

EMBRIOGENESIS SOMÁTICA A PARTIR DE CALLOS DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss.)

R. Martínez-Ruiz¹; J. L. Rodríguez-de la O²; J.J.Vargas-Hernández³; H.S. Azpiroz-Rivero⁴.

¹ Candidata a Doctora en Ciencias. Colegio de Postgraduados-Especialidad Forestal, Montecillos, Estado de México. C.P. 56230.

² Doctor en Ciencias. Profesor Investigador. Depto. de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. C.P. 56230.

³ Ph. D. Profesor Investigador. Colegio de Postgraduados-Especialidad Forestal, Montecillos, Estado de México. C.P. 56230.

⁴ Doctora en Ciencias. Investigador. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Chapingo, Estado de México. C.P. 56230.

RESUMEN

Con el propósito de inducir en callo la formación de embriones somáticos en forma indirecta, se utilizaron explantes de Nim en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) a diferentes concentraciones de benziladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) produjeron callos. Posteriormente los callos fueron transferidos para subcultivarlos en un medio con las sales MS con diferentes concentraciones de GA₃, extracto de malta, BA y AIA. La diferenciación de estructuras globulares o proembriones, fue cuantificada utilizando un microscopio estereoscópico con un lente Plan 1X y 10 X 21 y se midió la frecuencia de aparición en los callos asignándoles un porcentaje de valor observable. La obtención de estructuras embrionarias, desarrollo y germinación de embriones, se obtuvieron combinando el ácido giberélico (1.0 mg·l⁻¹) con benziladenina (0.3 mg·l⁻¹) y extracto de malta (500 mg·l⁻¹).

PALABRAS CLAVES: nim, *Azadirachta indica* A. Juss., embriogénesis, propagación *in vitro*.

SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM NIM (*Azadirachta indica* A. Juss) CALLUS CULTURES

SUMMARY

With the purpose to induce directly the creation of somatic embryos on calls, it was used explants of Neem in MS culture media (Murashige and Skoog, 1962) at different concentrations of benzyl adenine and indol acid. After that the calls were sub cultured in media with minerals of MS in different concentrations of GA₃, malta extract, BA and AIA. It was possible to differentiation in globular structures or proembryos using a microscopic stereoscopic with plan lens 1x and 10x21. The quantification of calls frequency was through the percent of observable value. The embryos structure development and germination of embryos were obtained combining AG₃ (1.0 mg·l⁻¹) plus Benzyl adenine (0.3 mg·l⁻¹) and Malt extract (500 mg·l⁻¹).

KEY WORDS: neem, *Azadirachta indica* A. Juss, embryogenesis, *in vitro* propagation.

INTRODUCCIÓN

La producción del Nim para plantaciones forestales comerciales en México, está limitada por la baja viabilidad de la semilla que dura apenas 15 días y tiene un porcentaje de germinación aproximado del 47 %; de las plantas que lograron germinar, el 20 % muere en vivero, lo cual provoca la falta de planta o semilla para realizar las plantaciones en superficies extensas (Shmutterer, 1990).

Mediante el cultivo *in vitro* se puede obtener gran cantidad de árboles de Nim para su propagación, y en este artículo presentamos un procedimiento rápido y eficiente para la regeneración a través de embriogénesis somática para *Azadirachta indica* A. Juss, especie particularmente

interesante para la industria de producción de bioinsecticidas en México.

Vidalie en 1984 anticipó la hipótesis de que la organogénesis a partir de callo se inicia con la formación de meristemoides (grupos de células meristemáticas), capaces de producir un primordio (Dodds y Roberts, 1984). Según Christianson y Warnick (1986), el proceso organogénico se divide en tres fases: Adquisición de competencia para la inducción, inducción *per se*, diferenciación morfológica y crecimiento. Según Street (1977), la región meristemática en formación puede actuar como punto de demanda, retirando metabolitos esenciales de las células adyacentes. Así mismo, durante la iniciación

de los meristemoides que darán lugar a brotes, el callo requiere acumular almidón (Thorpe, 1978).

En ocasiones, durante el desarrollo de la organogénesis ocurren errores, formándose estructuras anómalas u organoides que tienen su origen en la periferia de las células del callo y no en meristemoides organizados. Esto se ha observado en *Quercus* sp (Seckinger *et al.*, 1979), en manzano y en *Rubus* sp. (Swartz *et al.*, 1989). A nivel transcripcional, Christianson y Warnick (1986) señalan que al momento de colocar el inóculo en contacto con el medio de cultivo ocurren aumentos rápidos en ARN_m, al igual que cuando las células se determinan a formar primordios; mientras que durante la inducción de callo no ocurren cambios graduales en este material genético. La generación de plantas vía organogénesis se ha efectuado principalmente utilizando: secciones de tallo, ápices, meristemas, eje embrionario, tejido nuclear, callo, pecíolos y cotiledones.

La formación de estructuras organogénicas y la conversión posterior en brotes y/o raíces está determinado por características propias del inóculo (la fuente de éste, la edad, el tamaño, la orientación, la época de colecta y el genotipo), componentes químicos y físicos del medio de cultivo (sales, fuentes de carbono, reguladores del crecimiento, estado sólido o líquido, presión osmótica y otros) y las condiciones de incubación (luz, oscuridad, temperatura) (Reinert *et al.*, 1977; Murashige, 1962; Thorpe, 1978; Vidalie, 1984).

Según Bhojwani y Razdan, 1983, la diferenciación depende de la interacción cuantitativa entre auxinas y citocininas, la predominancia de auxinas estimula formación de raíces y la predominancia de citocininas estimula la brotación.

Algunas posibles razones por las que algunas veces las proporciones citocininas + auxinas fallan en la respuesta organogénica son (Thorpe, 1978): el requerimiento de otra hormona, los reguladores del crecimiento exógenos no logran contraer los efectos inhibitorios de aquellos que se acumulan endógenamente y factores físicos o nutricionales bloquean el proceso. Las giberelinas tienen efectos inhibitorios durante la diferenciación de meristemoides debido a que los contenidos de almidón en las células se reducen considerablemente; pero una vez que éstos se han formado, tal inhibición desaparece (Thorpe, 1978). Cuando el inóculo no adquiere competencia para la inducción, subcultivo en medios aparentemente inapropiados favorecen la diferenciación y regeneración de brotes (Christianson y Warnick, 1986).

La respuesta organogénica está en función de varios factores físicos. En tabaco, disminución en la floración, favoreciendo la diferenciación de yemas vegetativas; en medio líquido sólo ocurrió formación de callo (Bhojwani y

Razdan, 1983). En papa, la coloración verdosa del callo que precede la regeneración no se presentó cuando la presión osmótica fue baja; la brotación se logró agregando manitol (Shepard *et al.*, 1980).

La embriogénesis *in vitro* se ha definido como el proceso de desarrollo que produce un embrión perfecto a partir de una sola célula, de la cual, todos los derivados son parte de una estructura que adquiere bipolaridad en su etapa inicial, tal como ocurre en la embriogénesis cigótica (Street y Withers, 1974). Cada célula proembrionica pasa por tres fases secuenciales de desarrollo: etapa globular, de corazón y de torpedo (Kohlenbach, 1978).

La embriogénesis somática presenta dos patrones generales de desarrollo (Kohlenbach, 1978):

Embriogénesis directa que ocurre cuando existen células proembrionicamente determinadas (CPED) que reinician su desarrollo una vez que las condiciones ambientales son favorables, sin pasar por la formación de callo. Por otro lado, en la embriogénesis indirecta se requiere la determinación de células diferenciadas, la proliferación de callo (desdiferenciación) y la diferenciación (rediferenciación) de células embriónicamente determinadas (ICED).

En ambos patrones, el ambiente *in vitro* permite e induce a la vez el desarrollo embrionario. En el sistema CPED, las células requieren sólo el ambiente para iniciar su división, sin la participación necesaria de reguladores del crecimiento: en sistemas ICED los reguladores aseguran la formación de callo, con la determinación respectiva de las células proembrionicas que se caracterizan por contener un citoplasma denso, grandes gránulos de almidón, núcleo grande, nucleolo oscurecido y con alto contenido de proteínas y ARN (Dodds y Roberts, 1984).

Históricamente, la auxina ha sido la hormona más utilizada para la embriogénesis en el sistema CPED, ésta permite clonar las células preembrionicamente determinadas. En el sistema CPED, la auxina es la sustancia mitogénica que da como resultado la determinación (Wann *et al.*, 1988). La auxina más empleada ha sido 2,4-D diclorofenociacético, la cual es responsable de la respuesta transcripcional y de traducción durante el cultivo primario. La respuesta a la regeneración es un carácter heredable y se puede seleccionar en forma recurrente (Brow, 1986).

Los factores que afectan la regeneración vía embriogénesis son:

Componentes del medio de cultivo. Los compuestos químicos más importantes para el desarrollo de embriones somáticos son las auxinas y las fuentes de nitrógeno: una relación alta es importante para la inducción de callo; una

vez que esto ocurre, las auxinas restringen severamente el desarrollo de células embriogénicas (Reinert *et al.*, 1977, Bhojwani y Razdan, 1983). El nitrógeno es adecuado, pero éste es superado por las formas orgánicas (Sharp *et al.*, 1980).

Litz y Jarret, en 1987, señalaron que para la iniciación de callo embriogénico, un elemento esencial es el hierro y las sales del medio MS al 50 %, así como concentraciones de 2,4-D hasta de 5 mg·l⁻¹ y niveles de sacarosa de 4 a 6 %. Para inducir embriogénesis la auxina debe retirarse y la sacarosa reducirse de 2 a 3 %. La maduración y germinación de los embriones son favorecidos por las citocininas.

Factores físicos. Para la inducción de callo, las condiciones de oscuridad son preferibles (Litz y Jarret, 1987). La capacidad embriogénica disminuye cuando los subcultivos son más espaciados (Reinert *et al.*, 1977). En medios líquidos el tipo de recipientes ejercen efectos significativos, obteniéndose embriones normales cuando hay mayor espacio para la aireación, al igual que cuando se agita vigorosamente (Amirato, 1983).

En ocasiones es necesario dar tratamientos de frío al inóculo antes de iniciar la formación del callo (Litz y Jarret, 1987); situación particularmente válida cuando se hacen cultivos de anteras (Rajasekaran y Mullins, 1979; Wang *et al.*, 1988). En aquellas especies cuyas semillas requieren de frío para germinar en la propagación convencional, los embriones somáticos obtenidos *in vitro* también pueden requerir de tratamientos de frío para desarrollar las plántulas (Bhojwani y Razdan, 1983).

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo en Texcoco, Estado de México.

Se utilizaron semillas para la obtención de material vegetativo del Nim las cuales se importaron del Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales de León, Nicaragua. Los explantes de Nim (yemas axilares y apices) fueron obtenidos de semillas germinadas de una edad de 11 semanas, los explantes fueron sembrados *in vitro* y derivaron callo en un medio básico MS (1962). La incubación fue bajo una intensidad luminosa de 3000 lux, con lámparas de luz fluorescente SLIMLINE de 75w, con 26 °C, 16 horas luz y 24 °C, 8 horas de oscuridad.

Formación de callo

De los brotes que se lograron obtener en un medio libre de patógenos se utilizaron para la desdiferenciación

en un medio de cultivo MS básico con citocininas y auxinas. El cultivo se mantuvo en la sala de incubación durante 45 días, tomándose lecturas cada dos semanas.

Se utilizaron como fuente de citocininas a la benziladenina (BA) y como fuente de auxinas al ácido indolacético (AIA) con concentraciones de 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg·l⁻¹ en cada caso (Cuadro 1). El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS) complementado con 0.4 % de tiamina y 100 mg·l⁻¹ de mio-inositol.

En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial completa (5 x 5) con 25 tratamientos y 10 repeticiones, dando un total de 250 unidades experimentales.

CUADRO 1. Concentraciones de benziladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) empleados en la fase de embriogénesis.

Factores	Niveles mg·l ⁻¹
BA	0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0
AIA	0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0

La variable a evaluar fue la siguiente:

Formación de callo (FC) mediante el peso fresco del callo formado en gramos.

Para determinar el efecto de la combinación de reguladores de crecimiento, se realizó un análisis de varianza. Se usó la prueba de Tukey con una significancia de $P = 0.05$ para la comparación de medias. Se utilizó la transformación de la raíz cuadrada para las variables donde se tuvieron valores de cero.

El modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{ijk} = m + A_i + B_j + AB_{ij} + x_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable respuesta del uso del *i*-ésimo nivel de concentración de benziladenina y el *j*-ésimo nivel de concentración de ácido indolacético en la *k*-ésima repetición.

m = Media general de los factores constantes incontrolables en el experimento.

A_i = Efecto del *i*-ésimo nivel del factor fijo de concentración de benziladenina.

B_j = Efecto del *j*-ésimo nivel del factor fijo de concentración del ácido indolacético.

AB_{ij} = Efecto conjunto del i-ésimo nivel del factor benziladenina y el j-ésimo nivel del factor ácido indolacético.

x_{ijk} = Error experimental.

Multiplicación de callo para obtener embriogénesis

Los tratamientos que formaron callo se utilizaron para montar este experimento, que consistió en tomar las mejores masas de células y someterlas a diferentes tratamientos de reguladores de crecimiento (ácido giberélico, extracto de malta y benziladenina) a diferentes concentraciones en un medio MS sólido y un medio MS líquido para observar su respuesta a la embriogénesis.

Para ello se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial 3 x 3 x 5 para un total de 45 tratamientos y 5 repeticiones, dando un total de 225 unidades experimentales para medio sólido y 225 unidades experimentales para medio líquido (Cuadro 2). Se contabilizó el número de formaciones globulares por unidad experimental. La toma de datos se realizó cada semana durante 90 días de incubación.

CUADRO 2. Concentraciones de ácido giberélico, extracto de malta y benziladenina utilizadas en el ensayo factorial para inducir embriogénesis en medio sólido y líquido.

Factores	Niveles mg·l ⁻¹
Ácido giberélico	0.0 0.1 5.0
Extracto de malta	0.0 500 1000
Benziladenina	0.0 0.1 0.3 1.0 3.0

Para determinar el efecto de cada uno de los factores involucrados en el diseño experimental se hizo un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con arreglo factorial completo. Se utilizó la prueba de Tukey con una significancia de $P = 0.05$ para la comparación de medias. Se utilizó la transformación de la raíz cuadrada para las variables donde se tuvieron valores de cero.

El modelo estadístico empleado para medio sólido y medio líquido fue:

$$Y_{ijk} = m + A_i + B_j + C_l + AB_{ij} + AC_{il} + BC_{jl} + ABC_{ijl} + x_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable respuesta del uso del i-ésimo nivel de concentración de ácido giberélico, j-ésimo nivel de concentración de extracto de malta y l-ésimo

nivel de concentración de benziladenina. En el k-ésima repetición.

m = Media general de los factores constantes incontrolables en el experimento.

A_i = Efecto i-ésimo nivel del factor fijo de concentración de ácido giberélico.

B_j = Efecto j-ésimo nivel de factor fijo de concentración de extracto de malta.

C_l = Efecto del l-ésimo nivel de concentración de benziladenina.

AB_{ij} = Efecto del i-ésimo nivel de concentración de ácido giberélico y el j-ésimo nivel de concentración de extracto de malta.

AC_{il} = Efecto del i-ésimo nivel de concentración de ácido giberélico y el l-ésimo nivel de concentración de benziladenina.

BC_{jl} = Efecto del j-ésimo nivel de concentración de extracto de malta y el l-ésimo nivel de concentración de benziladenina.

ABC_{ijl} = Efecto conjunto del i-ésimo nivel de ácido giberélico, j-ésimo nivel del extracto de malta y el l-ésimo factor de benziladenina

x_{ijk} = Error experimental.

Germinación de embriones

De los embriones que se formaron en el ensayo anterior, se utilizaron para montar este experimento que consistió en su germinación en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido al 100 % y al 50 % complementado con 0.4 de tiamina y mio-inositol 100 mg·l⁻¹, sometiéndolos a diferentes concentraciones de GA₃ (0.0, 0.1, 0.3, 1.0, y 3.0) (Cuadro 3).

En este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial (2 x 5) para un total de 10 tratamientos y 5 repeticiones, dando un total de 50 unidades experimentales. Utilizando 10 embriones por unidad experimental. La variable a evaluar fue el número de germinación de los embriones a los 30 días de incubación.

CUADRO 3. Concentraciones del ácido giberélico y medio de cultivo MS utilizadas en el ensayo factorial para inducir germinación de embriones.

Factores	Niveles
Medio MS %	50 y 100
Ácido giberélico mg l ⁻¹	0.0, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0

Para evaluar el efecto de los factores considerados en el ensayo, se hizo un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con arreglo factorial completo. Se utilizó la prueba de Tukey con una significancia de $P = 0.05$ para la comparación de medias. Se utilizó la transformación de la raíz cuadrada ya mencionada para las variables donde se tuvo valores de cero.

El modelo estadístico empleado en el análisis de varianza fue:

$$Y_{ijk} = m + A_i + B_j + AB_{ij} + x_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable respuesta del uso del i -ésimo nivel de concentración de medio de cultivo MS y j -ésimo nivel de concentración de ácido giberélico. En la k -ésima repetición.

m = Media general de los factores constantes incontrolables en el experimento.

A_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor fijo de concentración de MS.

B_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor fijo de concentración del ácido giberélico.

AB_{ij} = Efecto conjunto del i -ésimo nivel del factor MS y el j -ésimo nivel del factor ácido giberélico.

x_{ijk} = Error experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de callo

No existen diferencias estadísticamente significativas entre los factores evaluados individualmente (BA y AIA), ni tampoco se presentó para su interacción (Figura 1 y Cuadro 4).

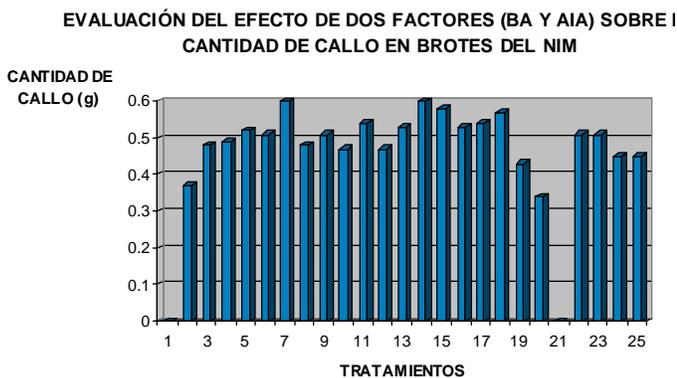


Figura 1. Efecto de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la cantidad de callo a los 45 días de incubación en Nim.

CUADRO 4. Valores promedio para la comparación de cinco niveles de BA y cinco niveles AIA sobre la cantidad de callo a los 45 días de incubación.

Factores	Modelo general	BA	AIA	Interacción
F calculada	0.02	1.65	0.37	1.03
Pr > F	0.4373 NS	0.1631 NS	0.8269 NS	0.04266 NS

Alpha = 0.05
NS no significativo
* estadísticamente significativo

Multiplicación de callos para obtener embriogénesis

La realización de este ensayo fue en un medio MS al 100 % con agar (sólido) y sin agar (líquido). En el medio sin agar no se obtuvo ninguna respuesta para las variables evaluadas, infiriendo que se debió al control de las temperaturas ya que en las mesas rotatorias del laboratorio no se cuenta con el equipo necesario para controlar la temperatura; según Muralidharan y Mascarenhas (1989) para inducir a estructuras bipolares en mesas rotatorias es necesario mantener la temperatura constante a 27 °C.

Número de formaciones globulares

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para la variable evaluada por efecto del factor AIA (Figura 2 y en el Cuadro 5 y 6), en cambio las concentraciones de benziladenina no resultaron estadísticamente significativas y para la interacción de los tres factores los tratamientos estadísticamente significativos son el nueve (con 1.0 mg·l⁻¹ de AIA, 1.0 mg·l⁻¹ de BA y 0.0 de extracto de malta) y en el tratamiento 23 (con 1.0 mg·l⁻¹ de AIA, 0.3 mg·l⁻¹ de BA y 500 de extracto de malta) que presentaron las mejores respuestas, es decir, que son las concentraciones más favorable para la obtención de proembriones para multiplicación del Nim.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE 3 FACTORES SOBRE CALLO DE NIM

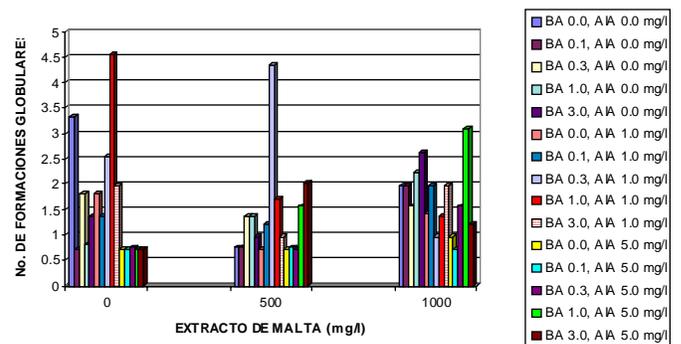


Figura 2. Efecto de tres niveles de AIA, tres niveles de extracto de malta y 5 niveles de BA sobre el número de formaciones globulares a los 45 días de incubación en Nim.

CUADRO 5. Análisis de varianza para la comparación de tres niveles de AIA, tres niveles de extracto de malta y cinco niveles de BA para el número de formaciones globulares a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	AIA	BA	Extracto de malta	Interacción
F calculada	1.34	4.65	1.01	0.33	1.25
Pr > F	0.0939 ^{NS}	0.0107 *	0.4039 ^{NS}	0.7227 ^{NS}	0.0026 *

Alpha = 0.05

^{NS} no significativo

* estadísticamente significativo

CUADRO 6. Comparación de medias del número de formaciones blobulares mediante la prueba de medias de Tukey a los 45 días de incubación en diversas concentraciones de AIA- BA y extracto de malta.¹

Número de tratamiento	Tratamiento AIA- BA-E. mg·l ⁻¹	Medias
1	00-00-00	3.34 B
2	00-0.1-00	0.70 B
3	00-0.3-00	1.82 B
4	00-1.0-00	0.82 B
5	00-3.0-00	1.36 B
6	1.0-00-00	1.82 B
7	1.0-0.1-00	1.36 B
8	1.0-0.3-00	2.56 B
9	1.0-1.0-00	4.54 A
10	1.0-3.0-00	1.96 B
11	5.0-00-00	0.70 B
12	5.0-0.1-0.0	0.70 B
13	5.0-0.3-00	0.76 B
14	5.0-1.0-00	0.70 B
15	5.0-3.0-00	0.70 B
16	00-0.0-500	0.76 B
17	00-0.1-500	0.76 B
18	00-0.3-500	1.36 B
19	00-1.0-500	1.36 B
20	0.0-3.0-500	0.96 B
21	1.0-0.0-500	0.70 B
22	1.0-0.1-500	1.22 B
23	1.0-0.3-500	4.34 A
24	1.0-1.0-500	0.70 B
25	1.0-3.0-500	0.96 B
26	5.0-0.0-500	0.70 B
27	5.0-0.1-500	0.76 B
28	5.0-0.3-500	0.70 B
29	5.0-1.0-500	1.56 B
30	5.0-3.0-500	2.02 B
31	00-0.0-1000	1.96 B
32	00-0.1-1000	1.96 B
33	00-0.3-1000	1.56 B
34	0.0-1.0-1000	2.22 B
35	0.0-3.0-1000	2.62 B
36	1.0-0.0-1000	1.42 B
37	1.0-0.1-1000	1.96 B
38	1.0-0.3-1000	0.76 B
39	1.0-1.0-1000	1.36 B
40	1.0-3.0-1000	1.96 B
41	5.0-0.0-1000	0.96 B
42	5.0-0.1-1000	0.70 B
43	5.0-0.3-1000	1.56 B
44	5.0-1.0-1000	3.08 B
45	5.0-3.0-1000	1.22 B

Alpha = 0.05. Medias con la misma letra vertical no presentan diferencias significativas

En la prueba de medias se observa que el factor ácido giberélico es importante para obtener embriones principalmente a una concentración de 1 mg·l⁻¹, la benziladenina con 1 mg·l⁻¹ y el extracto de malta con 500 mg·l⁻¹.

Germinación de embriones somáticos

El análisis de varianza mostró que no hubo un efecto significativo de la concentración del MS, pero si el efecto de GA₃ y de la interacción de estos factores sobre el número de embriones germinados de Nim es significativo (Cuadro 7 y Figura 3).

En la prueba de medias de Tukey, para los dos factores encontramos diferencias entre medias (Cuadro 7) y éstas fluctuaron entre 0.70 a 1.60 en el número de embriones germinados. Se puede observar que al incrementar la concentración de GA₃ se incrementa la germinación de los embriones y así mismo la interacción de GA₃ con la concentración del medio de cultivo MS (50 %) favorece la germinación.

CUADRO 7. Valores promedio del número de embriones germinados en dos concentraciones de MS y cinco niveles de GA₃ a los 30 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	MS %	GA ₃ (mg l ⁻¹)	MS*GA ₃
F calculada	4.62	0.02	3.29	7.10
Pr > F	0.0003 *	0.8982 ^{NS}	0.0201*	0.0002 *

^{NS} no significativo * estadísticamente significativo.

Prueba de medias de Tukey.

Número de tratamiento	Composición MS% GA ₃ (mg l ⁻¹)	Medias
1	50 - 0.0	0.700 B
2	50 - 0.1	0.820 AB
3	50 - 0.3	0.760 B
4	50 - 1.0	1.480 A
5	50 - 3.0	1.600 A
6	100 - 0.0	0.700 B
7	100 - 0.1	0.700 B
8	100 - 0.3	0.820 AB
9	100 - 1.0	0.700 B
10	100 - 3.0	0.700 B

P = 0.05. Medias con la misma letra vertical no presentan diferencias significativas

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede afirmar que los tratamientos previos con BA y AIA derivan callos en los explantes de secciones de tallo de Nim, promoviendo durante su subcultivo las respuestas embriogénicas, en la mayoría de los experimentos y como se puede observar en la Figura 3 la gran formación de estructuras proembrionarias, las mejores respuestas para su formación *in vitro* fue con la adición del extracto de malta como coadyuvante empleado. La estrategia sobre la incorporación al medio de cultivo de extracto de malta, giberelinas y benziladenina conjuntamente con la modificación de niveles de sales promovieron en los diferentes experimentos ensayados la proliferación uniforme de embriones somáticos a partir de callos cultivados. Los medios de cultivo MS ensayados promovieron la formación de estructuras embrionarias y callos con alta capacidad regenerativa destacando la naturaleza poliembriónica del Nim, identificando al ácido giberélico y extracto de malta como promotores de la embriogénesis somática.

LITERATURA CITADA

- AMIRATO, P. V. 1983. Embryogenesis. *In*: Evans, W.R., P.V. Amirato y Y. Yamada (Eds), Handbook of plant cell culture. Vol. 1. Mc Millan Publ. Co., N. Y. 82 p.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. 1983. Cellular totipotency. *In*: Plan Tissue culture: theory and practice. Elsevier Science Publ. B.V. Amsterdam. pp: 77-90.
- BROW, D.C. W. 1986. Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis. *HortScience* 21(3): 763-766.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. 1986. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *HortScience* 21(3): 842-847.
- DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. 1984. Organogenesis. *In*: Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press. N.Y. pp. 78-88.
- KOHLLENBACH, H. W. 1978. Comparative somatic embryogenesis. *In*: T.A. Thorpe (Ed.), Frontiers of plant tissue culture. Calgary. Intl. Assoc. Plant Tissue Culture. pp. 59-66.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1987. Organogénesis y embrogénesis somática. Apuntes mimeografiados. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. 46 p.
- MURALIDHARAN, E. M.; MASCAREÑAS, A.F. 1989. *In vitro* morphogenesis in *Azadirachta indica* A. Juss and *Eucalyptus citriodora* Hook *In*: A.K. Kukreja, A.K. Mathur. P.S. Ahuja y R.S. Thakur (De.) Tissue Culture and Biotechnology of medicinal and aromatic plants. Paramount Publ., New Delhi. pp: 49-55.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revision medium for graphit growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. 1979. Embyos and plant from culture anthers of hybrid grapevines. *J. Exp. Bot.* 30: 399-407.
- REINERT, J.; BAJAJ, P.S.; B. ZBELL. 1977. Aspectos of organization, organogenesis, embryogenesis and cytodifferentiation. *In*:

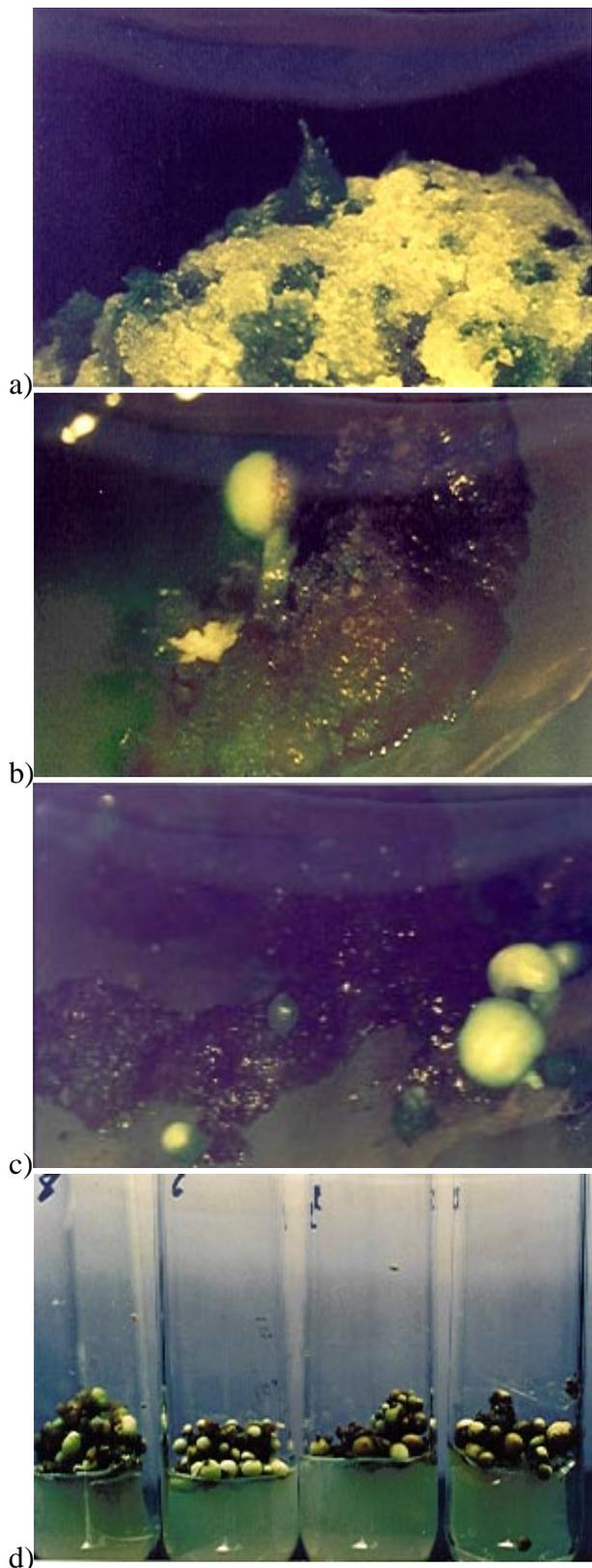


Figura 3. Observación de explantes a) formación de callo, b) formación de embriones globulares, c) embriones globulares y en forma de torpedo, d) vista general de embriogénesis en medio MS adicionado de Extracto de malta, AIA Y BA

- H.E. Street (ed), Plant tissue cell culture . Ed. Univ. California Press, Berkley. pp. 389-427.
- SECKINGER, G.R.; McCOWN, B.H.; STRUCKMEYER, B.E. 1979. Production of anomalous structures in *Quercus rubra* L. callus culture. Amer. J. Bot. 66: 993-996.
- SHARP, W. R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. In: J. Janick (ed), Horticultural Reviews, Vol. 2. AVI Publishing Company Inc., Westport, Conn. pp: 268-310.
- SHEPARD, J. F.; BIDNEY, D.; SHALIN, E. 1980. Potatoe protoplasts in crop improvement. Science 208: 17-24.
- SHMUTTERER, H. 1990. Properties and potencial of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Entomol (U.S.A.) 35: 271-297.
- STREET, H. E.; WITHERS, L.A. 1974. The anatomy of embryogenesis in culture. In: H. E. Street (Ed), Tissue culture and plant science. Academic Press, London. pp: 77-100.
- STREET, H. E. 1977. Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publications. 614 p.
- SWARTZ, J. A.; BORDS, R. H.; MOHAMED F.; NAESS, K. 1989. Pretrament effects on regeneration of shoots isolated *in vitro* Rubus leaves. HortScience. 1989. ASHS Annual Meeting: Abstr. 524 p.
- THORPE, T. A. 1978. Physiological and biochemical aspects of organogenesis *in vitro*. In: T. A. Thorpe (Ed), Frontiers of plat tissue culture. Calgary: Intl. Assoc. Plant Tissue Culture. pp: 49-58.
- VIDALIE, H. 1984. Cultivo *in vitro*. Editorial Científica S.A. de C. V. México. 190 p.
- WANG, D.J.; GUI L.; SUN, J. S. 1988. Tissue culture of fruit crops in China. HortScience 23(6): 962-965.
- WANN, S. R. 1988. Somatic embryogenesis in woody species. In: J. Jonick (ed) Horticultural Rev., Vol. 10. Timber Press, Portland, Or. pp. 153-181.