

APROXIMACIONES BIOTECNOLÓGICAS PARA LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE NEEM (*Azadirachta indica*).

Yamillette del Carmen Salcedo Acevedo, Guillermo Ballesteros Mathey, Alejandro Gregorio Nila Méndez, Elizabetha Hernández Domínguez, José Antonio González Rodríguez, Yuri Jorge Peña Ramírez*. Unidad de Investigación de Biotecnología Vegetal. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Carretera Costera del Golfo Km. 216.4 Acayucan, Veracruz. C.P. 96100 Tel. / Fax +52 924 24 5 74 10
e-mail: unibve@itsacayucan.edu.mx

Palabras clave: PCR, ADNcl, propagación

Introducción. El Neem es un árbol de la familia de las meliáceas, valioso debido a que sus extractos actúan en los insectos como inhibidores del crecimiento, disminuyen la fecundidad y la oviposición (1). Dado que esta especie es de crecimiento lento, técnicas tradicionales de propagación resultan en bajos rendimientos por lo que se busca la propagación *in vitro*. Esta técnica puede ser una alternativa eficaz para producir masivamente esta especie. De igual manera, es importante establecer protocolos moleculares que eventualmente nos permitan realizar eventos de transformación genética sobre esta especie.

El objetivo de este trabajo es presentar los avances que hemos realizado para abordar las problemáticas de propagación *in vitro* de neem así como la construcción de vectores para la transformación plástmica entre estos individuos.

Metodología. Para la propagación *in vitro*, se colectaron semillas inmaduras de neem en la región de Acayucan, Veracruz. Después de la colecta, se procesaron para obtener semillas axénicas, las cuales fueron sometidas a germinación en medio MS (2) adicionado con dicamba (3 mgL^{-1}). El material sembrado se incubó a $28 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ con un foto período de 16-8 h (luz-oscuridad) y se mantuvo su observación para evaluar la aparición de callos y/o brotes adventicios. Por otro lado, se extrajo y purificó ADN cloroplastídico (ADNcl) mediante el método reportado por Daniell *et al* (3). El rendimiento y la integridad del ADNcl se evaluó en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio de acuerdo a procedimientos moleculares estándares.

Resultados y discusión. Nuestros resultados mostraron que el efecto de dicamba (3 mgL^{-1}) en medio MS favoreció la formación de callos a partir de embriones cigóticos después de 8 días de cultivo (ver Fig. 1a). Durante la cuarta semana, se observó la formación del tejido calloso, presentando además la formación de brotes adventicios. Actualmente, nuestros esfuerzos están encaminados en la optimización del medio de cultivo para lograr la producción de embriones somáticos a partir de estos callos.

Con respecto a la obtención de ADNcl, este fue obtenido de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología. El resultado de la extracción puede apreciarse en la Fig. 1b. Este ADNcl será utilizado para amplificar regiones cloroplastídicas parciales de la zona RI (Repetido invertido), las cuales serán clonadas en un vector tipo TA para su empleo posterior.

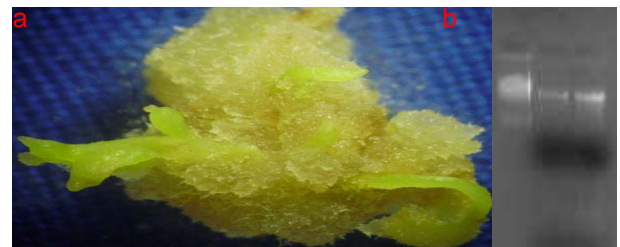


Fig.1a) Estructura callosa de neem en la cual se observa formación de brotes Fig.1 b) ADNcl del neem.

Conclusiones. Se visualizó la formación de callos *in vitro* de neem a partir de embriones cigóticos obtenidos de semillas inmaduras los cuales fueron sembrados en un medio de cultivo MS adicionando dicamba (3 mgL^{-1}). Por otro lado, se obtuvo ADNcl de neem que al juzgar por una apreciación visual es adecuado para su utilización como templado en la obtención de productos de amplificación de regiones parciales cloroplastídicas RI.

Agradecimiento. Agradecemos al CONACYT por su apoyo financiero en el proyecto 53851

Bibliografía.

- Schmutterer, H. y Ascher, K.R.S. (1990). Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree *Azadirachta Indica*. En: *The neem tree: Azadirachta indica*. Weinheim, A. V.C.H. Vol. 35, Pages 271-297.
- Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. y Lee, S. B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat. Biotechnol.* 16:345-348.
- Sanbrook, J., Fritsch, E.F y Maniatis, T. (1998). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY, USA.