

## NOTA TÉCNICA

# PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL NIM (*Azadirachta indica* A. Juss.) MEDIANTE BROTES AXILARES

Amelia Capote Rodríguez<sup>1</sup> y Jesús Estrada Ortiz<sup>1</sup>

### RESUMEN

El árbol del nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) es actualmente una especie de importancia económica debido a sus usos tanto en el área forestal, como para la obtención de bioinsecticidas. La propagación del nim vía cultivo de tejidos ha sido reportada por numerosos autores y en la mayoría de los casos, los protocolos están basados en la organogénesis. En este estudio se seleccionaron las zonas apicales de posturas jóvenes de aproximadamente 10 cm de longitud, crecidas en condiciones de vivero. Los explantes utilizados fueron yemas apicales y segmentos nodales, se desinfectaron aplicando diferentes tratamientos de alcohol al 70% y cloro al 2.5%, y se enjuagaron con una solución de cisteína (50 mg/L) para evitar su oxidación. El material vegetal fue cultivado en medio basal MS, suplementado con 6- bencil amino purina (BAP) ó 6- furfuril amino purina (KIN), en concentraciones de 2 y 3 mg/L, solo o en combinación con 0.1 mg/L de ácido naftalén acético (ANA). La respuesta de los explantes fue mejor en los medios suplementados con BAP (3 mg/L), en comparación con los que tenían KIN. En subsecuentes cultivos se obtuvo una tasa de multiplicación de 3.2 nudos/brote, aunque el enraizamiento de los brotes fue obtenido en el medio MS sin hormonas. Las plantas enraizadas fueron transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatización y mostraron las mismas características que la planta madre.

**Palabras clave:** *Azadirachta indica*, brotes axilares, nim, propagación *in vitro*, reguladores del crecimiento, segmentos nodales.

Fecha de recepción: 16 de octubre de 2001.

Fecha de aceptación: 28 de junio de 2004.

---

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). Correo-e: [acapote@inifat.co.cu](mailto:acapote@inifat.co.cu)

## ABSTRACT

The neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.) is an important species because of its uses in both forestry and as bioinsecticide source. Propagation of neem via tissue culture has been investigated by several authors. The majority of these studies showed that culture protocols were based on organogenesis. In this study were used apical parts around 10 centimeters long, from juvenile plantlets grown in nursery conditions. The explants that were used in this research were axillary buds and nodal segments, which were washed with destiled water and desinfected with 70% alcohol and 2.5% chloride at different time intervals. After desinfection the explants were washed using a solution of cistein (50 mg/L) to avoid their oxidation, and placed on a MS basal medium, supplemented with 30 g/L sucrose and 6- benzylanimopurine (BAP) or 6- furfurilaminopurine (KIN), at two different concentrations (2 and 3 mg/L). These supplements were used alone or combined with naphthaleneacetic acid (NAA). The best result (3.2 node/shoot) was showed in the treatment where the medium was supplemented with 3 mg/L of BAP. However the culture medium for root development in shoot explants was MS medium without hormones. Rooted plants were transferred to *ex vitro* condition and after the acclimatization period, showed the same characteristic than mother plants.

**Key words:** *Azadirachta indica*, axillary shoot, neem, *in vitro* propagation, growth regulators, nodal segments.

## INTRODUCCIÓN

El nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), se ubica en la familia Meliaceae y tiene una gran importancia económica por sus propiedades medicinales y su uso como insecticida natural, atribuidas fundamentalmente a la presencia de azadirachtina, sustancia que repele a los insectos. De hecho, se han reportado diversos biopreparados a base de nim, los cuales son efectivos contra un amplio espectro de plagas (Mordue (Luntz) y Blackwell, 1993; Estrada *et al.*, 1998; Schmutterer, 1999).

En los últimos doce años el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT) de Cuba, ha coordinado e impulsado un programa nacional en este país para la explotación agroindustrial del nim, y se han plantado más de 500 000 árboles a fin de garantizar un desarrollo sostenido en la producción de los bioinsecticidas y contribuir a la mejora del medio ambiente.

Convencionalmente el nim es propagado por semillas, las cuales requieren una inmediata siembra posterior a su cosecha, ya que son recalcitrantes. Esto limita su distribución y almacenamiento a la vez que también presentan desventajas de heterogeneidad, como resultado de una polinización cruzada (Murthy *et al.*, 1998).

La aplicación de la propagación clonal podría ayudar incuestionablemente en la multiplicación de individuos elites, por lo que se han desarrollado diferentes técnicas de cultivo de tejidos con este fin, tales como la producción de brotes adventicios a partir de discos de hojas (Ramesh y Padhya, 1990; Biswas y Gupta, 1999), el cultivo de anteras (Gautham *et al.*, 1993), la proliferación de brotes a partir de explantes nodales (Yasseen, 1994; Nalini *et al.*, 1999) y más recientemente la embriogénesis somática (Su *et al.*, 1997; Martínez-Ruiz *et al.*, 1999).

El objetivo del trabajo fue iniciar los estudios encaminados a establecer una técnica eficiente que permita la obtención y multiplicación *in vitro* de plantas de nim a partir de la utilización de yemas apicales y segmentos nodales.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la División de Genética perteneciente al INIFAT. Se seleccionaron las zonas apicales de posturas jóvenes, de aproximadamente 10 cm de longitud, crecidas en condiciones de vivero, las cuales fueron lavadas con detergente comercial y enjuagadas con agua corriente varias veces.

Para la desinfección de las mismas se estudiaron cuatro tratamientos resultado de la combinación de alcohol al 70% durante uno y cinco minutos y posteriormente, una solución de cloro comercial (50 g/L de cloro activo) al 2.5% durante 15 y 20 minutos, para finalmente enjuagar con agua destilada estéril tres veces (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tiempo de permanencia (minutos) de los explantes en las sustancias utilizadas para su desinfección.

Tratamiento	Alcohol al 70%	Cloro al 2.5%
1	1	15
2	1	20
3	5	15
4	5	20

Una vez concluida la fase de desinfección, el material vegetal fue enjuagado con una solución de cisteína (50 mg/L) para evitar su oxidación y en condiciones asépticas fueron seleccionadas las yemas apicales y los segmentos nodales, para ser utilizados como explantes. Dicho material vegetal se cultivó en un medio

basal MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con alguno de los siguientes compuestos: 6- bencil amino purina (BAP) ó 6- furfural amino purina (KIN), en concentraciones de 2 ó 3 mg/L. Un tratamiento adicional consistió en la aplicación de 0.1 mg/L de ácido naftalén acético (ANA) como auxina (Cuadro 2).

En todos los casos el pH de los medios fue ajustado a 5.7 antes de añadir el agar (7 g/L) y esterilizados en autoclave a 121°C y 1.2 atm de presión durante 20 min.

Los cultivos fueron mantenidos durante 45 días a una temperatura de 25 ± 2°C y un fotoperíodo de 14 horas luz. Cada tratamiento (medio de cultivo) estuvo representado por 20 repeticiones y se determinó al final del cultivo el porcentaje de contaminación, el porcentaje de explantes que produjeron brotes y el número de segmentos nodales por brote en sucesivos subcultivos.

Los resultados fueron evaluados por medio de un análisis de varianza de clasificación simple y las diferencias significativas determinadas mediante la prueba de Newman-Keuls al 5%, utilizando el paquete estadístico STATITCF versión 4.0.

Cuadro 2. Reguladores del crecimiento adicionados en el medio de cultivo.

Tratamiento	Auxina (mg/L)	Citoquinina (mg/L)
1	---	BAP (2)
2	ANA (0.1)	BAP (2)
3	---	BAP (3)
4	ANA (0.1)	BAP (3)
5	---	KIN (2)
6	ANA (0.1)	KIN (2)
7	---	KIN (3)
8	ANA (0.1)	KIN (3)

ANA = Ácido naftalén acético, BAP = Bencil amino purina, KIN = Furfural amino purina.

En todo proceso de propagación *in vitro* es imprescindible como etapa inicial, obtener los máximos porcentajes de desinfección de los explantes que son

utilizados. En este estudio se obtuvo un promedio de 96.8% de cultivos libres de microorganismos, como resultado de la efectividad del tratamiento de desinfección realizado. La mejor respuesta se registró en el tratamiento III (Alcohol 70% -1 min y cloro 2.5% -15 min), para ambos tipos de explantes estudiados (Cuadro 3). Este resultado es sumamente importante, si se tiene en cuenta que el grado de contaminación microbiana superficial en los materiales crecidos en campo, es mucho mayor que el que se encuentra cuando se trabaja con plantas provenientes de laboratorio o invernaderos con crecimiento controlado (George, 1993). Los explantes obtenidos de plantas crecidas en campo suelen ser difíciles o imposibles de desinfectar, debido a la presencia de microorganismos endófitos y epifíticos (Leifert *et al.*, 1994), los cuales pueden causar severas pérdidas de las plantas micropropagadas en diferentes etapas de su crecimiento.

Cuadro 3. Porcentaje de cultivos libres de microorganismos al utilizar diferentes tratamientos para la desinfección de los explantes.

Tratamiento	Explantes	
	Yemas apicales	Segmentos nodales
I. Alcohol 70% (1 min) y cloro 2.5% (15 min)	63% c	25% c
II. Alcohol 70% (1 min) y cloro 2.5% (20 min)	87% b	71.4% b
III. Alcohol 70% (5 min) y cloro 2.5% (15 min)	99% a	95 % a
IV. Alcohol 70% (5 min) y cloro 2.5% (20 min)	48% d	35% c

Los valores con la misma letra indican que no son significativamente diferentes en un nivel de  $\alpha = 0.05$ .

Martínez-Ruiz *et al.* (1999) plantean que el uso del hipoclorito de sodio para la desinfección del material vegetal, permite la obtención de buenos resultados (90% de material sin contaminación), pero a una concentración mayor (15%) y durante un tiempo menor (10 min) con relación al tratamiento empleado en este estudio.

El uso de la solución de cisteína evitó la oxidación de los explantes, aspecto de suma importancia en cultivos de plantas leñosas, debido a su tendencia a

segregar fenoles lo cual provoca la oxidación y pérdida de los cultivos. La utilización de sustancias como antioxidantes se ha planteado con anterioridad, como es el caso de polivinil pirrolidona (PVP), el cual fue necesario para evitar el ennegrecimiento de los cultivos de anteras de nim, debido a la acumulación de compuestos fenólicos (Gautham *et al.*, 1993); así como el empleo de una solución antioxidante (ácido ascórbico 100 mg/L y ácido cítrico 150 mg/L) para los ápices y segmentos del tallo (Martínez-Ruiz *et al.*, 1999).

La respuesta de los explantes a los reguladores del crecimiento adicionados a los medios de cultivo y su combinación, fue notoriamente distinta. En la Figura 1 se observa que la respuesta de éstos fue mayor en los medios suplementados con BAP que aquellos en los que se utilizó KIN; no obstante, en ambos explantes se obtuvo la formación de abundantes callos de color pardo oscuro y compactos. El mayor porcentaje de respuesta fue obtenido en el medio al que se añadió 3 mg/L de BAP para ambos explantes (76% en segmentos nodales y 86% en yemas apicales), no siendo imprescindible la presencia de las auxinas en los medios de cultivo para inducir el desarrollo de los brotes.

Los resultados después de cinco subcultivos indican que la tasa de multiplicación osciló en un promedio de 3.2 nudos/brote (Figura 2) y bajo estas condiciones se induce siempre la formación de callos en la base del explante, los cuales deben eliminarse al realizar cada subcultivo (Figura 3).

Está reportado que el uso del BAP en concentraciones que fluctúan desde 0.1 hasta 3.0 mg/L, permiten obtener entre 2.2 y 2.9 nudos/brote; sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre estas concentraciones; asimismo, con el empleo del 2iP a iguales concentraciones, la tasa de multiplicación se presenta entre 2.3 y 3.2 nudos/brote (Martínez-Ruiz *et al.*, 1999).

La utilización de BAP es muy frecuente en el cultivo de tejidos de nim con el fin de inducir el desarrollo de brotes a partir de diferentes explantes (Niskanen *et al.*, 1999; Biswas y Gupta, 1999) y la regeneración de plantas vía embriogénesis somática (Su *et al.*, 1997; Murthy y Saxena, 1998), lo cual demuestra la efectividad de esta citoquinina en la morfogénesis *in vitro* de esta especie.

Los brotes regenerados, previa eliminación del callo formado en la base, fueron transferidos a medio de enraizamiento (MS sin suplemento hormonal), donde desarrollaron un óptimo sistema radical, pasando a la fase *ex vitro* para su adaptación a las condiciones ambientales naturales, donde se observó un alto porcentaje de supervivencia (87.5%), manteniendo las plantas en vivero las características fenotípicas de sus progenitores.

La micropropagación del nim mediante la inducción y proliferación de brotes axilares ha sido reportada con anterioridad por diversos autores (Yasseen, 1994; Joshi y Thengane, 1996; Nalini *et al.*, 1999) y se ha demostrado mediante estudios

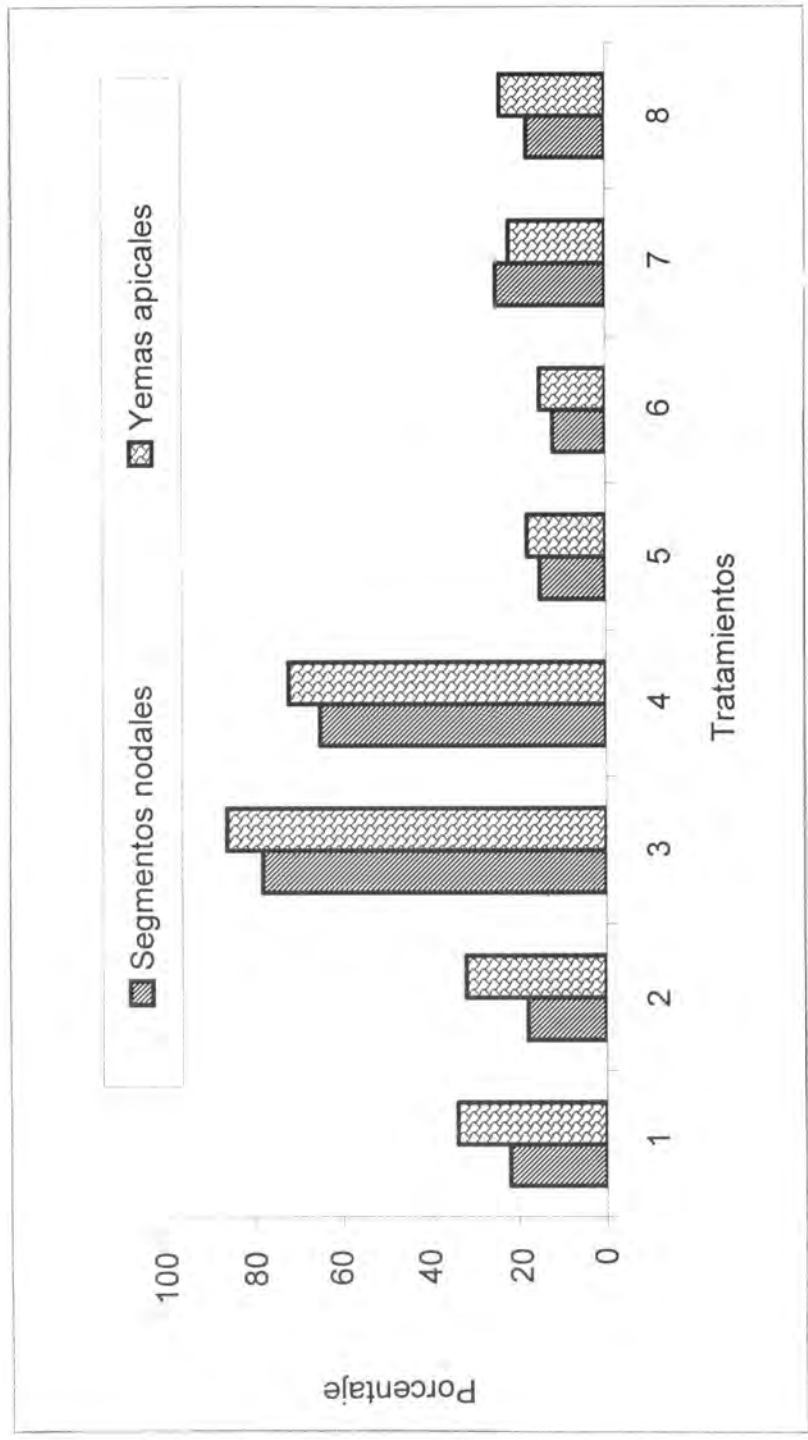
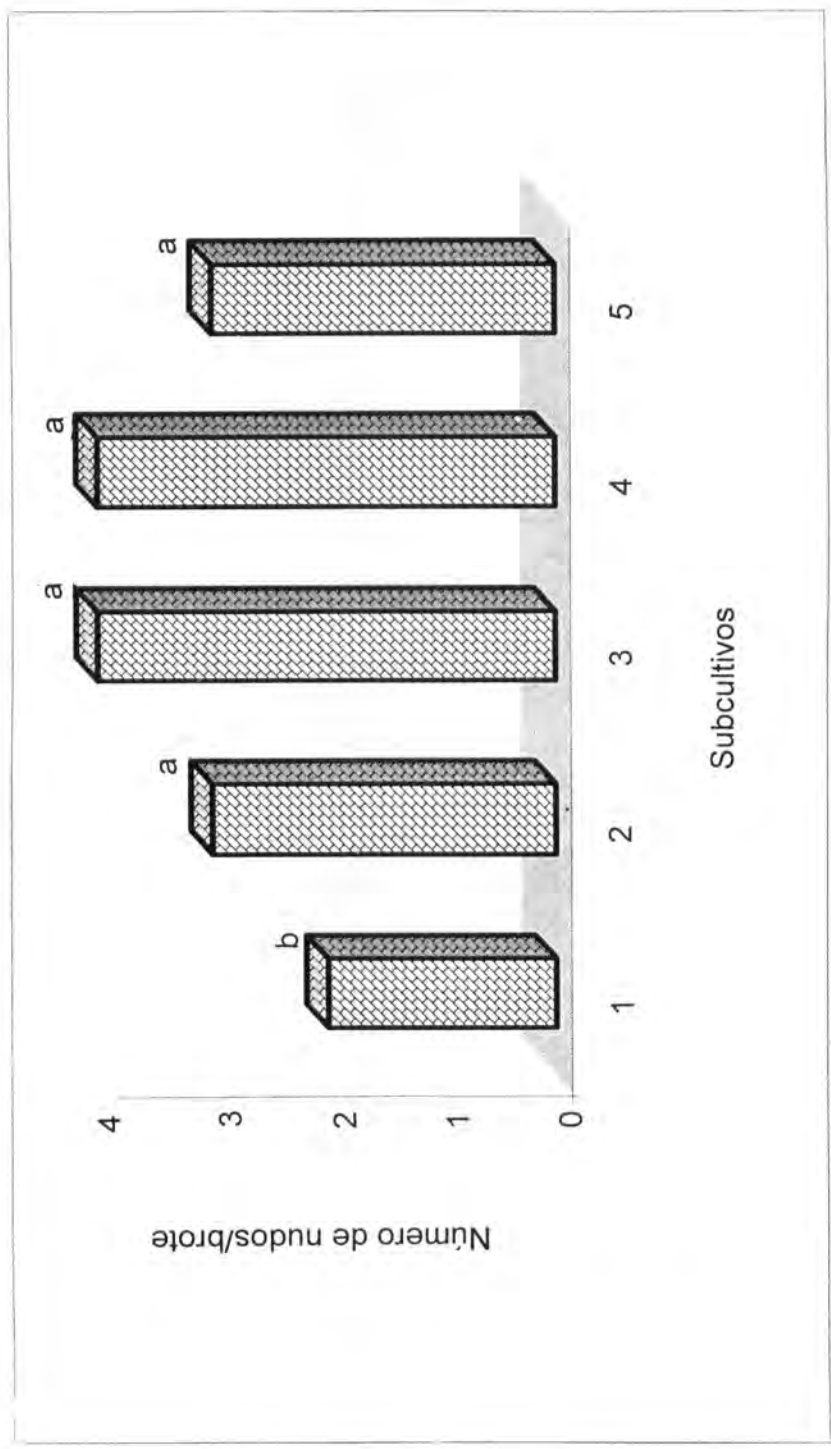


Figura 1. Porcentaje de explantes que desarrollaron brotes a los 30 días en cada medio de cultivo estudiado.



Los valores con la misma letra indican que no son significativamente diferentes en un nivel de  $\alpha = 0.05$ .

Figura 2. Resultados obtenidos en sucesivos subcultivos de los explantes en el medio MS suplementado con 3 mg/L de BAP.



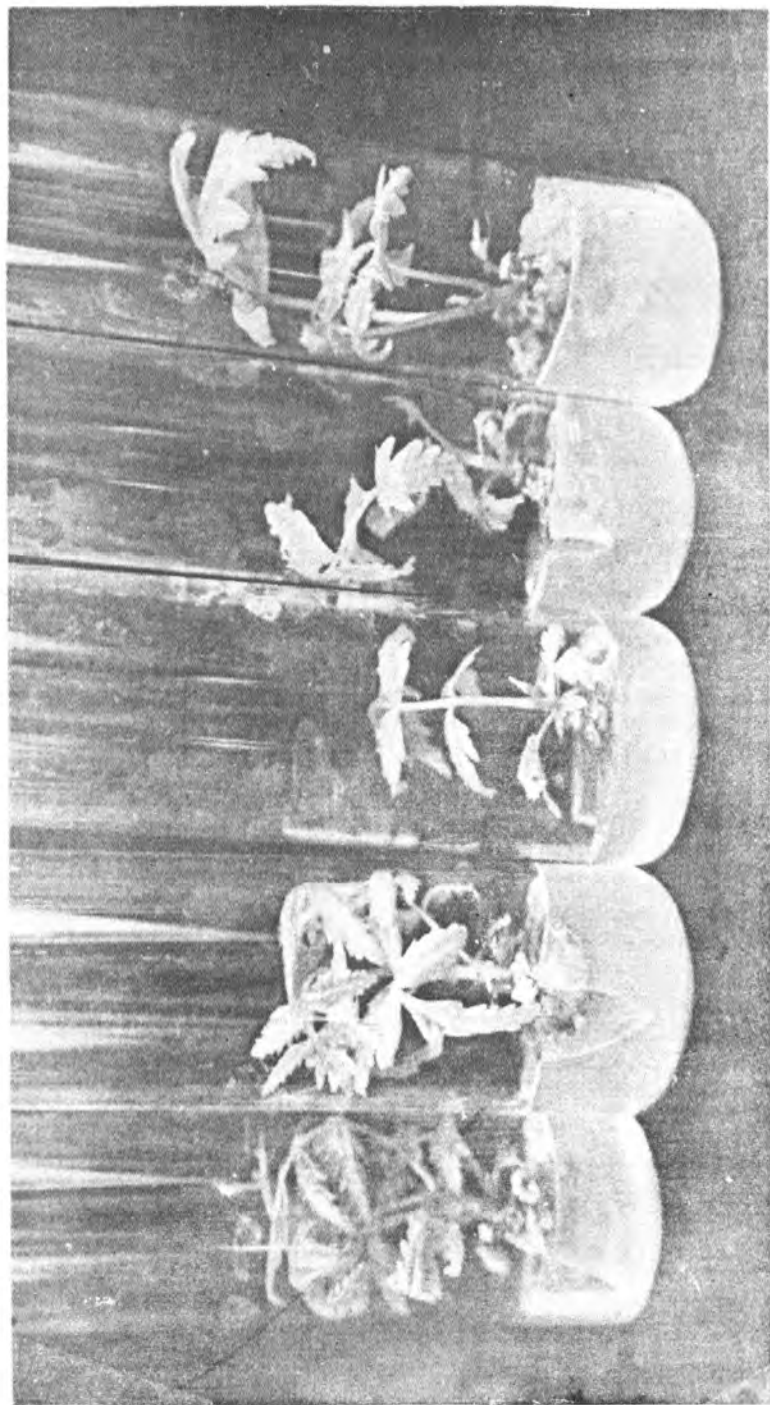


Figura 3. Brotes obtenidos al cultivar segmentos nodales de plántulas de nim sobre medio MS con la adición de 3mg/L de BAP.

moleculares en los que se ha utilizado la técnica de RAPD, que la progenie obtenida conserva las características genotípicas de las plantas madre, así como un contenido de azaridachtina similar (Venkateshwarlu, 1999).

Estos resultados indican la posibilidad del empleo de estas técnicas en la micropropagación de esta especie en el INIFAT, las que serán de gran utilidad en ulteriores programas de siembra generalizadas de nim en Cuba y otros países con condiciones agroclimáticas semejantes.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo un elevado porcentaje de explantes libre de contaminaciones (96.8%), de acuerdo a la metodología de desinfección empleada.

Es posible la obtención de brotes del nim a partir de yemas apicales y segmentos nodales de plantas juveniles utilizando el medio MS con la adición de 3 mg/L de 6 bencil amino purina (BAP).

La tasa de multiplicación que se obtiene es de 3.2 segmentos nodales/brote, lo que permite la realización de sucesivos subcultivos y la multiplicación *in vitro* de esta especie.

El porcentaje de supervivencia de las plantas obtenidas bajo cultivo *in vitro* fue alto (87.5%) cuando crecieron en condiciones ambientales naturales.

## REFERENCIAS

- Biswas, B. K. and S. C. Gupta. 1999. Clonal propagation of a neem with high azadirachtin content in seed kernels. *In: NEEM'99. Abstracts World Neem Conference, 19-21 May, University of British Columbia, Vancouver, Canada.* pp. C. 3-3.
- Estrada, J., M. T. López y P. Barrios. 1998. El Nim y sus bioinsecticidas. Una alternativa agroecológica. INIFAT, Ministerio de la Agricultura, Cuba. pp. 3-24.
- Gautham, V. K., K. Nanda and S. C. Gupta. 1993. Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss – a medicinal tree. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 34:13-18.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Exegetics Ltd., 574 p.
- Joshi, M. S. and S. R. Thengane. 1996. *In vitro* propagation of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) by shoot proliferation. *Ind. J. Exp. Biol.* 34:480-485.
- Leifert, C., C. E. Morris and W. M. Waites. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-growth plants: Reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Science* 13:139-183.

- Martínez-Ruiz, R., J. L. Rodríguez, J. J. Vargas-Hernández y B. Bermejo-Velázquez. 1999. Organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en NIM, *Azadirachta indica* A. Juss. (Un árbol de uso múltiple). Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 5(2):155-166.
- Mordue (Luntz), A. J. and A. Blackwell. 1993. Azadirachtina: an update. J. Insect Physiol. 39:903-924.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Murthy, B. N. S. and P. K. Saxena. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Plant Cell Rep. 17:469-475.
- Nalini, K., S. Lakshmisubramanian, C. Muthuraman, R. Sakthivel and P. M. Murali. 1999. Multiple shoot regeneration from nodal segments of *Azadirachta indica* (A. Juss). In: NEEM'99. Abstracts World Neem Conference, 19-21 May, University of British Columbia, Vancouver, Canada. pp. C. 5-6.
- Niskanen, A. M., S. K. Kundu and P. M. A. Tigerstedt. 1999. *In vitro* propagation of the neem tree (*Azadirachta indica*). In: NEEM'99. Abstracts World Neem Conference, 19-21 May, University of British Columbia, Vancouver, Canada. pp. P-9.
- Ramesh, K. and M. A. Padhya. 1990. *In vitro* propagation of neem, *Azadirachta indica* (A. Juss), from leaf discs. Ind. J. Exp. Biol. 28:932-935.
- Schmutterer, H. 1999. Neem and chinaberry research during the 20<sup>th</sup> century. In NEEM'99. Abstracts World Neem Conference, 19-21 May, University of British Columbia, Vancouver, Canada. pp. S. 1-1.
- Su, W., W-I. Hwang, S. Y. Kim and Y. Sagawa. 1997. Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50:91-95.
- Yasseen, Y. M. 1994. Shoot proliferation and plant formation from neem with thidiazuron. Hortscience 29:515.
- Venkateshwarlu, B. 1999. Micropropagation of plus neem tree and evaluation of the tissue-cultured progeny for azadirachtin content. In: NEEM'99. Abstracts World Neem Conference, 19-21 May, University of British Columbia, Vancouver, Canada. pp. C. 3-4.