

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES  
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**



**“EFECTO DE LOS FENOLES COMO COFACTORES EN LA ACTIVIDAD  
ENZIMÁTICA DE AIA OXIDASA EN ESTACAS DE LENGUA (*Nothofagus  
pumilio* (POPEP. et ENDL.) KRASSER)”**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al título de:

INGENIERO FORESTAL

Profesor Guía: Sra. Mirtha Latsague  
Vidal.

**PATRICIA LISETTE SAEZ DELGADO**

**TEMUCO - CHILE**

**2004**

## CALIFICACIÓN COMISIÓN INFORMANTE

**NOTA**

**Profesor Patrocinante** : Mirtha Latsague Vidal  
**Profesor Informante** : Marcelo Hernández Nauto  
**Profesor Informante** : Eduardo Gutiérrez Da Forno

---

Vº Bº Profesor patrocinante  
**MIRTHA LATSAGUE VIDAL**  
Magíster en Ciencias  
Mención Botánica

---

Vº Bº Profesor informante  
**MARCELO HERNÁNDEZ NAUTO**  
Ingeniero Forestal  
Magíster en Ciencia  
Mención Recursos Forestales

---

Vº Bº Profesor informante  
**EDUARDO GUTIERREZ DA FORNO**  
Magíster en Ciencias  
Mención Biología Molecular

---

Vº Bº Director de Carrera  
**CELSO NAVARRO CARCAMO**  
Ingeniero Forestal

## INDICE DE MATERIAS

| CAPÍTULO |  | Página |
|----------|--|--------|
| 1.       | <b>INTRODUCCIÓN</b>  | 1      |
| 2.       | <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>  | 5      |
| 2.1.     | <b>Antecedentes generales del género <i>Nothofagus</i></b>                                 | 5      |
| 2.2.     | <b>Antecedentes generales de la especie</b>  | 5      |
| 2.3.     | <b>Antecedentes sobre reproducción vegetativa por estacas en <i>Nothofagus pumilio</i></b> | 8      |
| 2.4.     | <b>Sustancias reguladoras del crecimiento: Auxinas</b>                                     | 9      |
| 2.4.1.   | Modo de acción   | 10     |
| 2.4.2.   | Auxinas y su efecto en la formación de raíces  | 11     |
| 2.4.3.   | Propiedades de la enzima AIA oxidasa   | 12     |
| 2.5.     | <b>Compuestos fenólicos en vegetales</b>   | 13     |
| 2.5.1.   | Los fenoles como cofactores en la formación de raíces                                      | 15     |
| 3.       | <b>MATERIAL Y MÉTODO</b>   | 19     |
| 3.1.     | <b>Materiales</b>  | 19     |
| 3.1.1.   | Ubicación y fecha del ensayo   | 19     |
| 3.1.2.   | Extracción del material biológico  | 19     |
| 3.1.3.   | Características del lugar de recolección   | 20     |
| 3.2.     | <b>Metodología</b>   | 21     |
| 3.2.1.   | Planteamiento global   | 21     |
| 3.2.2.   | Toma de muestras   | 22     |

| <b>CAPÍTULO</b> |   | <b>Página</b> |
|-----------------|---|---------------|
| 3.2.3           | Tratamiento de las estacas  | 24            |
| 3.2.4.          | Preparación de la columna de filtración molecular   | 24            |
| 3.2.4.1.        | Cálculo del volumen de elución  | 25            |
| 3.2.5.          | Obtención del extracto crudo  | 27            |
| 3.2.6.          | Determinación del contenido de fenoles solubles   | 28            |
| 3.2.6.1.        | Preparación del Reactivo de Folin   | 28            |
| 3.2.6.2.        | Curva de calibración  | 28            |
| 3.2.6.3.        | Determinación del contenido de fenoles solubles en las fracciones                                   | 30            |
| 3.2.7.          | Determinación del contenido de proteínas solubles   | 31            |
| 3.2.7.1.        | Preparación del Reactivo de Bradford  | 31            |
| 3.2.7.2.        | Curva de Calibración  | 31            |
| 3.2.7.3.        | Determinación del contenido de proteínas solubles en las fracciones                                 | 33            |
| 3.2.8.          | Determinación de la actividad de la enzima AIA oxidasa  | 33            |
| 3.2.8.1.        | Preparación del Reactivo de Salkoswki   | 34            |
| 3.2.8.2.        | Curva de calibración  | 34            |
| 3.2.8.3.        | Determinación de la actividad enzimática en las fracciones  | 36            |
| 3.2.9.          | Determinación del efecto de los fenoles solubles y del pH de elución en la actividad de AIA oxidasa | 36            |
| 3.2.9.1.        | Buffer fosfato pH 6.1   | 36            |
| 3.2.9.1.1.      | Diseño experimental   | 37            |
| 3.2.9.2.        | Buffer fosfato salino pH 7.5  | 38            |

| <b>CAPÍTULO</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| 3.2.9.2.1. Diseño experimental   | 38            |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | 40            |
| <b>4.1. Extracción de fenoles y proteínas solubles</b>   | 40            |
| 4.2.1. Ensayos realizados con Buffer fosfato pH 6.1 como eluyente  | 41            |
| 4.2.2. Ensayos para actividad enzimática realizados con Buffer fosfato salino pH 7.5 como eluyente                               | 43            |
| <b>5. CONCLUSIONES</b>   | 48            |
| <b>6. RESUMEN</b>  | 49            |
| <b>7. SUMMARY</b>  | 51            |
| <b>8. BIBLIOGRAFIA</b>   | 53            |
| <b>9. ANEXOS</b>   | 58            |
| 9.1. <b>Anexo 1.</b> Cuadros y figuras para ensayos realizados usando como eluyente Buffer fosfato pH 6.1                        | 58            |
| 9.2. <b>Anexo 2.</b> Cuadros y figuras para ensayos del diseño N° 1 realizados usando como eluyente Buffer fosfato salino pH 7.5 | 74            |
| 9.3. <b>Anexo 3.</b> Cuadros y figuras para ensayos del diseño N° 2 realizado usando como eluyente Buffer fosfato salino pH 7.5  | 76            |

## INDICE DE FIGURAS

| FIGURA N° |  | Página |
|-----------|--|--------|
|           | <u>En el texto</u>   |        |
| 1         | Mapa de ubicación bosque de lenga, Reserva Nacional Malalcahuello - Nalcas.  | 20     |
| 2         | Características de los árboles elegidos para la obtención de las estacas. Reserva Nacional Malalcahuello - Nalcas  | 23     |
| 3         | Columna de filtración molecular con gel Sephadex G - 50 y colorantes azul dextrano y rojo fenol  | 26     |
| 4         | Curva de calibración para determinación de fenoles solubles con Ácido Tánico   | 30     |
| 5         | Curva de calibración para determinación de proteínas con BSA   | 33     |
| 6         | Curva de calibración para la determinación de actividad enzimática de AIA oxidasa con Ácido indol acético  | 35     |
| 7         | Valores promedios de las seis réplicas para análisis de Actividad enzimática (A.E.) v/s concentración de fenol para tratamientos 0 a 3 (0, 50, 75 y 100% de fenol respectivamente) | 41     |

| FIGURA N° |  | Página |
|-----------|--|--------|
| 8         | Actividad enzimática media de estacas de <i>Nothofagus pumilio</i> , a un nivel de confianza de 95%.<br>Números 0, 1, 2 y 3 corresponden a tratamientos aplicados de concentración de fenol 0, 50%, 75% y 100% respectivamente   | 42     |
| 9         | Actividad enzimática (A.E.) media de estacas de <i>Nothofagus pumilio</i> , a un nivel de confianza de 95%,<br>0 y 1 corresponden a tratamientos aplicados de concentración de fenol 0 y 115 ppm respectivamente (en tabla 16 del anexo ver resultados parciales obtenidos en las cuatro repeticiones) | 44     |
| 10        | Actividad enzimática media en estacas de <i>Nothofagus pumilio</i> , a un nivel de confianza de 95%.<br>Números 0 a 4 corresponden a tratamientos aplicados de concentración de fenol 0, 2.6, 47.8, 160.57 y 185 ppm respectivamente   | 45     |
|           | <u>En el anexo</u>   |        |
| 11        | Grafico de fracciones de Fenol eluidas y <i>pick</i> de concentración de fenol encontrado en muestra 1   | 60     |
| 12        | Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y <i>pick</i> de ésta encontrado en muestra 1  | 60     |

| <b>FIGURA N°</b> |   | <b>Página</b> |
|------------------|---|---------------|
| 13               | Grafico de fracciones de fenol eluídas y <i>pick</i> de concentración de fenol encontrado en muestra 2                        | 62            |
| 14               | Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y <i>pick</i> de ésta encontrado en muestra 2 | 62            |
| 15               | Grafico de fracciones de fenol eluídas y <i>pick</i> de concentración de fenol encontrado en muestra 3                        | 64            |
| 16               | Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y <i>pick</i> de ésta encontrado en muestra 3 | 64            |
| 17               | Grafico de fracciones de fenol eluídas y <i>pick</i> de concentración de fenol encontrado en muestra 4                        | 66            |
| 18               | Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y <i>pick</i> de ésta encontrado en muestra 4 | 66            |
| 19               | Grafico de fracciones de fenol eluídas y <i>pick</i> de concentración de fenol encontrado en muestra 5                        | 68            |
| 20               | Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y <i>pick</i> de ésta encontrado en muestra 5 | 68            |
| 21               | Grafico de fracciones de fenol eluídas y <i>pick</i> de concentración de fenol encontrado en muestra 6                        | 70            |
| 22               | Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y <i>pick</i> de ésta encontrado en muestra 6 | 70            |

|    |  |    |
|----|--|----|
| 23 | Grafico de fracciones de fenol eluidas y <i>pick</i> de concentración de fenol encontrado en muestra eluída con buffer fosfato salino pH 7.5 | 74 |
|----|--|----|

## INDICE DE TABLAS

| TABLA N° |   | Página |
|----------|---|--------|
|          | <u>En el texto</u>  |        |
| 1        | Preparación de estándares para la curva de calibración de fenoles solubles con una solución patrón de Ácido Tánico 50 ppm.  | 29     |
| 2        | Preparación de estándares para la curva calibración de proteínas solubles con una solución patrón de BSA (1mg/ml)   | 32     |
| 3        | Preparación estándares para la curva calibración de actividad enzimática con una solución patrón de AIA 1 mM (Ácido Indol Acético)  | 34     |
| 4        | Diseño experimental para tratamientos realizados utilizando Buffer fosfato pH 6.1   | 37     |
| 5        | Esquema de tratamientos a realizar y sus respectivas repeticiones, donde T 0 corresponde al tratamiento control (sin fenol) y T 1 corresponde a una concentración de fenol de 115.4 ppm. frente a la cual se observó el aumento de la actividad enzimática. R, corresponde a las replicas realizadas. | 38     |

| TABLA N° |  | Página |
|----------|--|--------|
| 6        | Esquema de los tratamientos a realizar cada uno con tres réplicas ( <b>R</b> ), en donde <b>T 0</b> corresponde al tratamiento control (sin fenol) y <b>T 1, T 2, T 3 y T 4</b> , corresponden a distintas concentraciones de fenol (2.609; 47.88; 160.57 y 185 ppm respectivamente)<br><u>En el anexo</u> | 39     |
| 7        | Resultados de análisis de muestra 1 (Árbol 1)  | 59     |
| 8        | Resultados de análisis de muestra 2 (Árbol 2)  | 61     |
| 9        | Resultados de análisis de muestra 3 (Árbol 3)  | 63     |
| 10       | Resultados de análisis de muestra 4 (Árbol 4)  | 65     |
| 11       | Resultados de análisis de muestra 5 (Árbol 5)  | 67     |
| 12       | Resultados de análisis de muestra 6 (Árbol 6)  | 69     |
| 13       | Resumen de resultados obtenidos usando como eluyente Buffer Fosfato pH 6.1   | 71     |
| 14       | Análisis de varianza ensayo realizado con Buffer fosfato pH 6.1 (Tabla ANOVA)  | 73     |
| 15       | Resultados de análisis de muestras eluidas con Buffer fosfato salino pH 7.5  | 74     |
| 16       | Resultados obtenidos en los tratamientos aplicados en el primer diseño experimental descrito para eluciones con Buffer fosfato salino pH 7.5   | 75     |
| 17       | Análisis de varianza para tratamientos aplicados en el primer diseño experimental descrito para Buffer fosfato salino pH 7.5 (Tabla ANOVA)   | 75     |

| <b>TABLA N°</b> |   | <b>Página</b> |
|-----------------|---|---------------|
| <b>18</b>       | Resultados de análisis de muestras eluidas con Buffer fosfato salino pH 7.5   | 76            |
| <b>19</b>       | Resultados obtenidos en los tratamientos aplicados en el segundo diseño experimental para eluciones con Buffer fosfato salino pH 7.5                      | 77            |
| <b>20</b>       | Análisis de varianza para tratamientos aplicados en el segundo diseño experimental descrito para eluciones con Buffer fosfato salino pH 7.5 (Tabla ANOVA) | 78            |
| <b>21</b>       | Test de rangos múltiples para variación en la Actividad enzimática (A. E.) según tipo de tratamiento  | 79            |

