



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

ORGANOGENESIS Y EMBRIOGENESIS SOMÁTICA *IN VITRO*
EN NIM *Azadirachta indica* A. JUSS. (UN ÁRBOL DE USO MÚLTIPLE)

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

PRESENTA:

ROSA MARTÍNEZ RUIZ



Chapingo, Estado de México a 30 de octubre de 1997

853951

ORGANOGENESIS Y
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
IN VITRO EN NIM *Azadirachta*
indica A. JUSS.



UN ÁRBOL DE USO MÚLTIPLE

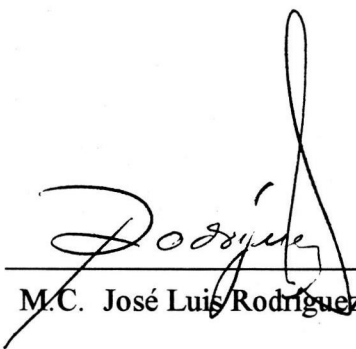
¹ Foto tomada por Hellpap en Burma, 1983.

**ORGANOGENESIS Y EMBRIOGENESIS SOMÁTICA *IN VITRO*
EN NIM *Azadirachta indica* A.JUSS. (UN ÁRBOL DE USO MÚLTIPLE)**

Tesis realizada por **Rosa Martínez Ruiz** bajo la dirección del Comité Asesor indicado,
aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

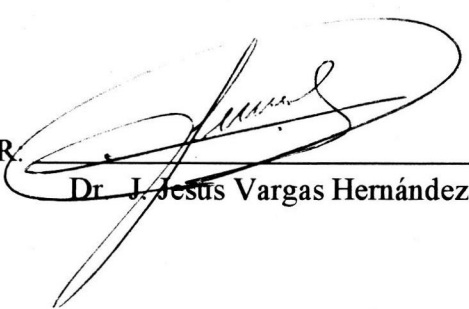
MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:



M.C. José Luis Rodríguez de la O.

ASESOR:



Dr. J. Jesús Vargas Hernández

ASESOR:

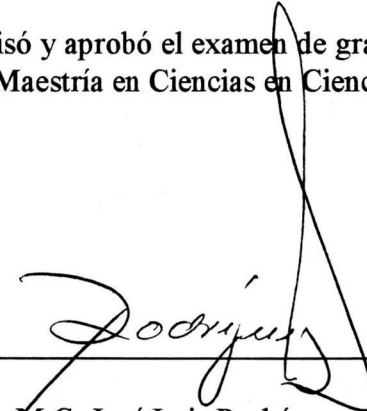


Dr. Basilio Bermejo Velázquez

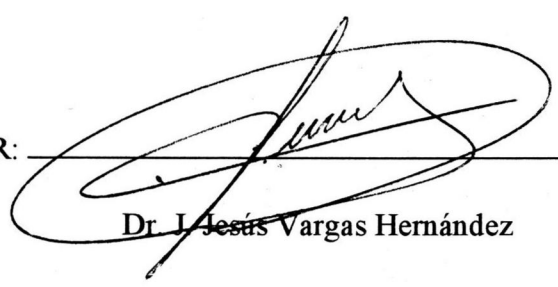
**ORGANOGENESIS Y EMBRIOGENESIS SOMÁTICA *IN VITRO*
EN NIM *Azadirachta indica* A.JUSS. (UN ÁRBOL DE USO MÚLTIPLE)**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **Rosa Martínez Ruiz** autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales estuvo constituido por:

PRESIDENTE: _____


M.C. José Luis Rodríguez de la O.

ASESOR: _____


Dr. J. Jesús Vargas Hernández

ASESOR: _____


Dr. Basilio Bermejo Velázquez

DEDICATORIAS

A mis padres:

Teresa Ruiz Romero
y
Rafael Martínez Guzmán

Por que durante mi existencia he resibido amor, comprensión y sobre todo apoyo en las decisiones que he tomado.

A mis hermanos:

Por todo el apoyo y cariño que me han brindado.

A Gustavo Enrique Rojo Martínez:

Por ser el mejor compañero y amigo que he conocido, y que gracias a tu gran apoyo estos últimos años han sido los mejores.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a las siguientes instituciones y personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

Al pueblo de México que por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), me apoyaron económicamente para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en particular al Departamento de Bosques, por la confianza y apoyo recibidos para efectuar el programa de estudios.

Al Comité Asesor que dirigió la realización de este estudio, integrado por los siguientes profesores: M.C. José Luis Rodríguez de la O (Director), Dr. J. Jesús Vargas Hernández (Asesor) y Dr. Basilio Bermejo Velázquez (Asesor), todos ellos mis profesores, quienes mas han contribuido a mi formación profesional, además por su amistad, colaboración y disposición de tiempo dedicado a la revisión de esta investigación.

Al personal del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, en especial a M.C. Alejandro Manzo González, Tec. Lab. Gisela García de la Rosa, M.C. Teresa Cervantes Martínez, Ing. Norma M. Aguilar Díaz y Biol. Maribel Pacheco Sánchez por su amistad, apoyo y valiosas sugerencias para la realización de este trabajo.

A todos y cada uno de los profesores del Departamento de Bosques, porque directa o indirectamente contribuyeron con mi formación académica y personal, especialmente al Dr. Hugo Ramírez Maldonado, M.C. Francisco Romahn de la Vega, Dra. Amparo Borja de la Rosa, Dr. Carlos Rodríguez Franco y Dr. Miguel Angel Musálem Santiago.

A mis compañeros y amigos, especialmente al Ing. Arturo Alvarado, Biol. Francisco Vargas e Ing. José González, por su convivencia y amistad.

ÍNDICE

	<i>página</i>
Índice de figuras.....	vii
Índice de cuadros.....	ix
CAPÍTULO I	
Introducción.....	1
CAPÍTULO II	
Revisión de literatura.....	4
2.1. El árbol del Nim.....	4
2.1.1. Importancia y problemática.....	4
2.1.2. Origen y distribución.....	4
2.1.2.1. Proyectos de introducción del Nim llevados a cabo en algunos países..	5
2.1.3. Clasificación taxonómica.....	6
2.1.4. Descripción botánica.....	8
2.1.5. Requerimientos ambientales del Nim.....	8
2.1.6. Plagas, enfermedades y factores limitantes del Nim.....	11
2.1.6.1. Malezas.....	11
2.1.6.2. Plagas y Enfermedades.....	11
2.1.7. Usos y aprovechamientos.....	11
2.1.7.1. Pesticida.....	12
2.1.7.1.1. Efectos sobre los insectos plaga.....	12

	<i>Página</i>
2.1.7.1.2. Efectos sobre otros organismos.....	15
2.1.7.2. Medicinal.....	17
2.1.7.3. Anticonceptivo.....	19
2.1.7.4. Medicina Veterinaria.....	19
2.1.7.5. Agricultura.....	19
2.1.7.6. Agroforestal.....	19
2.1.7.7. Forraje.....	20
2.1.7.8. Madera.....	20
2.1.7.9. Leña.....	20
2.1.7.10. Energía.....	21
2.1.7.11. Abono orgánico.....	21
2.1.7.12. Industrial.....	21
2.1.7.13. Ecológico.....	22
2.1.7.14. Cultural.....	22
2.1.7.15. Toxicidad.....	23
2.1.8. Perspectivas del árbol del Nim en México.....	23
2.1.9. Propagación.....	24
2.1.9.1. Sexual.....	24
2.1.9.2. Asexual.....	25
2.1.9.2.1. Propagación vegetativa tradicional.....	25
2.1.9.2.2. Cultivo de tejidos.....	26

	<i>Página</i>
2.2. Importancia de la biotecnología	26
2.2.1. Cultivo de tejidos.....	27
2.2.1.1. Etapas del cultivo de tejidos.....	28
2.2.1.2. Reguladores de crecimiento vegetal.....	28
2.2.1.3. Totipotencia.....	32
2.2.1.4. Organogénesis.....	34
2.2.1.4.1. Fundamentos.....	34
2.2.1.4.2. Fuentes de inoculo.....	34
2.2.1.4.3. Factores que regulan la respuesta organogénica.....	35
2.2.1.5. Embriogénesis somática.....	36
2.2.1.5.1. Fundamentos.....	36
2.2.1.5.2. Factores que afectan la regeneración vía embriogénesis	37
2.2.1.6. Propagación <i>in vitro</i> del árbol del Nim.....	37
2.2.2. ADN recombinante.....	40

CAPÍTULO III

Materiales y Métodos.....	42
3.1. Localización	42
3.2. Materiales.....	42
3.2.1 Semillas.....	42
3.2.2. Explantes o fuentes de explantes.....	42
3.2.3. Medio de cultivo	42

	<i>Página</i>
3.2.4. Productos empleados para la desinfección de explantes	43
3.3. Métodos	43
3.3.1. Ensayos de germinación en vivero....	43
3.3.2. Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico	45
3.3.2.1. Desinfección del material vegetativo en laboratorio	45
3.3.2.2. Siembra <i>in vitro</i>	45
3.3.3. Etapa II: Multiplicación de brotes.....	47
3.3.3.1. Comparación de citocininas para multiplicación de propágulos.....	47
3.3.3.2. Comparación de carbohidratos y nitratos en la multiplicación de propágulos	49
3.3.3.3. Multiplicación de callos para obtener embriogénesis	51
3.3.3.4. Germinación de embriones	53
3.3.4. Etapa III: Enraizamiento de brotes	54
3.3.5. Etapa IV: Trasplante a suelo de plantas <i>in vitro</i>	56
 CAPÍTULO IV	
Resultados y Discusión	
4.1. Ensayo de germinación en vivero e <i>in vitro</i>	57
4.1.1. Germinación <i>in vitro</i>	57
4.1.2. Germinación en vivero	57
4.2. Etapa I : Establecimiento del cultivo aséptico.....	59
4.2.1. Características de la bacteria contaminante	60

	<i>Página</i>
4.3. Etapa II : Multiplicación de brotes	61
4.3.1. Efecto de las citocininas en la multiplicación de propágulos.....	61
4.3.1.1. Efectos del BA (Benziladenina) en la multiplicación de propágulos	61
4.3.1.1.1. Efecto sobre el número de brotes.....	61
4.3.1.1.2. Efecto sobre la altura de brotes	62
4.3.1.1.3. Efecto sobre la cantidad de callo	62
4.3.1.1.4. Comparación de medias para número de yemas y grosor de tallo.....	62
4.3.1.2. Efectos de la kinetina (Forfuril aminopurina) en la multiplicación de propágulos	63
4.3.1.3. Efectos del 2ip (γ,γ - Dimethyllylamino purine riboside) en la multiplicación de propágulos	64
4.3.1.3.1. Efecto sobre el número de brotes	64
4.3.1.3.2. Efectos sobre la cantidad de callo.....	65
4.3.1.3.3. Efectos sobre la altura, número de yemas y grosor del tallo..	65
4.3.2. Efectos de la adición de carbohidratos y nitratos en la multiplicación de propágulos	66
4.3.2.1. Número de brotes	66
4.3.2.2. Altura de brotes	67
4.3.2.3. Grosor del tallo	68
4.3.2.4. Cantidad de callo	69
4.3.2.5. Número de yemas	71
4.3.2.6. Color de hojas	72

	<i>Página</i>
4.3.3. Multiplicación de callos para obtener embriogénesis.....	73
4.3.3.1. Número de brotes	73
4.3.3.2. Número de formaciones globulares.....	75
4.3.4. Germinación de embriones somáticos.....	77
4.4. Etapa III : Enraizamiento de brotes	78
4.4.1. Número de raíces.....	78
4.4.2. Longitud de las raíces.....	79
4.4.3. Gramos de callo.....	81
4.5. Etapa IV : Trasplante a suelo de plantas obtenidas <i>in vitro</i>	84
4.6. Metodología para el cultivo <i>in vitro</i> del árbol del Nim	85
 CAPÍTULO V	
Conclusiones.....	87
 CAPÍTULO VI	
Recomendaciones.....	88
Bibliografía.....	89
Anexo.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Árbol del Nim de 2 años de edad con una altura de 5 metros (Tutupec, Oaxaca, 1997).....	7
2. El árbol del Nim y sus partes.....	9
3. Factores ecológicos para el desarrollo del Nim (Del Real et al., 1995)	10
4. Estructura molecular de: Azadirachtina, Nimbin y Salannin (Jacobson, 1989)....	13
5. Ingredientes activos de la semilla del Nim y sus efectos principales contra las plagas de cultivo (Jacobson, 1989).....	13
6. Climas de México (INEGI, 1997).....	24
7. Etapas de la propagación <i>in vitro</i> (Espinoza, 1986).....	29
8. Porcentaje de germinación de semilla de Nim en vivero	58
9. Porcentaje de contaminación en explantes de Nim.....	60
10. Efecto de la concentración de BA en el medio de cultivo sobre la multiplicación de propágulos de Nim..	61
11. Efectos de la concentración de kinetina en el medio de cultivo sobre la multiplicación de propágulos de Nim.....	63
12. Efecto de la concentración de 2ip en el medio de cultivo sobre la multiplicación de propágulos del Nim.....	64
13. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre el número de brotes a los 45 días de incubación.....	66
14. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre la altura de brotes a los 45 días de incubación.....	68
15. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre el grosor del tallo a los 45 días de incubación.....	69
16. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre la cantidad de callo (g) a los 45 días de incubación.....	70

17. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre el número de yemas a los 45 días de incubación.....	72
18. Efecto de tres niveles de GA ₃ , tres niveles de extracto de malta y 5 niveles de BA sobre el número de brotes a los 45 días de incubación.....	73
19. Efecto de tres niveles de GA ₃ , tres niveles de extracto de malta y 5 niveles de BA sobre el número de formaciones globulares a los 45 días de incubación	75
20. Efecto de las concentraciones MS y GA ₃ en la germinación de embriones somáticos de Nim a los 30 días de incubación.....	77
21. Efecto de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre el número de raíces a los 45 días de incubación.....	78
22. Efecto de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la longitud de las raíces a los 45 días de incubación.....	81
23. Efecto de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la cantidad de callo a los 45 días de incubación.....	81
24. Embriogénesis somática en Nim.....	83
25. Etapas de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	86

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Plagas agrícolas que son afectadas por los productos a base de Nim.....	15
2. Nemátodos que atacan cultivos de importancia agrícola y que son afectados por el Nim.....	16
3. Hongos que atacan cultivos de importancia agrícola y que son afectados por el Nim.....	16
4. Ácaros que atacan cultivos de importancia agrícola y que son afectados por el Nim.....	17
5. Estudios de cultivo <i>in vitro</i> con <i>Azadirachta indica</i>	39
6. Sustratos utilizados para la germinación de semillas.....	44
7. Factores y niveles de estudio en la Etapa I del experimento.....	46
8. Tratamientos para determinar el mejor sistema de desinfestación del explante...	46
9. Concentraciones de citocininas en la brotación de yemas axilares.....	48
10. Tratamientos evaluados en la brotación de yemas axilares.....	48
11. Niveles de sacarosa y nitratos en la brotación de yemas axilares.....	50
12. Tratamientos evaluados en la brotación de yemas axilares.....	50
13. Concentración de ácido giberélico, extracto de malta y benziladenina utilizadas en el ensayo factorial para inducir embriogénesis en medio sólido y líquido.....	52
14. Concentración de ácido giberélico y medio de cultivo MS utilizadas en el ensayo factorial para inducir germinación de embriones.....	53
15. Comparación de benziladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) empleado en la fase de enraizamiento.....	55
16. Proceso de análisis de varianza para el ensayo de germinación.....	58
17. Ensayo de germinación en vivero prueba de Tukey.....	58
18. Procedimiento Npar1wan en SAS para la prueba de medias de rangos.....	59

19. Valores promedio de diferentes variables relacionadas en la multiplicación de brotes al agregar diferentes concentraciones de BA al medio de cultivo MS al 100 % a los 45 días de incubación.....	62
20. Valores promedio de diferentes variables relacionadas en la multiplicación de brotes al agregar diferentes concentraciones de kinetina al medio de cultivo MS al 100 % a los 45 días de incubación.....	63
21. Valores promedio de diferentes variables relacionadas en la multiplicación de brotes al agregar diferentes concentraciones de 2ip al medio de cultivo MS al 100 % a los 45 días de incubación.....	65
22. Valores promedio del número de brotes en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	66
23. Valores promedio de la altura de brotes (cm) en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	67
24. Valores promedio del grosor del tallo (mm) en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	68
25. Valores promedio de la cantidad de callo (g) en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	70
26. Valores promedio del número de yemas en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	71
27. Procedimiento Npar1wan en SAS para la prueba de medias de rangos.....	72
28. Análisis de varianza para la comparación de tres niveles de GA ₃ , tres niveles de extracto de malta y cinco niveles de BA para el número de brotes a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	74
29. Análisis de varianza para la comparación de tres niveles de GA ₃ , 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.....	76
30. Valores promedio del número de embriones germinados en dos concentraciones de MS y cinco niveles de GA ₃ a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	77

31. Valores promedio para la comparación de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre el número de raíces a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	79
32. Valores promedio para la comparación de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la longitud de raíces a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	80
33. Valores promedio para la comparación de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la cantidad de callo a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.....	82
34. Características de plantas de Nim obtenidas <i>in vitro</i> 50 días después del período de aclimatación.....	84
35. Especies de artrópodos afectados por los derivados del Nim (Jacobson, 1989).....	99
36. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).....	102

RESUMEN

Debido a sus diversas formas de aprovechamiento tanto de tipo agroforestal como industrial (obtención de bioinsecticidas), el árbol de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), representa actualmente un recurso muy importante para su aprovechamiento en diversas regiones de nuestro país. Para ello, resulta prioritario el estudio de diversas estrategias que permitan la obtención y multiplicación de plantas. Las respuestas organogenéticas *in vitro* tanto de yemas axilares y ápices, así como la embriogénesis a partir del cultivo de callos fueron evaluados. Se evaluó el número y altura de brotes, empleando las citocininas 2-isopentil amino purina (2ip), kinetina (K) y benziladenina (BA), con niveles de 0.1 – 3.0 mg/l. La incorporación de nitratos al 200% y sacarosa al 6% incrementó la altura de brotes, cuya multiplicación se presentó al adicionar 250% de nitratos, y 9% de sacarosa. La obtención de estructuras embrionarias, desarrollo y germinación de embriones, se obtuvieron combinando al ácido giberélico (AG₃) con BA y extracto de malta. El enraizamiento de brotes se obtuvo combinando la BA con el ácido indolacético (AIA) con niveles entre 0.1 y 3.0 mg/l .

Palabras claves: Nim, *Azadirachta indica* A. Juss. , embriogénesis, organogénesis, propagación *in vitro*.

ABSTRACT

Due to its diverse ways of utilization such as agroforestry and industrial use (source of bioinsecticides). The Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.), represents an important resource to be managed in different regions of our country. In order to do so, it is to generate protocols for seedling strategies which production and mass multiplication of selected genotypes. The organogenetic responses *in vitro* from both axillary buds and apices as well as the embryogenesis from the culture of callus were evaluated in this study. Shoot number and height were evaluated using cytokinines 2-isopentyl amino purine (2ip), kinetin (K) and benzyladenine (BA), with levels of 0.1 - 0.3 mg/l incorporation of nitrates at 200% and sucrose at 6% increased shoot growth which were induced by adding 250% of nitrates and 9% of sucrose to the culture medium. Differentiate of embryonary structures and development of embryos were obtained by mixing gibberellic acid (GA₃) with BA and malt extract. Rooting of shoots was obtained by combining indoleacetic acid (AIA) at levels between 0.1 and 3.0 mg/l .

Key words: Neem, *Azadirachta indica*, embryogenesis, organogenesis, *in vitro* and propagation.

INTRODUCCIÓN

En las regiones áridas y en los trópicos secos son de los lugares en donde la pobreza llega a límites intolerables y es por ello, que en éstas se debe trabajar con más ímpetu y dirigir más proyectos hacia estos lugares con el fin de incrementar el nivel de vida de sus habitantes.

En estas zonas se prefiere introducir especies de uso múltiple, en la que los árboles juegan un importante papel no solamente como abastecedor de alimento para el hombre, si no también en la producción de madera u otros productos. Con este propósito se aconseja el empleo de especies arbóreas de rápido crecimiento, con follaje permanente y de valor económico. Dentro de estas especies se encuentra el Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), puesto que a los 12 meses de plantado alcanza una altura de 2.00 metros y es un árbol extremadamente valioso, no solo por su madera que es de buena calidad, sino por que puede ser utilizado como barrera rompevientos, para restaurar los suelos pobres y erosionados, por sus frutos y follaje del que se extraen variedad de sustancias (elementos activos) para el control de plagas y enfermedades, entre otros múltiples usos.

El uso eficaz del Nim como plaguicida natural ha llegado a muchos países del mundo y con él la distribución del árbol, que ahora puede encontrarse en casi todos los países tropicales del Asia, África, América Latina, Norte de Australia y América del Norte (Hawai). Por su parte, los científicos, los ambientalistas y las autoridades que se enfrentan a los problemas de contaminación provocados por los pesticidas que no son biodegradables, a la necesidad de suministro de pesticidas para la agricultura y al mismo tiempo tener que incrementar la producción agrícola para el abastecimiento de alimentos de forma segura y ecológica; le están otorgando una gran atención a la multiplicación de esta especie.

De 2400 especies vegetales estudiadas por los científicos en los últimos años para averiguar las propiedades en el control de plagas, el Nim ha resultado ser la más prometedora. Por lo que el Nim significa una nueva opción dentro de los sistemas de producción en México, en el manejo integral de plagas, como insecticida natural, como abastecedor de subproductos para la industria y árbol de reforestación , lo cual hace necesario realizar una difusión hacia los diversos sectores agrícolas del país sobre el manejo y aprovechamiento de éste recurso.

En algunas regiones de nuestro país se hace necesario incrementar o recuperar la superficie forestal, para el abastecimiento de energéticos, para amortiguar la

sobreexplotación de las selvas y bosques, y al mismo tiempo, disminuir los niveles de erosión de los suelos dados por la falta de cobertura vegetal.

En México existen programas de apoyo para las plantaciones forestales, sin embargo, las que se han hecho hasta la fecha, han sido solo para la extracción de celulosa, sin importar ningún otro aspecto de beneficio para las comunidades rurales.

La necesidad de plantas de Nim para plantaciones, están limitadas por la baja viabilidad de la semilla que dura apenas 15 días y tienen un porcentaje de germinación aproximado del 47%; de las plantas que lograron germinar, el 20% muere en vivero, lo cual provoca la falta de semilla o planta para realizar las plantaciones en superficies extensas, además del poco conocimiento acerca del cultivo del árbol y sus requerimientos específicos climáticos. Por lo anterior se hace necesario antes de realizar las plantaciones a gran escala, efectuar ensayos y probar una cantidad de razas (procedencias) para lograr las formas que más se adapten a las condiciones de México.

Mediante la aplicación de la biotecnología es posible producir en el laboratorio microorganismos o especies vegetales que realizan funciones específicas en la naturaleza. Esta técnica es utilizada ampliamente en el sector industrial, pero hay coincidencia al señalar que es el sector agrícola y forestal el más favorecido por estas innovaciones tecnológicas al afrontar posibilidades anteriormente insospechadas, como la prevención de enfermedades de las plantas sin la aplicación de pesticidas, el mejoramiento genético por medio de novedosas recombinaciones de genes que en la naturaleza no se pueden dar, el incremento de la calidad de los derivados agrícolas o la reducción de la degradación ambiental.

Una de las áreas de la biotecnología es el cultivo *in vitro*; mediante esta técnica se puede obtener gran cantidad de árboles de Nim para su propagación. Con base en lo anterior, se procedió a realizar este estudio tendiente a lograr una técnica en micropropagación en esta especie, con el fin de contar con un método que permita la propagación masiva del árbol del Nim.

Objetivo Principal

1.- Establecer las condiciones *in vitro* que permitan la obtención y multiplicación de plantas de *Azadirachta indica* A. Juss. a partir de organogénesis y embriogénesis somática.

Objetivos Particulares

1.-Conocer mediante ensayos el porcentaje de germinación de semillas de Nim.

2.-Establecer el cultivo aséptico *in vitro* del Nim.

- 3.- Evaluar los constituyentes del medio de cultivo MS y reguladores de crecimiento en la obtención, multiplicación y enraizamiento de plantas a partir de cultivo *in vitro* de yemas axilares y ápices de tallo.
- 4.- Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento que promuevan a partir del cultivo de células la formación de embriones somáticos.
- 5.- Evaluar las concentraciones de reguladores de crecimiento que permitan la germinación *in vitro* de semillas y embriones de Nim.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. EL ÁRBOL DEL NIM

2.1.1. Importancia y problemática

Los graves problemas que ocasionan al hombre y al ambiente el uso excesivo de plaguicidas químicos ha hecho que instituciones, tanto oficiales como privadas, se interesen por conseguir alternativas de control que sean menos impactantes o inocuas al ser humano y al ambiente (Shmutterer, 1990).

Azadirachta indica es potencialmente uno de los árboles más valiosos de las zonas áridas y de los trópicos secos. Puede crecer en suelos áridos deficientes de nutrientes y es una fuente de leña de rápido crecimiento. Además, proporciona muchos subproductos comercialmente explotables y tiene cualidades beneficiosas desde el punto de vista ecológico (Shmutterer, 1990).

El principal problema que se tiene para el abastecimiento de semilla o plántula de Nim, es que sus semillas no mantienen la viabilidad por largo tiempo y tienen que sembrarse a las 2 ó 3 semanas de recolectadas. A pesar de que el árbol necesita luz, las plántulas jóvenes pueden sufrir si reciben una fuerte insolación directa y por lo tanto es deseable proporcionarles una sombra ligera durante el primer año. Las heladas y el fuego destruyen las plántulas (Geilfus, 1989).

2.1.2. Origen y distribución

El nombre genérico Nim, viene de la palabra persa que quiere decir: El árbol noble (Keshava, 1991). El árbol del Nim es originario de la parte tropical del suroeste asiático, especialmente de la India y Birmania, donde tiene siglos siendo utilizada como especie medicinal y de ornato. Es considerado como una planta forestal que crece rápidamente y es excepcionalmente resistente a la sequía. Ha sido promovido por varias décadas por organizaciones internacionales como abastecedor de madera y/o carbón en las zonas áridas de Asia, África y desde hace algún tiempo en América Latina (Cruz, 1993). El Nim es nativo del subcontinente Indo-Pakistani; otros atribuyen su origen a zonas secas de la India, Pakistán, Sri Lanka, Malasia, Indonesia, Tailandia y Birmania. En la India existen cerca de 25 millones de árboles. Se localiza en un largo cinturón que se extiende hacia el sur desde Delhi y Lahore hasta Cabo Camorín. En el sur de Asia se encuentran en Bangladesh y Birmania (Ahmed y Grainge, 1986).

Ahmed y Grainge (1986) mencionan que en África el árbol del Nim se encuentra distribuido en Nigeria y Sudán; también en la costa del Este, desde Etiopía, pasando

por Somalia, Kenia, Tanzania y Mozambique; y en el Oeste de África, Mauritania, Togo, Costa de Marfil y Camerún. Ha sido introducido a naciones del Caribe, en Trinidad y Tobago, Jamaica, Surinam, Guayana y Barbados como planta medicinal (Ahmed y Grainge, 1985).

Existen abundantes plantaciones en Guatemala, Bolivia, Ecuador, Honduras, Argentina, Brasil, Cuba, Nicaragua, República Dominicana y en Haití. De manera experimental lo cultivan en Puerto Rico, Las Islas Vírgenes, Florida, Oklahoma, California, Arizona y ahora en México (Ahmed y Grainge, 1986).

Sus semillas y hojas se utilizan en la India y Sri Lanka (Ceylan) para la lucha contra las plagas. Además, en estos países se extrae aceite de las semillas, que es utilizado para la fabricación de jabón. Ya sea el aceite de Nim prensado en frío, como también los residuos de la extracción de aceite pueden ser utilizados en la lucha contra las plagas. También las hojas del árbol del Nim contienen insecticidas, aunque en concentración ligeramente menores (Leos y Salazar, 1991).

La India es el país con el mayor número de árboles de esta especie, con 18 millones en producción. Se tiene conocimiento que en Arabia hay 50,000 árboles establecidos, dos millones en República Dominicana y en México cerca de 5,000 árboles (Del Real *et al.*, 1995).

2.1.2.1. Proyectos de introducción del Nim llevados a cabo en algunos países

- Haití

El árbol del Nim fue introducido como especie forestal para abastecimiento de madera y se ha convertido en la especie más común que se produce internamente (Del Real *et al.*, 1995).

- República Dominicana

Al inicio de la década de 1980 el Nim fue introducido como una especie prometedora para fincas energéticas forestales y poco después por la agencia Alemana de Cooperación Técnica (GTZ) para fines de producción de insecticida biológico (Taveras, 1994).

- Venezuela

Se implantó un proyecto para el desarrollo sustentable y se creó un vivero para producir más de treinta y cinco mil plantas (Del Real *et al.*, 1995).

- México

En México se introdujo el árbol del Nim en 1987 por la Universidad de Nuevo León y el Colegio de Posgraduados de Chapingo, con resultados muy limitados (264 y 100 árboles respectivamente (Rodríguez y Rodríguez, 1994).

En 1992 Ecosta y Maderas del Pueblo A.C. inician un proyecto de introducción, consiguiendo un apoyo de la PROAFT A.C., logrando introducir 3500 árboles en la costa de Oaxaca. Actualmente se tiene una superficie de 25 has. de Nim, en las cuales se están realizando ensayos de progenie, calidades de sitio y la evaluación dasométrica de las plantaciones, en el Municipio de Tututepec, Oaxaca.

2.1.3. Clasificación taxonómica

Nombre Científico:

Azadirachta indica A. Juss

Sinónimos:

Melia indica Brand., *Melia azadirachta* L.

Nombre Común:

Es conocido con diferentes nombres en el mundo (Jacobson, 1989):

Español	: Nim	Sánscrito	: Nimba, Arsihtha
Inglés	: Neem, Indian lilac	Sindi	: Nimi
Portugués	: Margosa	Sri Lanka	: Kohomba
Alemán	: Niembaum	Farsa	: Nib
Hindú	: Nimb	Malayo	: Yeppa
Bruñese	: Tamar, Tamarkha	Singapur	: Kohumba
Urdo	: Nim	Indonesia	: Mindi
Tamil	: Vembu	Nigeria	: Dongoyaro

El árbol del Nim pertenece a la siguiente clasificación taxonómica (Bailey, 1977):

Reino:	Vegetal
División:	Embriofita
Subdivisión:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledoneas
Orden:	Geraniales
Familia:	Meliaceae
Género:	<i>Azadirachta</i>
Especie:	<i>indica</i>

Es un árbol siempre verde (Figura 1), es decir que no pierde sus hojas en ninguna época del año, de una altura de 15-20 m, con una copa redondeada, con ramas ampliamente extendidas; los cogollos u hojas jóvenes son de color rojo cobrizo y posteriormente se tornan a un verde oscuro. Desarrolla una raíz principal de rápido crecimiento, clave para resistir la sequía; sus raíces laterales pueden tener hasta 15 m de longitud, se reporta que vive más de 200 años (Cruz, 1993).



Figura 1. Árbol del Nim de 2 años de edad con una altura de 5 metros (Tututepec, Oaxaca, 1997).

El árbol del Nim es de la familia de las meliáceas, pariente cercano del cedro, la caoba y el paraíso (Rodríguez y Rodríguez, 1994).

2.1.4. Descripción botánica

Hojas:

Hojas compuestas imparipinadas, alternas, de 12 a 40 cm de largo y de peciolo largos; divididas de 7 a 17 segmentos con bordes aserrados de aproximadamente 7 cm de largo cada uno y la hoja de aproximadamente 30 cm de largo (Keshava, 1991) (Figura 2a).

Flores:

Las flores son blancas, amarillentas o de color crema, pequeñas y se disponen a manera de racimo (no apretados) de 20 cm de largo. La floración se da por lo general en diciembre - enero y la fructificación se extiende desde febrero a marzo y dura hasta agosto - septiembre (Figura 2b) (Vera, 1984) (Geilfus, 1989).

Fruto y semilla:

Es una drupa elipsoidal con una semilla que mide 1.5 a 1.8 cm de largo, de color verde, con una cubierta dura de color blanco y una cubierta carnosa y dulce de color amarillo a rojo según la madurez. La semilla representa el 10 % del total del fruto (Figura 2c y 2d) (Vera, 1984) (Geilfus, 1989).

Tronco:

El tronco es recto, café rojizo, con un centro blanco grisáceo y en un corte pueden distinguirse los anillos de crecimiento. Su corteza presenta escamas redondeadas en tonos grises (Keshava, 1991).

2.1.5. Requerimientos ambientales del Nim

Altitud

Crece normalmente en todas las zonas bajas tropicales, desde los 50 msnm hasta aproximadamente los 1500 msnm (Geilfus, 1989).

Temperatura

Tiene un buen desarrollo a los 25°C, aunque puede resistir temperaturas extremas desde 0°C hasta los 49° C, admite altas temperaturas pero es muy sensible al frío, factor que se convierte en la principal limitante para establecer plantaciones en lugares altos (Johnson, 1993).

Es resistente a la sequía extrema y aridez, creciendo aún con 130 mm de precipitación anuales; el rango óptimo es de 450-750 milímetros anuales (Vera, 1984). Sin embargo, Del Real *et al.* (1995) mencionan que el rango óptimo de crecimiento se encuentra entre 800 y 1800 mm anuales (Figura 3).



Figura 2. El árbol del Nim y sus partes: A) Rama floreciendo y fructificando, B) Flores, C) Frutos y D) semillas. Simmonds y Blaney, 1983 (A,C); Fagoonee, 1983 (B).

Humedad

Se puede dar en zonas húmedas, si el suelo está bien drenado y no muy ácido; en este caso sería preferiblemente utilizarlo para insecticida, porque para leña y madera otras especies de zonas húmedas crecen más rápido (Geilfus, 1989).

Suelo

Se desarrolla rápidamente y no demanda mucho de la fertilidad del suelo. El árbol del Nim crece, por ende, en las más variadas condiciones. Las cimas de las colinas y las tierras yermas, como por ejemplo las laderas erosionadas son tan idóneas como las llanuras pedregosas o suelo lateríticos (tierra roja) (Brechelt, 1993).

Puede considerarse de manera general que se desarrolla óptimamente en suelos arenosos y profundos, con un pH mínimo de cinco, ya que su hojarasca contribuye a que la capa superficial del suelo alcance un pH neutro. Puede tolerar suelos alcalinos y/o salinos, aunque Vera (1984) reporta un deficiente crecimiento del árbol. Es muy sensible a suelos con mal drenaje, es decir que se inunden durante alguna temporada del año; es igualmente sensible en arenas secas profundas donde la capa freática durante la estación seca se encuentre a más de 18 m de profundidad, así como en suelos con bajos niveles de zinc y/o potasio.

Límite del crecimiento ←	Crecimiento y producción de frutos reducidos ←	Ambito óptimo del crecimiento vegetativo/generativo ← →	Crecimiento y producción de frutos reducidos →	Límite del crecimiento →
≤ 300	500	precipitaciones 800 anuales 1800 (mm)	2000	2500
+4 (noche)	+ 10	+20 temperatura +27 (°C)	+ 40	+ 49
≥ 95 % arena 30 % piedras	75- 95% arena	suelo (porcentaje de arena fina 0-0.2 mm) 50-75% arena arcilla de 25 a 45 %	arcilla 45- 70 %	arcilla ≥70%
≤ 1.8 x 1.8	3 x 3	distancia de plantación (metros) 4 x 5 ≥ 7 x 7		

Figura 3. Factores ecológicos para el desarrollo del Nim (Del Real *et al.*, 1995).

2.1.6. Plagas, enfermedades y factores limitantes del Nim

2.1.6.1. Malezas

El Nim no tolera la competencia de pastos, principalmente en los primeros años de cultivo y necesita control cuidadoso de las malezas, especialmente en las zonas áridas (National Academy Press, 1993).

2.1.6.2. Plagas y enfermedades

- **Plagas**

En África y Asia, donde se han hecho plantaciones extensas, empiezan a aparecer algunos problemas con plagas como las siguientes (Jacobson, 1989):

África:

Aonidiella orientallis (Homóptera: Diaspididae)

Pinnaspis strachni (Homóptera: Diaspididae)

Acromyrmex sp. (Hormiga arriera) (Himenóptera: Formicidae)

Asia:

Aodoxophyes aurata

Helopeltis theivora (Hemiptera: pentatomidae)

Plagas como el escarabajo dentado de granos, *Oryzaephilus surinamensis*, puede atacar las semillas viejas del Nim (Grossman, 1995).

En la actualidad, en las plantaciones de Nim en México no se tiene ningún problema de plagas debido a que son plantaciones jóvenes.

- **Enfermedades**

En las plántulas de semillero se presentan problemas como son diversas royas, pudriciones y marchitamientos, incluyendo *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (National Academy Press, 1993).

2.1.7. Usos y aprovechamientos

Existen múltiples usos del Nim, puesto que casi todas las partes del árbol se utilizan; además de los usos que se citan a continuación, existe la posibilidad de realizar investigaciones y descubrir otros productos para ser utilizados (Jacobson, 1989):

Insecticida	Forrajes	Ornamental
Nematicida	Cortina rompeviento	Sistemas agroforestales
Fungicida	Cercos vivos	Forestal
Bactericida	Recuperador de suelo	Energía
Medicina humana	Maderable	Anticonceptivo
Medicina veterinaria	Leña	Valor cultural
Cosméticos	Controlador de la erosión	Carbón
Abono orgánico	Sombra	

2.1.7.1. Pesticida

El Nim contiene 49 sustancias activas y son tres las principales que son utilizadas para el control de insectos (Figura 4 y 5):

- Azadirachtin: Inhibe el crecimiento y altera la metamorfosis, causa deformaciones y esterilidad en los insectos. Se encuentra en las semillas (Jacobson, 1989).
- Nimbin: Tiene efectos repelentes y antialimentarios en insectos; se encuentra en semillas, corteza y madera (Jacobson, 1989).
- Salanin. Es antialimentario, inhibe la formación de quitina, es repelente y afecta la comunicación sexual de insectos. Se encuentra en las semillas (Jacobson, 1989).

Formulaciones de azadiractin tales como Benefit®, BioNim®, Margosan-O™, y Azatin™ son etiquetadas como controladores de áfidos, gusano soldado, orugas, zancudos, escarabajos de la hoja del olmo, grillo de campo, saltamontes, polilla, larva de los esfingidos, saltarilla, mosca de sierra de pino, gusano de abeto, mosca blanca en terrenos abiertos, ornamentales, árboles y arbustos. El margosan-O ha sido registrado para el uso contra la mosca blanca en crisantemos, minador de la hoja en abedules, polilla en árboles de sombra y trips en gladiolas (NRC, 1992).

En programas de manejo integrado de plagas (MIP), aún si se usaran otros fumigantes, se podría continuar con tratamientos de Nim para minimizar la reinfestación. Se aconseja el aceite de Nim prensado en frío, que requiere maquinaria para producirse, ya que proporciona mejor control de plagas que los productos de Nim producidos por procesos de vapor (Meisner *et al.*, 1976).

2.1.7.1.1. Efectos sobre los insectos - plaga

Schmutterer (1987, 1988); Jotwani y Srivastava (1981), Düweke (1992) y National Academy Press (1993) mencionan que en la semilla se encuentra el azadirachtin y otras sustancias insecticidas y/o repelentes que causan los siguientes efectos en los insectos (anexo):

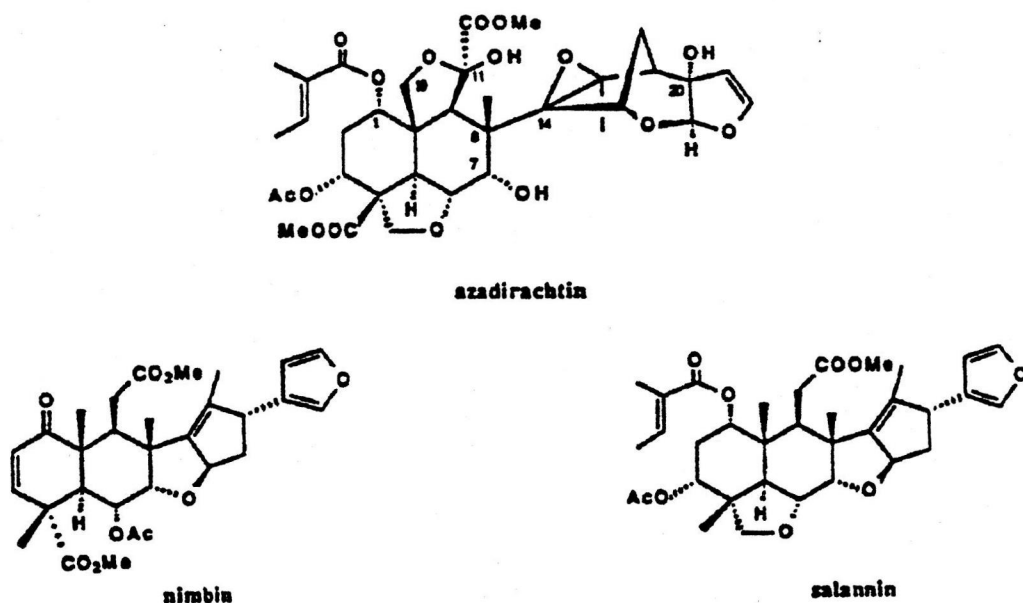


Figura 4. Estructura molecular de: Azadirachtina, Nimbin y Salannin (Jacobson, 1989).

Plagas (Insectos, nemátodos)	Grupos de compuestos del Nim y sus efectos más importantes						Productos del Nim
	Nimbine Efectos repelen- tes	Salannine Anti- alimentarios	Azadirachtina Alteración de la Metamorfosis	Reducción de la Fecundidad	Inhibición de poner los huevos	Defectos en la conducta	
Lepidoptera Coleoptera Hymenoptera (larvas)							Extracto de las semillas, ricos en Azadirachtina.
Coleoptera (adultos)							Extractos de las semillas, con aceite y Azadirachtina; aceite de Nim.
Diptera (larvas)							Extractos de las semillas, ricos de Azad.
Homoptera Heteroptera (larvas, ninfas)							Aceite de las semillas, en- riquecido de Azadirachtina
Homoptera Heteroptera (adultos)							Aceite de las semillas, ex- tractos de ho- jas con Azad.
Orthoptera							Extractos de semillas y ho- jas con aceite Extracto del aceite con Azadirachtina
Tysanoptera							Extractos de las semillas con aceite.
Nemátodos							Extractos de hojas y semi- llas ricos en Nimbin.

Figura 5. Ingredientes activos de la semilla del Nim y sus efectos principales contra las plagas de cultivos (Jacobson, 1989).

- Regulación hormonal del crecimiento en los insectos.
- Repelencia y antialimentación.
- Reducción de fecundidad y huevecillos estériles.
- Reducción del comportamiento y de la actividad general.
- Inhibición del desarrollo de huevecillos y pupas.
- Acelera la metamorfosis en varios estadíos.
- Impide la oviposición.
- Interrumpe la comunicación sexual.
- Inhibe la formación de quitina.
- Actúa como veneno estomacal.

Schmutterer (1990) menciona que en los ensayos de laboratorio más de 400 plagas se mostraron susceptibles al Nim; sus efectos principales los causa sobre el desarrollo de las larvas, la reducción de la alimentación, reproducción y la pérdida de actividad. La alteración del desarrollo se debe principalmente a una escasez de la hormona ecdisona que es la que promueve la muda y por lo cual el desarrollo no es posible.

Taveras (1994) señala que en la República Dominicana los efectos de los ingredientes activos presentes en las semillas de Nim sobre los insectos plaga son muy variables. Contra *Chelomorfa rufipennis* se ha comprobado un fuerte efecto repelente sobre adultos y antialimento, así como regulador del crecimiento en larvas. Sobre *Trialeurodes vaporarum* y *Bemisia tabaci* se ha observado un leve efecto repelente, un moderado antialimentario y un fuerte efecto regulador del crecimiento.

A continuación se mencionan algunos órdenes de insectos que son plagas agrícolas y sus efectos al aplicar productos a base de Nim (Cuadro 1).

Cuadro 1. Plagas agrícolas que son afectadas por los productos a base de Nim.

Orden	Efecto
Orthóptera: (defoliadores, grillos y langostas)	El efecto antialimentario es el más importante, un número de especies rehusan comer las plantas tratadas con Nim. Recientemente un nuevo efecto descubierto es el de que las formas gregarinas se tornan en formas solitarias.
Homóptera: (áfidos, psilidos, mosquitas blancas y otros homópteros)	Por ejemplo ninfas de defoliadores, presentan considerables efectos antialimentarios y efectos reguladores del desarrollo. Aunque algunos reportes mencionan que los áfidos no son buenos candidatos a ser controlados por el Nim.
Thysanóptera: (trips)	Es muy efectivo el Nim en los trips que están presentes en el suelo; a los adultos de trips los obliga a salir de sus refugios en las plantas al provocarles repelencia.
Coleóptera: (mayates, picudos, escarabajos)	Las larvas del género de los escarabajos especialmente fitófagos coccinélidos (escarabajo mexicano de la haba y escarabajo del pepino) y crisomélidos (escarabajo colorado de la papa entre otros), rehusan comer plantas tratadas con Nim, crecen poco y algunos mueren por contacto.
Lepidóptera: (mariposas, palomillas)	Las larvas de lepidópteros como gusano soldado, barrenadores del fruto y barrenadores del maíz, presentan una alta sensibilidad al Nim, el cual bloquea la alimentación aunque el efecto más importante es la interrupción del crecimiento.
Díptera: (moscas y mosquitos)	Muchas especies de insectos dípteros, como mosca de la fruta, mosca de la cara, mosca del cuerno y mosca doméstica, por ejemplo, son susceptibles a los productos del Nim; es posible que los mosquitos sean susceptibles también.
Hymenóptera: (Avispas, Hormigas, abejas)	en este grupo el Nim provoca antialimentación y tiene efectos reguladores del crecimiento en estados inmaduros.

Fuente: National Academy Press (1993), Brechelt y Luz (1995) y Grainge *et al.* (1985).

2.1.7.1.2. Efectos sobre otros organismos

- Nemátodos

El Nim afecta a varios tipos de Nemátodos (Cuadro 2) entre los cuales destacan las siguientes especies: *Meloidogyne incognita*, *Tylenchorynpus brassicas*, *Dityenchus cype*, *Hoplolaimus indicus*, *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus delattrei* (Grainge *et al.*, 1985). En el Sur de la India se usa la pasta de Nim para el control de éstos; anualmente se utilizan cerca de 3000 toneladas de Nim aplicadas al suelo (National Academy Press, 1993).

Cuadro 2. Nemátodos que atacan cultivos de importancia agrícola y que son afectados por el Nim.

Nemátodo de quiste en la soya	<i>Heterodera glycine</i>
Nemátodo de agalla	<i>Meloidogyne incognita</i>
Nemátodo de la raíz	<i>Meloidogyne javanica</i>
Nemátodo	<i>Pratylenchus brachyurus</i>
Nemátodo	<i>Tylenchus filiformis</i>

Fuente: Grainge *et al.* (1988).

- Caracoles

En pruebas de laboratorio se ha observado que los extractos con etanol proveen toxicidad para especies de caracoles acuáticos, como por ejemplo *Biamphalaria glabrata*. Los extractos de Nim matan igualmente a los adultos como a los huevecillos. En otro experimento en el cual se utilizó semilla de Nim en solución acuosa, se obtuvo un 100 % de mortalidad de *Scabra sp.*; este caracol es común en oriente y es vector de lesiones del pulmón (National Academy Press, 1993).

- Hongos

El Nim también ha demostrado actividad fungicida. Se reporta que el aceite de Nim protegió semillas de chícharo de serias enfermedades fungosas ocasionadas por *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* y retrasó el desarrollo de *Fusarium oxysporum* pero no lo controló. Por otro lado, la pasta de Nim incorporada al suelo bloqueó el desarrollo de *Rhizoctonia solani* (Cuadro 3) (National Academy Press, 1993).

Cuadro 3. Hongos que atacan cultivos de importancia agrícola y que son afectados por el Nim.

Ahogamiento de las plántulas	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Costra negra de la papa	<i>Rhizoctonia solani</i>
Marchitez en hortalizas	<i>Fusarium oxysporum</i>
Marchitez del jitomate	<i>Fusarium lycopersici</i>
Tizón foliar del frijol	<i>Alternaria tenuis</i>

Fuente: National Academy Press (1993).

- Virus

El Nim ha demostrado mucha efectividad en la interferencia de la transmisión de virus a las plantas por insectos. Se han hecho ensayos de los efectos del Nim en contra de insectos vectores. En Filipinas, plantaciones de arroz fueron asperjados con aceite de Nim y se observó una considerable disminución en la incidencia de daños por virus que afectan al arroz y son transmitidos por el saltador café (*Nilapaverta lugens*). En

la India, con extractos de hojas de Nim redujeron la transmisión del virus del mosaico del tabaco; este virus causa también daños considerables en varios cultivos de hortalizas (National Academy Press, 1993).

- Ácaros

El árbol del Nim es muy efectivo también para combatir los siguientes ácaros que atacan a diferentes cultivos agrícolas (Cuadro 4):

Cuadro 4. Ácaros que atacan cultivos de importancia agrícola y que son afectados por el Nim.

Araña roja de los cítricos	<i>Panonychus citri</i>
Ácaro	<i>Tetranychus citri</i>
Ácaro	<i>Tetranychus urticae</i>

Fuente: Schmutterer (1988).

- Lombrices de tierra

En estudios de invernadero los polvos y semillas de Nim fueron incorporados en macetas que contenían suelo con lombrices (*Eisemia foetida*); el número de lombrices jóvenes se incremento en 25 %. Por otro lado, en diferentes parcelas tratadas con Nim, no se presentó diferencia en el número de lombrices; sin embargo, el peso promedio de las lombrices se incremento en dichas parcelas. Por lo que parece ser que los productos de Nim favorecen a las lombrices de tierra, pero bajo ciertas condiciones (Jacobson, 1989).

2.1.7.2. Medicinal

La corteza y las hojas pulverizadas pueden ser utilizadas como jabón durante los baños, elimina la dermatitis, sarna, sarampión, varicela, evita irritaciones de la piel, espinillas, acné, calor y fiebres (National Academy Press, 1993).

Sirve para eliminar ectoparásitos; piojos, garrapatas, infecciones, llagas, úlceras y a la vez sirve para la cicatrización. No permite la multiplicación y proliferación de los microbios patógenos. La flora intestinal no se altera ni sufre por haber consumido el extracto (Rodríguez y Rodríguez, 1994).

Fortalece el sistema cardiovascular, normaliza la tensión arterial y páncreas (especialmente cuando la gente sufre de enfermedades degenerativas como diabetes mellitus). Al consumir este extracto durante uno o dos meses sin ingerir dulces, aumenta la vitalidad del individuo y con ello ningún insecto se acerca o pica. Es un remedio preventivo para el control de la malaria (National Academy Press, 1993; Hager, 1992).

Acción anti-tuberculosis. El aceite de Nim inhibió el crecimiento de las tres cepas de *Mycobacterium* en una concentración de 12.5 mg/ml. El aceite de Nim y el nimbidol en concentraciones mas altas provocaron efectos parciales de inhibición, mientras que el nimbidin prolongo el período de supervivencia de ratones afectados con tuberculosis. El efecto del Nim también abatió la hipersensibilidad en cerdos de Guinea sensibles a la tuberculosis (Ketkar, 1985).

Acción anti-fungosa. El nimbidin, nimbidol y aceite de Nim son muy efectivos contra varios hongos como:

- *Tinea rubrum*
- *Trichophyton interdigitale*
- *Cocchi dioides immitis*
- *Microsporum gysum*
- *Aspergillus fumigatus*
- *Penicillium litacimun*
- *fusarium nivale*

estos productos se aplican a muy bajas concentraciones (Ketkar, 1985).

Efecto anti-protozoario. El nimbidin y el nimbidinato sódico destruyó a *Paramaecium caudatum* en 1/500 dilución en un minuto. El Nimbidol demostró mas potencia que el nimbindin a dosis de 25 mg por 100 g de agua suministrada oralmente, suprimiendo la infección de *Plasmodium gellinaecum* en pollitos (Ketkar, 1985).

Efecto dermatológico. El nimbin es también efectivo contra varias enfermedades de la piel, tales como la furunculosis, dermatitis arsenical, eczema, roña y dermatitis seborreica. Las hojas secas son tratadas con alcohol al 70 %; evaporado el residuo disuelto en glicol-propileno en una proporción de 4:2.6 y la solución se aplica localmente (Ketkar, 1985).

Enfermedades dentales. Las gárgaras y dentríticos de nimbidin son efectivos contra el sangrado de las encías y la piorrea. Silvose T y Silvo TRS son extractos patentados de la corteza del Nim. Cuando se agrego a la pasta dental produjo resultados notables en la prevención y curación de la inflamación de encías y la paradontoncia (Ketkar, 1985). Los brotes tiernos del Nim son usados por millones de personas en la India y en África para prevenir la infección de enfermedades periodontales (Hager, 1992).

El aceite de Nim se incorpora en los aceites medicinales para el pelo. También se usa para tratar reumatismo, fiebre, lepra y escrófula; la resina es demulcente y los frutos purgativos. El Nim también se ha usado en tratamientos de hepatitis y enfermedades de los ojos y se piensa que tiene propiedades antisifilicas. Se hierven los ingredientes del follaje y/o corteza y se deja reposar. Se puede utilizar directamente el zumo de las hojas sobre las heridas (National Academy Press, 1993).

2.1.7.3. Anticonceptivo

Se esta estudiando las posibilidades de extraer de la semilla del Nim un anticonceptivo; se ha encontrado que puede funcionar como un espermaticida, ya que provocó inmovilidad a los espermatozoides de los conejos en estudios realizados de reproducción (National Academy Press, 1993). En otro estudio realizado en changos y humanos, se utilizó aceite de Nim sin diluir antes del coito y resulto 100 % efectivo (Amhed y Grainge 1985; 1986).

2.1.7.4. Medicina veterinaria

El aceite de Nim así como el extracto acuoso de las semillas se utiliza para el control de la garrapata y moscas del ganado; el extracto tiene un efecto repelente. También sirve para controlar las pulgas y la sarna en los perros (Cruz, 1993). Algunas posibilidades de uso en el campo de la veterinaria son para el control de insectos, tales como la mosca del cuerno, la mosca zumbadora, y la mosca picante. Así como el combate de bacterias como el *Staphilococcus aureus* la cual causa mastitis en la vacas, también la *Salmonella bacterium* que es abortiva en caballos, en ganado vacuno y carnero, También se pueden controlar lombrices intestinales del ganado (National Academy Press, 1993).

2.1.7.5. Agricultura

En Sri Lanka, por ejemplo, el humo de las hojas de Nim se usa como fumigante botánico. En Filipinas, extracto y polvos de la semilla del Nim se usan para el tratamiento de granos de arroz (Jacobson, 1989).

Un problema general con los fumigantes es la reinfestación después de la fumigación. Al respecto, el Nim ha probado ser mejor que cualquier otro fumigante. Por ejemplo, en granos no fumigados hubo un doce por ciento de infestación de plagas, cinco a seis por ciento de infestación con otros fumigantes y sólo tres por ciento de infestación con el fumigante de Nim, solo en ocho meses después de la fumigación (Grossman, 1995).

2.1.7.6. Agroforestal

En combinación con la agricultura, el Nim se puede usar de diversas maneras (Johnson, 1993):

- Control de plagas: además de los productos extraídos, el Nim se siembra alrededor de los cultivos para repeler plagas.

- Asociaciones: es un árbol muy competitivo y difícil de intercalar con otros cultivos, ya que termina desplazándolos; sin embargo, se han logrado avances en algodón, frutales, mijo, forrajes, cacahuete, frijol y sorgo, siempre y cuando menos del 20 % sean árboles del Nim.
- Tutor: ECOSTA¹ realiza pruebas para poder utilizar al Nim como tutor de vainillales.
- Como no tira las hojas, el Nim proporciona excelentes resultados al usarse como cortinas rompevientos y se planta para sombras en potreros.

2.1.7.7. Forraje

Las hojas verdes son utilizadas en la India como forraje para ganado en la estación seca; contiene 13-15 % de proteínas y de ellas el 50 % son digestibles. Un árbol adulto puede producir 350 kilogramos al año. La pasta puede darse a razón de 10 % de la dieta de los bovinos, y 5 % de las gallinas; contiene de 12 a 17 % de proteína cruda (Rodríguez, 1994).

2.1.7.8. Madera

La madera posee albura blanca-grisácea y duramen rojizo a café-rojizo, de grano entrecruzado y textura mediana, aceitosa, con anillos de crecimiento fácilmente distinguibles. La madera se puede trabajar fácilmente y es resistente a pudrición y ataque de insectos (Jacobson, 1988).

El árbol del Nim está emparentado con la caoba y el cedro rojo que pertenecen a la familia de las Meliaceae y su madera se asemeja a la de la caoba cubana. Es resistente a la pudrición y a los insectos (termitas) y es más fuerte que la teca. Es excelente para construcción, para postes y para confección de muebles. En República Dominicana han demostrado que se obtienen buenos muebles a partir de árboles de 3 ó 4 años de edad. En la ebanistería las ramas son utilizadas para la fabricación de utensilios de cocina o artesanías (Vera, 1994).

2.1.7.9. Leña

El Nim se ha usado para leña en la India y África desde hace mucho tiempo. Se ha convertido en la especie más importante para plantaciones en el Norte de Nigeria. El valor calorífico de la madera es ligeramente menor que el del carbón de Enugu, en Nigeria. La madera es relativamente pesada, tiene un peso específico entre 0.56 y 0.85 (promedio de 0.68) (Geilfus, 1989).

¹ ECOSTA: Organización no Gubernamental, ubicada en el Municipio de Tututepec, Oaxaca.

El árbol desarrolla primero sus raíces antes de crecer en altura. Puede alcanzar de cuatro a siete metros de altura a los tres años; para leña se explota en rotaciones de ocho años y produce alrededor de 20 metros cúbicos por hectárea por año. Después retoña muy rápido y puede ser cortado a los tres o cuatro años (Vera, 1994).

2.1.7.10. Energía

Las semillas de esta especie contienen hasta el 40 % de aceite, el cual se utiliza como combustible en lámparas y como lubricantes para maquinaria. Se cree que la pulpa que rodea a la semilla es un substrato prometedor para la producción de gas metano (Vera, 1994).

2.1.7.11. Abono orgánico

El Nim puede ser utilizado como un excelente abono orgánico, ya que las raíces del árbol son capaces de extraer nutrientes de las capas del suelo más profundas y ponerlos a disposición en las capas superficiales a través de sus hojas, ricas principalmente en calcio y magnesio. Además, la pasta que se deriva de la extracción del aceite puede ser utilizada para las plantas en el jardín o en el huerto (National Academy Press, 1993).

- **Fertilizantes**

La pasta y los polvos de Nim representan un considerable potencial como fertilizante; la pasta está constituida de los siguientes elementos:

Proteínas crudas	13-35 %
Carbohidratos	26-50 %
Fibra cruda	8-26 %
Grasas	2-13 %
Cenizas	5-18 %
Ácidos grasos	1-17 %

Fuente: National Academy Press (1993).

2.1.7.12. Industrial

El aceite de Nim se considera como el producto comercial más importante; el rendimiento de aceite es hasta del 50 % del peso de la semilla. Este aceite es muy

usado en lámparas, jabones y otros productos . Se caracteriza por ser generalmente amargo, oscuro y oloroso (Ahmed y Grainge, 1986).

Además de las sustancias activas insecticidas de las semillas prensadas se puede obtener el aceite de Nim; para esto, 30 kg de semillas de Nim producen de 6 a 8 kg de aceite. Las pastas de las prensas resultantes pueden utilizarse para la elaboración de un insecticida, al igual que los granos enteros de Nim (National Academy Press, 1993).

Jabones: la India provee el aceite que hoy en día es el más usado para la manufactura de jabones, tanto a grande como a pequeña escala debido a su bajo costo (Ahmed y Grainge, 1986).

Cosméticos: en la fabricación de cosméticos es muy útil el Nim. Los polvos se utilizan como componente de cremas faciales. El aceite de Nim purificado es utilizado en la elaboración de barniz de uñas y otros cosméticos (Ahmed y Grainge, 1986).

2.1.7.13. Ecológico

A nivel ecológico el Nim es utilizado en muchos países para resolver diversos problemas como son los siguientes (Geilfus, 1989):

- Recuperador de suelo
- Retención de agua
- Protección contra la erosión
- Reforestación
- Cortina rompevientos
- Sombra

Por su rápido crecimiento y denso follaje durante todo el año es utilizado en muchos lugares para reforestación y sombra en avenidas y alrededor de los terrenos como cortina rompevientos, esto debido a las características de follaje y hojas. Además se utiliza como cercos vivos por su capacidad de rápido crecimiento y de troncos erectos (Vera, 1994).

Por su capacidad de poder crecer en zonas con pendientes, ha permitido su utilización para evitar la erosión de los suelos y por su característica de extraer nutrientes de las capas profundas hacen del Nim un buen recuperador de suelos (Hager, 1992).

2.1.7.14. Cultural

Las hojas jóvenes son comestibles. En la India el primer día del año se hace un ayuno total y solamente se toma té de Nim. Incluso el comer hojas es parte de la celebración

del festival Gudhi Padwa el día primero de Chaitra (calendario Hindú). Lo primero que hacen los Hindus al levantarse es lavarse los dientes, venerar al sol y comer hojas de Nim para purificar la sangre. En muchas comunidades Hindus, el Nim ocupa un lugar muy importante en los eventos socioculturales y religiosos. El té de hojas de Nim también es tomado al despertarse en forma rutinaria por algunas personas en la India para prevenir enfermedades. Este té lo preparan dejando agua con hojas durante toda la noche (Ahmed y Grainge, 1986).

2.1.7.15. Toxicidad

Radwanski y Wickens (1981) mencionan que uno de los atributos más importantes del aceite de Nim como un insecticida es su efectividad y la no toxicidad hacia el hombre y los animales, además de que no significa un riesgo de contaminación para el ambiente. Se ha reportado toxicidad del aceite de Nim sobre cerdos de Guinea y conejos. En peces insectívoros hasta 0.04 % de extracto de Nim les resulta tóxico (Sadre,*et al.*, 1984; Jotwani y Srivastava, 1981).

Well (citado por Bengé, 1988) reporta que la ingestión de semillas por el pez de charco en Haití resulta fatal para peces de tilapia; por lo cual se hace necesario efectuar estudios sistemáticos de toxicología.

Cuando en el sitio de preparación del aceite o pasta, en el manejo de semillas en el almacén, se deterioran y son infestadas por *Aspergillus flavus*, en ciertas condiciones y se producen aflatoxinas (Pereira y Wohlgemuth, 1982).

2.1.8. Perspectivas del Nim en México

El árbol del Nim como se vio anteriormente es una especie que se adapta a las condiciones de los climas secos. En nuestro país estos climas abarcan más del 50 % del territorio mexicano predominando, sobre todo, en la mitad septentrional, y en particular, en el altiplano, en las planicies costeras Noroccidental y Nororiental y en Baja California. También se presentan pequeños enclaves en la Depresión del Balsas, en Oaxaca, en el extremo Noroeste de Yucatán y en algunas otras partes. El tipo de clima seco desértico predomina en la península de Baja California, en la mitad occidental de Sonora y ocupa grandes extensiones de Chihuahua, Coahuila, Durango y Zacatecas (Figura 5)(Rzedowski, 1994).

El árbol de Nim representa una alternativa de desarrollo en estas regiones del país, ya que su potencial de usos es variado y se adapta de manera adecuada a estas regiones.

Las semillas del árbol del Nim significan una nueva opción dentro de los sistemas de producción agroforestal en México, en el manejo integral de plagas, como insecticida natural y árbol de reforestación entre otros usos.

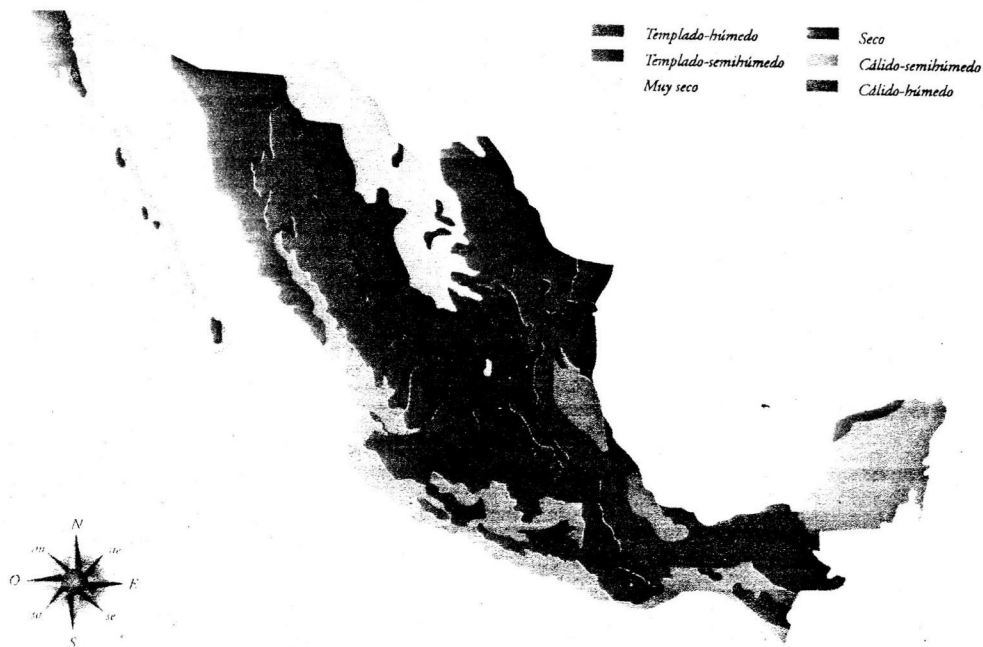


Figura 6 . Climas de México (INEGI, 1997).

2.1.9. Propagación

El Nim es propagado tanto vegetativa como sexualmente. Puede ser cultivado utilizando semilla, planta de semillero y acodos. Se puede plantar directamente en el terreno definitivo (National Academy Press, 1993).

2.1.9.1. Sexual

Las semillas deben de ser colectadas cuando alcanzan su madurez, lo que ocurre entre los meses de mayo y junio; la semilla pierde rápidamente su viabilidad y debe de sembrarse en las dos semanas siguientes a su recolección. Es posible mantener un poder germinativo hasta por doce semanas conservando la semilla en recipientes a 6 ó 7°C (Garza, 1987; CATIE, 1986). Las semillas una vez sembradas tardan tres semanas en germinar; para una correcta germinación se recomienda la escarificación de las semillas, con lo que se puede lograr una germinación de hasta el 47 % (Jacobson, 1989).

Se ha reportado que el porcentaje de germinación declina rápidamente durante el almacenamiento. Sin embargo, Jacobson (1989) citó al Doctor Tompsell que congeló semillas a las que les bajo su contenido de humedad a 8 % y así permanecieron viables por dos años.

Sin embargo, Ezumah (citado por Jacobson, 1989) concluyó que las semillas de Nim no requieren un período de postmaduración. Menciona que el secado al sol no tiene efectos adversos sobre la viabilidad y parece ser preferible al secado por aire seco para llevar la humedad de la semilla al 10 % o menos antes del almacenamiento. El almacenamiento en frío tiene efectos adversos sobre la germinación y longevidad de la

semilla; las semillas almacenadas de 20 a 28^o C retienen la viabilidad por 16 semanas, mientras que la viabilidad dura solamente 12 semanas en almacenamiento en frío, a temperaturas de 6 a 7° C.

La producción de semillas secas de un árbol de Nim es de cinco kg aproximadamente, alcanza su primera producción significativa a los tres o cuatro años de edad. Para el quinto año puede producir hasta 8 kg y en su etapa adulta mantiene un promedio de 10-15 kg anuales. No obstante, se han cuantificado producciones hasta de 30 kg/año (National Academy Press, 1993).

Un kilogramo de semillas de Nim contienen de 4, 400 a 6, 300 semillas, que no se pueden almacenar por más de tres meses; se recolectan de frutos maduros que se secan al sol (Geilfus, 1989).

Los árboles del Nim por lo general dan frutos una vez al año y son fáciles de cosechar, con solo sacudir el árbol. En la pulpa se encuentra un grano de 1.5 cm de largo, que contiene una o dos semillas de color marron (Figura 2d). La pulpa debe separarse lo más rápidamente posible (National Academy Press, 1993).

Ya que los granos secos también pueden enmoherse durante el almacenamiento, deben guardarse solo en recipientes cerrados, tales como sacos de yute o cestos. Por el contrario, los recipientes tales como sacos plásticos o cubetas no son adecuados (Benge, 1988).

Las semillas pueden sembrarse en el sitio si hay suficiente humedad y sombra provisional; por ejemplo, intercalado con cultivos, en bolsas o en canteros para pseudoestacas de 20 cm (National Academy Press, 1993).

La germinación se da aproximadamente a los 25 días; las plantas en bolsas pueden estar listas en tres meses; las pseudoestacas en seis meses a un año (Fagoonee, 1983; National Academy Press, 1993).

2.1.9.2. Asexual

2.1.9.2.1. Propagación vegetativa tradicional

En la propagación vegetativa, CATIE (1986) menciona la propagación por pseudoestacas, requiriendo periodos de 1 año para un enraizamiento adecuado. En Tanzania, estacas tratadas con AIB y ANA en una pasta de lanolina al 0.1 % presentaron un desarrollo radicular satisfactorio (Jacobson, 1989); sin embargo, en pruebas realizadas en México bajo invernadero por ECOSTA, encontraron que el enraizamiento es sumamente lento e ineficiente (menos del 5 %) al emplear Radix a 5,000 y 10,000 ppm.

2.1.9.2.2. Cultivo de tejidos

El uso de cultivo de tejidos para la producción de plantas del Nim para la reforestación tiene mucha demanda, debido a la relativa facilidad de producción de plántulas (Benge, 1988).

Schultz (1983) menciona que existen dos razones para aplicar la metodología de cultivo de tejidos en la investigación del Nim:

1. Para obtener generación de órganos y regeneración de plantas, debido a la rapidez de la pérdida de viabilidad de semillas de Nim.
2. Para estimular la investigación biotecnológica de los insecticidas contenidos en las plantas, incluyendo los triterpenoides y las azadirachtinas, las cuales son muy difíciles de sintetizar.

2.2. IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGIA

La biotecnología se define, desde el punto de vista industrial como el conjunto de tecnologías nuevas y tradicionales que involucran la aplicación de los procesos de los sistemas biológicos y/o las capacidades metabólicas de los seres vivos, en la producción de los bienes y servicios que repercuten en una mejoría de la calidad de vida del hombre, en sectores tales como la agricultura, el medio ambiente y las industrias farmacéutica, de los alimentos y química (Peña *et al.*, 1997).

Dentro del campo de la biotecnología vegetal, los avances recientes en el conocimiento de algunos de los genes, así como el funcionamiento bioquímico y fisiológico de las plantas, han abierto áreas relevantes aplicadas a la obtención de variedades vegetales con mayor adaptabilidad a su ambiente, productividad y resistencia a plagas o enfermedades (Robert y Loyola, 1985).

Se reconoce que la biotecnología aplicada a las plantas comprende dos grupos de técnicas que son de alguna forma interdependientes: el cultivo de tejidos y la ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante (ADNr). Estos dos grupos de técnicas tienen como fin, en su más amplia expresión, el mejoramiento de las plantas cultivadas (Peña *et al.*, 1997).

Como ejemplos, existe una creciente lista de especies que han sido transformadas por medio de la ingeniería genética, incorporándoles genes específicos de otros organismos para hacerlas más eficientes en características tales como la resistencia a hongos, bacterias, insectos y virus. También se han mejorado para resistir altas y bajas temperaturas, herbicidas, salinidad y otros factores que limitan su producción. Entre las especies transformadas destacan: arroz, trigo, papa, tomate, algodón, espárrago, alfalfa, zanahoria, calabaza, lenteja, lechuga, pera, chicharo, girasol, brásica, petunia, nochebuena, rosas y gerbera entre otros (Villalobos, 1995).

La producción agrícola, y consecuentemente la disponibilidad de alimentos en general, se espera que deberá incrementarse a través del uso directo de la biotecnología y el mejoramiento genético; sin embargo, la ruta que desemboca en el acceso de los agricultores a las plantas mejoradas por medio de la ingeniería genética se orienta casi exclusivamente hacia cultivos de alta importancia socioeconómica para los países en desarrollo, pero con poca importancia para los mercados internacionales; no aparecen en la lista de las prioridades de las compañías líderes en biotecnología, tal es el caso de la yuca, el camote, el plátano, y otras. Ante esta situación, la investigación orientada a mejorar éstas y otras especies por medio de la biotecnología, tendrá que hacerse en tales países. Una seria limitación es que el nivel de la investigación y uso de la biotecnología en los países en desarrollo, es generalmente muy inferior a los estándares necesarios y se requiere contar con una estrategia que gradualmente permita el acceso a las biotecnologías apropiadas (Villallobos, 1995).

2.2.1. CULTIVO DE TEJIDOS

El cultivo *in vitro* de células y órganos de vegetales es una de la ramas de la biotecnología de la que México y otros países del tercer mundo podrían obtener grandes beneficios a corto y a largo plazo. En México el empleo de estas técnicas en aplicaciones agrícolas y forestales es muy importante en los siguientes aspectos (Robert y Loyola, 1985):

1. Propagación masiva de especies de importancia económica o social.
2. Obtención de compuestos de importancia industrial a través de cultivos celulares.
3. Embriogénesis somática y estudios de diferenciación celular.
4. La preservación de germoplasma agronómico y forestal.
5. El mejoramiento genético.

Estos aspectos podrían ayudar a la solución de muchos problemas, entre los que se pueden mencionar: la disminución de la variabilidad genética tanto de especies cultivadas como forestales; el desplazamiento de variedades tradicionales debido a la introducción de variedades de alta productividad, la destrucción de los ecosistemas por sobreexplotación y la alta contaminación producida por agentes químicos. Como consecuencia de lo anteriormente mencionado, en la actualidad es imprescindible la preservación de especies en peligro de extinción, lograr una alta producción en poco espacio y en el menor tiempo posible, la producción de especies resistentes y de alta calidad (Robert y Loyola, 1985).

La generación de gran cantidad de planta, a través de ciclos relativamente cortos, bajo condiciones controladas y asépticas, con características superiores, como por ejemplo: alta producción, resistencia a plagas y condiciones ambientales adversas o bien, la producción de alguna sustancia específica, son algunos de los objetivos que se

persiguen al trabajar con esta técnica, también conocida como micropropagación o propagación clonal (Hurtado y Merino, 1988).

2.2.1.1. Etapas del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos comprende básicamente de cuatro etapas (Figura 7) (Hurtado y Merino, 1988; Thorpe, 1994):

a) Obtención del explante libre de patógenos

Explante o inóculo: se le conoce a la planta o parte de la planta o semilla que se va a utilizar para la investigación. Este explante debe pasar por una serie de técnicas de desinfección (agua, cloro, alcohol, cloruro de mercurio etc.), ya que el explante al estar en contacto con el medio ambiente está contaminado de microorganismos patógenos como son; bacterias, hongos, virus, etc. que tenemos que eliminar para poder aplicar las siguientes etapas de la propagación *in vitro*.

b) Multiplicación

Una vez establecido el cultivo en condiciones asépticas, se evalúa el efecto de los diferentes componentes del medio de cultivo, así como de las condiciones de incubación (fotoperiodo, temperatura, humedad , etc.). Uno de los factores que mayor influencia tiene sobre el tipo de respuesta de las plantas en cultivo, son los reguladores de crecimiento vegetal, también conocidos como fitohormonas.

c) Enraizamiento

Al igual que en la etapa de multiplicación es importante evaluar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y encontrar que medio de cultivo es el que nos da mejor calidad de raíces. ya que dependiendo de la calidad de las raíces se va a obtener un mejor desarrollo de la planta.

d) Aclimatación

Finalmente es necesario que el desarrollo de todos los procesos anteriormente descritos, se vean apoyados mediante la implementación de tecnologías que permitan la transferencia de las plantas crecidas bajo condiciones de medio de cultivo *in vitro* hacia suelo; esto se realiza en invernadero bajo sistemas de nebulización, ventiladores, paredes húmedas, temperaturas y riego por goteo. Las condiciones a las que se aclimatarán las plantas son a las que serán expuestas en campo.

2.2.1.2 Reguladores de crecimiento vegetal

El término regulador del crecimiento vegetal define a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Devlin,1980).

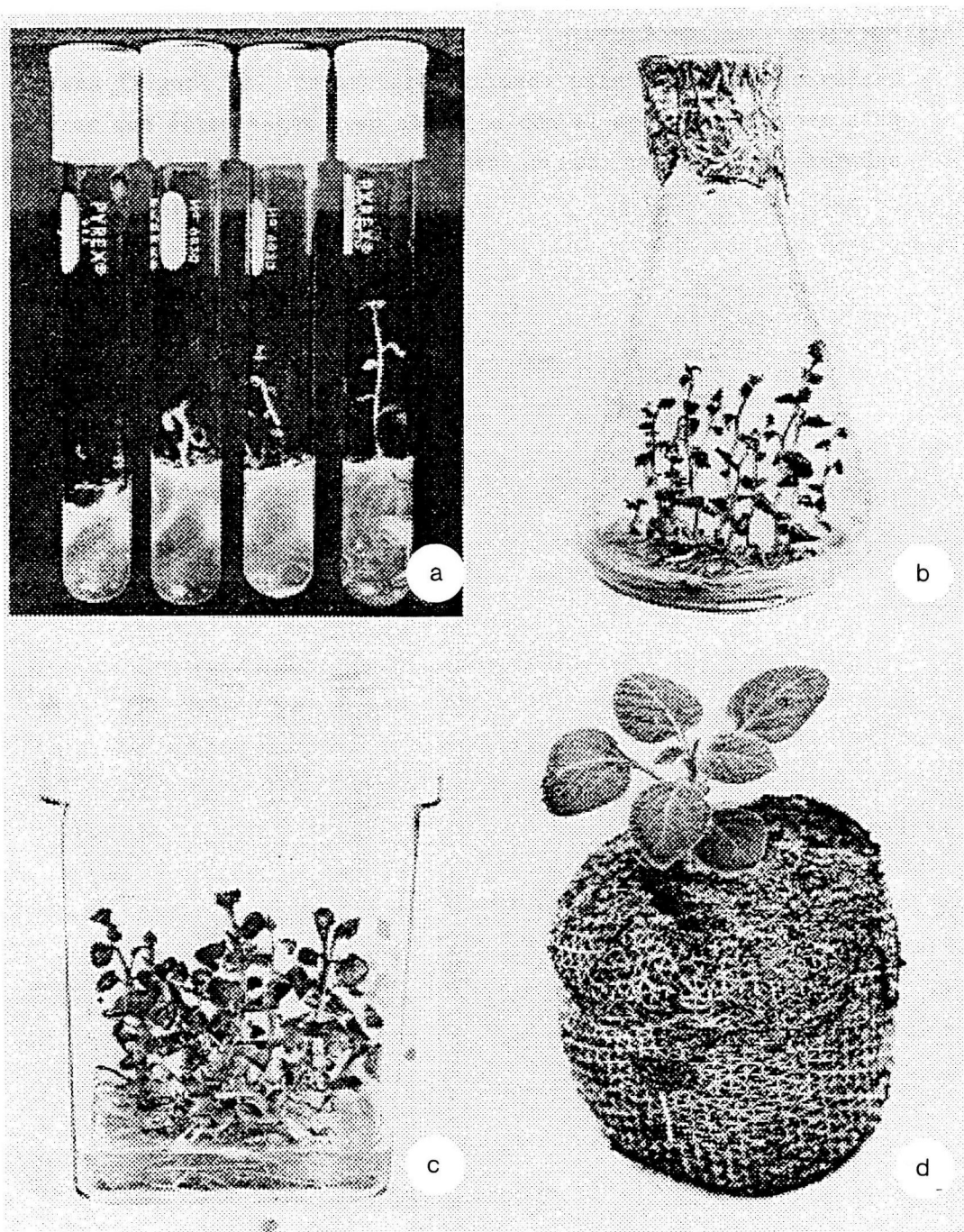


Figura 7. Etapas de la propagación *in vitro* (Espinoza *et al.*, 1986).

- (a) Obtención del explante (esquejes) libre de patógenos
- (b) Multiplicación
- (c) Enraizamiento
- (d) Aclimatación de plántulas derivadas de material *in vitro*

El crecimiento de las plantas es un proceso dinámico y complejo que está rigurosamente controlado. Los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en el control del crecimiento vegetal, no únicamente dentro de las plantas como un universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula, puesto que actualmente se reconoce que la mayor parte de la actividad fisiológica de las plantas está medida por estos compuestos, los cuales son sustancias mensajeras, que la mayoría de las veces son activas en concentraciones muy pequeñas. Aunque los lugares de síntesis y acción de los reguladores de crecimiento generalmente son distintos, en algunos casos son activos en el mismo sitio de formación (Hess, 1980).

Actualmente se reconocen 5 tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, clasificados en tres grupos principalmente (Leopold y Kriedemann, 1975):

1. Promotores de crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas
2. Inhibidores de crecimiento: ácido abscísico
3. Etileno

- Auxina

El nombre de auxina (del griego *auxein*, crecer) fue dado a la sustancia reguladora del crecimiento producida en el ápice del coleótilo de avena. Sin embargo, en la actualidad se sabe que las auxinas están universalmente presentes en las plantas superiores (Wareing y Phillips, 1973, citado por Hurtado y Merino, 1988).

De forma natural, las concentraciones mas altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento (ápices del coleótilo, yemas y ápices de crecimiento de las hojas); sin embargo, también se encuentran auxinas ampliamente distribuidas por la planta, sin duda provenientes de las regiones meristemáticas (Devlin, 1980).

En general, en las plantas los reguladores de crecimiento se desplazan desde su lugar de síntesis con cierta dirección y determinada velocidad. Así, la traslocación de las auxinas desde sus puntos principales de síntesis que son los meristemos apicales, básicamente es hacia abajo (basipétalo); esta polaridad de transporte se mantiene aún si el tallo es cortado y cambiado de dirección (Bidwell, 1979). Se dice que el transporte básicamente es basipétalo, debido a que se desconoce el transporte auxínico acropétalo; la conducción de las auxinas en los tejidos vegetales tienen lugar a velocidades suficientemente altas como para que el proceso de difusión sea su principal método de transporte. Así mismo, las auxinas pueden circular en contra de un gradiente de concentración, por lo que se ha pensado que este transporte puede ser regulado hasta cierto punto por el metabolismo de la célula, es decir, que en el interviene la energía metabólica, por lo que la circulación de la auxina en la planta tiene lugar de dos modos distintos: uno que depende de la energía metabólica y el otro que se realiza a favor de la difusión simple, siendo éste último el que se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas (Devlin, 1980).

Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de las proporciones del crecimiento diferencial y la regulación de fenómenos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula o estructura vegetal. Hasta la fecha se ha ido acumulando una enorme cantidad de datos sobre los efectos auxínicos en las plantas, encontrándose que éstos son muchos y muy variados siendo los principales que afectan el alargamiento y división celular, la formación de brotes, raíces, tejido calloso, respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical y embriogénesis (Bidwell, 1979).

- Citocininas

El nombre genérico de las citocininas es empleado para aquellas sustancias químicas que puedan estimular principalmente la división celular o citocinesis. Para que suceda la división celular debe de presentarse una cadena de hechos (síntesis de ADN, mitosis y citocinesis) en los cuales la presencia de las citocininas es necesaria para la mitosis; además, si la citocinina está presente en concentraciones elevadas puede volverse limitante, por lo menos en uno de los tres etapas necesarias para la división celular (Devlin, 1980).

En general, las citocininas están ampliamente difundidas en la plantas no solamente ligadas al ARN sino también en forma libre, aunque hasta la fecha es muy escasa la información sobre la cantidad de citocininas que se presentan normalmente en las plantas, y de la dinámica de éstas durante el crecimiento, desarrollo, senescencia y muerte (Hurtado y Merino, 1988).

La inducción *in vitro* de órganos por las citocininas está encaminado a la formación de yemas, las cuales son obtenidas en base a una proporción citocinínica alta con respecto a las auxinas. Como sabemos, el papel de las citocininas en el crecimiento de las raíces es extremadamente limitado. El tratamiento de secciones de raíz en cultivo, con una citocinina combinada con una auxina da como resultado una estimulación de la división celular. Lo anterior, sin embargo, normalmente no conduce a un incremento en la elongación de la raíz pero sí a una estimulación de la división de las células que están destinadas a diferenciarse en tejidos vasculares (Hurtado y Merino, 1988).

- Giberelinas

La primera giberelina purificada y estructuralmente identificada fue el ácido giberélico (GA_3), posteriormente se han aislado todas las demás, tanto de plantas superiores como de hongos, estando más ampliamente difundidas en la naturaleza la GA_1 , GA_3 y GA_4 . Las giberelinas han sido detectadas en gran variedad de partes vegetales por lo que parecen estar sintetizadas en muchas partes de las plantas, pero más específicamente en áreas de crecimiento activo como embriones, tejidos en desarrollo o meristemos. La cantidad de GA presente en la planta es mucho mayor en la

proximidad del ápice del tallo, lo que indica que las giberelinas son suministradas principalmente por el ápice más que por otra estructura de la planta (Devlin, 1980). Las giberelinas presentan un aspecto de actividad biológica muy variado, con un papel regulatorio principal en el crecimiento, pues pueden producir una elongación extraordinaria en enanos genéticos, fenómeno que puede ser atribuible a la estimulación de la división y al alargamiento celular. Además tienen muchos efectos regulatorios en el desarrollo vegetal debido a que son las responsables de la hidrólisis de las reservas de almidón en el endospermo durante la germinación de la semilla. Con un tratamiento de GA generalmente se induce la maduración de los frutos, la senescencia y dominancia de las yemas (Bidwell, 1979).

2.2.1.3. Totipotencia celular

Haberlandt propuso en 1902 que todas las células vegetales aún las más maduras y diferenciadas, tenían la capacidad de formar plantas completas (Bhojwani y Razdan, 1983; Litz y Jarret, 1987) y predijo que esa habilidad se podría demostrar en cultivos de células. Esta teoría fue confirmada por Reinert en 1958 al introducir embriones somáticos y regenerarse plantas *in vitro* a partir de callos derivados de ápices radiculares de zanahoria (Litz y Jarret, 1987).

Para que una célula exprese su totipotencia, primeramente sufre una dediferenciación (reversión hacia el estado meristemático y formación de callo), seguida de una rediferenciación (habilidad de los componentes celulares de formar órganos o plantas completas); capacidad que se mantiene mientras las células dispongan de un sistema membranal intacto y un núcleo viable (Bhojwani y Razdan, 1983).

- Formación de callo

Un callo es una masa amorfa de células parenquimatosas acomodadas en forma suelta y que tienen su origen en células que proliferan del tejido parental (Dodds y Roberts, 1984). El desarrollo de callo a partir de un fragmento de tejido vegetal se divide en tres etapas: inducción, división o proliferación y diferenciación (Aitchison *et al.*, 1977).

La inducción del callo ocurre cuando el inóculo se pone en contacto con un medio nutritivo capaz de estimular y mantener la división celular. Durante esta fase, el metabolismo es activo, aunque el tamaño de las células permanece constante; en cambio, la división es una fase de síntesis activa y se caracteriza por una disminución en el tamaño celular, etapa en que ocurre la dediferenciación (Aichinson *et al.*, 1977).

Desde un punto de vista funcional, la característica más importante de un callo es que éste es capaz de desarrollar brotes, raíces o embriones, los cuales pueden dar lugar a plantas normales (Dodds y Roberts, 1984). Por consiguiente, la regeneración de plantas puede ocurrir vía organogénesis o por embriogénesis somática (Bhojwani y Razdan, 1983).

Para estimular el desarrollo de callo se requiere la adición de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, principalmente auxinas (Yeoman y Macleod, 1977). La auxina predominante ha sido el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Wann, 1988); aunque se tienen ejemplos en los que el proceso se ha dado bajo un régimen de citocininas (Druart, 1980; Yasuda *et al.*, 1985). Una relación auxina-citocinina de 10 a 100 favorecen la formación de yemas (Dodds y Roberts, 1984).

- Pérdida de la capacidad morfogénica.

A fin de explicar la pérdida de la capacidad organogénica o embriogénica de un callo a través de los subcultivos repetidos, se ha propuesto tres hipótesis:

Hipótesis genética:

Los cultivos prolongados causan aberraciones cromosómicas, mutaciones y cambios en los niveles de ploidía, responsables de la disminución o pérdida del potencial morfogénico del inóculo y cuyo efecto es irreversible (Sunderland, 1977; Bhojwani y Razdan, 1983).

Hipótesis fisiológica:

En algunos casos, la disminución del potencial morfogénico puede deberse a: 1) alteración en el balance hormonal dentro de las células o tejidos, o 2) sensibilidad de éstos a los reguladores del crecimiento exógenos. En tales situaciones, las células dejan de diferenciarse, pero no necesariamente pierden su totipotencia, la cual puede ser restaurada modificando los tratamientos exógenos (Bhojwani y Razdan, 1983).

Hipótesis de competitividad:

Durante la disminución o pérdida de la totipotencia ocurren dos procesos: 1) las células en cultivo se hacen más sensibles a la acción inhibitoria del 2,4-D; 2) con el paso del tiempo y debido a la inestabilidad citológica de las células, aparecen nuevas líneas carentes de la capacidad regenerativa (Smith y Steet, 1974).

De acuerdo a esta última teoría, las células no embriogénicas aumentan en cada subcultivo e inhiben el desarrollo de las células embriogénicas, las cuales disminuyen gradualmente. Una vez que éstas desaparecen por completo, la regeneración es imposible; pero si aún persisten unas cuantas, basta alterar la composición del medio de cultivo para que las células totipotentes proliferen (Smith y Steet, 1974; Bhojwani y Razdan, 1983).

2.2.1.4. Organogénesis

2.2.1.4.1. Fundamentos

Torrey en 1966 anticipó la hipótesis de que la organogénesis a partir de callo se inicia con la formación de meristemoides (grupos de células meristemáticas), capaces de responder a factores dentro del tejido y de producir un primordio (Dodds y Roberts, 1984). Según Christianson y Warnick (1986), el proceso organogénico se divide en tres fases:

1. Adquisición de competencia para la inducción
2. Inducción *per se*
3. 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 y localizado así la zona. 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 de meristemoides organizados. Esto se ha observado en *Quercus sp* (Seckinger *et al.*, 1979), en manzano y en *Rubus sp* (Swatz *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; sorprendentemente, durante la inducción de callo no ocurren cambios graduales en este material genético.

2.2.1.4.2. Fuentes de inóculo

La regeneración de plantas vía organogénesis se ha efectuado principalmente utilizando:

1. secciones de tallo
2. Ápices
3. Meristemos
4. Eje embrionario
5. Tejido nucelar
6. Callo

7. Pecíolos

8. Cotiledones

2.2.1.4.3. Factores que regulan la respuesta organogénica

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, 1977; Thorpe, 1978; Vidalie, 1984).

Según Skoog y Miller (Bhojwani y Razna, 1983), la diferenciación depende de la interacción cuantitativa entre auxinas y citocininas: predominancia de auxinas estimula formación de raíces; predominancia de citocininas estimula la brotación.

Algunas posibles razones por las que algunas veces las proporciones de citocininas-auxinas fallan en la respuesta organogénica son (Thorpe, 1978):

1. Se requiere otra hormona
2. Los reguladores del crecimiento exógenos no logran contrarrestar los efectos inhibitorios de aquellos que se acumulan endógenamente
3. 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). Por otro lado, 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, niveles de 1% de agar formaron flores; concentraciones menores causaron 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).

Tanto la intensidad como la calidad de la luz afectan de manera diferente. Generalmente, la luz azul promueve yemas vegetativas; la luz roja estimula el enraizamiento (Bhojwani y Razdan, 1983).

Reisch y Bingham (1980) postulan que la capacidad morfogénica de los tejidos cultivados *in vitro* está bajo control genético.

2.2.1.5. Embriogénesis somática

2.2.1.5.1. Fundamentos

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 partes 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, etapa de corazón y etapa de torpedo (Kohlenbach, 1978).

La embriogénesis somática presenta dos patrones generales de desarrollo:

1. Embriogénesis directa

Existen células preembrionicamente determinadas (CPED) que reinician su desarrollo una vez que las condiciones ambientales son favorables, sin pasar por la formación de callo.

2. 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 sistemas 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 redeterminación respectiva de las células previamente quiescentes (Sharp *et al.*, 1980; Litz y Jarret, 1987; Wann, 1988). Las células proembrionicas 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 sistema CPED, el papel de ésta es de clonar las células preembrionicamente determinadas; en sistemas ICED, es la sustancia mitogénica que da como resultado la redeterminación (Wann, 1988). La auxina más empleada ha sido 2,4-D, 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 (Brown, 1986).

2.2.1.5.2. Factores que afectan la regeneración vía embriogénesis

- 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 cuatro a seis por ciento. Para inducir embriogénesis la auxina debe retirarse y la sacarosa reducirse de dos a tres por ciento. 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 de callo (Nitsch, citado por Litz y Jarret, 1987); situación particularmente válida cuando se hace 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 a plántulas (Bhojwani y Razdan, 1983).

2.2.1.6 Propagación *in vitro* del árbol de Nim

Hay numerosas aplicaciones potenciales de las técnicas de propagación *in vitro* para el mejoramiento genético del Nim y para su propagación en gran escala, así como para obtener semilla mejorada con alto contenido de aceite.

A nivel mundial se han desarrollado varios trabajos que han tenido éxito en la propagación de esta especie usando diferentes explantes, como son tallo, yemas axilares, cotiledones e inflorescencias (Cuadro 5). Se observa que de los trabajos realizados de 1972 a 1996 en propagación *in vitro* del Nim, se obtuvo una formación de callo en la mayoría de los explantes utilizados. En estos trabajos se ha utilizado el

medio de cultivo MS, con diferentes hormonas, como son 2,4-D, AIA, IBA, ANA, BA, KN y 2-IP, Los cuales se han evaluado en forma individual y combinada, en concentraciones que van de 0.05 a 2 mg/l En todos los casos la diferenciación, la brotación de raíz y meristemas fue por vía del callo (Sanyal *et al.*, 1983).

El medio básico fue el MS complementado con 50 g/l de sacarosa y fitohormonas BA y ANA (0.1, 0.25 y 0.5 mg/l). Individualmente y combinados se utilizaron ANA (0.1-1.0 mg/l) y KN o BA (0.5 mg/l) usando planta regenerada vía callo. El medio con auxinas (AIA, ANA, IBA, 2,4-D) y citocininas (KN y BA) también fueron evaluadas cada una por separado (Sanyal *et al.*, 1983).

Al utilizar la combinación AIA y BA (0.5 mg/l cada uno) se produjeron vigorosos brotes en número elevado: adicionando sulfato adenina (10 mg/l) se obtuvieron mejores resultados con un mejor desarrollo en brotación de hojas. Sin embargo, se obtuvo mayor producción de brotes usando dosis de Beta-sitosterol para el cultivo de callo y además se encontró en estudios de regeneración una relación entre las fitohormonas (concentraciones) y la diferenciación de tejidos del Nim (Sanyal *et al.*, 1983).

En otro estudio, Drew (1993) obtuvo alrededor de 5 a 10 brotes por explante, usando medio básico MS, suplementado con citocininas. Por su parte, Muralidharan y Mascarenhas (1989) observaron que al utilizar cotiledones como explante inicial se indujo a callo y posteriormente a estructuras bipolares. El cotiledón se puso en un medio de Gamborg (1985) y complementado con BA, KN y 2iP (0.5 - 5.0 mg/l) y 20 g/l de sacarosa. El cultivo en suspensión se incubó a una temperatura de 27° C.

La primera conclusión que evidencia la inducción a embriogénesis somática en el Nim fue demostrado por Shrikhande *et al.* (1993) en la India.

Joarder *et al.* (1993) obtuvieron regeneración de plantas vía embriogénesis somática mediante tejido nucelar de la semilla madura e inmadura y cotiledones inmaduros. El medio de cultivo inicial fue MS y LS (Linsmaier y Skoog, 1965) complementándose con diferentes concentraciones de citocininas y auxinas por separado y en combinación. Se obtuvo la mejor respuesta en términos de inducción y producción de a los 40 días de la siembra del explante en el medio MS con 2.0 mg/l de BA y 0.2 mg/l de ANA.

La embriogénesis somática del Nim se reportó por Joshi y Thengane (1993) y Joarder *et al.* (1993). De acuerdo a los primeros, el tipo de auxinas es fundamental para que ocurra la embriogénesis; con 2,4-D en combinación con BA y utilizando explantes de cotiledones se induce directamente a la embriogénesis somática; sin embargo, usando AIA se produce callo e inducción a embriogénesis. Los segundos indican que el medio básico es un factor decisivo para la producción de callo, señalando que el medio LS es el mas efectivo para producir embriogénesis somática vía callo.

Cuadro 5. Estudios de cultivo *in vitro* con *Azadirachta indica*.

Explant	Respuesta	Resultados	Referencia
Embriones maduros	callo	organogénesis	Rangaswamy y Promila, 1972 ¹ .
Corteza de tallo	callo	-	Sanyal <i>et al.</i> , 1981 ¹
Tallo, hoja y yemas axilares	callo	organogénesis	Jaiswal y Narayan, 1983 ¹
Cotiledones	callo	organogénesis	Sanyal <i>et al.</i> , 1983 ¹
Hojas	callo	organogénesis	Schulz, 1984 ¹
Hojas	callo	organogénesis	Nareyan y Jaiswal, 1985 ¹
Corteza de tallo, hoja	callo	organogénesis	Sanyal y Datta, 1986
Cotiledones	callo	-	Sanyal <i>et al.</i> , 1988 ¹
Cotiledones	estructuras bipolares	morfogénesis	Muralidharan y Mascarenhas, 1989 ¹
Hojas	callo	organogénesis	Ramesh y Padhya, 1990
Hojas	callo	organogénesis	Gautam <i>et al.</i> , 1991
Embriones inmaduros	germinación	plantas	Thigarajan y Murali, 1993 ¹
Cotiledones	callo	morfogénesis	Nirmala Kumari <i>et al.</i> , 1993 ¹
Nucela y cotiledones	callo	embriogénesis	Joarder <i>et al.</i> , 1993 ¹
Yemas axilares	raíces	plantas	Josshi y Thangane, 1993 ¹
Yemas axilares	raíces	plantas	Drew, 1993 ¹
Tallo	callo	organogénesis	Mohamed, 1994
Tallo	callo	organogénesis	Sharry y Abedini, 1995
Yemas apicales	callo	plantas	Rascón <i>et al.</i> , 1996

(1) Tomado de Shubhada *et al.*, 1995.

Muralidharan y Mascarenhas (1989) observaron estructuras bipolares en cámaras de incubación a 27° C en un cultivo en suspensión usando mesas rotatorias. Por otro lado Shrikhande *et al.* (1993) estudiaron el efecto de IAA (0.5 a 5.0 mg/l) solo y en combinación con BA y KN (0.2 a 3.0 mg/l) en inducción de callo. De acuerdo a estos autores, todas las combinaciones con el AIA y KN se induce a callo y a rizogénesis y la combinación AIA y BA induce a la compactación nodular de callo.

La inducción a la embriogénesis somática se ve afectada por la reducción de nitrógeno (Rangaswamy, 1986). Diferentes fuentes de nutrientes provocan la reducción de nitrógeno como son: leche de coco, caseína hidrolizada, mezcla de aminoácidos o aminoácidos solos (L- glutamina y L-alanina).

Shrikhande *et al.* (1993) observaron la inducción de embriones con diferentes estructuras bipolares en el medio de MS con AIA (0.5 mg/l) , BA (1.0 mg/l) y 50 g/l de sacarosa. Otras concentraciones de BA y AIA no originaron una respuesta adecuada. El fotoperiodo 16/8 horas es necesario para la inducción de callo.

De acuerdo a Muralidharan y Mascarenhas (1989), las estructuras bipolares se inducen en incubación de 2 a 3 semanas ya sea en luz u oscuridad. Joarder *et al.* (1993) observaron a mas de 500 embriones en cultivo de tejido nucelar en presencia de bajas concentraciones (menos de 0.1 mg/l) de BA. En cotiledones inmaduros, el porcentaje de inducción a embriogénesis se ve aumentado en un medio MS complementado con 1.0 mg/l de ANA y 0.1 mg/l de GA₃.

2.2.2. ADN RECOMBINANTE

En la actualidad se han creado cereales con genes brillantes que resplandecen en la oscuridad, tabaco con genes de rata que segregan metales duros y salmón con genes que pueden tolerar bajas temperaturas oceánicas que matarían a cualquier pez. Estos experimentos dan una idea de la diferencia entre la moderna manipulación genética y los métodos más tradicionales de reproducción selectiva que el hombre ha utilizado en el pasado para modificar plantas, animales y otros organismos (Villalobos, 1995).

Con la reproducción selectiva, los humanos pueden cruzar un cultivo con otro, digamos patatas con otra variedad de patatas y, en algunos casos, con patatas silvestres similares (Villalobos, 1995). Pero los mejoradores tradicionales no pueden añadir genes vírales, de insectos o de animales a las patatas, los cuales han sido añadidos ya a las plantas por medio del "ADN recombinante" y otras técnicas parecidas de manipulación genética (Goldburg, 1995).

Los científicos pueden ahora, por lo menos en teoría, tomar cualquier rasgo genético codificado de un organismo y añadirlo a cualquier otro por muy diferente que sea. Al eliminar los límites tradicionales de la reproducción con cruce, las técnicas de ingeniería genética parecen una bendición para los científicos que se dedican a modificar organismos para ayudar al hombre. Por otro lado, sin embargo, la manipulación genética también suscita cuestiones éticas, sociales y medio ambientales (Goldburg, 1995).

La preocupación por la manipulación genética empezó a darse a principios de los años setenta poco después de que científicos de California descubrieran cómo elaborar moléculas de ADN recombinante (RADN) utilizando "enzimas de restricción " para cortar y moldear el ADN (Goldburg, 1995).

Algunos científicos preocupados por la liberación deliberada de organismos manipulados genéticamente han advertido sobre las consecuencias de la introducción de especies "exóticas"; es decir, las transferidas intencionalmente o no, de una zona geográfica a otra. Muchas de esas introducciones de especies exóticas, como en los cultivos agrícolas y la ganadería, han resultado muy beneficiosas (Goldburg, 1995; Villalobos, 1995).

La introducción del estornino europeo en los Estados Unidos y del sapo en Australia ha dado resultados parecidos y ambos se han convertido en serias plagas. Estas experiencias demuestran con claridad que la introducción de organismos efectuada con poca previsión ecológica puede acarrear consecuencias desastrosas. Hay que reconocer, sin embargo, que introducir especies exóticas no es lo mismo que hacerlo con organismos transgénicos. La introducción de un organismo en un nuevo ambiente es distinto que introducir unos pocos genes en un organismo. Suele argumentarse que cuando entra un nuevo organismo tiende a convertirse en plaga porque faltan sus depredadores naturales nativos, patógenos y parásitos. Este argumento no debería servir para un organismo manipulado genéticamente reintroducido en el mismo ambiente donde vive su organismo homólogo no manipulado, a menos que el organismo sea manipulado para resistir a sus enemigos naturales (Goldburg, 1995).

Finalmente, los microorganismos pueden transferir sus genes entre diferentes especies, géneros e incluso reinos de microorganismos; aunque la extensión de esta transferencia de genes está mucho más documentada en el laboratorio que en la naturaleza, los genes manipulados que ofrecen una serie de ventajas selectivas pueden en teoría extenderse por todo el mundo microbial, haciendo difícil la evaluación del impacto a largo plazo de un microorganismo genéticamente manipulado (Goldburg, 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

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

3.2. Materiales

3.2.1. Semillas

Las semillas utilizadas para la obtención de material vegetativo del Nim se importaron del Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales de León, Nicaragua. Para su germinación se emplearon 3 tipos de sustratos (tierra de monte, arena y tezontle), en el vivero del Departamento de Bosques de la U.A.CH., ubicado a los 19° 29' Latitud Norte y 98° 53' Longitud Oeste a una altura de 2250 m sobre el nivel del mar. El clima en el área se clasifica como un Cb (Wo) templado con lluvias en verano y una temperatura media anual de 15.2 °C con una precipitación de 636.5 mm anuales (García, 1987).

3.2.2. Explantes o fuentes de explantes

Después de 12 semanas de haber germinado las semillas, de las plantas obtenidas se tomaron tanto los ápices como secciones de tallos con yemas axilares para la obtención de explantes y poder establecer la primera etapa del cultivo de tejidos.

3.2.3. Medio de cultivo

Se empleó como medio básico las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 100% (Anexo) complementados con tiamina (0.4 mg L⁻¹), mio - inositol (100 mg L⁻¹), sacarosa al 3% (azúcar comercial), agar-agar al 0.7 % y se ajustó a un pH de 5.7 ± 1. Las sales se agregaron a un matraz Erlenmeyer que contenía agua des-ionizada en constante agitación incorporandose los compuestos previamente pesados conforme al orden del Anexo.

El medio de cultivo se vació en tubos de ensaye de 25 x 150 mm colocando 15 ml en cada tubo. Los tubos se taparon y se colocaron en gradillas para su esterilización la cual se realizó por 20 minutos en una autoclave a una temperatura de 121 °C y 15 lb/pulg² de presión. Posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.

3.2.4. Productos empleados para la desinfección de explantes

Producto	Concentración	Tiempo (min)
Hipoclorito de sodio	10 %	15
Detergente	4 g /l	10
Etanol al 95%	10%	2
Agua des-ionizada y destilada		1
Ácido ascórbico	100 mg/l	30
Ácido cítrico	150 mg/l	30
Tween 20	3 gotas /l	30

3.3. Métodos

3.3.1. Ensayo de germinación en Vivero

Se utilizaron 100 semillas para cada sustrato con 5 repeticiones (Cuadro 6) para conocer la capacidad germinativa de la semilla y a su vez conocer que tipo de sustrato es el mejor para propagar el Nim. Con este propósito, se utilizaron charolas de 70 x 50 cm con una altura de 9 cm con los sustratos previamente esterilizados. No se eliminó la cubierta de la semilla y estas fueron sembradas a una profundidad de 4 cm. En cada tipo de sustrato se evaluó el número de semillas a los 50 días, con lo cual se calculó el porcentaje de germinación; también se determinó el porcentaje de semillas muertas o vanas. Después de la germinación, se realizó trasplante anticipado (Pimentel, 1996) en bolsa forestal para llevar las plantas a las áreas de crecimiento.

Cuadro 6. Sustratos utilizados para la germinación de semillas.

Sustrato	Proporción (%)	Cantidad de semillas
1.- Arena	100	500
2.-Tierra de monte	100	500
3.-Tezontle	100	500

Las variables a evaluar en esta etapa son:

- 1.- Número de semillas germinadas por tratamiento.
- 2.- % de semillas muertas o vanas.

El diseño experimental empleado durante el ensayo de germinación fue completamente al azar con 3 tratamientos y 5 repeticiones cada uno, para un total de 15 unidades experimentales. Este diseño se caracteriza porque no es necesario establecer bloques ya que las unidades experimentales son tan homogéneas que no se descubren gradientes de variabilidad.

Como en la germinación se tienen valores de cero y debido a que los datos no se distribuyen normalmente se utilizó la transformación de la raíz cuadrada siguiente:

$$\sqrt{Y + \frac{1}{2}}$$

donde:

Y= Variable de estudio.

$\frac{1}{2}$ = Constante de ajuste por la existencia de datos con valor a cero.

El modelo empleado en el análisis de varianza fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Variable respuesta observada.

μ = Efecto general de la media.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

ξ_{ij} = Error experimental correspondiente al i-ésimo tratamiento y a la j-ésima repetición.

Para la comparación de medias entre tratamientos (sustratos) se empleó la prueba de Tukey con una significancia de $p = 0.05$ para cada una de las variables.

3.3.2. Etapa I : Establecimiento del cultivo aséptico

3.3.2.1. Desinfección del material vegetativo en laboratorio

De las semillas que germinaron en el vivero se extrajeron los ápices y segmentos de tallo. Dicho material vegetativo se desinfectó introduciéndolo en una solución con detergente comercial para poder trasladarlo al laboratorio e iniciar su desinfestación. En el laboratorio la desinfestación se realizó lavando y cepillando con detergente varias veces los ápices y secciones de tallo con yemas axilares y pecíolos de hoja, y colocándose en agitación en un recipiente con gotas de tween-20 durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron los inóculos con agua esterilizada y se mantuvieron en solución antioxidante (ácido ascórbico 100 mg L^{-1} y ácido cítrico 150 mg L^{-1}) en un vaso de precipitado hasta el momento de la siembra.

Antes de la siembra, el material de laboratorio (cajas de petri, pinzas, bisturí y cánulas) se esterilizaron en una autoclave durante 40 minutos a una temperatura de 121°C y 1 kg/cm^2 de presión. A 10 minutos antes de la siembra la cámara de flujo laminar se limpio con alcohol al 70% y se puso a funcionar. Todo el material utilizado en la desinfestación y siembra del material vegetativo fue asperjado con alcohol al 70% fuera de la cámara de siembra.

3.3.2.2. Siembra *in vitro*

Se cortaron segmentos de tallo de 1.5 a 2 cm de longitud con 2 yemas axilares cada uno en las cajas de Petri, sembrando cada segmento en tubos de ensaye de 25×150 mm con 15 ml de medio de cultivo. Se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con parafilm.

Durante el desarrollo de la etapa I de la investigación, el material *in vitro* se mantuvo en el cuarto de incubación del laboratorio de cultivo de tejidos bajo un ambiente controlado. La iluminación fue proporcionada por lámparas fluorescentes DURO-TEST (LabLine) de 75 W, con un termoperíodo promedio de 26°C durante el día y de 22 a 24°C durante la noche, sometiendo los explantes a un fotoperíodo de 16 horas luz (con una intensidad luminosa de 2700-3200 lux) y 8 de oscuridad.

El diseño experimental utilizado fue un arreglo factorial 3 x 3 (9 tratamientos) en un diseño resultado de la combinación de tres niveles de desinfección con hipoclorito de sodio al 15% y con alcohol al 10%, completamente al azar con 20 repeticiones, para un total de 180 unidades experimentales (Cuadro 7 y 8). El período de incubación fue de 45 días tomándose datos semanales. El análisis estadístico se realizó con los datos obtenidos a los 45 días de desarrollo.

Cuadro 7. Factores y niveles de estudio de la Etapa I del experimento.

Factores	Niveles
	tiempo en minutos
hipoclorito de sodio 15%	10, 15 y 20
alcohol 10%	1, 2 y 3

Cuadro 8. Tratamientos para determinar el mejor sistema de desinfección del explante.

Tratamiento	Hipoclorito de sodio (15%) tiempo en min	Alcohol (10%) tiempo en min	Repetición
1	10	1	20
2	10	2	20
3	10	3	20
4	15	1	20
5	15	2	20
6	15	3	20
7	20	1	20
8	20	2	20
9	20	3	20

La variable a evaluar fue la presencia de contaminación por hongos o bacterias. Se realizó un análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis con un diseño completamente al azar. Se utilizó la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS con una significancia de $p = 0.05$ para la comparación de medias).

El modelo empleado en el análisis estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + A_j + HA_{ij} + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Variable respuesta del uso del i-ésimo nivel de exposición de hipoclorito de sodio el j-ésimo nivel de exposición de alcohol, en la k-ésima repetición.

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

H_i = Efecto del i-ésimo nivel de hipoclorito de sodio.

A_j = Efecto del j-ésimo nivel de alcohol.

HA_{ij} = Efecto de interacción entre el i-ésimo nivel de hipoclorito de sodio y el j-ésimo nivel de alcohol.

ξ_{ijk} = Error experimental.

3.3.3. Etapa II : Multiplicación de brotes

El material resultante de los bioensayos de la etapa I para obtener los explantes libres de patógenos, se trasplantó a medios de cultivo para promover multiplicación de los propágulos. Se utilizaron segmentos de tallos de 1 a 1.5 cm de longitud con dos o tres yemas axilares.

Durante el desarrollo de esta etapa de la investigación el material *in vitro* se mantuvo en el cuarto de incubación del laboratorio de cultivo de tejidos, bajo un ambiente controlado. La iluminación fue proporcionada por lámpara fluorescentes DURO-TEST (LabLine) de 75 W, a una temperatura promedio de 26 °C durante el día y de 22 a 24 °C durante la noche, sometiendo los explantes a una intensidad luminosa de 2700-3200 lux.

3.3.3.1. Comparación de citocininas para multiplicación de propágulos

Se probaron las citocininas Benziladenina (BA), Kinetina y 2, isopentil amino purina (2ip) en forma aislada, en un rango de concentraciones de 0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, mg L⁻¹. El medio se complementó con la solución básica del medio MS, 3% de sacarosa y 0.4% de tiamina.

En los tres experimentos se utilizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y 10 repeticiones para cada tratamiento de citocininas dando un total de 50 unidades experimentales por experimento (Cuadro 9 y 10). El periodo de incubación fue de 45 días tomándose datos cada 15 días.

Cuadro 9. Concentración de citocininas evaluadas en la brotación de yemas axilares.

Factores	Niveles mg L ⁻¹
Benziladenina (BA)	0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0
Kinetina (K)	0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0
2, isopentil amino purina (2ip)	0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0

Cuadro 10. Tratamientos evaluados en la brotación de yemas axilares.

Tratamiento	Ensayo A BA mg L ⁻¹	Ensayo B Kinetina mg L ⁻¹	Ensayo C 2ip mg L ⁻¹
1	0.0	0.0	0.0
2	0.1	0.1	0.1
3	0.3	0.3	0.3
4	1.0	1.0	1.0
5	3.0	3.0	3.0

Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

- Número de brotes (NB)= Se contabilizó el número de brotes totales por explante.
- Tamaño de brotes (TB) = Tamaño de los brotes en centímetros (promedio por tubo).
- Grosor del tallo (GT) = Grosor del tallo en promedio por tubo en milímetros.
- Número de yemas (NY) = Se contabilizó el número de yemas por brote.
- Formación de callo (FC) = Se cuantificó el peso fresco de callo formado en g.

Para evaluar el efecto de las citocininas sobre estas variables se hizo un análisis de varianza en un diseño completamente al azar para cada factor . Se utilizó la prueba de Tukey con una significancia de $p = 0.05$ para la comparación de medias.

El modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Valor observado en la variable respuesta.

μ = Efecto general de la media.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

ξ_{ij} = Error experimental.

3.3.3.2. Comparación de carbohidratos y nitratos en la multiplicación de propágulos

Basándose en las curvas de crecimiento obtenidas manualmente en los experimentos anteriores, se plantearon experimentos adicionales con el propósito de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y nitratos.

Se utilizó como fuente de carbohidratos a la sacarosa (azúcar de mesa) en tres concentraciones: 3%, 6% y 9% y se probaron las siguientes concentraciones de nitratos: al 100%, 200% y 250%. El medio se complementó con la solución básica del medio MS y tiamina al 0.4%. La toma de datos se realizó cada 15 días durante 45 días de incubación.

En este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial completo (3×3) con 10 repeticiones dando, un total de 90 unidades experimentales (Cuadro 11 y 12).

Cuadro 11. Niveles de sacarosa y nitratos evaluados en la brotación de yemas axilares.

Factores	Niveles (%)
Nitratos	100, 200, 250
sacarosa	3, 6, 9

Cuadro 12. Tratamientos evaluados en la brotación de yemas axilares.

Tratamiento	Nitratos (%)	Sacarosa (%)
1(testigo)	100	3
2	200	3
3	250	3
4	100	6
5	200	6
6	250	6
7	100	9
8	200	9
9	250	9

Las variables que se evaluaron en este ensayo fueron las siguientes:

- a) Número de brotes (NB)= Se contabilizó el número de brotes totales por explante.
- b) Tamaño de brotes (TB) = Tamaño de los brotes en centímetros.
- C) Grosor del tallo (GT) = Se contabilizó en milímetros.
- d) Color de las hojas (CH) = Se tomo la coloración en tres tonos amarillo (1), verde claro (2) y Verde oscuro (3).
- e) Número de yemas (NY) = Se contabilizó el número de yemas por brote.
- f) Formación de callo (FC) = Se contabilizó la cantidad de callo formado en g.

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 y para la variable color de hojas se hizo la prueba de clasificación por rangos de Kruskal-Wallis. 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:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable respuesta del uso del i-ésimo nivel de concentración de nitratos y j-ésimo nivel de concentración de sacarosa. En la k-ésima repetición.

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

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

B_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor de concentración de sacarosa.

$(AB)_{ij}$ = Efecto conjunto del i-ésimo nivel del factor nitratos y el j-ésimo nivel del factor sacarosa.

ξ_{ijk} = Error experimental.

3.3.3.3. Multiplicación de callos para obtener embriogénesis

Los mejores tratamientos que formaron callo en la Etapa II, 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 y observar su respuesta para obtener embriogénesis.

Para ello se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial $3 \times 3 \times 5$, 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 13).

Cuadro 13. 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	1.0	5.0		
Extracto de malta	0.0	500	1000		
Benziladenina	0.0	0.1	0.3	1.0	3.0

Las variables a evaluar fueron las siguientes:

- a) Número de brotes (FB) = Se contabilizó el número de brotes formados por callo
- b) Formaciones globulares (FG) = Se contabilizó el número de formaciones globulares por unidad experimental

La toma de datos se realizó cada semana durante 45 días de incubación.

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 ya mencionada para las variables donde se tuvieron valores de cero.

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

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_l + (AB)_{ij} + (AC)_{il} + (BC)_{jl} + (ABC)_{ijl} + \xi_{ijkl}$$

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.

μ = 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 de concentración de extracto de malta.

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

$(AB)_{ij}$ = Efecto del j-ésimo nivel de factor de concentración de ácido giberélico y el j-ésimo nivel y de concentración de extracto de malta.

$(AC)_{il}$ = Efecto del i-ésimo nivel del factor 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 del factor ácido giberélico, j-ésimo nivel del factor extracto de malta y el l-ésimo factor de benziladenina.

ξ_{ijk} = Error experimental.

3.3.3.4. Germinación de embriones

De los embriones que se formaron en el ensayo anterior, se utilizaron para montar este experimento que consistió en ponerlos a germinar en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) sólido al 100% y al 50% complementado con 0.4 y 0.2% de tiamina y mio-inositol 100 y 50 mg L⁻¹ respectivamente, sometiéndolos a diferentes concentraciones de GA₃ (0.0, 0.1, 0.3, 1.0, y 3.0) (Cuadro 14).

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 14. Concentraciones de 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:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

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.

μ = 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 de concentración de ácido giberélico.

$(AB)_{ij}$ = Efecto conjunto del i-ésimo nivel del factor MS y el j-ésimo nivel del factor ácido giberélico.

ξ_{ijk} = Error experimental.

3.3.4. Etapa III : Enraizamiento de brotes

Los brotes resultantes de la Etapa II (multiplicación de brotes) se utilizaron para trasplantarlos a medios de cultivo para enraizamiento. Los brotes se sembraron en un medio MS básico con citocininas y auxinas. El cultivo se mantuvo en la sala de incubación durante 45 días, tomándose lecturas cada 2 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. 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 completo (5 x 5) con 25 tratamientos y 10 repeticiones, dando un total de 250 unidades experimentales (Cuadro 15).

Cuadro 15. Concentraciones de benziladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) empleados en la fase de enraizamiento de los brotes.

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

Las variables a evaluar fueron las siguientes:

- a) Número de raíces (NR)= Se contabilizó el número de raíces totales por explante.
- b) Longitud de la raíz (LR) = Longitud de las raíces en promedio en centímetros.
- c) Formación de callo (FC) = Se contabilizó 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 en un diseño completamente al azar con arreglo factorial. 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 tuvieron valores de cero.

El modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

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.

μ = 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 de concentración de ácido indolacético.

$(AB)_{ij}$ = Efecto conjunto del i-ésimo nivel del factor Benziladenina y el j-ésimo nivel del factor ácido Indolacético.

ξ_{ijk} = Error experimental.

3.3.5. Etapa IV : Trasplante a suelo de las plantas obtenidas *in vitro*

Las mejores plantas obtenidas en la etapa III con mayor número de raíces y vigor, se trasplantaron en bolsa forestal al invernadero controlando todos los factores ambientales, principalmente la humedad relativa, la temperatura y la intensidad de luz. El sustrato que se utilizó fue tierra de monte y vermiculita previamente esterilizados, en una proporción de 3:1(volumen). Se trasplantaron un total de 50 plántulas a invernadero.

Para evitar posibles contaminaciones se aplicaron riegos con Benlate a 3 g/L^{-1} . Las plantas duraron en invernadero 30 días para posteriormente dejarlas en un lugar a condiciones naturales de crecimiento. En este caso solo se determinó el porcentaje de supervivencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENSAYO DE GERMINACION EN VIVERO E *IN VITRO*

4.1.1. Germinación *in vitro*

Con el propósito de obtener explante libre de patógenos y de inducir alguna respuesta organogénica o embriogénica a partir de embriones maduros, se colocaron semillas de Nim para su germinación *in vitro*. Durante 8 meses se aplicaron diferentes técnicas de desinfestación del medio de cultivo y de los explantes incluyendo: a) Diferentes tiempos de exposición a diferentes concentraciones de alcohol, cloro y gotas de Tween, b) Uso de hipoclorito de calcio al 3% y al 4% y c) Uso de antibiótico (terramicina 62, 125 y 300 mg/500ml) en la desinfestación de las semilla. Como los resultados no fueron los esperados puesto que se presentó contaminación de hongos y bacterias en un 100 % de los tubos, se procedió a utilizar Agromicin y Promil en la desinfestación de la semilla e igualmente no se tuvo ningún resultado positivo.

Sin embargo, en ninguno de los casos se lograron resultados satisfactorios, debido a problemas de contaminación por hongos y bacterias. Por lo tanto no se pudo lograr un método de desinfestación adecuado para la germinación de semilla del Nim *in vitro*.

4.1.2. Germinación en vivero

La emergencia de las plántulas se inicio a los 15 días de sembrada la semilla, en los sustratos que respondieron más rápidamente (tierra de monte y arena). A los 45 días se completó la germinación en el otro sustrato (tezontle).

De las 1500 semillas que se colocaron a germinar en los diferentes sustratos, solo germinó el 6%, lo cual indica que el porcentaje de germinación es sumamente bajo en esta especie (Figura 8). Lo anterior se debe al bajo porcentaje de viabilidad que tienen las semillas del Nim; según Benge (1988), la semilla permanece viable solo durante un periodo menor a los dos meses; el porcentaje de viabilidad después de 3 semanas de recolectadas es de alrededor de 18 %.

A pesar del bajo porcentaje de germinación observado en todos los sustratos el análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas ($p=0.05$) entre ellos (Cuadro 16). Se observó que el mayor porcentaje de germinación (4 %) se registró en el sustrato de tierra de monte, reduciéndose al 1% en los otros dos sustratos arena y tezontle (Cuadro 17).

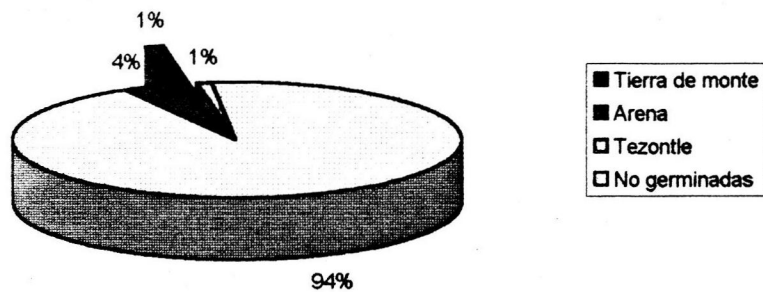


Figura 8. Porcentaje de germinación de semillas de Nim en vivero.

Cuadro 16. Proceso de análisis de varianza para el ensayo de germinación.

Proceso de análisis de varianza					
Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr > F
Sustratos	2	246.93	123.46	23.74	0.0001
Error	12	62.40	5.20		
Total	14	309.33			

Cuadro 17. Ensayo de germinación en vivero prueba de Tukey.

Grupos	Medias	N	Tratamiento	
A	12.400	5	1	Tierra de monte
B	4.000	5	2	Arena
B				
B	3.600	5	3	Tezontle

Alpha= 0.05 gl= 12 MSE= 5.2 Diferencia Mínima Significativa DMS = 3.8477

Medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

Los resultados del ensayo de germinación nos indican que la viabilidad de la semilla después de 8 semanas de recolectadas es sumamente bajo por lo que la propagación del árbol del Nim por medio de semilla es relativamente complicada, sobre todo si la semilla es de importación y lleva tiempo el traslado de la semilla del país de origen a México.

De acuerdo a los resultados la especie tiene una mayor capacidad de germinación en un sustrato como la tierra de monte que presenta una mayor compactación, obscuridad y retención de humedad en relación con el tezontle y la arena.

4.2. ETAPA I : Establecimiento del cultivo aséptico

El análisis de varianza mostró que al menos uno de los tratamientos resultó estadísticamente diferente; es decir que existen diferencias entre los tratamientos en el nivel de contaminación de los explantes (Cuadro 18).

Cuadro 18. Procedimiento N p a r l w a n en SAS para la prueba de medias de rangos.

Prueba de Wilcoxon (suma de rangos) por variable contaminación y clasificado por la variable tratamiento.

	Tratamiento con 20 repeticiones cada uno	Medias
1	Hipoclorito de sodio al 15% (10 min) y Alcohol al 10% (1 min)	97.0 b
2	Hipoclorito de sodio al 15% (10 min) y Alcohol al 10% (2 min)	160.0 a
3	Hipoclorito de sodio al 15% (10 min) y Alcohol al 10% (3 min)	83.5 c
4	Hipoclorito de sodio al 15% (15 min) y Alcohol al 10% (1 min)	79.0 c
5	Hipoclorito de sodio al 15% (15 min) y Alcohol al 10% (2 min)	79.0 c
6	Hipoclorito de sodio al 15% (15 min) y Alcohol al 10% (3 min)	79.0 c
7	Hipoclorito de sodio al 15% (20 min) y Alcohol al 10% (1 min)	79.0 c
8	Hipoclorito de sodio al 15% (20 min) y Alcohol al 10% (2 min)	79.0 c
9	Hipoclorito de sodio al 15% (20 min) y Alcohol al 10% (3 min)	79.0 c
Prueba de Kruskal-Wallis (Chi-Cuadrada Aproximación) Alpha = 0.05		
No. de datos = 180 CHISQ = 125.91 gl = 8 Probabilidad > CHISQ = 0.0001		

Medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

Cuando el tiempo de exposición del explante al hipoclorito de sodio al 15% fue de 10 minutos y al alcohol al 10% fue de 2 minutos (tratamiento 2), se obtuvo un 90% de material sin contaminación; es decir, libre de patógenos. El 10% restante se empezó a contaminar a los 10 días de sembrado (Figura 9).

Con la exposición del explante a hipoclorito de sodio al 15% con un tiempo de 10 minutos y alcohol al 10% con 1 minuto (tratamiento 1), se obtuvo un 50% de contaminación a los 5 primeros días de sembrado el material, principalmente por bacterias y del 50% restante, el 30% se contaminó a los 10 días de sembrado. A las 3 semanas se tenía un 20% de material libre de patógenos.

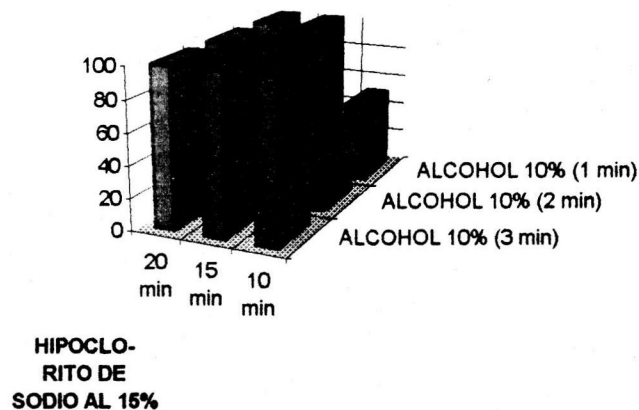


Figura 9. Porcentaje de contaminación en explantes de Nim.

En el tratamiento 3 en el cual se utilizó también el hipoclorito de sodio al 15% con 10 minutos de exposición y alcohol al 10% con 3 minutos, se presentó la contaminación a los 5 días en un 80 % y a los 15 días restantes las bacterias cubrían el 95 % del total del tratamiento.

En los tratamientos restantes donde se utilizó hipoclorito de sodio al 15% durante 15 y 20 minutos de exposición y alcohol al 10% con 3 diferentes tiempos (1,2 y 3 minutos) se presentó la contaminación a los 5 días en un 80% y a los 15 días se tenía todo el material contaminado.

Para poder saber cual o cuales son los tratamientos que nos permiten tener mejor respuesta respecto a la obtención de explantes asépticos para la producción de plantas del Nim en la primera etapa de cultivo *in vitro*, se realizó la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) para la prueba de comparación de rangos de Kruskal-Wallis. En el cuadro anterior podemos observar que los valores con la misma letra no presentan diferencia significativa, podemos decir entonces que el hipoclorito de sodio al 15 % con 10 minutos de exposición y al alcohol con un tiempo de exposición de 2 y 3 minutos son los factores que nos permiten obtener el explante libre de patógenos.

4.2.1. Características de la bacteria contaminante

El problema de contaminación de los explantes fue principalmente por bacterias; esta se inicio desde la base del tejido, formándose dentro del medio del cultivo como una capa en forma de abanico de color grisáceo transparente. En menos de 24 horas de sembrado el material ya se detectaba la presencia de la bacteria. La forma de tipo abanico se propagaba en varias direcciones dentro del medio de cultivo y finalmente la contaminación se extendía hacia la superficie del medio de cultivo con una apariencia lechosa a los 7- 10 días de la siembra.

4.3. ETAPA II : Multiplicación de brotes

4.3.1. Efecto de las citocininas en la multiplicación de propágulos

4.3.1.1. Efectos del BA (Benziladenina) en la multiplicación de propágulos

El análisis de varianza mostró que la concentración de BA en el medio de cultivo afectó en forma significativa ($p = 0.05$) el número y altura de los brotes, y peso fresco de los callos originados a partir de los explantes cultivados *in vitro*, pero no el número de yemas ni el grosor del tallo (Cuadro 19 y Figura 10) a los 45 días de incubación.

Al analizar la comparación de medias (Cuadro 19) se observó que los tratamientos de 0.3 mg L^{-1} y 0.1 mg L^{-1} de BA fueron las mejores en cuanto a altura de brotes y gramos de callo; en el caso del número de brotes el mejor tratamiento fue el de 0.3 mg L^{-1} . Siempre que se noto alguna diferencia entre tratamientos estuvo presente el tratamiento de 0.3 mg L^{-1} .

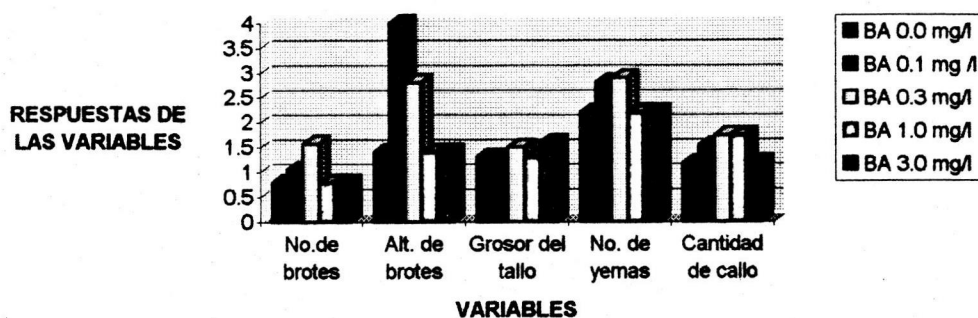


Figura 10. Efecto de la concentración de BA en el medio de cultivo sobre la multiplicación de propágulos de Nim.

4.3.1.1.1. Efecto sobre el número de brotes

El número promedio de brotes en los explantes varió desde 0.79 hasta 1.57. A los 45 días de incubación, el mayor número de brotes se presentó en el tratamiento 3 que contenía 0.3 mg L^{-1} de BA, superando en gran medida al resto de los tratamientos (Figura 10). Al utilizar concentraciones de BA mayores de 1 mg L^{-1} se observó una inhibición en el desarrollo de los brotes, hasta valores similares a los del tratamiento testigo.

Cuadro 19. Valores promedio de diferentes variables relacionadas con la multiplicación de brotes al agregar diferentes concentraciones de BA al medio de cultivo MS al 100% a los 45 días de incubación.

Niveles de BA mg/L ⁻¹	No. de Brotes	Altura de Brotes (cm)	Grosor de Tallos (mm)	Número de Yemas	Gramos de Callo
TX					
1 (0.0)	0.790 b	1.400 b	1.300 a	2.200 a	1.170 b
2 (0.1)	1.050 b	4.000 a	1.300 a	2.800 a	1.530 ab
3 (0.3)	1.570 a	2.800 a	1.500 a	2.900 a	1.740 a
4 (1.0)	0.790 b	1.400 b	1.300 a	2.200 a	1.740 b
5 (3.0)	0.790 b	1.400 b	1.600 a	2.200 a	1.180 b
F calculada	8.87	10.93	0.80	2.98	9.50
Pr > F	0.0001 *	0.0001*	0.5294 NS	0.0687 NS	0.0001 *
Alpha = 0.05					
NS no significativo					
* estadísticamente significativo					

Medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

4.3.1.1.2. Efecto sobre la altura de brotes

Al efectuar la comparación de medias de Tukey para la variable altura de brotes, se encontró que a los 45 días de incubación los mejores tratamientos fueron el de 0.1 mg L⁻¹ con una media de 4 cm y el de 0.3 mg L⁻¹ con una media de 2.8 cm de altura y no tienen diferencias significativas entre ellos. Estos dos tratamientos superaron al testigo y a los tratamientos con mayor concentración de BA, que presentaron una media de 1.40 cm (Cuadro 19). Al parecer concentraciones elevadas de BA inhiben el crecimiento de los brotes.

4.3.1.1.3. Efecto sobre el tamaño de callo

Se encontraron diferencias entre los niveles de BA en la formación y crecimiento del callo después de 45 días de incubación. Al realizar la prueba de Tukey para la comparación de medias se obtuvo mayores promedios en los tratamientos de 0.3 y 1.0 mg L⁻¹ (con una media de 1.74 g) y de 0.1 mg L⁻¹ (con una media de 1.53 g) superando al resto de los tratamientos con mayor concentración de BA, lo que indica que a una mayor concentración de 0.3 mg L⁻¹ existe una inhibición en la formación de callo (Cuadro 19).

4.3.1.1.4. Comparación de medias para número de yemas y grosor del tallo

Al realizar el análisis de varianza se observó en estas variables que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en relación al testigo (Cuadro 19). La media de número de yemas fluctuó entre 2.2 - 2.9 y en el caso de la variable grosor de tallo fluctuó entre 1.3 y 1.6 mm .

4.3.1.2. Efectos de la kinetina (Furfuril aminopurina) en la multiplicación de propágulos

A diferencia de lo ocurrido con BA, el análisis estadístico no mostró (Cuadro 20) que existieran diferencias significativas ($p= 0.05$) entre tratamientos en ninguna de las variables analizadas (número de brotes, altura de brotes, grosor de tallo, número de yemas y gramos de callo). Sin embargo, si comparamos las medias de respuesta de cada variable entre los tratamientos de kinetina podemos observar que se obtuvieron buenas respuestas (Figura 11), y que en general existe una curva de respuesta similar a la de BA con los mayores valores promedio en los niveles intermedios de kinetina.

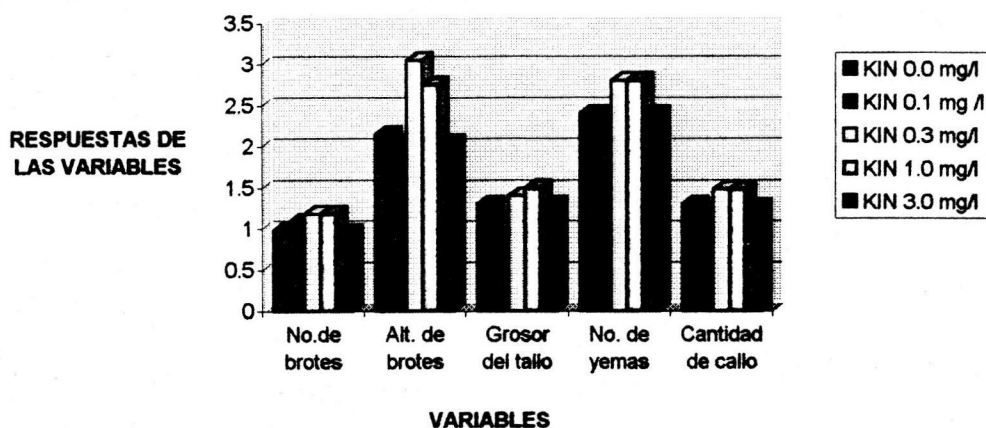


Figura 11. Efectos de la concentración de kinetina en el medio de cultivo sobre la multiplicación de propágulos de Nim.

Cuadro 20. Valores promedio de diferentes variables relacionadas con la multiplicación de brotes al agregar diferentes concentraciones de kinetina al medio de cultivo MS al 100% a los 45 días de incubación.

Niveles de Kinetina TX	No. de Brotes	Altura de Brotes (cm)	Grosor de Tallos (mm)	Número de Yemas	Gramos de Callo
1 (0.0)	0.980 a	2.150 a	1.300 a	2.400 a	1.300 a
2 (0.1)	1.080 a	2.050 a	1.100 a	2.400 a	1.210 a
3 (0.3)	1.180 a	3.050 a	1.400 a	2.800 a	1.480 a
4 (1.0)	1.440 a	2.750 a	1.500 a	2.900 a	1.520 a
5 (3.0)	0.950 a	2.050 a	1.300 a	2.400 a	1.260 a
F calculada	1.54	3.01	0.99	0.52	1.57
Pr > F	0.2056 NS	0.2770 NS	0.4237 NS	0.7218 NS	0.1990 NS
NS no significativo * estadísticamente significativo Alpha = 0.05					

Medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

4.3.1.3. Efectos del 2ip (γ,γ -Dimethylallylamino purine) en la multiplicación de propágulos

El análisis de varianza mostró que la concentración de 2ip en el medio de cultivo afectó en forma significativa ($p = 0.05$) el número de brotes y gramos de callo a partir de los explantes cultivados *in vitro*, pero no en la altura de brotes, número de yemas y grosor de tallo (Cuadro 21 y Figura 12) a los 45 días de incubación.

Al analizar la comparación de medias (Cuadro 21) se observó que el tratamiento de 0.3 mg L⁻¹ y 1.0 mg L⁻¹ de 2ip fueron los mejores en cuanto a número de brotes y gramos de callo respectivamente.

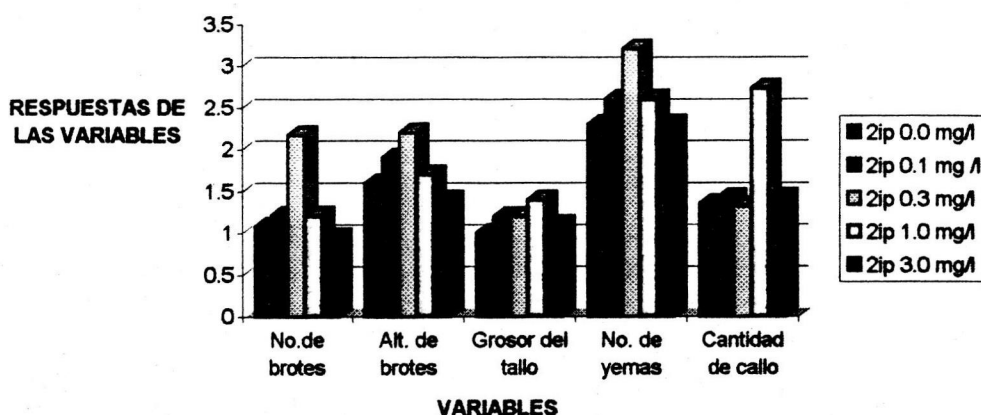


Figura 12. Efecto de la concentración de 2ip en el medio de cultivo sobre la multiplicación de propágulos de Nim.

4.3.1.3.1 Efecto sobre el número de brotes

El número promedio de brotes de los explantes varió desde 0.9 hasta 2.1 a los 45 días de incubación; el mayor número de brotes se presentó en el tratamiento 3 que contenía 0.3 mg L⁻¹ de 2ip, superando en gran medida al resto de los tratamientos (Figura 12). Al utilizar concentraciones de 2ip mayores de 1 mg L⁻¹ se observó una inhibición en el desarrollo de brotes, hasta valores similares a los del tratamiento testigo.

Cuadro 21. Valores promedio de diferentes variables relacionadas con la multiplicación de brotes al agregar diferentes concentraciones de 2ip al medio de cultivo MS al 100% a los 45 días de incubación.

Niveles de 2ip mg/L ⁻¹ TX	No. de Brotes	Altura de Brotes (cm)	Grosor de Tallos (mm)	Número de Yemas	Gramos de Callo
1 (0.0)	1.080 b	1.600 a	1.000 a	2.300 a	1.350 b
2 (0.1)	1.210 b	1.900 a	1.200 a	2.600 a	1.420 b
3 (0.3)	2.170 a	2.200 a	1.200 a	3.200 a	1.320 b
4 (1.0)	1.210 b	1.700 a	1.400 a	2.600 a	2.730 a
5 (3.0)	0.950 b	1.400 a	1.100 a	2.300 a	1.240 b
F calculada	1.54	3.01	0.99	0.52	1.57
Pr > F	0.2056 *	0.2770 NS	0.4237 NS	0.7218 NS	0.1990 *

NS no significativo

* estadísticamente significativo

Alpha = 0.05

Medias con la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas.

4.3.1.3.2. Efectos sobre el tamaño de callo

Se encontraron diferencias entre los niveles de 2ip en la formación y crecimiento del callo después de 45 días de incubación.. Al realizar la prueba de Tukey para la comparación de medias se obtuvo mayores promedios en los tratamientos de 1.0 mg L⁻¹ (con una media de 2.730 g) superando a los demás tratamientos (Cuadro 21).

4.3.1.3.3. Efectos sobre la altura de brotes, número de yemas y grosor del tallo

Al realizar el análisis de varianza se observó en estas variables que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en relación al testigo.

La altura promedio de brotes fluctuó entre 1.4 a 2.2 cm, el número de yemas por explante fluctuó entre 2.3 - 3.2 y en el caso de la variable grosor de tallo fue entre 1.1 y 1.4 cm . A pesar de que no hubo diferencias significativas, las dosis intermedias entre 0.1 y 1.0 mg L⁻¹ de 2ip presentaron los mayores valores promedio (Figura 12).

4.3.2. Efecto de la adición de carbohidratos y nitratos sobre la multiplicación de propágulos

4.3.2.1. Números de brotes

El análisis de varianza mostró que no hubo un efecto significativo de la concentración de sacarosa ni de la concentración de nitratos o de la interacción de estos dos factores sobre el número de brotes, en explantes de Nim tomados de plantas jóvenes (Cuadro 22 y Figura 13).

Cuadro 22 . Valores promedio del número de brotes en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	Nitrato	Sacarosa	Nitrato*Sacarosa
F calculada	0.29	0.38	0.40	0.20
Pr > F	0.9659 NS	0.6878 NS	0.6710 NS	0.9373 NS
Alpha = 0.05				
NS no significativo				
* estadísticamente significativo				
Prueba de medias de Tukey				
Número de tratamiento	Composición nitratos sacarosa (%)			Medias
1	100 - 3			1.11 a
2	100 - 6			1.07 a
3	100 - 9			1.31 a
4	200 - 3			1.11 a
5	200 - 6			1.01 a
6	200 - 9			1.11 a
7	250 - 3			1.14 a
8	250 - 6			1.21 a
9	250 - 9			1.21 a

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

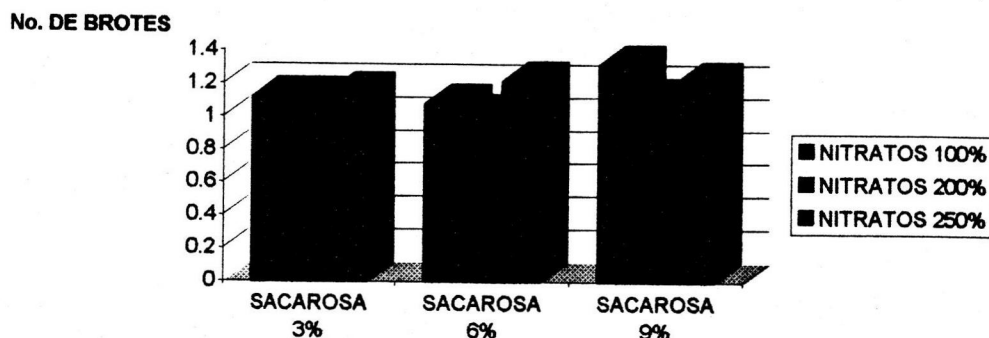


Figura 13. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre el número de brotes a los 45 días de incubación.

En la prueba de medias de Tukey, para los dos factores evaluados no encontramos diferencias significativas entre medias (Cuadro 22) en ninguna de las variables consideradas; estas fluctuaron entre 1.01 y 1.31 en el números de brotes (Figura 13). Se puede observar que al utilizar concentraciones altas de sacarosa y nitratos no se logró incrementar en número significativo la multiplicación de brotes del árbol del Nim.

4.3.2.2. Altura de brotes

En el análisis de varianza para altura de brotes tomada en centímetros se observó diferencias significativas en el efecto individual de los dos factores evaluados, pero no en su interacción; de manera general se puede observar diferencias (Cuadro 23 y Figura 14) por lo cual, por lo menos uno de los nueve tratamientos es diferente.

Cuadro 23. Valores promedio de la altura de brotes (cm) en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	Nitrato	Sacarosa	Nitrato*Sacarosa
F calculada	3.06	3.68	5.44	1.56
Pr > F	0.0046 *	0.029*	0.0061 *	0.1929 NS
Alpha = 0.05				
NS no significativo				
* estadísticamente significativo				
Prueba de medias de Tukey				
Número de tratamiento		Composición nitratos sacarosa (%)		Medias
1		100 - 3		1.40 b
2		100 - 6		1.45 b
3		100 - 9		1.45 b
4		200 - 3		1.60 b
5		200 - 6		2.75 a
6		200 - 9		1.60 b
7		250 -3		1.45 b
8		250 - 6		2.60 a
9		250 - 9		2.05 ab
Alpha = 0.05. Medias con la misma letra vertical no presentan diferencias significativas				

Al realizarse la prueba de Tukey (Cuadro 23) para la comparación de medias entre los nueve diferentes tratamientos, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, teniéndose tres diferentes grupos de medias. El tratamiento cinco (con 200 % de nitratos y 6 % de sacarosa en el medio de MS) presentó la mejor media con 2.75 cm, en segundo lugar de importancia fue el tratamiento ocho (con 200% de nitratos y 9 % de sacarosa) con una media de 2.60 cm y el tratamiento que presentó menor respuesta de los nueve, fue el testigo (al 100 % de nitratos y 3 % de sacarosa) con una media de 1.40 cm para la altura de los brotes.

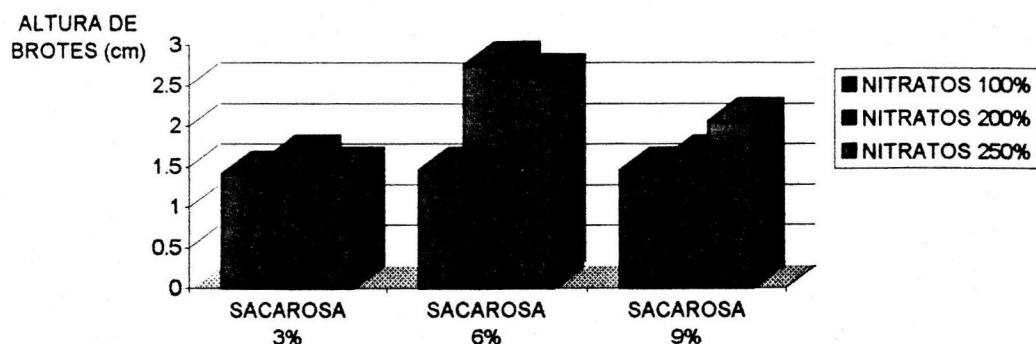


Figura 14. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre la altura de brotes a los 45 días de incubación.

4.3.2.3. Grosor del tallo

Como podemos observar de manera general en el Cuadro 24 y en la Figura 15, encontramos diferentes respuestas de los dos factores evaluados y podemos inferir que por lo menos un tratamiento es estadísticamente diferente. Al realizar el análisis de varianza se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con el factor sacarosa, no así con el factor nitrato ni tampoco con sus interacciones.

Cuadro 24 .Valores promedio del grosor de tallo (mm) en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	Nitrato	Sacarosa	Nitrato*Sacarosa
F calculada	2.97	1.61	7.97	1.15
Pr > F	0.0058 *	0.2072 NS	0.0001 *	0.3407 NS
Alpha = 0.05				

* Estadísticamente significativo

NS Estadísticamente no significativo

Prueba de medias de Tukey

Número de tratamiento	Composición nitratos sacarosa (%)	Medias
1	100 - 3	1.60 ab
2	100 - 6	2.40 b
3	100 - 9	2.50 b
4	200 - 3	1.60 ab
5	200 - 6	2.00 ab
6	200 - 9	1.90 ab
7	250 - 3	1.60 ab
8	250 - 6	2.00 ab
9	250 - 9	2.70 a

Medias con la misma letra vertical no presentan diferencias significativas

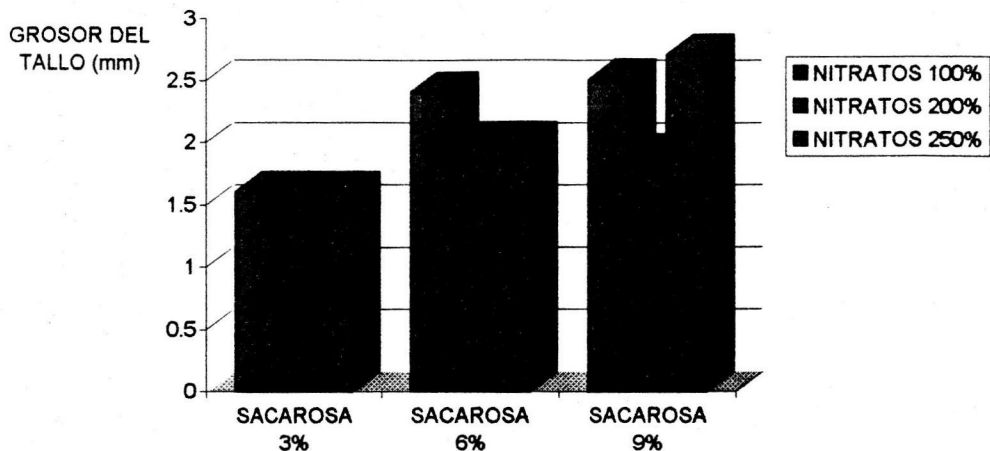


Figura 15. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre el grosor del tallo a los 45 días de incubación.

En la prueba de Tukey para la comparación de medias, se obtuvieron 3 grupos de medias estadísticamente diferentes. El mejor tratamiento fue el nueve (250 % de nitratos y 9% de sacarosa), obteniéndose una media en grosor de tallo de 2.7 mm superando en gran medida al resto de los tratamientos (Cuadro 24). Al utilizarse las mayores concentraciones de sacarosa y nitratos se obtiene el mayor grosor del tallo de los brotes de Nim.

4.3.2.4. Cantidad de callo

El análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas en los factores individuales evaluados sobre la cantidad de callo formado en los explantes a los 45 días de incubación, así como en la interacción de nitratos y sacarosa. Por lo cual podemos deducir que por lo menos uno de los tratamientos es estadísticamente diferente (Cuadro 25 y Figura 16).

Cuadro 25. Valores promedio de la cantidad de callo (g) en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	Nitrato	Sacarosa	Nitrato*Sacarosa
F calculada	17.45	12.58	35.50	10.85
Pr > F	0.0001 *	0.0001 *	0.0001 *	0.0001 *
Alpha = 0.05				
* estadísticamente significativo				
NS Estadísticamente no significativo				
Prueba de medias de Tukey				
Número de tratamiento		Composición nitratos sacarosa (%)		Medias
1		100 - 3		0.820 c
2		100 - 6		0.660 c
3		100 - 9		0.800 c
4		200 - 3		0.630 c
5		200 - 6		0.550 c
6		200 - 9		0.710 c
7		250 -3		0.700 c
8		250 - 6		1.400 b
9		250 - 9		2.050 a
Alpha = 0.05. Medias con la misma letra vertical no presentan diferencias significativas				

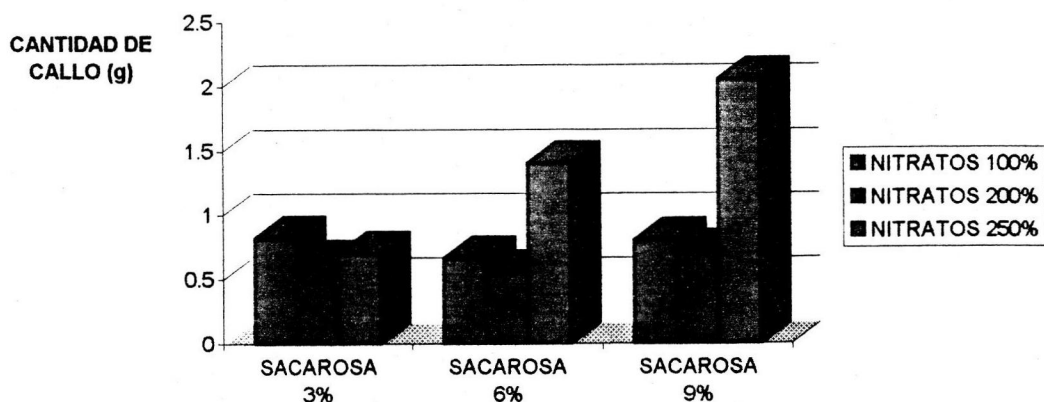


Figura 16. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre la cantidad de callo (g) a los 45 días de incubación.

Al efectuarse la prueba de comparación de medias de Tukey entre los tratamientos, se encontró diferencias significativas entre ellos. Se diferenciaron estadísticamente tres grupos de medias, pudiendo observar que la concentración de 250% de nitrato en

comparación con las otras 2 concentraciones estimuló de manera significativa el desarrollo de callo; e igualmente para el factor sacarosa al incrementar la concentración a 6% y 9% se tiene una respuesta positiva. Los mejores tratamientos fueron el 9 (250% de nitratos y 9% de sacarosa) con una media de 2.05 g de callo, y el tratamiento 8 (250% de nitratos y 6% de sacarosa); estos dos tratamientos superaron al resto de los tratamientos que fluctuaron entre .630 a .820 g de callo.

4.3.2.5. Número de yemas

En el Cuadro 26 se puede observar que existen diferencias significativas entre la interacción de los factores (nitratos y sacarosa). Por lo cual al menos uno de los tratamientos evaluados es diferente en la cantidad del número de yemas en los brotes del Nim.

Cuadro 26. Valores promedio del número de yemas en tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	Nitrato	Sacarosa	Nitrato*Sacarosa
F calculada	2.96	2.65	2.65	3.25
Pr > F	0.0060 *	0.075 NS	0.075 NS	0.0160 *
Alpha = 0.05				

NS no significativo

* Estadísticamente significativo

Prueba de medias de Tukey

Número de tratamiento	Composición nitratos sacarosa (%)	Medias
1	100 - 3	1.600 b
2	100 - 6	1.900 ab
3	100 - 9	2.000 ab
4	200 - 3	3.100 a
5	200 - 6	1.700 ab
6	200 - 9	1.800 ab
7	250 - 3	1.700 ab
8	250 - 6	1.500 b
9	250 - 9	1.700 ab

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

Al realizar la comparación de medias de Tukey para los factores de estudio, se observó que para la variable número de yemas no tiene importancia significativa el efecto de los factores nitrato y sacarosa de manera individual, pero sí en su interacción, siendo el mejor tratamiento el 4 (200 % nitratos y 3 % de sacarosa) con una media de 3.10, superando a los demás tratamientos que fluctuaron entre 1.5 a 2.0 números de yemas a los 45 días de incubación (Figura 17).

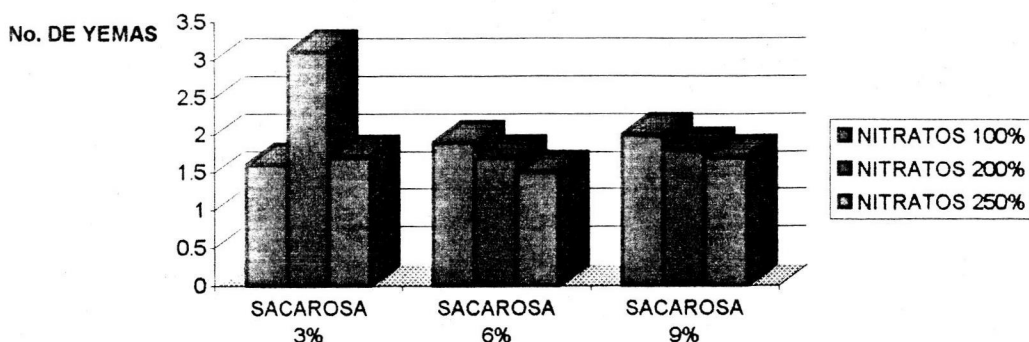


Figura 17. Efecto de tres niveles de sacarosa y tres niveles de nitratos sobre el número de yemas a los 45 días de incubación.

4.3.2.6. Color de hojas

El análisis de varianza para esta etapa se realizó con la prueba de clasificación por rangos de Kruskal-Wallis. En el análisis podemos observar que la probabilidad asociada con la ocurrencia conforme a H_0 de un valor tan grande como $H = 14.553$, $gl = 8$ es $p < 0.0684$ y ya que esta probabilidad es mayor que el nivel de significación previamente fijado ($\alpha = 0.05$), aceptamos H_0 y concluimos que los tratamientos resultaron iguales, es decir, que las concentraciones de nitratos y sacarosa no producen diferente coloración en las hojas, lo cual nos está representando explantes del mismo vigor (Cuadro 27).

Cuadro 27. Procedimiento N p a r l w a n en SAS para la prueba de medias de rangos.

Prueba de Wilcoxon (suma de rangos) por variable contaminación y clasificado por la variable tratamiento.		
Composición	nitratos sacarosa (%)	Medias
1	100 - 3	39.1 a
2	100 - 6	43.7 a
3	100 - 9	41.2 a
4	200 - 3	64.5 a
5	200 - 6	36.8 a
6	200 - 9	30.0 a
7	250 - 3	57.7 a
8	250 - 6	50.6 a
9	250 - 9	45.9 a

Prueba de Kruskal-Wallis (Chi-Cuadrada Aproximación) Alpha = 0.05
 No. de datos = 90 CHISQ = 14.553 gl = 8 Probabilidad > CHISQ = 0.0684
 Medias con la misma letra vertical no presentan diferencias significativas

4.3.3. 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 27⁰ C.

4.3.3.1. Número de brotes

El análisis de varianza mostró que no existen efectos significativos en ninguno de los factores evaluados individualmente (GA₃, BA y extracto de malta) sobre el número de brotes formados en los explantes a los 45 días de incubación en medio sólido, pero sí en la interacción de GA₃ y BA (Figura 18 y Cuadro 28), con base a lo anterior se infiere que por lo menos uno de los tratamientos es diferente .

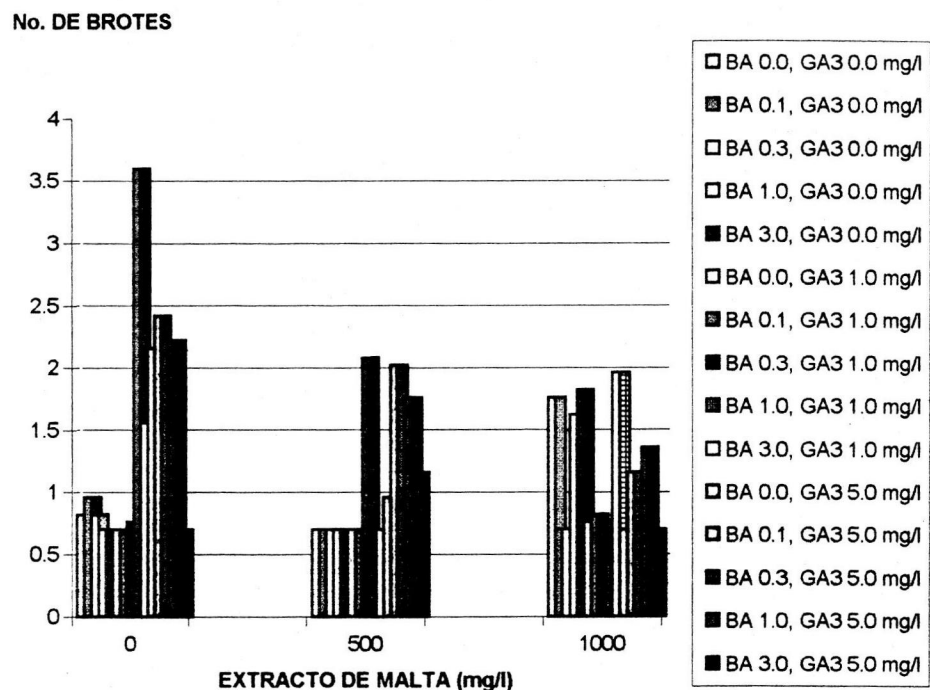


Figura 18. Efecto de tres niveles de GA₃, tres niveles de extracto de malta y 5 niveles de BA sobre el número de brotes a los 45 días de incubación.

Cuadro 28 . Análisis de varianza para la comparación de tres niveles de GA₃, tres niveles de extracto de malta y cinco niveles de BA para el número de brotes a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	GA ₃	BA	Extracto de malta	GA ₃ * BA * E.M
F calculada	1.20	2.45	1.07	0.70	1.81
Pr > F	0.2022 NS	0.0883 NS	0.3745 NS	0.4581 NS	0.0043 *
Alpha = 0.05					
NS no significativo					
* estadísticamente significativo					

Prueba de medias de Tukey

Número de tratamiento	Tratamiento GA ₃ - BA-E.M. mg L ⁻¹	Medias
1	00-00-00	0.82 b
2	00-0.1-00	0.96 b
3	00-0.3-00	0.82 b
4	00-1.0-00	0.70 b
5	00-3.0-00	0.70 b
6	1.0-00-00	0.70 b
7	1.0-0.1-00	0.70 b
8	1.0-0.3-00	0.76 b
9	1.0-1.0-00	3.600 a
10	1.0-3.0-00	1.56 b
11	5.0-00-00	2.16 b
12	5.0-0.1-0.0	2.42 b
13	5.0-0.3-00	0.70 b
14	5.0-1.0-00	2.22 b
15	5.0-3.0-00	0.70 b
16	00-0.0-500	0.70 b
17	00-0.1-500	0.70 b
18	00-0.3-500	0.70 b
19	00-1.0-500	0.70 b
20	0.0-3.0-500	0.70 b
21	1.0-0.0-500	0.70 b
22	1.0-0.1-500	0.70 b
23	1.0-0.3-500	2.08 b
24	1.0-1.0-500	0.70 b
25	1.0-3.0-500	0.70 b
26	5.0-0.0-500	0.96 b
27	5.0-0.1-500	2.02 b
28	5.0-0.3-500	1.02 b
29	5.0-1.0-500	1.76 b
30	5.0-3.0-500	1.16 b
31	00-0.0-1000	1.76 b
32	00-0.1-1000	0.70 b
33	00-0.3-1000	0.70 b
34	0.0-1.0-1000	1.62 b
35	0.0-3.0-1000	1.82 b
36	1.0-0.0-1000	0.76 b
37	1.0-0.1-1000	0.82 b
38	1.0-0.3-1000	0.70 b
39	1.0-1.0-1000	0.76 b
40	1.0-3.0-1000	1.96 b
41	5.0-0.0-1000	0.70 b
42	5.0-0.1-1000	1.16 b
43	5.0-0.3-1000	0.70 b
44	5.0-1.0-1000	1.36 b
45	5.0-3.0-1000	0.70 b

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

Al efectuarse la prueba de comparación de medias de Tukey, se encontró diferencias significativas entre los tratamientos. Se diferenciaron estadísticamente dos grupos de medias siendo la mejor interacción dada en el tratamiento nueve (1 mg L⁻¹ de GA₃ , 1 mg

L⁻¹ de BA y 0 mg L⁻¹ de Extracto de malta) con una media de 3.60 brotes, seguido por el tratamiento 12 (5.0 mg L⁻¹ de GA₃ y 1 mg L⁻¹ de BA) con una media de brotes de 2.42. (Figura 18 y Cuadro 28). Como podemos observar en los resultados anteriores, la interacción de los dos factores (GA₃ y BA) es importante para que se obtengan un número significativo de brotes.

4.3.3.2. Número de formaciones globulares

De manera general podemos observar en la Figura 19 y en el Cuadro 29 que existen diferencias significativas entre los tratamientos para la variable evaluada por efecto del factor GA₃; 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 GA₃, 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 GA₃, 1.0 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.

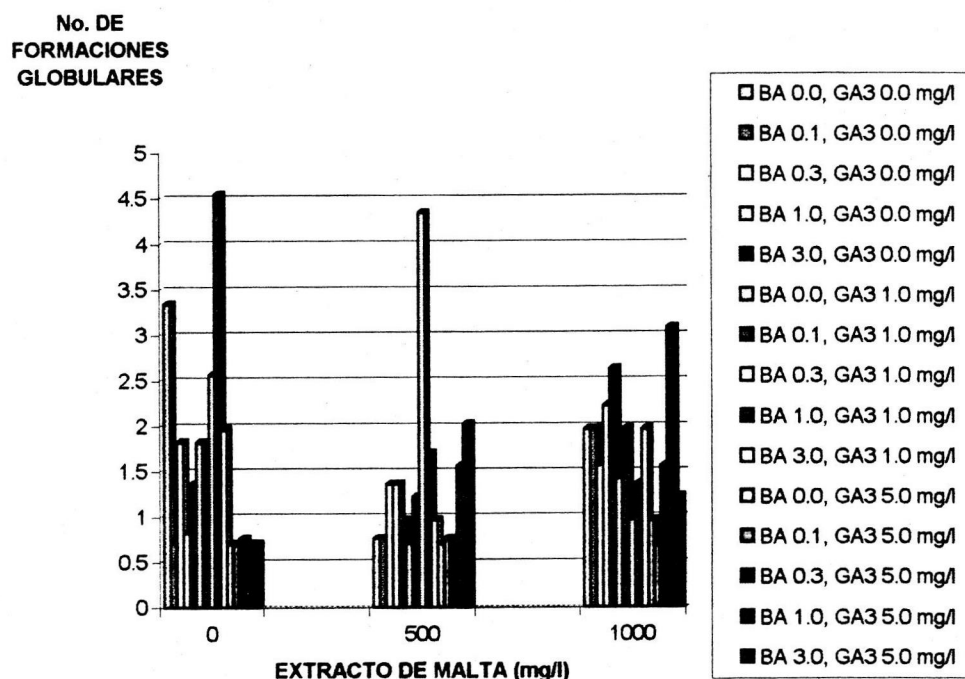


Figura 19. Efecto de tres niveles de GA₃, tres niveles de extracto de malta y 5 niveles de BA sobre el número de formaciones globulares a los 45 días de incubación.

En la prueba de medias se observa que el factor ácido giberélico es importante para obtener embriones somáticos 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} .

Cuadro 29 .Análisis de varianza para la comparación de tres niveles de GA_3 , 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	GA_3	BA	Extracto de malta	$\text{GA}_3*\text{BA}*E.M$
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

Prueba de medias de Tukey

Número de tratamiento

Tratamiento
 GA_3 - BA-E.M. 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

4.3.4. Germinación de embriones somáticos

El análisis de varianza mostró que no hubo un efecto significativo de la concentración del medio de cultivo MS, pero sí de la concentración de GA₃ y de la interacción de estos factores se obtuvo como respuestas valores de 0.70 a 1.60 embriones somáticos germinados de Nim (Cuadro 30 y Figura 20).

Cuadro 30. 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	

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

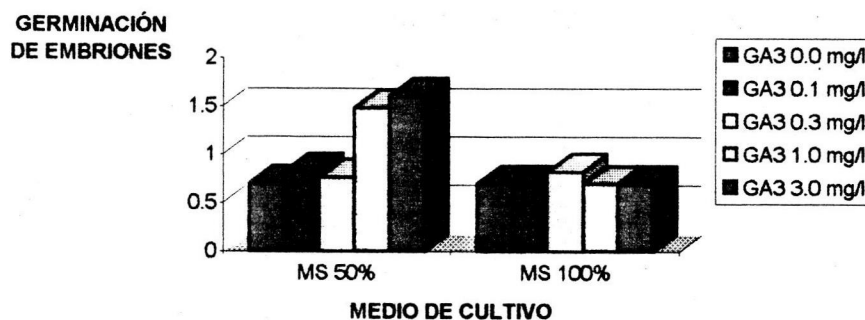


Figura 20. Efectos de las concentraciones MS y GA₃ en la germinación de embriones somáticos de Nim a los 30 días de incubación.

En la prueba de medias de Tukey en los dos factores evaluados encontramos diferencias entre medias (Cuadro 30 y Figura 20) y estas 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.

4.4. Etapa III : Enraizamiento de brotes

4.4.1. Número de raíces

El análisis de varianza mostró que la concentración de ácido indolacético (AIA) tuvo un efecto significativo ($p = 0.05$) sobre el número promedio de raíces formadas en los brotes de Nim cultivados *in vitro*, después de un periodo de incubación de 45 días. Sin embargo, la concentración de BA y la interacción de los dos factores anteriores no tuvieron un efecto significativo en la variable.

En los resultados podemos observar que las concentraciones de 1.0 y 3.0 mg L⁻¹ de AIA favorecieron el desarrollo de un mayor número de raíces, manifestándose como el mejor tratamiento para inducir rizogénesis un tratamiento con 3.0 mg L⁻¹ de AIA y 0.1 mg L⁻¹ de BA, con una media de 2.38 de número de raíces por explante. (Figura 21 y Cuadro 31).

Como podemos observar al aumentar la cantidad de AIA se incrementa la respuesta de rizogénesis. Esto coincide con el trabajo de Shrikhande *et al.* (1993), quienes encontraron que al utilizar combinaciones de AIA desde 0.5 a 5.0 mg L⁻¹ se induce un gran número de raíces en explantes de Nim.

También Mohamed (1994), usando secciones de tallos con yemas axilares y un medio MS al 100% y complementado con 9.8 mg L⁻¹ de AIA obtuvo rizogénesis.

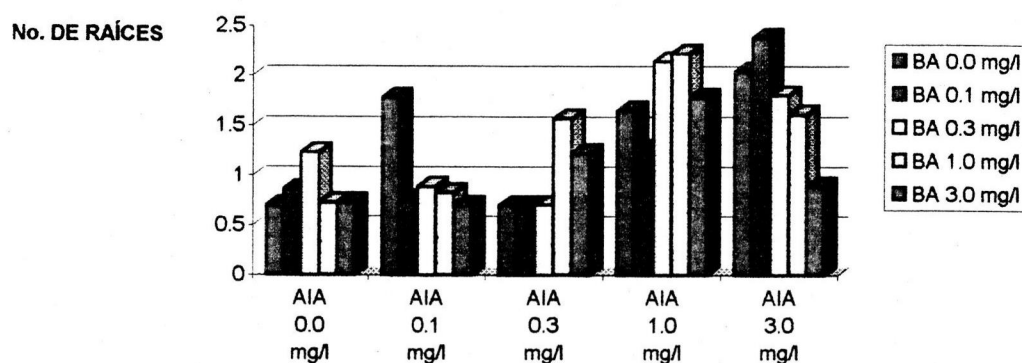


Figura 21. Efecto de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre el número de raíces a los 45 días de incubación.

Cuadro 31. Valores promedio para la comparación de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre el número de raíces a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	BA	AIA	BA*AIA
F calculada	2.27	0.71	7.49	1.35
Pr > F	0.0011 *	0.5871 NS	0.0001 *	0.1698 NS
Alpha = 0.05				
NS no significativo				
* estadísticamente significativo				
Prueba de medias de Tukey				
Número de tratamiento		Tratamiento BA-AIA (mg L ⁻¹)		Medias
1		0.0 - 0.0		0.700 b
2		0.1 - 0.0		0.860 b
3		0.3 - 0.0		1.230 b
4		1.0 - 0.0		0.730 b
5		3.0 - 0.0		0.730 b
6		0.0 - 0.1		1.780 b
7		0.1 - 0.1		0.760 b
8		0.3 - 0.1		0.890 b
9		1.0 - 0.1		0.830 b
10		3.0 - 0.1		0.700 b
11		0.0 - 0.3		0.700 b
12		0.1 - 0.3		0.700 b
13		0.3 - 0.3		0.700 b
14		1.0 - 0.3		1.570 b
15		3.0 - 0.3		1.220 b
16		0.0 - 1.0		1.650 b
17		0.1 - 1.0		1.260 b
18		0.3 - 1.0		2.140 ab
19		1.0 - 1.0		2.220 a
20		3.0 - 1.0		1.780 b
21		0.0 - 3.0		2.040 a b
22		0.1 - 3.0		2.380 a
23		0.3 - 3.0		1.800 b
24		1.0 - 3.0		1.610 b
25		3.0 - 3.0		0.890 b

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

4.4.2. Longitud de las raíces

Durante el periodo de incubación se presentaron diferencias en la longitud de raíces por efecto del factor AIA con concentraciones de 1.0 y 3.0 mg L⁻¹ donde se presentaron la mayor longitud de raíces, manifestándose como el mejor tratamiento el veinte (3.0 mg L⁻¹ de BA y 1.0 mg L⁻¹ AIA) con una media de 1.53 cm de longitud de la raíz (Cuadro 32 y Figura 22).

Cuadro 32. Valores promedio para la comparación de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la longitud de las raíces a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	BA	AIA	BA*AIA
F calculada	1.39	0.42	0.0108	0.3225
Pr > F	0.1145 NS	0.07960 NS	0.0108 *	0.3225 NS
Alpha = 0.05				

NS no significativo

* estadísticamente significativo

Prueba de medias de Tukey

Número de tratamiento	Tratamiento BA-AIA (mg L ⁻¹)	Medias
1	0.0 - 0.0	0.700 b
2	0.1 - 0.0	1.160 b
3	0.3 - 0.0	0.830 b
4	1.0 - 0.0	1.230 ab
5	3.0 - 0.0	1.030 b
6	0.0 - 0.1	1.150 b
7	0.1 - 0.1	0.910 b
8	0.3 - 0.1	0.930 b
9	1.0 - 0.1	0.930 b
10	3.0 - 0.1	0.700 b
11	0.0 - 0.3	0.700 b
12	0.1 - 0.3	0.700 b
13	0.3 - 0.3	0.700 b
14	1.0 - 0.3	0.640 b
15	3.0 - 0.3	0.640 b
16	0.0 - 1.0	0.670 b
17	0.1 - 1.0	1.060 b
18	0.3 - 1.0	1.340 ab
19	1.0 - 1.0	1.220 ab
20	3.0 - 1.0	1.530 a
21	0.0 - 3.0	1.370 ab
22	0.1 - 3.0	1.220 ab
23	0.3 - 3.0	1.400 a
24	1.0 - 3.0	1.100 b
25	3.0 - 3.0	0.620 b

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

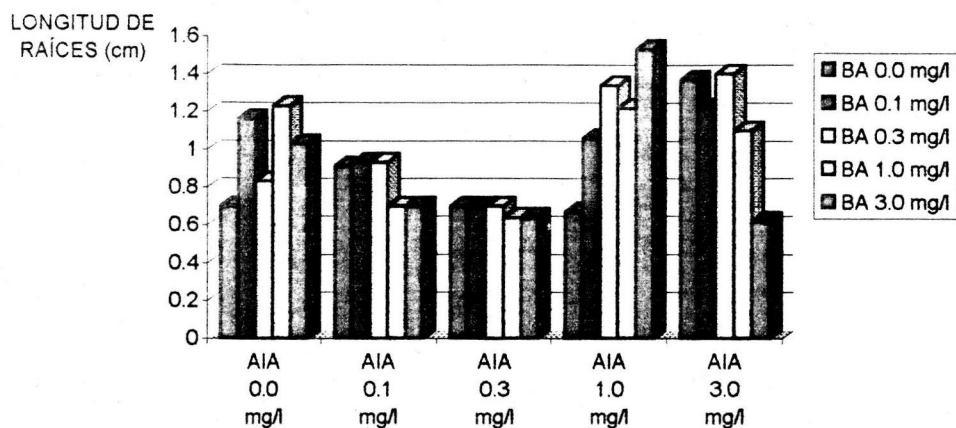


Figura 22. Efecto de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la longitud de las raíces a los 45 días de incubación.

4.4.3. Gramos de callo

Al realizar el análisis de varianza encontramos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los factores evaluados individualmente (BA y AIA), ni tampoco se presentó para su interacción. Al realizar la prueba de medias de Tukey no se encontraron diferencias entre tratamientos (Figura 23 y Cuadro 31).

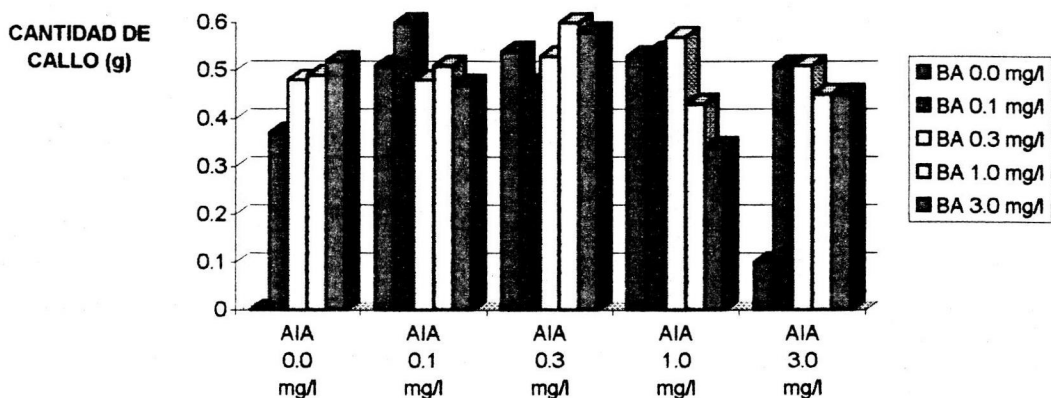


Figura 23. Efecto de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la cantidad de callo a los 45 días de incubación.

Cuadro 33. Valores promedio para la comparación de cinco niveles de BA y cinco niveles de AIA sobre la cantidad de callo a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	BA	AIA	BA*AIA
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

Prueba de medias de Tukey

Número de tratamiento	Tratamiento BA-AIA (mg L ⁻¹)	Medias
1	0.0 - 0.0	0.100 a
2	0.1 - 0.0	0.370 a
3	0.3 - 0.0	0.480 a
4	1.0 - 0.0	0.490 a
5	3.0 - 0.0	0.520 a
6	0.0 - 0.1	0.510 a
7	0.1 - 0.1	0.600 a
8	0.3 - 0.1	0.480 a
9	1.0 - 0.1	0.510 a
10	3.0 - 0.1	0.470 a
11	0.0 - 0.3	0.540 a
12	0.1 - 0.3	0.470 a
13	0.3 - 0.3	0.530 a
14	1.0 - 0.3	0.600 a
15	3.0 - 0.3	0.580 a
16	0.0 - 1.0	0.530 a
17	0.1 - 1.0	0.540 a
18	0.3 - 1.0	0.570 a
19	1.0 - 1.0	0.430 a
20	3.0 - 1.0	0.340 a
21	0.0 - 3.0	0.100 a
22	0.1 - 3.0	0.510 a
23	0.3 - 3.0	0.510 a
24	1.0 - 3.0	0.450 a
25	3.0 - 3.0	0.450 a

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

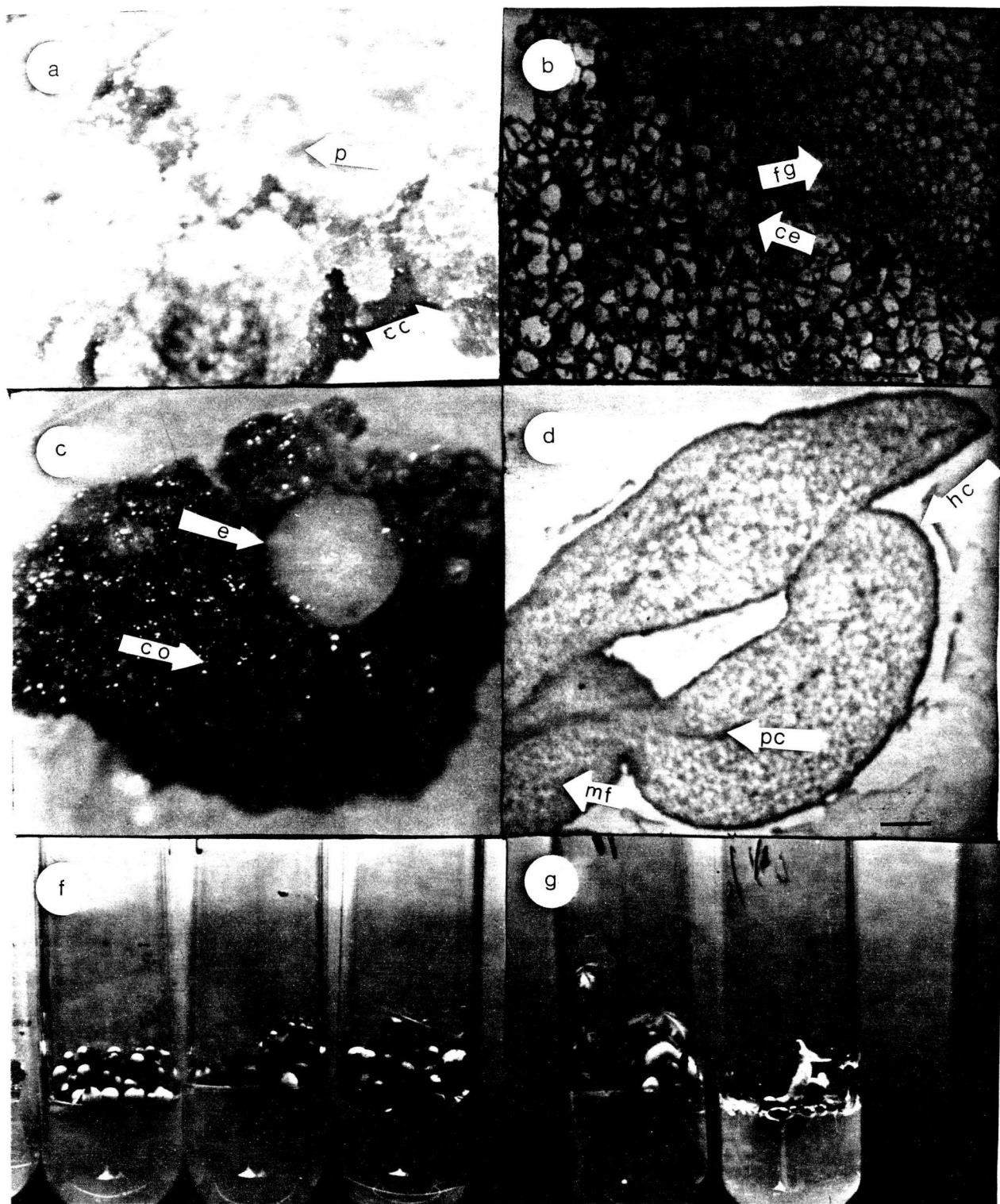


Figura 24. Embriogénesis en Nim: La barra de referencia utilizada representa 100 μm . a) cc: células de callo friable; p: proembrión. b) ce: células embriogénicas; fg: formación globular. c) e: embrión somático; co: células de callo oxidado. d) Embrión en etapa torpedo: pc: procambium; mf: meristemo fundamental; hc: hojas cotiledonares. f) Células de callo con embriones. g) Brote y raíz de embriones.

4.5. Etapa IV : Trasplante a suelo de plantas obtenidas *in vitro*

Las plántulas obtenidas *in vitro* fueron transplantadas a bolsas de polietileno de tamaño forestal conteniendo una mezcla de 70% de tierra de monte y 30% de Peat moss. Para conservar una alta humedad relativa en el medio que rodea a la planta, a cada maceta se le colocó una bolsa de polietileno transparente. Las plantas cubiertas con polietileno fueron mantenidas durante un período 30 días; diez días después del trasplante, las bolsas de polietileno fueron perforadas para que las plantas fueran adaptándose a menor humedad relativa. Después de 20 días de trasplante al suelo, las plantas fueron llevadas a condiciones de invernadero con 50% de sombra, pero la maceta aún conservaba la cubierta de polietileno. Al transcurrir diez días de que se trasladaron las plantas a invernadero, les fue eliminada la cubierta de polietileno y continuaron en condiciones de media sombra. Se tomaron datos de altura de planta, número de hojas y porcentaje de supervivencia de las plantas. Sin embargo, a estos datos no se le realizó ningún análisis estadístico.

Del grupo inicial de 50 plantas que se transplantaron a suelo, la supervivencia a los 50 días fue del 60%; esto debido principalmente a la alta humedad relativa en el medio ambiente creado por la bolsa de polietileno, lo que provocó una alta incidencia de enfermedades fungosas. Además de perforar las bolsas que cubrían a cada maceta, para reducir la incidencia de enfermedades fue necesario descubrir por completo las macetas diariamente por lapsos de una hora aproximadamente, como forma de ventilación, cubriéndola posteriormente. La ventilación es una práctica común en invernaderos que se realiza para disminuir la incidencia de enfermedades que son provocadas por ambientes con alta temperatura y humedad. Esta práctica de manejo permitió la supervivencia de 30 plantas del grupo original (Cuadro 34).

Cabe mencionar que para controlar la incidencia y crecimiento de fungosis se estuvo asperjando cada tercer día el fungicida Benlate a una concentración de 1.0 mg L^{-1} durante 25 días.

Cuadro 34. Características de plantas de Nim obtenidas *in vitro* 50 días después del periodo de aclimatación.

No. de plantas trasplantadas	No. de plantas después de la aclimatación	Altura de planta en promedio (cm)	No. de hojas en promedio
50	30	8.7	9

Después de 30 días de la etapa de aclimatación las características de las plantas que sobrevivieron mostraron que hubo poco crecimiento durante este período. De hecho, el crecimiento de tallo durante los 30 días de aclimatación fue menor al obtenido durante los días anteriores de la etapa de enraizamiento *in vitro*, ocurriendo poco crecimiento de raíz y formación de nuevas raíces primarias. Al final del periodo de aclimatación, se observó la abscisión de las hojas inferiores. Torres (1989) menciona que el retraso en crecimiento

durante los primeros días de aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro*, puede ser debido a que estas plantas usan una gran cantidad de energía para adaptarse a un nuevo ambiente y que la fijación de CO₂ a través de la fotosíntesis es menor al CO₂ liberado. Además, esto puede ser debido que al transferir a las plantas a condiciones naturales sea difícil inducir un buen funcionamiento radicular, que tiende a ser sustituido por nuevas raíces. Además de que las hojas tienen menos cera cuticular y no hay un control efectivo de apertura y cierre de estomas.

4.6. Metodología para el cultivo *in vitro* del árbol del Nim

Con base a los resultados de las diferentes etapas del estudio efectuado, la propagación *in vitro* del árbol del Nim usando microestacas se puede obtener de la siguiente manera:

1. Los explantes se toman de las ramas de los árboles jóvenes en cualquier fecha de año; después de cortados los explantes se colocan en agua jabonosa (4 g L⁻¹) durante el traslado al laboratorio.
2. Los explantes deben desinfectarse lavándose con jabón y agua corriente y se ponen en agitación en un recipiente con gotas de Tween-20 durante 30 minutos. Posteriormente se desinfectan con hipoclorito de sodio al 15% por 10 minutos y en alcohol al 10% durante 2 minutos y finalmente se enjuagan con agua destilada por 5 a 6 minutos y se transfieren a cajas de petri esterilizadas para la siembra.
3. Para multiplicar los explantes se siembran en un medio que consiste en: MS al 100% adicionando BA al 0.3 mg L⁻¹. La multiplicación celular en la base del explante se observa a las dos semanas de incubación.
- 4.- Los brotes se transfieren para inducir la rizogénesis a un medio que contenga la siguiente composición química: MS al 100%, 0.1 mg L⁻¹ de BA y 3.0 mg L⁻¹ de AIA. La aparición de raíces se presenta a los 10 días de incubación, teniéndose plantas completas a los 30 días de sembrado el explante. Durante el periodo de incubación se mantuvo un fotoperiodo de 16/8 horas, con una intensidad luminosa de 2700 a 3200 lux y una temperatura de 26 °C.
- 5.- Se transfieren las plantas *in vitro* a condiciones de invernadero controlándose principalmente la humedad relativa. Se recomienda asperjar con un fungicida la planta y el sustrato desde el primer día de trasplante. En esta última etapa la planta permanece aproximadamente 30 días en invernadero.
- 6.- Se obtiene la regeneración de plantas a las 14 semanas, desde que se establece el cultivo aséptico hasta la salida de la planta del invernadero.

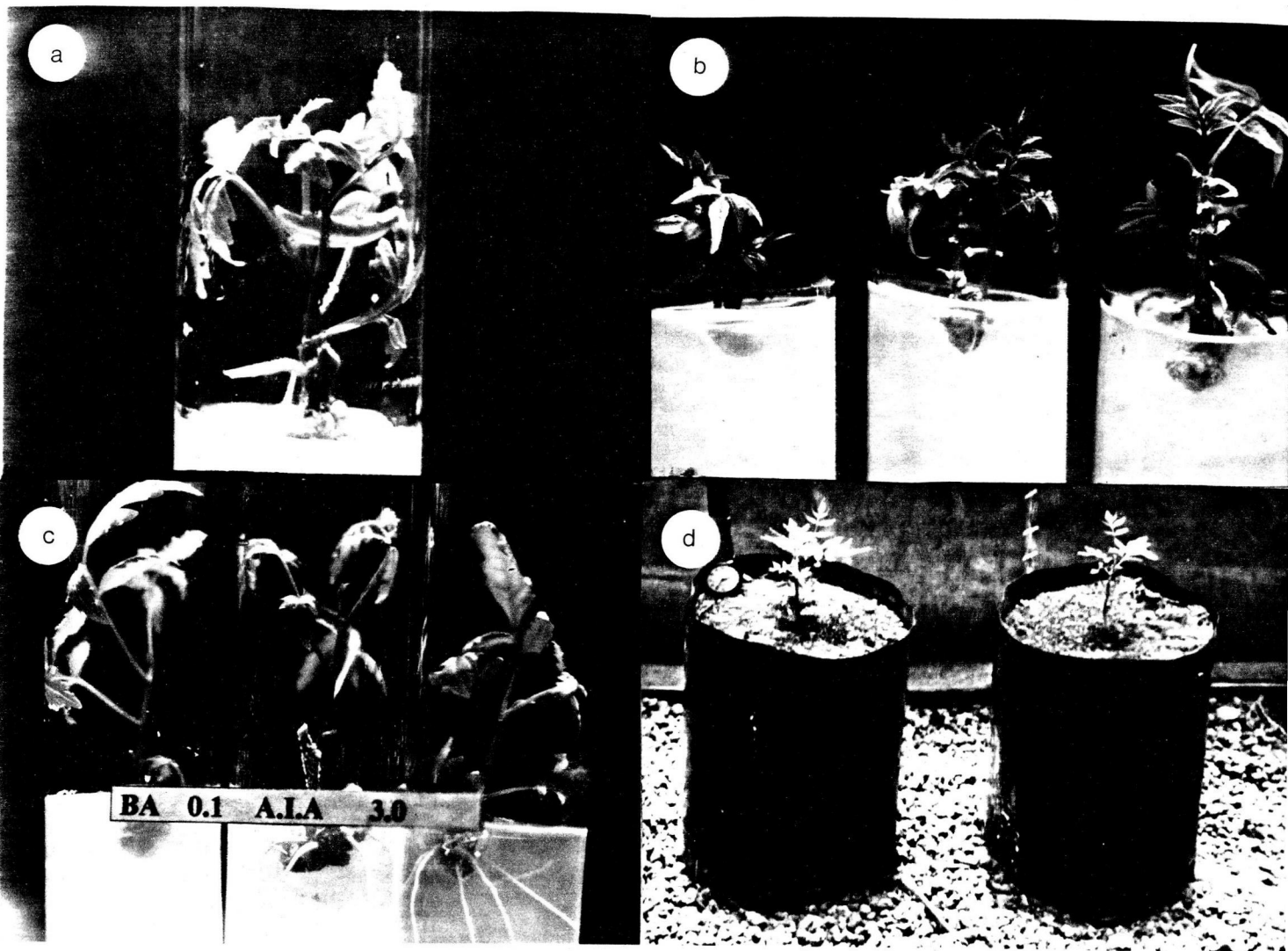


Figura 25. Etapas del cultivo *in vitro* de *Azadirachta indica* A. Juss.: a) Establecimiento aséptico del explante y desarrollo de la yema axilar. b) Multiplicación de propágulos, c) Enraizamiento y desarrollo de los explantes. d) Aclimatación de plantas *in vitro* en invernadero.

CONCLUSIONES

Se logró establecer una metodología adecuada para el cultivo del árbol del Nim *in vitro*, obteniéndose de 110 a 120 plantas por 10 explantes sembrados en 14 semanas, desde la siembra del explante hasta la obtención de planta aclimatada al medio ambiente. Potencialmente se puede obtener a partir de un explante (yema axilar) de Nim 100,000 plantas en un año.

La multiplicación de brotes se puede llevar acabo en presencia de 0.5 mg L^{-1} y 1.0 mg L^{-1} de BA..

También se puede obtener embrigénesis somática del Nim con una respuesta muy favorable debido al efecto de GA_3 en células de callo.

Para obtener rizogénesis es necesario complementar el medio de cultivo con 0.1 mg L^{-1} de BA y 3.0 mg L^{-1} de AIA.

Para la aclimatación de las plantas se observó que es de suma importancia mantener el árbol libre de patógenos y el controlar el exceso de humedad por medio de períodos cortos de ventilación, por lo menos durante la primera semana de aclimatación.

Cuando las plantas obtenidas *in vitro* fueron transplantadas del medio de cultivo a macetas con sustrato para su aclimatación, se obtuvo un 60 % de sobrevivencia de plantas.

La regeneración de planta del Nim *in vitro* es por la vía de explantes de tallo, ya que por vía semilla no fue posible debido al alto índice de presencia de contaminación especialmente bacterias.

La multiplicación *in vitro* es una metodología valiosa para la reproducción de dicha especie en cualquier época del año.

RECOMENDACIONES

- Se debe realizar un manejo fitosanitario de las semillas del Nim después de su cosecha para evitar su pudrición, que provoca problemas de contaminación por bacterias en la etapa de establecimiento aséptico de los explantes.
- De preferencia se debe trabajar con semillas de 2 a 3 semanas de cosechadas para evitar bajos porcentajes de germinación
- Cuando se realice la propagación de Nim vía *in vitro* sería recomendable que los explantes se obtuvieran de los árboles con las mejores características deseables para reproducir como son altura, producción de semillas, grosor del tallo, resistencia a plagas y enfermedades etc.
- Las partes vegetativas de donde se van a obtener los explantes deben trasladarse inmediatamente al laboratorio e introducirlos a un medio líquido con detergente para disminuir el problema de contaminación.

BIBLIOGRAFIA

- AHMED, S., M. GRAINGE, J. HYLIN, W.C. MITCHEL y J.A. LITSINGER. 1983. **Some promising plants species for use as pesst control agents under traditional farming systems**. In: natural pesticides from the Nim tree and other tropical plants Schmutterer H. and Ascher K.R.S. Eds. GTZ. Pets Eschborn West Germany. p. 565.
- AHMED, S. y M. GRAINGE. 1985. **The use of indigenous plant resources in rural develoment**. Internacional Journal For Develoment Technology 3: 123-130.
- AHMED, S. y M. GRAINGE. 1986. **Potential of the Nim tree development**. Economic Botany 40(2): 201-209.
- AHMED, S. 1995. **Cuando la ciencia aprende de la cultura: los múltiples usos de la margosa**. Ceres, F.A.O. (Roma) 155: 4-6.
- AITCHISON, P.A., M.M. MACLEOD y YEOMAN. 1977. **Growth patterns in tissue (callus) cultures**. In: Street (de.), Plant tessue and cell cultures. Univ. Of California Press, Berkley. pp. 267-306.
- AMIRATO, P.V. 1983. **Embryogenesis**. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Amirato y Y. Yamada (eds.), Handbook of plant cell culture. Vol. 1. McMillan Publ. Co., N.Y. pp. 82- 123.
- BAILEY, L.H. 1977. **Manual of cultivated plants**. Mc Millan Publishing, C.O., Inc. New York. pp. 612-613.
- BENGE, M. D. 1988. **Cultivation and propagation of the Neem Tree**. In: focus on Phytochemical pesticides. Vol. 1: The Neem Tree, Martín Jacobson De. C. R. C. Press Inc. Boca Ratón, Florida. 178 p.
- BHOJWANI, S. S., y M.K. RAZDAN. 1983. **Cellular totipotency**. In: Plant tissue culture: Theory and Practice. Elservier Science Publ. B.V. Amsterdam. pp. 71-90.
- BIDWELL, R.S.S. 1979. **Fisiología vegetal**. AGT Editor. México. pp. 128-129.
- BRECHELT, A. 1993. **El árbol Nim-historia y perspectivas de una planta de uso múltiple**. Proyecto: Fabricación de insecticidas naturales IPL-GTZ. República Dominicana. 11p. Mimeografiado.

- BRECHELT, A. y C.F. LUZ. 1995. **El Nim un árbol para la agricultura y medio ambiente**. Fundación agricultura y medio ambiente. En: Segundo Congreso Latinoamericano y del Caribe sobre Nim y otros insecticidas vegetales. República Dominicana. p. 39.
- BROW, D.C.W. 1986. **Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis**. HortScience 21(3): 763-766.
- CATIE. 1986. **Silvicultura de especies promisorias para la producción de leña en América Central, resultado de 5 años de investigación**. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 58 p.
- CHRISTIANSON, M.L. y D.A. WARNICK. 1986. **Organogenesis *in vitro* as a developmental process**. HortScience 21(3): 842.
- CRUZ, D. 1993. **Nim: Programa para promover el desarrollo rural en Venezuela**. Cooperativa Mixta El Buchal, Dabajuro, Estado de Falcon, Venezuela. 11 p.
- DEL REAL, S. J, C.H. REYES, P.A. CASTRO, G. GRACIA y M.A. GONZÁLEZ. 1995. **Conozcamos el árbol del Nim**. ECOSTA. México. Mimeografiado. 15 p.
- DEVLIN, R.M. 1980. **Fisiología vegetal**. Omega. Barcelona, España. 534 p.
- DODDS, J.H. y L.W. ROBERTS. 1984. **Organogenesis**. In: Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press., N.Y. pp. 78-88.
- DREW, R.A. 1993. **Clonal propagation of Neem by tissue culture**. Paper presented at the World Neem Conf., February 24-28 Bangalore.
- DRUART, P. 1980. **Plantlet regeneration from root callus of diofferent *Prunus* species**. Scientia Horticulturae 12(4): 339-342.
- DÜWEKE, V.P. 1992. **Heil vom baum**. Fundación Friedrich Naumann. Die Zeit (Alemania) 15(3):1-2.
- ESPINOZA, N., R. ESTRADA, V. TOVAR, J. BRYAN Y J.H. DODDS. 1986. **Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa**. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú. 16 p.
- FAGOONEE, I. 1983. **Germination tests with Neem seeds**. In. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proceedings of the 2nd Internat. Neem Conference, Rauischholzhausen, Federal Republic of Germany, 25-28 May, 1983/publ. By: Ges. Fur Techn. Zusammenarbeit (GTZ). pp. 531-538.

- GARCÍA, E. 1987. **Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen (para adaptarlos a las condiciones de la República Mexicana)**. Cuarta edición. Indianapolis 30. México, D.F. pp 130.
- GARZA, V.P. 1987. **El árbol insecticida Nim *Azadirachta indica* para el control de las plagas y el desarrollo rural en México**. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. Marilín, Nuevo León. 27 p.
- GAUTAM, V.K., K. NANDA y S.C. GRUPTA. 1991. **Differentiation in long-term callus cultures of *Azadirachta indica* A. Juss. (U.S.A.)** *In vitro* 27(3): 146.
- GEILFUS, F. 1989. **El árbol al servicio del agricultor. Guía de especies**. CATIE (Costa Rica). pp. 603-605.
- GRAINGE, M., S. AHMED, W. C. MITCHELL y J. W. HYLIN. 1985. **Plant species reportedly possessing pest - control properties**. An EWC/UH data base. Resource system Institute, East - West Center, Honolulu College of Tropical Agriculture * Human Resources. University of Hawaii. U. of Hawaii Foundation. 249 p.
- GRAINGE, M. y J.W. AHMED. 1988. **With pest-Control pests** Hand book of plants. 160 p.
- GOLDBURG, R. 1995. **Andar con pies de plomo**. Ceres, F.A.O.(Roma) 153: 21-25
- GROSSMAN, J. 1995. **Neem as an alternative fumigant (Conference Notes)**. IPM practitioner. Monitoring the Field of pest Management. Kenya. Vol XVII: 4.
- HAGER, M. 1992. **Miracle plants**. Newsweek. November, 1992. pp. 50-52.
- HELLPAP, C. 1983. **Effects of Neem kernel extracts on the fall armyworm, *spodoptera frugiperda***. In. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proceedings of the 2nd Internat. Neem Conference, Rauischholzhausen, Federal Republic of Germany, 25-28 May, 1983/publ. By: Ges. Fur Techn. Zusammenarbeit (GTZ). pp. 353-364.
- HESS, D. 1980. **Fisiología vegetal**. Omega. Barcelona, España. pp.15-45.
- HURTADO, M.D. Y M.E. MERINO. 1988. **Cultivo de tejidos vegetales**. Trillas. D.F., México. 232 p.
- IICA. 1985. **Redacción de referencias bibliográficas; normas oficiales del IICA**. 3^a de. Rev. Documentación e información agrícola No. 14. 57 p.

- INEGI. 1994. **Atlas de México**. Subsecretaría de educación básica y normal. México D. F. pp. 16-17.
- JACOBSON, M. 1989. **Phytochemical pesticides Vol.1: The Neem tree**. CRC. Press. Inc. Florida, Boca Raton. 178 p.
- JOARDER, N.; R. ISLAM y O.I. JOARDER. 1993. **Micropropagation of *Azadirachta indica* through axillary bud culture**. Paper presented at the World Neem Conf., February 24-28. Bangalore.
- JOHNSON L.P. 1993. **The Neem tree: Green resource for a sustainable 21st. Century**. Wildlife & Environment 2 (1):22-23.
- JOSHI, M.S. Y S.R. THENGANE. 1993. **Potential application of *in vitro* methods for propagation of Neem**. Paper presented at the World Neem Conf. February 24-28. Bangalore.
- JOTWANI, M.G. Y K.P. SRIVASTAVA. 1981. **Neem pesticide of the future-II: protection against field pests**. Pesticides 15(II) :40-47.
- KESHAVA, B. 1991. **El árbol del Nim, Diversidad de usos**. Perfiles liberales (Venezuela) 24: 59-60.
- KETKAR, C.M. 1985. **Potential role of Neem in plant protection**. Proc. Nath. Seminar Behavior Physiology. USA. pp. 7-14
- KOHLNBACH, 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.
- LEOPOLD, C.A. Y KRIEDEMANN. 1975. **Plant growth and development**. Mc Graw-Hill Book Co. 2a. Edición. U.S.A.
- LEOS, M.J. y S.R.P. SALAZAR. 1991. **Importación y diseminación del árbol insecticida Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) en México**. In: XXV Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Mexicana de Entomología. Oaxaca, México. pp. 106-131.
- LITZ, R.E. y R.L. JARRET. 1987. **Organogénesis y embriogénesis somática**. Apuntes mimeografiados, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. 46 p.
- MEISNER, J.; M. WYSOKI y K.R.S. ASCHER. 1976. **The residual effect of some products from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds upon larvae of Boarmia**

- (*Ascotis*) *selenaria* Schiff. In laboratorio trials. *Phytoparasitica* (U.S.A) 4(3): 185-192.
- MOHAMED, Y.Y. 1994. Shoot proliferation and plant formation from Neem (*Azadirachta indica* Juss) With thidiazuron. *Hortscience* (U.S.A) 29(5):515.
- MURALIDHARAN, E.M. Y A.F. MASCARENHAS. 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. 1977. Plant cell and organ culture as horticultural practices. *Acta Horticulturæ* 78:17-30.
- NATIONAL ACADEMY PRESS. 1993. **Nim: A tree for solving global problems.** Report of an Ad Hoc. Panel of the board on science and technology for international development. National Research council, Washington. D.C. 107 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1992. **Neem: A tree for solving global problems.** National Academy Press, Washington,. D.C. 141 p.
- PEÑA, C.G., R.L. RICO y G.T.L.VILLEGAS. 1997. **La biotecnología vegetal y su importancia para el México moderno.** IPN (México) 11: 42-45.
- PEREIRA , J. I. y R. WOHLGEMUTH. 1982. **Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). of west African origin.** J: Appl. Entomol. pp. 94, 208.
- PIMENTEL, B. 1996. **Viveros forestales.** Mimeografiado. UACH. Chapingo, México. s/p.
- RADWANSKI, S. A. y G.E. WICKENS. 1981. **Vegetative fallows and potential value of the Nim tree (*Azadirachta indica*) in the tropics.** *Econ. Bot.* 35: 398
- RAJASEKARAN, K. y M.G. MULLINS. 1979. **Embyos and plantlets from culture anthers of hybrid grapevines.** *J. Exp. Bot.* 30: 399-407.
- RAMESH, K. y M.A. PADHYA. 1990. ***In vitro* propagation of Neem, *Azadirechta indica* (A. Juss), from leaf discs.** *J. Exp. Biol. (Indian)* 28(10): 35,932
- RANGASWAMY, N.S. 1986. **Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures.** *Proc. Indian Acad. Sci. Plant. Sci.* 96: 247-271.

- RASCÓN, C. A., M.I. MORENO y P.L.A. GARCÍA. 1996. **Propagación *in vitro* del Neem *Azadirachta indica* A. por cultivo de yemas apicales.** In: III Congreso Nacional de Biotecnología. Chihuahua, México. pp. 115-116.
- REINERT, J., P.S. BAJAJ y B. ZBELL. 1977. **Aspects of organization, organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation.** In: H.E. Street (ed.), Plant tissue and cell culture. 2nd. ed. Univ. California Press, Berkley. pp. 389-427.
- REISH, B. y E.T. BINGHAM. 1980. **The genetic control of bud formation from callus cultures of alfalfa.** Plant Science Letters 20:71-77.
- ROBERT, L.M. y M.V. LOYOLA. 1985. **El cultivo de tejidos vegetales en México.** In: El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACYT. México. pp. 15-26.
- RODRIGUEZ, E. 1994. **El nim (*Azadirachta indica*) como especie prometedora para la sombra de ganado en Cuba.** Taller internacional sobre sistemas silvopastoriles en la producción ganadera. Matanzas, Cuba. pp. 13-15.
- RODRÍGUEZ, L.D.A. y C.S.R. RODRÍGUEZ. 1994. **El árbol del Nim (*Azadirachta indica*).** Colegio de posgraduados. Montecillos, Edo. de México. 69 p.
- RZEDOWSKI, J. 1994. **Vegetación de México.** Limusa. México, D.F. pp. 33-37.
- SADRE, N. L., Y. VIBHAVARI, U. DESHPANDE, K.N. MENDULKAR y D.H. NANDAL. 1984. **Male antifertility activity of *azadirachta indica* in different species.** In: Natural pesticides from the Nim tree and other tropical plants. Schmutterer H. and ascher K. R. S. Eds. GTZ Press Eschborn, West Germany. p. 473.
- SANYAL, M. y P.C. DATTA. 1986. **Neem family is a challenge to tissue culturists.** Appl. Biotechnol. Med. Aromatic- Timber- plants (1986) 31, 119.
- SANYAL, M.S., S. TIKADAR y P.C. DATTA. 1993. **Nimbin and β -sitosterol in cotyledon and cultured and tissues of *Azadirachta indica*.** Indian Drugs 20: 479-481.
- SCHULTZ, W.P. 1983. **Patological alterations in the ocarioles of *Epilachna varivestis* induce by and extrac from Neem kernels.** Proc. Ist. Int. Neem Conf. (West Germany, 1980). pp. 81-96.
- SECKINGER, G.R., B.H. McCOWN y B.E. STRUCKMEYER. 1979. **Production of anomalous structures in *Quercus rubra* L. Callus cultures.** Amer. J. Bot. 66:993-996.

- SHARP, W.R., M.R. SONDAHL, L.S. CALDAS y S.B. MARAFFA. 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.
- SHARRY, E.S. y W.I. ABEDINII. 1995. **Aplicacion de diferentes biotécnicas en *Melia azederach* L.** In: II Congreso Nacional de Biotecnología. Aguascalientes, México. pp. 73.
- SHEPARD, J.F., D. BIDNEY y E. SHALIN. 1980. **Potato protoplasts in crop improvement**. Science 208:17-24.
- SHMUTTERER, H. 1987. **Insect growth- disrupting and fecundity - reducing ingredients from the Neem and chinaberry tress**. In: Handbook of natural pesticides. Vol. III. Insect growth regulators. Por: Morgan E.D. and Mandava, N.B.. CRC Press Inc. pp. 119-170.
- SHMUTTERER, H. 1988. **Potential of Azadirachtin containing pesticides for integratet pest control in developing and industrialized countries**. J. Insect Physiol 34(7): 713-719
- SHMUTTERER, H. 1990. **Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica***. Annu. Rev. Entomol (U.S.A.) 35:271-297
- SHRIKHANDE, M., R.S. THENGANE y A.F. MASCARENHAS. 1993. **Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Azadirachta indica* A. Juss.** *In vitro* Cell. Dev. Biol. 29: 38-42.
- SHUBHADA, T., J. MEDHA y F.A. MASCARENHAS. 1995. **Somatic embryogenesis in neem (*Azadirachta indica*)**. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol.2.- Angiosperms. Kluwer Academic. Publishers, London. pp. 356-374.
- SIMMONDS, S.J. y W.M. BLANEY. 1983. **Some neurophysiological effects of azadirachtin on lepidopterous larvae and their feeding response**. In: Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proceedings of the 2nd Internat. Neem Conference, Rauischholzhausen, Federal Republic of Germany, 25-28 May, 1983/publ. By: Ges. Fur Techn. Zusammenarbeit (GTZ). pp. 163-180.
- SMITH, S.M. y H.E. STREET. 1974. **The decline of embryogenic potential as callus of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured**. Ann. Bot. 38: 233-241.

- STREET, H.E. y L.A. WITHERS. 1974. **The anatomy of embryogenesis in culture.** In: H.E. Street (ed.), Tissue culture and plant science. Academic Press. London. pp. 71-100
- STREET, H.E. 1977. **Plant tissue and cell culture.** Blackwell Scientific Publications. 614 p.
- SUNDERLAND, N. 1977. **Nuclear cytology.** In: H.E. Street (ed.), Plant tissue and cell culture. 2nd ed. Univ. California Press. Berkley. pp. 177-205.
- SWARTZ, J.A. R.H. BORDS, F. MOHAMED y K. NAESS. 1989. **Pretreatment effects on regeneration of shoots from isolated *in vitro* *Rubus* leaves.** HortScience, 1989 ASHS Annual Meeting: Abstr. 524.
- TAVERAS, F. 1994. **Control de plagas con el uso de nim en la República Dominicana (*Bemisia tabaci*, *Pseudocysta perseae* y otros).** En : Primer congreso Latinoamericano y del Caribe sobre el Nim y otros insecticidas vegetales. República Dominicana. pp. 2.
- THORPE, T.A. 1978. **Physiological and biochemical aspects of organogenesis *in vitro*.** In: T.A. Thorpe (ed.), Frontiers of plant tissue culture. Calgary: Intl. Assoc. Plant Tissue Culture. pp. 49-58.
- THORPE, T.A. 1994. **Morphogenesis and regeneration.** In: Plant cell Tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 17-36.
- TORRES, K.C. 1989. **Stages of micropropagation.** In: Tissue culture techniques for horticultural crops. New York. pp. 52-69
- VERA, A.F. 1994. **Especies para leña: arbustos y árboles para producción de energía.** CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp. 84-87.
- VIDALIE, H. 1984. **Cultivo *in vitro*.** Editorial Científica S.A. de C.V. México. 190 p.
- VILLALOBOS, A.V.M. 1995. **El futuro en nuestras manos.** Ceres, F.A.O.(Roma) 153: 18-20.
- WANG, D., L. GUI y J.S. SUN. 1988. **Tissue culture of fruit crops in China.** HortScience 23(6): 962-965.
- WANN, S.R. 1988. **Somatic embryogenesis in woody species.** In: J. Janick (ed.) Horticultural Rev., Vol. 10. Timber Press, Portland, Or. pp. 153-181.

YASUDA, T., Y. FUJII y T. YAMAGUCHI. 1985. **Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine.** Plant Cell Physiol 26: 595-597.

YEOMAN, M.M. y A.J. MACLEOD. 1977. **Tissue (callus) cultures- techniques.** In: H.E. Street (ed.). Plant tissue and cell culture, 2nd. ed. Univ. California Press. Berkley. pp.31-59.

ANEXO

Cuadro 35. Especies de artrópodos afectados por los derivados del Nim (Jacobson, 1986).

Ortópteros	
Chapulines, cucarachas, langostas	
Cucaracha oriental	<i>Blata orientalis</i>
Cucaracha alemana	<i>Blatella germanica</i>
Cucaracha americana	<i>Periplaneta americana</i>
Chapulines	<i>Melanoplus ssp</i>
Grillo de campo	<i>Gryllus pelsinvanicus</i>
Langosta del desierto	<i>Shistocerca gregaria</i> y <i>S. ssp</i>
Langosta migratoria	<i>Locusta migratoria</i>
Langosta roja	<i>Nemadacris septemfasciata</i>
Saltamonte variegado	<i>Zonocerus variegatus</i>
Homópteros	
Pulgones, escamas, chicharritas	
Salta hoja de algodón	<i>Amrasca devastans</i>
Escama amarilla	<i>A. citrina</i>
Escama roja de california	<i>Aonidiella auranti</i>
Mosca blanca	<i>Bemisia tabaci</i>
Mosca blanca algodones	<i>Aleurotrix floccococcus</i>
Pulgón de los cítricos	<i>Aphis citricola</i>
Pulgón de la caña	<i>Melanaphis sacchari</i>
Pulgón de la mostaza	<i>Lilphapis erysime</i>
Pulgón de los cítricos	<i>Toxoptera auranti</i>
Pulgón del algodón	<i>Aphis gossypii</i>
Pulgón del frijol	<i>Rhopalosiphum maidis</i>
Pulgón verde	<i>Myzus persicae</i>
Salivazo blanco	<i>Sogatella furcifera</i>
Salta hoja de la berengena	<i>Jacobiella fascialis</i>
Salta hoja del algodón	<i>Empoasca acialis, Elybica y E. fabae</i>
Silido de los cítricos	<i>Diaphorina citri</i>
Coleópteros	
Mayates, picudos, escarabajos	
Barrenador de granos	<i>Rhyzoperta dominica</i>
Conchuela del frijol	<i>Epilachna varivestis</i>
Coto rrita punteada	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>
Cotorrita verde o diabrotica	<i>D. balteata</i>
Enrollador del hoja del arroz	<i>Chiridia bipunctata</i>
Escarabajo	<i>Schematiza cardiae</i>
Escarabajo coccinelido	<i>Henosepilachna v.</i>
Escarabajo crismelido	<i>Agelasica alni</i>
Escarabajo de frutas secas	<i>Carpophilus hemipterus</i>
Escarabajo de algodón	<i>Myllocerus sp</i>
Escarabajo de follaje	<i>Ooteca beniggseni</i>
Escarabajo dorado de la papa	<i>Leptinotarsa descemlineata</i>
Escarabajo galerucido	<i>Madurasia oscurella</i>
Gorgojo confuso	<i>Tribolium castaneum y T. confusus</i>
Mayate plano de los granos	<i>Cryptolestes ferrigenus</i>
Mayate rojo	<i>Aulocophora foveicollis</i>
Picudo de la raíz del arroz	<i>Echinocnemus oryzae</i>
Picudo de los granos	<i>Oryzaephilus osurinamensis</i>
Picudo del maíz	<i>Sitophilus oryzae y S. zeamais</i>
Pulga de la hoja	<i>Podagria sp.</i>
Pulga saltona	<i>Epitrix fuscula</i>

Cuadro 35. Especies de artrópodos afectados por los derivados del Nim (Jacobson, 1986)
continuación.

Lepidopteros	
Mariposas, palomillas	
Gusano peludo	<i>Euproctis lunata</i>
Gusano bellotero	<i>Helicoverpa zea</i>
Gusano cogollero	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Gusano cortador	<i>Feltia subterranea</i>
Gusano de la cera	<i>Galleria mellonella</i>
Gusano de la hoja y la vaina	<i>Antigastra catalaunalis</i>
Gusano del ombligo	<i>Amyelois transitella</i>
Gusano del fruto del tomate	<i>Keiferia lycopersitella</i>
Gusano flota	<i>Spodoptera eridiana</i>
Gusano medidor	<i>Trichoplusia ni</i>
Gusano verde del tabaco	<i>Manduca sexta</i>
Mariposa azul	<i>Euchysops enejus</i>
Mariposa de las flores	<i>Homoessa electellum</i>
Mariposa del arroz	<i>Corcyra cephalonica</i>
Mariposa del mediterráneo	<i>Epesteia Kuheniella</i> y <i>E. cautella</i>
Mariposa del repollo	<i>Pieris brassicae</i>
Dípteros	
Moscas y mosquitos	
Mosquito	<i>Aedes togoi</i> y <i>Culex</i>
Minador de hojas	<i>Phytomyza ilicis</i>
Minador de la hoja de hortalizas	<i>Liriomyza sativae</i>
Minador del frijol	<i>Melanagromyza abtusa</i>
Mosca	<i>Musca domestica</i>
Mosca de agalla de arroz	<i>Orseolia orizae</i>
Mosca de la fruta	<i>Anastrepha ludens</i>
Mosca de la fruta del caribe	<i>A. suspensa</i>
Mosca del frijol	<i>Ophiomya phascoli</i>
Mosca del melón	<i>Dacus curcubita</i>
Mosca voladora	<i>Phomia sp</i>
Mosca voladora axzul	<i>Calliphora vicina</i>
Mosquita de la fruta	<i>Drosophila melanogaster</i>
Hymenopteros	
Avispas, hormigas, abejas	
Abeja	<i>Apis mellifera</i>
Hormiga de la madera	<i>Formica polyctena</i>
Minador de la hoja	<i>Fenus pusilla</i>
Mosca de la mostaza	<i>Athalia lugens</i>
Trips	
Trips de las flores	<i>Frankliniella occidentalis</i>
Tripido del arroz	<i>Stenchaetothrips biformis</i>
Ácaros	
Araña roja de los cítricos	<i>Panonychus citri</i>
Acaro	<i>Tetranychus cinnabarius</i>
Acaro	<i>Tetranychus urticae</i>

Cuadro 35. Especies de artrópodos afectados por los derivados del Nim (Jacobson, 1986)
continuación.

Nemátodos	
Nemátodo de quiste en la soya	<i>Heterodera glycine</i>
Nematodo de agalla	<i>Meloidogyne incognita</i>
Nematodo de la raíz	<i>Melodogine javanica</i>
Nematodo	<i>Pratylenus brachyurus</i>
Nematodo	<i>Tylenchus filiformis</i>
Hongos	
Ahogamiento de las plantulas	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Costra negra de la papa	<i>Rhizotonia solani</i>
Marchitez en hortalizas	<i>Fusarium oxysporum</i>
Marchitez del jitomate	<i>Fusarium lycopersici</i>
Tizón foliar del frijol	<i>Alternaria tenuis</i>
Crustáceos	
Ostiones	
Ostracodo	<i>Heterocypris luzonensis</i>

Cuadro 36. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

Nombre del compuesto (sales inorgánicas)	Fórmula	Concentración (mg L ⁻¹)
MACROELEMENTOS		
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
Cloruro de calcio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
Fosfato ácido de potasio	KH ₂ PO ₄	170
MICROELEMENTOS		
Ioduro de Potasio	KI	0.83
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Molibdato de sodio	Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Sulfato cúprico	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
SOLUCIÓN DE FIERRO		
Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Ácido etilendinitrilotetracetato disódico	Na ₂ EDTA	37.24

