

Establishment of the system of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica* A. Juss from cell suspensions, coupled to the production of azadiractin *in vitro*

Rafael Fernández–Da Silva * , Valeria Montilla 

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



<https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i2.169>

Abstract.- Neem (*Azadirachta indica* A. Juss; Meliaceae) is a woody tree versatile in medical, environmental and agricultural fields. In agriculture, its role is bioinsecticide, due to the secondary metabolite azadirachtin (AZA), only synthesized by this specie. To obtain the optimal concentration required a large amount of seeds, available for a short period of time per year, however, by techniques biotechnological, elite varieties coupled to a higher yield in the production of said compound can be obtained, regardless of the period of the year. Therefore, this study to establish the somatic embryogenesis system linked to the *in vitro* production of AZA in suspensions cells, from leaf and cotyledon, with different concentrations of cytokinin (BAP) and auxins (2,4-D and AIA) to regenerate plants and non-embryogenic callus, for the latter in liquid medium, to evaluate the effect of different proportions nitrate/ammonium, sodium acetate and squalene. Somatic embryos were differentiated in cell suspensions with 2 mg/L of BAP and 1 mg/L of 2,4-D, after 5 months of culture. The maximum production (52,53 mg/L) of AZA in 14 days of culture was achieved by simultaneously using nitrate (60 mM), sodium acetate and squalene (10 mg/L each).

Keywords: precursor; nitric MS; *in vitro* regeneration; cell suspension.

Establecimiento del sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* A. Juss a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de azadiractina *in vitro*

Resumen.- El neem (*Azadirachta indica* A. Juss; Meliaceae), es un árbol leñoso versátil en medicina, remediación y agricultura. En el agrícola, su rol es bioinsecticida, debido al metabolito secundario azadiractina (AZA), únicamente sintetizado por esta especie, cuya concentración óptima, requiere principalmente gran cantidad de semillas, disponibles por un breve lapso de tiempo al año, no obstante, por técnicas biotecnológicas, se puede obtener variedades elite acopladas a un mayor rendimiento en la producción de dicho compuesto, independientemente del periodo del año, por lo cual el objetivo de este trabajo fue establecer el sistema de embriogénesis somática concatenado a la producción *in vitro* de AZA en suspensiones celulares, a partir de hoja y cotiledón, con distintas concentraciones de citocinina (BAP) y auxinas (2,4-D y AIA) para regenerar plantas y callo no embriogénico, para de este último en medio líquido, evaluar el efecto de distintas proporciones de nitrato/amonio, acetato de sodio y escualeno. En suspensiones celulares se diferenciaron embriones somáticos con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de 2,4-D, luego de 5 meses de cultivo. La máxima producción (52,53 mg/L) de AZA en 14 días de cultivo, se logró empleando simultáneamente nitrato (60 mM), acetato de sodio y escualeno (10 mg/L c/u).

Palabras clave: precursor; MS nítrico; regeneración *in vitro*; suspensión celular.

Received: 15 de mayo, 2022.

Accepted: 25 de julio, 2022.

1. Introducción

El Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) es una planta arbórea de la familia Meliaceae, originada en la India, cuyo cultivo se ha extendido al Asia tropical, Australia y el neo trópico, [1]. Este árbol es un emblema ancestral indio, dado a su múltiple y versátil uso desde el año 4.500 AC

* Autor para correspondencia:

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

[2], mientras que en Venezuela se ha utilizado para recuperar suelos, reforestación elaboración de abonos e insecticidas [1]. Sin embargo, en este siglo, diferentes partes vegetativas y reproductivas de esta planta son empleados en el tratamiento en medicina popular de distintas enfermedades [3], dada la presencia de ciertos metabolitos secundarios [4], ya sea en afecciones digestivas como dermatológicas [5], como tumorales [6]. Aunado a ello, la presencia exclusiva del metabolito secundario azadiractina (AZA) [7], en esta especie vegetal, determina el rol biocontrolador de insectos plagas [8], no obstante, la producción convencional depende fundamentalmente de semillas, que al producirse una sola vez al año, por viabilidad económica necesita gran cantidad de dicha materia prima, usando mayores extensiones de tierras que no pueden usarse para otros cultivos de importancia agroalimentaria. Por tanto, las técnicas biotecnológicas por cultivo de tejidos, permiten producir masivamente a bajo costo la AZA [9], basándose en la totipotencia de las células vegetales, que puede generar células indiferenciadas denominadas callo [10], con características regenerativas de plantas (exclusivamente el Callo embriogénico) o en la producción de metabolitos secundarios (Callo embriogénico y callo no embriogénico) [11].

En relación a la regeneración de plantas *in vitro*, se ha reportado en medio sólido, ya sea a través de la germinación de semillas [12], así como de explantes como semillas [13], anteras [14], brotes axilares [15], endospermo [16] y embriones cigóticos [17, 18]. Las *in vitro* plantas obtenidas se diferencian, ya sea por organogénesis como por embriogénesis somática, tanto primaria como secundaria [19, 20, 21], distinguiéndose el desarrollo organogénico directo en explantes nodales [22], mientras que mayor es la tasa regenerativa a través de embriones somáticos desarrollados indirectamente de explantes cotiledonares [23].

La producción *in vitro* de AZA es eficiente [24] en callo, suspensiones celulares y en raíces en cabellera [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31], pero tiene mucho menos tiempo de estudio en comparación con otros metabolitos secundarios de interés comercial [32] variando los reportes de AZA entre 2,5 a 72,81 mg/L, en relación

a las condiciones biológicas, químicas y físicas del cultivo, potenciando el uso del agente permeabilizante Tritón X-100, para facilitar la extracción sin pérdida de la viabilidad celular [33] velocidad de agitación de 120 rpm [34], para mantener un nivel adecuado de oxígeno [11, 28, 29], así como de precursores como el acetato de sodio, y escualeno [35], incrementando los niveles de nitrógeno [36], utilizando callos friables de diferente origen [37, 38], o tipo [39], donde el último reporte de suspensiones celulares derivadas de callo friable verde amarillento derivado de flores, utilizando los precursores pirofosfato geranil y isopentil pirofosfato y altos niveles de nitrógeno repercutió en 71,6 mg/L de AZA [40] o con extracto de levadura logrando 190,5 mg/L [41].

A pesar de los reportes de eficientes protocolos de regeneración por embriogénesis somática en Neem, no se ha descrito este sistema en suspensiones celulares, el cual facilitaría la masiva y rápida micropropagación de plantas elites en la producción de AZA. Asimismo, por suspensión celular, también se conoce mucho de la producción de este metabolito secundario, como el mayor rendimiento empleando callo no embriogénico de segmentos foliares, donde sería apropiada la optimización de los parámetros químicos referentes a la combinación de precursores químicos con distintas relaciones de nitrógeno. De tal manera, que el objetivo de esta investigación, fue establecer el sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de azadiractina *in vitro*.

2. Materiales y métodos

Cultivo in vitro en medio sólido

A partir de árboles de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sanos, ubicados en el Campus de la Universidad de Carabobo (Estado Carabobo-Venezuela), se obtuvieron frutos inmaduros, que fueron el material biológico inicial de los ensayos *in vitro* en el año 2017. Estos se desinfectaron el mismo día de su colecta, en una campana de flujo laminar horizontal, escindiendo el embrión cigótico, aislando primero el epicarpio

y mesocarpio, permaneciendo solo el endocarpio, que se lavó dos veces por 2 min cada uno, con agua destilada estéril y detergente líquido comercial (Dodecilbencensulfonato de sodio, Clic[®], Fácil Química C.A.). Posteriormente, se efectuó un lavado con isopropanol al 70 % v/v durante 30 segundos y con agua destilada estéril por 1 min, otro lavado con cloro comercial (3,5 % de hipoclorito de sodio) al 20 % v/v y Tween 20 (1 gota/10mL) por 5 min, y definitivamente 3 lavados con agua destilada estéril de 1 min cada uno, para eliminar el cloro y alcohol isopropílico sobrante. Finalmente, se sumergió en una solución de cisteína al 1 % en agua destilada estéril por 30 min, para minimizar la oxidación del embrión cigótico como explante inicial. De este se desarrolla la *vitro planta* en el medio MS con 0,2 mg/L de BAP (6-N-bencil-aminopurina), en oscuridad continua y temperatura ambiente (25 °C) hasta la diferenciación radical y la apertura de la hojas cotiledonares, estimulando el desarrollo de la misma a $120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ de iluminación continua, que luego de 2 semanas se obtuvo como explantes definitivos (cotiledón y hoja) para la inducción de callo (embriogénico “E”; no embriogénico “NE”) en placas de Petri, con medio MS sólido suplementado con distintos tipos y niveles de reguladores del crecimiento, medios de cultivo óptimos establecidos por Artigas y Fernández [19] y Fernández *et al.* [21] en oscuridad continua y temperatura ambiente (25 °C). Para segmentos foliares se empleó 1 mg/L de BAP con 0,4 mg/L de AIA (ácido índol acético), mientras que para cotiledón se utilizó 1 mg/L de BAP con 0,4 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Cultivo in vitro en medio líquido

A partir de segmentos pequeños de callo E o NE se iniciaron las suspensiones celulares, siguiendo el sistema de Fernández *et al.* [42]. En matraces Erlenmeyer con 100 mL de medio líquido, de idéntica composición para el inducción callogénica en medio sólido según el tipo de explante, se colocó mediante una pinza y/o bisturí estéril 1 g de los trozos disgregados del tipo de callo (según el caso). Con el callo E derivado de secciones de hoja y de cotiledón se evaluó la

inducción de la embriogénesis somática, mientras que del callo NE originado de segmentos foliares se evaluó la producción de azadiractina (AZA). Los cultivos inicialmente de suspensión gruesa, se mantuvieron en oscuridad continua y a temperatura ambiente (25 °C), con agitación continua de 150 rpm, para facilitar una mayor disgregación de los agregados celulares. Después de 2 semanas, se pasó a través de un tamiz de malla de acero (150 mesh), obteniéndose una suspensión fina, que se dejó en agitación a 100 rpm, a temperatura ambiente (25 °C) y oscuridad continua, variando la reposición de medio de cultivo, cada 15 días por 5 meses para inducción de embriones somáticos y sin renovación (estrés) por 5 semanas para la producción de AZA. Para el proceso regenerativo se evaluó la combinación de la citocinina BAP (1, 2, 4 y 6 mg/L) con la auxina 2,4-D (0,4, 1 y 2 mg/L), mientras que para la síntesis de AZA la incidencia de luz fue nula, para facilitar la mayor producción de este terpenoide, ya que al ser este fotosensible se degrada con dicho estímulo [43].

Evaluación morfo histológica

La caracterización anatómica y morfológica de las suspensiones celulares, se efectuó de acuerdo al protocolo establecido por Fernández *et al.* [21, 42, 44] y Artigas y Fernández [19, 20]. Para el registro fotográfico se empleó un microscopio estereoscópico Leica MZ75 y para el estudio anatómico se empleó un microscopio compuesto Leica DM1000.

Producción y extracción de azadiractina (AZA)

La producción de AZA, se evaluó una vez por semana, durante 5 semanas consecutivas en un cultivo, de la misma composición descrita anteriormente para suspensión celular, pero suplementada con 10 mg/L de Tritón X-100 (agente permeabilizante de la membrana), en función de las siguientes variables: relación de las sales de nitrógeno en mM $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 40:20 (KNO_3 : 20; NH_4NO_3 :20), 50:10 (KNO_3 : 40; NH_4NO_3 :10), y 60 (KNO_3 : 60; NH_4NO_3 :0) combinadas con los precursores acetato de sodio (AC: 0, 10 y 50 mg/L) y escualeno (ES: 0, 10 y 50 mg/L), realizándose treinta (30) replicas por

tratamiento. Se determinó el nivel de AZA por espectrofotometría UV-visible, una técnica barata, expedita y exacta, tomando en consideración el patrón de concentración conocida del metabolito secundario [45], siguiendo el método de la vainillina aceptada para limonoides relacionados a AZA [46], el cual inicia tomando 1 mL de medio de cultivo, que se trasladó a un tubo de centrifuga Falcon cónico de 10 mL, donde se añadió 5 mL etanol al 9 % v/v, para inmediatamente mezclar por inversión, centrifugándose a 7.000 rpm por 15 minutos. Consecutivamente, se evaporó el etanol de la muestra en un baño de María a 75 °C, resuspendiéndose la muestra subsiguientemente en 1 mL de agua destilada estéril, que se almacenó a -80 °C, hasta el instante de la evaluación por espectrofotometría, la cual se efectuó tomando 0,35 mL de la muestra almacenada, a los cuales se les añadió 0,1 mL de solución de metanol de vainillina (0,02 mg/mL), agitándose por inversión, y dejándose reposar por 2 minutos. Prontamente, se agregaron 0,15 mL de ácido sulfúrico concentrado al 97 % (v/v) en 3 partes de 0,05 mL, agitándose por inversión por 10 segundos con cada adición. Inmediatamente de esto, se adicionaron 0,35 mL de metanol, dejándose reposar la muestra por 15 min a temperatura ambiente (25 °C). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Genesys™ 10, UV-Vis) a 577 nm. Los datos obtenidos se valoraron por medio de su comparación con una curva estándar de AZA, la cual se realizó utilizando soluciones patrón de azadiractina en diclorometano, entre 0,01–1 mg/mL, que asintió validar la exactitud del método espectrofotométrico que se manejó para establecer la AZA en este estudio [47].

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de la diferenciación de agregados embriogénicos y embriones somáticos, en función de los reguladores de crecimiento y explantes, mientras que en la producción de AZA se efectuó en función de la relación de sales de nitrógeno (nitrato y amonio) y precursores químicos (AC y ES), aplicando una ANOVA de dos vías una vez corroborado que los datos cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, utilizando el programa de análisis

estadístico PAST (versión 3.15, Hammer Ø., Museo de Historia Natural, Universidad de Oslo, Noruega). También se realizaron comparaciones puntuales a posteriori mediante la prueba de Tukey. En todos los casos, se utilizó como criterio un valor de significancia de $p < 0,05$ [48]. Los resultados de inducción de embriogénesis somática se evaluó con las variaciones promedio de células y agregados embriogénicos en curvas continuas en función del tiempo, en relación a las combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, mientras que la producción de AZA se valoró en función la concentración del metabolito con los tratamientos referentes a la combinación de sales de nitrógeno y precursores químicos.

3. Resultados y discusión

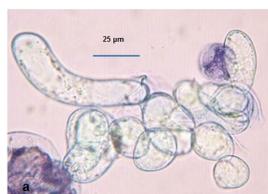
Las características de las poblaciones de las células y de los agregados celulares en una suspensión celular, varían en función al tipo de callo empleado y a su vez del explante de origen, ya sea para establecer suspensiones a partir de callo embriogénico (E) para estudiar la embriogénesis somática o con callo no embriogénico (NE) para la producción de azadiractina (AZA). Así la suspensión celular obtenida del callo E de hoja (De color blanco y de consistencia compacta por presentar “neomorfos”) fue menos concentrada (poco turbia) que la obtenida del callo E originado del cotiledón (color beige, consistencia suave), obteniéndose una población celular heterogénea, ya que no se descarta la presencia de “parches” callo NE, mientras que en las suspensiones no embriogénicas, predominan las células NE. En este sentido, las células no embriogénicas y embriogénicas pueden estar agrupadas, siendo hialinas, alargadas y de mayor tamaño las células no embriogénicas, algo densas en citoplasma, isodiamétricas y más pequeñas las células embriogénicas (Figura 1a), encontrándose también de forma individual células no embriogénicas (Figura 1b) y embriogénicas (Figura 1c), o en grupo celular homogéneo no embriogénico (Figura 1d) o embriogénico (Figura 1e), así como en forma de agregados celulares poco compacto (Figura 1f), o compacto (Figura 1g), donde se evidencia un

patrón de división celular simétrico (Figura 1g) o asimétrico (Figura 1h), potenciándose el desarrollo de embriones somáticos (Figura 1i) o callo E (Figura 1j), que facilitaron la proliferación primaria indirecta y asincrónica de embriones somáticos individuales de forma globular (Figura 1k), torpedo (Figura 1l) y cotiledonar (Figura 1m), diferenciándose asincrónica y directamente a nivel epicotilar en estos dos últimos, embriones somáticos secundarios (Figura 1n), que germinaron (Figura 1ñ) y desarrollaron plantas completas (Figura 1o). En Cultivo *in vitro* de Neem, solo hay algunos trabajos del proceso regenerativo por organogénesis y embriogénesis somática en medio sólido, donde de manera detallada se describen los sistemas, en particular el embriogénico primario y cíclico o repetitivo, el cual es de mayor tasa regenerativa, empleando explantes cotiledonares [19, 20, 21], por tanto, este es el primer reporte en el establecimiento del sistema de suspensión celular de Neem, donde las características de las células, agregados celulares, patrón de división celular, estadios del embrión somático, asincronía embriogénica y diferenciación directa de embriones somáticos repetitivos es similar al indicado en *Coffea arabica* [42].

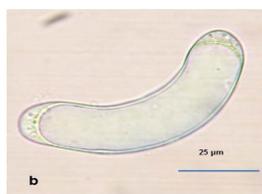
Al evaluar cada 15 días los cultivos en suspensión, se observó un crecimiento lento, el oscurecimiento (oxidación) del medio por la acumulación de sustancias fenólicas al ser un sistema sin recambio, donde la mayor proliferación de células y agregados celulares fue a partir de 30 y 60 días al emplear respectivamente callo E de hoja y cotiledón, empleando altas concentraciones de BAP y 2,4-D, en particular 2 BAP+1 2,4-D para el primero y 4 BAP+1 2,4-D para el segundo (Figura 2). Destacándose significativamente una formación de células y agregados en el caso de callo E originado de cotiledón, distinguiéndose un promedio de $4,5 \pm 8$ /mL de estructuras embriogénicas primarias y secundarias en diferentes estadios a los 5 meses, únicamente en el medio óptimo ya reseñado. El empleo de BAP combinado con auxinas como el 2,4-D o AIA, favorece la inducción de la embriogénesis somática en medio sólido en Neem [17, 18, 21, 49, 50, 51],

pero en medio líquido este trabajo el primer reporte de ello, donde el cultivo sin reemplazo de medio, favoreció la acumulación de compuestos fenólicos, una condición de estrés que pudo haber contribuido la activación de la embriogénesis somática, tal como lo plantea un trabajo previo [52], al indicar que la exposición transitoria de las células a condiciones fuertes de estrés (estrés osmótico, aplicación de metales pesados, alta o baja temperatura, hipoxia, radiación ultravioleta, tratamientos mecánicos o químicos) y/o altas concentraciones de reguladores del crecimiento, facilita el desarrollo de embriones somáticos, tal como se describe en callo embriogénico de la planta leñosa *Feijoa sellowiana*, donde se favorece la diferenciación de embriones somáticos en altas concentraciones de los compuestos fenólicos floroglucinol y ácido caféico [53], no obstante, no se ha dilucidado las vías específicas por medio de la cual este agente estresante activa el desarrollo de los embriones somáticos. Asimismo, la baja diferenciación de embriones somáticos en un único medio de cultivo, evidencia lo recalcitrante de la especie vegetal al evento regenerativo en medio líquido, tal como se observó en medio sólido [21], donde altas concentraciones de citocininas como el BAP favorece tanto la embriogénesis primaria como secundaria en plantas leñosas como el Neem [19, 20, 21] o el café [42].

Al evaluar la producción de azadiractina (AZA) con 15 tratamientos en 5 semanas de cultivo, la variación en función del tiempo fue similar con los tratamientos, donde se incrementó la concentración del metabolito secundario en las dos primeras semanas de cultivo (14,3–52,9 mg/mL), decayendo progresivamente en las tres restantes (28,8–14,1 mg/mL), encontrándose la mayor síntesis en la segunda semana (33,1–52,9 mg/mL). Asimismo, en función de la combinación de precursores químicos y relaciones de sales de nitrógeno en los tratamientos, se observó que las menores concentraciones de AZA (12,1–37,2 mg/mL) estuvieron en tratamientos sin precursores (T1-T3), mientras que las mayores concentraciones (14,4–52,9 mg/mL) se detectaron en tratamientos (T5-T6) con los dos precursores (10 mg/mL de acetato de sodio “AS”+ 10 mg/mL escualeno “ES”) con las



(a) Agrupación de células embriónicas (E) y no embriónicas (NE)



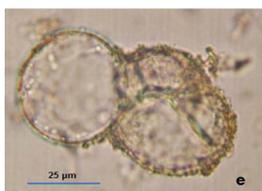
(b) Célula NE individual



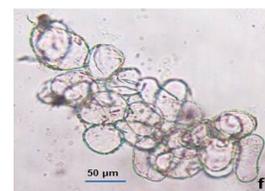
(c) Célula E individual



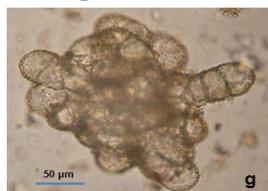
(d) Grupo de células NE



(e) Grupo de células E



(f) Agregado celular poco compacto



(g) Agregado celular compacto con (h) Agregado celular compacto con (i) Agregado celular compacto con células E en patrón de división células E en patrón de división embrión somático globular simétrica asimétrica



(j) Microcallos



(k) Embrión somático globular



(l) Embrión somático torpedo



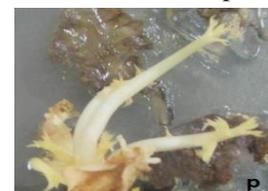
(m) Embrión somático con cotiledonar



(n) Diferenciación directa (ñ) Germinación de em- briones somáticos secundarios



(o) Vitro plantas con pri- meras hojas desarrolladas



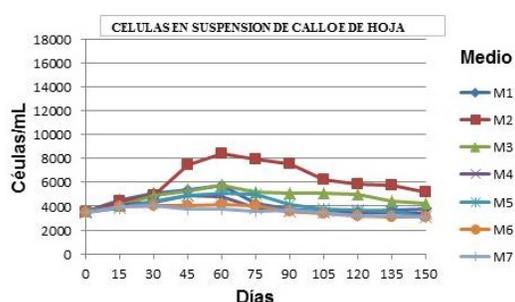
(p) Vitro plantas con pri- meras hojas desarrolladas

Figura 1: Morfo anatomía de la suspensión celular de *Azadiractha indica*

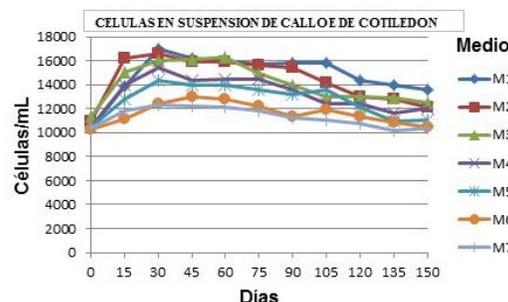
mayores relación de nitrato ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, 50:10 y 60:0), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,0002$) entre estos, siendo la mayor concentración (52,9 mg/mL) en T6 (10 mg/mL AC+10 mg/mL ES+MS 60:0), siendo menores las concentraciones de AZA en tratamientos (T7-T15)

con mayores concentraciones de precursores (50 mg/mL de AS y/o ES) (Figura 3).

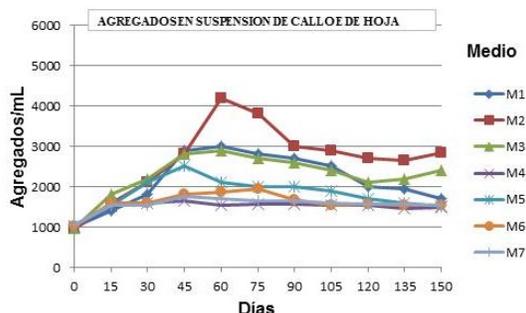
En este sentido, estos resultados confirman la tendencia de incremento progresivo de la síntesis de AZA hasta los 14 días (2 semanas de cultivo), disminuyendo en las subsiguientes semanas de



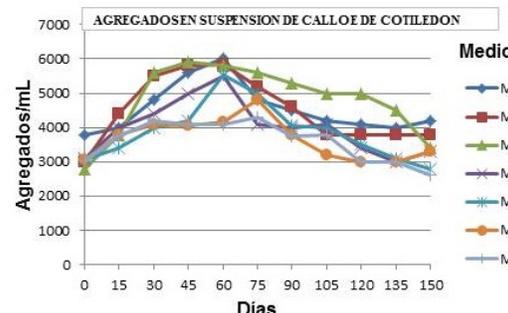
(a) Células en suspensión de Callo E de Hoja



(b) Células en suspensión de Callo E de Cotiledon



(c) Agregados en suspensión de Callo E de Hoja



(d) Agregados en suspensión de Callo E de Cotiledon

M1: 1 BAP+0,4 2,4-D; M2: 2 BAP+1 2,4-D; M3: 4 BAP+1 2,4-D; M4: 6 BAP+ 1 2,4-D; M5: 2 BAP+2 2,4-D; M6: 4 BAP+2 2,4-D M7: 6 BAP+2 2,4-D

Figura 2: Variación en el número de células y agregados por mL en suspensión de callo E derivado de segmentos foliares y de cotiledón, cada 15 días durante 5 meses de cultivo en 7 medios con distintas concentraciones (mg/mL) de BAP y 2,4-D

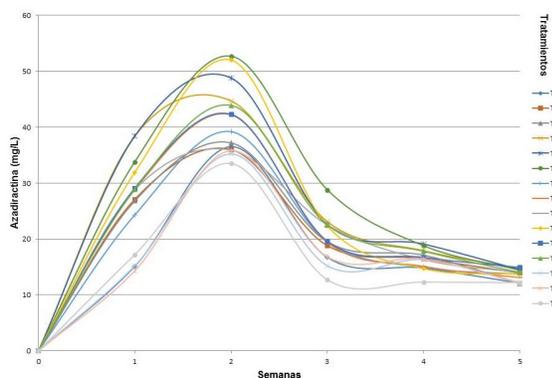
cultivo, por el agotamiento de nutrientes en el medio nutritivo, descrito previamente en suspensiones celulares de callo NE derivado de secciones foliares [39], explicándose que la síntesis del metabolito secundario probablemente se da por tres factores:

1. una menor tasa de síntesis, ya que se alcanza una fase estacionaria,
2. la iniciación de un proceso de degradación y
3. a cambios en la estructura del fitoquímico, derivando este en otros compuestos no-detectables [54],

donde la aparición de estos factores está asociada a los cambios en la composición de nutrientes en el medio de cultivo, tales como nitrógeno, fósforo y fuente de carbono como la sacarosa, que progresivamente son metabolizados por las células [54], como en los cultivos celulares de

callos derivados de brotes de *A. indica*, que para el día 12, más de la mitad del nitrato y el total de sacarosa presente en el cultivo había sido consumido [55]. Asimismo, también se indica que la combinación de 10 mg/mL de acetato de sodio y escualeno como precursores químicos fue el óptimo en la producción del metabolito secundario (44,2 mg/mL) [39], sin embargo, fue menor a la concentración obtenida en este trabajo (52,9 mg/mL), debido al incremento de nitrógeno (relación nítrica en el medio de cultivo MS 60:0).

Con respecto a la variación del pH del medio durante las seis semanas de cultivo, se encontró un incremento del nivel (6,2–6,5) del mismo a partir de la segunda semana, en función de la relación de sales de nitrógeno empleadas, partiendo de 5,8 (inicio del cultivo), hasta 6,8–7,2 en la quinta semana (Figura 4). Esta respuesta es explicada por el hecho que la absorción del nitrógeno inorgánico puede alterar fuertemente el pH del medio, lo cual



Tratamientos: T1: 0 AC+0 ES+MS 40:20; T2: 0 AC+0 ES+MS 50:10; T3: 0 AC+0 ES+MS 60:0; T4: 10 AC+10 ES+MS 40:20; T5: 10 AC+10 ES+MS 50:10; T6: 10 AC+10 ES+MS 60:0; T7: 10 AC+50 ES+MS 40:20; T8: 10 AC+50 ES+MS 50:10; T9: 10 AC+50 ES+MS 60:0; T10: 50 AC+10 ES+MS 40:20; T11: 50 AC+10 ES+MS 50:10; T12: 50 AC+10 ES+MS 60:0; T13: 50 AC+50 ES+MS 40:20; T14: 50 AC+50 ES+MS 50:10; T15: 50 AC+50 ES+MS 60:0.

Figura 3: Producción *in vitro* de azadiractina en el tiempo (semanas) en función de la combinación de distintas relaciones MS de nitrógeno “ $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ” (40:20, 50:10 y 60:0 o “nitrítico”) con los precursores acetato de sodio “AC” (0, 10 y 50 mg/L) y escualeno “ES” (0, 10 y 50 mg/L)

afecta a la azadiractina sintetizada. En el caso más específico de los iones NO_3^- , presentes en el nitrato de potasio (KNO_3) del medio MS, su consumo resulta en un incremento del pH del medio. La azadiractina es una molécula estable en disoluciones acuosas medianamente ácidas, con un pH entre 4 y 6, siendo inestable en soluciones fuertemente ácidas o alcalinas, e incluso muy cercanas a pH 7 [56]. Estas variaciones son similares a las reportadas por otros investigadores [54, 55], donde el pH de 5,8 al inicio del cultivo, se reduce durante los primeros 10 días hasta valores entre 4,5–5, para luego aumentar nuevamente, alcanzando valores de hasta 6,2 en el día 16. Igualmente, es posible que estas variaciones en el pH sean consecuencia del consumo de otros iones presentes en el medio nutritivo o a la excreción de sustancias de desecho en este.

Al detallar la síntesis de AZA en la segunda semana de cultivo en función de la combinación de precursores y relaciones de sales de nitrógeno, evidenciamos que significativamente ($p \leq 0,0005$)

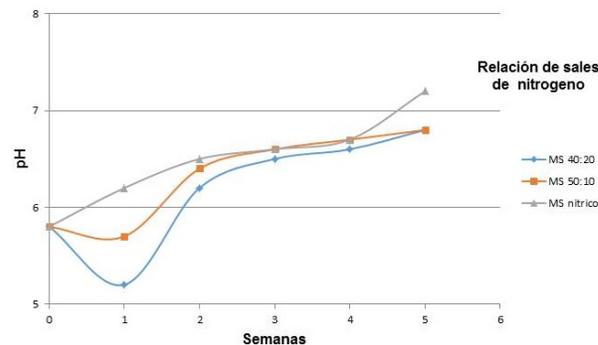
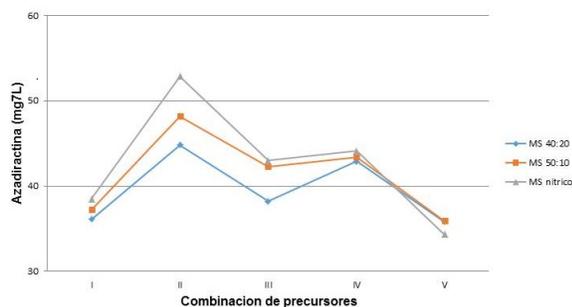


Figura 4: Variación del pH en función del tiempo de cultivo (semanas) en medios MS de nitrógeno “ $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ” con diferentes combinaciones (40:20, 50:10 y 60:0 o “nitrítico”).

la mayor concentración del metabolito secundario se halla al combinar 10 mg/mL AC+10 mg/mL ES con la mayor relación de nitrógeno nitrítica ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: MS 50:10 y MS 60:0) (Figura 5). De tal manera, se ratifica el importante papel de los precursores acetato de sodio y escualeno en la producción de azadiractina [57], donde el primero al no pertenecer a la ruta biosintética del mismo, debe ser transformado en ácido acético, y posteriormente incorporarse al ciclo de los ácidos tricarbónicos, permitiendo un incremento en los niveles de acetil CoA, que comprende el primer paso en la ruta del mevalonato, mientras que el segundo es un precursor obligado que participa directamente en la ruta de síntesis, incorporándose sin necesidad de ser transformado, facilitando su paso a 2,3-oxidoescualeno, después a lanosterol, seguido de productos intermedios hasta llegar a la azadiractina. Así hay reportes que indican que es mayor la síntesis de AZA empleando individualmente escualeno [35, 58] o acetato de sodio [31], sin embargo, la combinación de ambos precursores en concentraciones óptimas en el interior celular mejora la síntesis del metabolito secundario, ya que actúan en cascada a distintos niveles de la síntesis de triterpenoides [32, 33], pero si se aumenta mucho sus concentraciones pueden inhibir por retroalimentación la ruta biosintética, disminuyendo significativamente el nivel de AZA [31, 57, 58, 59], como se demostró en cultivos en raíz en cabellera de *A. indica*, principalmente

al utilizar 50 mg/ml de escualeno [31] o con suspensiones de callo NE de hojas al combinar 50 y 100 mg/L de AC y ES [39], tal como se observó en esta investigación.



I: 0 AC+0 ES; II: 10 AC+10 ES; III: 10 AC+50 ES; IV: 50 AC+10 ES; V: 50 AC+50 ES.

Figura 5: Producción in vitro de azadiractina en la segunda semana de cultivo, agrupando los resultados según las relaciones MS de nitrógeno “ $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ” (40:20, 50:10 y 60:0 o “nitrógeno”) con los precursores acetato de sodio “AC” (0, 10 y 50 mg/L) y escualeno “ES” (0, 10 y 50 mg/L)

Por otra parte, la relevancia en la proporción de sales de nitrógeno en cultivo in vitro, es destacada por varios investigadores [60, 61], que plantean que a pesar que el nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) es preferido por el metabolismo celular vegetal, dado al menor requerimiento energético que en el caso del ion NO_3^- del nitrato de potasio (KNO_3), sólo pocas especies vegetales pueden desarrollarse bien cuando el NH_4^+ es proporcionado como fuente de nitrógeno mayoritaria, debido a efectos negativos sobre el crecimiento y morfogénesis, y sobre la producción de metabolitos secundarios. En tal sentido, mejores resultados en la síntesis de metabolitos secundarios, suelen ser obtenidos cuando se suministran ambos iones en simultáneo, estando el NO_3^- en mayor proporción, y, en algunos casos, cuando este es la única fuente de nitrógeno en el medio, tal como se describe al aplicar una proporción de nitrato:amonio en 5:1 en la producción de Jaceosidina en *Saussurea medusa* [62], de artemisina en *Artemisia annua* [63], de ginsenosidos por *Panax ginseng* con solo medio nitrógeno [61]. Así en el caso de *A. indica*, en callos derivados de semillas inmaduras, es mayor la

concentración de AZA (así como en la producción de biomasa) al incrementar la proporción de nitrato respecto a la de amonio, obteniendo la mayor producción del metabolito secundario (12,49 mg/L) cuando el nitrato fue utilizado como única fuente de nitrógeno [36], ratificando los resultados encontrados en este trabajo, donde se logró un mayor rendimiento de azadiractina a partir de callo no embriogénico derivado de tejido foliar, combinando ambos precursores en MS nitrógeno, lo que potencia la realización de otros estudios in vitro a nivel de biorreactores, a fin de obtener de manera continua este metabolito secundario de importancia bioinsecticida.

4. Conclusiones

Este trabajo es el primer reporte en *Neem* de embriogénesis somática a partir de suspensiones celulares, diferenciando embriones somáticos primarios y secundarios, utilizando altas concentraciones de la citocinina BAP (2 mg/L) combinada con la auxina 2,4-D (1 mg/L) luego de 5 meses de cultivo sin recambio. Mientras que la mayor producción (52,53 mg/L) de AZA en 14 días de cultivo, se logró empleando simultáneamente nitrato (60 mM), acetato de sodio y escualeno (10 mg/L c/u). Estos hallazgos pudieran ser la base de subsiguientes investigaciones en bioreactores, para la micro propagación masiva de plantas elite y la producción a gran escala de este importante metabolito secundario de función bioinsecticida.

Agradecimientos

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

5. Referencias

- [1] M. Urdaneta, *Neem Un Árbol Milagroso*, 1st ed. Maracaibo-Venezuela: Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, 2001.

- [2] M. Vanisree, C. Lee, S. Lo, S. Nalawade, C. Lin, and H. Tsay, "Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures," *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. 45, no. 1, pp. 1–22, 2003.
- [3] K. Biswas, I. Chattopadhyay, and R. Banerjee, "Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*)," *Current Science*, vol. 82, no. 11, pp. 1336–1345, 2002.
- [4] R. Bijauliya, S. Alok, D. Chanchal, M. Sabharwal, and R. Yadav, "An Updated review of pharmacological studies on *Azadirachta indica* (Neem)," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 9, no. 7, pp. 2645–2655, 2018. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(7\).2645-55](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(7).2645-55)
- [5] S. Akbar, *Handbook of 200 Medicinal Plants a comprehensive review of Their traditional medical uses and scientific justifications*, 1st ed. Switzerland: Springer, 2020.
- [6] S. Agrawala, D. Poplib, K. Sircarb, and A. Chowdhry, "Are view of the anti cancer activity of *Azadirachta indica* (Neem) in oral cancer," *Journal of Oral Biology Craniofacial Research*, vol. 10, no. 2, pp. 206–209, 2020. <https://doi.org/10.1016%2Fj.jobcr.2020.04.007>
- [7] M. Gowda, S. Ambardar, and C. Kole, *The Neem Genome*, ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2019.
- [8] S. B. M. Dougoud, J.; Toepfer and W. Jenner, "Efficacy of homemade botanical insecticides based on traditional knowledge. A review," *Agronomy of Sustainable Development*, vol. 39, pp. 37–57, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13593-019-0583-1>
- [9] N. Joshee, A. Sadanand, and D. Parajuli, *Medicinal Plants From Farm to Pharmacy*, 1st ed. Switzerland: Springer, 2019.
- [10] T. Çalışkan, R. Hatipoğlu, and S. Kirici, "Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under In vitro Conditions," *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, vol. 7, no. 7, pp. 971–980, 2019.
- [11] F. Orozco, G. Sepúlveda, G. Trejo, A. Zamilpa, and M. Rodríguez, "Oxygen limitations to grow *Azadirachta indica* cell culture in shake flasks," *Revista mexicana de ingeniería química*, vol. 10, no. 3, pp. 343–352, 2011.
- [12] B. Murthy and P. Saxena, "Somatic embryogenesis and plant regeneration of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)," *Plant Cell Report*, vol. 17, no. 6–7, pp. 469–475, 1998. <https://doi.org/10.1007/s002990050427>
- [13] A. Wewetzer, "Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin," *Phytoparasitica*, vol. 26, no. 1, pp. 7–52, 1998. <https://doi.org/10.1007/BF02981265>
- [14] V. Gautam, K. Nanda, and S. Gupta, "Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss." *Plant Cell, Tissue Organ and Culture*, vol. 34, no. 1, pp. 13–18, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00048458>
- [15] S. Sharry, J. Cabrera, L. Herrera, R. Rangel, S. Ledo, and W. Abedini, "An alternative pathway for plant in vitro regeneration of chinaberry tree *Melia azedarach* L. derived from the induction of somatic embryogenesis," *Journal of Biotechnology Spec Issue*, vol. 9, no. 3, pp. 188–194, 2006.
- [16] T. Thomas and R. Chaturvedi, "Endosperm culture: a novel method for triploid plant production." *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 93, no. 1, pp. 1–14, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6>
- [17] R. Chaturvedi, M. Razdan, and S. Bhojwani, "In vitro morphogenesis in zygotic embryo cultures of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.)," *Plant Cell Report*, vol. 22, no. 11, pp. 801–809, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0768-0>
- [18] G. Rout, "In vitro somatic embryogenesis in callus cultures of *Azadirachta indica* A. Juss.- a multipurpose tree," *Journal of Forest Research*, vol. 10, no. 4, pp. 263–267, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10310-004-0130-y>
- [19] M. Artigas and R. Fernández, "Establecimiento del sistema de regeneración por embriogénesis somática de *Azadirachta indica* A. Juss." *Acta Biológica Colombiana*, vol. 20, no. 2, pp. 73–83, 2015. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.44200>
- [20] M. Artigas and R. Fernández, "Morpho-anatomical characterization of secondary somatic embryogenesis in *Azadirachta indica* (Meliaceae)," *Acta Botánica Mexicana*, vol. 122, no. 1, pp. 1–14, 2018. <https://doi.org/10.21829/abm122.2018.1242>
- [21] R. Fernández, A. Villarroel, L. Cuamo, and V. Storaci, "Evaluación de un sistema de regeneración por embriogénesis somática de Neem (*Azadirachta indica*)," *Acta Biológica Colombiana*, vol. 21, no. 3, pp. 581–592, 2016. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n3.52626>
- [22] A. Bello, K. Aliabad, A. Saravi, and H. SodaeiZade, "Determination of the Best Culture Medium and plant growth regulators for micropropagation of Neem Tree (*Azadirachta indica* A.Juss)," *International Journal of Horticultural Science and Technology*, vol. 9, no. 2, pp. 237–245, 2022. <https://doi.org/10.22059/IJHST.2021.322456.463>
- [23] G. N. S. Dhandapani, B.; Ramasamy and K. Kalyanasundaram, "Regeneration potential of different explants during micropropagation of neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss)," *Journal of Phytology*, vol. 13, pp. 171–177, 2021. <https://doi.org/10.25081/jp.2021.v13.7352>
- [24] D. Thakore and A. Srivastava, "Review: Production of biopesticide azadirachtin using plant cell and hairy root cultures," *Engineering in Life Sciences*, vol. 17, pp. 997–1005, 2017. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700012>
- [25] S. Srivastava and A. Srivastava, "Statistical medium optimization for enhanced azadirachtin production

- in hairy root culture of *Azadirachta indica*,” *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 48, pp. 73–84, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9395-y>
- [26] S. Srivastava and A. Srivastava, “Azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in a modified stirred tank reactor,” *Bioprocess and Biosystem Engineering*, vol. 35, pp. 1549–1553, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0745-x>
- [27] S. Srivastava and A. Srivastava, “In Vitro azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in nutrient mist bioreactor,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 166, no. 2, pp. 365–378, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9430-9>
- [28] S. Srivastava and A. Srivastava, “Strategies to overcome oxygen transfer limitations during hairy root cultivation of *Azadirachta indica* for enhanced azadirachtin production,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 167, p. 1818–1830, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9531-5>
- [29] S. Srivastava, A. Srivastava, and R. Palavalli, “Development of a mathematical model for growth and oxygen transfer in in vitro plant hairy root cultivations,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 167, pp. 1831–1844, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9515-5>
- [30] S. Srivastava and A. Srivastava, “Production of the biopesticide azadirachtin by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in liquid-phase bioreactors,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 171, pp. 1351–1361, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0432-7>
- [31] S. Srivastava and A. Srivastava, “Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 172, pp. 2286–2297, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0664-6>
- [32] F. Orozco and M. Rodríguez, “Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida,” *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 6, no. 3, pp. 251–258, 2007.
- [33] T. Kuruvilla, P. Komaraiiah, and V. Ramakrishna, “Enhanced secretion of azadirachtin by permeabilized margosa (*Azadirachta indica*) cells,” *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 37, pp. 89–91, 1999.
- [34] J. Bedoya and R. Hoyos, “Efecto de la Relación Agitación-Aireación sobre el Crecimiento Celular y la Producción de Azadiractina en Cultivos Celulares de *Azadirachta indica* A. Juss,” *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía (Medellin)*, vol. 63, no. 1, pp. 5293–5305, 2010.
- [35] K. Balaji, C. Veeresham, K. Srisilam, and C. Kokate, “Azadirachtin, a novel biopesticide from cell cultures of *Azadirachta indica*,” *Journal of Plant Biotechnology*, vol. 5, no. 2, pp. 121–129, 2003.
- [36] G. Prakash and A. Srivastava, “Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures,” *Process and Biochemistry*, vol. 40, no. 12, p. 3795–3800, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.05.010>
- [37] M. Rodríguez, R. Festucci, L. Campos, and W. Campos, “Azadirachtin biosynthesis induction in *Azadirachta indica* A. Juss cotyledonary calli with elicitor agents,” *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 57, no. 2, pp. 155–162, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000200001>
- [38] L. Sánchez, “Escalamiento del cultivo de células en suspensión de *azadirachta indica* (neem) en biorreactor tanque agitado para la producción de azadiractina,” Requisito parcial para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica, 2016.
- [39] R. Fernández, J. Salomón, A. Villarroel, and V. Montilla, “Evaluation of the in vitro production of azadirachtin in Neem according to the type of callus and chemical agents,” *Revista Ingeniería UC*, vol. 28, no. 2, pp. 282–293, 2021. <https://doi.org/10.54139/revinguc.v28i2.27>
- [40] N. Rafiq, M. Ali, M. Malhi, O. Aksoy, S. Ahmed, and M. Umar, “Production of azadirachtin contents from immature flowers derived in vitro cultures of *Azadirachta indica* A. Juss,” *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 26, no. 3, pp. 2056–2063, 2017.
- [41] R. Farjaminezhad and G. Garoosi, “Improvement and prediction of secondary metabolites production under yeast extract elicitation of *Azadirachta indica* cell suspension culture using response surface methodology,” *AMB Express*, vol. 11, pp. 43–59, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01203-x>
- [42] R. Fernández, L. Hermoso, and A. Menéndez, “Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor,” *Interciencia 2005*, vol. 30, no. 11, pp. 694–698, 2005.
- [43] D. Barrek, O. Paise, and M. Grenier-Loustalot, “Analysis of Neem oil by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 378, no. 3, pp. 753–763, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2377-0>
- [44] R. Fernández, P. Ramírez, J. Silva, V. Storaci, L. Cuamo, Z. D. Guglielmo, and G. Smits, “Establecimiento de un sistema de selección in vitro de variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.) resistentes al hongo *Pyricularia grisea*,” *Acta biológica Colombiana*, vol. 22, pp. 85–100, 2017. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.56933>
- [45] D. Sharma, P. Kaur, G. Singh, D. Singh, S. Verma, and J. Singh, “Development and Validation of Stability Indicating UV-Visible Spectrophotometric Method for simultaneous Estimation of Neem (*Azadirachtin*) and

- Curcumin in Pharmaceutical Tablet Dosage form,” *Analytical Chemistry Letters*, vol. 9, no. 4, pp. 564–581, 2019. <https://doi.org/10.1080/22297928.2019.1652113>
- [46] J. Dai, V. Yaylayan, V. Raghavan, and J. Pare, “Extraction and Colorimetric Determination of Azadirachtin-Related Limonoids in Neem Seed Kernel,” *Journal of Agricultural Food Chemical*, vol. 47, pp. 3738–3742, 1999. <https://doi.org/10.1021/jf990227h>
- [47] T. Singh, S. Haq, S. Salman, A. Namreen, and A. Rasheed, “Analytical Method Validation of Azadirachtin Extracted From *Azadirachta Indica*,” *International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 2, no. 4, pp. 99–106, 2017. <https://doi.org/10.21477/ijapsr.v2i04.9552>
- [48] O. Hammer, A. David, T. Harper, and P. Ryan, “PAST: Paquete de programas de estadística paleontológica para enseñanza y análisis de datos,” *Version. 2.17. Palaeontologia Elec*, vol. 4, no. 1, p. 9, 2001.
- [49] W. K. Y. Su, W.; Hwang and Y. Sagawa, “Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*,” *Plant Cell, Tissue culture and Organ*, vol. 50, no. 2, pp. 91–95, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1005891113815>
- [50] G. Shekhawat, S. Mathur, and A. Batra, “Role of phytohormones and nitrogen in somatic embryogenesis induction in cell culture derived from leaflets of *Azadirachta indica*,” *Biologia Plantarum*, vol. 53, no. 4, pp. 707–710, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10535-009-0127-7>
- [51] P. Das, “In Vitro Somatic Embryogenesis in Some Oil Yielding Tropical Tree Species,” *American Journal of Plant Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 217–222, 2011. <https://doi.org/10.4236/ajps.2011.22023>
- [52] A. Fehér, “Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate,” *Biochim Biophys Acta, Genetic Regulation Mech.*, vol. 1849, no. 4, pp. 385–402, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- [53] E. Reis, T. Batista, and J. Canhoto, “Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg,” *Protoplasma*, vol. 232, no. 3–4, pp. 193–202, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00709-008-0290-2>
- [54] G. Prakash, C. Emmanuel, and A. Srivastava, “Variability of azadirachtin in *Azadirachta indica* (Neem) and batch kinetics studies of cell suspensions culture,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 10, no. 3, pp. 198–204, 2005. <https://doi.org/10.1007/BF02932013>
- [55] K. Raval, S. Hellwig, G. Prakash, A. Ramos, A. Srivastava, and J. Biichs, “Necessity of a two-stage process for the production of azadirachtin-related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 96, no. 1, pp. 16–22, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90091-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90091-0)
- [56] N. Saxena and Y. Kumar, “Chemistry of Azadirachtin and other Bioactive Isoprenoids from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss),” in *Neem. A Treatise*, ed., K. Singh K., S. Phogat, A. Tomar, and R. S. Dhillon, Eds. Nueva Delhi, India: I. K. International, 2008, pp. 208–231.
- [57] S. Srivastava and A. Srivastava, “In vitro Azadirachtin Production,” in *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, 1st ed., K. G. Ramawat and J. M. Mérillon, Eds. New York-USA: Springer Science & Business Media, 2008.
- [58] G. Prakash and A. Srivastava, “Integrated yield and productivity enhancement strategy for biotechnology production of azadirachtin by suspension culture of *Azadirachta indica*,” *Asia-pacific, Journal of Chemical Engineering*, vol. 6, no. 2, pp. 129–137, 2011. <https://doi.org/10.1002/apj.482>
- [59] M. Arias, A. Angarita, J. Aguirre, J. Restrepo, and C. Montoya, “Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales,” *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía (Medellin)*, vol. 62, no. 1, pp. 4881–4895, 2009.
- [60] C. Ramage and R. Williams, “Mineral nutrition and plant morphogenesis,” *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, vol. 38, no. 2, pp. 116–124, 2002. <https://doi.org/10.1079/IVP2001269>
- [61] G. Sivakumar, K. Yu, and K. Paek, “Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures,” *Engineering in Life Science*, vol. 5, no. 4, pp. 333–342, 2005. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520085>
- [62] D. Zhao, J. Xing, M. Li, D. Lu, and Q. Zhao, “Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*,” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 67, no. 3, pp. 227–234, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1012770623153>
- [63] J. Wang and R. Tan, “Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium,” *Biotechnology Letters*, vol. 24, no. 14, pp. 1153–1156, 2002.