

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTAS MORFOGÉNICA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE CALLO OTENIDO A PARTIR DE DISCO DE HOJA DE *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)

EVALUATION OF RESPONSES OF CALLUS MORPHOGENIC OBTAINED FROM DISK SHEET *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) AND PHYTOCHEMICAL SCREENING

Anyela Paola Herrera-S¹, Mayra Alejandra Villegas-L.¹, Rodolfo López-F.²

¹Programa de Biología. Universidad del Quindío. anyelina223@hotmail.com

²Universidad del Quindío. Centro de Estudios e Investigación en Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad del Quindío-CIBUQ. rodolfofran@hotmail.com

Fecha de recibido: Octubre 10 de 2010

Fecha de Aceptado: Febrero 5 de 2011

Correspondencia: Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – CIBUQ., Universidad del Quindío. Av. Bolívar calle 12 norte Armenia Quindío Colombia

RESUMEN

El árbol de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), del que se obtiene una gran cantidad de sustancias químicas, presenta problemas en la reproducción sexual, con semillas poco viables. El objetivo del presente trabajo fue inducir procesos de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de disco de hoja de *A. indica* y realizar tamizaje fitoquímico para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los callos obtenidos. Se tomaron hojas de una planta de *A. indica*, las que se clasificaron de acuerdo a su posición en la lámina foliar: apical, medio, basal; para la fase de desinfección se evaluó NaClO del 3%, por 5 y 10 min de inmersión. Para la fase de inducción se evaluaron dos concentraciones de la auxina Picloram (1 y 2 mg/L). El mejor índice de desinfección, con menor daño en el tejido del explante, se alcanzó con la inmersión en NaOCl durante 10 min; para la inducción de callogénesis, las dos concentraciones permitieron generación de callo con características friables. Los callos obtenidos fueron transferidos a diferentes concentraciones de BAP (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L) y subcultivados por 4 meses, donde la mayoría presentó oxidación y en ninguna de las concentraciones (con BAP) hubo presencia de estructuras organogénicas. En el tamizaje fitoquímico realizado para callos y para hojas frescas, se obtuvieron resultados positivos para Alcaloides, Flavonoides, Sesquiterpenlactonas, Esteroides y/o Triterpenos, Cardiotónicos y Cumarinas volátiles.

Palabras Clave: *Azadirachta indica*, callogénesis, organogénesis indirecta, Picloram, BAP, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

The Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss), which gives a large amount of chemicals, has problems in sexual reproduction, with little viable seed. The aim of this study was to induce callus formation processes and indirect organogenesis from *A. indica* leaf discs and perform phytochemical screening for the presence of secondary metabolites in callus obtained. Leaves of *A. indica* were taken and classified according to their position in the leaf: apical, middle, baseline; for the disinfection phase NaOCl 3% for 5 and 10 min of immersion was evaluated. For the induction phase, two concentrations of auxin picloram (1 and 2.0 mg/L) were evaluated. The best index of disinfection, with less damage in the tissue explant, was achieved by immersion in NaOCl for 10 min, for induction, both concentrations showed a generation of callus. The calluses obtained were transferred to different concentrations of BAP (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/L) and subcultured for 4 months, in which most had rust. Furthermore, none of the concentrations (BAP) had presence of organogenic structures. The phytochemical screening of both calluses and fresh leaves gave positive results for alkaloids, flavonoids, sesquiterpene lactone, steroids and/or Triterpenes, Coumarins volatile and Cardiotonic.

Keywords: *Azadirachta indica*, callogenesis, indirect organogenesis, Picloram, BAP, secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

El árbol del Neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) perteneciente a la Familia Meliaceae; es conocido por sus propiedades medicinales en humanos (1) y por su uso en el control de insectos plaga en cultivos agrícolas (2); es una de las plantas con mayores aplicaciones en el mundo ya que todas sus partes pueden procesarse para obtener cientos de compuestos.

Se cultiva principalmente para la extracción de azadiractina (Aza), un metabolito secundario efectivo contra insectos, ácaros, nematodos, hongos y bacterias; cuya mayor concentración se encuentra en las semillas (3, 4). En Colombia, donde la palabra insecticida es sinónimo de toxicidad y contaminación, y donde los productos más usados son pesticidas de origen sintético que generan gran impacto negativo en el medio ambiente, el Neem se presenta como una especie vegetal promisoría para la producción de insecticidas; los metabolitos secundarios de este, se consideran ambientalmente amigables, es por esto que su demanda se incrementa continuamente (5).

Sin embargo, existen limitaciones agroclimáticas para su reproducción tradicional a partir de semillas, ya que estas disminuyen su capacidad germinativa en un 60% después de dos a tres semanas (6); además de que la concentración de Aza en estas varía considerablemente debido a la complejidad de sus estructuras y de acuerdo al genotipo de la semilla.

Teniendo en cuenta estos factores, y en aras de aprovechar el Neem para producir bioinsecticidas, se plantea inducir procesos de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de discos de hoja de *A. indica*, y realizar un tamizaje fitoquímico para determinar la presencia de metabolitos secundarios presentes en los callos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones en Biodiversidad-CIBUQ y el Laboratorio de Búsqueda de Principios Bioactivos de la Universidad del Quindío.

Material Vegetal

Como material vegetal se utilizó una planta joven de *A. indica*. A partir de ésta se utilizaron segmentos de hojas tanto jóvenes como maduras de aproximadamente

1cm² y fisiológicamente en buen estado; como explantes se emplearon segmentos de las partes apical, media y basal de la hoja.

Desinfección del Material

Para la pre-desinfección de los explantes de *A. indica*, el material vegetal (disco de hoja) se sumergió en 1000ml de agua destilada con detergente común, 3 gotas de tween 20 y 1ml de kasumin durante 30 minutos. En cabina de flujo laminar los explantes fueron tratados con hipoclorito de sodio (NaOCl) del 3% durante 5 y 10 min (Tabla 1); por último y luego de haber sometido los discos de hoja a tres enjuagues con agua destilada estéril, fueron inoculados al medio de cultivo basal, propuesto por Murashige y Skoog (MS) (7), el cual fue suplementado con diferentes concentraciones de la auxina Picloram; como agente gelificante se utilizó Culturegel; el medio fue suplementado con 30gr de glucosa; se ajustó el pH a 5.7-5.8 con KOH al 1N; los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C, 15 libras de presión durante 20 minutos. A las cuatro semanas se evaluó el número de explantes que formaron callos y las características de los mismos

Tabla 1. Tipo de Explante Utilizado de *A. indica*, y Tiempo de Inmersión en NaOCl

EXPLANTE (segmento de la hoja)	NaOCl	
	3%*5 minutos	3%*10 minutos
Apical	48	48
Media	48	48
Basal	48	48

Como protocolo de desinfección de los explantes durante el proceso de investigación, se utilizó el tiempo de inmersión en NaOCl, con el que se obtuvo la mayor desinfección del material vegetal.

Inducción de callos en segmentos de hojas inmaduras de *Azadirachta indica* A. Juss

El diseño experimental para la inducción de callo consistió en la adición de la auxina Picloram a 1.0 y 2.0 mg.l⁻¹; utilizando los segmentos de hoja: apical, media y basal, dando lugar a un total de 6 tratamientos con 48 repeticiones cada uno. Los tratamientos se realizaron con un fotoperiodo de 12 horas en luz y la otra mitad en condiciones de oscuridad. En ambos casos se mantuvo una temperatura de 26 ± 1° C, y se utilizó como control explantes inoculados en medio sin hormonas.

Inducción de la respuesta morfogénica de callos

Se utilizaron callos obtenidos en la fase de inducción y

se inocularon en el medio de cultivo según el objetivo que quería lograrse de la siguiente manera:

↑ Multiplicación

La mitad de los callos (32) obtenidos de la inducción con auxinas se multiplicaron en medios con Picloram 2.0 mg/L por ser la concentración más óptima a la hora de la inducción; en esta fase fue mantenida la temperatura de la fase de inducción, luego de 4 semanas de cultivo se evaluaron las respuestas de multiplicación.

↑ Inducción de organogénesis indirecta

La otra mitad de los callos (32) obtenidos de la inducción con auxinas fueron puestos en un medio conteniendo BAP a 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L para la inducción de organogénesis indirecta; luego de 4 semanas se evaluaron las respuestas de morfogénesis en cuanto a: oxidación y posible aparición de estructuras organogénicas (brotes y raíces).

Determinación de metabolitos secundarios

Para el desarrollo de este objetivo, se siguió la metodología de Antonio Sanabria Galindo (8); a través de marchas fotoquímicas, se hicieron los mismos procedimientos tanto para los callos obtenidos como para hojas frescas, provenientes directamente de la planta de *A. indica*, mantenida en condiciones de vivero en la Universidad del Quindío.

Obtención del Extracto Etanólico

Las hojas y los callos obtenidos en el laboratorio, se secaron en un horno a una temperatura de 40°C durante 5 días, luego se pulverizó el material mecánicamente y se guardó en frascos de vidrio.

La obtención de los extractos se hizo por extracción con solvente (etanol), ya que todas las sustancias que se analizan en el presente estudio son solubles en este. 1,8 g de material vegetal pulverizado tanto para callos como para las hojas se dejaron con etanol rectificado durante 24 horas; se realizó destilación simple, logrando separar el extracto del solvente.

Los dos extractos etanólicos obtenidos, fueron comparados entre sí mediante cromatografía en capa delgada, utilizando como fase móvil diclorometano y acetato de etilo; los posibles grupos de metabolitos fueron detectados al observar las placas bajo luz ultravioleta de onda corta y larga (254 nm y 365 nm), usando como revelador, vainillina.

Análisis Fitoquímico Preliminar para determinar grupos de Metabolitos Secundarios presentes en los extractos

Se realizaron diferentes pruebas fitoquímicas, que permitieran determinar la presencia de metabolitos secundarios, tanto en callos como en hojas frescas de *A. indica* (Figura 1).

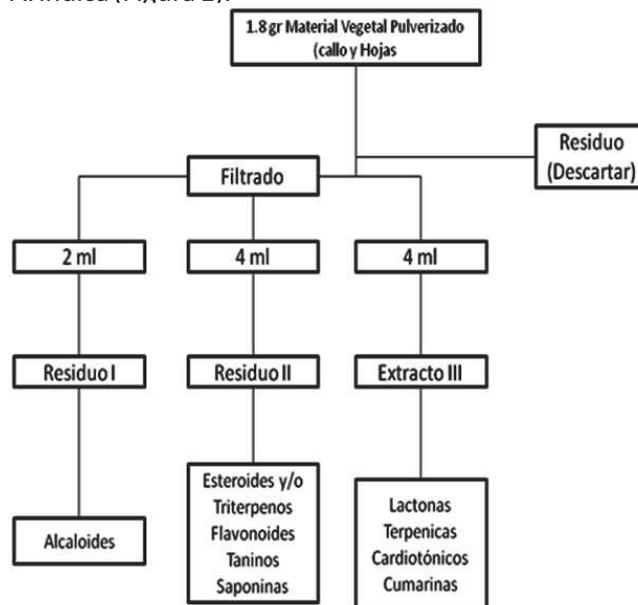


Figura 1. Obtención del extracto etanólico total para callos y hojas de *A. indica*.

Para la lectura de los resultados, se tuvo en cuenta la siguiente simbología:

- Presencia en concentración abundante del metabolito [+++]
- Presencia en concentración moderada [++]
- Presencia del metabolito en poca concentración, resultado dudoso en la prueba, o falso positivo [+]
- Ausencia del metabolito [-]

Análisis de Alcaloides

A la cápsula de porcelana con el RESIDUO I se le agregó 0,25 ml de HCl al 5%, se calentó a 60°C, se dejó enfriar y se filtró por papel hasta obtener un filtrado totalmente transparente denominado FILTRADO "A". Se transfirieron aproximadamente 0,5 ml de este a 3 tubos de ensayo, al primero se le adicionaron 2 gotas de Reactivo de Dragendorff, al segundo dos gotas de Reactivo de Mayer y al tercero 2 gotas de Reactivo de Wagner.

Análisis de Esteroides y/o Triterpenos

El RESIDUO II fue extraído con 10 ml de éter de petróleo, se filtró, y se obtuvo el FILTRADO "B", se concentró en baño maría y se adicionó a un tubo de ensayo que contenía 10 ml de metanol-agua (90:10), se agitó y se

dejó en reposo hasta que se separaron las 2 capas, luego se retiró 1ml de la fase etérea superior (SOLUCIÓN "1") con una pipeta.

En una placa de vidrio de 5x5 cubierta con sílica gel, se aplicó sobre la diagonal y a 2 cm del vértice inferior izquierdo, una muestra de la SOLUCIÓN "1", se corrió la placa con ciclohexano-acetato de etilo (95:5), se dejó evaporar el solvente y se giro 90° hacia la izquierda, luego se corrió nuevamente con una mezcla de éter de petróleo-éter etílico-acetato acético (80:20:1). Se marcaron todas las manchas coloreadas, se asperjó con reactivo de Liebermann-Burchard y se calentó por 10 minutos en una estufa a 100°C.

Adicionalmente a esta prueba, se realizó la prueba propuesta por Domínguez (9), llevando a sequedad 1ml de extracto etanólico (tanto de callos, como de hojas), se adicionó 1 ml de cloroformo y se dividió en dos porciones iguales; en una de las porciones se hizo la reacción de Liebermann-Buchard y en la otra, la de Salkowski.

Análisis de Flavonoides

Se utilizó la prueba Willstater o de Shinoda. En una placa escavada que contenía aproximadamente 0,5 g de magnesio en polvo, se le agregó 0.5ml de extracto etanólico y gota a gota ácido clorhídrico concentrado hasta que se terminó el desprendimiento de hidrógeno, observando los cambios de coloración por 10 minutos.

Análisis de Sesquiterpenlactonas

Una gota de solución etanólica de callos y una de hojas se colocó en dos tubos de ensayo, se adicionó una gota de solución metanólica 2N de clorhidrato de hidroxilamina y una gota de solución metanólica 2N de hidróxido de potasio; la mezcla se calentó durante 1 a 2 minutos, se dejó enfriar y se acidulo con ácido clorhídrico 0.5N, luego se adicionó una gota de cloruro férrico al 1%, y se observó el cambio de coloración por varios minutos. También se realizó la prueba de Baljet para sesquiterpenlactonas, en la cual se colocaron 2 gotas del extracto etanólico (callos y hojas), y 3 gotas de reactivo de Baljet, considerando la prueba positiva si se formaba una coloración naranjada o roja, o si se evidenciaba algún cambio notable de coloración.

Análisis Preliminar de Cardiotónicos

A 1 ml de extracto etanólico (callos y hojas), se le adicionó 1 ml de solución de acetato de plomo al 10% y

1 ml de agua destilada, la mezcla se calentó a baño maría durante 5 minutos y se dejó enfriar, se agitó el filtrado con 5ml de cloroformo, se separó la capa clorofórmica en 5 tubos de ensayo y se llevó a sequedad, a cada tubo se le hizo el siguiente procedimiento:

- Tubo 1:** adición de 1 ml del Reactivo de Baljet. Coloración roja, naranja, rojiza o violeta: positiva.
- Tubo 2:** adición de 1 ml del Reactivo de Kedde. Coloración roja, azul o violeta: positiva.
- Tubo 3:** adición de 1 ml del Reactivo Keller Killani. Coloraciones intensas: positiva.
- Tubo 4:** adición de 1 ml del Reactivo Liebermann-Buchard. Coloración verde o azul verdoso: positiva.
- Tubo 5:** adición de 1 ml del Reactivo de Salkowski. Coloración amarilla-rojo sangre: positiva.

Análisis de Taninos

5 ml de extracto etanólico se llevaron a sequedad; se disolvió el residuo en 10ml de agua destilada y se filtró; a 3 ml, a este extracto acuoso se le adicionaron 2 gotas de solución de cloruro férrico al 10%. Se consideró la prueba positiva si se producía una coloración azul o verde; se confirmó el resultado de la prueba dividiendo el resto del extracto acuoso en tres tubos de ensayo con partes iguales, a cada tubo se le hizo el siguiente procedimiento:

- Tubo 1:** adición de 5 gotas de solución de gelatina.
- Tubo 2:** adición de 5 gotas de solución de gelatina-sal.
- Tubo 3:** adición de 5 gotas de solución salina.

Confirmación positiva para precipitado blanco en los tubos con soluciones de gelatina y gelatina sal; si además aparecía un precipitado en el tubo con solución salina se consideraba prueba negativa.

Análisis de Saponinas

Se evaporó 1 ml del extracto etanólico y se retomo en agua hirviendo, se dejó enfriar y se agitó vigorosamente, dejándose reposar 20 minutos; si había presencia de espuma, esta indicaba prueba positiva.

Análisis de Cumarinas Volátiles

En un tubo de ensayo, se adicionaron 2 ml del extracto etanólico (callos y hojas), se tapó con un papel filtro impregnado con solución diluida en NaOH; se llevó a baño maría por varios minutos, y se observó el papel bajo la luz ultravioleta, si se observaban manchas amarillas: era positiva.

Fase Estadística

Para el tratamiento estadístico, se utilizó el Paquete Statgraphics Centurión XV. Para analizar el porcentaje de contaminación se realizó un análisis de varianza con un factor, utilizando un valor de significancia igual a 5% ($\alpha = 0.05$), la variable respuesta fue el porcentaje de contaminación de los explantes y el factor para explicarlo fue el tiempo de inmersión en NaOCl, (5 y 10 minutos), unidad de muestreo fue el explante.

También se realizó un análisis de varianza para explicar el porcentaje de contaminación mediante el factor segmento de la hoja, (apical, media, basal), con el explante como unidad de muestreo. Se realizó una tabulación cruzada, con las variables segmento de la hoja y contaminación del explante, como variable dicotómica, con las respuestas si y no.

Se realizó una regresión logística, para explicar la contaminación de los explantes (variable respuesta), con las variables parte de la hoja y tiempo de inmersión en NaOCl.

La producción de callos se analizó con un ANOVA mediante el factor segmento de la hoja, (apical, medio y basal), considerando el explante como unidad de muestreo.

Igualmente, con un ANOVA se explicó el porcentaje de callos producidos al aplicar dos concentraciones de la hormona Picloram: 1 mg l⁻¹ y 2 mg l⁻¹. Mediante tabulación cruzada se observó el comportamiento de producción de callo como variable dicotómica (si o no) y la concentración de la hormona.

Se realizó una regresión logística, para explicar la producción de callo (variable respuesta), con las variables segmento de la hoja y concentración de hormona.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material Vegetal

Para la evaluación de la contaminación utilizando como explantes las partes apical, media y basal de la hoja, el análisis de varianza ANOVA mostró que no hay diferencias significativas con respecto al segmento utilizado y al índice de contaminación. (Figura 2).

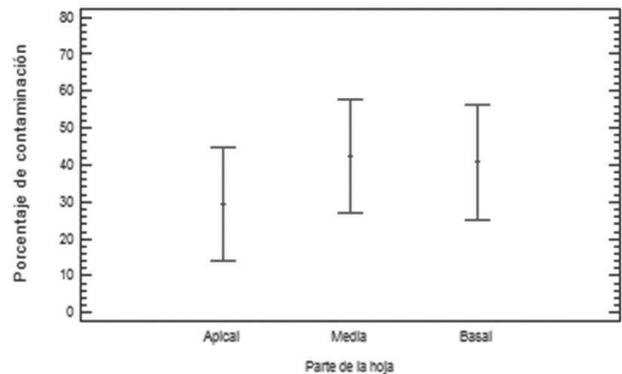


Figura 2. Porcentaje de contaminación de los explantes de *A. indica* utilizando como explante diferentes segmentos de la hoja

El tamaño inicial del explante que se utilizó (1cm²) resultó ser el apropiado para la fase de establecimiento, explantes muy pequeños se necrosaron en mayor proporción; por otra parte se observó que los explantes que eran inoculados al medio en posición horizontal no tenían ninguna respuesta, mientras que los que se sembraron en posición vertical mostraron generación de callo de color verde después de tres semanas de cultivo; en la mayoría de los casos estos emergían de los extremos cortados del explante (No se muestran datos), este mismo fenómeno ha sido descrito por Daquinta *et al.* (2003) (10), para otras Meliáceas.

De acuerdo con Jiménez *et al.* (11), es importante tener en cuenta la zona del tejido que se utiliza para iniciar el cultivo *in vitro*, ya que tiene gran influencia en la eficiencia de la desinfección. (12), sin embargo en este caso no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la parte apical, media y basal de donde provenía el explante.

Desinfección del Material

En la Figura 3 se observa el porcentaje de contaminación en segmentos de hojas apical, media y basal de *A. indica*; se encontró que el tratamiento con mayor tiempo de inmersión en NaOCl tuvo el menor índice de contaminación en los explantes.

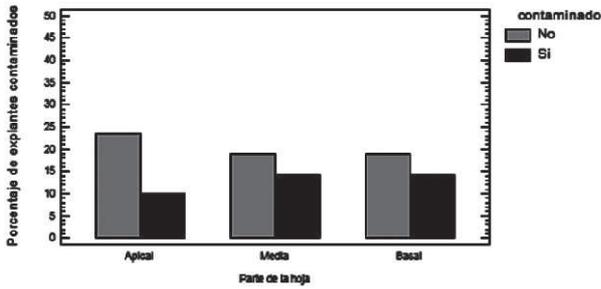


Figura 3. Porcentaje de contaminación de los explantes de *A. indica* provenientes de diferentes segmentos de la hoja

El análisis de varianza ANOVA mostró diferencias significativas en cuanto a la desinfección de los discos de hoja con diferente exposición al NaOCl (Figura 4); por lo tanto el tiempo elegido para la desinfección fue de 10 minutos, el cual tuvo un índice de contaminación de (20%), respecto al tratamiento de 5 minutos con el 55% de contaminación.

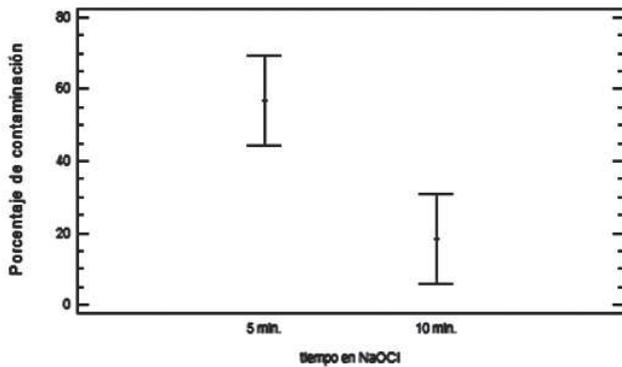


Figura 4. Porcentaje de contaminación de los explantes de *A. indica* en dos tiempos de inmersión en NaOCl

El análisis de regresión logística, confirmó los resultados obtenidos en el ANOVA; mostrando para los segmentos basal, medio y apical de la hoja con respecto al índice de contaminación, un *P-valor* de 0,28 lo cual indica que no hay diferencias significativas; y un *P-valor* de 0,00 para el tiempo de inmersión en NaOCl (5 y 10 minutos), mostrando diferencias significativas.

Se observó que a mayor tiempo de exposición a NaOCl se presentaron porcentajes más bajos de contaminación, lo cual puso de manifiesto que la desinfección superficial del material vegetal con soluciones de NaOCl, resultó efectiva para controlar los microorganismos contaminantes (11, 12, 13), adicionalmente permitió que el explante no sufriera necrosis, y por tanto fuese viable para la inducción de calogénesis (no se muestran datos).

Aunque es posible utilizar desinfectantes más efectivos como el bicloruro de mercurio ($HgCl_2$), no es conveniente debido a que es tóxico y altamente contaminante (12, 15), por lo que varios autores recomiendan el uso del NaOCl como desinfectante en la micropropagación vegetal (14, 16). No obstante Mroginski y Roca (17), señalan que es difícil lograr cultivos completamente estériles para cualquier especie.

Inducción de callos en segmentos de hojas inmaduras de *Azadirachta indica* A. Juss

En la Figura 5, se observa el porcentaje de formación de callos en los segmentos de hoja de *A. indica*; se encontró que el tratamiento con la concentración mas alta de Picloram (2.0 mg l-1) fue el que arrojó mejores resultados para la formación de callos en este tipo de explantes.

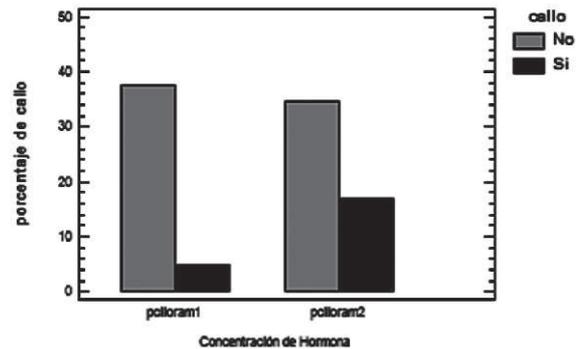


Figura 5. Porcentaje comparativo de formación de callos en explantes de *A. indica* a dos concentraciones de Picloram

La inducción de callo a partir de segmentos de hoja demostró que el tratamiento mas efectivo para lograr la desdiferenciación de los explantes, se conseguía con la concentración de Picloram mas alta, pues en este caso el porcentaje de los explantes que generaron callo después de 4 semanas de cultivo en el medio de inducción fue de 23.2% (Tabla 2); Por otra parte, se encontró que los explantes expuestos a oscuridad con este regulador, no respondieron adecuadamente a la inducción de calogénesis comparados con los inoculados en condiciones de luz (No se muestran datos).

Tabla 2. Porcentaje de formación de callo según el segmento de la hoja (apical, media y basal) a dos concentraciones de Picloram. Después de 4 semanas de inoculación

Medio de Cultivo	Regulador de Crecimiento mg l-1	Porcentaje de Formación de Callo, según tipo de explante		
		Apical	Media	Basal
M1	Picloram 1{}	15.8	20.5	17.9
M2	Picloram 2{}	22.6	23.8	23.4

El ANOVA mostró que el estímulo de la auxina Picloram a una concentración mayor, presentó la mayor formación de callo con respecto a una concentración más baja (Figura 6), estadísticamente se demostró que habían diferencias significativas entre las dos concentraciones de la hormona utilizada (*p*-valor de 0.0013).

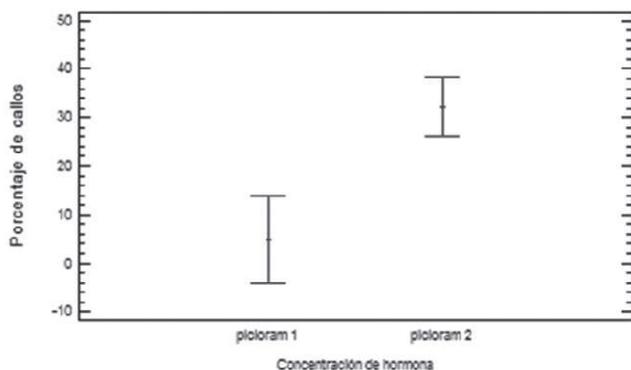


Figura 6. Porcentaje de formación de callos en explantes de *A. indica* a dos concentraciones de Picloram

Lo anterior concuerda con lo dicho por Collins *et al* (19), quienes afirman que el Picloram es una auxina sintética muy eficiente para el cultivo de tejidos vegetales, puesto que ofrece ciertas ventajas, por ser soluble en agua, menos tóxica y por ofrecer un mayor potencial para la regeneración de plantas a partir de callos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, coinciden con la afirmación de Roca y Mroginski, (17), quienes sugieren la aplicación de hormonas en concentraciones de 2.0, 3.0 ó 4.0 mg/L en la fase de inducción con el objetivo de inducir callo.

En cuanto a la parte de donde provenía el explante, el ANOVA mostró que no hay diferencias significativas entre los segmentos apical, medio y basal de la hoja donante, por lo que en la fase de inducción de organogénesis indirecta no se tuvo en cuenta dicho aspecto. (Figura 7)

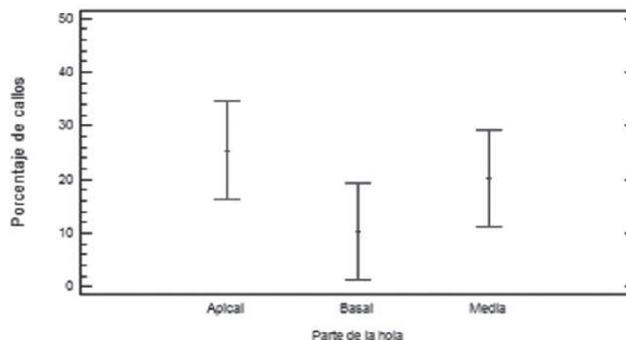


Figura 7. Porcentaje de formación de callos en diferentes segmentos de la hoja de *A. indica* a dos concentraciones de Picloram

En el tratamiento control (sin reguladores de crecimiento), no se presentó formación de callo en los diferentes segmentos de la hoja.

Los callos obtenidos en presencia de Picloram, presentaron buenas características morfológicas, de un color amarillo verdoso, de forma amorfa y de característica friable (Figura 8); características que están asociadas a una mayor capacidad de regeneración de plantas.

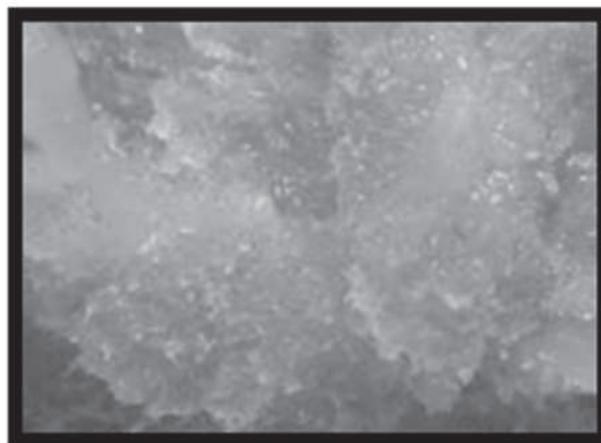


Figura 8. Características de callo de *A. indica* obtenido a dos concentraciones de Picloram

Según Salinas (20), los callos embriogénicos están constituidos por células isodiamétricas con abundantes gránulos de almidón, con una coloración clara, amarillenta o amarillo verdosa, de forma amorfa o nodular y de consistencia fríasca; basados en lo anterior, es probable que de los callos que se obtuvieron después de 4 semanas de cultivo se puedan regenerar embriones somáticos.

Inducción de la respuesta morfogénica de callos

Para la inducción de la respuesta morfogénica en callos de *A. indica*, se tuvo en cuenta la disponibilidad de callos obtenidos en la fase inicial utilizando las dos concentraciones de la hormona Picloram (1.0 -2,0 mg/L); sin tener en cuenta la procedencia de los segmentos de hoja (apical, media y basal).

•Multiplicación

La proliferación de callo se vio afectada en todos los tratamientos evaluados debido a la oxidación de éstos (Figura 9); además, fue posible evidenciar la deshidratación del material relacionado principalmente con la disminución de diámetro de todos los callos (datos no mostrados).

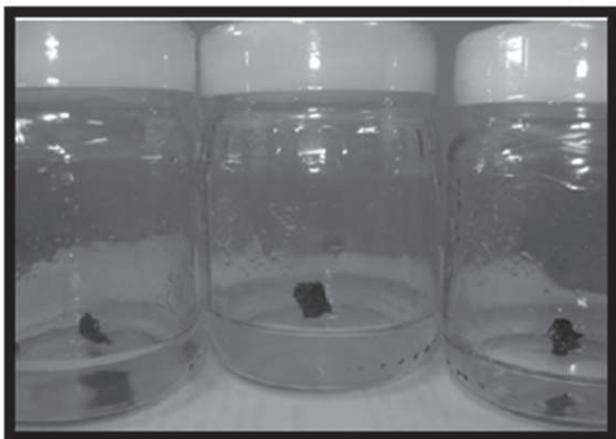


Figura 9. Callos de *A. indica* oxidados en la fase de multiplicación

En concordancia con lo anterior, Gutiérrez (21), plantea que en muchas especies forestales, la oxidación presente en los callos embriogénicos es común; reportó la oxidación de la mayoría de los callos de aliso (*Alnus acuminata*) que posteriormente pueden originar embriones somáticos diferenciados.

Glocke *et. al.* (22), en estudios *in vitro* con especies de eucalipto afirmaron que el oscurecimiento de los callos esta relacionado con muchos factores; respecto a lo anterior, Uribe (23) encontró diferencias en la multiplicación de callos de *Guadua angustifolia* expuestos a luz y oscuridad, en los cuales los callos de oscuridad se deshidrataron, oxidaron y necrosaron mientras que los expuestos a luz crecieron en peso y diámetro y presentaron características embriogénicas.

En el caso de los callos provenientes de disco de hoja de *A. indica*, la oxidación se presentó en alto porcentaje, posiblemente debido a la exposición de los callos a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, lo cual pudo incrementar la deshidratación del material, ya que la totalidad de los callos inoculados para la fase de inducción de respuesta morfogénica perdieron diámetro luego de treinta días (datos no mostrados).

Para reducir los problemas asociados a la oxidación, algunos autores sugieren subcultivos frecuentes y la utilización de carbón activado, el cual tiene la capacidad de absorber metabolitos tóxicos, lo que favorece la habilidad del explante o callo de regenerar estructuras (22).

Los callos que fueron divididos y separados del explante, antes de la inoculación en un nuevo medio con la concentración original del regulador de crecimiento (2,0 mg/L de Picloram) en condiciones de luz y oscuridad, mostraron un porcentaje alto de oxidación y una fuerte deshidratación en la totalidad del explante.

Los callos mantenidos en Picloram 2.0 mg/L en condiciones de luz, pero que no sufrieron la división ni separación del explante, presentaron crecimiento abundante, pasando de crecer solo en el extremo cortado del explante, a crecer en toda la superficie de este, además se evidenció un consecutivo cambio de color, volviéndose de amarillo-verdoso a un color pardo. (Figura 10).

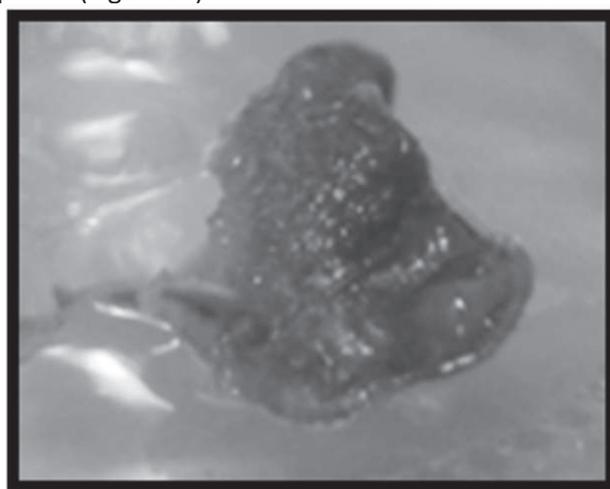


Figura10. Callo de *A. indica* en la fase de multiplicación Después de 4 semanas de cultivo el tamaño de los

callos era pequeño aproximadamente (0.5 a 1 cm), pero cuando fueron transferidos a un medio fresco con las mismas condiciones que el medio inicial estos iniciaron un crecimiento mas acelerado.

•Inducción de organogénesis indirecta

Los callos que fueron inoculados en medios de cultivos con BAP a diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L), presentaron poca o nula oxidación, sin embargo, luego de 4 semanas de cultivo no se observo la aparición de estructuras organogénicas en ninguna de las concentraciones empleadas.

Las respuestas que tuvieron los callos esta fase, solo fue de crecimiento en medios con BAP a 1 y 1.5 mg/L; lo que coincide con Royero et al. (24) quienes afirman que esta hormona utilizada en mayores concentraciones, produce mayor diámetro de los callos.

En este sentido, se puede concluir que el crecimiento de los callos en esta fase, se ve favorecido mayormente por el tratamiento que contenía mayores concentraciones de BAP. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Muñoz (25), quien señala que un aumento en la concentración hormonal origina la proliferación de una gran cantidad de brotes y consecuente aumento de diámetro de los callos.

Según Vietez y Vietez (26), a concentraciones de 1 ó 2 mg/l de BAP se obtiene el máximo número de brotes en el material juvenil, por lo que concluye que la concentración óptima para la proliferación de callos se encuentra entre 0,5-2.0 mg/l.

Determinación de metabolitos secundarios

•Obtención del Extracto Etanólico

Los extractos obtenidos a partir de los callos y las hoja de *A. indica* presentaron una coloración amarillosa para los callos y verde oscuro para la hojas.

Al hacer la comparación entre ambos, mediante la cromatografía en capa delgada, se evidenciaron después del revelado con vainillina, manchas de tonalidades amarillas, rojas y violetas tanto para el extracto de los callos como para las hojas; y solo manchas en tonalidades verdes en el extracto de las hojas. (Figura 11).

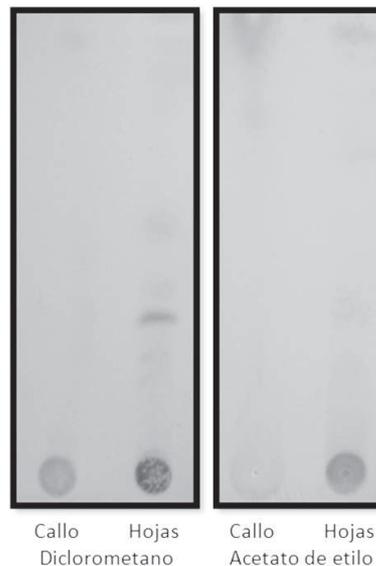


Figura11. Cromatografía comparativa para extracto etanólico de callo y hojas de *A. indica*

Los patrones cromatográficos, mostraron gran variabilidad, esto indica que tanto los callos como las hojas de *A. indica*, tienen gran producción de metabolitos secundarios, lo que sería de gran utilidad para la explotación de alguno de estos. Sin embargo, las hojas mostraron una presencia notablemente mayor de fraccionamientos en la cromatografía.

Lo anterior concuerda con lo dicho por Sajc *et al.* (27), quienes afirman; que factores fisicoquímicos en los cultivos *in vitro*, tales como, la composición del medio, la disponibilidad de luz y la temperatura entre otros, afectan la producción de metabolitos secundarios a partir de células de plantas cultivadas en condiciones *in vitro*; sin embargo, la producción de estos, puede ser aumentada utilizando callos con mayor tiempo de incubación; pues la producción de estos aumenta al iniciarse la fase estacionaria de la curva de crecimiento (28)

•Análisis Fitoquímico Preliminar para determinar grupos de Metabolitos Secundarios presentes en los extractos

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en las pruebas preliminares para la determinación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de callos y hojas de *A. indica*.

Análisis de Alcaloides

El análisis fitoquímico preliminar tanto para callos como para las hojas presentó un valor positivo para

alcaloides con los diferentes reactivos (Dragendorff, Mayer, Wagner)

El resultado positivo indicó que, el contenido de alcaloides en ambas partes de la planta es muy abundante, sin embargo estas pruebas no sirven para determinar el tipo de alcaloide presente en los extractos; sólo permiten dar un indicio de la presencia de varios grupos de alcaloides, o de grupos que contienen nitrógeno dentro de su estructura.

Análisis de Flavonoides

Esta prueba arrojó resultados positivos para ambos extractos (callos y hojas), lo cual se evidenció por la formación de una coloración rojiza al agregar las limaduras de magnesio y el ácido clorhídrico concentrado sobre el extracto de las hojas, y un cambio de coloración y formación de espuma para el extracto de los callos. Según la teoría esta apreciación es prueba positiva para sustancias que poseen en su estructura el núcleo de la γ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavononas, flavonoles isoflavonoides y xantonas).

Este resultado positivo ya se esperaba, por ser los flavonoides uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos en las plantas, siendo en su mayoría responsables de los colores amarillo y blanco de las flores, hojas y frutos (10).

Análisis de Esteroides y/o Triterpenos

Esta prueba tuvo un resultado positivo tanto para los callos como para las hojas, se presentaron diferencias en la aparición de manchas coloreadas en las placas antes del revelado con el reactivo de Liebermann-Burchard, siendo estas más evidentes y con mayores tonalidades para el extracto etanólico de las hojas, en la cual se observaron manchas amarillo-verdosas, las cuales pueden corresponder a carotenoides o xantofilas; en la placa para el extracto etanólico de los callos solo se evidenciaron manchas amarillas.

Después del revelado en ambas placas aparecieron manchas con tonalidades rojas y azules, pero solo en la placa para el extracto de las hojas se evidenciaron manchas en tonalidades verdes.

Tabla 3 Resultados del tamizaje Fitoquímico Preliminar para hojas y callo de *A. indica*.

Grupo de Metabolito secundario	Prueba	Resultados	
		Callos	Hojas
Alcaloides Libres	Dragendorff	+++	+++
	Mayer	+++	++
	Wagner	+++	+++
Flavonoides	Shinoda	+	+
Sesquiterpenlactonas		++	++
Esteroides y/o Triterpenos		++	+++
	Baljet	+++	+++
	Kedde	-	-
	Keller-Killiani	+++	+++
	Liebermann-Burchard	+++	+++
Taninos	Salkowski	+++	+++
	Cloruro Férrico	-	+++
	Gelatina Sal	-	+++
Saponinas	Espuma	-	-
Cumarinas Volátiles	Papel o Fluorescencia	+++	+++

El resultado de la prueba propuesta por Domínguez (9), fue igualmente positiva, confirmando los resultados obtenidos con la prueba propuesta por Antonio Sanabria tanto para callos como para hojas.

La presencia de Esteroides y/ triterpenos, en cultivos de células de *A. indica* y en sus hojas, ha sido reportada en muchas investigaciones, David *et al*, (29), afirman, que un tercio de los mas de 300 metabolitos producidos por esta planta, corresponden a triterpenos, los cuales son especialmente utilizados para el control de insectos (30), entre este grupo se encuentra el Aza, uno de los metabolitos principales, abundante y únicamente producido por *A. indica*, (31, 1).

Análisis Preliminar de Cardiotónicos

La prueba presentó resultados positivos para callos y para hojas en la reacción con todos los reactivos, exceptuando el reactivo Kedde que arrojó resultados negativos para ambos extractos.

Análisis Taninos

La prueba de cloruro férrico para los extractos de callos y hojas, arrojó un resultado negativo para callos, al no presentarse ningún cambio de coloración en la reacción, y positivo para hojas, al tornarse la muestra en una coloración azul verdosa intensa; este último resultado fue confirmado a través de la prueba gelatina-sal, considerándose positiva si se evidenciaba un precipitado en dicha reacción.

Análisis Saponinas

El análisis de saponinas arrojó resultados negativos para ambos extractos (callos y hojas) al no presentarse durante la reacción formación de espuma en ninguno de los dos casos.

Análisis Cumarinas Volátiles

Al observarse bajo la luz ultravioleta, el papel filtro impregnado con NaOH diluido, después de estar en baño maría con el extracto etanólico de callos y hojas se evidenciaron manchas de fluorescencia amarilla a lo largo del papel para ambos extractos.

A pesar de que los resultados del tamizaje fitoquímico no demuestran con certeza la presencia de todos los grupos de metabolitos secundarios; ya que los reactivos usados son muy sensibles a muchos grupos funcionales similares; las diferentes pruebas permitieron tener un indicio de la gran variedad de metabolitos presentes en la planta, tanto en los callos obtenidos mediante cultivo *in vitro*, como en las hojas tomadas directamente de la planta, con respecto a esto, puede afirmarse que *A. indica* posee un gran potencial, sobre todo teniendo en cuenta que los grupos de metabolitos secundarios encontrados, son ampliamente conocidos por sus propiedades farmacológicas e industriales importantes, esta afirmación concuerda con lo dicho por Dai *et al* 1999, y, David *et al*, 2000 (31,32), quienes manifiestan que *A. indica*, produce mas de 300 metabolitos secundarios, de interés comercial y científico por sus efectos biológicos.

CONCLUSIONES

- A partir de disco de hoja de *A. indica*, en medio basal MS suplementado con el regulador hormonal Picloram, se logró la inducción de callogénesis en condiciones *in vitro*.
- En las pruebas fitoquímicas se pudo establecer que tanto callos inducidos como hojas frescas de *A. indica*, poseen componentes como: alcaloides, sesquiterpenlactonas, flavonoides, esteroides y/o triterpenos, cardiotónicos y cumarinas volátiles; así mismo que solo las hojas poseen taninos, y que ninguna de las dos partes de la planta posee saponinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio de Biotecnología-CIBUQ de la Universidad del Quindío, y a su personal que allí labora; también al Profesor Milton Gómez, director del Laboratorio de Búsqueda de Principios Activos.

BIBLIOGRAFIA

1. Kausik B, I Chattopadhyay, RK Banerjee, U Bandyopadhyay (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Sci. 82:1336-1342.
2. Koul O, M B Isman, C M Ketkar (1990) Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. Can. J. Bot. 68:1-11.
3. Gera M, N Gera, S L Menna, T Singh (1998) Variation in response in ten provenances of *Azadirachta indica* A. Juss. The Indian Forester 124 (9):696-701.

4. National Research Council (NRC). 1992. Neem: a tree for solving global problems. Report of an Ad Hoc Panel of 25 the Board on Sci. and Technol for International Development. National Academy Press. Washington, D.C. 107 p.
5. Prakash, G; Bhojwani, S and Srivastava, A. (2002). Production of azadirachtin from plant tissue culture: state of the art and future prospects. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7, 185-193).
6. Webb, D.B., Wood, P.J., Smith, J.P. and Henman, G.S. 1984. A guide of species selection for tropical and subtropical plantations. OFI. Oxford. 256 p.
7. Rosell CH y Villalobos, VM. Fundamento teórico-práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales. Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. 1990.
8. Murashige T. A. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
9. Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar [Libro]. - Bogota : [s.n.], 1983.
10. Dominguez A, 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa S.A. p 97.
11. Daquinta M, Lezcano Y, Cid M, Rodríguez M, Pina D, Escalona M. 2003. Calogénesis en meliáceas exóticas (*Khaya nyasica* Stapf y *Toona ciliata*). Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila. *Biotecnología Vegetal Vol. 3, No. 2: 123–125.*
12. Jiménez V., Castillo J., Tavares E., Guevara E., Montiel M. 2006. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86:389–395.
13. Pérez, P. y Jiménez, G.E. (1995). “Micropropagación y fundamentos teóricos prácticos del cultivo *in vitro*”. Conferencias en Biotecnología Agrícola, pp. 1-10.
14. Ramírez, M. (1998). “Tratamientos a plantas madres y al explante para el establecimiento *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.)”. Trabajo de Grado. Maracaibo: La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. División de Estudios para Graduados. Programa de Fruticultura. 132 p.
15. López R. (2007). “Micropropagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth, en medio sólido y por inmersión temporal, y estudio de la aclimatación en campo”. Tesis Mag. Sc. Biología Vegetal. Universidad del Quindío, Universidad Tecnológica de Pereira, Universidad de Caldas.
16. Marulanda M.L. e Isaza L.V. (2004). “Establecimiento *in vitro* de heliconias con fines de producción masiva”. *Scientia et Technica* 26: 193-197.
17. Mroginski, L. A. y Roca W.M. (1991). “Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*”. In: W.M. Roca y L.A., Mroginski (EDS). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. P 19-40.
18. Collins GB, Vian WE, Phillips GC. Use of 4- amino- 3,5,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Sci* 1978;18:286. 8
19. Martin D. N 2003 Feed-back regulation of gibberellin biosynthesis and geneexpression in *Pisum sativum* L. *Planta* 200: 159-166.
20. Salinas R. 1990. Inducción de Embriogénesis Somática en Camote (*Ipomoea batatas* Lam). Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina. 51 p.

21. Gutiérrez L. G. 2002. Embriogénesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K. y estudio de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. 180 pp.
22. Glocke P., Collins. G, Sedgley M. 2006. Effects of auxins on organogenesis and somatic embryogenesis from juvenile explants of *Eucalyptus erytronema*, *E. stricklandii*, and two inter-specific hybrids. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 81 (6) 1009-1014.
23. Uribe M. 2007. Embriogénesis somática en *Guadua angustifolia* Kunth. Tesis de Maestría. Universidad del Quindío, Universidad Tecnológica de Pereira, Universidad de Caldas. 87p.
24. Royero, M., Vargas, T. E., Oropeza, M. 2007. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* L. *Interciencia* 32 (4): 247-254.
25. Muñoz-Tuesta S. Y. 2003. Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) a partir de Cotiledones. Tesis de Grado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias. Lima – Perú.
26. Vietez A. M., E. Vietez. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 1980, Vol. 50, p. 127-130.
27. Sajc, L. Grubisic, D. and Vunjak-Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal* 4, 89-99.
28. Yeoman, M & Forche, E. 1980. Cell Proliferation and Growth in Callus Cultures. *International review of Cytology*, Supplement 11A. 1-24.
29. Dai, J.; Yaylayan, V.; Vijaya G. S. and Pare, J. (1999). Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 3738-3742.
30. David, E.; A. and Jonesa, G. (2000). Ratio of productos formed on photo-oxidation of the neem triterpenoids nimbin and salanmin. *Arkivok* 1 (3), 312-319.