



## INDUCCIÓN DE CALLO EN CULTIVOS DEL ÁRBOL TROPICAL *Calophyllum brasiliense* CAMBES, PRODUCTOR DE COMPUESTOS ANTIVIRALES (VIH-1).

Antonio Bernabé, Víctor M. Chávez, Francisco Cruz, Ricardo Reyes, Dpto. de Biotecnología, UAM-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina 09340 México, D.F. Tel: (5) 8044714, Fax (5) 8044712, e-mail: bernabe\_aa@hotmail.com

*Palabras clave:* *Calophyllum brasiliense*, calanólidos, callogénesis.

**Introducción.** *Calophyllum brasiliense* Cambes (Clusiaceae) conocida comúnmente como “Barí”, es una planta tropical de aproximadamente 45 m. Se distribuye del sur de Veracruz a Quintana Roo y desde Nayarit hasta Chiapas (CONABIO). Las especies del género *Calophyllum* han tomado gran relevancia por sus usos farmacológicos. Se han aislado diversos metabolitos secundarios con efectos antidepresivos, hipotensores, y antimicrobianos (1 y, 2). En México se reportan dos quimiotipos con diferencias químicas y anatómicas en las hojas, del cual el quimiotipo 2 produce los metabolitos activos (calanólidos) contra el VIH-1 (3). La presente investigación pretende establecer cultivos de callo *in vitro* a partir de hojas juveniles de *C. brasiliense* quimiotipo 2 y en una segunda etapa detectar la producción de los compuestos contra VIH-1 (calanólido A, B y C).

**Metodología.** Se colectaron semillas en Catemaco, Veracruz, México; se les retiró la cubierta y fueron germinadas a la sombra en charolas de plástico conteniendo una mezcla (1:1) de Agrolita y Peat moss como sustrato. De las plántulas entre 20 y 30 cm de altura, se cortaron hojas juveniles con longitud de 3 a 5 cm, desinfectadas superficialmente y obteniéndose segmentos de 5 x 5 mm, se sumergieron en solución antioxidante de 100 mg de ácido cítrico y 150 mg/l de ácido ascórbico, durante 10 minutos y se sembraron en medio de cultivo WPM suplementado con 20% de sacarosa y 1 g/l de PVP como antioxidante. El pH se ajustó a 5.6 y se solidificó con 1.7g/l de phitagel. Enriquecido con dos auxinas (2,4-D y ANA) (0.0-2.5 mg/L) y una citocinina (KIN) (0.0-2.5 mg/L) en un diseño factorial completamente al azar 2X7X7 Los cultivos se incubaron en oscuridad continua a  $26 \pm 2$  °C.

**Resultados y discusión.** Se observaron dos tipos de respuestas morfogénicas. La combinación de KIN/ANA indujo la formación de callos esponjosos, compactos de color blanquecino que posteriormente se tornaron de un color café claro y finalmente formaron raíces a los 30 días. La respuesta por efecto de KIN/2,4-D, fue la producción de callo, inicialmente de color verde claro que más tarde tornaron un color café, la mayoría de consistencia friable a los 20 días de cultivo. En el testigo no se tuvo ninguna respuesta, solo hubo un poco de crecimiento y encorvamiento, el explante tomó una textura dura y quebradiza, lo mismo sucedió para los tratamientos conteniendo las auxinas o citocinina de manera individual. Las combinaciones con KIN/ANA de 0.0/0.5, 0.1/0.5 y 0.1/1.0 mg/L fueron los tratamientos que indujeron las mejores respuestas en formación de callo y raíz con porcentajes de 62.5, 69.5 y 77.83 %, respectivamente.

Aunque los tratamientos 0.0/0.5, 0.1/0.5 mg/L de KIN y ANA tuvieron altos porcentajes de explantes con respuesta, estos tuvieron menor cantidad de callo, mientras que el tratamiento con 0.1/1.0 la abundancia de callo fue mayor y friable (Figura 1 b). Para los tratamientos con KIN/2,4-D todos los callos formados tuvieron una textura friable a concentraciones de 1.0/0.5, 2.0/0.1 y 1.0/1.0 mg/L tuvieron porcentajes de respuesta a callo de 54.16, 59.66 y 62 %, respectivamente, siendo éste último el de mayor respuesta y con mejor apariencia (Figura 1 a). Estos callos se utilizaron para realizar los primeros análisis químicos. Dado que estas muestras analizadas fueron pequeñas, el análisis por ccf no ha revelado la presencia de los compuestos contra el VIH-1 pero si se observan incidencias del compuesto principal, el ácido apetalico en callos con formación de raíces (Figura 1 b) y que posiblemente pueda estar ligado a los calanólidos.



Figura 1. (a) Inducción de callo con 1.0 mg/l de KIN y 1.0 mg/l de 2,4-D; (b) Inducción de callo y raíz con 0.1 mg/L de KIN y 1.0 mg/L de ANA, ambos cultivos en medio WPM.

**Conclusiones.** Las mejores respuestas de formación de callo con raíz se obtuvo con 0.1 mg de KIN y 1.0 mg de ANA mientras que la producción callo friable fue con 1.0 mg/l de KIN y 1.0 mg/l de 2,4-D. Estos callos han sido seleccionados para iniciar el análisis por cromatografía en capa fina con el fin de evidenciar la existencia o no de los compuestos antivirales del VIH-1, así también se ha empezado a realizar cultivos en células en suspensión para incrementar la cantidad de callo para un mejor análisis.

### Bibliografía.

- Bello, A, Cuesta, O, Mangas, R y Oubada, A. (2004). Potencialidades biológicas actuales en especies de *Calophyllum*. *Rev. Cub. Farm. (Supl Esp)*.
- Mangas, R. (2004). Aislamiento y caracterización espectroscópica de algunos componentes presentes en las hojas de la especie *Calophyllum pinetorum*. *Rev. Cub. Farm. (Supl Esp)*.
- Huerta, R, Basualdo, M, Abe, F, Jiménez, M, Soler, C y Reyes, R (2004). HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (9): 1471-1475.