293–5305, 2010.
- [28] G. Prakash and A. Srivastava, "Integrated yield and productivity enhancement strategy for biotechnology production of azadirachtin by suspension culture of *Azadirachta indica*," *Asia-pacific Journal of Chemical Engineering*, vol. 6, no. 1, pp. 129–137, 2011.
- [29] M. Singh and R. Chaturvedi, "Sustainable production of azadirachtin from differentiated *in vitro* cell lines of neem (*Azadirachta indica*)," *AoB Plants*, vol. 5, no. 1, pp. 1–15, 2013.
- [30] M. Rodríguez, R. Festucci, L. Campos, and W. Campos, "Azadirachtin biosynthesis induction in *Azadirachta indica* A. Juss cotyledonary calli with elicitor agents," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 57, no. 2, pp. 155–162, 2014.
- [31] A. Vásquez-Rivera, D. Chicaiza-Finley, R. Hoyos, and F. Orozco-Sánchez, "Production of Limonoids with Insect Antifeedant Activity in a Two-Stage Bioreactor Process with Cell Suspension Culture of *Azadirachta indica*," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 177, no. 2, pp. 334–345, 2015.
- [32] L. Sánchez, "Escalamiento del cultivo de células en suspensión de *Azadirachta indica* (Neem) en biorreactor tanque agitado para la producción de azadiractina," Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica, 2016.
- [33] M. Rafiq, N. Ali, M. Malhi, O. Aksoy, S. Ahmed, and M. Umar, "Production of azadirachtin contents from immature flowers derived *in vitro* cultures of *Azadirachta indica* A. Juss," *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 26, no. 3, pp. 2056–2063, 2017.
- [34] M. Artigas y R. Fernández, "Establecimiento del sistema de regeneración por embriogénesis somática de *Azadirachta indica* A. Juss," *Acta Biológica Colombiana*, vol. 20, no. 2, pp. 73–83, 2015.
- [35] R. Fernández, A. Villaroel, L. Cuamo, y V. Storaci, "Evaluación de un sistema de regeneración por embriogénesis somática de Neem (*Azadirachta indica*)," *Acta Biológica Colombiana*, vol. 21, no. 3, pp. 581–592, 2016.
- [36] R. Fernández, L. Hermoso, and A. Menéndez, "Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor," *Interciencia*, vol. 30, no. 11, pp. 694–698, 2005.
- [37] D. Barrek, O. Paise, and M. Grenier, "Analysis of Neem oil by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 378, no. 3, pp. 753–763, 2004.
- [38] M. Artigas and R. Fernández, "Morpho-anatomical characterization of secondary somatic embryogenesis

- in *Azadirachta indica* (Meliaceae),” *Acta Botanica Mexicana*, vol. 122, no. 1, pp. 1–14, 2018.
- [39] S. Johansen, *Plant Microtechnique*, 1st ed. New York, USA: Mc Graw-Hill Book Company, 1940.
- [40] D. Sharma, P. Kaur, G. Singh, D. Singh, S. Verma, and J. Singh, “Development and Validation of Stability Indicating UV-Visible Spectrophotometric Method for simultaneous Estimation of Neem (*Azadirachtin*) and Curcumin in Pharmaceutical Tablet Dosage form,” *Analytical Chemistry Letters*, vol. 9, no. 4, pp. 564–581, 2019.
- [41] J. Dai, V. Yaylayan, V. Raghavan, and J. Pare, “Extraction and Colorimetric Determination of Azadirachtin-Related Limonoids in Neem Seed Kernel,” *Journal of Agricultural Food Chemical*, vol. 47, pp. 3738–3742, 1999.
- [42] T. Singh, S. Haq, S. Salman, A. Namreen, and A. Rasheed, “Analytical Method Validation of Azadirachtin Extracted From *Azadirachta Indica*,” *International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 2, no. 4, pp. 99–106, 2017.
- [43] O. Hammer, A. David, T. Harper, and P. Ryan, “Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis,” *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, no. 1, p. 9, 2001.
- [44] E. Allan, J. Eeswara, S. Johnson, A. Mordue, D. Morgan, and T. Stuchbury, “The production of azadirachtin by *in vitro* tissue cultures of neem *Azadirachta indica*,” *Pesticide Science*, vol. 4, no. 1, pp. 147–152, 1994.
- [45] A. Wewetzer, “Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of Azadirachtin,” *Phytoparasitica*, vol. 26, no. 1, pp. 47–52, 1998.
- [46] T. L. M. Ng, R. Karim, Y. S. Tan, H. F. Teh, A. D. Danial, L. S. Ho, N. Khalid, D. R. Appleton, and J. A. Harikrishna, “Amino Acid and Secondary Metabolite Production in Embryogenic and Non Embryogenic Callus of Finger root Ginger (*Boesenbergia rotunda*),” *PLoS One*, vol. 11, no. 6, pp. 1–19, 2016.
- [47] L. Albuquerque, A. Araújo, C. De Araújo, M. Nascimento, F. Vieira, I. Cícera, D. Miranda, E. De Castro, V. Cruz, and A. Da Silva, “Induction, Growth Kinetics and Morpho-histological Characterization of Neem Callus,” *Journal of Agricultural Science*, vol. 10, no. 6, pp. 283–290, 2018.
- [48] S. Ashokhan, R. Othman, M. Hafiz, S. Anuar, and J. Syafawati, “Effect of Plant Growth Regulators on Coloured Callus Formation and Accumulation of Azadirachtin, an Essential Biopesticide in *Azadirachta indica*,” *Plants*, vol. 9, no. 3, pp. 352–368, 2020.
- [49] M. Arias, A. Angarita, J. Aguirre, J. Restrepo, y C. Montoya, “Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales,” *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía (Medellín)*, vol. 62, no. 1, pp. 4881–4895, 2009.
- [50] S. Srivastava and A. Srivastava, “*In vitro* Azadirachtin Production,” in *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, K. G. Ramawat and J. M. Mérillon, Eds. New York, USA: Springer Science & Business Media, 2008.