

Fraccionamiento y recuperación de proteínas solubles libres de fenoles en estacas de lenga (*Nothofagus pumilio*)

Fractioning and soluble Protein free Phenols recovery from lenga (*Nothofagus pumilio*) cuttings

Mirtha Latsague Vidal^{1*}, Patricia Sáez Delgado¹

*Autor de correspondencia: ¹ Universidad Católica de Temuco, Escuela de Ciencias Ambientales, Facultad de Recursos Naturales, Casilla 15-D, Tel.: (45)205409, fax: (45)211034, Temuco, Chile, mlatsagu@uct.cl

SUMMARY

At present, there is no information about *Nothofagus* fractioning and protein recovery from cutting crude extracts; necessary condition to, *in vitro*, demonstrate enzymatic activity with cofactors presence. Besides, this information is crucial to determine enzymatic expression levels, which in turn could allow to know physiological aspects of lenga (*Nothofagus pumilio*), cuttings which could be conditioning the poor results obtained in rooting treatments. To obtain information about what was pointed out above, a protocol which not only allows to separate phenol free proteins from crude extracts of lenga cuttings, but to determine its composition as well, was validated and standardized. From each of the 60 samples, 36 fractions were analyzed, obtaining, repetitively, phenol free proteins from fraction 14 on. The results obtained were statistically validated and show that the method employed allows to fractionate and to recover phenol free proteins from lenga cuttings through a Sephadex G-50 column ($P < 0.05$).

Key words: *Nothofagus pumilio*, cuttings, chromatography, soluble proteins.

RESUMEN

Para *Nothofagus spp.* no existe a la fecha información acerca del fraccionamiento y recuperación de proteínas a partir de extracto crudo de estacas, condición necesaria para demostrar *in vitro* actividad enzimática en presencia de cofactores. Además, esta información es crucial para determinar los niveles de expresión enzimática, lo que permitiría conocer aspectos fisiológicos de las estacas de lenga (*Nothofagus pumilio*) que podrían estar condicionando la baja respuesta obtenida en los tratamientos de enraizamiento. Para obtener información acerca de lo señalado se validó y estandarizó un protocolo de fraccionamiento, el cual permitió separar proteínas libres de fenoles a partir de extracto crudo de estacas de lenga, como asimismo determinar su contenido. De cada una de las 60 muestras se analizaron 36 fracciones. A partir de la fracción 14 en adelante se obtuvieron proteínas libres de fenoles. Los resultados obtenidos se validaron estadísticamente y mostraron que la técnica permite fraccionar y recuperar proteínas libres de fenoles a través de columna Sephadex G-50 en estacas de lenga ($P < 0,05$).

Palabras clave: *Nothofagus pumilio*, estacas, cromatografía, proteínas solubles.

INTRODUCCIÓN

En Chile existen numerosas especies nativas que poseen un gran valor e interés científico ya sea por su relevancia ecológica, su potencial genético o por ser consideradas como una alternativa económica importante. Dentro de estas especies se encuentra *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. La superficie existente de esta especie en la IX Región (101.440 hectáreas) se encuentra distribuida en formaciones puras y mixtas, las que se distribuyen tanto dentro del Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas (SNASPE) como en predios particulares. Gran parte de este recurso ha soportado floeos y cortas selectivas 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 que, en caso de emplearse como productores de semillas, podrían generar bosques de menor calidad que el bosque original.

Considerando que entre los objetivos de la silvicultura se encuentra mantener la composición del bosque natural y mejorar la cantidad y calidad de la producción futura a través de un manejo apropiado, reproducir vegetativamente esta especie podría contribuir a tales objetivos. Tradicionalmente se han utilizado varias formas de propagación vegetativa, siendo una de las más conocidas el enraizamiento de estacas.

Lenga presenta una baja capacidad rizogénica. Puga (2001), al tratar estacas obtenidas de plantas cultivadas en vivero con sustancias enraizantes como ácido indol butírico (AIB), obtuvo respuestas muy bajas de enraizamiento; Romero (2000) y Castro (2001) no obtuvieron respuesta al tratamiento con ácido indol acético (AIA) realizado en estacas obtenidas de plantas de 5 y de 30 años de edad, bajo distintas condiciones de ensayo.

Se observan diferencias significativas entre las plantas de fácil y difícil enraizamiento en relación a los factores que lo activan, entre ellos ácidos fenólicos y expresión de la enzima AIA oxidasa (Hartmann y Kester 1981, Beffa *et al.* 1990). La obtención de proteínas totalmente libres de fenoles es una condición previa para posteriormente determinar el nivel de expresión de AIA oxidasa.

No existe información para *Nothofagus spp.* acerca del fraccionamiento y recuperación de proteínas, por lo cual el objetivo de este estudio fue validar y estandarizar el protocolo descrito por Grisson y Pilet (1989), para la recuperación y fraccionamiento de una preparación proteica libre de fenoles a partir de extracto crudo de estacas de lenga.

MÉTODOS

El material vegetal corresponde a estacas de lenga de aproximadamente 15 cm de longitud, recolectadas en verano (noviembre) en la Reserva Nacional Malalcahuello-Nalcas, IX Región, mantenidas en nitrógeno líquido, hasta el momento de su análisis en laboratorio.

La obtención del extracto crudo y, a partir de este extracto, la obtención de fracciones puras de proteínas solubles libres de fenoles, se realizó según la metodología descrita por Grisson y Pilet (1989) para raíces de maíz. Los segmentos previamente molidos se homogeneizaron en una licuadora utilizando como medio de extracción *buffer* fosfato 66 mM (pH 6,1) a 4°C y en oscuridad, en proporción 1:2 (50 g de estacas/100 mL de *buffer*), filtrando en lana de vidrio. Este filtrado se centrifugó 15 minutos a 3.500 rpm. Luego se eliminó el pellet, y la fracción sobrenadante se centrifugó nuevamente 30 minutos a 3.500 rpm. El nuevo sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo que contenía la fracción de proteínas y fenoles solubles.

Para el empaqueo de la columna se suspendieron 3 g 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 durante 48 horas. Para calcular el flujo de la columna y determinar el volumen de elusión se calibró la columna Sephadex G-50 con 1 mL de la mezcla de Azul dextrano (Pharm. Uppsala) (10 mg/mL) (peso molecular 2 millones g/mol) y rojo fenol (10 mg/mL) (peso molecular 345 g/mol). El volumen de elusión fue recogido en fracciones de 5 mL.

Para el fraccionamiento y recuperación de proteínas y fenoles se sembraron 2 mL de extracto crudo en la co-

lumna previamente preparada. El extracto sembrado se eluyó con *buffer* fosfato pH 6,1, recogiendo 36 fracciones de 5 mL cada una, con un volumen de elusión total de 180 mL. Este procedimiento se repitió 60 veces. Las fracciones eluidas se mantuvieron a 4°C y oscuridad para, posteriormente, determinar la concentración de proteínas y fenoles correspondientes.

Los fenoles solubles obtenidos por fraccionamiento fueron determinados colorimétricamente con reactivo de Folin Ciocalteu (Scarpa y Bordeu 2000), utilizando como patrón ácido tánico 50 ppm y leyendo absorbancia a 765 nm, la que fue referida a la ecuación de la curva de calibración obtenida utilizando los estándares de referencia del cuadro 1.

Para la determinación de proteínas solubles obtenidas en el fraccionamiento se utilizó el método de Bradford (1976), utilizando una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) de 1 mg/mL, leyendo absorbancia a 595 nm, la que fue referida a la ecuación de la curva de calibración obtenida utilizando los estándares de referencia del cuadro 2.

La confiabilidad del fraccionamiento se comprobó con un diseño experimental aleatorio en donde se considera-

Cuadro 1. Preparación de soluciones para la curva de calibración de fenoles solubles totales con ácido tánico 50 ppm.

Preparation of solutions for the calibration chart of phenols soluble totals with Tanic Acid 50 ppm.

| Punto de curva | Solución patrón (mL) | Agua destilada (mL) | Concentración ácido tánico (ppm) |
|----------------|----------------------|---------------------|----------------------------------|
| 0 | 0 | 50,0 | 0 |
| 1 | 7,5 | 42,5 | 7,5 |
| 2 | 10,0 | 40,0 | 10,0 |
| 3 | 12,5 | 37,5 | 12,5 |
| 4 | 25,0 | 25,0 | 25,0 |
| 5 | 37,5 | 12,5 | 37,5 |

Cuadro 2. Preparación de soluciones para la curva de calibración de proteínas solubles totales con BSA (1 mg/mL).

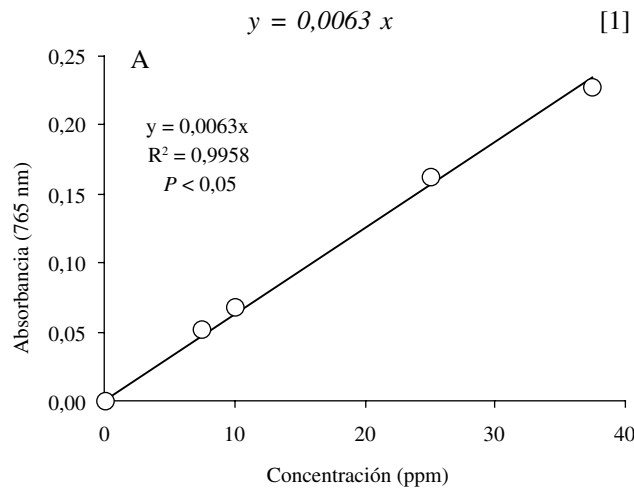
Preparation of solutions for the calibration chart of proteins soluble totals with BSA (1 mg/mL).

| Punto de curva | Solución patrón (µL) | Buffer fosfato 66 mM (µL) | Concentración final (BSA) (mg/mL) |
|----------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 0 | 0 | 100,0 | 0 |
| 1 | 12,5 | 87,5 | 0,125 |
| 2 | 25,0 | 75,0 | 0,250 |
| 3 | 50,0 | 100,0 | 0,500 |
| 4 | 75,0 | 25,0 | 0,750 |
| 5 | 100,0 | 0 | 1,000 |

ron para el ensayo 12 réplicas y cinco repeticiones para cada réplica. De cada una de las 60 muestras se analizaron 36 fracciones. Para validar los resultados obtenidos, se realizó un análisis de varianza y las medias de las 60 fracciones proteicas analizadas fueron sometidas a la prueba de comparaciones múltiples LSD con un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS

Los resultados indicaron que la técnica validada es aplicable al género *Nothofagus*, permitiendo fraccionar, recuperar y cuantificar en forma separada proteínas libres de fenoles a través de columna Sephadex G-50 en estacas de lenga. La curva de calibración para fenoles, en el rango de concentraciones estudiadas, respondió a la ecuación [1] y a un coeficiente de correlación igual a 0,9958 (figura 1A).



donde y corresponde a absorbancia a 765 nm y x a concentración de ácido tánico (ppm).

Para proteínas, la curva de calibración en el rango de concentraciones estudiadas respondió a la ecuación [2] y a un coeficiente de correlación igual a 0,9803 (figura 1B).

$$y = 0,1444x \quad [2]$$

donde y corresponde a absorbancia a 595 nm y x a concentración de proteínas (mg/mL).

En la figura 2 se presentan los valores promedio de concentración de fenoles y proteínas, respectivamente, obtenidos de las 60 muestras analizadas. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones ($P < 0,05$). Los fenoles eluyeron completamente en las primeras fracciones (3 - 13) en un rango de concentraciones decrecientes de 70 a 0 ppm (figura 2A). Estos fenoles no estaban libres de proteínas, las que se encontraron en concentraciones de 0,02 a 0,08 mg/mL (figura 2B). En las

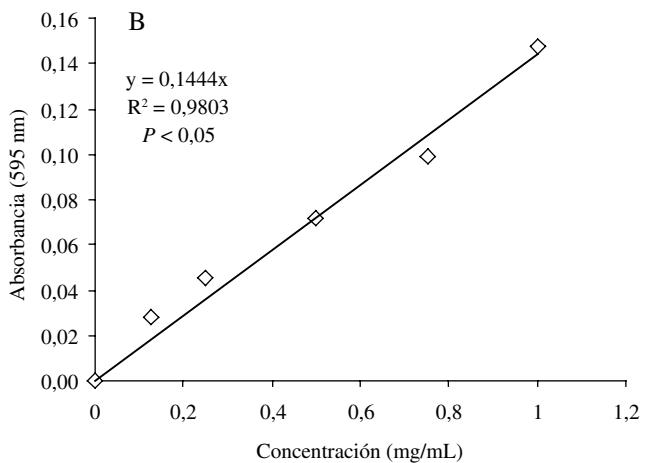


Figura 1. Curvas de calibración con ácido tánico (A) y con BSA (B).
 Calibration curve with Tanic acid (A) and BSA (B).

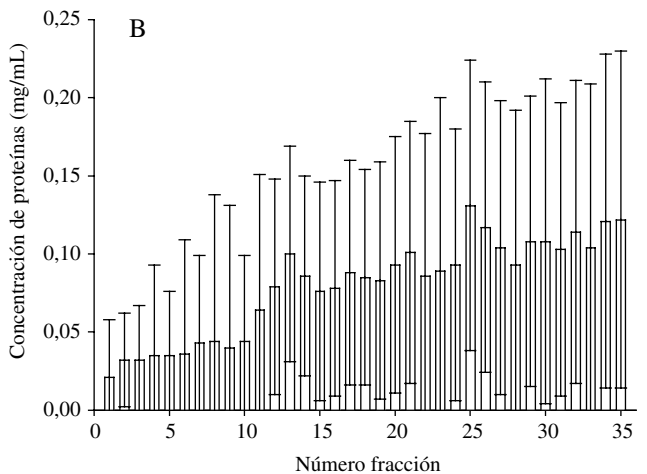
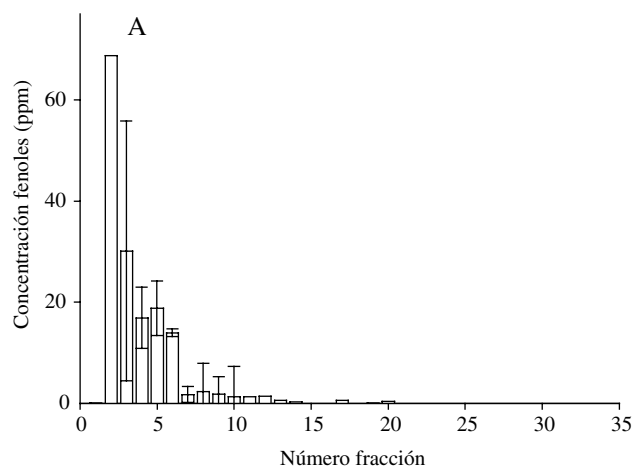


Figura 2. Valores promedio de concentración de fenoles solubles (A) y proteínas solubles en fracciones colectadas (B).
 Soluble Phenols (A) and proteins (B) concentration in collected fractions.

fracciones 14-36, en cambio, se obtuvieron fracciones de proteínas totalmente libres de fenoles, en concentraciones variables entre 0,10 y 0,13 mg/mL (figura 2B).

DISCUSIÓN

La discusión de los resultados se centra exclusivamente en la validación de la técnica utilizada para fraccionamiento de proteínas libres de fenoles, objetivo de este trabajo.

Considerando que la columna Sephadex permite eluir muestras en orden de tamaño decreciente, los resultados podrían indicar que en las primeras fracciones existieron complejos polifenólicos o bien complejos fenol-proteínas (Baldini 1992), lo que impediría obtener una fracción pura de fenoles solubles. Resultados similares obtuvieron Pythoud y Buchala (1989), quienes lograron obtener a partir de extracto de tallo de *Populus tremula* L. una preparación enzimática pura, utilizando columna Sephadex G-50. En plantas de *Horseradish sp.*, Hoyle (1977) logró separar 20 formas de isoenzimas, pero utilizando columna Sephadex G-75. Por otro lado, se ha logrado extraer y purificar enzimas peroxidadas y polifenoloxidasas en extracto de cotiledones de *Corylus avellana* L. utilizando columna Sephadex G-150 (González *et al.* 1991).

No existe información para especies arbóreas nativas respecto al fraccionamiento de proteínas por cromatografía en columna Sephadex, siendo ésta una primera contribución a la validación de esta técnica en este tipo de plantas. En este sentido la puesta a punto de técnicas de laboratorio actuales aplicadas al área de la fisiología vegetal y la divulgación de éstas constituyen una contribución de considerable utilidad para el sector forestal.

Finalmente, la validación estadística de los resultados muestra que la técnica utilizada permite fraccionar y recuperar proteínas libres de fenoles a través de la columna Sephadex G-50 en estacas de lenga, por lo cual se sugiere que la técnica validada podría ser aplicada en otras especies leñosas, en las cuales se requieren estudios bioquímicos de esta naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación de la Universidad Católica de Temuco PDIUCT 2003-04-02.

REFERENCIAS

- Baldini E. 1992. *Arboricultura General*. Editorial Mundi Prens. España. 375 p.
- Beffa R, M Hilary, P Pilet. 1990. *In Vitro* Oxidation of Indoleacetic Acid by soluble Auxin – Oxidases and Peroxidases from Maize Roots. *Plant 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. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Castro E. 2001. Propagación Vegetativa de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. *et* Endl.) Krasser) mediante enraizamiento de estacas de verano. Tesis Ingeniero Forestal. Temuco, Chile. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Católica de Temuco. 46 p.
- González A, R Sánchez, R Rodríguez. 1991. Ethylene in relation to protein, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rooting in hazelnut cotyledons. *Physiologia Plantarum* 83: 611-620.
- Grisson R, P Pilet. 1989. Cytoplasmic and wall isoperoxidases in growing maize roots. In Pythoud F. Peroxidase Activity and Adventitious Rooting in Cutting of *Populus tremula*. *Plant Physiology Biochemistry* 27: 503-510.
- Hartmann H, D Kester. 1981. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Compañía Editorial Continental, S.A., México. 814 p.
- Hoyle M. 1977. High resolution of Peroxidase-Indoleacetic Acid Oxidase Isoenzymes from *Horseradish* by Isoelectric Focusing. *Plant Physiology* 60: 787-793.
- Pythoud F, A Buchala. 1989 Peroxidase Activity and Adventitious Rooting in Cutting of *Populus tremula*. *Plant Physiology Biochemistry* 27: 503-510.
- Puga C. 2001. Propagación vegetativa de lenga (*N. Pumilio* (Poepp *et* Endl.) Krasser) mediante el enraizamiento de estacas. Tesis Ingeniero Forestal. Concepción, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción. 45 p.
- Romero M. 2000. Propagación vegetativa de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. *et* Endl.) Krasser) mediante enraizamiento de estacas. Tesis Ingeniero Forestal. Temuco, Chile. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Católica de Temuco. 54 p.
- Scarpa J, S Bordeu. 2000. Análisis Químico del Vino. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 154 p.
- Schmidt H. 1992. Silvicultura del bosque Nativo. Segundo Taller Silvícola: Eucaliptos, Bosque Nativo. Fundación Chile y Grupo Silvícola. Concepción, Chile. 68 p.

Recibido: 04.05.05

Aceptado: 16.10.06