

1. INTRODUCCIÓN

En Chile existen numerosas especies nativas que poseen un gran valor e interés científico ya sea por su importancia ecológica, por su valioso potencial genético o por ser consideradas como una alternativa económica interesante. Dentro de estas especies se encuentra *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser, conocida con el nombre común de lenga.

Como tipo forestal, está presente con 3.391.551,8 hectáreas, representando un 25,3% del total de la superficie de bosque nativo existente en Chile (CONAF - CONAMA, 1999).

En la IX Región, la superficie existente de esta especie (101.440 hectáreas), se encuentra distribuida en formaciones puras y mixtas, las que se encuentran tanto dentro del Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas (SNASPE), como en predios particulares. Gran parte de este recurso ha soportado floreos y cortas selectivas (en aquellos sectores en que la especie tiene condiciones comerciales) que han afectado negativamente su calidad y composición (Schmidt, 1992), por cuanto los árboles que quedan en pie después de la explotación son en su mayoría de bajo valor comercial, los cuales, en caso de emplearse como productores de semillas, podrían generar bosques de menor calidad que el bosque original.

Considerando que entre los objetivos silvícolas se cuenta, mantener la composición del bosque natural, y mejorar la cantidad y calidad de la

producción futura a través de un manejo apropiado (Schmidt, 1990), reproducir vegetativamente esta especie, puede contribuir con este objetivo.

Tradicionalmente se han utilizado varias formas de propagación vegetativa, una de las más conocidas es el enraizamiento de estacas. Mediante su exposición a condiciones favorables se promueve la regeneración de su sistema radicular y se producen nuevas plantas que conservan las características genéticas del árbol seleccionado.

La formación de raíces adventicias esta controlada por factores genéticos, físicos, químicos y fisiológicos. Entre los factores fisiológicos, los reguladores del crecimiento son importantes en determinar los últimos sucesos. Las auxinas generalmente promueven el enraizamiento en estacas herbáceas, pero ellas a menudo tienen poco o nada de efecto cuando son aplicadas a estacas leñosas. *Nothofagus pumilio* (lenga) no escapa a estas características, teniendo grandes dificultades para formar raíces adventicias a partir de esquejes.

En estudios previos desarrollados por Romero (2000), Castro (2001), se utilizaron estacas de lenga de distintas procedencias, épocas de recolección, edad de la estaca y distintas concentraciones hormonales, no llegando a la formación de raíces adventicias.

En la actualidad, esta especie a logrado ser propagada *in vitro*, obteniendo un enraizamiento del 60 a 70% (Martínez, 1997), sin embargo este tipo de propagación implica un alto costo de producción para el viverista, por lo que masivamente se ha utilizado la reproducción sexual (semillas), la que en el caso particular de lenga se ve afectada por su fructificación tardía (20 a 40 años de edad), su marcada semillación cíclica y la baja producción de semillas que lenga

posee en comparación con otras especies del género *Nothofagus* (Uriarte, 1991).

Por lo anterior se hace necesario comprender los cambios bioquímicos que ocurren en las estacas de lenga y que no permiten el desarrollo de raíces adventicias, lo que según bibliografía revisada podría atribuirse a la presencia de sustancias inhibidoras del tipo fenólicas, las que según Herman y Hess (1963), estarían implicadas como estimuladoras de la AIA oxidasa induciendo la oxidación de las auxinas aplicadas en los tratamientos y restringiendo el enraizamiento adventicio.

Por consiguiente, la investigación propuesta tiene como objetivo general, determinar la influencia de los fenoles solubles presentes en estacas de lenga, sobre la actividad de la AIA oxidasa, la cual interfiere sobre el enraizante AIA utilizado en la inducción de raíces adventicias. Para dar cumplimiento a este objetivo, se determinaron los siguientes objetivos específicos:

- Fraccionar (separar) y recuperar fenoles y proteínas solubles totales presentes en extracto crudo de estacas de lenga, a través de columna de filtración Sephadex G - 50.
- Comparar el efecto del pH del Buffer de elución empleado en la columna de fraccionamiento.
- Determinar *in vitro* el efecto de la presencia de fenoles solubles, sobre la actividad de la enzima AIA oxidasa proveniente de estacas de lenga.
- Determinar *in vitro* el efecto de la concentración de fenoles solubles, sobre la actividad de la enzima AIA oxidasa proveniente de estacas de lenga.

La relevancia de esta investigación radica principalmente en que sus resultados son una aproximación para establecer la relación existente entre el contenido de fenoles, su influencia sobre la AIA oxidasa y por consiguiente esclarecer dudas con respecto a la formación de raíces adventicias en estacas de lenga, permitiendo a futuro complementar la reproducción vegetativa por estacas en esta especie, a través del establecimiento de metodologías de tratamiento alternativo a lo que usualmente se usa en la reproducción de estacas.

Además se implementará una metodología de investigación a nivel bioquímico poco conocida en el área forestal, que podría ser utilizada en estudios con otras especies nativas, principalmente del género *Nothofagus*.

Por otra parte, dentro de los desafíos que el sector forestal se ha impuesto frente al nuevo escenario económico que enfrenta, se cuenta además de mantener e impulsar la plantación en el manejo forestal, incrementar la investigación científica y tecnológica principalmente en áreas poco desarrolladas hasta ahora como lo es el área fisiológica en estudios forestales.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes generales del género *Nothofagus*

El género *Nothofagus* es un taxón constitutivo muy importante de los bosques del sur de Chile, alguna de sus especies, conforman valiosos tipos forestales de los bosques nativos en varias regiones del país (Donoso, 1981).

Los *Nothofagus*, pertenecientes a la familia de las Fagáceas, poseen aproximadamente cuarenta especies que se encuentran distribuidas en Sudamérica, Nueva Zelanda y Australia; son plantas leñosas, micorrízicas que no resisten el fuego, con baja capacidad de dispersión y corta viabilidad de sus semillas (Rodríguez *et al.*, 1983).

La distribución de este género se restringe al hemisferio sur; y en Chile, su hábitat se relaciona a eventos del pasado, con gradientes climáticos marcados por bajas temperaturas, y perturbaciones naturales de importancia (Polyméris, 1993, citado por Puga, 2001).

2.2. Antecedentes generales de la especie.

Nothofagus pumilio posee los siguientes nombres comunes: lenga, ruil, roble de Magallanes o ruillí. Es un árbol de tamaño mediano, caducifolio, monoico, que en la región patagónica alcanza una altura de 20 a 25 metros y unos 60 a 80

centímetros de diámetro a la altura del pecho (DAP) (Rodríguez *et al.*,1983).

Corresponde a una de las especies arbóreas chilenas que presenta una de las distribuciones latitudinales más extensas de los bosques templados de Sudamérica, aproximadamente 2000 Km de norte a sur (Uriarte, 1991).

Lenga es un árbol considerado intolerante, aunque también puede comportarse como semi - tolerante, especialmente en bosques de *Araucaria araucana* (araucaria), en donde crece bajo el dosel de éstas (Donoso, 1978).

La regeneración natural de estos bosques es normalmente abundante y vigorosa, sin embargo, la distribución y las posibilidades de desarrollo de las plantas dependerán en gran medida, de la cantidad de luz que llegue al piso del bosque (INFOR - CONAF, 1998).

Es una especie monoica, que puede florecer desde agosto hasta fines de noviembre, dependiendo de la latitud, altitud, exposición, humedad y suelos en que se encuentre. Sus niveles de producción de semillas fluctúan entre 0.5 y 10 millones de semillas por hectáreas, lo que es bajo, en relación a los alcanzados por otras especies del género *Nothofagus*, como por ejemplo *Nothofagus alpina* (raulí) que puede alcanzar niveles de producción de 40 millones de semillas por hectárea (Uriarte, 1991).

Los antecedentes a cerca de la regeneración de lenga se refieren básicamente al sistema natural, no existiendo antecedentes sobre regeneración artificial, así como tampoco acerca de su capacidad de reproducirse vegetativamente (Uriarte, 1991; INFOR - CONAF, 1998; Romero, 2000; Puga, 2001).

Lenga es una especie que presenta una estrategia de reproducción en claros, es decir que posee un cierto grado de tolerancia en su condición de planta joven, que le permite establecerse adecuadamente cuando se produce un claro en el bosque debido a muertes o volteos por el viento de árboles maduros.

El número de plantas por hectárea disminuye paulatinamente a medida que crecen. Esto se debe a la mortalidad natural de la regeneración, condicionada por la falta de luz. La competencia selecciona los individuos más vigorosos (Uriarte, 1991; INFOR - CONAF, 1998).

En la actualidad, y debido al alto valor de su madera, resulta interesante propiciar un manejo integral de ella, siendo necesario establecer alternativas de reproducción, además de la regeneración natural (semillas), que en el caso particular de lenga presenta problemas por la marcada semillación cíclica, produciéndose un *pick* de semillación cada cinco años, y ataques de insectos que se alimentan o parasitan de ella. Entre las alternativas propuestas existe la técnica de reproducción vegetativa, principalmente a través del enraizamiento de estacas.

Romero (2000) y Castro (2001), probaron bajo distintas condiciones de ensayo reproducir esta especie a través de estacas, sin llegar a la formación de raíces adventicias.

Según Latsague y Lara (2003), la no formación de raíces adventicias, se podría atribuir al contenido y/o tipo de fenoles producidos por la especie, los cuales son significativamente mayores que en otras especies del género *Nothofagus* que sí forman raíces y, los que según Herman y Hess (1963), estarían implicados como estimuladores de la AIA oxidasa, induciendo la oxidación de las auxinas

aplicadas en los tratamientos y restringiendo el enraizamiento adventicio.

2.3. Antecedentes sobre reproducción vegetativa por estacas en *Nothofagus pumilio*

Existen muchos métodos de propagación vegetativa (Hartmann y Kester, 1995), entre ellos, el método de reproducción vegetativa a través del enraizamiento de estacas es actualmente el desarrollado con mayor rapidez, siendo de vital importancia para el mejoramiento genético y para los programas operativos de plantación (Zobel y Talbert, 1994).

Romero (2000), estudió la capacidad de propagación vegetativa de lenga por medio de estacas de árboles adultos obtenidas en invierno, investigó el efecto de un rango de concentraciones de ácido indol butírico (AIB) (1000, 1500, y 2000 ppm) sobre estacas apicales, medias y basales. Las estacas se mantuvieron en sustrato termorregulado bajo condiciones de invernadero durante 5 meses, aplicando riego 2 a 3 veces al día.

Los resultados indicaron que lenga no puede reproducirse vegetativamente a partir de árboles adultos en época invernal, lo que se atribuyó a un receso vegetativo absoluto, lo que podría impedir el desarrollo de raíces. Sin embargo, Castro (2001), basado en la investigación anterior, estudió el enraizamiento en época de verano sin llegar a la formación de raíces adventicias.

Puga (2001), estudió también la posibilidad de reproducir vegetativamente estacas de lenga, utilizando tres diferentes sustratos y cuatro concentraciones hormonales de ácido indol butírico (AIB), a diferencia de los ensayos anteriores,

se utilizaron estacas cultivadas en vivero (árboles jóvenes), obteniendo enraizamiento, pero en un porcentaje muy bajo.

2. 4. Sustancias reguladoras del crecimiento: Auxinas

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos, luz, nutrientes, agua y temperatura, entre otros, como así mismo de factores internos, tales como las hormonas vegetales o fitohormonas. Las fitohormonas se han definido como compuestos naturales que poseen la propiedad de regular procesos fisiológicos en concentraciones muy por debajo de la de otros compuestos (nutrientes, vitaminas) y que en dosis más altas los afectarían (Salisbury, 1994).

Dentro de las hipótesis más acertadas en el mecanismo de regulación de las fitohormonas, está la acción de receptores específicos capaces de reconocer a la hormona, y la sensibilidad de los tejidos para responder a sus efectos (Weaver, 1975).

Estudios referentes a los procesos de formación de raíces adventicias dan una mayor importancia a la dinámica de los reguladores, que a su cantidad en los tejidos vegetales. Su acción se genera mediante cofactores (ácidos fenólicos, flavonoides y terpenos), los que actuarían desbloqueando genes reprimidos y sintetizando enzimas nuevas las que influirían en la formación del callo radicular e iniciación de primordios (Puga, 2001).

Se han establecido cinco grupos de hormonas vegetales (fitohormonas) promotoras del crecimiento, entre ellas las auxinas, siendo el ácido indol-3-

acético (AIA), el compuesto que actualmente se considera como la auxina principal de las plantas, encontrándose sobre todo, en tejidos en crecimiento activo.

Según Weaver (1975), las auxinas son compuestos orgánicos diferentes a los nutrientes, que regulan el crecimiento de las plantas, y en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben y modifican el proceso fisiológico normal.

Los efectos típicos de las auxinas son:

- Alargamiento de las células.
- Incremento de la longitud del tallo.
- Desarrollo del fruto en ausencia de polinización.
- Producción de raíces adventicias.

En el proceso de formación de raíces adventicias, las auxinas provocan la desdiferenciación de células parenquimáticas y luego ellas mismas estimulan la formación de las iniciales de raíz, actuando sobre la división celular.

2.4.1. Modo de acción.

Existe acuerdo en que las auxinas actúan a nivel génico al inducir o reprimir la expresión de ciertos genes. El AIA (ácido indol acético) se liga a un receptor de naturaleza proteica, formando un complejo receptor-hormona. Este complejo activa a un promotor que controla la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas hidrolíticas de los compuestos de la pared.

2.4.2. Auxinas y su efecto en la formación de raíces

El ácido indol acético (AIA) existe en las raíces en concentraciones similares a las que se encuentran en muchas otras partes vegetales, conteniendo las raíces auxina suficiente o casi suficiente para la elongación normal. Ciertamente muchas raíces extirpadas crecen durante días o semanas *in vitro* sin necesidad de agregar auxina, lo cual indica que cualquier necesidad que puedan tener de esta hormona está satisfecha por su capacidad de sintetizarla (Segura, 1994).

El fenómeno de la rizogénesis, es el resultado de la estimulación auxínica y de otros factores que migran a la zona radicular. Normalmente se señala a las auxinas como el factor más importante en la formación de raíces adventicias (Puga, 2001).

“La formación de las raíces adventicias en cortes de tallo es la base de la práctica común de reproducción asexual de muchas especies. Went y Kenneth Thiman (1935), demostraron que el ácido indol acético (AIA) estimula la iniciación de raíces en cortes de tallo” (Salisbury, 1994), el primer uso práctico de esta hormona se desarrolló a través de ésta demostración.

El mecanismo hormonal de la rizogénesis es bastante complejo, junto a las auxinas intervienen diversos cofactores. Baldini (1992), postula que el factor promotor del enraizamiento, también llamado cofactor, protege a la auxina de la ácido indol acético oxidasa (AIA oxidasa) formando un complejo auxina - cofactor, en donde este cofactor es generalmente un compuesto de tipo fenólico.

La auxina sintética ácido naftalenico (ANA), por lo común es más eficaz que el AIA, al parecer debido a que no es destruida por la AIA oxidasa y por

consiguiente, persiste por un mayor tiempo (Salisbury, 1994).

El mismo autor señala que en las estacas caracterizadas por una escasa capacidad rizogénica el contenido de AIA tiende a ser bastante bajo, estando presentes por el contrario, inhibidores del enraizamiento en cantidades elevadas.

Sivori *et al.* (1980), citado por Rojas (1995), nombra como sustancias inhibidoras a compuestos monofenólicos que actúan como cofactores de la enzima AIA oxidasa y también ocupando el sitio activo de las enzimas que catalizan la transformación del triptófano a ácido indol acético (AIA) y por lo tanto interfiriendo en la síntesis de éste.

2.4.3. Propiedades de la enzima AIA oxidasa

Una forma de metabolismo del AIA consiste en la oxidación descarboxilativa de un lado de la cadena del AIA por la enzima AIA oxidasa, llevando a la formación de indol - 3 - metanol u oxindole - 3 - metileno, sin embargo el conocimiento respecto a la correlación entre los niveles de AIA y AIA oxidasa durante el proceso de inducción del crecimiento, es aun muy limitado (Zin - Huang *et al.*,1996).

En 1947 Tang y Bonner, citados por Goldacre (1953), fueron los primeros en describir la enzima, la cual oxida y destruye la actividad biológica del ácido indol acético (AIA). Informando que el pH óptimo en que actúa va de 6.0 a 6.7, y que el sustrato medio - máximo de concentración es 25 µg/ml de AIA.

Leopold (1964), menciona que la oxidación descarboxilativa del AIA requiere a un cofactor fenólico, y que éste puede activar la enzima AIA oxidasa, atribuyendo el efecto de activación específicamente a ácidos felúricos y p - cumáricos, y que en efecto la presencia de estos compuestos podrían ser la causa de la depresión del crecimiento.

Segura (1994), menciona a algunos compuestos fenólicos, específicamente monofenoles, como activadores de la reacción de descarboxilación del AIA.

Según Hartmnn y Kester (1995), los compuestos fenólicos estarían implicados en el proceso de formación de raíces adventicias, protegiendo a la auxina de su destrucción por la AIA oxidasa o también estimulando la acción de la enzima y por lo tanto afectando la concentración auxínica.

Por otro lado trabajos citados por Rojas (1995), informan de una estrecha relación entre la actividad de AIA oxidasa y la formación de raíces adventicias. La enzima podría ayudar a la destoxificación del exceso de AIA y actuar sobre la auxina, oxidándola y por lo tanto interfiriendo en su concentración.

2. 5. Compuestos fenólicos en vegetales

Las plantas son laboratorios naturales en donde se biosintetizan una gran cantidad de sustancias químicas y de hecho se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe.

El metabolismo primario de las plantas sintetiza compuestos esenciales y de presencia universal en todas las especies vegetales. Por el contrario, los

productos finales del metabolismo secundario no son ni esenciales ni de presencia universal en las plantas. Entre los metabolitos secundarios son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, tales como alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, flavonoides, glicósidos, glucosinolatos, quinonas, terpenoides y fenoles (Salisbury, 1994).

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos los que químicamente se caracterizan por poseer un anillo aromático más un grupo hidroxilo o un derivado funcional de éste (Hess, 1961).

Algunos roles importantes de los fenoles en los vegetales, son los que dicen relación con la defensa de la planta ante ataques de microorganismos o herbívoros, competencia frente a otros vegetales (sustancias alelopáticas), rigidez de la planta, lo que permite la conducción del agua con nutrientes, pigmentación de flores y frutos, lo que asegura la sobrevivencia de las especies, y por ultimo, cumplen un importante rol como inhibidores del crecimiento (Kefeli, 2002).

Un grupo especial de fenoles son aquellos que protegen las auxinas, tienen un efecto antioxidante inhibiendo la oxidación del ácido indol acético (AIA), y por otro lado podrían también contribuir a la oxidación del AIA interfiriendo en la concentración de éste. Para ordenar lo anterior, Rojas (1995), los divide en dos grupos, fenoles cofactores y fenoles inhibidores, respectivamente.

En una planta completa existe un gradiente de inhibición de la degradación enzimática del AIA, que es inversamente proporcional a la edad del tejido, por ello la inhibición disminuye del ápice a la base del tallo (Stonier, 1971), es decir

que a mayor edad existe mayor oxidación. Esto podría significar que en el tejido adulto, donde hay mayor cantidad de fenoles, la actividad de la enzima AIA oxidasa estaría aumentada (Kanamori, 1995).

Además de la concentración es importante considerar el tipo de fenoles, es así como los mono y difenoles aceleran la actividad de AIA oxidasa y los polifenoles la inhiben (Rojas, 1995).

Algunos tipos de compuestos fenólicos que pueden reducir la concentración de ácido indol acético (AIA) son los monofenoles tales como los ácidos p-hidroxibenzoico, vainílico, p-cumárico y siríngico que reducen la disponibilidad de AIA promoviendo su decarboxilación a través de la enzima AIA oxidasa. En contraste, muchos di y polifenoles (por ejemplo, los ácidos clorogénico, cafeico y protocatéuico) sinergizan el crecimiento inducido por AIA, suprimiendo la degradación de la hormona (Hartmann y Kester, 1995).

Estos resultados sugirieron que existiría un control en los niveles de AIA a través del balance entre mono y polifenoles. Estos últimos resultan interesantes debido a que, a través de la enzima polifenol oxidasa, oxidan polifenoles a quinonas y estos fenoles oxidados no deberían ser capaces de activar a la AIA oxidasa.

2.5.1. Los fenoles como cofactores en la formación de raíces

Un amplio rango de productos químicos, naturales y sintéticos, pueden mejorar la respuesta de las estacas al enraizamiento. Existe sinergismo entre auxinas y cofactores del enraizamiento (Rojas, 1995). Sin embargo, la identificación

química de los cofactores endógenos continua siendo no clara, aunque se conoce que presentan características de fenoles (Hartmann, 1995; Rojas, 1995).

El término cofactor ha sido usado para referirse a “sustancias fenólicas de origen natural que actúan sinérgicamente con el ácido indol acético (AIA) para promover el enraizamiento” (Hartmann y Kester, 1995).

Los compuestos fenólicos son muy importantes por el rol que cumplen en el crecimiento (Taiz y Zeiger, 1991), reduciendo o incrementando la concentración de ácido indol acético (AIA), lo que incide sobre la formación de raíces adventicias. En este sentido Kanamori (1995), asegura que el tejido adulto posee mayores contenidos de fenoles que el de una planta nueva, por lo que su capacidad rizogénica es mayor, y que el contenido total de estos aumenta en la región donde se regeneran las raíces para formar el conjugado auxina - fenol. Este mismo autor señala que la capacidad rizogénica se incrementa hacia la primavera por la disminución de inhibidores y por el aumento de la síntesis de auxinas.

Hartmann y Kester (1995), señalan que la acción de los compuestos fenólicos es la promoción de raíces adventicias por medio de la protección, al menos en parte, de la destrucción de la auxina por la enzima AIA oxidasa.

Por otro lado, pareciera que la alta concentración de fenoles solubles totales en lenga (Latsague y Lara, 2003), inhibe la formación de raíces adventicias en esta especie. Muchos de los compuestos fenólicos promueven el enraizamiento si se encuentran en bajas concentraciones, porque su toxicidad tiene límites cercanos a las concentraciones óptimas para inducir al enraizamiento.

Ciertamente, el rol de los compuestos fenólicos en la formación de raíces adventicias es un tema de controversia ya que algunos autores señalan que la acción de los compuestos fenólicos en la promoción de raíces, es la protección de la destrucción de la auxina por la enzima AIA oxidasa y por otra parte se señala también que actuarían como inhibidores y antagonistas de la acción auxínica, bloqueando su transporte y facilitando la acción de la enzima AIA oxidasa (Herman, 1963; Hartmann, 1989).

Rojas (1995), menciona “el papel que juegan los cofactores fenólicos en la iniciación de raíces adventicias es motivo de discusión ya que, en algunos estudios, no se ha encontrado ninguna correlación entre los cofactores de enraizamiento y la respuesta al enraizamiento (Hartmann y Kester, 1995). Por otra parte, no hay claridad sobre la acción de la enzima AIA oxidasa con respecto al enraizamiento, ya que, Bansal y Nanda (1984), encontraron que la actividad de esta enzima es muy alta en dos especies de gran porcentaje de enraizamiento (*Salix tremula* y *Populus robusta*), y fue insignificante en *Eucalyptus citriodora* cuyo enraizamiento fue nulo. Por otro lado *Hibiscus rosa* que tiene un porcentaje de enraizamiento menor que *Salix* y *Populus*, tiene una alta actividad enzimática”.

Sin embargo, otros trabajos informan de una estrecha relación entre la actividad de AIA oxidasa y la formación de raíces adventicias. La enzima podría ayudar a la detoxificación del exceso de AIA, o actuar sobre la auxina, generando algunos productos de oxidación, los cuales son biológicamente más activos.

Otros autores proponen postulados similares a lo anterior, pero añaden a la acción de AIA oxidasa, la acción de la enzima fenolasa. Ambas actuarían sobre el AIA y algunos cofactores fenólicos, respectivamente, formando un complejo

auxina - fenol, los que promueven el enraizamiento de estacas (Hartmann y Kester, 1995).

En resumen, los posibles mecanismos de acción de los compuestos fenólicos en la formación de raíces adventicias pueden ser los siguientes: estimular o inhibir la actividad de AIA oxidasa, estimular la síntesis y liberación de auxinas endógenas y formar el complejo auxina - fenol.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Materiales

3.1.1. Ubicación y fecha del ensayo

El ensayo *in vitro* se llevó a cabo en los Laboratorios de Química del Departamento de Ciencias Biológicas Y Químicas de la Universidad Católica de Temuco, ubicados en el Campus San Francisco.

El ensayo se inició en marzo del año 2003, fecha en que se comenzaron a afinar las técnicas colorimétricas a utilizar, y finalizó en el mes de mayo del año 2004.

3.1.2. Extracción del material biológico

Se utilizó como material vegetal, estacas de *Nothofagus pumilio*, extraídas de un bosque puro de lenga de la Reserva Nacional Malalcahuello - Nalcas, Comuna de Curacautín, Provincia de Malleco, IX Región, ubicado a 2 Km del refugio invernal en exposición Sur - Este (figura 1).

Este bosque puro de lenga fue originado por corridas de lava provenientes del volcán Lonquimay a principios de 1970 (Romero, 2000).

Estudios anteriores sobre reproducción vegetativa de lenga por enraizamiento

de estacas, fueron realizados en este sector, razón por la cual ésta investigación se llevó a cabo con los mismos individuos.

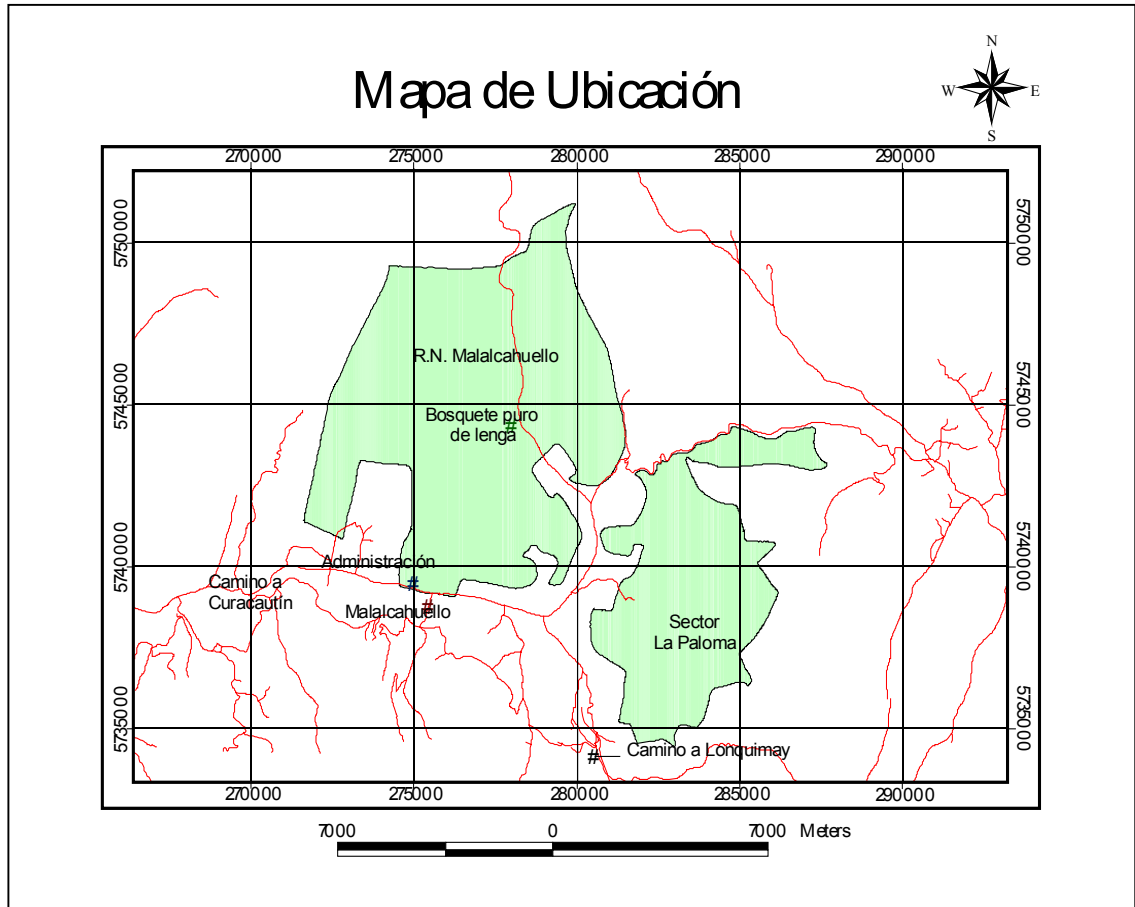


FIGURA 1. Mapa de ubicación bosquete de lenga, Reserva Nacional Malalcahuello - Nalcas.

3.1.3. Características del lugar de recolección.

El clima al interior de la Reserva Nacional Malalcahuello - Nalcas es mediterráneo perhúmedo, con una temperatura promedio anual de 8.5 °C y precipitaciones medias anuales de 3.083 mm, medida en la Cordillera Las

Raíces, teniendo solo uno o dos meses secos al año (CONAF, 1996).

Los efectos de la combinación de temperaturas más bajas y mayor precipitación, hacen que a mayor altitud exista mayor humedad (Landrum y Nimlos, 1975).

Los suelos de la Reserva se clasifican como grises pardo podsólicos, aunque en algunas partes presentan una capa de escoria volcánica de la cual ha derivado un suelo más delgado y de calidad inferior, que en las cumbres forman grandes arenales sin vegetación (Romero, 2000).

En cuanto a la flora, la reserva esta inserta en su totalidad en la región de los Bosques Andino - Patagónico, predominado por especies como araucaria (*Araucaria araucana*), coigüe (*Nothofagus dombeyi*), raulí (*Nothofagus alpina*) y lenga (*Nothofagus pumilio*). La quila corresponde a una especie común en el sotobosque, además de un gran número de Azaras y Berberis (CONAF, 1996).

3.2. Metodología

3.2.1. Planteamiento global

La estrategia experimental global, consistió en la extracción de fenoles y proteínas solubles totales a partir de extracto crudo de estacas de lenga, previamente molidas y homogenizadas en tampón de extracción Buffer fosfato pH 6.1. A partir del extracto crudo, se fraccionaron y recuperaron proteínas y fenoles por medio de cromatografía de filtración molecular utilizando una columna rellena con Sephadex G - 50, las fracciones obtenidas se analizaron colorimétricamente para determinar la concentración de proteínas y fenoles

presentes en cada volumen de elución obtenido desde la columna.

El fraccionamiento de las proteínas y fenoles totales presentes en el extracto crudo, permitió obtener fracciones puras que posteriormente fueron utilizadas para determinar (*in vitro*) el efecto de los fenoles sobre la actividad de AIA oxidasa, siendo éste el objetivo principal de la investigación.

Se analizó el efecto de fenoles presentes en la fracción más concentrada (fracción *pick*), así como también distintas diluciones de esta fracción *pick*, sobre la actividad de AIA oxidasa.

Los ensayos para determinar concentraciones de fenoles y proteínas, así como para evaluar actividad enzimática se optimizaron a partir de procedimientos colorimétricos previamente establecidos por medio del ajuste de curvas de calibración.

Con el propósito de verificar el efecto del pH sobre el fraccionamiento de proteínas y fenoles en la columna (posiblemente influenciado por la formación de complejos polifenólicos dependientes del pH) se ensayaron eluciones bajo dos condiciones de pH distintas (6.1 y 7.5).

3.2.2. Toma de muestras

Se recolectaron estacas de árboles de entre 30 y 35 años de edad, vigorosos y no atacados por patógenos, cuyas ramas se encontraban bien iluminadas, ubicadas en la periferia del árbol y no cubiertas por copas de árboles vecinos, seleccionando estacas sanas y vigorosas de aproximadamente 15 cm de

longitud. La figura 2 muestra algunos de los individuos seleccionados.



FIGURA 2. Características de los árboles elegidos para la obtención de las estacas. Reserva Nacional Malalcahuello - Nalcas.

Se muestrearon solo árboles dominantes y codominantes. En este bosque existen diferencias entre los árboles en relación a las variables diámetro y altura. Las estacas se extrajeron de ramas de la sección media de la copa, ya que esta zona presenta una determinada edad ontogénica, representando la fase juvenil de la planta, y por lo tanto la presencia de puntos o tejidos meristemáticos (Hartmann y Kester, 1995).

3.2.3. Tratamiento de las estacas

El material vegetal fue recolectado en el mes de octubre y la extracción fue hecha antes de medio día, el material vegetal fue envuelto en papel aluminio, rotulado y posteriormente depositado en un termo criogénico (MVE X C47/1-6) con Nitrógeno líquido, estas condiciones se mantuvieron hasta el momento de su análisis.

Con este procedimiento se evita la degradación del tejido vegetal y además se preserva la actividad enzimática, principalmente de la enzima a estudiar.

3.2.4. Preparación de la columna de filtración molecular

En la cromatografía por filtración molecular (también llamada de permeación), los componentes de una muestra se separan de acuerdo a su tamaño y peso molecular.

Para el empacado de la columna, se suspendió una cierta cantidad de resina Sephadex G - 50 en una solución de Buffer fosfato 66 mM, ajustado a pH 6.1, esta suspensión se agitó y mantuvo a temperatura ambiente por dos días.

La columna se llenó primero con la solución de Buffer fosfato (solución eluente).

Para evitar la pérdida de éste y para evitar la pérdida de resina, se puso en la base de la columna una porción de lana de vidrio, luego por medio de una pipeta pasteur se agregó una suspensión de resina Sephadex, evitando la entrada de burbujas de aire al sistema. Una vez llena con la suspensión se

pasaron a través de la columna aproximadamente 1000 ml de la solución eluente.

Para el empacado de la columna con Buffer fosfato salino pH 7.5 se procedió de la misma forma descrita para Buffer fosfato pH 6.1.

3.2.4.1. Cálculo del volumen de elución

Para calcular el flujo de la columna y asegurar el volumen de interés (volumen de elución), se debió calibrar la columna con dos compuestos de peso molecular conocido, para lo cual, en la superficie de la resina fue puesto 1 ml de una mezcla de Azul dextrano (Pharm. Uppsala) (10 mg/ml) de peso molecular 2 millones g/mol y rojo fenol (10 mg/ml) de peso molecular 345 g/mol.

Una vez que la mezcla entró a la resina se comenzó a recoger el eluido hasta que salió el azul dextrano, este volumen se anotó como volumen inicial o volumen muerto (V_0), el que marcó el volumen mínimo a partir del cual se podía obtener proteínas al eluir la muestra problema.

Se continuó con la elución hasta que eluyó completamente el rojo fenol, este volumen se anotó como volumen total (V_t), que indica el volumen máximo hasta donde se podían eluir proteínas.

Los colorantes sirven para delimitar el intervalo de volúmenes entre los que deben eluir las proteínas, puesto que sus pesos moleculares se encuentran entre los del azul y el rojo, y la columna separa las proteínas en función de su peso molecular.

En la figura 3 se observa el recorrido de los colorantes azul dextrano y rojo fenol por la columna con gel Sephadex G - 50. El colorante de menor peso molecular (rojo) difunde al interior de las partículas del gel, por lo cual demora más en eluir.



FIGURA 3. Columna de filtración molecular con gel Sephadex G - 50 y colorantes azul dextrano y rojo fenol.

Para el calculo del volumen de elución o volumen de interés se restó al volumen total el valor del volumen inicial.

$$\text{Vol. de elución} = V_t - V_0$$

Los 60 ml de volumen de elución resultante fueron recogidos en fracciones de 5 ml cada una, volumen mínimo necesario para realizar los análisis colorimétricos, determinado por el tamaño de las cubetas del espectrofotómetro utilizado (Cecil CE 2041).

3.2.5. Obtención de extracto crudo

Las fracciones de fenoles y proteínas se extractaron de acuerdo a la metodología de Grison y Pilet (1985), citado por Pythoud (1989). Los segmentos previamente molidos se homogenizaron en una licuadora utilizando como medio de extracción Buffer fosfato 66 mM (pH 6.1) a 4 ° C, en proporción 1: 2 (una parte de molienda por dos de Buffer) y filtrado en lana de vidrio.

Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 3.500 rpm (revoluciones por minuto) y se eliminó el *pelet*, la fracción sobrenadante se centrifugó nuevamente 30 minutos a 3.500 rpm, constituyendo éste sobrenadante el extracto que contenía en sí la fracción proteica y fenólica juntas.

Para obtener de éste extracto fracciones de fenoles y proteínas en forma separada, fue necesario someter el extracto a cromatografía de filtración molecular en gel Sephadex G - 50 usando en la primera etapa de la investigación Buffer fosfato 66 mM pH 6,1 como eluente y en la segunda etapa Buffer fosfato

salino pH 7.5.

En cada caso se aplicó en la columna una muestra de 2 ml de extracto, recogiendo las fracciones que constituían el volumen de interés (volumen de eluído), cada una se mantuvo en frío y oscuridad (para proteger proteínas y fenoles respectivamente), para posteriormente determinar en ellas la concentración de fenoles y proteínas.

La extracción realizada con tampón fosfato permite la obtención de proteínas solubles del tejido vegetal (Alberdi *et al.*, 2002), la variación en los pH utilizados se realizó con el fin de determinar a que pH es más factible encontrar porciones completamente puras de proteína, y ver el efecto de éste en la formación de complejos polifenólicos y complejos fenol-proteínas.

3.2.6. Determinación del contenido de fenoles solubles

Para la determinación de fenoles solubles en las fracciones recolectadas de la columna se utilizó el método de Folin Ciocalteu (Scarpa y Bordeu, 2000). El fundamento de este método consiste en que los compuestos fenólicos son oxidados por una mezcla de ácidos conocida como Reactivo de Folin.

3.2.6.1. Preparación del Reactivo de Folin. Para la preparación del reactivo de Folin, en un matraz de 500 ml fueron puestos 20 g de Wolframato de Sodio y 5 g de Molibdeno de Sodio, éstos fueron disueltos en aproximadamente 100 ml de agua destilada, a esta mezcla se agregó 10 ml de Ácido Fosfórico y 20 ml de Ácido Clorhídrico, bajo un sistema refrigerante se hizo hervir por siete horas, una vez frío se agregaron 30 g de Sulfato de Litio y algunas gotas de Bromo,

para luego ebullición nuevamente por 15 minutos. Posteriormente y una vez frío se aforó con agua destilada a 200 ml.

3.2.6.2. Curva de calibración. Debido a la alta diversidad de compuestos fenólicos existentes, los fenoles solubles deben ser determinados usando unidades arbitrarias de un estándar fenólico que en este caso correspondió a Ácido Tánico, éste fue secado por 2 horas a 105 °C y llevado luego a desecador para posteriormente preparar una solución patrón de 50 ppm (partes por millón) que fue utilizada para preparar los estándares de referencia (tabla 1) necesarios para la construcción de la curva de calibración.

TABLA 1. Preparación de estándares para la curva de calibración de fenoles solubles con una solución patrón de Ácido Tánico 50 ppm.

Punto de Curva	Solución patrón (ml)	Agua Destilada (ml)	Concentración (Ac. Tánico) (ppm)
0	0	50	0
1	7.5	42.5	7.5
2	10	40	10
3	12.5	37.5	12.5
4	25	25	25
5	37.5	12.5	37.5
6	50	0	50

Para el desarrollo de color se tomó 1 ml de cada una de las preparaciones anteriores, 1 ml de reactivo de Folin, 3 ml de Carbonato de Sodio al 20% y se aforó a 25 ml con agua destilada. La lectura de la absorbancia a 765 nm se

realizó, luego de 30 minutos de incubación.

La curva de calibración en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación (3.1) y a un coeficiente de correlación igual a 0,9958.

$$y = 0,0063 x \quad (3.1)$$

La curva de calibración resultante se muestra en figura 4. La intensidad de la coloración azul observada en las fracciones es función de la cantidad de fenoles encontrados en cada una de ellas.

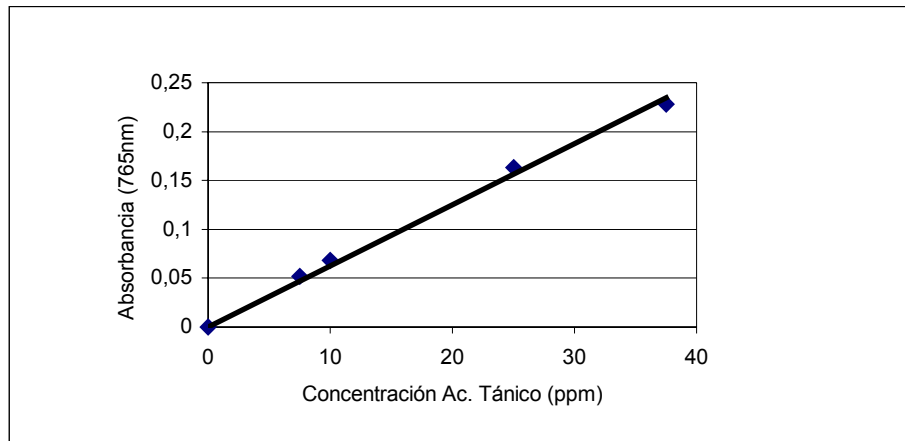


FIGURA 4. Curva de calibración para determinación de fenoles solubles con ácido tánico.

3.2.6.3. Determinación del contenido de fenoles solubles en las fracciones. El procedimiento anterior se siguió para determinar el contenido de fenoles presente en cada fracción obtenida, tomando alícuotas de 1 ml de cada fracción recolectada de la columna. A partir de las absorbancias obtenidas en ellas se

determinó su concentración en ppm a través de la ecuación (3.1) obtenida de la curva de calibración con ácido tánico.

3.2.7. Determinación del contenido de proteínas solubles

Para la medición de proteínas solubles se utilizó el método de Bradford (1976), este método determina la concentración de proteína soluble a través de la adición de un colorante ácido (azul de Coomassie G-250, Pierce) a la solución de proteínas, además se adiciona hidróxido de sodio 1 M, para mantener el pH de la muestra ¹.

3.2.7.1 Preparación del Reactivo de Bradford. Para la preparación del reactivo de Bradford se utilizaron 100 mg de colorante Azul de Coomassie G - 250 (Pierce), los que fueron disueltos en 100 ml de Ácido Fosfórico 85 % y 50 ml de etanol 95 %, se agitó en agitador magnético (Fisatom 752A) por una hora, se aforó a un litro con agua destilada y filtró en papel Whatman antes de usar.

3.2.7.2 Curva de calibración. La curva de calibración se preparó con una solución patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma) de concentración 1 mg/ml, a partir de ésta solución se prepararon los estándares de referencia a las concentraciones que se indican en la tabla 2.

¹Dr. Juan M. Gallardo. Laboratorio de Toxicología, CIBIOR - IMSS, México. Comunicación vía Internet.

TABLA 2. Preparación de estándares para la curva calibración de proteínas solubles con una solución patrón de BSA (1 mg/ml).

Punto de Curva	Solución patrón (µL)	Buffer fosfato 66mM (µL)	Concentración final (BSA) (mg/ml)
0	0	100	0
1	12.5	87.5	0.125
2	25	75	0.25
3	50	100	0.5
4	75	25	0.75
5	100	0	1

Para el desarrollo de color, a cada uno de los matraces se adicionó 5 ml de reactivo de Bradford y 250 µL de NaOH. Se incubo 5 minutos y leyó absorbancia a 595 nm.

La curva de calibración en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación (3.2) y a un coeficiente de correlación igual a 0,9803.

$$y = 0.1444 x \quad (3.2)$$

La curva de calibración se muestra en la figura 5. La intensidad de la coloración azul observada en las fracciones ensayadas es función de la cantidad de proteínas presentes en cada una de ellas.

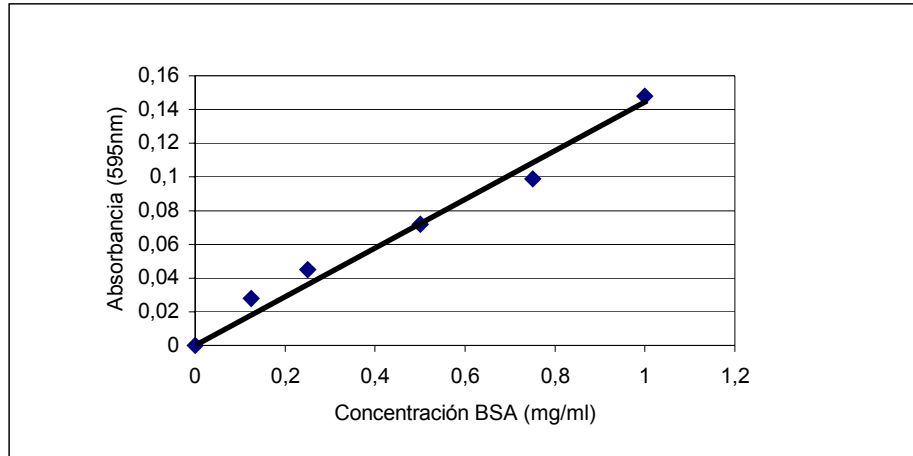


FIGURA 5. Curva de calibración para determinación de proteínas con BSA.

3.2.7.3. Determinación del contenido de proteínas solubles en las fracciones.

El mismo procedimiento se siguió para determinar el contenido de proteínas presentes en cada fracción obtenida de la columna, para ello se tomaron alícuotas de 100 μ L.

Para obtener la concentración de proteínas en las fracciones, a partir de las absorbancias se determinó su concentración en mg/ml a través de la ecuación (3.2) obtenida de la curva de calibración con BSA.

3.2.8. Determinación de la actividad de la enzima AIA oxidasa

Para determinar la presencia de la enzima AIA oxidasa en las fracciones de proteínas recolectadas de la columna, a cada una de ellas se le determinó

actividad enzimática de AIA oxidasa, la cual fue ensayada siguiendo el método de ensayo descrito por Psenak *et al.* (1970), citado por Ríos (1996), que se basa en la oxidación del AIA en presencia del reactivo de Salkowski.

3.2.8.1. Preparación del Reactivo de Salkowski. Para su preparación se utilizaron 20 ml de Cloruro Férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ al 5% H_2O), 57.45 ml de agua destilada y 22.55 ml de Ácido Sulfúrico concentrado (36 N), la mezcla debió hacerse en baño con hielo para evitar el aumento de la temperatura.

3.2.8.2. Curva de calibración. La curva de calibración se preparó con una solución patrón de AIA (Ácido Indol Acético) de concentración 1 mM, a partir de esta solución se prepararon los estándares de referencia (tabla 3) necesarios para la construcción de la curva de calibración la cual permitirá cuantificar actividad enzimática en las distintas fracciones eluídas de la columna.

TABLA 3. Preparación de estándares para la curva calibración de actividad enzimática con una solución patrón de AIA 1 mM (Ácido Indol Acético).

Punto de Curva	Solución patrón (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración final AIA (mM)
0	0	10	0
1	0.1	0.9	0.1
2	0.3	0.7	0.3
3	0.5	0.5	0.5
4	0.7	0.3	0.7
5	1	0	1

A cada matraz se le adicionó 0.5 ml de tampón fosfato 0.05 M pH 5.8, 0.25 ml de Resorcinol $5 \cdot 10^{-4}$ M y 0.25 ml de Cloruro de Manganeso $5 \cdot 10^{-4}$.

La preparación anterior se incubo por 1 hora a 30 °C y en oscuridad, transcurrido ese tiempo se detuvo la reacción enzimática con Ácido Tricloroacético al 50 %. La valoración se realizó en una nueva batería que contenía 0.5 ml de la reacción anterior y 2 ml de reactivo de Salkowski, esto se dejó reaccionar por 20 minutos y se leyó absorbancia a 500 nm.

La curva de calibración en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación (3.3) y a un coeficiente de correlación igual a 0,9892.

$$y = 0,3538 x \quad (3.3)$$

La curva de calibración resultante se muestra en la figura 6.

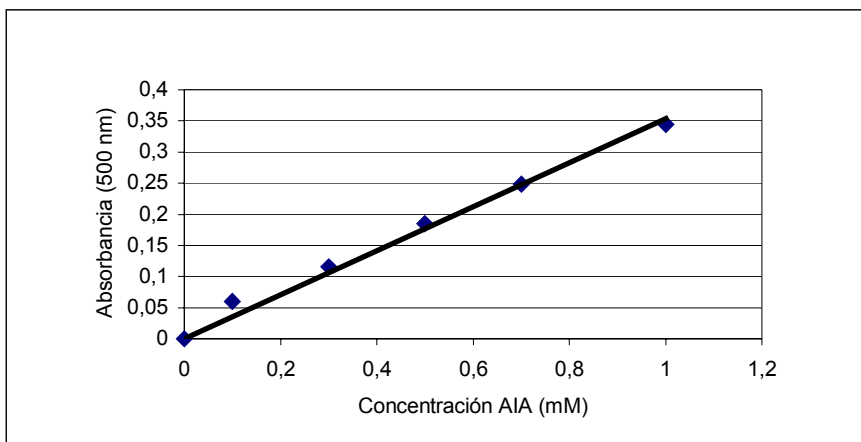


FIGURA 6. Curva de calibración para la determinación de actividad enzimática de AIA oxidasa con ácido indol acético.

En este caso una unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima capaz de catalizar un sustrato de concentración 1 mM de AIA por miligramo de proteína por hora (1 mM AIA / mg proteína / hr).

3.2.8.3. Determinación de la actividad enzimática en las fracciones. Para la determinación de actividad enzimática en las fracciones recolectadas de la columna, se tomó 1 ml de cada fracción y se procedió a determinar la desaparición del sustrato AIA a partir de una concentración inicial 1 mM, en un ensayo de 1 hora de duración, tal cual como se explicó anteriormente.

Las absorbancias obtenidas en cada una de las fracciones fueron referidas a la ecuación (3.3) de la curva de calibración con AIA, obteniéndose las correspondientes concentraciones de AIA remanente. La actividad enzimática se expresó en términos de mM AIA / mg proteína / hr.

3.2.9. Determinación del efecto de los fenoles solubles y del pH de elución en la actividad de AIA oxidasa.

Para evaluar el efecto de los fenoles sobre la actividad de AIA oxidasa, se determinó la variación en el consumo de AIA por parte de la enzima, frente a distintas concentraciones de fenol obtenidas en las fracciones colectadas de la columna y evaluadas en el punto 3.2.6.3.

3.2.9.1. Buffer fosfato pH 6.1. Para analizar el efecto de los fenoles solubles sobre la actividad de la enzima AIA oxidasa, se tomaron las fracciones *pick* de fenol, es decir las fracciones que presentaran la más alta concentración de fenoles solubles determinados con reactivo de Folin. Estas se diluyeron hasta obtener una batería con concentraciones de 0, 50, 75 y 100% de fenol, las que

fueron ensayadas con las fracciones correspondientes al *pick* de proteína con actividad AIA oxidasa y que estuvieran en lo posible libres de fenol, evitando tomar aquellos *pick* encontrados en las primeras fracciones, sin embargo en todos los casos no fue posible realizar el ensayo con fracciones de proteína realmente libres de fenoles.

El mismo proceso se repitió en seis réplicas y en cada una se realizaron cinco repeticiones con el fin de obtener resultados validos estadísticamente, el resumen de los resultados obtenidos en los ensayos se observa en la tabla 13 (anexo).

3.2.9.1.1. Diseño experimental. Se presenta en la tabla 4 el esquema de los tratamientos realizados y sus respectivas réplicas, donde **T 0** corresponde al tratamiento control (sin fenol) y **T 1**, **T 2** y **T 3** corresponden a las concentraciones de fenol (distintas y crecientes) frente a las que se midió la actividad enzimática. **R** corresponde a las seis réplicas hechas y **X** corresponde a la media de las 5 repeticiones por réplica.

TABLA 4. Diseño experimental para tratamientos realizados utilizando Buffer fosfato pH 6.1.

Tratamiento	R	R	R	R	R	R
T0 (0 %)	X	X	X	X	X	X
T1 (50%)	X	X	X	X	X	X
T2 (75%)	X	X	X	X	X	X
T3 (100%)	X	X	X	X	X	X

Para la validación se aplicó un análisis de la varianza (Anova una vía). También fue aplicado un test LSD con un nivel de confianza del 95%.

3.2.9.2. Buffer fosfato salino pH 7.5. Se observó el comportamiento de la actividad enzimática de AIA oxidasa a través de la variación en el consumo de AIA cuando las fracciones puras de proteínas (libres de fenol) fueron enfrentadas a determinadas concentraciones de fenoles solubles obtenidas de las fracciones recolectadas de la columna usando como eluente Buffer fosfato salino pH 7.5.

3.2.9.2.1. Diseño experimental. El diseño experimental con Buffer fosfato salino pH 7.5 comprendió dos etapas. Primero se observó, si en fracciones puras de proteína enzimática, la simple adición de fenoles, independiente de la concentración, alteraba positivamente (es decir, aumentaba) su actividad enzimática (tabla 5). El aumento de actividad fue analizado a través del test LSD.

TABLA 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 réplicas realizadas.

Tratamiento	R	R	R	R
T 0	X	X	X	X
T 1	X	X	X	X

Posteriormente, para comprobar si en este Buffer fosfato salino pH 7.5, utilizado

para obtener fracciones puras de proteínas, es decir, separadas totalmente de fenoles, se observa una variación en el comportamiento de la respuesta enzimática frente a distintas concentraciones de fenol, se repitió el diseño experimental aplicado en 3.2.9.1.1., cambiando los rangos de concentración de fenol utilizados ya que estos son dependientes de lo que se determine en cada ensayo (tabla 6 y anexo 2).

TABLA 6. Esquema de los tratamientos a realizar, cada uno con tres réplicas (**R**), en donde **T 0** corresponde al tratamiento control (sin fenol) y **T 1, T 2, T 3** y **T 4**, corresponden a distintas concentraciones de fenol (2.609; 47.88; 160.57 y 185 ppm respectivamente).

Tratamiento	R	R	R
T 0 (0 ppm)	X	X	X
T 1 (2.6 ppm)	X	X	X
T 2 (47.8 ppm)	X	X	X
T 3 (160.5 ppm)	X	X	X
T 4 (185 ppm)	X	X	X

Los datos fueron analizados en forma individual para cada tratamiento realizando un análisis de varianza, y para ver si existían diferencias significativas entre los tratamientos, principalmente entre el tratamiento control (**T 0**) y los demás tratamientos, las medias fueron sometidas a un test de comparaciones múltiples LSD con un nivel de confianza del 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Extracción de fenoles y proteínas solubles

Con respecto a la extracción de fenoles y proteínas solubles a partir de estacas de lenga, se puede observar claramente (en los ensayos realizados utilizando Buffer fosfato pH 6.1) que los fenoles eluyen totalmente en las primeras fracciones, sin embargo estos fenoles no se encuentran libres de proteínas. En las fracciones siguientes se observa la obtención de proteínas, las que no están totalmente libres de fenoles (figuras 14 a 25 del anexo). Al realizar el ensayo con Buffer fosfato salino pH 7.5, es factible obtener fracciones puras de proteínas, es decir, se evita la formación de complejos fenol - proteína, lo que queda demostrado al encontrar fracciones proteicas completamente libres de fenol (figuras 14 a 25 del anexo).

Los resultados permiten señalar que es posible fraccionar y recuperar en forma separada proteínas libres de fenoles a través de la columna Sephadex G-50 en estacas de lenga, similar a lo obtenido por Pythoud y Buchala (1989), quienes lograron obtener a partir de extracto de tallo de *Populus tremula* una preparación enzimática libre de fenoles, utilizando columna Sephadex G - 50. La obtención de proteínas totalmente libres de fenoles es una condición para poder posteriormente *in vitro* demostrar el efecto de estos fenoles como cofactores enzimáticos en lenga.

Por otra parte, considerando que el principal objetivo de la investigación es

determinar el efecto de los fenoles solubles sobre la actividad de AIA oxidasa, en este capítulo se discutirá sobre esta parte del ensayo en particular, presentando los resultados de la extracción y cálculo de concentración de fenoles y proteínas en anexos.

4.2. Actividad enzimática

4.2.1. Ensayos realizados con Buffer Fosfato pH 6.1 como eluente

La figura 7 muestra el comportamiento de la actividad enzimática de AIA oxidasa frente a las concentraciones de fenol ensayadas.

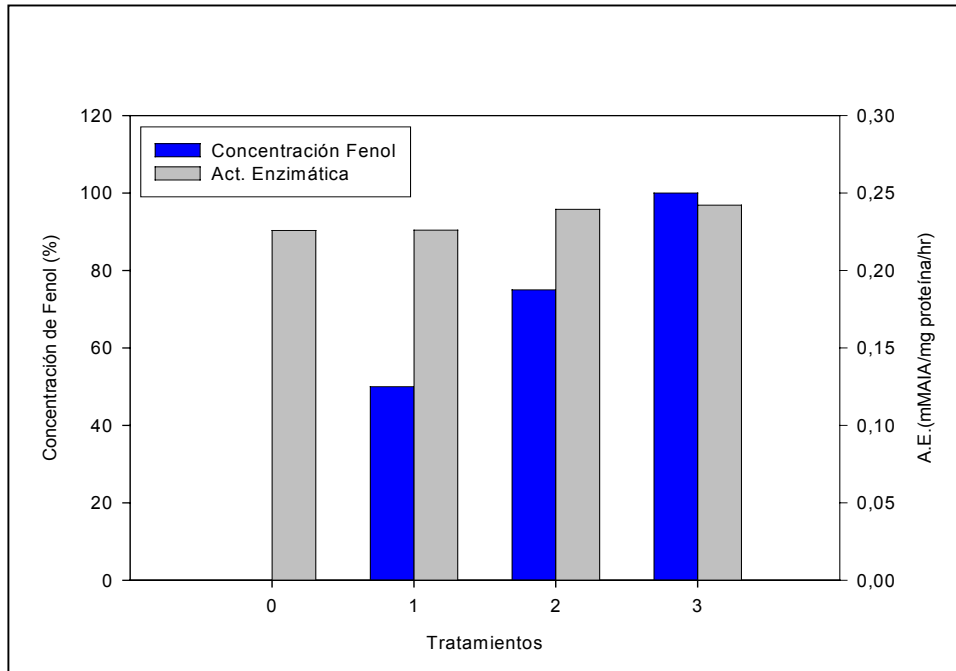


FIGURA 7. Valores promedios de las seis réplicas para análisis de actividad enzimática (A.E.) v/s concentración de fenol para tratamientos 0 a 3 (0, 50, 75 y 100% de fenol respectivamente).

Se puede observar que en las primeras fracciones existen ciertos niveles importantes de actividad enzimática (actividad basal), lo que haría suponer que debido al volumen de las fracciones colectadas, la enzima se encontraría acomplejada con fenoles u otras proteínas, aumentando su peso molecular y eluyendo primero, fenómeno que además se ve potenciado por el pH del Buffer de elución utilizado, el cual se encuentra dentro del pH óptimo de la enzima, que según Goldacre (1953), fluctúa entre 6.0 y 6.7. Por otro lado, podría suponerse que la enzima ya tenía suficiente fenol para entregar el máximo de respuesta.

En la figura 8 podemos apreciar que si bien hay un leve aumento de la actividad enzimática, éste no es significativo ($\alpha < 0.05$).

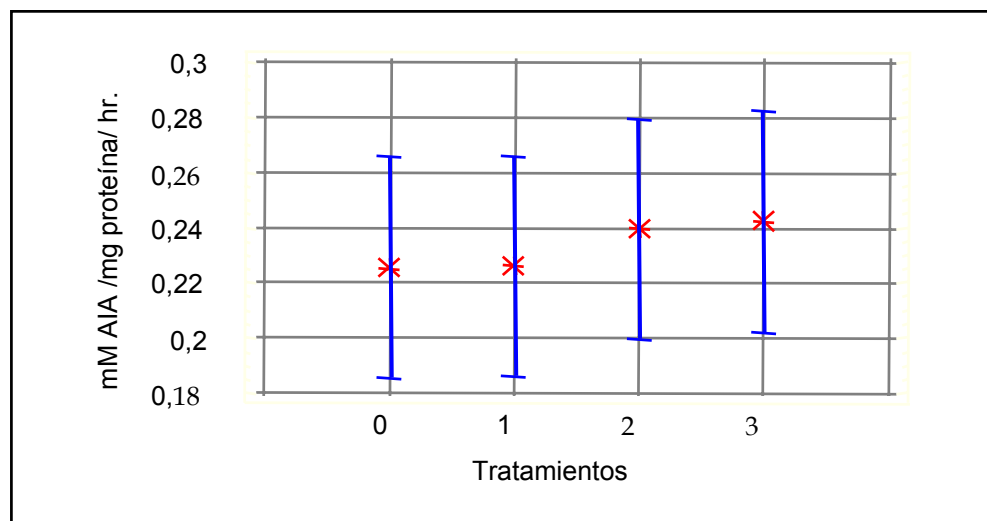


FIGURA 8. Actividad enzimática media de estacas de *Nothofagus pumilio*, a un nivel de confianza de 95%. Números 0, 1, 2, y 3 corresponden a tratamientos aplicados de concentración de fenol 0, 50%, 75% y 100% respectivamente.

Según Beffa *et al.* (1990), la actividad de AIA oxidasa ensayada *in vitro*, aumenta frente a compuestos fenólicos como el ácido p - cumárico, pero este aumento ocurre sólo después de la separación de compuestos de bajo peso molecular, lo que podría también explicar la alta actividad en las primeras fracciones eluídas.

Por otra parte, al tomar para el ensayo en todos los casos la fracción *pick* de fenoles solubles, (fracción que eluyó en el segundo o tercer volumen recogido en todas las muestras), se podría pensar que la actividad fue ensayada frente al mismo tipo de fenol, variando solo su concentración, razón por la cual no se observa variación en ella, ya que según Gortenr *et al.* (1958), citado por Leopold (1964), este efecto de activación, no depende solo de la concentración de fenol, sino que más bien la activación de la enzima es atribuida específicamente a un compuesto endógeno de tipo felurico o p - cumárico (ensayo realizado en tejido de piña). Según el mismo autor, en otros tejidos vegetales, naturalmente ocurre que los compuestos fenólicos en general, presumiblemente provocan una depresión en el crecimiento a través de un efecto de red en presencia de ese químico.

Otros autores (Leopold, 1964 y Rojas, 1995) también mencionan al ácido p - cumárico como activador de la enzima AIA oxidasa y por tanto como posible inhibidor del desarrollo radicular.

4.2.2. Ensayos para actividad enzimática realizados con Buffer Fosfato Salino pH 7.5 como eluente

Se probó el ensayo usando como Buffer eluente, Buffer fosfato salino pH 7.5, ya que a este pH se evita la formación de complejos proteína- fenol asegurando

proteínas de mayor pureza.

En la figura 9 se puede apreciar que al agregar fenoles a una porción pura de proteínas, se estimula significativamente la actividad enzimática ($\alpha < 0.05$). El aumento medio es de 0.03 mM AIA /mg proteína /hr (T1) a 0.28 mM AIA /mg proteína /hr (T2).

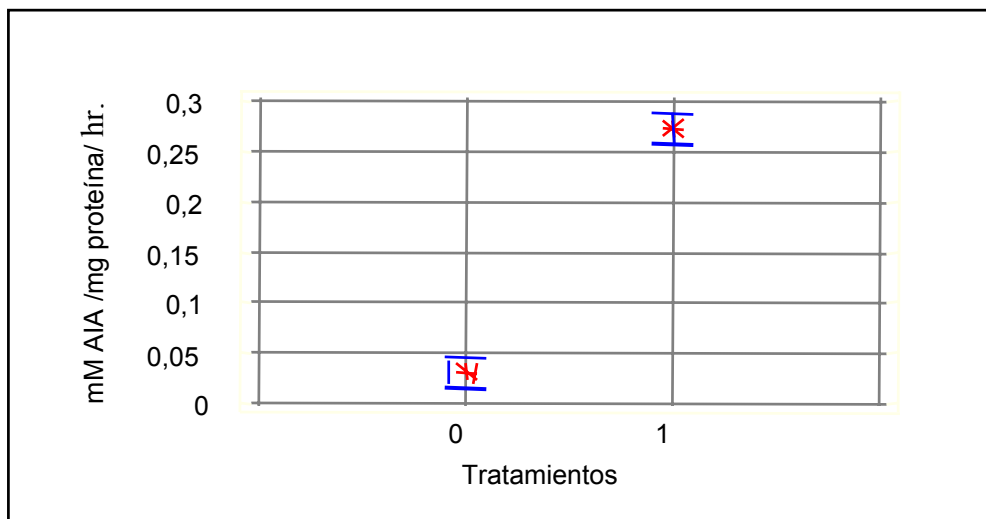


FIGURA 9. Actividad enzimática (A.E.) media de estacas de *Nothofagus pumilio*, a un nivel de confianza de 95%, 0 y 1 corresponden a tratamientos aplicados de concentración de fenol 0 y 115 ppm respectivamente (en tabla 16 del anexo ver resultados parciales obtenidos en las cuatro repeticiones).

Posteriormente, para analizar si este aumento observado en la actividad de la enzima AIA oxidasa frente a la aplicación de fenoles solubles, depende de la concentración que se aplique de éstos, se realizó el ensayo midiendo la variación en la actividad enzimática frente a diferentes concentraciones de fenoles solubles. La figura 10 muestra que existen diferencias significativas entre

las distintas respuestas de actividad enzimática de AIA oxidasa al ser ensayada frente a ciertas concentraciones de fenol.

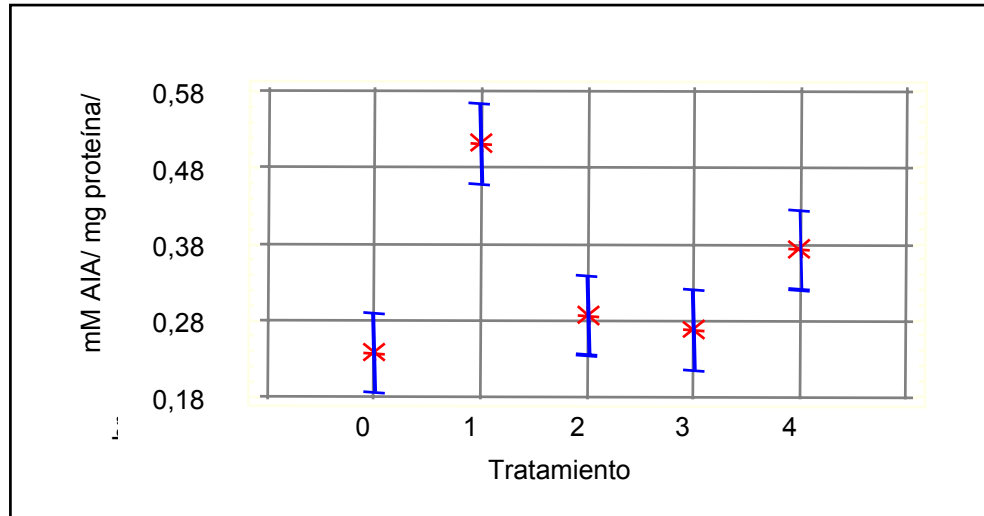


FIGURA 10. Actividad enzimática media en estacas de *Nothofagus pumilio*, a un nivel de confianza de 95%. Números 0 a 4 corresponden a tratamientos aplicados de concentración de fenol 0, 2.6, 47.8, 160.57 y 185 ppm respectivamente.

Como se observa en la figura, si bien existe un aumento en la actividad de la enzima en todos los tratamientos, no se observa una tendencia que indique que el incremento de la actividad es proporcional al aumento de la concentración de fenol aplicada, por el contrario se observa una diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en el aumento de la actividad en el tratamiento 2, el cual corresponde a la menor concentración de fenol ensayada (2.6 ppm).

Según estos resultados pareciera ser que, a pesar de que los fenoles se muestran como activadores de la enzima AIA oxidasa en lengua, no existe relación entre la concentración de fenoles y la actividad de AIA, lo que concuerda con Rojas

(1995), quien señala que además de la concentración, es importante considerar el tipo de fenoles, agregando este autor que los mono y difenoles aceleran la actividad de AIA oxidasa y los polifenoles la inhiben.

El mismo autor estudió que el contenido de fenoles en queule (*Gomortega keule*), especie de difícil enraizamiento, es menor que el que contiene el álamo, especie que no tiene ninguna dificultad para enraizar. Por lo cual tampoco pudiese pensarse que la capacidad rizogénica disminuye proporcionalmente al aumentar contenido de fenoles.

Siguiendo con esta analogía, el contenido de fenoles totales de lingue (*Persea lingue*) pudiera sugerir que esta especie no debiera presentar dificultades para su enraizamiento. Sin embargo, sí existe dificultad para lograr la formación de raíces adventicias, cosa que no ocurre en tepa (*Laurelia philippiana*) cuyo contenido de fenoles totales es semejante al de lingue (Santelices, 1990), el autor concuerda en que, sin considerar la concentración total de fenoles, existen ciertos tipos de fenoles inhibitorios capaces de activar la enzima. Hartmann y Kester (1995), señalan que los fenoles del tipo inhibitorio serían monofenoles o m - difenoles.

Algunos autores (Leopod, 1965; Hartmann y Kester, 1995; Rojas, 1995), señalan que el contenido de fenoles varía según la época del año, por lo que sería recomendable realizar los ensayos de enraizamiento en épocas en que el contenido de fenoles inhibitorios es menor, además mencionan que la actividad enzimática es responsabilidad de un tipo de fenol en particular, sin embargo el análisis por cromatografía de los extractos orgánicos que contienen compuestos fenólicos, no permite aseverar si los del tipo inhibitorio se encuentran presentes en las estacas. Por lo tanto, sería recomendable a futuro recurrir a un análisis

exhaustivo de cada uno de los fenoles que se encuentran en el extracto, aislarlos y posteriormente analizar el efecto de cada uno de ellos por separado sobre la actividad enzimática y su incidencia en la formación de raíces adventicias.

5. CONCLUSIONES

- El fraccionamiento de extractos crudos de estacas de lenga en columna Sephadex G - 50 permite recuperar en forma separada proteínas solubles de fenoles solubles presentes en el extracto, dentro del rango de tamaños determinados por los marcadores azul dextrano y rojo fenol.
- La utilización de Buffer Fosfato salino pH 7.5 como eluente evita la formación de complejos proteína - fenol de alto peso molecular, obteniendo fracciones más puras de proteínas.
- Los fenoles solubles actúan como cofactores de la enzima AIA oxidasa en estacas de lenga, estimulando la actividad AIA oxidasa.
- No existe correlación entre la concentración de fenoles solubles y la actividad enzimática de AIA oxidasa.

RESUMEN

Estacas de lenga (*Nothofagus pumilio*) no responden al tratamiento auxínico en la inducción de raíces adventicias. Esto se atribuye al contenido de fenoles producidos por la especie, los que podrían estar estimulando la actividad de la enzima auxina oxidasa (AIA oxidasa), influyendo en la oxidación del ácido indol acético (AIA) aplicado en los tratamientos.

En base a lo anterior, se estudio el efecto que los fenoles solubles presentes en estacas de lenga, tienen sobre la actividad enzimática de AIA oxidasa.

El ensayo consistió en extraer, a partir de extracto crudo de estacas de lenga, fracciones puras de fenoles solubles y proteínas solubles, separadas por cromatografía en columna de filtración molecular por gel Sephadex G - 50. Posteriormente a través del método de Folin - Ciocalteu y método de Bradford, se determinaron las concentraciones de fenoles y proteínas en las distintas fracciones recolectadas.

Posteriormente se analizó el efecto de fenoles solubles sobre la actividad enzimática de AIA oxidasa, eluidos con dos tipos de Buffer diferentes (Buffer fosfato pH 6.1 y Buffer fosfato salino pH 7.5).

Con Buffer fosfato pH 6.1 como eluente, se investigó el efecto de diferentes concentraciones de fenoles solubles (0, 27, 40 y 54 ppm) sobre la actividad de AIA oxidasa, no encontrándose diferencias significativas, lo que se atribuyó al

pH de Buffer utilizado como eluente, el que probablemente promueve la formación de complejos auxina - fenol y proteínas acomplejadas, lo que impediría obtener fracciones de proteínas puras (libres de fenol).

Al utilizar Buffer fosfato salino pH 7.5, sí se obtuvieron fracciones puras de proteína enzimática, lo que permitió analizar el efecto de los fenoles solubles totales sobre la actividad enzimática en estas fracciones. Se midió actividad enzimática sin fenol y con fenol (0 y 115 ppm respectivamente) observándose un aumento significativo en la actividad de la enzima AIA oxidasa cuando es medida en presencia de fenoles. Luego para analizar si el aumento en la actividad de la enzima es dependiente de la concentración de fenoles aplicados, se analizó el efecto con concentraciones crecientes de fenol (2, 48, 160 y 185 ppm), no encontrándose un patrón de correlación entre el aumento en la concentración de fenol aplicado y el aumento en la actividad enzimática.

En conclusión, los resultados indican que si bien los fenoles solubles presentes en estacas de lenga estarían implicados como estimuladores de la actividad de la enzima AIA oxidasa y por lo tanto estarían afectando la concentración auxínica, no existe correlación entre la concentración de éstos y la actividad enzimática.

7. SUMMARY

Lenga cuttings (*Nothofagus pumilio*) don't respond to auxin treatment in the induction of adventitious roots. This is attributed to a high contents of phenols produced by the specie, which could be stimulating the enzyme IAA oxidase and influencing the oxidation of indol acetic acid (IAA) applied in the treatment.

Based on the above, the effect that soluble phenols presents in cuttings of lenga have on the enzymatic activity of IAA oxidase was studied.

This study consisted in a crude extract from lenga cuttings. Pure fractions of soluble phenols and soluble proteins, were separated by chromatography in column of molecular filtration by Sephadex G - 50 using method of Folin - Ciocalteu and Bradford, respectively, the concentration of the different fractions recollected was determined.

Subsequently, the effect of different concentrations of phenols on enzymatic activity of IAA oxidase was analyzed, employing two different Buffer (Phosphate Buffer pH 6.1 and Phosphate Saline Buffer pH 7.5).

Using Phosphate Buffer pH 6.1, the effect of different concentrations of phenols (0, 27, 40 y 50 ppm) on IAA oxidase activity was studied. No differences in the enzymatic activity against different phenol concentration were found this was attribute to complexes auxina - phenols formation. .

Subsequently phosphate saline buffer pH 7.5 was used, pure fractions of enzymatic protein were found, this permitted the analysis in these fractions the effect of the phenols on enzymatic activity. The enzymatic activity without phenols and with phenols (0 and 115 ppm, respectively) and a significant increase in the enzymatic activity was seen when this was measured with phenols. Then to analyze if this increase depended on the concentration of phenols, the effect of a range of concentration of phenols (2, 48, 160, 185 ppm) was analyzed and a pattern of correlation between increase in the concentration of phenols and increase in the enzymatic activity wasn't found.

In conclusion, the results show that although the phenols presents in cuttings of lenga increase the enzymatic activity and therefore decrease the auxin concentration, the effect of the concentration of these phenols on enzyme, cannot be concluded.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alberdi, M., Godoy, R. y Steubing, L. 2002. Métodos de Ecología Vegetal. Editorial Universitaria. Valdivia.
- Baldini, E. 1992. Arboricultura General. Editorial Mundi Prensa. España. 375p.
- Beffa, R., Martín H. y Paul - Emile P. 1990. *In Vitro* Oxidation of Indolacetic Acid by Soluble Auxin - Oxidases and peroxidases from Maize Roots. *Plnat Physiology*. 94: 485 - 491.
- Bradford, M. 1976. A Rapid Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye - Binding. *Anal Biochem*. 72: 248 - 254.
- Castro, E. 2001. Propagación Vegetativa de Lengua (*Nothofagus pumilio* (Poepp et Endl.) Krasser) mediante Enraizamiento de Estacas de Verano. Tesis Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad Católica de Temuco. Temuco. 46p.
- CONAF, 1998. Experiencia Silvicultural del Bosque Nativo de Chile. Proyecto Manejo Sustentable del Bosque Nativo. Publicaciones lo Castillo. Santiago, Chile. 420p.

- CONAF - CONAMA, 1999. Catastro y Evaluación de Recursos Vegetacionales Nativos de Chile. Informe Nacional con Variables Ambientales. Santiago, Chile. 90p
- Donoso, C. 1978. La Silvicultura de los *Nothofagus* en Chile. Facultad de Cs. Forestales Universidad Austral de Chile. Depto. de Silvicultura y Conservación, Universidad de California. Berkeley, California. 102p.
- Donoso, C. 1981. Tipos Forestales de los Bosque Nativos de Chile. Documento de Trabajo N°38. Talleres Gráficos. Santiago. 71p.
- Goldacre, P. 1953. The Destruction of Indole - 3 - Acetic Acid by Plant Tissues. Tesis para Grado de Ph. Doctor. Institute of Technology. Pasadena, California.
- Hartmann, H., y D. Kester. 1995 Propagación de Plantas, Principios y Prácticas. Editorial Continental. México. 760p.
- Herman, D. y C. Hess. 1963. The Effect of Etiolation Upon the Rooting of Cutting. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 13: 42 - 62.
- INFOR - CONAF, 1998. Monografía de Lengua. *Nothofagus pumilio*. Santiago de Chile. 103p.
- Kanamori, A. 1995. Puesta a Punto de la Técnica para Cuantificación de Sustancias Fenólicas en Estacas Herbáceas de Chirimoyo según Swaim y Hillis (1959). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso. 146p.

- Kefeli, V. 2002. Phenolic Cycle in Plants and Enviroment. Journal of Cell and Molecular Biology 2: 13 – 18. Halic University,
- Landrum, L., y T. Nimlos. 1975. Gradientes Florales y Morfología Asociada del Suelo en la Reserva Forestal de Malalcahuello Chile. Boletín Técnico N°35. Depto. de Silvicultura, Facultad de Cs. Forestales Universidad de Chile.
- Latsague, M. y J. Lara 2003. Contenido Total de Fenoles en lenga y su Relación con el Enraizamiento. Gayana Botánica, 60(2).
- Leopold, C. 1964. Plant Growth and Development. Editorial Mc Graw – Hill. 466p.
- Martínez, P. 1997. Micropropagación de (*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. Revista Bosque. 18: 43 – 50.
- Pythoud, F. 1989. Peroxidase Activity and Adventitious Rooting in Cutting of *Populus Tremula*. Plant Physiology Biochemistry. 27(4): 503 – 510.
- Puga, C. 2001. Propagación Vegetativa de *Nothofagus pumilio* mediante Enraizamiento de Estacas. Tesis Ingeniería Forestal. Universidad de Concepción. Concepción. 45p.
- Ríos, D. 1996. Rooting Responce PO, PPO and IAA – ox activities on Walnut Explant. Acta Horticultura. 442: 241 – 245.

- Rodríguez, R. y R. Tames. 1983. IAA Oxidase and Peroxidase Distribution and Localization in *Cicer Arietinum*. L. Seedlings.
- Rojas, K. 1995. Enraizamiento de queule (*Gomortega Keule* (Mol.) Baillon) y su Relación con el Contenido y Tipo de Fenoles. Tesis Ingeniería Forestal. Universidad de Chile. Santiago. 85p.
- Romero, M. 2000. Propagación Vegetativa de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser Mediante Enraizamiento de Estacas. Tesis Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad Católica de Temuco. Temuco. 54p.
- Salisbury, F. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana. México. 759p.
- Santelices, R. 1990. Propagación Vegetativa en Tapa (*Laureliopsis philippiana* (phil) Losser) a partir de estacas. Ciencia e Investigación Forestal 4(1): 61 - 68.
- Scarpa, J. y S. Bordeu. 2000. Análisis Químico del Vino. Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Schmidt, H. 1990. Antecedentes Silvícola para Los Bosque de lenga y coigüe, Sector Río Cóndor, Tierra del Fuego. Informe Técnico. Chile. 68p.
- Schmidt, H. 1992. Silvicultura del Bosque Nativo. Segundo Taller Silvícola: Eucaliptos, Bosque Nativo. Fundación Chile y Grupo Silvícola Concepción, Chile.

- Segura, J. 1994. Concepto de Hormona Vegetal. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Editorial Mc Graw Hill. Madrid. 19: 285 - 375.
- Stonier, E. 1971. Les Cultures de Tissus de Plantes. Cnrs N° 193. Editorial Colloques Internationaux. Paris.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 1991. Plant Physiology. Editorial Benjamín Cummings. California. 565p.
- Uriarte, A. 1991. Los Bosques de Lengua, una Orientación para su Uso y Manejo. Informe Técnico N° 126. Concepción. Chile. 91p.
- Weaver, R. 1975. Regulación del Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. 363p.
- Zin - Huang, L., Ho - Yih, L. Y Hwei - Yi W. 1996. Effect of Light on Endogenous Indole - 3 - Acetic Acid, Peroxidases and Indole - 3 Acetic Acid Oxidase in Soybean Hypocotyls. Bot. Bull. Acad. Sin. 37: 113 - 119.
- Zobel, B. y J. Talbert. 1994. Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales. Editorial Limusa S.A. México. 545 P.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1. Cuadros y Figuras para ensayos realizados usando como eluente Buffer Fosfato pH 6.1.

TABLA 7. Resultados de análisis de muestra 1 (Árbol 1)

Fracciones	Concentración Fenoles (ppm)	Concentración Proteína (mg/ml)	Actividad Enzimática (mM AIA/ mg proteína/ hr)
0	-0,294	0,021	0,209
1	0,147	0,032	0,361
2	68,824	0,032	0,318
3	30,147	0,035	0,278
4	16,912	0,035	0,239
5	18,824	0,036	0,198
6	13,971	0,043	0,227
7	1,765	0,044	0,256
8	2,353	0,040	0,275
9	1,912	0,044	0,220
10	1,324	0,064	0,182
11	1,324	0,079	0,231
12	1,471	0,100	0,215
13	0,588	0,086	0,233
14	0,294	0,076	0,251
15	-0,294	0,078	0,309
16	0,000	0,088	0,223
17	0,588	0,085	0,221
18	0,000	0,083	0,239
19	0,147	0,093	0,208
20	0,441	0,101	0,326
21	0,294	0,086	0,406
22	0,000	0,089	0,295
23	0,147	0,093	0,319
25	0,000	0,131	0,265
26	-0,441	0,117	0,250
27	-0,441	0,104	0,230
28	-0,294	0,093	0,245
29	-0,147	0,108	0,214
30	-1,029	0,108	0,299
31	-0,147	0,103	0,265
32	-0,735	0,114	0,253
33	-0,882	0,104	0,323
34	-0,147	0,121	0,267
35	-0,441	0,122	0,236
Extracto	FR	0,435	-0,235

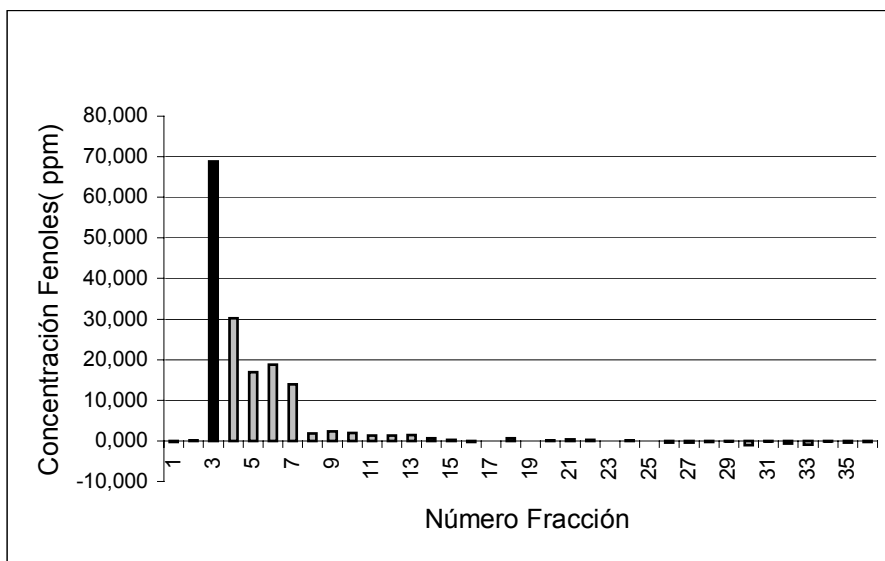


FIGURA 11. Grafico de fracciones de Fenol eluidas y *pick* de concentración de fenol encontrado en muestra 1.

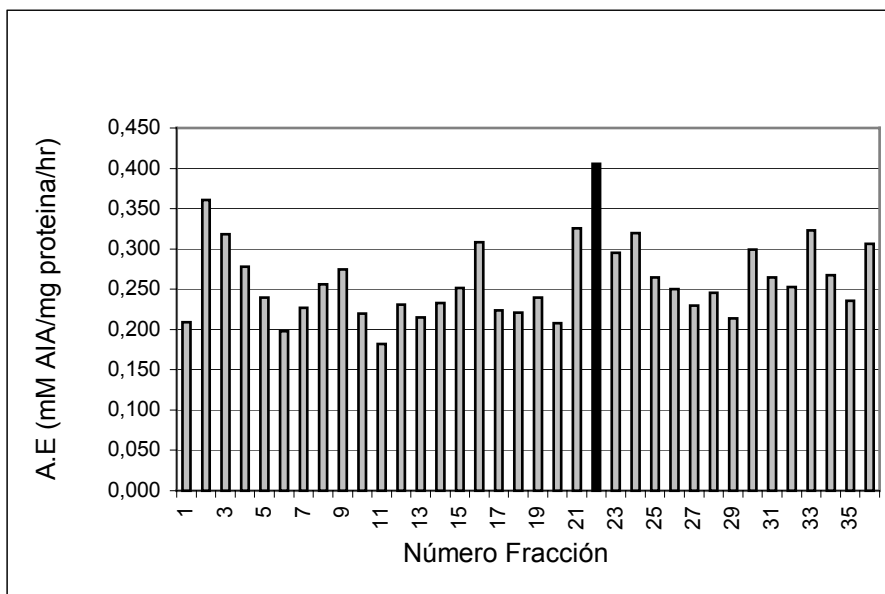


FIGURA 12. Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y *pick* de ésta encontrado en muestra 1.

TABLA 8. Resultados de análisis de muestra 2 (Árbol 2).

Fracciones	Concentración Fenoles (ppm)	Concentración Proteína (mg/ml)	Actividad Enzimática (mM AIA/ mg proteína/ hr)
0	-0,816	0,050	0,261
1	0,000	0,052	0,295
2	68,571	0,046	0,301
3	33,061	0,050	0,310
4	23,265	0,045	0,263
5	12,245	0,049	0,270
6	18,163	0,053	0,295
7	16,122	0,061	0,265
8	4,694	0,060	0,241
9	3,673	0,056	0,241
10	2,653	0,078	0,258
11	3,673	0,088	0,367
12	3,673	0,107	0,280
13	3,878	0,057	0,251
14	4,286	0,082	0,263
15	3,878	0,088	0,212
16	4,082	0,083	0,296
17	3,469	0,073	0,228
18	3,673	0,086	0,169
19	4,898	0,107	0,295
20	4,286	0,103	0,249
21	4,082	0,087	0,261
22	3,878	0,088	0,237
23	4,898	0,076	0,235
25	4,286	0,107	0,250
26	3,878	0,102	0,229
27	5,510	0,109	0,234
28	5,510	0,084	0,261
29	5,306	0,102	0,263
30	6,939	0,113	0,260
31	4,490	0,116	0,213
32	5,714	0,090	0,258
33	4,796	0,105	0,245
34	5,918	0,099	0,297
35	0,000	0,102	0,278
Extracto	FR	0,416	0.309

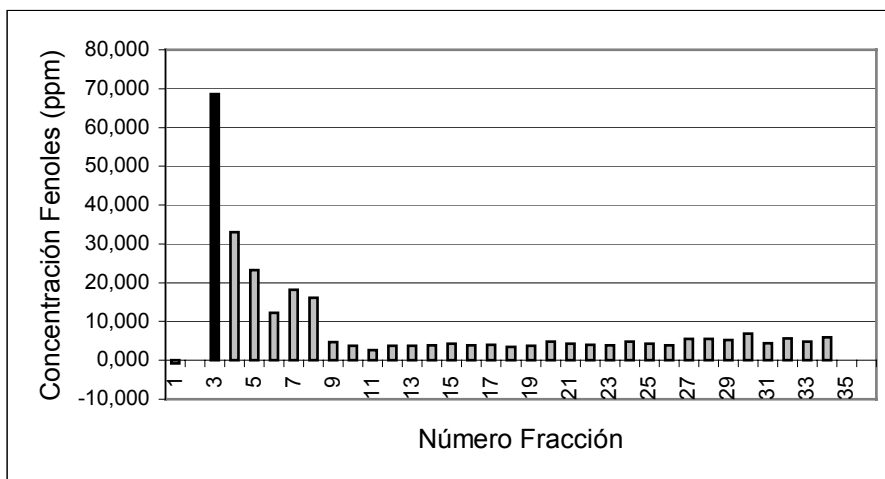


FIGURA 13. Grafico de fracciones de Fenol eluidas y *pick* de concentración de fenol encontrado en muestra 2.

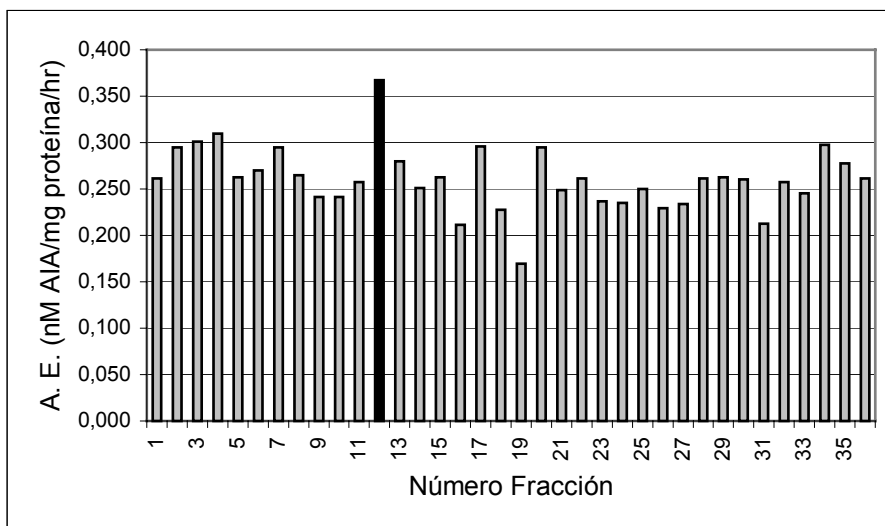


FIGURA 14. Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y *pick* de ésta encontrado en muestra 2.

TABLA 9. Resultados de análisis de muestra 3 (Árbol 3).

Fracciones	Concentración Fenoles (ppm)	Concentración Proteína (mg/ml)	Actividad Enzimática (mM AIA/ mg proteína/ hr)
0	-0,615	0,209	0,235
1	-1,846	0,279	0,248
2	51,231	0,285	0,188
3	34,615	0,279	0,155
4	9,385	0,272	0,149
5	19,846	0,298	0,117
6	16,000	0,336	0,109
7	1,538	0,317	0,139
8	0,923	0,247	0,157
9	0,006	0,349	0,191
10	0,308	0,342	0,167
11	0,000	0,355	0,152
12	-0,615	0,355	0,181
13	2,615	0,285	0,127
14	-0,923	0,406	0,168
15	0,000	0,532	0,123
16	-0,615	0,304	0,135
17	-1,231	1,058	0,129
18	-1,077	0,431	0,104
19	-0,308	0,368	0,064
20	-1,538	0,463	0,152
21	-1,385	0,437	0,083
22	-1,538	0,431	0,125
23	-1,846	0,463	0,119
25	-1,385	0,374	0,075
26	-1,538	0,444	0,093
27	-1,385	0,418	0,095
28	-1,077	0,437	0,048
29	-1,846	0,380	0,076
30	-1,231	0,513	0,108
31	-2,000	0,412	0,081
32	-1,846	0,558	0,125
33	-1,538	0,507	0,139
34	-1,231	0,456	0,177
35	-1,846	0,596	0,067
Extracto	FR	2.326	-0.459

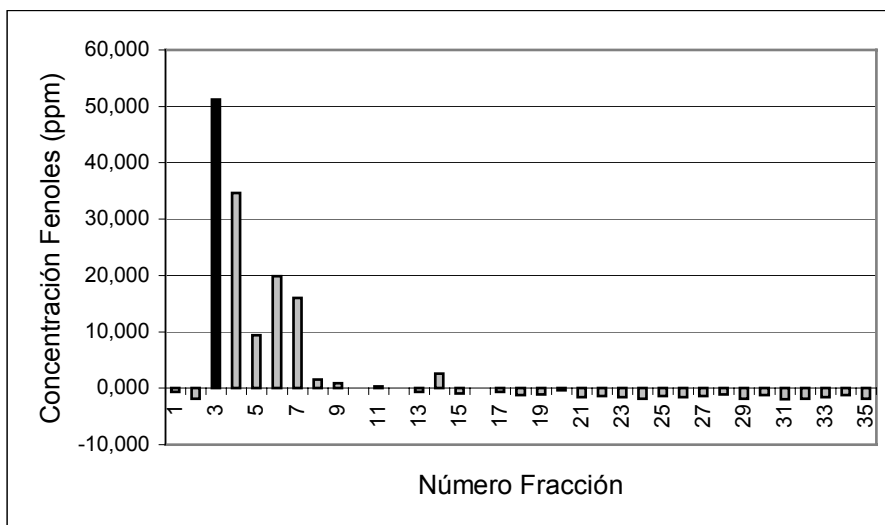


FIGURA 15. Grafico de fracciones de Fenol eluídas y *pick* de concentración de fenol encontrado en muestra 3.

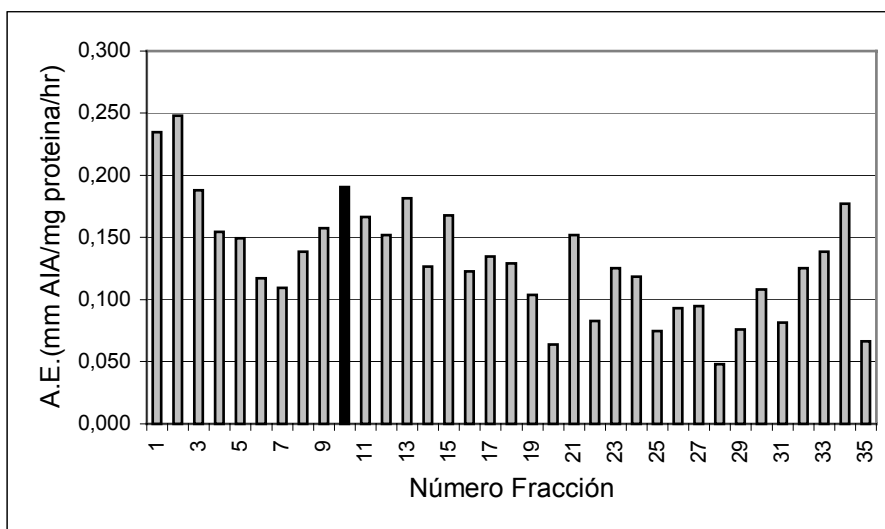


FIGURA 16. Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y *pick* de ésta encontrado en muestra 3.

TABLA 10. Resultados de análisis de muestra 4 (Árbol 4).

Fracciones	Concentración Fenoles (ppm)	Concentración Proteína (mg/ml)	Actividad Enzimática (mM AIA/ mg proteína/ hr)
0	-1,905	0,159	0,113
1	3,810	0,215	0,285
2	63,016	0,159	0,206
3	24,127	0,256	0,157
4	12,857	0,229	0,154
5	12,063	0,249	0,303
6	17,302	0,229	0,181
7	7,619	0,332	0,146
8	6,984	0,242	0,157
9	3,175	0,284	0,096
10	2,540	0,416	0,136
11	3,333	0,339	0,099
12	2,857	0,270	0,120
13	2,857	0,312	0,087
14	2,698	0,402	0,096
15	3,333	0,332	0,120
16	4,444	0,339	0,107
17	3,651	0,395	0,137
18	3,333	0,263	0,073
19	4,762	0,388	0,068
20	7,619	0,485	0,049
21	3,968	0,450	0,029
22	3,968	0,519	0,149
23	4,921	0,506	0,104
25	4,127	0,471	0,075
26	4,762	0,547	0,132
27	4,762	0,471	0,041
28	4,286	0,471	0,043
29	4,921	0,540	0,046
30	5,079	0,602	-0,015
31	5,079	0,499	0,393
32	5,238	0,506	0,038
33	6,032	0,575	0,079
34	6,984	0,512	0,043
35	5,556	0,519	0,044
Extracto	FR	2.320	0.540

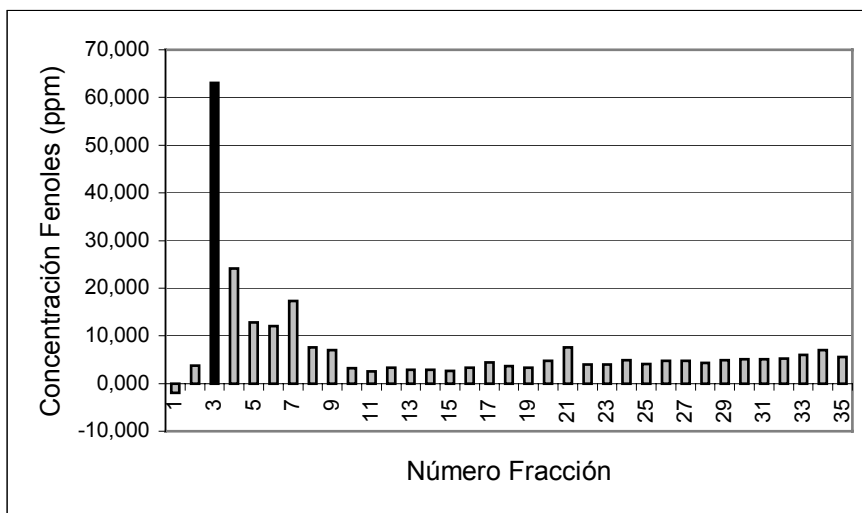


FIGURA 17. Grafico de fracciones de Fenol eluidas y *pick* de concentración de fenol encontrado en muestra 4.

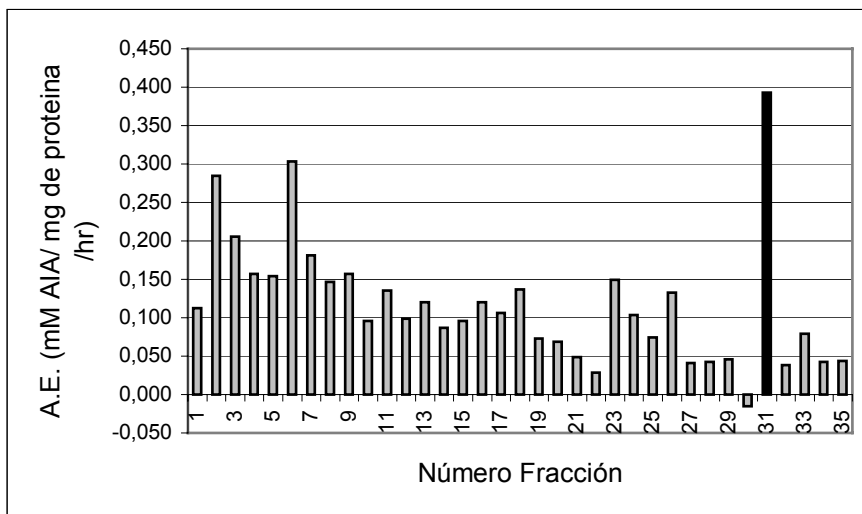


FIGURA 18. Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y *pick* de ésta encontrado en muestra 4.

TABLA 11. Resultados de análisis de muestra 5 (Árbol 5).

Fracciones	Concentración Fenoles (ppm)	Concentración Proteína (mg/ml)	Actividad Enzimática (mM AIA/ mg proteína/ hr)
0	-1,356	0,232	0,233
1	-0,508	0,269	0,217
2	48,814	0,227	0,260
3	23,051	0,259	0,241
4	9,492	0,322	0,230
5	7,288	0,343	0,282
6	15,932	0,327	0,203
7	3,390	0,296	0,207
8	1,186	0,301	0,189
9	-0,339	0,306	0,153
10	-0,678	0,322	0,189
11	-1,695	0,348	0,226
12	-2,034	0,348	0,215
13	-1,525	0,322	0,222
14	0,000	0,343	0,199
15	0,508	0,391	0,194
16	0,169	0,433	0,173
17	0,000	0,364	0,199
18	0,508	0,407	0,192
19	1,186	0,433	0,143
20	0,000	0,523	0,142
21	-0,508	0,512	0,158
22	-0,339	0,480	0,217
23	0,847	0,449	0,251
25	-1,356	0,480	0,199
26	-1,695	0,523	0,199
27	-0,169	0,507	0,176
28	-1,017	0,628	0,184
29	-1,186	0,533	0,179
30	-2,034	0,491	0,032
31	0,508	0,576	0,081
32	0,169	0,560	0,127
33	0,000	0,539	0,153
34	0,000	0,544	0,168
35	0,000	0,554	0,072
Extracto	FR	1,969	0,468

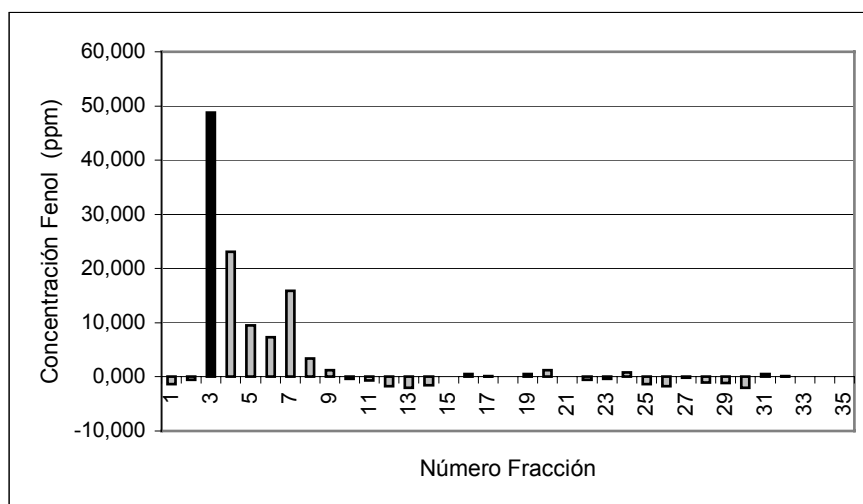


FIGURA 19. Grafico de fracciones de Fenol eluidas y *pick* de concentración de fenol encontrado en muestra 5.

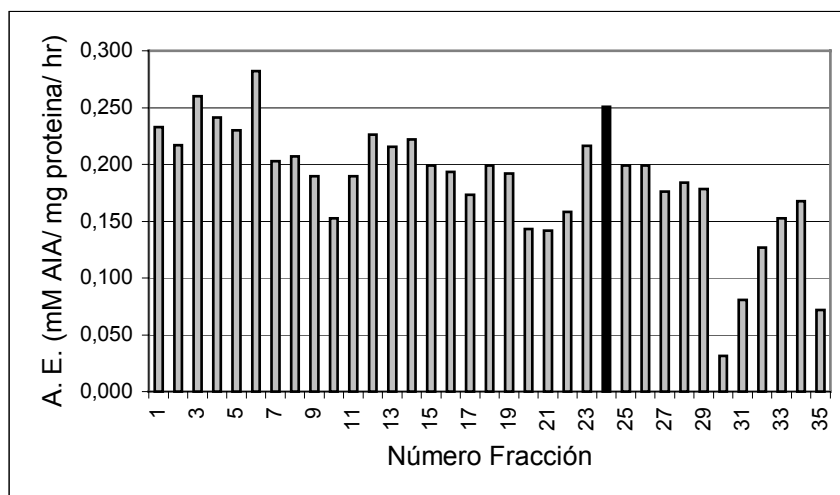


FIGURA 20. Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y *pick* de ésta encontrado en muestra 5.

TABLA 12. Resultados de análisis de muestra 6 (Árbol 6).

Fracciones	Concentración Fenoles (ppm)	Concentración Proteína (mg/ml)	Actividad Enzimática (mM AIA/ mg proteína/ hr)
0	-1,111	0,037	0,306
1	-1,270	0,030	0,338
2	-0,476	0,035	0,269
3	25,714	0,058	0,339
4	6,032	0,041	0,303
5	5,397	0,073	0,244
6	0,794	0,056	0,295
7	1,587	0,094	0,306
8	5,556	0,091	0,339
9	3,333	0,055	0,289
10	6,032	0,087	0,386
11	-0,159	0,069	0,282
12	-1,111	0,069	0,410
13	-0,794	0,064	0,322
14	-1,746	0,070	0,354
15	-0,159	0,069	0,273
16	-1,429	0,072	0,283
17	-1,111	0,069	0,325
18	-1,270	0,076	0,523
19	-0,476	0,082	0,295
20	0,476	0,084	0,216
21	3,016	0,091	0,302
22	-0,476	0,111	0,291
23	-1,270	0,087	0,352
25	1,429	0,093	0,372
26	-2,381	0,093	0,244
27	-0,952	0,094	0,309
28	-0,317	0,099	0,311
29	-1,270	0,093	0,313
30	-1,270	0,104	0,298
31	1,270	0,094	0,272
32	-0,159	0,097	0,241
33	-0,952	0,105	0,371
34	-1,111	0,107	0,299
35	-1,270	0,108	0,222
Extracto	401.587	0,387	0,410

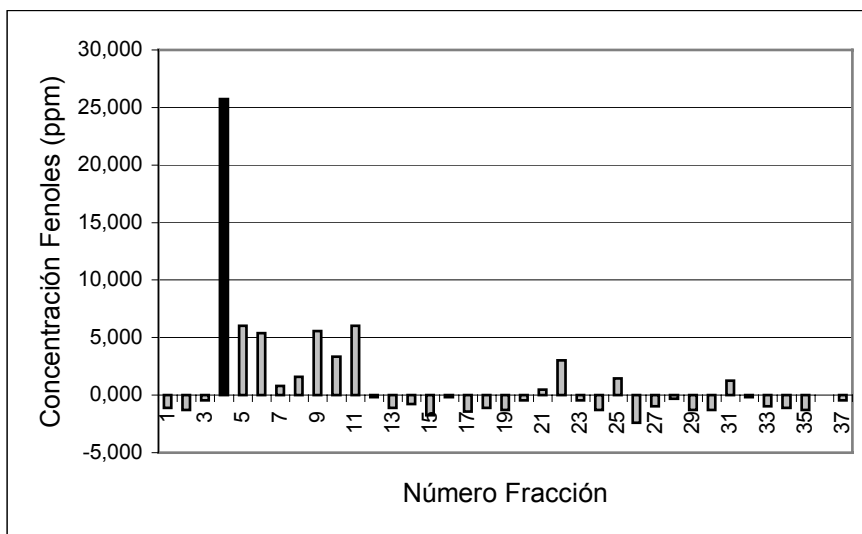


FIGURA 21. Grafico de fracciones de Fenol eluidas y *pick* de concentración de fenol encontrado en muestra 6.

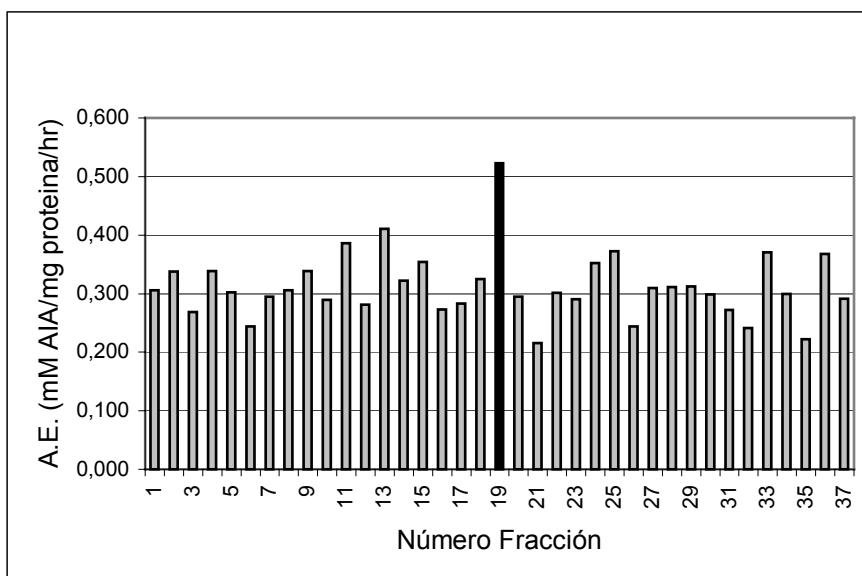


FIGURA 22. Grafico de fracciones que presentan Actividad enzimática (A. E.) de AIA oxidasa y *pick* de ésta encontrado en muestra 6.

TABLA 13. Resumen de resultados obtenidos usando como eluente Buffer Fosfato pH 6.1

Árbol	Tratamiento	Concentración	R1	R2	R3	R4	R5	Media
1	1	0	0,237	0,232	0,23	0,25	0,243	0,2384
2	1	0	0,24	0,278	0,27	0,25	0,249	0,2574
3	1	0	0,197	0,169	0,119	0,185	0,164	0,1668
4	1	0	0,288	0,264	0,267	0,28	0,257	0,2712
5	1	0	0,162	0,164	0,107	0,16	0,149	0,1484
6	1	0	0,262	0,271	0,33	0,263	0,237	0,2726
Promedio Concentración T1 (0%)		0						0,2258
1	2	34,412	0,253	0,259	0,254	0,259	0,228	0,2506
2	2	34,285	0,196	0,295	0,258	0,229	0,295	0,2546
3	2	25,615	0,185	0,173	0,212	0,159	0,159	0,1776
4	2	31,508	0,246	0,225	0,225	0,242	0,228	0,2332
5	2	24,407	0,16	0,179	0,099	0,107	0,171	0,1432
6	2	12,857	0,322	0,258	0,297	0,313	0,296	0,2972
Promedio Concentración T2 (50%)		27,1806						0,2260
1	3	51,618	0,29	0,25	0,256	0,296	0,292	0,2768
2	3	51,427	0,476	0,318	0,27	0,258	0,262	0,3168
3	3	38,423	0,131	0,172	0,156	0,139	0,179	0,1554
4	3	47,262	0,274	0,23	0,236	0,23	0,213	0,2366
5	3	36,61	0,138	0,187	0,125	0,162	0,139	0,1502
6	3	19,285	0,265	0,237	0,393	0,347	0,263	0,301
Promedio Concentración T3 (75%)		40,7708						0,2394
1	4	68,824	0,268	0,319	0,273	0,4	0,307	0,3134
2	4	68,57	0,281	0,274	0,254	0,275	0,307	0,2782
3	4	51,231	0,192	0,169	0,168	0,176	0,254	0,1918
4	4	63,016	0,171	0,215	0,294	0,208	0,21	0,2196
5	4	48,814	0,136	0,113	0,106	0,14	0,11	0,121
6	4	25,714	0,311	0,287	0,36	0,34	0,347	0,329
Promedio Concentración T4 (100%)		54,3615						0,2421

TABLA 14. Análisis de varianza ensayo realizado con Buffer Fosfato pH 6.1 (Tabla ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Tratamiento	0.001381	3	0.000460655	0.10	0.9567
Error	0.088420	20	0.00442104		
Total	0.0898027	23			

Nota: valor $P > 0.05$, no existiendo diferencias significativas, según el test LSD a un nivel de confianza del 95%.

9.2. Anexo 2. Cuadros y Figuras para ensayos del diseño N° 1 realizado, usando como eluente Buffer Fosfato Salino pH 7.5

TABLA 15. Resultados de análisis de muestras eluidas con Buffer fosfato salino pH 7.5.

Fracción	Concentración Fenol (ppm)
Vol. Muerto	-0.405
1	3.919
2	-0.270
3	32.568
4	115.541
5	56.757
6	33.108
7	43.649
8	17.027
9	28.378
10	19.459
11	17.432

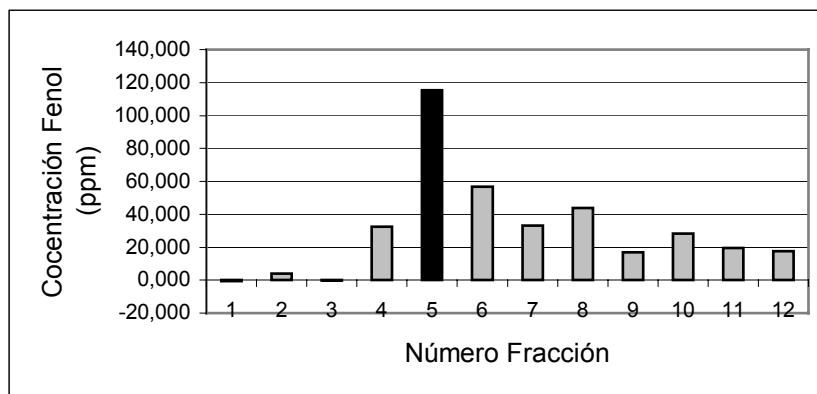


FIGURA 23. Grafico de fracciones de Fenol eluidas y *pick* de concentración de fenol encontrado en muestra eluida con buffer fosfato salino pH 7.5.

TABLA 16. Resultados obtenidos en los tratamientos aplicados en el primer diseño experimental descrito para eluciones con Buffer fosfato salino pH 7.5.

Tratamiento	Concentración Fenol (ppm)	Actividad Enzimática (mM AIA/ mg proteína/ hr)
1	0	0.031
	0	0.031
	0	0.031
	0	0.031
2	115.54	0.282
	115.54	0.302
	115.54	0.259
	115.54	0.245

TABLA 17. Análisis de varianza para tratamientos aplicados en el primer diseño experimental descrito para eluciones con Buffer fosfato salino pH 7.5. (Tabla ANOVA)

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Tratamiento	0.116162	1	0.116162	367.21	0.000
Error	0.001898	6	0.000316		
Total	0.11806	7			

Nota: valor $P < 0.05$, existiendo diferencias significativas, según el test LSD a un nivel de confianza del 95%.

9.3. Anexo 3. Cuadros y Figuras para ensayos del diseño N° 2 realizado, usando como eluente Buffer Fosfato Salino pH 7.5

TABLA 18. Resultados de análisis de muestras eluidas con Buffer fosfato salino pH 7.5.

Fracción	Concentración Fenol (ppm)
Vol. Muerto	-4.808
1	8.846
2	-3.462
3	2.692
4	14.231
5	100.00
6	185.00
7	94.808
8	35.192
9	40.769
10	24.423
11	31.731

Fracción	Concentración Fenol (ppm)
Vol. Muerto	-0.577
1	2.692
2	-0.769
3	52.692
4	156.346
5	160.577
6	54.423
7	47.88
8	21.923
9	33.654
10	31.538
11	24.615

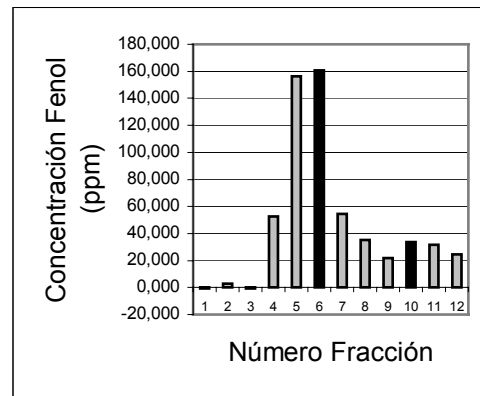
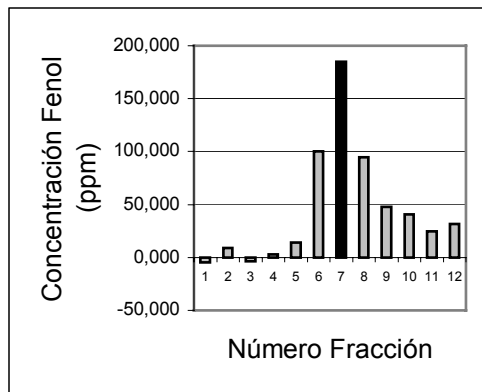


TABLA 19. Resultados obtenidos en los tratamientos aplicados en el segundo diseño experimental descrito para eluciones con Buffer fosfato salino pH 7.5..

Tratamiento	Concentración Fenol (ppm)	Actividad Enzimática (mM AIA/ mg proteína/ hr)
1	0	0.240
	0	0.232
	0	0.240
2	2.69	0.523
	2.69	0.511
	2.69	0.499
3	47.88	0.293
	47.88	0.287
	47.88	0.279
4	160.57	0.312
	160.57	0.342
	160.57	0.339
5	185	0.369
	185	0.361
	185	0.387

TABLA 20. Análisis de varianza para tratamientos aplicados en el segundo diseño experimental descrito para eluciones con Buffer fosfato salino pH 7.5 (Tabla ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	Valor F	Valor P
Tratamiento	0.146314	4	0.0365784	11.02	0.0011
Error	0.033183	10	0.0033183		
Total	0.179497	14			

Nota: valor $P < 0.05$, existiendo diferencias significativas, según el test LSD a un nivel de confianza del 95%.

TABLA 21. Test de rangos múltiples para variación en la Actividad enzimática (A. E.) según tipo de tratamiento.

Tratamiento	Cantidad	Media (A. E.)
1	3	0.238
2	3	0.511
3	3	0.286333
4	3	0.267
5	3	0.372333
Relación	Deferencias	+/- Limites
1 - 2	* -0.273	0.104799
1 - 3	-0.048333	0.104799
1 - 4	-0.029	0.104799
1 - 5	* -0.134333	0.104799
2 - 3	* 0.224667	0.104799
2 - 4	* 0.244	0.104799
2 - 5	* 0.138667	0.104799
3 - 4	0.0193333	0.104799
3 - 5	-0.086	0.104799
4 - 5	* -0.105333	0.104799

Nota: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de tratamientos.