

UCH-FC  
LIC-B  
R 372  
C.1

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA EN SEMILLAS DE

Araucaria araucana (Mol.) Koch

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Licenciado en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas



Antonio Reiner Orellana

Junio, 1981

Profesor Guía: Dra. Liliana Cardemil

## INDICE DE MATERIAS

|   | Pág. |
|---|------|
| LISTA DE TABLAS .....                                       | iii  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                      | iv   |
| ABSTRACT .....  | v    |
| RESUMEN .....   | vii  |
| INTRODUCCION .....  | 1    |
| MATERIAL Y METODOS .....                                    | 6    |
| Material utilizado y condiciones de germinación .....       | 6    |
| Obtención de extractos crudos de enzima .....               | 6    |
| Ensayo de la actividad enzimática .....                     | 7    |
| Determinación de proteínas totales solubles .....           | 8    |
| Identificación de la enzima .....                           | 8    |
| Determinación de la localización subcelular de la enzima .. | 9    |
| Extracción de giberelinas .....                             | 10   |
| Cromatografía en capa fina de giberelinas .....             | 11   |
| Bioensayo de giberelinas .....                              | 11   |
| Imbibición de semillas con AMO 1618 .....                   | 13   |
| RESULTADOS .....  | 14   |
| DISCUSION .....   | 32   |
| LISTA REFERENCIAS .....                                     | 38   |

LISTA DE TABLAS

|   | Pág. |
|---|------|
| tabla I:<br>Actividad amilolítica de extractos crudos<br>de enzima, provenientes de embriones con 0,<br>39 y 60 hrs. de imbibición, sometidos a<br>70°C y 25°C previa incubación .....      | 19   |
| tabla II:<br>Actividad amilolítica de extractos crudos de<br>enzima, proveniente de megagametofitos con<br>0, 39 y 60 hrs de imbibición, sometidos a<br>70°C y 25°C previa incubación ..... | 20   |
| tabla III:<br>Actividad amilolítica remanente en diferentes<br>fracciones de un homogeneizado de tejido em-<br>brionario de 0 h. de imbibición .....  | 23   |
| tabla IV:<br>Cuantificación total de las giberelinas presentes<br>en el embrión a 0, 39 y 60 hr. de imbibición .....  | 28   |
| tabla V:<br>Cuantificación de las giberelinas presentes en<br>el embrión a 0, 39 y 60 hr. de imbibición en<br>base a las zonas A, B y C .....   | 29   |
| tabla VI:<br>Efecto del AMO 1618 sobre la actividad amilolítica<br>y proteínas totales solubles de embriones con 60 hr.<br>de imbibición .....  | 31   |

LISTA DE FIGURAS

|   | Pág. |
|---|------|
| figura 1:<br>Actividad amilolítica y proteínas totales<br>solubles en el embrión y el gametofito fe-<br>menino durante las primeras 70 hrs. de im-<br>bibición .....  | 15   |
| figura 2:<br>Actividad específica y proteínas totales<br>solubles en el embrión durante las prime-<br>ras 70 hrs. de imbibición .....   | 17   |
| figura 3:<br>Identificación por cromatografía en capa<br>fina de los productos del almidón soluble<br>originados por la acción de extractos cru-<br>dos de enzima provenientes del embrión<br>y gametofito femenino .....   | 21   |
| figura 4:<br>Identificación por cromatografía en capa<br>fina de las giberelinas existentes en el<br>embrión de 0 hr. de imbibición .....   | 24   |
| figura 5:<br>Actividad de giberelinas en extractos me-<br>tanólicos purificados de embriones con 0,<br>39 y 60 hrs. de imbibición .....   | 26   |
| figura 6:<br>Actividad amilolítica y proteínas totales<br>solubles en el embrión durante las prime-<br>ras 70 hrs. de imbibición correlacionadas<br>con las variaciones cualitativas de las<br>giberelinas existentes en el embrión en<br>igual lapso de tiempo ..... | 30   |

## ABSTRACT

The main reserve of Araucaria araucana (Mol.) Koch. seed is starch and therefore, the levels of the amylase activity were quantified during the first 70 hours imbibition of the seed.

Analysis of products and thermostability of the enzyme present in the embryo and megagametophyte tissue identified the amylase as  $\alpha$ -amylase. The enzyme is already present in both, embryo and megagametophyte tissue at time 0 (before seed imbibition). Differential centrifugation of embryo homogenates shows that the  $\alpha$ -amylase is a soluble enzyme.

The levels of amylase activity in the embryo are 2.5 to 5.5 times higher than in the megagametophyte tissues over all time recorded. The amylase activity of the embryo increases significantly at 18 and 60 hours of imbibition. Contrary, the levels of total soluble proteins reach a minimum at 18 hours of imbibition and start increasing continuously over this time. The increase in soluble protein levels as well as the second increase in amylase activity over 39 hours of imbibition are correlated with an increase of some of the gibberellins present in the embryo. The amylase activity of the embryo is 63% lower than the controls when seeds are imbibed with AMO 1618 during first 60 hours.

The amylase activity and the soluble protein levels of the megagametophyte tissue remain stable during the first 70 hours of imbibition. These two characteristics of the female gametophyte tissue, suggest a low starch hydrolysis and a low general metabolic activity of these cells during this time of imbibition. As a consequence, the role of the megagametophyte tissue on embryo development is discussed.

## RESUMEN

La semilla de Araucaria araucana (Mol.) Koch contiene como principal reserva almidón, y por esta razón se cuantificaron los niveles de actividad amilolítica durante las primeras 70 hrs. de imbibición de la semilla.

Análisis de los productos y estudios de termoestabilidad revelan la existencia, tanto en el embrión como en el megagametofito, de una  $\alpha$ -amilasa, enzima que ya está presente en las células de ambos tejidos a tiempo 0 (i.e. 0 hr. imbibición). Centrifugación diferencial de homogeneizados de embriones demuestran que la  $\alpha$ -amilasa embrionaria es una enzima soluble.

Mediciones de la actividad amilolítica en el embrión y el gametofito femenino revelan que la acción de la  $\alpha$ -amilasa embrionaria es 2,5 a 5,5 veces mayor que la del megagametofito en todos los tiempos estudiados. En el embrión, la actividad aumenta significativamente a las 18 y 60 hrs. de imbibición, mientras que las proteínas solubles totales decaen hasta las 18 hrs. aumentando sostenidamente sobre ese tiempo. Cuantificaciones de las giberelinas del embrión revelan que junto al segundo aumento de actividad amilolítica hay un grupo de giberelinas notoriamente aumentadas. La actividad amilolítica del embrión es un 63% menor que la registrada en controles cuando las semillas son embebidas con AMO 1618 durante las primeras 60 hrs.

En el gametofito femenino, por el contrario, tanto la actividad como las proteínas permanecen en un nivel estable durante las primeras 70 hrs. de imbibición. Estas dos características del gametofito femenino sugieren una lenta hidrólisis del almidón de reserva, y una baja actividad metabólica general de esas células durante ese tiempo de imbibición. Como una consecuencia de ello se discute el rol del megagametofito en el crecimiento y diferenciación del embrión.



## INTRODUCCION

El material de reserva que una semilla posee debe ser desdoblado a moléculas simples para ser usado durante el proceso de diferenciación y crecimiento del embrión. Por ello la acción de enzimas digestivas que desdoblan estas reservas tiene gran importancia cuando la semilla es puesta en condiciones favorables para su germinación.

Existe una gran diferencia en el contenido de reservas nutritivas en las semillas. Así por ejemplo, en cereales y otras gramíneas, los carbohidratos, principalmente el almidón, son la principal reserva nutritiva, mientras que en leguminosas son las proteínas, y en semillas como la del maní, nuez o frijol, son los lípidos en forma de triglicéridos. En semillas de coníferas, muy poco estudiadas hasta ahora, se ha encontrado que la principal reserva son ácidos grasos, siendo es caso el contenido de almidón (2, 14). Recientes estudios realizados en el Laboratorio de Genética Fisiológica Vegetal en semillas de nuestra conífera nacional Araucaria araucana, han revelado que la principal reserva nutritiva de esta semilla es el almidón, reserva que constituye aproximadamente el 60% del peso seco de la semilla (16), lo que sugiere que la presencia y acción de las enzimas que desdoblan este polisacárido es fundamental durante el proceso de crecimiento y diferenciación del embrión, puesto que éste requerirá de glucosa como primera fuente de energía para dichos procesos. Entre estas enzimas

las más conocidas en plantas vasculares son la  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas (8). Las amilasas se han dividido en endoamilasas (dextrinogénicas) y exoamilasas (glucogénicas o maltogénicas), según el mecanismo de acción que presentan. Las endoamilasas hidrolizan al azar los enlaces  $\alpha(1-4)$ , sin atacar los enlaces  $\alpha(1-6)$  que constituyen los puntos de origen de las ramas laterales de la amilopectina y el glicógeno. Así los productos iniciales de su acción son oligosacáridos (dextrinas), los cuales son desdoblados posteriormente para originar, principalmente, maltosa. Las  $\alpha$ -amilasas son el único tipo de endoamilasa conocido hasta ahora, y debe su nombre a que los grupos reductores liberados por su acción tienen configuración óptica  $\alpha(1, 10)$ . Se las ha encontrado en el páncreas y glándulas salivales del hombre y varios animales (cerdo, perro, caballo, etc.), en la sangre y orina humana, en bacterias (Bacillus subtilis, B. coagulans, etc.), hongos (Aspergillus oryzae, A. candidus, etc.) y plantas superiores (en especial en cereales como cebada, trigo). A pesar de los diferentes orígenes se ha determinado que las  $\alpha$ -amilasas poseen muchas características comunes: son solubles en agua, presentan un peso molecular de alrededor de 50.000 daltons, contienen por lo menos 1 átomo-gramo de calcio por mol el cual es esencial para su actividad, etc. Pero se pueden diferenciar por el requerimiento de  $\text{Cl}^-$  u otro anión monovalente, o por la composición aminoacídica o la afinidad para unir calcio (10).

El otro grupo, las exoamilasas, se caracterizan porque atacan el polisacárido sólo desde el extremo terminal no reductor de la molécula, y lo hacen de una manera regular: van hidrolizando cada enlace glucosídico para producir solamente  $\alpha$ -glucosa (glucamilasas o  $\gamma$ -amilasas),

o bien, cada dos enlaces para producir maltosa acción típica de las  $\beta$ -amilasas (1, 11). Estas son llamadas así porque la maltosa originada posee configuración óptica  $\beta$ . En ambos casos la acción enzimática se detiene frente al primer enlace  $\alpha(1-6)$ , que no es atacado, obteniéndose entonces una dextrina de alto peso molecular, denominada "dextrina límite". Las  $\beta$ -amilasas se han encontrado sólo en plantas superiores, y se las ha caracterizado porque son proteínas que no requieren de cofactores para actuar y son inactivadas por iones Ag, Cu y Hg. Además son termolábiles, y estables a pH ácidos (por ej. pH 3,7) (1, 11, 3).

Diferentes aspectos de la acción de las  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas han sido estudiadas en semillas de gramíneas. Desde 1960 diversos trabajos han mostrado que la principal actividad amilolítica en semillas de cebada es debida a una  $\alpha$ -amilasa, que es sintetizada "de novo" en las células de la aleurona en respuesta a la acción de giberelinas ( $GA_1$ ,  $GA_7$ ,  $GA_4$  y especialmente  $GA_3$ ), para después ser secretada al endosperma (22, 30, 28, 29, 7, 13, 9). Sin embargo, estudios recientes hechos en cebada, arroz y otras semillas de cereales han mostrado que la actividad amilolítica de la  $\alpha$ -amilasa es primero registrada en el epitelio del escutelo, y después de 2 días de imbibición, en el endosperma. Esto sugiere que las giberelinas producidas en el embrión actuarían primero en el escutelo para después difundir a las células de la aleurona induciendo síntesis "de novo" en esas células (18, 21). La participación e importancia de la  $\beta$ -amilasa en la hidrólisis del almidón durante la germinación de estas semillas no está aún del todo clara. Desde el año 1962 sólo se había dado a conocer la presencia

de una  $\beta$ -amilasa, preformada en el endosperma, en una forma inactiva unida a proteínas en el caso de la cebada o el trigo, o a gránulos de almidón en el caso del arroz, la que al parecer se activaría por la acción de agentes enzimáticos o reductores, en una etapa posterior a la acción de  $\alpha$ -amilasa (24, 27, 19). Pero un estudio realizado en 1980, en arroz, demostró que en el escutelo existe síntesis "de novo" de  $\beta$ -amilasa en tiempos iniciales de germinación (20), lo cual abre nuevas expectativas para el rol de esta enzima durante este proceso.

A diferencia de lo que ocurre en semillas de gramíneas, la información disponible hasta la fecha sobre actividad amilolítica en semillas de coníferas es sumamente escasa, y recién en 1965 fue estudiada por Tesche la presencia de estas enzimas en algunas semillas de coníferas. Tesche señaló, en una breve comunicación, haber reconocido actividad amilolítica tanto en el embrión como en el gametofito femenino de Pinus silvestris, P. strobus, P. nigra, Abies alba, Picea abies, Lorix decidua y Pseudotsuga taxifolia. Lamentablemente este estudio ha sido incompleto pues no se ha caracterizado el tipo de amilasa presente en estas especies. Tampoco ha especificado los tiempos de imbibición en que la actividad amilolítica fué controlada. Sólo informó que en algunas semillas de Pinus embebidas por 72 hrs. se registraba un mínimo de actividad a las 24 hrs. para aumentar gradualmente después ese tiempo (26).

Posteriormente, en 1971, se descubrió la presencia de una  $\alpha$ -amilasa en el embrión y gametofito femenino de Pinus silvestris, en un estudio que comprendió las primeras 24 hrs. de germinación de la semilla, y que mostró que la actividad amilolítica en el gametofito femenino era

casi 6 veces mayor que la registrada en el embrión (17). También se estudió el efecto de  $GA_3$  sobre la actividad amilolítica del megagametofito sin encontrar acción alguna de esta hormona, aunque se debe hacer notar que el investigador usó concentraciones no fisiológicas de  $GA_3$ , del orden  $10^{-3}M$ , a diferencia de las concentraciones fisiológicas que son del orden  $10^{-5} - 10^{-7}M$ . No fue estudiado el efecto de esta hormona en el embrión.

Respecto a la semilla de Araucaria araucana la literatura no registra datos sobre actividad amilolítica a pesar del gran contenido de almidón existente en ella. Era por lo tanto de gran interés realizar un estudio que permitiera caracterizar esta actividad durante las primeras horas del desarrollo del embrión. Esto permitiría comprender procesos fisiológicos y morfológicos que estarían simultáneamente ocurriendo en la germinación de esta semilla. Este estudio podría servir, además, de base para futuras investigaciones comparativas con otras especies de Araucaria y con semillas de otras coníferas. El objetivo de esta investigación fué entonces cuantificar los cambios de la actividad amilolítica en el embrión y en el megagametofito en las primeras 70 hrs. de imbibición de la semilla y además, identificar la amilasa responsable de la degradación del almidón y la dependencia de esta enzima de la presencia de giberelinas endógenas.

## MATERIALES Y METODOS

Material utilizado y condiciones de germinación. Se usaron semillas de Araucaria araucana (Mol.) Koch cosechada en 1979 y 1980 entre los meses de marzo y abril, en la reserva forestal de Malalcahuello (Temuco). Las semillas fueron guardadas en bolsas plásticas a 5°C hasta el momento de usarlas; a esa temperatura las semillas permanecen viables por lo menos 1 año. Para su germinación se las escarificó mecánicamente con el objeto de sincronizar su proceso germinativo y se las esterilizó sumergiéndolas en hipoclorito de sodio comercial al 10% por 15 min., lavándolas luego con agua destilada. Después de este tratamiento se les puso en placas petri con vermiculita humedecida con agua destilada y se les mantuvo por un tiempo máximo de 70 hrs., a 25°C con fotoperíodo de 12 hrs.

Obtención de extractos crudos de enzima. El procedimiento empleado fue el de Nyman para semillas de Pinus silvestris (17). A intervalos de tiempos escogidos durante las primeras 70 hrs. de imbibición, tejido fresco de embriones o gametofitos femeninos provenientes de 5-10 semillas diferentes fue homogeneizado en morteros con una solución NaCl 0,06 M. En todos los casos la proporción peso fresco tejido (gr) a volumen NaCl 0,06 M (ml) fue aproximadamente 1:5. El homogeneizado se centrifugó a 27000xg por 15 min., 3°C. Debido al alto contenido de amiloplastos presentes en las células del megagametofito (16) que

podrían interferir en la determinación de la actividad enzimática, el homogeneizado proveniente de éstos se pre-centrifugó a 1000xg por 10 min., 3°C. El sobrenadante fué usado para cuantificar la actividad amilolítica y las proteínas totales solubles. Se mantuvo en hielo hasta el momento de usarlo, siendo este tiempo no mayor a 2 hrs.

Ensayo de la actividad enzimática. La actividad amilolítica se ensayó siguiendo un método colorimétrico basado en la reacción yodo-almidón que permite detectar la degradación del almidón. Para esto se incubó a 25°C por 10 min., 1,0 ml del extracto crudo de enzima (diluido 10 veces con agua destilada) con 1,0 ml de solución tampón 0,05M de acetato de sodio a pH 4,8, que contenía 0,02M de  $\text{CaCl}_2$  y 0,03% de almidón. La reacción se detuvo usando 1,0 ml de solución KI- $\text{I}_2$  (6 gr KI y 0,6 gr  $\text{I}_2$  en 100 ml de agua destilada, diluida 10 veces con HCl 0,05M). Cada tubo se llevó a 8,0 ml con agua destilada y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 585 nm. Un tubo "blanco de enzima" y uno "blanco de sustrato" se usaron como controles. La actividad se expresó como mg almidón degradado/gr peso seco/10 min. Para conocer el peso seco del material usado, tanto de embriones como de megagametofitos, se procedió a mantener a 60°C por 24-48 hrs. muestras de igual peso fresco a las homogeneizadas y provenientes de los mismos embriones y megagametofitos. En el caso de los embriones esto se realizó cortando longitudinalmente por la mitad una cantidad no inferior a 10 embriones y separando las mitades de cada embrión, dejando un grupo para obtener el extracto crudo de enzima y el otro para conocer el peso

seco. Con los megagametofitos el procedimiento fué diferente debido a su gran tamaño que facilitaba la obtención de suficiente material; en este caso cada gametofito femenino (en un número no inferior a 5) fué cortado en pequeños trozos los que se separaban en igual proporción para obtener dos muestras similares de igual peso, una de las cuales se usó para obtener el extracto crudo de enzima y la otra para determinar su peso seco.

Determinación de proteínas totales solubles. Se determinaron de acuerdo al método descrito por Schacterle y Pollack (25). Consistió en incubar a temperatura ambiente por 10 min., 1,0 ml del extracto crudo de enzima (diluído 100 veces con agua destilada) con 1,0 ml de reactivo cuproalcalino (solución NaOH 0,5N conteniendo 10% de carbonato de sodio, 0,1% de tartrato de potasio y 0,05% de sulfato cúprico), agregando después 4,0 ml de reactivo de fenol (solución comercial 2N se diluye a 1N, y ésta se diluye 1/9 con agua destilada) y dejando los tubos 5 min. a 55°C. Después de enfriar los tubos se leyó la D.O. a 650 nm. Se usó seroalbúmina de bovino como standard. Las proteínas totales se expresaron como mg proteínas/gr peso seco.

Identificación de la enzima. Para determinar si la amilasa existente en el embrión y el megagametofito era del tipo  $\alpha$  o  $\beta$  (o una mezcla de ambas) se siguieron dos procedimientos. Uno de ellos, basado en la diferencia de termoestabilidad de las enzimas, consistió en someter una alícuota del extracto crudo de enzima a 70°C por 10 min. para después determinar la actividad amilolítica en ese extracto por el método antes descrito, comparando el resultado con un control



mantenido a 25°C por igual tiempo (25°C es la temperatura óptima de estas enzimas). El otro procedimiento, basado en el diferente mecanismo de acción que presentan  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa, consistió en realizar un análisis cromatográfico de los productos originados inicialmente por la acción del extracto crudo de enzima. Este análisis se realizó en placas de Kieselguhr G (Merck, 250  $\mu$ , 20x20 cm) saturadas con tampón fosfato 0,1 M, pH 5,0, usando como solvente n-butanol - acetona - tampón fosfato pH 5,0, 40:50:10 v/v (15), aplicándose 15-20  $\mu$ l de la mezcla de reacción después de un incubación por 20 min. Se reveló con una solución saturada de nitrato de plata en acetona y con una solución de hidróxido de sodio 5 N en alcohol 95%. Una solución standard que contenía glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetrosa y maltopentosa en concentraciones de 1 mg/ml cada una se corrió simultáneamente, al igual que una solución de almidón incubada con  $\beta$ -amilasa comercial (Sigma Chemical Co.).

Determinación de la localización subcelular de la enzima. Se realizó un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial de homogeneizados de tejido (homogeneización hecha en solución isotónica, 0,9M de NaCl; proporción peso fresco tejido (gr) a volumen NaCl (ml) fué aprox. 1:5), ensayándose la actividad amilolítica (según método ya descrito) tanto en el homogeneizado inicial como en los sedimentos y sobrenadantes originados al centrifugar a 1000xg y 20000xg por 10 min. a 3°C, y a 100000xg por 60 min. a 3°C. Para ensayar la actividad en los sedimentos, éstos fueron resuspendidos en la misma solución isotónica utilizada al homogeneizar.

Extracción de giberelinas. Se siguió un método modificado de Reeve y Crozier (23). El tejido fue macerado con metanol en hielo (proporción peso fresco tejido (gr) a volumen de metanol (ml) fue 1:9) dejando reposar el macerado 24 hrs. a 5°C; después de ese tiempo, el sedimento que quedó al extraer el extracto metanólico se volvió a macerar en hielo, con 45 ml de metanol, dejando decantar nuevamente por 24 hrs. a 5°C, extrayendo el extracto metanólico y juntándolo con el anterior. Estos extractos se centrifugaron a 1000xg por 5 min. para remover los restos celulares, y el sobrenadante (extracto metanólico) fue concentrado en un evaporador rotatorio. El residuo acuoso que quedó fue, entonces, diluido con 15 ml de tampón fosfato 0,02M, pH 7,5. Este extracto a pH 7,5 fue lavado tres veces con 10 ml de n-hexano y tres veces con 10 ml de acetato de etilo. Enseguida se acidificó a pH 2,5 con HCl concentrado y se extrajeron las giberelinas libres con 10 ml de acetato de etilo, quedando las giberelinas conjugadas retenidas en la solución tampón. Esta fracción se lavó con 10 ml de acetato de etilo dos veces más, para evitar que quedasen posibles giberelinas libres en ella. La fracción ácida de acetato de etilo fue concentrada evaporando el acetato de etilo en un evaporador rotatorio, y las giberelinas redisueltas en 0,5 ml de acetato de etilo para cromatografiarlas. No se trabajó con las giberelinas conjugadas pues ensayos preliminares mostraron que su concentración era 3 veces menor que la de las giberelinas libres.

Cromatografía en capa fina de giberelinas. Para comparar los Rf's (movilidad de la muestra relativa al solvente) de las giberelinas presentes en la fracción de acetato de etilo con los de giberelinas standards se realizó una cromatografía en capa fina de sílica gel (Poligrama, 250  $\mu$ , 20x20 cm) equilibrada con acetato de etilo, utilizándose como solvente benceno - n-butanol - ácido acético, 80:15:5 v/v (15) y aplicándose 20  $\mu$ l de soluciones de GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> usadas como standards, y 20  $\mu$ l de la fracción de acetato de etilo. Se reveló con ácido sulfúrico 5% en etanol seguido de calentamiento a 80°C por 5 min.

Bioensayo de giberelinas. Placas de sílica gel desarrollada pero no reveladas (al hacerlo se pierde la actividad biológica de las giberelinas) fueron usadas para el bioensayo. Cada gel fué dividido en 11 zonas y cada zona fué eluída con 10 ml de metanol; se dejó decantar 24 hrs. a 5°C y se tomó el extracto metanólico, centrifugándolo a 1000xg por 5 min., descartando el sedimento. El sobrenadante (extracto metanólico) fué concentrado en un evaporador rotatorio. El residuo se resuspendió en 0,5 ml de acetato de etilo, diluyéndolo luego 50 veces con agua destilada. Se le dejó en hielo hasta el momento de usarlo.

El bioensayo se realizó siguiendo el método descrito por Jones y Varner en endosperma de cebada (13), el cual está basado en el hecho de que la  $\alpha$ -amilasa en esta semilla es sintetizada "de novo" por las células de la aleurona, en respuesta a giberelinas, en especial a GA<sub>3</sub>. Así el grado de actividad amilolítica detectado por la disminución de la D.O., es proporcional a la presencia de giberelinas. De acuerdo a este método, semillas de cebada fueron cortadas transversalmente por la mitad y la parte que contenía el embrión fué

descartada debido a la presencia de giberelinas endógenas en él. Las mitades restantes fueron esterilizadas sumergiéndolas en hipoclorito de sodio comercial al 1% por 20 min., lavándolas después con agua destilada. Enseguida fueron dejadas en placas petri con vermiculita humedecida con agua destilada por 48 hrs. a 25°C. Pasado este período de imbibición, cada 10 mitades fueron transferidas a pequeños matraces que contenían 2  $\mu$ moles de tampón acetato pH 4,8 20  $\mu$ moles de cloruro de calcio y la solución de giberelina a ser bioensayada en un volumen final de 2 ml. Los matraces, conteniendo sólo la solución tampón y el cloruro de calcio, fueron autoclaveados antes de agregar la solución de giberelina y de comenzar el período de incubación. La incubación de estas "medias semillas" fue desarrollada por 24 hrs. a 25°C en un baño termorregulado con agitación (40 osc/min). Pasado ese tiempo, el contenido se filtró en papel Whatman N° 4 y se lavó cada matraz con 3,0 ml de agua destilada. El lavado se agregó al filtrado inicial. La muestra, entonces, se diluyó 10 veces con agua destilada y se ensayó su actividad amilolítica haciendo reaccionar por 10 min. a 25°C, 1,0 ml de esta muestra con 1,0 ml de solución de almidón (0,15 gr almidón soluble, 0,6 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 200  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  en 100 ml de agua destilada). La reacción fue terminada agregando 1,0 ml de solución KI-I<sub>2</sub> (6 gr KI y 0,6 gr I<sub>2</sub> en 100 ml de agua destilada, diluida 100 veces con HCl 0,05N). Luego 5,0 ml de agua destilada fue agregada leyéndose la D.O. a 650 nm. Soluciones de GA<sub>3</sub> en concentraciones de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-8</sup> M se usaron como standards. Los resultados fueron expresados como moles equivalentes/lit de GA<sub>3</sub>.

Imbibición de semillas con AMO 1618. Para establecer si existía una correlación entre las giberelinas y la actividad amilolítica en el embrión, se pusieron semillas en condiciones de imbibición en una solución  $10^{-4}$  M de un inhibidor de la síntesis de giberelinas, el AMO 1618 (2-isopropil - 4' - cloruro de trimetilamonio - 5' - metilfenil piperidin carboxilato), durante las primeras 60 hr. Después de este tiempo se determinó el nivel de actividad amilolítica y de proteínas totales solubles según métodos antes descritos.



## RESULTADOS

Las variaciones de la actividad amilolítica y de los niveles de proteínas totales solubles en el embrión y en el megagametofito, en las primeras 70 hrs. de imbibición de la semilla, se muestran en la figura 1. Se puede notar que tanto la actividad amilolítica como los niveles de proteínas del megagametofito son muy inferiores a los registrados para el embrión, en todos los tiempos ensayados. La mayor diferencia se detecta a las 70 hrs., donde la actividad es 5,5 veces menor y el nivel de proteínas son  $1/4$  de las del embrión. Es posible notar, además, que la actividad enzimática y los niveles de proteínas del megagametofito prácticamente no presentan variaciones durante las 70 hrs. de imbibición, a diferencia de lo que ocurre con el embrión en igual lapso de tiempo. En el embrión la actividad amilolítica aumenta rápidamente llegando a un máximo a las 18 hrs. de imbibición, donde alcanza 1,8 veces el valor de la actividad encontrada a 0 hr. (8,94 mg almidón degradado/gr peso seco/10 min), para disminuir llegando a un mínimo a las 24-39 hrs., y nuevamente comenzar a aumentar duplicando, a las 70 hrs., el valor de actividad registrado a las 39 hrs. Las proteínas, por su parte, muestran una disminución inicial, que alcanza un mínimo a las 18 hrs. de imbibición, seguida de un aumento continuo, llegando a las 70 hrs. a un valor 1,7 veces más alto que el registrado a las 18 hrs. (100,4 mg proteínas/ gr peso seco). Este aumento de las

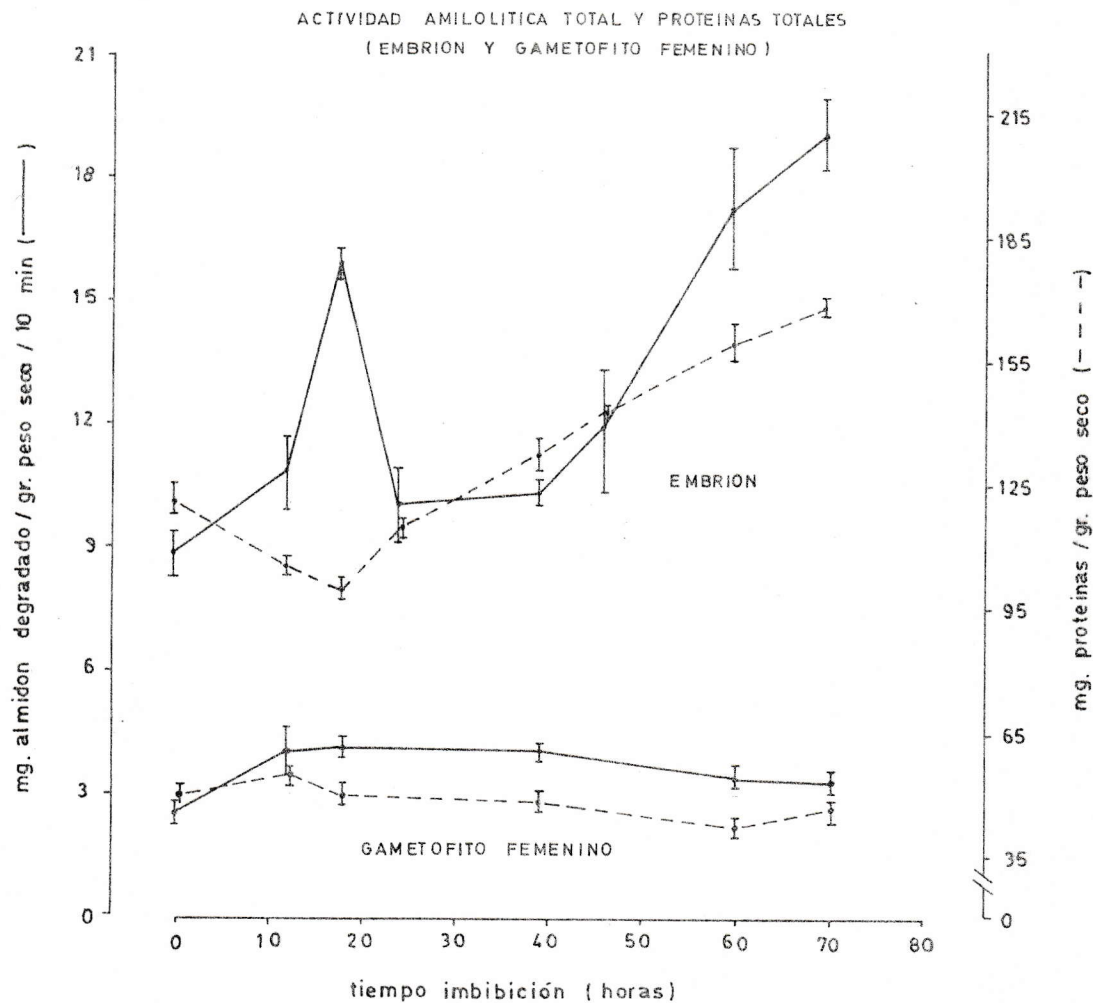


figura 1: Actividad amilolítica total y proteínas totales solubles en el embrión y el gametofito femenino durante las primeras 70 hrs. de imbibición. La actividad está expresada como mg almidón degradado/gr peso seco/10 min. y las proteínas como mg proteínas/gr peso seco. Los puntos en todas las curvas son el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  d.s.

... ..  
... ..  
... ..  
... ..  
... ..



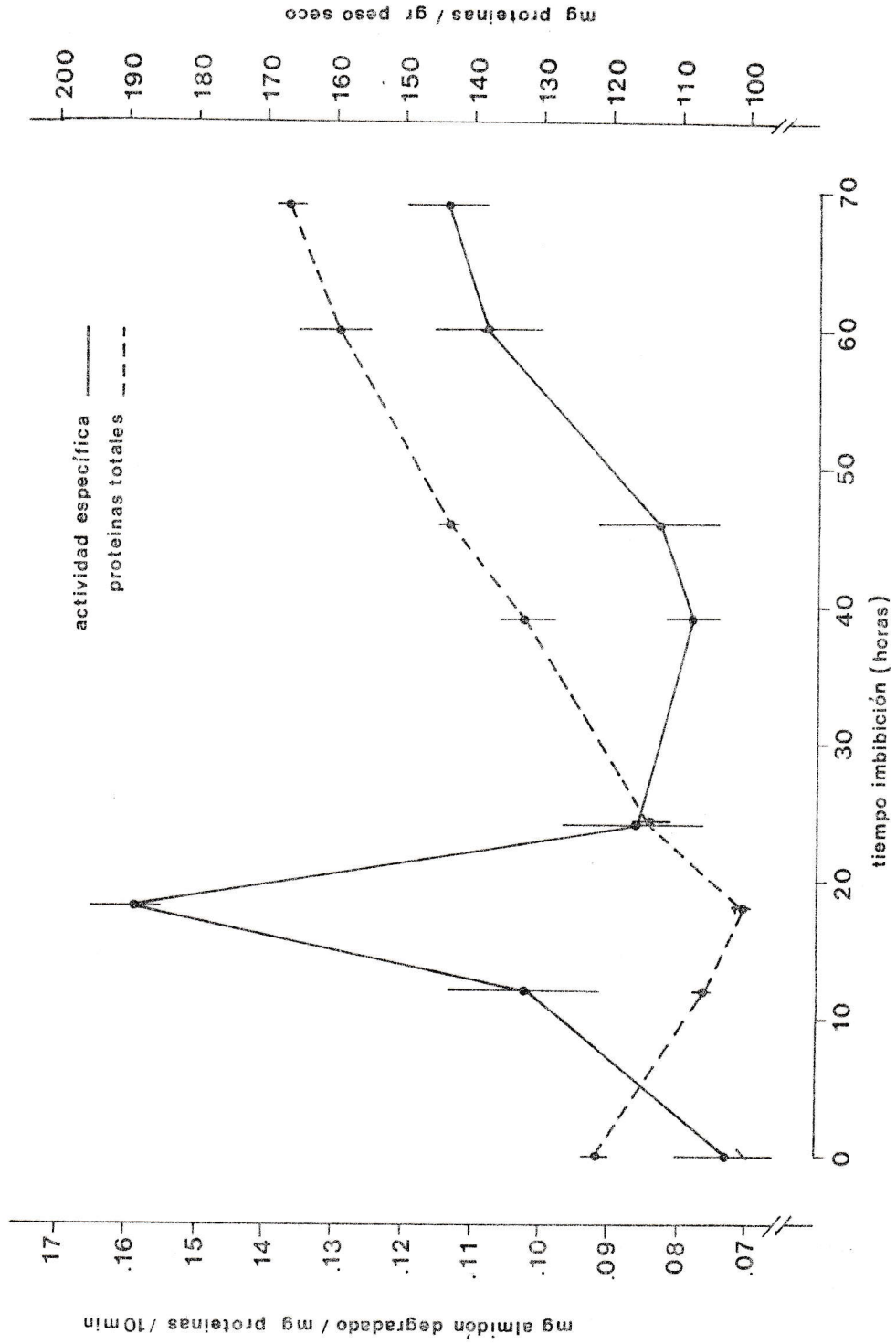


figura 2

proteínas se correlaciona con el segundo aumento de actividad enzimática, correlación que se manifiesta mejor si los datos de actividad se expresan como actividad específica (figura 2).

En las tablas I y II, y en la figura 3 se muestran los resultados de los experimentos realizados para identificar a la amilasa presente en el embrión y en el gametofito femenino. Las tablas I y II muestran que alícuotas de extractos crudos de enzima, provenientes de embriones y megagametofitos de 0, 39 y 60 hrs. de imbibición y sometidos a 70°C por 10 min., presentan igual actividad que los controles mantenidos por igual tiempo a 25°C, lo cual revela que la amilasa presente en ambos tejidos es de tipo  $\alpha$ . Esta identificación de la enzima se corroboró en ambos tejidos, mediante análisis por cromatografía en capa fina de los productos de la acción enzimática sobre almidón soluble. Como  $\alpha$ -amilasa es una endoenzima, se espera que origine después de 20 min. de incubación con el sustrato, oligosacáridos de 4-6 residuos de azúcares como productos de su acción, mientras que  $\beta$ -amilasa, exoenzima que va cortando enlaces  $\alpha$  (1-4) a partir del extremo no reductor de la molécula originará, en igual tiempo, unidades de maltosa. La figura 3 comprueba fehacientemente que la enzima en ambos tejidos es del tipo  $\alpha$ .

La  $\alpha$ -amilasa está presente en las células del gametofito femenino y del embrión antes que la semilla se ponga en contacto con agua, es decir, a tiempo 0 de imbibición (figura 1). Sin embargo, a pesar de que enzima y sustrato están presentes en la misma célula, el almidón no es hidrolizado antes de que se den las condiciones favorables para la germinación (16). De ahí que resulte interesante determinar

## ACTIVIDAD AMILOLITICA (Embrión)

mg. almidón degradado / gr. peso seco / 10 min.

|       | tiempo imbibición (horas) |                  |                  |
|-------|---------------------------|------------------|------------------|
| 0     | 39                        | 60               |                  |
| 25° C | $10,23 \pm 0,07$          | $10,10 \pm 0,08$ | $17,53 \pm 0,11$ |
| 70° C | $10,12 \pm 0,06$          | $9,94 \pm 0,08$  | $17,86 \pm 0,22$ |

tabla I: Actividad amilolítica de extractos crudos de enzimas provenientes de embriones con 0, 39 y 60 hrs. de imbibición, sometidos a 25°C y 70°C por 10 min. previo a la incubación con almidón soluble a 25°C. La actividad está expresada como mg almidón degradado/gr peso seco/10 min. Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  d.s.

## ACTIVIDAD AMILOLITICA (Gametofito femenino)

mg. almidón degradado / gr. peso seco / 10 min.

|       | tiempo imbibición (horas) |                 |
|-------|---------------------------|-----------------|
| 0     | 39                        | 60              |
| 25° C | $7,59 \pm 0,52$           | $3,77 \pm 0,66$ |
| 70° C | $7,52 \pm 0,33$           | $3,45 \pm 0,72$ |

tabla II: Actividad amilolítica de extractos crudos de enzima provenientes de gametofitos femeninos con 0, 39 y 60 hrs. de imbibición sometidos a 25°C y 70°C por 10 min. previo a la incubación con almidón soluble a 25°C. La actividad está expresada como mg almidón degradado/gr peso seco/10 min. Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  d.s.

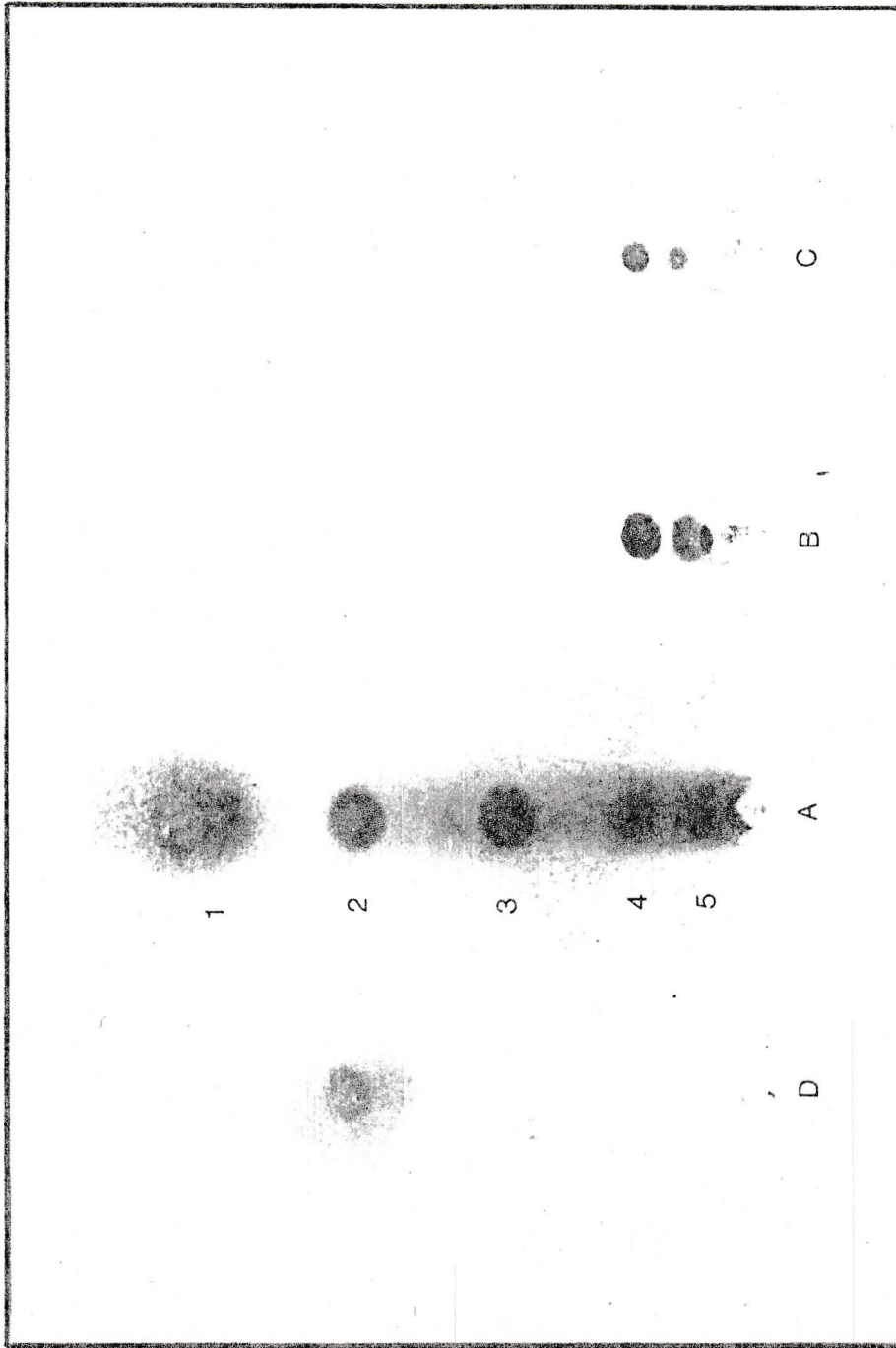


figura 3: Identificación por cromatografía en capa fina de los productos del almidón soluble originados por la acción, de extractos crudos de enzima provenientes del embrión (B) y gametofito femenino (C).  
 A: solución standard conteniendo glucosa (1), maltosa (2), maltotriosa (3), maltotetraosa (4) y maltopentosa (5).  
 D: maltosa originada por la acción de una  $\beta$ -amilasa comercial.

cual es la localización intracelular de la enzima, antes que la semilla se embeba en agua. Así, con el objeto de establecer si la  $\alpha$ -amilasa embrionaria es una enzima particulada o soluble, homogeneizados de embriones fueron sometidos a centrifugación diferencial ensayándose la actividad amilolítica en diferentes fracciones subcelulares. En la tabla III se muestra la actividad amilolítica, total y específica, registradas en el homogeneizado inicial, en los sobrenadantes y en los sedimentos de este experimento. Los datos señalan claramente que la  $\alpha$ -amilasa del embrión es una enzima soluble.

Ya que el segundo aumento de la actividad amilolítica, expresada por gramo de peso seco, y por mg de proteína, se correlaciona con un aumento notable de las proteínas totales solubles (figuras 1 y 2), se pensó que esta correlación podría implicar síntesis "de novo" de esta enzima. Considerando que en otras plantas superiores tal síntesis involucra al  $GA_3$  como intermediario (29, 13, 7, 9) se quiso detectar la presencia de giberelinas en el embrión de la semilla de A. araucana. La figura 4 muestra el cromatograma producido al aplicar un extracto metanólico purificado de embriones de 0 hr. de imbibición a una placa de sílica gel. Este cromatograma revela la presencia, entre otras, de dos manchas cuyos Rf's son similares a los Rf's de  $GA_3$  y  $GA_7$ , corridos como standards. La actividad de giberelinas de éstas y de más manchas se determinó posteriormente, dividiendo la placa cromatográfica en zonas, eluyendo y realizando un bioensayo para cada zona. Igualmente se hicieron bioensayos para extractos provenientes de embriones con 39 y 60 hrs. de imbibición. La figura 5 muestra los resultados obtenidos, junto a un cromatograma de las giberelinas

| Centrifugación             | Fracción     | ACTIVIDAD AMILOLITICA ( Embrión )                     |  |             |
|----------------------------|--------------|---|--|-------------|
|                            |              | ACTIVIDAD degradado/gr.peso mg. almidon seco /10 min. | ACTIVIDAD ESPECIFICA mg. almidon degradado / mg. proteina /10 min. (10 <sup>-2</sup> ) |             |
| Sin centrifugar            | Suspension   | 3,21 ± 0,31   | 100,00   | 1,30 ± 0,17 |
| 1000 x g<br>10 min, 3°C    | Sobrenadante | 2,88 ± 0,52   | 89,72  | 1,79 ± 0,22 |
|                            | Sedimento    | 0,17 ± 0,06   | 5,29   | 0,83 ± 0,21 |
| 20000 x g<br>10 min, 3°C   | Sobrenadante | 2,83 ± 0,03   | 88,16  | 2,03 ± 0,29 |
|                            | Sedimento    | 0,00  | 0,00   | 0,00        |
| 100 000 x g<br>60 min, 3°C | Sobrenadante | 2,68 ± 0,48   | 83,49  | 3,23 ± 0,17 |
|                            | Sedimento    | 0,00  | 0,00   | 0,00        |

tabla III: Actividad amilolítica total y específica, remanente en diferentes fracciones de un homogeneizado de tejido embrionario de 0 hr. de imbibición. La actividad total está expresada como mg almidón degradado/gr peso seco/10 min. y como porcentaje; se consideró 100% a la actividad registrada en el homogeneizado sin centrifugar. La actividad específica está expresada como mg almidón degradado/mg proteina/10 min. Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes - d.s.

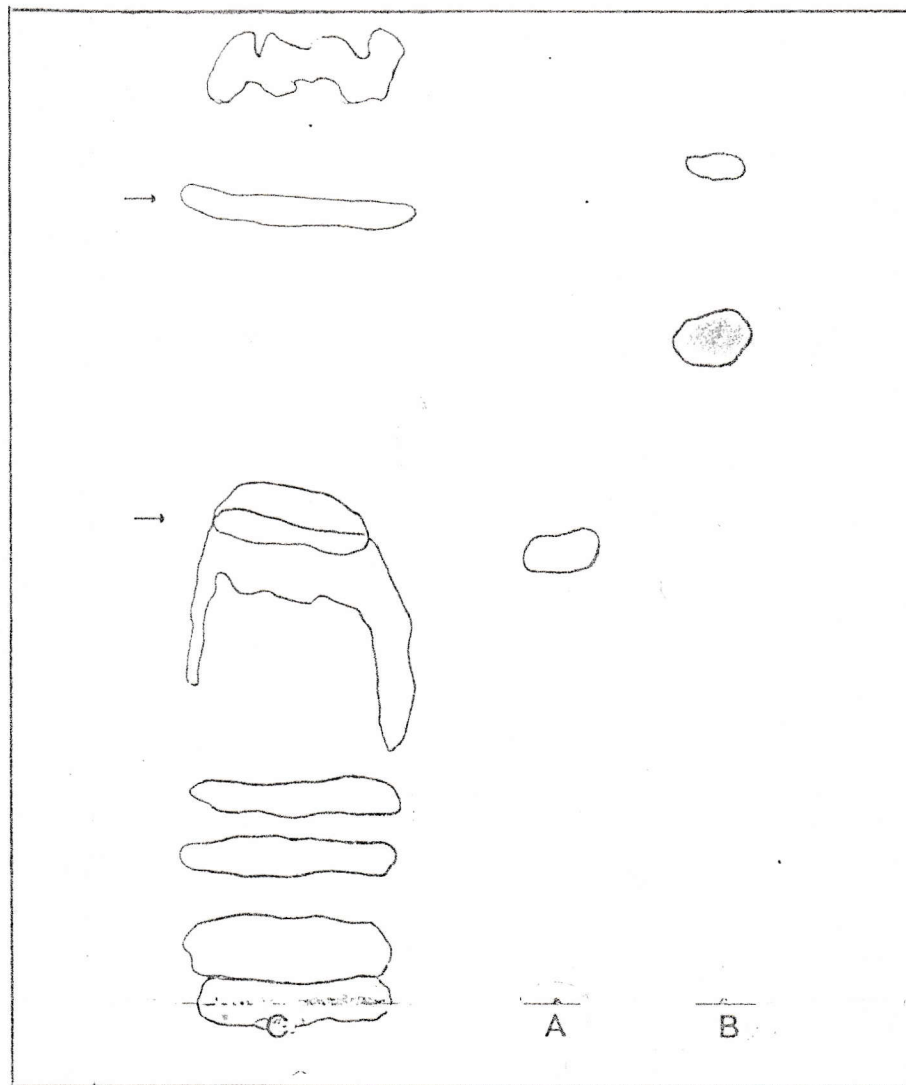


figura 4: Identificación por cromatografía en capa fina de las giberelinas existentes en el embrión de 0 hr. de imbibición.

- A: mancha correspondiente al  $GA_3$ , corrido como standard.
- B: manchas correspondientes a las giberelinas  $GA_4$  y  $GA_7$ , corridas como standards.
- C: manchas provenientes de un extracto metanólico purificado de embriones. Las flechas señalan las manchas con Rfs similares a los de  $GA_3$  y  $GA_7$ .



Figura 10. Distribución de la población en estratos morfológicos para los  
 años de 1950 y 1951. En el eje de las abscisas se muestra el número de  
 individuos en cada estrato morfológico y en el eje de las ordenadas  
 el porcentaje de la población total. La línea horizontal indica el  
 porcentaje de la población total que corresponde a cada estrato morfológico.  
 Los datos se refieren a la población total de la zona de estudio.

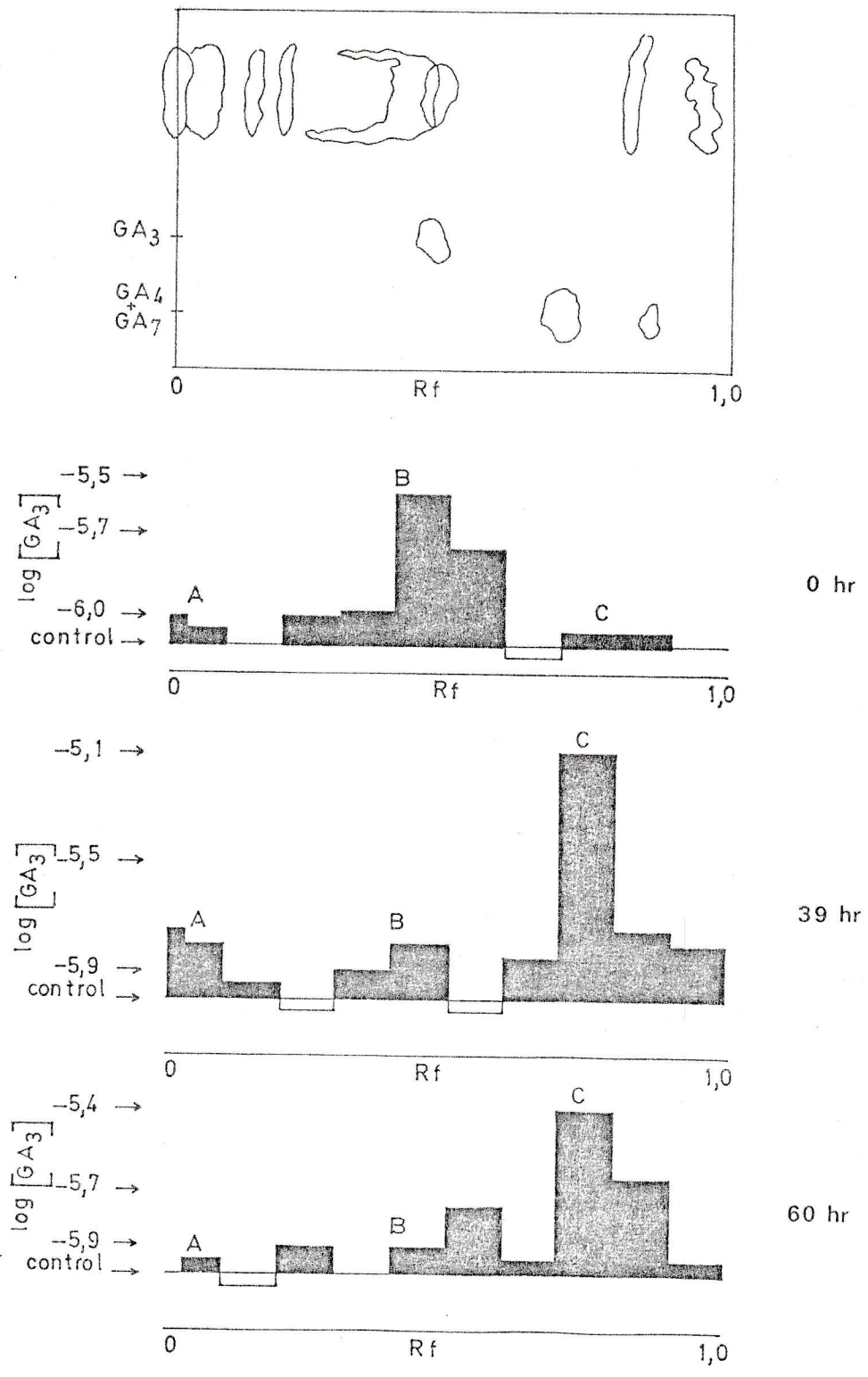


figura 5

encontradas en embriones de tiempo 0. Podemos reconocer 3 zonas con actividad de giberelinas: una con Rfs entre 0 y 0,1 (zona A), otra con Rfs entre 0,2 y 0,6 (zona B) y una tercera con Rfs entre 0,7 y 0,9 (zona C). Se puede ver que en la zona C la actividad de giberelina aumenta notoriamente sobre las 39 hrs. de imbibición, respecto a lo registrado a 0 hr., aumento que es acompañado por una disminución de las giberelinas de la zona B. La cuantificación de las giberelinas totales registradas en cada tiempo revela que éstas están, a las 39 y 60 hrs. de imbibición, en una concentración 2 y 1,3 veces mayor que la de 0 hr ( $0,90 \times 10^{-5}$  moles equiv./lt  $GA_3$ ) respectivamente (tabla IV). Al hacer la cuantificación por zona (A, B y C) se ve que estos aumentos se deben fundamentalmente a los aumentos registrados por las giberelinas de la zona C a las 39 y 60 hrs. de imbibición, que son del orden de 10 y 5,7 veces la concentración de la misma zona a las 0 hr. ( $0,12 \times 10^{-5}$  moles equiv./lt  $GA_3$ ) respectivamente (tabla V). Una correlación entre estos resultados y los obtenidos para actividad amilolítica y proteínas totales solubles se muestra en la figura 6, la que permite apreciar claramente como el segundo aumento de actividad, sobre las 39 hrs. de imbibición, es acompañado no tan sólo por un aumento de las proteínas totales solubles, sino también por cambios, principalmente de tipo cualitativo, de las giberelinas presentes en el embrión.

Embriones provenientes de semillas embebidas, durante 60 hrs. en una solución de AMO 1618 ( $10^{-4}$  M), presentan sólo un 37,3% de la actividad amilolítica y un 66,1% de las proteínas totales solubles registradas en embriones controles (tabla VI).

CUANTIFICACION TOTAL GIBERELINAS (Embrión)

moles equiv./lt. GA<sub>3</sub> (10<sup>-5</sup>)

|             | tiempo imbibición (horas) |             |
|-------------|---------------------------|-------------|
| 0           | 39                        | 60          |
| 0,90 ± 0,29 | 1,84 ± 0,59               | 1,18 ± 0,12 |

tabla IV: Cuantificación de las giberelinas presentes en el embrión con 0, 39 y 60 hrs. de imbibición. Los valores, expresados en moles equivalentes/lt GA<sub>3</sub>, corresponden al promedio de 2 bioensayos independientes. ± d.s.

CUANTIFICACION GIBERELINAS POR  
ZONA DE PLACA CROMATOGRAFICA (Embrion)

moles equiv./lt. GA<sub>3</sub> (10<sup>-5</sup>)

| zonas                          | tiempo imbibicion (horas) |             |             |
|--------------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
|                                | 0                         | 39          | 60          |
| A<br>(R <sub>ts</sub> : 0-01)  | 0,15 ± 0,05               | 0,36 ± 0,09 | 0,11 ± 0,01 |
| B<br>(R <sub>ts</sub> : 02-06) | 0,63 ± 0,29               | 0,29 ± 0,12 | 0,39 ± 0,05 |
| C<br>(R <sub>ts</sub> : 07-09) | 0,12 ± 0,03               | 1,19 ± 0,58 | 0,68 ± 0,11 |

tabla V: Cuantificación de las giberelinas presentes en el embrión con 0, 39 y 60 hrs. de imbibición, en base a las zonas A, B y C establecidas. Los valores, expresados como moles equivalentes/lt GA<sub>3</sub>, resultan del promedio de 2 bioensayos independientes ± d.s.

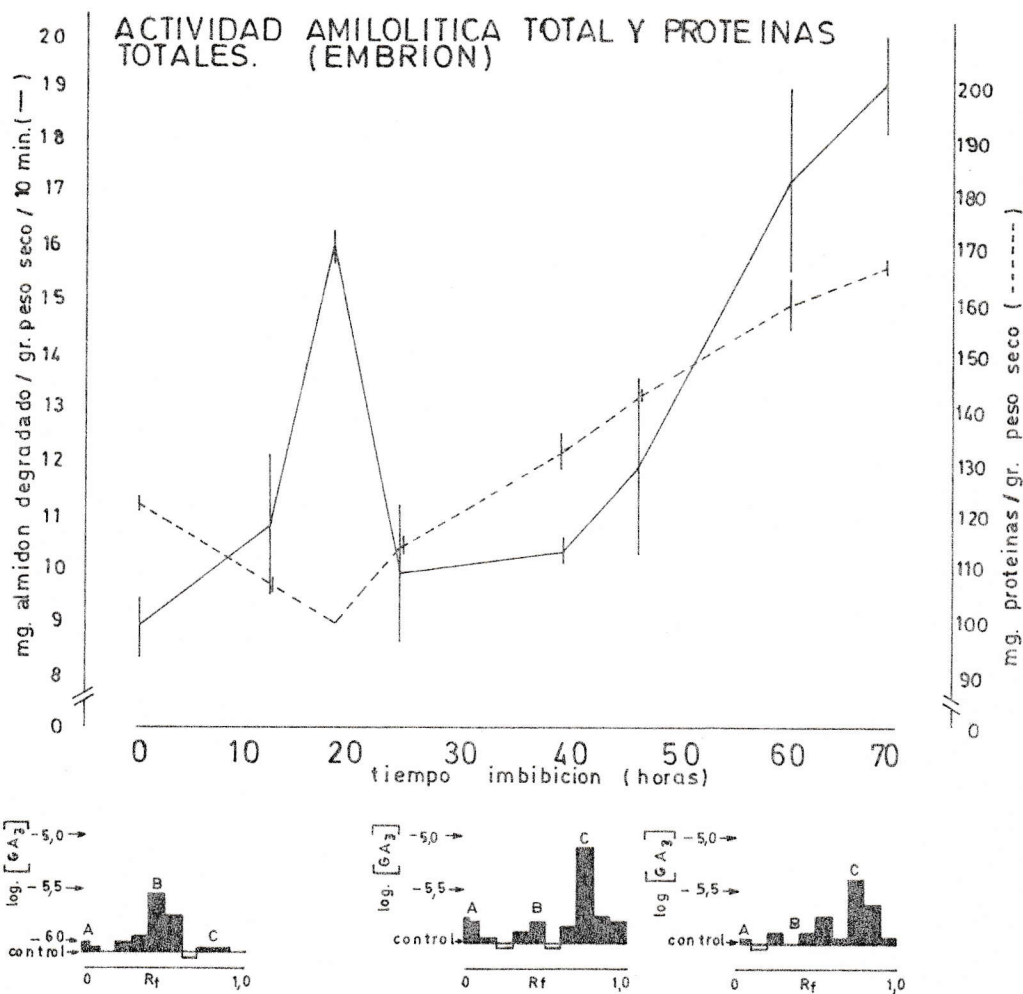


figura 6: Actividad amilolítica total y proteínas totales solubles en el embrión durante las primeras 70 hrs. de imbibición correlacionadas con las variaciones cualitativas de las giberelinas existentes en el embrión en igual lapso de tiempo. La actividad está expresada como mg almidón degradado/gr peso seco/10 min., las proteínas como mg proteínas/gr peso seco, y las giberelinas como logaritmo de la concentración de GA<sub>3</sub>.

EFFECTO DEL AMO 1618 SOBRE ACTIVIDAD AMILOLITICA  
Y PROTEINAS TOTALES SOLUBLES ( Embrion 60 hrs. imbibición)

| Tratamiento<br>Imbibición          | mg. almidón /<br>gr. peso seco/10min. % | mg. proteínas /<br>gr. peso seco % |
|------------------------------------|---|------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O dest.             | 4,23 ± 0,11 100                         | 70,50 ± 6,49 100                   |
| AMO 1618<br>( 10 <sup>-4</sup> M ) | 1,58 ± 0,06 37,3                        | 46,67 ± 3,84 66,1                  |

tabla VI: Efecto del AMO 1618 sobre la actividad amilolítica y las proteínas totales solubles en embriones con 60 hr. de imbibición. La actividad está expresada como mg almidón degradado/gr. peso seco/10 min y las proteínas como mg proteínas/gr peso seco. Los valores corresponden a dos experimentos independientes. ± d.s.

## DISCUSION

Las pocas semillas de coníferas estudiadas en relación a su contenido de reservas nutritivas han mostrado ser ricas en lípidos y pobres en carbohidratos (14, 2). Este hecho podría explicar los pocos estudios realizados sobre amilasas en este grupo de plantas. Sólo dos trabajos son conocidos hasta la fecha: uno realizado por Tesche en 1965 (26) y el otro por Nyman en 1971 (17). Ambos estudios muestran la existencia de actividad amilolítica en semillas de Pinus silvestris y Nyman, además identifica a la amilasa como del tipo  $\alpha$ , tanto en el embrión como en el gametofito femenino. Nuestros resultados demuestran que el mismo tipo de amilasa encontrado por Nyman en P. silvestris, está presente en el embrión y en el megagametofito de la semilla de Araucaria araucana, y que amilasa del tipo  $\beta$  parecen estar ausente. La posibilidad de existencia de una forma inactiva de  $\beta$ -amilasa en las células del embrión o del gametofito femenino, tal como ocurre en el endosperma de semillas de cereales, no puede ser descartada por los datos obtenidos en nuestros experimentos, pero sería muy improbable que esta enzima permaneciera inactiva durante 70 hrs. de imbibición si consideramos que la semilla germina alrededor de las 40 hrs., y que a las 70 hrs. ya ha comenzado a emerger el epicótilo.

El hecho de que el embrión sea un tejido diploide de origen materno y paterno, a diferencia del megagametofito que sólo tiene origen



materno y es haploide, hace muy posible que las  $\alpha$ -amilasas presentes en ambos tejidos sean de naturaleza química levemente diferentes y pudieran ser, por lo tanto, isoenzimas. Ya en semillas de cereales se han determinado 7 isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa (12, 4). El estudio de las formas de  $\alpha$ -amilasas presentes en el embrión y en el gametofito femenino de la semilla de A. araucana es una materia que debe ser investigada en un futuro próximo.

La actividad amilolítica del embrión es fundamental para las primeras etapas del desarrollo embrionario. Así lo demuestra el hecho de que el embrión utilice preferentemente sus propias reservas de almidón, en las primeras 70 hrs. de imbibición de la semilla (16). Y parecen confirmarlo los dos significativos aumentos de actividad registrados a las 18 y 60 hrs. de imbibición. El primer aumento, correlacionado con una disminución de las proteínas totales solubles, no parece ser provocado por una síntesis de la  $\alpha$ -amilasa sino más bien por un proceso de activación o de solubilización de la enzima. La inclinación hacia una u otra posibilidad depende de la localización intracelular de la  $\alpha$ -amilasa, que puede estar soluble en el citoplasma, compartimentalizada en la vacuola central o bien en forma particulada, ya sea almacenada en pequeñas vesículas o unida a membranas de mitocondrias, retículo endoplásmico, proteínas de reservas o amiloplastos. El ensayo de la actividad amilolítica en diferentes fracciones subcelulares demuestra que la  $\alpha$ -amilasa embrionaria es una enzima soluble, aunque los datos obtenidos no permiten discriminar respecto a si la enzima está en el citoplasma o en la vacuola central de la célula. El carácter soluble de esta enzima sugiere que el

primer aumento de actividad amilolítica se debería a una activación inicial de esta enzima. La posibilidad de una compartimentalización en la vacuola central no se opone a la idea de la activación, pues de ser este el caso se debe considerar que el contenido vacuolar es liberado totalmente durante el proceso de homogeneización del tejido para la obtención del extracto crudo de enzima. Por otra parte, parece poco probable que el aumento de actividad registrado hasta las 18 hrs. de imbibición se explique por una solubilización gradual de la enzima desde algún organoide que la contuviese, ya que el uso de una solución isotónica (respecto al tejido embrionario homogeneizado) reduce grandemente la posibilidad de que la  $\alpha$ -amilasa del embrión fuese extraída y solubilizada por alteraciones de las membranas celulares de estos organoides.

Diferente situación se presenta con el segundo aumento de actividad enzimática registrado sobre las 39 hrs. de imbibición, ya que éste, además de ser más gradual que el primero, está acompañado por un continuo aumento de las proteínas totales solubles. Esta correlación entre aumento de proteínas y de actividad permite pensar en una probable síntesis "de novo" de la enzima. Evidencias circunstanciales de esta síntesis "de novo" se obtienen al realizar experimentos tendientes a establecer una correlación entre estos aumentos y la presencia de giberelinas en el embrión, tal como ocurre en semillas de cereales donde el  $GA_3$  producido por el embrión induce la síntesis "de novo" de  $\alpha$ -amilasa y otras hidrolasas. Los experimentos desarrollados en este sentido muestran un notorio aumento, a las 39 y 60 hrs. de imbibición, de un grupo específico de giberelinas,

correlacionándose este aumento con los de actividad amilolítica y proteínas totales solubles. Esto permite postular a esas giberelinas como intermediarias en una probable síntesis "de novo" de la  $\alpha$ -amilasa embrionaria. Un fuerte apoyo a esa posible acción de estas giberelinas es la disminución de la actividad amilolítica en un 63% aprox., y de las proteínas totales solubles en un 34% aprox. registradas en embriones provenientes de semillas embebidas por 60 hrs., en una solución de un inhibidor de la síntesis de giberelinas, el AMD 161B.

Los resultados negativos obtenidos por Nyman, al estudiar si el  $GA_3$  estaría involucrado en la actividad amilolítica de los megagametofitos de P. silvestris, no contradicen nuestros resultados, porque: 1ª) Nyman usó concentraciones no fisiológicas ( $10^{-3} M$ ), y no estableció si la hormona entraba o no al tejido, y 2ª) Nyman sólo estudió el efecto del  $GA_3$  en el gametofito femenino y no en el embrión, que bien puede ser el tejido donde se sintetiza la  $\alpha$ -amilasa en respuesta a giberelinas, para después ser secretada al gametofito femenino donde ejercería su acción. Esto podría explicar la caída de la actividad amilolítica que Nyman registra en megagametofitos de P. silvestris embebidos sin embrión.

La realización de estudios más directos que confirman la probable síntesis "de novo" de la  $\alpha$ -amilasa embrionaria en la semilla de A. araucana son, sin embargo, altamente deseables. La administración de antibióticos que inhiban la síntesis proteica, la incorporación de aminoácidos radioactivos al inicio del aumento de actividad, electroforesis de  $\alpha$ -amilasa en geles de almidón o la incubación de la semilla

en  $H_2O^{18}$  (9) son métodos aconsejables para este objetivo.

La baja actividad amilolítica y el bajo nivel de las proteínas totales solubles detectados en el megagametofito durante las primeras 70 hrs. de imbibición parecen sugerir que la importancia del megagametofito como órgano almacenador de reservas no es fundamental para el desarrollo del embrión en las primeras horas de imbibición de la semilla. Esto se ve apoyado por cuantificaciones de lípidos y proteínas realizadas en nuestro laboratorio (16), y por el hecho de que embriones aislados, puestos en condiciones idénticas a las de germinación, pueden crecer y diferenciarse, aunque su crecimiento es menor que el de los controles (6). Esto último, sin embargo, sugiere cierta acción de tipo nutritivo del megagametofito.

En conclusión, se ha determinado que la amilasa presente en el embrión y en el gametofito femenino entre 0 y 70 hrs. de imbibición, es de tipo  $\alpha$ . La  $\alpha$ -amilasa embrionaria es una enzima soluble que parece estar inactiva antes de poner la semilla en contacto con agua, y que se activaría como consecuencia del ingreso de ésta a las células, originando un aumento de la actividad hasta las 18 hrs. de imbibición. La caída de la actividad entre 18 y 39 hrs. se explicaría por una degradación de las proteínas totales solubles. El aumento de actividad amilolítica sobre las 39 hrs. de imbibición se correlaciona con un aumento de las proteínas totales solubles, lo que sugiere una probable síntesis "de novo" de la enzima; esto es apoyado por un aumento de ciertas giberelinas del embrión en el mismo tiempo, y por la gran disminución de la actividad amilolítica cuando las semillas son embebidas en un inhibidor de la síntesis de giberelinas.

En el gametofito femenino, la actividad amilolítica y las proteínas totales solubles están en niveles muy bajos y prácticamente no sufren variaciones durante las 70 hrs. de imbibición, lo que sugiere una escasa participación de este tejido en el desarrollo del embrión en horas iniciales de imbibición.

Numerosos problemas quedan aún por resolver en esta semilla respecto a la actividad amilolítica y a las amilasas en sí. Estudios que aborden aspectos como la comprobación de síntesis "de novo" de la enzima en el embrión sobre las 39 hrs. de imbibición, la comparación de propiedades de las  $\alpha$ -amilasas del embrión y del gametofito femenino, la composición aminoacídica de ellas, la determinación del peso molecular, etc., contribuirían a mejorar el poco conocimiento que hoy día tenemos sobre aspectos fisiológicos y bioquímicos que se presentan en ésta y otras semillas de coníferas durante la germinación.

## LISTA DE REFERENCIAS

- 1.- Bernfeld, P. 1951. Enzymes of Starch Degradation and Synthesis. In "Advances in Enzymology". Editors F.F. Nord. Interscience Publisher Ltd. London. 12: 380-424.
- 2.- Bewley, J.D. and M. Black. 1978. Physiology and Biochemistry of Seeds. Vol. I. Springer-Verlag, Berlin pp: 7-39.
- 3.- Bilderback, D.E. 1973. A simple methods to Differentiate between  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase. Plant. Physiol. 51: 594-595.
- 4.- Bilderback, D.E. 1974. Amylases from Aleurone Layers and Starchy Endosperm of Barley Seeds. Plant. Physiol. 53: 480-484.
- 5.- Bog-Hansen, T.C. and T. Daussant. 1974. Immunochemical Quantitation on Isoenzymes.  $\alpha$ -amylase Isoenzymes in Barley Malt. Anal. Biochem. 61: 522-527.
- 6.- Cardemil, L. and A. Reinerio. 1981. Changes of Araucaria araucana (Mol.) Koch seeds reserves during early stages of germination. (in preparation).
- 7.- Chrispeels, M.J. and J.E. Varner. 1967. Gibberellic Acid Enhanced Synthesis and Release of  $\alpha$ -Amylase and Ribonuclease by Isolated Barley Aleurone Layers. Plant Physiol. 42: 398-406.
- 8.- Devlin, R. 1970. Fisiología Vegetal. Ed. Omega. Barcelona. pp: 147-174.
- 9.- Filner, Ph. and J.E. Varner. 1967. A test for "de novo" Synthesis of Enzymes: Density Labeling with  $H_2O^{18}$  of Barley  $\alpha$ -amylase Induced by Gibberellic Acid. Prod. Nat. Acad. Sci. U.S. 58: 1520-1525.
- 10.- Fisher, E. and E. Stein. 1960.  $\alpha$ -Amylases. In "The Enzymes". Editors Boyer, P., Lardy, H. and K. Myrback. Academic Press, New York, London 4: 313-343.
- 11.- French, D. 1960.  $\beta$ -Amylases. In "The Enzymes". Editors Boyer, P., Lardy, H. and K. Myrback. Academic Press, New York, London. 4: 345-368.

- 12.- Jacobsen, J.V., Scandalios, J.G. and J.E. Varner. 1970. Multiple forms of Amylase Induced by Gibberellic Acid in Isolated Barley Aleurone Layers. *Plant. Physiol.* 45: 367-371.
- 13.- Jones, R.L. and J.E. Varner. 1967. The bioassay of Gibberellins. *Planta.* 72: 155-161.
- 14.- Kozlowski, T.T. 1971. Growth and Development of Trees. Vol. I. Academic Press, New York, London. pp: 41- 3.
- 15.- Lewis, B. and F. Smith. 1969. Sugar and Derivatives. Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Editors E. Stahl. Springer-Verlag, New York Inc. pp: 807-837.
- 16.- Monsalves, J., Rivas, A. y L. Cardemil. 1978. Cambios morfológicos en las primeras 72 hrs. de germinación del "piñón" de A. araucana. XXI Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. *Arch. Biol. Med. Exper.* 12: 197. (Resumen).
- 17.- Nyman, B. 1971. Light, Seed coat and Gibberellic Acid in Relation to the Amylase Activity in Germinating Scots Pine Seeds (Pinus silvestris). *Physiol. Plant.* 25: 112-117.
- 18.- Okamoto, K. and T. Akazawa. 1979. Enzymic Mechanisms of Starch Breakdown in Germinating Rice Seeds. 7. Amylase formation in the epithelium. *Plant. Physiol.* 63: 336-340.
- 19.- Okamoto, K. and T. Akazawa. 1979. Enzymic Mechanisms of Starch Breakdown in Germinating Rice Seeds. 8. Immunohistochemical localization of  $\beta$ -amylase. *Plant. Physiol.* 64: 337-340.
- 20.- Okamoto, K. and T. Akazawa. 1980. Enzymic Mechanisms of Starch Breakdown in Germinating Rice seeds. 9. "De novo" synthesis of  $\beta$ -amylase. *Plant. Physiol.* 65: 81-84.
- 21.- Okamoto, K., Kitano, H. and T. Akazawa. 1980. Biosynthesis and Excretion of hydrolases in germinating cereal seeds. *Plant & Cell Physiol.* 21(1): 201-204.
- 22.- Paleg, L.G. 1960. Physiological effects of gibberellic acid: I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant. Physiol.* 35: 293-299.
- 23.- Reeve, D.R. and Crozier 1978. The analysis of gibberellins by high performance liquid chromatography. In "Isolation of Plant Growth Substances". Editor J.R. Hillmann. Cambridge University Press. pp: 41-77.

- 24.- Rowsell, E.V. and L.J. Goad. 1962. The constituent of wheat binding latent ( $\beta$ -amylase. *Biochem. J.* 84: 73-74.
- 25.- Schacterle, G. and R. Pollack. 1973. A Simplified Method for the Quantitative Assay of Small Amounts of Protein in Biological Material. *Anal. Biochem.* 51: 654-655.
- 26.- Tesche, M. 1965. Amylase und Stärke in einigen koniferensamen *Naturwissensch.* 52: 132-133.
- 27.- Tronier, B. and R.L. Ory. 1970. Association of bound ( $\beta$ -amylase with protein bodies in barley. *Cer. Chem.* 47: 464-471.
- 28.- Varner, J.E. and G.R. Chandra. 1964. Hormonal Control of Enzyme Synthesis in Barley Endosperm. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 52: 100-106.
- 29.- Varner, J.E., Chandra, G.R. and M.J. Chrispeels. 1965. Gibberellic acid-controlled synthesis of  $\alpha$ -amylase in barley endosperm. *J. Cell. Comp. Physiol.* 66: 55-68.
- 30.- Yomo, J. 1961. Studies on the Amylase Activating Substances. V. Purification of the Amylase Activating Substances from the Barley Green Malt. *Chem. Abst.* 55: 26145.