

**PROPAGACION POR ESTAQUILLADO Y ANALISIS DEL CONTENIDO EN  
DEACETILBACCATINA III EN POBLACIONES NATURALES Y CULTIVADAS DE  
TEJO (*Taxus baccata*, L.) EN GALICIA.<sup>1</sup>**  
¡Error! Marcador no definido.

M<sup>a</sup> I. IGLESIAS DIAZ (\*), J.SOTO FERNÁNDEZ(\*\*), L.M.CABEZAL GOMEZ(\*).

\* ESC. POLITÉCNICA SUPERIOR (LUGO). UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

\*\* FAC. QUÍMICA. DPTO DE QUÍMICA ORGÁNICA. UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## RESUMEN

La demanda de taxol por su efectividad en el tratamiento de determinados tipos de cáncer, y su presencia en las especies del género *Taxus*, ha llevado a numerosas investigaciones en torno al desarrollo de las posibles fuentes y métodos de obtención. Una alternativa desarrollada es la obtención del taxotere (un potente análogo del taxol) por semisíntesis a partir de la 10-Deacetilbaccatina III extraída de las acículas de *Taxus baccata*. En el presente trabajo realizado en 1994 y 1995, se investigaron las posibles diferencias en *Taxus baccata* de distintas procedencias y sexo para su contenido en Deacetilbaccatina III, así como en su capacidad de enraizamiento. Los porcentajes de enraizamiento fueron los dos años significativamente más bajos para las poblaciones de montaña (46%) Caurel y Fonsagrada, frente a las plantas cultivadas sometidas a un régimen de poda anual (85%). No se observaron diferencias significativas entre sexos. El análisis químico mostró una gran variabilidad individual en los contenidos en 10-Deacetilbaccatina III. Estos contenidos fueron más altos en las acículas de los brotes jóvenes (641,88mg/Kg) que en los tejidos maduros (299,88mg/Kg).

P.C.: Propagación, Estaquillado, *Taxus baccata*, 10-Deacetilbaccatina III, Precursores Taxol.

## SUMMARY

The growing demand for taxol, being effective on various types of cancer, and its presence in species of *Taxus*, have conducted an active research to increase to supply of taxol. Síntesis partial from 10-Deacetilbaccatina III (readily extracted in high yield from the needles of *Taxus baccata*) is one of several strategies being investigated. The trials in this study was realized during 1994 and 1995, with the purpose of investigate the possible differences between *Taxus baccata* lines and sex for potential rooting and 10-Deacetilbaccatina III contents. The rooting percentage were significantly different in both years, with lower values in silvestry plants of mountain zones (46%) than cultivated plants (85%). The 10-Deacetilbaccatina III contents showed an high individual variability. The mean was highest in neddles of inmadure shoots (641.88mg/Kg) than those of cuttings (299.88mg/Kg).

K. W: Cutting propagation, *Taxus baccata*, 10-Deacetilbaccatina III, Taxol precursors.

## INTRODUCCION

En la actualidad hay una fuerte demanda de taxol para el tratamiento de determinados tipos de cáncer. La presencia de esta sustancia en las especies del género *Taxus* ha llevado a

interesantes investigaciones en torno a las posibles fuentes y métodos de obtención. Entre las líneas de investigación desarrolladas está la obtención por semisíntesis de taxol; en esta línea Rhone Poulenc ha patentado ya el taxotere (análogo potente del taxol), obtenido a partir de la 10-Deacetilbaccatina III, que se extrae de las acículas de *Taxus baccata* (BOOMER, 1991). WHEELER, N., *ET AL* (1992) han investigado la variabilidad genética y ambiental en poblaciones de *Taxus baccata* y se han encontrado con diferencias, entre y dentro de poblaciones y especies de tejo, en su contenido en Taxol, Cephalomanina y Baccatina III. Estos autores han observado también diferencias según el tipo de tejido estudiado. El objetivo del presente trabajo fue investigar las posibles diferencias existentes entre individuos de distintas procedencias y sexos en su contenido en Deacetilbaccatina III, así como en su capacidad de enraizamiento en la propagación por estaquillado. Consecuencias de estos estudios podrían ser la selección de los individuos más interesantes por su contenido en Deacetilbaccatina III, su propagación y la repoblación de áreas naturales con estas poblaciones para la obtención por semisíntesis del taxotere.

## MATERIAL Y METODOS

- *Estaquillado*: Los ensayos de propagación por estaquillado se realizaron en 1994 y se repitieron en 1995. Se recogieron estaquillas de tres poblaciones naturales situadas en: Caurel y Fonsagrada (900-1000 m de altitud) y Altide (440 m de altitud), y de ejemplares cultivados en la ciudad de Lugo (450 m de altitud).

Los ensayos se realizaron en invernadero de cristal bajo riego por microaspersión y en mesas de propagación con calor de fondo (21°C). Se utilizó un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones y 10 estaquillas por tratamiento experimental. Se estudiaron dos factores: procedencia de las estaquillas y sexo.

La recolección de estaquillas se realizó durante el mes de febrero y se conservaron en cámara fría a 4°C hasta la fecha de estaquillado (18 de Febrero en 1994 y 3 de marzo en 1995). Los dos años se prepararon estaquillas de 10 cm de longitud, limpias de hojas en su tercio inferior y se estaquillaron en el sustrato (30% corteza de pino, 30% turba rubia, 40% arena y Propamocarb-50 cc/m<sup>3</sup>) tras aplicarles un tratamiento hormonal con Acido Indol Butírico (sal potásica:K-IBA) en solución acuosa al 1% (inmersión durante 5") seguido de un tratamiento con fungicida (Propamocarb 72,2% pv). El porcentaje (%) de estaquillas enraizadas y muertas se determinó periódicamente para cada tratamiento. La duración de los ensayos fue de 8 meses en 1994 y 11 meses en 1995. Los resultados se analizaron para cada año mediante Análisis de Varianza.

Las estaquillas enraizadas en 1994 se repicaron a macetas de 250 cc de capacidad y se cultivaron durante un año en un medio de cultivo. Lo mismo se hizo con las plantas estaquilladas en 1995.

- *Análisis Químico*: En mayo de 1995 se seleccionaron 4 plantas entre las estaquillas cultivadas de cada población y sexo para analizar su contenido en Deacetilbaccatina III. Las plantas de tejo se secaron al vacío en un desecador de vidrio con hidróxido sódico como secante durante 5 días. Se pesaron, se molieron en un mortero y se dejaron macerar en metanol frío 7 días. Después de filtrar y concentrar el metanol, el extracto resultante se secó a vacío y se pesó. A cada muestra se le hizo un filtrado por sílica de fase reversa Lichropep RP-18 Merck (25-40 mm) eluyendo con acetonitrilo, seguido de un filtrado por sílica flash eluyendo con diclorometano/metanol. La disolución resultante se concentró, pesó y analizó en un cromatografo líquido de alta eficacia (HPLC) Waters 600E equipado con un detector ultravioleta Waters 490. Se utilizó una columna de fase reversa Zorbax ODS, 5, (150x4,6mm), usando como eluyente una mezcla de acetonitrilo/agua 25/75 que a partir del minuto 15

aumenta gradualmente la cantidad de acetonitrilo hasta el 100%, y se detectó la Deacetilbaccatina III a 10,40 minutos. En julio de 1996 se seleccionaron de nuevo plantas entre las estaquillas enraizadas en 1995 y cultivadas durante un año. Se separaron los brotes desarrollados durante el cultivo de la estaquilla enraizada y se analizaron separadamente ambas partes, incluyendo solo la fracción hoja en el análisis. Este año se analizaron también muestras tomadas de las poblaciones naturales y cultivadas y de las que se analizó también solo la fracción hoja. Se utilizó la técnica indicada anteriormente y la Deacetilbaccatina III, se detectó a los 8,8 minutos.

## RESULTADOS

*1. Estaquillado: Año 1994.* En 1994 el porcentaje medio global de estaquillas enraizadas fue del 59% a mediados de septiembre. El mayor incremento en los porcentajes de enraizamiento tuvo lugar desde principios de junio (12%) a mediados de julio (57%). El porcentaje de estaquillas muertas fue del 37% en septiembre.

*Procedencia.* La evolución de los porcentajes de enraizamiento para cada procedencia puede verse en LA GRÁFICA 1. Las estaquillas de ejemplares cultivados en Lugo, junto con la población natural de Altide tuvieron porcentajes de enraizamiento significativamente más altos (71 y 85% respectivamente). En las poblaciones de montaña, Caurel y Fonsagrada, los porcentajes de enraizamiento fueron del 46 y 34% respectivamente.

*Sexo.* Se obtuvieron diferencias significativas entre sexos, con un porcentaje medio de estaquillas enraizadas en septiembre del 72% para las estaquillas masculinas y un 46% en el caso de las femeninas.

*Procedencia y sexo.* Se detectaron interacciones significativas entre población y sexo para los porcentajes de enraizamiento. Las estaquillas femeninas de Fonsagrada no enraizaron, mientras que las estaquillas femeninas de Altide tuvieron porcentajes de enraizamiento entre los más altos. Solamente la población femenina de Fonsagrada fue significativamente diferente del resto de las combinaciones. Los porcentajes de mortandad fueron significativamente más altos para las estaquillas femeninas de Fonsagrada frente al resto de las combinaciones.

*Año 1995.* El porcentaje medio global de estaquillas enraizadas fue del 43% en enero de 1996. La evolución en el porcentaje de enraizamiento fue lento este año frente a la evolución seguida el año anterior. El porcentaje de estaquillas muertas hasta septiembre fue del 15%.

*Procedencia.* La evolución de los porcentajes de enraizamiento para cada procedencia, puede verse en la GRÁFICA 2. Este año se confirman los resultados obtenidos en 1994 con las poblaciones de Lugo y Altide con porcentajes de enraizamiento significativamente mayores (65 y 69 % respectivamente) que las poblaciones de Caurel y Fonsagrada (24 y 15% respectivamente).

*Sexo.* Los porcentajes de enraizamiento medios fueron del 46 y 40 % para las poblaciones masculinas y femeninas respectivamente sin diferencias significativas entre ellos.

*Procedencia y Sexo.* Los porcentajes de enraizamiento que fueron significativamente mayores para las poblaciones de Altide y Lugo, tanto masculinas como femeninas. El porcentaje de mortandad fue de nuevo, significativamente superior en las estaquillas femeninas de Fonsagrada frente al resto de las combinaciones.

*2. Análisis del contenido en Deacetilbaccatina III (D-III): Año 1995.* El contenido medio en D-III determinado en las estaquillas cultivadas durante un año después del enraizamiento, se reflejan en la TABLA 1, para cada procedencia y sexo. El contenido medio global fue de 121,81 mg/Kg. Los resultados fueron muy variables y no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos para cada factor. Hubo sin embargo una interacción

significativa entre los factores estudiados, con los contenidos mas altos en D-III en las plantas femeninas de Caurel y las masculinas de Lugo.

Año 1996. El contenido medio en D-III determinado en las acículas de brotes y estaquillas para los dos sexos y las cuatro procedencias, se expresa en la TABLA 2. El contenido medio en D-III fué de 470.88 mg/Kg. Los resultados fueron muy variables y no se detectaron diferencias significativas, sin embargo el contenido medio global fue mas alto en las acículas jóvenes (726mg/kg) que en las acículas maduras (275mg/Kg ). Los contenidos en D-III fueron tambien mas altos en las muestras de Lugo y Caurel que en el resto.

## DISCUSION

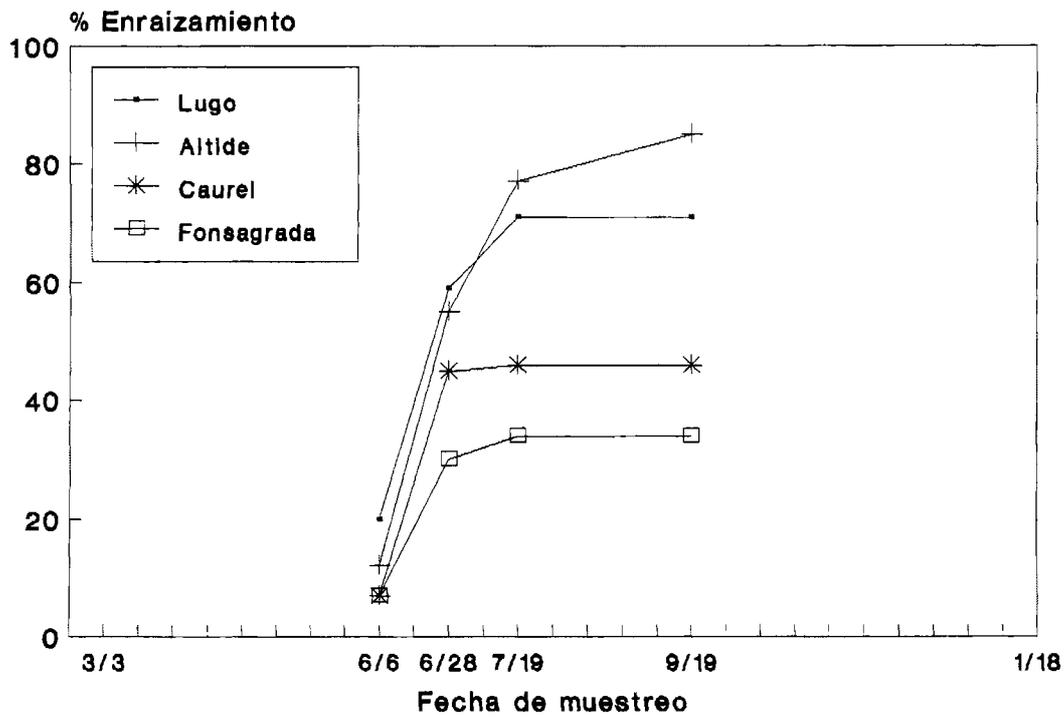
Los porcentajes de enraizamiento obtenidos han sido mas altos con las plantas cultivadas, que con las poblaciones naturales de montaña. Las diferencias observadas entre sexos el primer año no se repitieron en el segundo año, siendo el factor procedencia el que determinó las diferencias observadas en la variable enraizamiento. El hecho de que las estaquillas femeninas de Fonsagrada no enraizaran en absoluto se debió a las características de la planta madre y no al sexo. Todo ello parece indicar que las condiciones de cultivo de las plantas madre y su juvenilidad (mantenida por poda en las plantas de Lugo) son el factor determinante de los porcentajes de enraizamiento observados en nuestro estudio. Los resultados previos obtenidos para el contenido en D-III ponen de manifiesto la variabilidad existente entre individuos, tal como indicaron WHEELER *ET AL* (1992). Estos autores observaron tambien variaciones en el contenido en taxol, cefalomanina y baccatina II en función del tipo de tejido analizado y de la época de recolección. En este sentido los resultados obtenidos en nuestro estudio con la D-III, indican un descenso del contenido en D-III en los tejidos de las acículas durante su maduración, con contenidos mas altos en las acículas jóvenes que en las acículas maduras, independientemente de la procedencia de la planta. Sería pues necesario investigar las variaciones estacionales en D-III con el fin de determinar la época mas adecuada para la recolección y extracción de este precursor para la semisíntesis del taxotere.

## BIBLIOGRAFIA

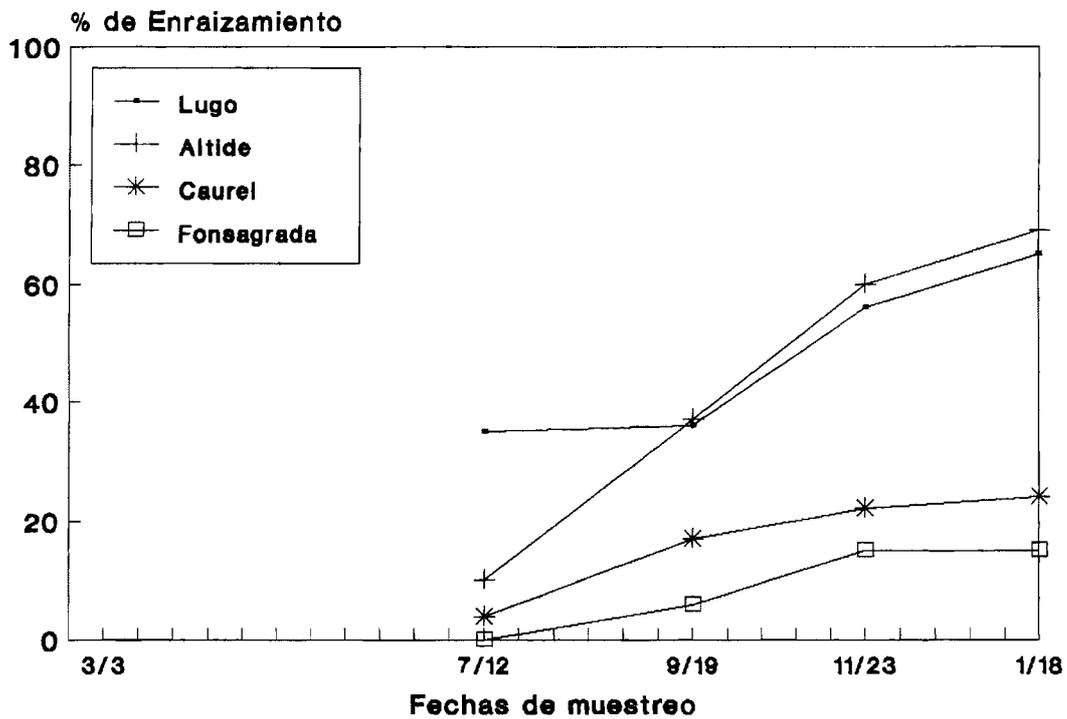
BORMAN, S. (1991). *Scientist Mobilize to increase Supply of anticancer Drug Taxol*. C&En. September. Pg. 11-18.

WHEELER, N.C.; JECH, K.; MASTERS, S. (1992). *Effects of Genetic, Epigenetic, and Environmental factors on Taxol content in Taxus brevifolia and related species*. Journal of natural Products, Vol. 55, N0. 4, pg. 432-440.

1. Trabajo realizado con la ayuda de los Proyectos XUGA 20903B91 y XUGA 20904B93 dirigidos por D. L. Castedo Expósito.



GRAFICA 1. Evolución de los porcentajes medios de enraizamiento de estaquillas de *Taxus baccata* según su procedencia y para ambos sexos, durante 1994.



GRAFICA 2. Evolución de los porcentajes medios de enraizamiento de estaquillas de *Taxus baccata* según su procedencia y para ambos sexos, durante 1995.

POBLACION			
SEXO	Lugo	Altide	Caurel
Masculino	221.60 A	63.73 A	97.33 A
Femenino	23.57 A	120.70 A	203.95 A

Grupos homogéneos para el test de Newman-Keuls (5%)

TABLA 1. Contenido medio en 10-Deacetilbaccatina III (mg/Kg) en estaquillas cultivadas de *Taxus baccata* de distintas procedencias y sexos en 1995.

TIPO		
PROCEDENCIA	acícula joven	acícula madura
Lugo	867.00	130.50
Altide	112.50	106.00
Caurel	1,197.50	711.00
Fonsagrada	390.50	252.00

TABLA 2. Contenido medio en 10-Deacetilbaccatina III (mg/Kg) en acículas jóvenes y acículas maduras de *Taxus baccata* en 1996 de distintas procedencias y ambos sexos