



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**RESPUESTA ANTIOXIDANTE DIFERENCIAL EN COMPARTIMENTOS DE  
AGALLAS INDUCIDAS POR *Espinosa nothofagi* EN *Nothofagus obliqua***

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de  
Concepción para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología  
Vegetal

POR: Constanza Araceli Meli Yáñez

Profesora Guía: Dra. Luvia María Guedes García

Marzo, 2025

Concepción, Chile

© 2025, Constanza Araceli Meli Yáñez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

**RESPUESTA ANTIOXIDANTE DIFERENCIAL EN COMPARTIMENTOS DE  
AGALLAS INDUCIDAS POR *Epinosa nothofagi* EN *Nothofagus obliqua***

Profesora Guía



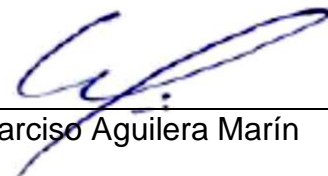
---

Lubia María Guedes García

Colaboradora Académica

Bióloga, Dra.

Profesor Guía



---

Narciso Aguilera Marín

Profesor Asociado

Agrónomo, Dr.

## DEDICATORIA

A Dios por bendecirme y brindarme la oportunidad de acceder a la universidad. Por otorgarme la sabiduría, el conocimiento y la fuerza necesaria para seguir adelante, incluso en los momentos en que pensé que no sería posible.

A mi papá, mamá y hermana, por su esfuerzo incansable y dedicación constante. Gracias por nunca dejarme sola y por inculcarme la convicción de que puedo alcanzar cualquier meta que me proponga.

A mi familia paterna, gracias por enseñarme a estar siempre vinculada con la naturaleza y el campo. Es un honor poder seguir cultivando ese vínculo con las plantas, tierra y nuestras tradiciones ancestrales mapuches. Este logro es el reflejo de su dedicación y buena voluntad.

A mi familia materna, gracias por mantenerme presente en sus oraciones y fortalecer mi camino con su fe inquebrantable. Sin su apoyo, no habría sido posible. Y a aquellos que ya no están, les dedico este logro con todo mi corazón. Como mariposas que vuelan alto, recordando que las promesas y los sueños sí se cumplen. Este logro es también suyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que formaron parte de esta etapa de mi vida: compañeros, profesores, auxiliares, tíos y tías de la facultad. Cada uno de ellos, con sus vivencias, costumbres y experiencias de vida, enriqueció significativamente mi camino. Su apoyo, enseñanzas y ejemplo fueron esenciales para alcanzar este objetivo, dejando recuerdos invaluablees que atesoraré a lo largo de mi vida.

Agradecer a mi profesora guía, Lubia María Guedes García, por brindarme la oportunidad y confiar en mi capacidad para realizar esta investigación. Gracias por su invaluable apoyo en el laboratorio y por mostrarme que las mujeres tenemos el mismo potencial y capacidad para contribuir en la ciencia.

A mi profesor guía, Narciso Aguilera Marín, por su invaluable apoyo, paciencia, compromiso y pasión por la enseñanza. No solo me incentivó a crecer como estudiante, sino también como persona. Gracias por compartir su conocimiento y por ser un pilar fundamental en el logro de este objetivo.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno y mecanismos de eliminación.....	1
1.2 Agallas vegetales y estrés oxidativo .....	3
1.3 <i>Nothofagus obliqua</i> como superhospedero de agallas .....	5
II. METODOLOGÍA.....	11
2.1 Descripción del área de estudio.....	11
2.2 Estudio histoquímico.....	12
2.3 Estudio bioquímico.....	13
2.3.1 Cuantificación de malondialdehído (MDA).....	13
2.3.2 Cuantificación de peróxido de hidrógeno .....	15
2.3.3 Cuantificación de enzimas antioxidantes .....	15
2.3.4 Cuantificación de flavonoides.....	17
2.3.5 Cuantificación de fenoles.....	18
2.4 Análisis estadístico .....	18
III. RESULTADOS .....	20
3.1 Rasgos morfoanatómicos de tallos y agallas inducidas en <i>N. obliqua</i> . .....	20
3.2 Resultados del estudio histoquímico .....	21
3.3 Cuantificación de peróxido de hidrógeno y malondialdehído.....	27
3.4 Cuantificación de la actividad de las enzimas antioxidantes.....	29
3.5 Cuantificación de proteínas totales, fenoles y flavonoides.....	31
IV. DISCUSIÓN.....	35
V. CONCLUSIONES.....	40
VI. GLOSARIO.....	41
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3. 1 Actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), dehidroascorbato reductasa (DHAR), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y peroxidasa (POX) de tallos y agallas y el compartimento externo (CE) e interno (CI) de <i>E. nothofagi</i> inducidas en yemas de <i>N. obliqua</i> .....	31
--	----

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Fig. 3. 1 Características morfológicas y anatómicas de tallos y agallas inducidas en <i>N. obliqua</i> .....	21
Fig. 3. 2 Detección histoquímica de $O_2^-$ en tallos de <i>N. obliqua</i> y en agallas inducidas por <i>E. nothofagi</i> .....	22
Fig. 3. 3 Detección histoquímica de $H_2O_2$ en tallos de <i>N. obliqua</i> y agallas de <i>E. nothofagi</i> por reacción con DAB.....	24
Fig. 3. 4 Detección histoquímica de flavonoides en tallos de <i>N. obliqua</i> y agallas de yemas inducidas por <i>E. nothofagi</i> .....	26
Fig. 3. 5 Concentración total de $H_2O_2$ en tallos de <i>N. obliqua</i> y agallas de yemas de <i>E. nothofagi</i> y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla.....	27
Fig. 3. 6 Concentración total de malondialdehído en tallos de <i>N. obliqua</i> y agallas de yemas de <i>E. nothofagi</i> y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla.....	28
Fig. 3. 7 Concentración de proteínas totales en tallos de <i>N. obliqua</i> y agallas de yemas de <i>E. nothofagi</i> y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla.....	32
Fig. 3. 8 Concentración de fenoles en tallos de <i>N. obliqua</i> y agallas de yemas de <i>E. nothofagi</i> y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla.....	33
Fig. 3. 9 Concentración de flavonoides totales en tallos de <i>N. obliqua</i> y agallas de yemas de <i>E. nothofagi</i> y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla.....	34

## RESUMEN

La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) es una respuesta común de las plantas ante diversos estreses. No obstante, cuentan con mecanismos antioxidantes para mitigar el daño oxidativo causado por la sobreproducción de EROs. En *Nothofagus obliqua*, el insecto gallícola *Espinosa nothofagi* induce agallas que alteran significativamente la fisiología y el metabolismo del hospedero. Estas estructuras están compartimentalizadas funcionalmente: el compartimento interno (CI), asociado a la nutrición larval, y el compartimento externo (CE), relacionado con la protección. Este estudio analizó la producción de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y la respuesta antioxidante en los compartimentos de las agallas. Se realizaron estudios histoquímicos para localizar  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y flavonoides, junto con análisis bioquímicos que cuantificaron flavonoides, malondialdehído,  $H_2O_2$ , fenoles, proteínas y enzimas antioxidantes. Los resultados mostraron que las agallas tienen una respuesta antioxidante diferencial: el CI exhibe bajos niveles de estrés oxidativo gracias a una alta actividad antioxidante no enzimática, mientras que el CE presenta mayores defensas enzimáticas frente a estreses externos. Además, los contenidos de proteínas, fenoles y flavonoides fueron superiores en las agallas en comparación con los tallos. El estudio revela estrategias de las plantas para enfrentar el estrés inducido por herbívoros, compartimentalizando la producción de EROs y la respuesta antioxidante según las funciones específicas de los tejidos.

**Palabras claves:** Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo, anión superóxido, peróxido de hidrogeno, flavonoides.

## ABSTRACT

The production of reactive oxygen species (ROS) is a common response of plants to various stresses. However, plants possess antioxidant mechanisms to mitigate oxidative damage caused by excessive ROS production. In *Nothofagus obliqua*, the gall-inducing insect *Espinosa nothofagi* triggers the formation of galls, which significantly alters the physiology and metabolism of the host plant. These structures are functionally compartmentalized: the inner compartment (IC) is associated with larval nutrition, while the outer compartment (OC) is related to protection. This study analyzed ROS production, including superoxide anion and hydrogen peroxide, and the associated antioxidant response in the compartments of the galls. Histochemical studies were performed to localize  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , and flavonoids, along with biochemical analyses that quantified flavonoids, malondialdehyde,  $H_2O_2$ , phenols, proteins, and antioxidant enzymes. Results showed that galls exhibit differential antioxidant responses: the IC displayed low oxidative stress levels due to high non-enzymatic antioxidant activity, whereas the OC showed elevated enzymatic defenses against external stress factors. Additionally, the contents of proteins, phenols, and flavonoids were higher in galls compared to stems. This study highlights how plants respond to herbivory-induced stress by compartmentalizing ROS production and antioxidant responses according to the specific roles of the tissues.

**Keywords:** Reactive oxygen species, oxidative stress, superoxide anion, hydrogen peroxide, flavonoids.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno y mecanismos de eliminación

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son un grupo de moléculas oxidantes las cuales son modificadoras de distintas funciones celulares, participan en la señalización celular, además de la defensa contra agentes infecciosos, entre otras funciones (Revilla, 2021). La mayoría de las EROs son generadas en la mitocondria a través de la cadena de transporte de electrones. Entre las principales EROs se encuentra el radical hidroxilo (OH), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el ácido hipocloroso (HOCl) y el anión superóxido ( $O_2^-$ ), este último es la principal ERO producido por el metabolismo celular (Carvajal, 2019). A concentraciones bajas, las EROs son mediadores en procesos de señalización intracelular. Sin embargo, en niveles elevados, estas moléculas se vuelven nocivas, causando estrés oxidativo (EO) afectando funciones biológicas, como la integridad de la membrana celular y de los ácidos nucleicos (Isaías et al., 2015).

Numerosos factores bióticos y abióticos inducen estrés en las plantas y por tanto la producción de EROs. La herbivoría es uno de los factores que puede inducir la producción de EROs, cuando una planta es atacada, se desencadena una serie de respuestas a nivel celular y molecular que incluyen la producción de

EROs. Principalmente, se sintetiza  $H_2O_2$  el cual se genera en el sitio de alimentación de los herbívoros masticadores y se propaga sistemáticamente a través de los haces vasculares, fundamentalmente por el floema (Kerchev et al., 2012). Este fenómeno ocurre como parte de una respuesta de defensa compleja que las plantas activan para enfrentar el daño causado por los herbívoros. Las EROs son altamente reactivos y pueden causar daño celular si no se regulan adecuadamente, pero también juegan un papel crucial en la activación de genes relacionados con la defensa y en la señalización de respuestas adaptativas (Piper et al., 2019).

Sin embargo, las plantas disponen de varios mecanismos destinados a eliminar o contrarrestar la sobreproducción de EROs y preservar el equilibrio redox de sus células. El sistema antioxidante consta de dos mecanismos principales: el enzimático y el no enzimático, que trabajan conjuntamente para neutralizar las EROs y proteger las células del daño oxidativo (Bhattacharjee, 2019). El mecanismo enzimático está conformado por varias enzimas, como la superóxido dismutasa (SOD), responsable de convertir el superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno ( $O_2$ ), la catalasa (CAT) que descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno, previniendo la formación de radicales hidroxilos altamente dañinos (Considine et al., 2021). La glutatión peroxidasa (GPX) utiliza glutatión reducido (GSH) para reducir el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos, ofreciendo protección contra el daño oxidativo a las

células (Palma et al., 2014). En las células también se encuentran otras moléculas que tienen alto poder oxidante, como el ascorbato (vitamina C), que puede donar electrones para neutralizar las EROs, incluyendo el radical hidroxilo. Los tocoferoles (vitamina E), son antioxidantes liposolubles, protege las membranas celulares del daño oxidativo al capturar los radicales libres en la fase lipídica. (Carvajal, 2019). El glutatión es un tripéptido, que actúa como un importante antioxidante celular al participar en reacciones de detoxificación de EROs y mantener el estado reducido de otras moléculas antioxidantes. Los fenoles también son un grupo importantes de compuestos antioxidantes, relacionado a su estructura química rica en grupos hidroxilos unidos a anillos aromáticos. Estos grupos hidroxilos tienen la capacidad de donar protones o electrones a los EROs neutralizándolos (Bravo et al., 2015). Además, los fenoles pueden activar rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de enzimas antioxidantes las cuales descomponen EROs (Zenil et al., 2014).

## 1.2 Agallas vegetales y estrés oxidativo

Las agallas vegetales son el tipo de herbivoría más complejo que existe en la naturaleza (Harris, 2020). Estas estructuras, también conocidas como cecidias, se definen como crecimientos anormales productos de interacciones específicas entre plantas hospederas y herbívoros especializados, los cuales pueden ser un insecto u otro organismo (González et al., 2015). Estas estructuras se desarrollan

a consecuencia de una reacción de la planta que incluye básicamente el desarrollo anormal de células y tejidos. Estas respuestas dan lugar a una variedad de formas específicas de agallas, cada una típica para cada especie de insecto inductor (Oliveira et al., 2016). Como respuesta a este tipo de estrés, las plantas activan mecanismos defensivos como las EROs, las que inhiben la formación de agallas, induciendo daño oxidativo y muerte celular en los tejidos afectados. Este proceso puede impedir el establecimiento de la agalla y, en consecuencia, el completamiento del ciclo de vida del inductor (Isaías et al., 2015). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los inductores de agallas logran superar estas defensas oxidativas mediante estrategias adaptativas. Estas incluyen la manipulación del sistema antioxidante de la planta hospedera para neutralizar el exceso de EROs, asegurando así la viabilidad y desarrollo de la agalla (Guedes et al., 2022).

La formación de agallas implica una compleja reorganización de tejidos y rediferenciación celular, influenciada por el establecimiento de un nuevo equilibrio redox dentro de los compartimentos celulares (Grandez et al., 2015). Durante este proceso, la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  actúan como moléculas de señalización, induciendo estrés oxidativo en las células vegetales. Para contrarrestar este aumento de EROs, las plantas activan mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos y no enzimáticos, que mayormente incluyen la síntesis de compuestos fenólicos como flavonoles y lignina (Pawlowski et al.,

2017). Las EROs y la señal química resultante inducen cambios significativos en el metabolismo de la planta, promoviendo la proliferación celular y la formación de nuevos tejidos, culminando en la formación de las agallas (Considine et al., 2021).

La producción de EROs durante la inducción de las agallas puede conllevar a efectos negativos en las especies vegetales hospederas, causando daño oxidativo, además de afectar el crecimiento y desarrollo, provocando efectos negativos en funciones como la fotosíntesis, la absorción de nutrientes y otros procesos metabólicos (Guedes et al., 2022). En resumen, un desequilibrio entre los niveles de producción de EROs y los mecanismos antioxidantes en las plantas hospederas puede tener efectos perjudiciales en la fisiología y desempeño general de la planta hospedera, lo que destaca la importancia de mecanismos antioxidantes para contrarrestar los efectos negativos de los EROs.

### 1.3 *Nothofagus obliqua* como superhospedero de agallas

*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst, conocida popularmente como roble, hualle o pellín, es una especie arbórea nativa de Chile, monoica y caducifolia, perteneciente a la familia Nothofagaceae (Estravis et al., 2019). Se distribuye ampliamente en diversas zonas del sur de Chile y juega un papel crucial en los

ecosistemas en los que se encuentra, ya que proporciona hábitat y alimento a numerosas especies animales (Glatzel, 2024). Además, el roble contribuye a la estabilidad del suelo y al ciclo de nutrientes en los bosques donde crece. El roble, tiene gran importancia comercial, no solo por su valor ornamental, sino también por la calidad de su madera contribuyendo principal fuente de madera entre las angiospermas nativas chilenas (Urrutia et al., 2021).

El roble hospeda al menos siete morfotipos de agallas, dos de estas especies de insectos son himenópteros, de la familia Pteromalidae, *Espinosa nothofagi* Gahan, 1947 y *Plastobelyta gallicola* Kieffer, 1906 (Aguilera et al., 2022). Estas especies inducen diferentes morfotipos de agallas en *N. obliqua*. Por ejemplo *E. nothofagi* induce agallas cónicas en los brotes laterales, mientras que *P. gallicola* induce agallas globulares en tallos jóvenes (Aguilera et al., 2022). Debido a que el roble es una especie caducifolia, la inducción y desarrollo de estas agallas solo se producen durante la etapa de crecimiento vegetativo de la especie, es decir primavera-verano (Guedes et al., 2022).

Las agallas de *E. nothofagi* presentan dos compartimentos distintos. El compartimento externo (CE) está compuesto principalmente por una epidermis uniseriada, clorénquima y tejido de almacenamiento de agua (Aguilera et al., 2022), por lo que la producción de EROs en este compartimento se ha atribuido

fundamentalmente a la fotosíntesis (Guedes et al., 2022). Por otro lado, el compartimento interno (CI) está compuesto por tejido esclerenquimático y tejidos nutritivos (Aguilera et al., 2022). En este compartimento se ha descrito una intensa acumulación de  $H_2O_2$  en los haces vasculares y el tejido nutritivo, posiblemente asociado al proceso de alimentación de la larva y actividad metabólica de la agalla (Guedes et al., 2022). De conjunto con la detección histoquímica de  $H_2O_2$  en este morfotipo de agalla, se demostró la acumulación de fenoles totales y flavonoles, concluyéndose que la coocurrencia de estas moléculas se debe a su posible papel como eliminadores de EROs (Guedes et al., 2022).

Atendiendo a ello y como postularon Guedes et al. (2022), existe una respuesta diferencial en la acumulación de EROs, fenoles y flavonoles en CE y CI de las agallas inducidas por *E. nothofagi*. Los polifenoles, incluyendo los flavonoles, se detectaron en ambos compartimentos de la agalla y pudieran funcionar como antioxidantes, ayudando a neutralizar las EROs acumuladas y protegiendo los tejidos de la agalla contra el estrés oxidativo. Sin embargo, tanto la generación de EROs y los mecanismos antioxidantes que se desencadenan durante el desarrollo de la agalla no han sido cuantificados.

Además, aunque la co-ocurrencia de fenoles y flavonoles en los sitios de producción de EROs en las agallas de *E. nothofagi* se ha descrito como mecanismo de eliminación de estos, hay otros mecanismos que pudiera estar involucrados en la respuesta antioxidante de la planta. Por ejemplo, la participación de enzimas antioxidantes como peroxidasas y lacasas, que podrían estar involucradas en la eliminación de EROs y la polimerización de precursores de lignina en respuesta al estrés oxidativo (Fernández, 2015). En conjunto, estos mecanismos de compensación del estado redox en el CI y CE de la agalla son cruciales para mantener la homeostasis y proteger los tejidos de la agalla y la planta contra los efectos negativos del estrés oxidativo.

*Espinosa nothofagi* ha desarrollado estrategias específicas para evadir el sistema de defensa de *N. obliqua*. Este proceso de evasión permite al insecto no solo sobrevivir en la planta hospedera, sino también inducir un incremento en la actividad antioxidante de la especie (Guedes et al., 2022). Es crucial entender como *E. nothofagi* supera las defensas de *N. obliqua* para establecer sus agallas. Este proceso afecta la actividad antioxidante de la planta hospedera y revela los mecanismos de interacción entre la planta y el insecto, así como las adaptaciones fisiológicas involucradas. Además, pone de manifiesto un mecanismo de manipulación por parte de los insectos inductores, que aprovechan la producción de EROs como señal para activar las defensas de la planta. Esto favorece el establecimiento y desarrollo de las agallas, creando un entorno óptimo que

beneficia el ciclo de vida del inductor. Evaluar la producción de EROs y la respuesta antioxidante en los diferentes compartimentos de las agallas es fundamental para comprender como los insectos gallícolas compartimentalizan el daño oxidativo como estrategia para su mitigación y evadir las defensas de la planta hospedera.

Atendiendo a ello, se propone la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo se compartimentaliza la producción del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno y la respuesta antioxidante asociada en las agallas inducidas por *E. nothofagi* en las yemas de *N. obliqua*?

**Hipótesis:**

La actividad fitófaga de *E. nothofagi* induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno en *N. obliqua*, resultando en una respuesta antioxidante diferencial en los compartimentos de sus agallas debido a las funciones específicas asociadas a dichos compartimentos.

**Objetivo general:**

Determinar la producción de EROs a consecuencia de la actividad fitófaga de *E. nothofagi* y la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática que se desencadena en cada compartimento de las agallas de *N. obliqua*.

**Objetivos específicos:**

1. Evaluar los efectos inducidos por *E. nothofagi* en la producción y acumulación del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno en los compartimentos interno y externo de las agallas de *N. obliqua*.
2. Determinar la respuesta inducida por *E. nothofagi* en la actividad de las enzimas antioxidantes y la producción de flavonoides en el compartimento interno y externo de las agallas de *N. obliqua*.

## II. METODOLOGÍA

### 2.1 Descripción del área de estudio

El sitio de muestreo se localiza en el campus Concepción de la Universidad de Concepción (36°49'36.8"S, 73°02'08.6"W). La elección de Campus Concepción como área de estudio se respalda por la presencia de varios árboles de la especie y la considerable presencia de este morfotipo de agalla en esta especie. En esta área se seleccionaron cuatro árboles adultos con presencia de las agallas.

En cada árbol se recolectaron tallos a la altura del quinto nodo y agallas de yemas maduras ( $n = 5$  para cada estudio) durante septiembre de 2024. Se tomó en cuenta la etapa de maduración debido a que durante este periodo existe un gran aumento de estrés oxidativo, producto de la intensificación de la actividad alimentaria de la larva (Isaías et al., 2015).

Las muestras se recolectaron en nitrógeno líquido y fueron transportadas hasta el Laboratorio de Semioquímica Aplicada donde se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Además, se recolectaron tres agallas y tallos de cada árbol ( $n = 6$ ) para la detección histoquímicas de  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y flavonoides. Previo al análisis cuantitativo, las agallas se diseccionaron con un bisturí para separar los

compartimentos interno y externo y remover la larva. El trabajo de disección se realizó en hielo para evitar la degradación de las muestras.

Para la cuantificación de flavonoides, malondialdehído (MDA),  $H_2O_2$ , fenoles y enzimas antioxidantes se recolectaron cinco agallas y tallos de cada árbol (n = 10). Previo a la separación de los CI y CE de la agalla, junto a los tallos sin agallas se secaron en una estufa (VENTICELL 111-ECO line) a 40°C (Guedes et al., 2022).

## 2.2 Estudio histoquímico

Se utilizaron secciones obtenidas a mano alzada de muestras frescas de tallos y agallas maduras (n = 6 de cada árbol) para detectar EROs y flavonoles. La detección de  $H_2O_2$  se realizó según Rossetti et al. (2001), para lo que las secciones se sometieron a una solución con 0,5% de 3,3' -diaminobencidina durante 15- 60 min en condiciones de oscuridad. El desarrollo de color marrón indicó la presencia de  $H_2O_2$ . Para la detección de  $O_2^-$  las muestras recién recolectadas se colocaron en una solución de 0,2% de azul de nitro-tetrazolio en búfer fosfato de sodio 50 Mm, pH 7,5 recién preparado. Posteriormente, las muestras se sometieron al vacío en un frasco ámbar y se incubaron toda la noche en oscuridad. Las muestras se seccionaron a mano alzada, considerándose la presencia de  $O_2^-$  al manifestarse el color azul (Kumar et al., 2014).

Para la detección de flavonoles, las agallas se incubaron en una solución de cafeína-benzoato de sodio durante 48 h (Ferreira et al., 2017). Posteriormente, las muestras se lavaron con agua destilada y se cortaron a mano alzada, y se incubaron en una solución de 4-dimetilaminocinamaldehído durante 1 h. El desarrollo de color azul violáceo indicó la presencia de flavonoles (Feucht et al., 1986).

Todas las pruebas histoquímicas se compararon con secciones no teñidas para validar los resultados. Las reacciones histoquímicas y sus respectivas secciones en blanco fueron analizadas y documentadas mediante un microscopio óptico equipado con una cámara digital (Leica ICC50W, Alemania).

## 2.3 Estudio bioquímico

Los estudios bioquímicos se realizaron a través de metodologías espectrofotométricas en un espectrofotómetro (800 TSI, Biotek, USA) según las indicaciones de cada metodología.

### 2.3.1 Cuantificación de malondialdehído (MDA)

La cuantificación del MDA, como medida de peroxidación lipídica, se realizó según la metodología de Hodges et al. (1999) con modificaciones. Para ello, se maceraron 100 mg de cada material vegetal (compartimento interno y externo de agallas y tallos sin agallas) en N<sub>2</sub> líquido utilizándose 10 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) con un mortero previamente frío. Al macerado se le adicionó 1 ml de solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se transfirió a un tubo Eppendorf, luego se lavó el mortero con otro ml de TCA 20% y se transfirió al mismo Eppendorf. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 4 °C, y el sobrenadante se recolectó y se resguardó en hielo. A 250 µL del sobrenadante de cada muestra se le adicionó 1 ml de solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% más 1 ml de TCA 20 %. Para el blanco, se utilizaron 250 µL del medio de extracción. Las muestras y blanco se incubaron en baño María a 90°C durante 20 min. La reacción se detuvo incluyéndose las muestras por 1 min en hielo y se centrifugaron a 3000 g por 4 min. La absorbancia se leyó a 532 y 600 nm.

Para el cálculo de la cantidad de complejo MDA-TBA se utilizó la fórmula propuesta por Hodges et al. (1999)

$$Eq. MDA (nmol \cdot mol^{-1}) = [(A_{532} - B_{600})/155000] \times 10^6$$

### 2.3.2 Cuantificación de peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno se cuantificó según la metodología de Junglee et al. (2014). La mezcla de reacción consistió en 0,5 ml de TCA al 0,1%, extracto de cada compartimento de las agallas y tallos molidos, 0,5 ml de tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7) y 1 ml de yoduro de potasio (KI) 1 M. La reacción se desarrolló durante 1 h en oscuridad y se midió la absorbancia a 390 nm. Como blanco se utilizó TCA 0,1% en ausencia del extracto de las muestras. El homogeneizado se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C. Se tomaron 200 µL de sobrenadante de cada tubo y se colocaron en pocillos de microplacas. El cálculo de la concentración se realizó a través una curva de calibración obtenida con una solución estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,1%.

### 2.3.3 Cuantificación de enzimas antioxidantes

La cuantificación de enzimas antioxidantes en este estudio se realizó en un extracto enzimático, según describe Palma et al. (2014). Para la preparación las muestras se homogeneizaron a 4°C en tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,8 que contenía EDTA 0,1 mM, mercaptoetanol 10 mM y polivinilpolipirrolidona al 20%. El extracto proteico se filtró y luego se centrifugó a 15,000 g durante 20 min a 4°C. El extracto resultante se usó para medir las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa (SOD, EC.1.15.1.1), deshidroascorbato. reductasa

(DHAR, EC.1.8.5.1) ascorbato peroxidasa (APX, EC.1.11.1.11), glutati3n reductasa (GR, EC.1.8.1.7), y peroxidasa (POX, EC.1.11.1.7). Se cuantific3 prote3nas seg3n describe la metodolog3a de Bradford (1976).

- 1) Super3xido Dismutasa (SOD): La mezcla de reacci3n (3 ml) conten3a tamp3n fosfato pot3sico 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, NBT 75 M, EDTA 0,1 mM y 0,05 ml de extracto enzim3tico. La reacci3n se inicia a3nadiendo riboflavina 2 M y la mezcla se incub3 bajo l3mparas fluorescentes durante 15 min, y luego se mantuvo en la oscuridad para detener la reacci3n. La absorbancia de la mezcla se mide a 560 nm (Wayne et al., 1987).
- 2) Dehidroascorbato reductasa (DHAR): Se realiz3 seg3n Dalton et al. (1993). La actividad se midi3 en fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5), EDTA 0,1 mM, glutati3n reducido (GSH) 0,5 mM, deshidroascorbato (DHA) 0,5 mM y 50  $\mu$ L de extracto.
- 3) Ascorbato peroxidasa (APX): Se ensay3 registrando la disminuci3n de la absorbancia a 290 nm (Anwar, 1984). La mezcla de reacci3n conten3a Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), ascorbato 0,4 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM.
- 4) Glutati3n reductasa (GR): Se determin3 midiendo la disminuci3n de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidaci3n del NADPH como lo describen Edwards et al. (1990). La mezcla de reacci3n consisti3 en HEPES-NaOH

0,1 mM (pH 7,8), 3 mM de  $MgCl_2$ , glutati3n oxidado 0,25 mM, NADPH 0,2 mM y EDTA 1 mM.

- 5) Peroxidasa (POX): Se estim3 monitorean la oxidaci3n del guaiacol a 470 nm, se realiz3 segun Kato et al. (1987). La actividad se analiz3 en tamp3n fosfato de sodio 200 mM (pH 5,8) que contiene guayacol 7,2 mM y 11,8 mM de  $H_2O_2$ .

#### 2.3.4 Cuantificaci3n de flavonoides

Las muestras secas de CI, CE y los tallos sin agallas se molieron por separado en un molino electrico (IKA A11 basic) y se a3adi3 metanol 96% para luego ser introducidas a ultrasonido por 20 min. La extracci3n se repiti3 de la misma forma tres veces cada 24 h. Los extractos de cada muestra fueron mezclados y llevados a sequedad en un rotavapor (Heidolph VV2000, Alemania). Con los extractos secos se prepar3 un extracto a concentraci3n de 100  $\mu L$  de muestra y 900  $\mu L$  de metanol en un tubo Eppendorf. La cuantificaci3n de flavonoides se realiz3 segun Kim et al. (2003). Los extractos de las muestras (250  $\mu L$ ) se hicieron reaccionar con 250  $\mu L$  de  $NaNO_2$  1,5% y se mantuvo en reposo durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se a3adieron 500  $\mu L$  de  $AlCl_3$  al 3% y se mantuvo en reposo por 6 min. Para finalizar se adicionaron 150  $\mu L$  de  $NaOH$  1 M y 150  $\mu L$  de agua destilada y se dej3 reposar por 5 min. La absorbancia se ley3 a 510 nm contra

un blanco de agua destilada. El contenido de flavonoides totales se cuantificó a través de una curva patrón de catequina ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y se expresó como miligramos de equivalentes de catequina (EC) por cada gramo de peso seco ( $\text{mg EC g}^{-1}$  peso seco). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### 2.3.5 Cuantificación de fenoles

La cuantificación de fenoles se realizó según la metodología de Singh et al. (2016). En los mismos extractos realizados en el acápite 2.3.4. En un Eppendorf se añadieron  $30 \mu\text{L}$  de muestra,  $20 \mu\text{L}$  de reactivo de Folin y  $600 \mu\text{L}$  de agua ultra pura para ser incubadas 5 min en oscuridad. Luego se añadieron  $300 \mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 15% por 1 h en oscuridad, se preparó una curva patrón de ácido gálico ( $1\text{mg/ml}$ ) en donde la cantidad de ácido gálico se tomó directamente de la solución stock. La absorbancia se leyó a  $750 \text{ nm}$  por triplicado y la concentración se expresó como fenoles totales ( $\text{mg GAE/g}$  de extracto seco).

## 2.4 Análisis estadístico

Las comparaciones entre tallo y agalla completa, así como entre el CE y CI de las agallas, se realizaron utilizando el software estadístico “R” versión 4.1.3 (386) año 2022. Para comprobar la normalidad de los datos, se aplicó el test de

Shapiro-Wilk y para evaluar la homogeneidad de las varianzas, se utilizó la prueba de Levene. La comparación de la actividad de las enzimas SOD, DHAR, APX, GR y POX entre los tallos sin agallas y los compartimentos de las agallas se efectuó mediante un modelo lineal mixto, considerándose cada árbol como variable aleatoria y los compartimentos y tallos como variables fijas. Para analizar el contenido de proteínas, fenoles, flavonoides, MDA y peróxido de hidrogeno entre las agallas completas y los tallos sin agallas, se utilizó un modelo lineal generalizado (familia Gaussiana). En las comparaciones de estas mismas variables entre los tallos sin agallas y los dos compartimentos de las agallas, se aplicó un modelo lineal mixto, considerándose los individuos como variables aleatorias y los órganos como variables fijas. Los resultados se presentan por su media y desviación estándar, y las diferencias significativas entre los tratamientos se determinaron para un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ .

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Rasgos morfoanatómicos de tallos y agallas inducidas en *N. obliqua*

Los tallos jóvenes de *N. obliqua* son de color pardo rojizo (Fig. 3.1a). En sección transversal, los tallos mostraron una epidermis uniestratificada, el córtex con presencia de cloroplastos, fibras y cilindro vascular en crecimiento secundario que bordea la médula (Fig. 3.1b).

Las agallas de *E. nothofagi* tienen forma cónica, de color verde a rojiza con proyecciones externas (Fig. 3.1a). Las agallas son compartimentalizadas (Fig. 3.1c). En el CI de la agalla se distinguen capas de tejido nutritivo (Fig. 1d) que bordea una cámara larval amplia que contiene una sola larva. Inmediatamente se distinguen varias capas de esclerénquima que rodean a los haces vasculares (Fig. 3.1d). El CE de las agallas consiste en numerosas capas de tejido de almacenamiento de agua y varias capas de clorénquima delimitados por una epidermis uniseriada (Fig. 3.1e).

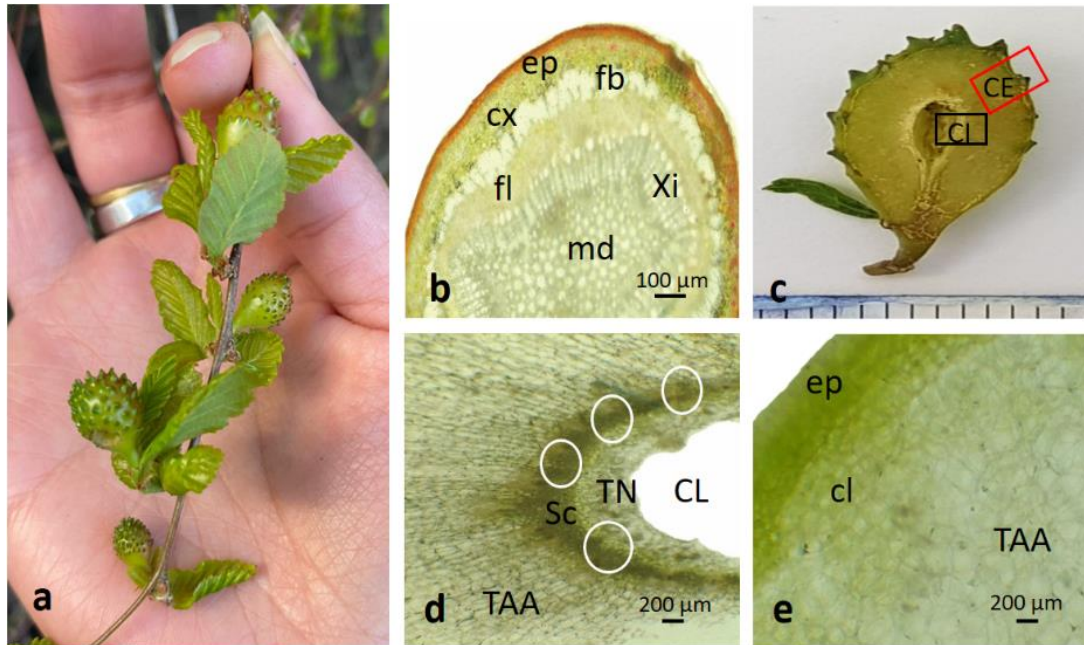


Fig. 3. 1 Características morfológicas y anatómicas de tallos y agallas inducidas en *N. obliqua*; **a**. Rama lateral con agallas de yema inducidas por *E. nothofagi*; **b**. Sección transversal de un tallo compuesto por epidermis (ep), cortex (cx), fibras (fb), floema (fl), xilema (Xi) y médula (md); **c**. Sección longitudinal de una agalla donde se distingue el compartimento externo (CE, cuadro rojo) y compartimento interno (CI, cuadro negro); **d**. Sección transversal del CI de agallas formado por el tejido nutritivo (TN), esclerénquima (Sc) y haces vasculares (círculos blancos); **e**. Sección transversal del CE de una agalla formado por epidermis (ep), clorénquima (cl) y tejido de almacenamiento de agua (TAA).

### 3.2 Resultados del estudio histoquímico

En el caso de la histolocalización del  $O_2^-$  se evidenció una distribución diferencial en los tejidos del tallo y agalla marcadas notoriamente de color azul por reacción con NBT (Fig. 3.2). En el tallo se detectó  $O_2^-$  principalmente en células del floema y xilema (Fig. 3.2a), además del córtex (Fig. 3.2b), el cambium vascular el cual

se localiza entre el xilema y floema, junto con el felógeno muestran presencia de  $O_2^-$  (Fig. 3.2a y b). Las células de los radios parenquimáticos mostraron una intensa acumulación de  $O_2^-$  al igual que algunas células de la médula (Fig. 3.2c). En el CE de la agalla se detectó la presencia de  $O_2^-$  en las células de la epidermis (Fig. 3.2d), al igual que en el parénquima de almacenamiento de agua (Fig. 3.2e). Además, acumulación de  $O_2^-$  en traqueidas que se proyectan al tejido de almacenamiento de agua (Fig. 3.2f). En el CI de la agalla se detectó  $O_2^-$  en los haces vasculares (Fig. 3.2g y h) y en fibras esclerenquimáticas (Fig. 3.2i).

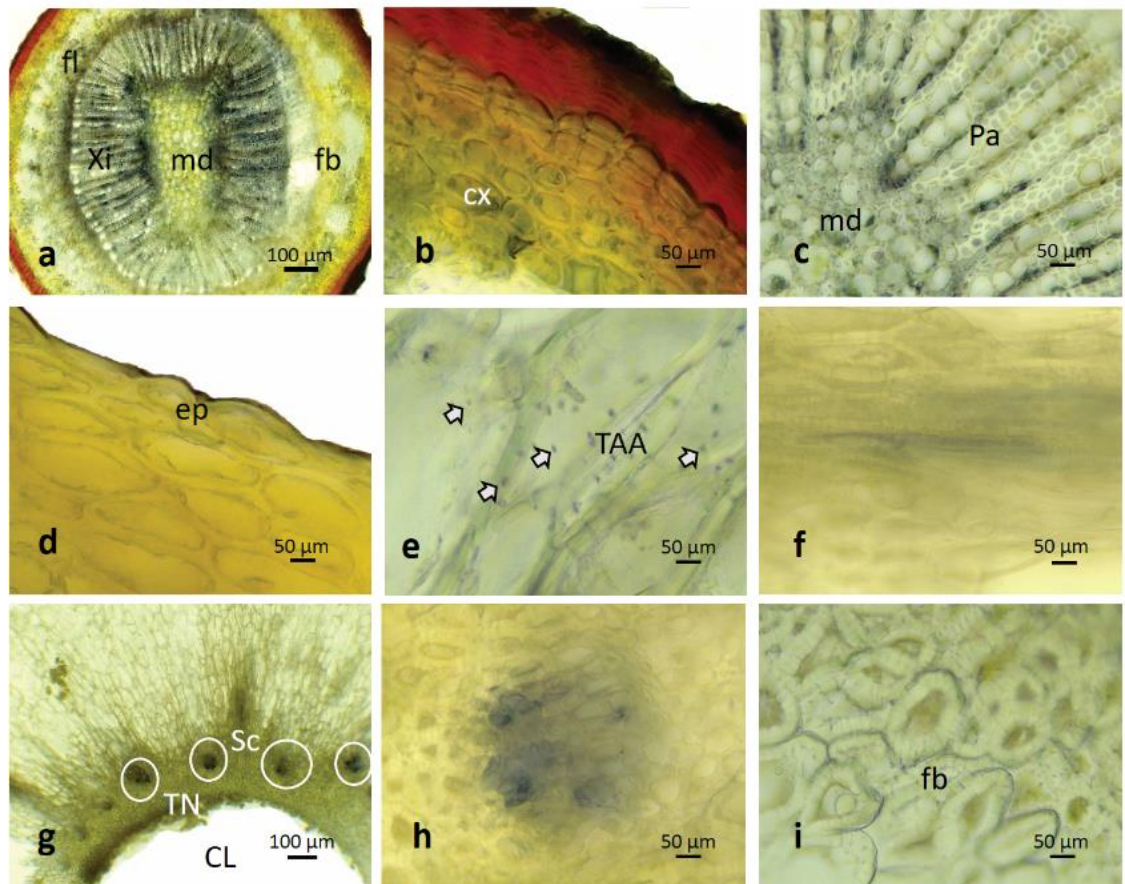


Fig. 3. 2 Detección histoquímica de  $O_2^-$  en tallos de *N. obliqua* y en agallas inducidas por *E. nothofagi*; **a.** Anión superóxido teñido con NBT en células del floema (fl) y xilema (Xi) de tallo; **b.** detección de  $O_2^-$  en células del cortex (cx) de un tallo; **c.** Células de radios parenquimáticas (Pa) y medula (md) de tallo; **d.** Detalle de CE y la detección de  $O_2^-$  en epidermis (ep); **e.** Vista general de la detección de  $O_2^-$  en interior de parénquima de almacenamiento de agua (TAA) en El CE de agalla; **f.** Traqueida proyectada hacia TAA; **g.** Vista general de CI y la detección de  $O_2^-$  en azul en los haces vasculares (círculos blancos), esclerénquima (Sc) y tejido nutritivo (TN); **h.** Haz vascular con presencia de  $O_2^-$ ; **i.** Fibras (fb) con presencia de  $O_2^-$  en paredes celulares.

La acumulación de  $H_2O_2$  en el tallo de *N. obliqua* se identificó en color marrón debido a la reacción con DAB. El  $H_2O_2$  se detectó principalmente en el súber, clorénquima, fibras perivasculares, floema, cambium vascular, xilema del tallo sin agallas (Fig. 3.3a). En el córtex, ambas las paredes celulares y en los espacios intercelulares acumulan  $H_2O_2$ , al igual que las paredes internas de las fibras perivasculares y el felógeno (Fig. 3.3b). Las células de parénquima radial también acumularon este ERO (Fig. 3.3c).

En las agallas inducidas por *E. nothofagi* el  $H_2O_2$  se detectó en las paredes celulares de los tejidos de ambos compartimentos. En el CE la reacción más intensa ocurrió en las paredes de las células epidérmicas y del clorénquima (Fig. 3.3d). Además, de en las paredes celulares del parénquima de almacenamiento de agua, aunque en estas últimas la reacción fue menos intensa (Fig. 3.3e). En

el CI la reacción de detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue más intensa en los haces vasculares (Fig. 3.3f) y con menor intensidad en las paredes de las células del tejido de almacenamiento y nutritivo (Fig. 3.3g).

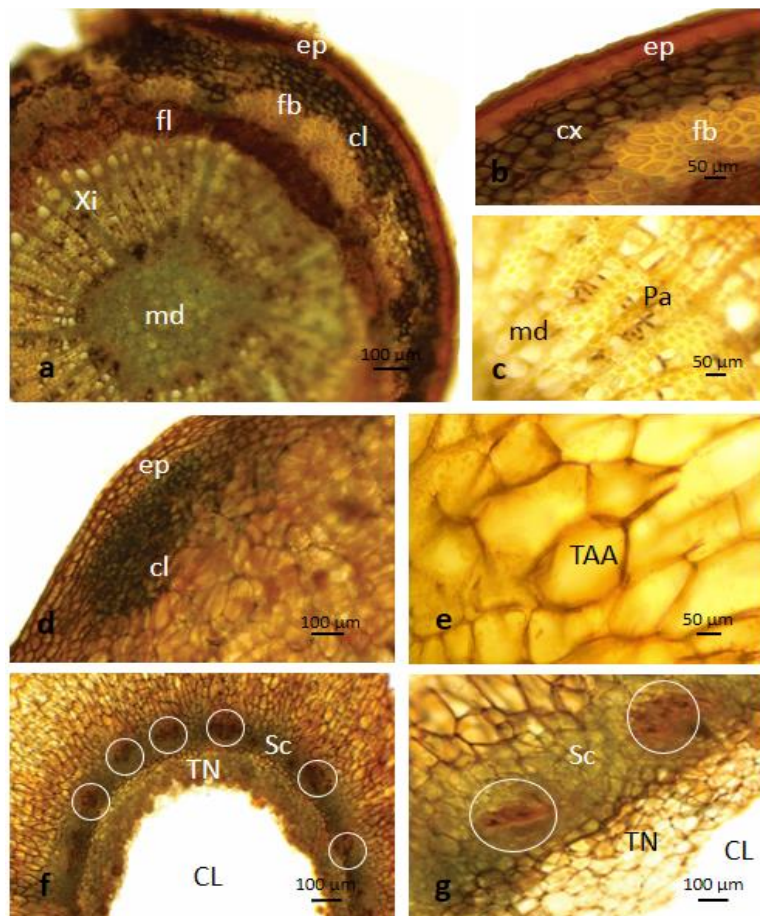


Fig. 3. 3 Detección histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tallos de *N. obliqua* y agallas de *E. nothofagi* por reacción con DAB; **a**. Presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células epidérmicas (ep), clorénquima (cl), floema (fl) y xilema (xi) de tallo; **b**. Presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en epidermis (ep) y cortex (cx) de tallo; **c**. Células del parénquima xilemático (xi) con presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tallo; **d**. EROs en paredes celulares epidérmicas (ep) y de

las células de clorénquima (cl) del CE de agalla; **e.** Vista general de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en paredes celulares del tejido almacenamiento de agua (TAA) en el CE de agalla; **f.** Vista general de detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el compartimento interno de la agalla que comprenden haces vasculares (círculo blanco), esclerénquima (Sc) y tejido nutritivo (TN); **g.** Detalle de la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en haces vasculares (círculos blancos) y células del tejido nutritivo (TN).

Los tallos de *N. obliqua* acumulan flavonoles en vacuolas del floema, xilema y médula (Fig. 3.4a). Además, en las fibras (Fig. 3.4b) y en las vacuolas de las células de la médula (Fig. 3.4c). Las paredes celulares de las células epidérmicas y del clorénquima se tiñeron de color azul oscuro en la agalla, indicando la presencia de flavonoles en estos tejidos del CE (Fig. 3.4d). Adicionalmente, las paredes celulares del tejido de almacenamiento de agua también mostraron una tinción positiva para flavonoides (Fig. 3.4e). En el CI se detectaron flavonoides en células del esclerénquima (Fig. 3.4f) y en las paredes celulares parenquimáticas (Fig. 3.4g).

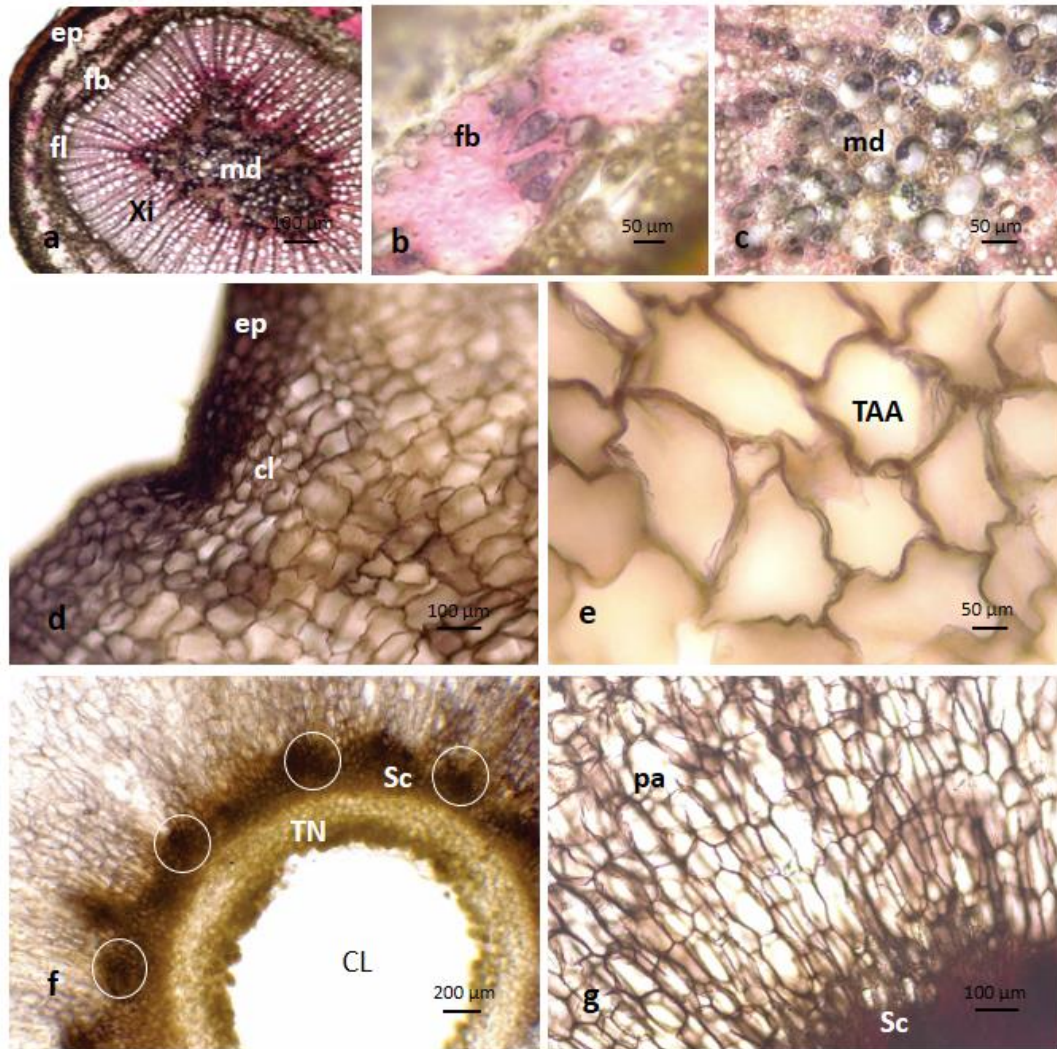


Fig. 3. 4 Detección histoquímica de flavonoides en tallos de *N. obliqua* y agallas de yemas inducidas por *E. nothofagi*; **a**. Tinción de tallo para detección de flavonoides en células epidérmicas (ep), fibras (fb), floema (fl), células del xilema (Xi) y medula (md); **b**. Detección de flavonoides en fibras (fb) de muestras de tallo; **c**. Detección de flavonoides en células de la medula (md) de muestras de tallo; **d**. Flavonoides en células de la epidermis (ep) de agalla y en las células de clorénquima (cl) en el CE de agalla; **e**. Vista general de CE de la agalla y la detección de flavonoides en las paredes celulares del parénquima que almacena agua (TAA); **f**. Vista general de detección de flavonoides en haces vasculares (círculo blanco), esclerénquima (Sc) y tejido nutritivo (TN) en el CI de agalla; **g**. CI de la agalla con paredes celulares de parénquima (pa) y esclerénquima (Sc) con presencia de flavonoides.

### 3.3 Cuantificación de peróxido de hidrógeno y malondialdehído

Las concentraciones de  $H_2O_2$  en las agallas fue significativamente mayor que en los tallos, con diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3.5). Adicionalmente, hubo diferencias significativas entre los tallos y los compartimentos de las agallas ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3.5). La mayor concentración de  $H_2O_2$  se registró en los tallos, con diferencias significativas en el CE y CI, registrándose el menor valor en el CI (Fig. 3.5).

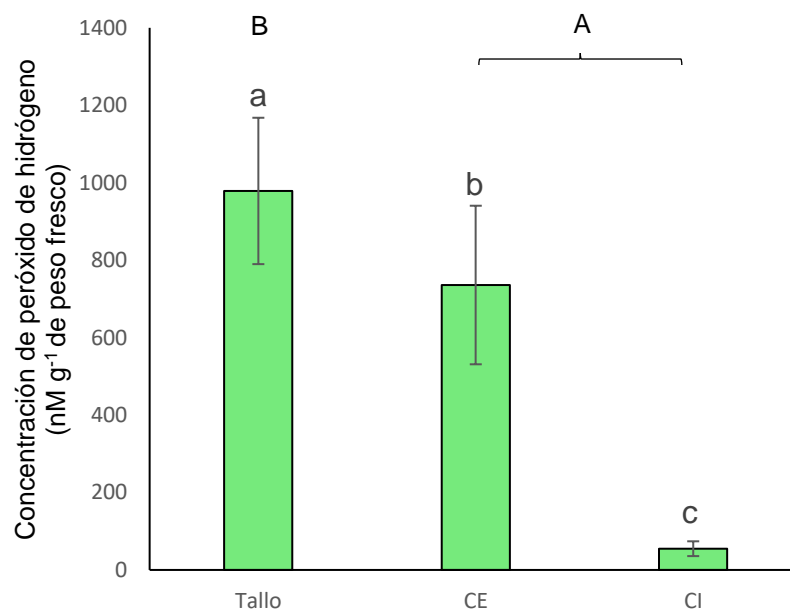


Fig. 3. 5 Concentración total de  $H_2O_2$  en tallos de *N. obliqua* y agallas de yemas de *E. nothofagi* y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla. Las barras representan las medias y la barra de error la desviación estándar. Letras

minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre el tallo, CE y CI de agalla.

La concentración de MDA no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre tallos y agallas (Fig. 3.6). De igual forma no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los compartimentos de las agallas y tallos (Fig. 3.6).

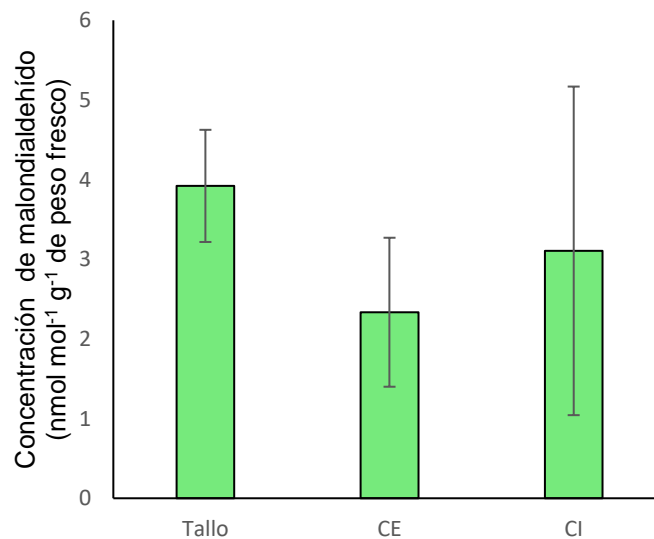


Fig. 3. 6 Concentración total de malondialdehído en tallos de *N. obliqua* y agallas de yemas de *E. nothofagi* y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla. Las barras representan las medias y la barra de error la desviación estándar.

### 3.4 Cuantificación de la actividad de las enzimas antioxidantes

La actividad fitófaga de *E. nothofagi* afectó significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes (Tabla 3.1). No hubo diferencias significativas en la actividad de la SOD entre tallos y agallas completas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 3.1). Sin embargo, cuando se compararon los tallos con los compartimentos de las agallas se observaron diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) en la actividad de la SOD (Tabla 3.1). Aunque la actividad en tallos y CE fue estadísticamente similar, en el CI la actividad de la SOD fue significativamente menor (Tabla 3.1).

En tallos y agallas se detectaron diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ), para la actividad de la DHAR, con mayor actividad en tallos (Tabla 3.1). La comparación entre los tallos y los compartimentos de las agallas también mostraron diferencias ( $p < 0,05$ ) (Tabla 3.1). La actividad de la DHAR en el CE fue significativamente menor que la del tallo, pero sin diferencias significativas en el CI (Tabla 3.1).

La actividad de la APX no mostró diferencias significativas entre los tallos y agallas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 3.1). Sin embargo, cuando se comparó con los compartimentos de la agalla se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre la actividad de APX de los tallos y CI, pero sin diferencias de ambos con el CE (Tabla 3.1). La mayor actividad de APX se registró en los tallos (Tabla 3.1).

Para la actividad de la GR hubo diferencia altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre tallos y agallas, registrándose la mayor actividad en la agalla (Tabla 3.1). En los compartimentos de la agalla se observaron diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ), donde CE mostró mayor actividad (Tabla 3.1). No se detectaron diferencias significativas entre CI y tallos (Tabla 3.1).

La actividad de POX en tallos fue significativamente mayor en las agallas, con diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) (Tabla 3.1). Adicionalmente, los tallos mostraron diferencias significativamente ( $p < 0,01$ ) comparados con ambos compartimentos, con mayor actividad en los tallos (Tabla 3.1).

Tabla 3. 1. Actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), dehidroascorbato reductasa (DHAR), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y peroxidasa (POX) de tallos y agallas y el compartimento externo (CE) e interno (CI) de *E. nothofagi* inducidas en yemas de *N. obliqua*. Los datos están representados por las medias  $\pm$  desviación estándar. Las letras mayúsculas en las columnas de la tabla muestran diferencia significativa entre tallos y agallas completas y las letras minúsculas indican diferencias entre tallo, CE y CI para  $p < 0,05$ .

Parámetros	Tratamientos			Df	Chisq	Valor-p
SOD	Tallo	Agalla		1	0,5243	> 0,05
	1,12 $\pm$ 0,23	0,86 $\pm$ 0,20				
SOD	Tallo	CE	CI	1	214,02	< 0,001
	1,12 $\pm$ 0,23a	1,04 $\pm$ 0,07a	0,67 $\pm$ 0,04b			
DHAR	Tallo	Agalla		1	20,21	< 0,001
	0,42 $\pm$ 0,03A	0,18 $\pm$ 0,14B				
DHAR	Tallo	CE	CI	1	4,08	< 0,05
	0,42 $\pm$ 0,03a	0,12 $\pm$ 0,04b	0,24 $\pm$ 0,18ab			
APX	Tallo	Agalla		1	3,61	> 0,05
	0,32 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,06				
APX	Tallo	CE	CI	1	7,10	< 0,01
	0,32 $\pm$ 0,06a	0,26 $\pm$ 0,05ab	0,18 $\pm$ 0,04b			
GR	Tallo	Agalla		1	24,72	< 0,001
	0,07 $\pm$ 0,01B	0,12 $\pm$ 0,04A				
GR	Tallo	CE	CI	1	14,41	< 0,001
	0,07 $\pm$ 0,01b	0,15 $\pm$ 0,03a	0,09 $\pm$ 0,04b			
POX	Tallo	Agalla		1	25,49	< 0,001
	0,55 $\pm$ 0,15A	0,10 $\pm$ 0,12B				
POX	Tallo	CE	CI	1	6,86	< 0,01
	0,55 $\pm$ 0,15a	0,17 $\pm$ 0,14b	0,02 $\pm$ 0,03b			

### 3.5 Cuantificación de proteínas totales, fenoles y flavonoides

Los resultados de la cuantificación de proteínas totales mostraron que los tallos tuvieron menor concentración de proteínas que las agallas completas, con diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3.7). El CI fue el que mayor

concentración de proteínas mostró, con diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) con el CE y tallos (Fig. 3.7).

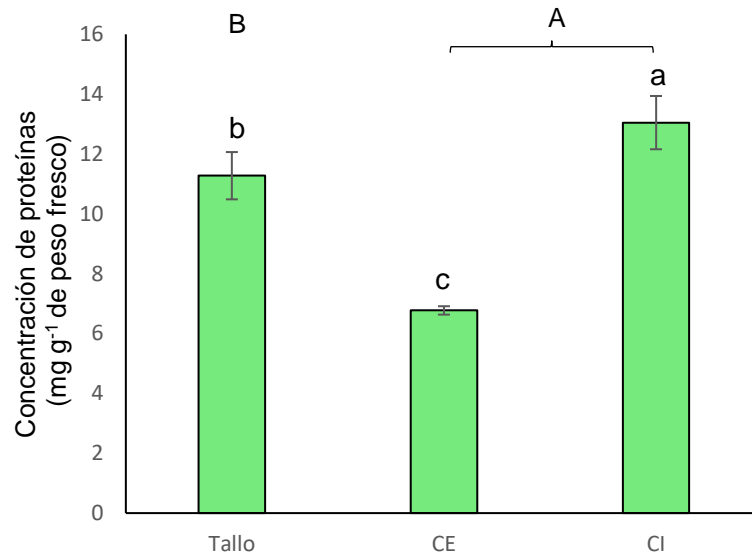


Fig. 3. 7 Concentración de proteínas totales en tallos de *N. obliqua* y agallas de yemas de *E. nothofagi* y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla. Las barras representan las medias y la barra de error la desviación estándar. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre el tallo y las agallas completas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre el tallo, CE y CI de agalla.

Los tallos tuvieron menor contenido de fenoles que las agallas, con diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3.8). No hubo diferencias significativas entre los tallos y los compartimentos de las agallas ( $p > 0,05$ ) (Fig. 3.8).

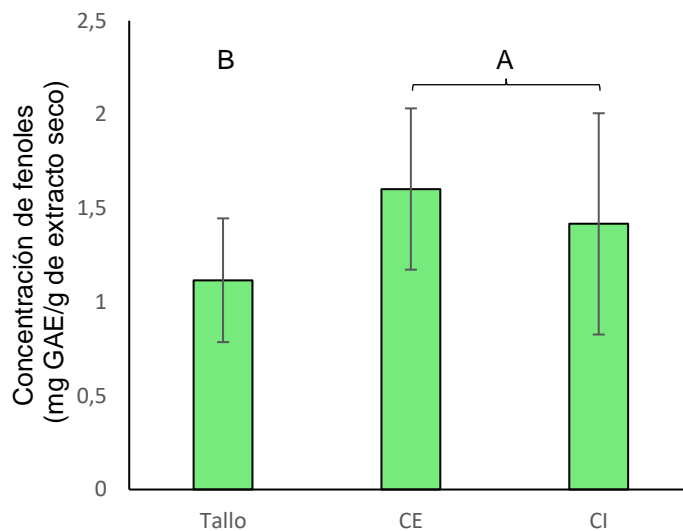


Fig. 3. 8 Concentración de fenoles en tallos de *N. obliqua* y agallas de yemas de *E. nothofagi* y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla. Las barras representan las medias y la barra de error la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el tallo y las agallas completas.

La concentración de flavonoides totales fue significativamente mayor en las agallas comparado con los tallos ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3.9). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando se compararon los tallos con los CE y CI (Fig. 3.9). Mientras que no se encontró diferencias notables entre tallo, CI y CE.

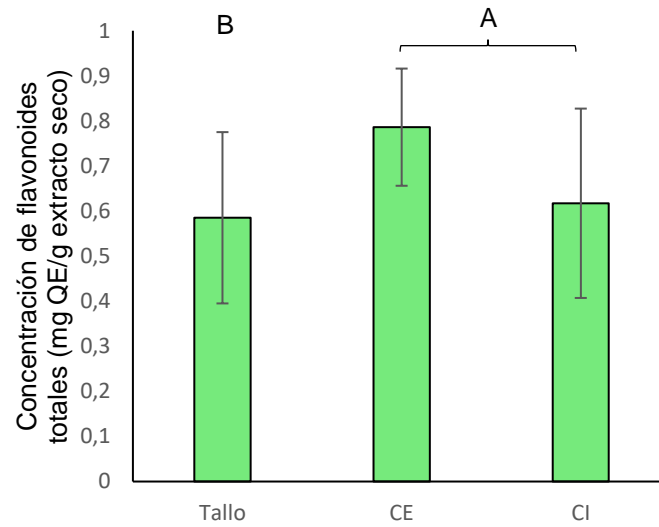


Fig. 3. 9 Concentración de flavonoides totales en tallos de *N. obliqua* y agallas de yemas de *E. nothofagi* y el compartimento interno (CI) y externo (CE) de la agalla. Las barras representan las medias y la barra de error la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el tallo y las agallas completas.

#### IV. DISCUSIÓN

Los resultados indican una acumulación diferencial significativa en la distribución de compuestos y enzimas antioxidantes en los tallos y compartimentos de las agallas de *N. obliqua*. El análisis histoquímico de  $H_2O_2$  se correlaciona con los resultados de cuantificación, ya que se identifica una mayor acumulación de EROs en los tallos en comparación con los compartimentos de las agallas. Este patrón podría estar relacionado con diferencias funcionales entre los tejidos, como mecanismos especializados en donde los tallos presentan una mayor actividad metabólica general debido a su papel fundamental en el desarrollo y crecimiento vegetativo, lo que puede generar un aumento en la producción de EROs (Arriola et al., 2024). Los estudios histoquímicos revelan que los tallos están en transición activa del crecimiento primario al secundario, durante esta etapa la actividad del cambium vascular se relaciona histoquímicamente con la acumulación de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ .

Por otra parte, los análisis cualitativos y cuantitativos de los compartimentos de la agalla revelan diferencias notables en los niveles de EROs y las respuestas antioxidantes. Se detectaron niveles bajos de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en el CI de la agalla de *E. nothofagi*, mientras que en el CE se observa una mayor concentración de  $H_2O_2$  (Fig. 3.3), posiblemente asociado a las distintas funciones específicas que tiene cada uno de estos compartimentos. En el tejido nutritivo y esclerénquima del CI,

por ejemplo, la acumulación parece asociada a procesos vinculados con la alimentación y nutrición de la larva. En contraste, en el CE, la acumulación está vinculada a funciones como la fotosíntesis o la respuesta a condiciones de estrés ambiental (Guedes et al., 2022). Además, en el CI de las agallas de *E. nothofagi* funciona como un compartimento nutritivo, almacenando nutrientes como azúcares reductores, proteínas y lípidos (Aguilera et al., 2022). Este papel fue corroborado por la alta concentración de proteínas observadas en el CI, donde los nutrientes se movilizan hacia las células del tejido nutritivo y son consumidas por la larva de *E. nothofagi* (Guedes et al., 2022). El CI demostró niveles bajos de estrés oxidativo. La baja actividad de SOD fue consistente con una reducción de la acumulación de  $O_2^-$ , que se localizó en los haces vasculares y las paredes celulares de fibras. Enzimas como APX, GR y POX también mostraron bajas actividad en el CI, lo que sugiere un estrés oxidativo mínimo en este compartimento.

Además, se observa la coocurrencia de flavonoides en los mismos sitios de acumulación de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , a los que se le puede atribuir un papel protector como respuesta al estrés ambiental provocado (Del Valle et al., 2015). Las EROs pueden inducir la expresión de genes involucrados en la síntesis de flavonoides como parte de la respuesta defensiva de la planta ante el estrés. Por lo tanto, la síntesis de estas moléculas se intensificaría en las áreas donde se acumulan EROs, como se ha observado en muestras de tallo, respondiendo a las

demandas locales generadas por el estrés oxidativo y las condiciones fisiológicas asociadas (Mansoor et al., 2022).

La variación en las actividades enzimáticas observada en las agallas parece estar vinculada con las interacciones específicas entre la planta hospedera y el organismo inductor de la agalla. El insecto que induce la formación de la agalla manipula los procesos metabólicos de la planta hospedera para establecer un ambiente que favorezca su desarrollo (Aguilera et al., 2022). Este proceso puede incluir la regulación diferencial de enzimas, donde ciertas rutas metabólicas se activan y otras se reprimen, dependiendo de las necesidades específicas del inductor y de las funciones asociadas a las enzimas involucradas, como la superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peróxidasa (Palma et al., 2014). En el CI de las agallas, los bajos niveles de estrés oxidativo están asociados con la eficiencia de sus sistemas antioxidantes, destacando la actividad elevada de la DHAR, que contribuye al reciclaje continuo de ascorbato. Este mecanismo asegura un suministro constante de antioxidantes no enzimáticos que minimizan el daño oxidativo. Además, de la alta capacidad antioxidante de los extractos fenólicos del CI demostrada por su capacidad en la eliminación de radicales libres como ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y difenilpicrilhidracilo (Guedes et al., 2022; Arriola et al., 2024). Estos resultados posicionan al CI como un compartimento altamente especializado, con estrategias para equilibrar las

demandas metabólicas y mantener la homeostasis redox, crucial para el desarrollo larvario.

En contraste, el CE enfrenta un mayor estrés oxidativo, probablemente derivado de factores abióticos como la radiación UV, como se describió anteriormente en agallas de *E. nothofagi* (Guedes et al., 2022). La elevada actividad de enzimas antioxidantes como SOD, APX y GR sugiere un mecanismo de defensa eficiente frente a los altos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, la acumulación de antocianinas en el CE, independiente del color de las agallas, subraya su papel protector como filtros frente a la radiación UV (Arriola et al., 2024).

En las agallas de *E. nothofagi*, la baja actividad de POX probablemente corresponde a su fase de maduración, durante la cual las demandas estructurales y metabólicas priorizan la estabilización sobre el crecimiento activo y la lignificación (Aguilera et al., 2022). Por otro lado, en los tallos sin agallas, la elevada actividad de POX se asocia con procesos de suberización y lignificación esencial para el desarrollo de la peridermis y del xilema, según evidencias histológicas.

En conjunto, los sistemas antioxidantes de los tallos de *N. obliqua* y de las agallas inducidas por *E. nothofagi* funcionan de manera coordinada para contrarrestar el

exceso de EROs, manteniendo el equilibrio redox celular. Sin embargo, los mecanismos utilizados varían entre estos órganos, reflejándose diferencias en las intensidades metabólicas y las funciones específicas de cada compartimento. Estas variaciones destacan como los compartimentos de las agallas ajustan selectivamente la actividad enzimática; así como a la acumulación de metabolitos para satisfacer sus demandas fisiológicas y funcionales únicas.

## V. CONCLUSIONES

1. La elevada actividad de enzimas antioxidantes en los tallos destaca su papel en la mitigación del estrés oxidativo durante las fases activas de crecimiento.
2. En las agallas, los compartimentos interno y externo exhiben respuestas antioxidantes diferenciadas: el CI mantiene bajos niveles de estrés oxidativo mediante un reciclaje eficiente de ascorbato y actividad antioxidante no enzimática, mientras que el CE demuestra una sólida defensa enzimática frente a factores de estrés abiótico.
3. Los hallazgos del presente estudio profundizan la comprensión de la interacción entre la regulación de EROs y los sistemas antioxidantes en el desarrollo de agallas y las respuestas de los tejidos del hospedero, proporcionando un marco para explorar los mecanismos de adaptación al estrés en las interacciones planta-insecto.

## VI. GLOSARIO

- Ácido tiobarbitúrico (TBA): reactivo químico empleado para evaluar el nivel de daño oxidativo en tejidos vegetales o animales.
- Ácido tricloroacético (TCA): compuesto químico utilizado como agente precipitante de proteínas y como reactivo en análisis bioquímicos, especialmente en la cuantificación de peroxidación lipídica.
- Malondialdehído (MDA): producto final de la peroxidación de lípidos que se utiliza como marcador bioquímico para medir el daño oxidativo en las células.
- Nitro Blue Tetrazolium (NBT): reactivo químico utilizado para la detección de EROs. Al reaccionar el NBT se reduce, formando precipitado azul que indica la presencia de actividad oxidativa.
- Polivinilpolipirrolidona (PVPP): polímero insoluble usado en la extracción de compuestos fenólicos, como los flavonoides, para prevenir interferencias en análisis bioquímicos.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, N., Isaías, R. M. D. S., De Castro Jorge, N., Cornejeros, M. J., Becerra, J., Nieves-Aldrey, J. L., & Guedes, L. M. (2022). Distinctive anatomical and histochemical responses of *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst (Nothofagaceae) to two galling Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) in Chile. *Flora*, 290, 152-056. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2022.152056>
- Anwar, M. H., & Asada, K. (1984). Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate, *Plant and Cell Physiology*. 1285–1295.
- Arriola, Í. A., Guedes, L. M., Moreira, A. S. F. P., Aguilera, N., Isaías, R. M. D. S., & De Oliveira, D. C. (2024). Iron metabolism acts as a bridge between photosynthesis and red coloration of bud galls induced on *Nothofagus obliqua* (Nothofagaceae). *Physiologia Plantarum*, 176(6). <https://doi.org/10.1111/ppl.14651>
- Bhattacharjee, S. (2019). Reactive oxygen species in plant biology. Springer eBooks, 107-125. New Delhi, India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3941-3>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254
- Bravo, J. A., Peñarrieta, M., Tejada, L., Mollinedo, P., & Vila, J. (2015). Phenolic compounds in food. *Bolivian Journal of Chemistry*, 31 (2), 68-81. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5018.1840>
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36 (1), 91-100. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es).

- Considine, M. J., & Foyer, C. H. (2021). Stress effects on the reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 72(16), 5795–5806. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab265>
- Dalton, D. A., Baird, L. M., Langeberg, L., Taugher, C. Y., Anyan, W. R., Vance, C. P., & Sarath, G. (1993). Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*glycine max* [L.] merr.) root nodules. *Plant Physiology*, 102(2), 481–489. <https://doi.org/10.1104/pp.102.2.481>
- Del Valle, J. C., Buide, M. L., Casimiro-Soriguer, I., Whittall, J. B., & Narbona, E. (2015). On flavonoid accumulation in different plant parts: variation patterns among individuals and populations in the shore campion (*Silene littorea*). *Frontiers In Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00939>
- Edwards, E. A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant*, 180(2), 278–284. <https://doi.org/10.1007/BF00194008>
- Estravis-Barcala, M., Arana, M. V., Bellora, N., Cerdan, P. D. (2019). Respuestas a la temperatura en especies del género *Nothofagus* distribuidas en un gradiente altitudinal. Instituto de investigaciones forestales y agrícola. Tesis de licenciatura, Universidad de Buenos Aires, Argentina. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/79842>
- Fernández-Pérez, F. (2015). Caracterización funcional de mutantes de peroxidasas implicadas en la biosíntesis de ligninas en *Arabidopsis thaliana*. Proyecto de investigación. Programa de doctorado de biología celular y molecular. Universidad de Coruña, España.
- Ferreira, B. G., Falcioni, R., Guedes, L. M., Avritzer, S. C., Antunes, W. C., Souza, L. A., & Isaias, R. M. (2017). Preventing false negatives for histochemical detection of phenolics and lignins in PEG-Embedded plant tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 65 (2), 105–116. <https://doi.org/10.1369/0022155416677035>

- Feucht, W., Schmid, P. P. S., Christ, E. (1986). Distribution of flavanols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *Journal of Plant Physiology*, 125 (1–2), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80237-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80237-1).
- Glatzel, M. (2024). Historia biogeográfica y filogeográfica de *Nothofagus Antarctica* en Sudamérica austral. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche.
- González, M. A., & Solís, M. S. (2015). Anatomía y morfogénesis de las agallas producidas por *Leptocybe invasa* en plantas de Eucalyptus. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 50 (2), 141-151. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-23722015000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722015000200002&lng=es&tlng=es)
- Grandez-Rios, J. M., García Villacorta, R., Cuevas-Reyes, P., & de Araújo, W. S. (2015). Insectos inductores de agallas en América Latina: ecología, importancia y nuevas perspectivas. *Journal of Neotropical Biology*, 12 (2), 92-103.
- Guedes, L. M., Torres, S., Sáez-Carillo, K., Becerra, J., Pérez, C. I., & Aguilera, N. (2022). High antioxidant activity of phenolic compounds dampens oxidative stress in *Espinosa nothofagi* galls induced on *Nothofagus obliqua* buds. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology*, 314, 111114. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111114>
- Harris, M. O., & Pitzschke, A. (2020). Plants make galls to accommodate foreigners: some are friends, most are foes. *The New Phytologist*, 225(5), 1852–1872. <https://doi.org/10.1111/nph.16340>
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Plant* 207, 604–611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Isaías, R. M. S., Oliveira, D. C., Moreira, A. S., Soares, G. L., & Carneiro, R. G. (2015). The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant

galls: mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850 (8), 1509–1517.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>

Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., & Lopez-Lauri, F. (2014). Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5 (11), 730.

Kerchev, P. I., Fenton, B., Foyer, C. H., & Hancock, R. D. (2012). Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant, Cell & Environment*, 35 (2), 441-453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02399.x>

Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (22), 6509-15.

Kumar, D., Yusuf, M. A., Singh, P., Sardar M., Sarin N. B. (2014) Histochemical detection of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in *Brassica juncea* seedlings. *BioProtocol*, 4 (8). 4. 1. 10.21769/BioProtoc.1108.

Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., & Ahmad, P. (2022). Reactive oxygen species in plants: from source to sink. *Antioxidants*, 11(2), 225. <https://doi.org/10.3390/antiox11020225>

Oliveira, D. C., Isaias, R. M. S., Fernandes, G. W., Ferreira, B. G., Carneiro, R. G. S., & Fuzaro, L. (2016). Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology*, 84, 103–113.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.012>

Palma, F., López-Gómez, M., Tejera, N., & Lluch, C. (2014). Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Science*, 223, 16-24.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.005>

- Pawlowski, T. A., Staszak, A. M., Karolewski, P., & Giertych, M. J. (2017). Plant development reprogramming by cynipid gall wasp: proteomic analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2414-9>
- Piper, F. I., Gundale, M. J., Fuenzalida, T., & Fajardo, A. (2019). Herbivore resistance in congeneric and sympatric *Nothofagus* species is not related to leaf habit. *American Journal of Botany*, 106(6), 788-797.
- Kato, M., Shimizu, S. (1987). Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany*. 65 (4), 729-735. <https://doi.org/10.1139/b87-097>
- Revilla Flores, E. M. (2021). Especies reactivas de oxígeno importancia e implicaciones patológicas. *Revista Científica Ciencias Médicas*, 24 (2), 125-132. <https://doi.org/10.51581/rccm.v24i2.401>
- Rossetti, S., Bonatti, P. M. (2001). In situ histochemical monitoring of ozone- and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39 (5), 433-442, [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01250-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01250-5)
- Singh, G., Passsari, A. K., Leo, V. V., Mishra, V. K., Subbarayan, S., Singh, B. P., Kumar, B., Kumar, S., Gupta, V. K., Lahlhenmawia, H., & Nachimuthu, S. K. (2016). Evaluation of phenolic content variability along with antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic potential of selected traditional medicinal plants from India. *Frontiers in Plant Science*, 7, 407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00407>
- Urrutia-Jalabert, R., Barichivich, J., Rozas, V., Lara, A., Rojas, Y., Bahamóndez, C., Rojas-Badilla, M., Gipoulou-Zúñiga, T., Cuq, E. (2021). Climate response and drought resilience of *Nothofagus obliqua* secondary forests across a latitudinal gradient in south-central Chile. *Forest Ecology and Management*, 485, <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.118962>
- Wayne Beyer, F., Fridovich I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions, *Analytical*

*Biochemistry*, 161 (2), 559-566, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1).

Zenil Lugo, N., Colinas León, M. T., Bautista Bañuelos, C., Vázquez Rojas, T. R., Lozoya Saldaña, H., & Martínez Damián, M. T. (2014). Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5 (6), 1029-1039.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342014000600010&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000600010&lng=es&tlng=es).