

**CARACTERIZACION Y REGULACION HORMONAL DE LAS ALFA-AMILASAS DE**  
**Araucaria araucana (MOL.) KOCH**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento  
parcial de los requisitos para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias



**ELBA ACEVEDO JONES**

Directora de Tesis: Dra. Liliana Cardemil Oliva

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

Informe de Aprobación

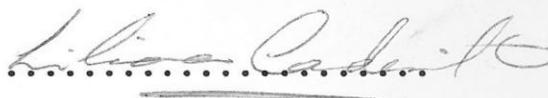
Tesis de Doctorado

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

**ELBA ACEVEDO JONES**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el 9 de octubre de 1991.

Directora de Tesis  
Dra. Liliana Cardemil O.

  
.....

Comisión Informante de Tesis

Mary Kalin Arroyo

Luis Corcuera Pérez

Miguel Jordán Zimmermann

Luis Meza- Basso

Luz María Pérez Roepke

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

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Genética Fisiológica Vegetal, del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Liliana Cardemil O. y fue financiada parcialmente por la Academia de Ciencias del Tercer Mundo (Research Grant N° BC 89-11) y la Dirección de Asistencia Técnica Internacional de CONICYT (Resolución exenta N° 131).

A Antonio por su apoyo y  
estímulo

A mis hijos por su  
comprensión y paciencia

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas.

A la Dra. Liliana Cardemil por su constante apoyo intelectual durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Luz María Pérez por su valiosa enseñanza, oportuna orientación y apoyo humano durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Luis Corcuera por su permanente apoyo, críticas, comentarios y consejos.

A los Dres. Joseph Varner, David Ho y Rafael Pont Lezica, de la Universidad de Washington, St. Louis, Missouri, por el valioso apoyo recibido durante mi estadía en sus laboratorios.

A Claudio Goycoolea, Alejandro Riquelme, Claudio Retamal y Carlos Medina por su colaboración en algunos aspectos metodológicos y de discusión.

A las autoridades de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación Superior por haberme concedido el tiempo necesario para finalizar esta tesis.

A Oriana Zamora por su constante estímulo y particularmente a Angélica Vega por su valioso apoyo técnico.

## INDICE DE MATERIAS

	página
INDICE .....	vi
LISTA DE TABLAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
ABREVIATURAS .....	xvii
RESUMEN .....	xix
ABSTRACT .....	xxiv
1. INTRODUCCION .....	1
2. MATERIALES Y METODOS .....	19
2.1 Reactivos químicos y materiales	
cromatográficos .....	19
2.2 Caracterización de la $\alpha$ -amilasa de	
semillas quiescentes .....	21
2.2.2 Purificación de la enzima $\alpha$ -amilasa	
por cromatografía de afinidad .....	24
2.2.3 Cromatografía de intercambio iónico	
en DEAE-celulosa .....	26
2.2.4 Cuantificación de proteínas .....	27

	página
2.2.5 Ensayo de la actividad enzimática .....	27
2.2.6 Estudios con inhibidores de proteasas.....	28
2.2.7 Electroforesis .....	29
2.2.8 Determinación de la masa molecular de las isoenzimas de $\alpha$ -amilasa .....	30
2.2.9 Determinación del punto isoeléctrico de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa y su relación con la masa molecular .....	32
2.2.10 Correlación entre la movilidad relativa de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa y su pI .....	33
2.2.11 Detección de carbohidratos en las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa .....	34
2.2.12 Composición aminoacídica de la $\alpha$ -amilasa .....	35
2.2.13 Análisis de la secuencia aminoacídica NH <sub>2</sub> -terminal .....	37
2.2.14 Detección inmunológica de $\alpha$ -amilasa inmovilizada en papel de nitrocelulosa (Western blotting) .....	38
2.2.14.1 Electrotransferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa .....	38

	página
2.2.14.2 Detección de proteínas electro- transferidas .....	39
2.2.15 Tratamiento con bromuro de cianógeno .....	41
2.3 Regulación de la expresión génica de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa .....	43
2.3.1 Efecto de un retardante de crecimiento sobre la actividad de la $\alpha$ -amilasa de plántulas de <u>A. araucana</u> .....	43
2.3.2 Efecto del ácido abscísico sobre la actividad de $\alpha$ -amilasa en plántulas de <u>A. araucana</u> .....	45
<b>3. RESULTADOS</b> .....	47
3.1 Caracterización de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de <u>Araucaria araucana</u> .....	47
3.1.1 Purificación de la $\alpha$ -amilasa .....	47
3.1.2 Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa .....	54
3.1.3 Extracción de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> en presencia de inhibidores de proteasas .....	59

	página	
3.1.4	Masa molecular de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa .....	61
3.1.5	Determinación del punto isoeléctrico de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa y su relación con la masa molecular .....	61
3.1.6	Correlación entre la movilidad relativa de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa en gel nativo y su pI .....	64
3.1.7	Análisis de glicosilación de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa .....	64
3.1.8	Composición de aminoácidos de la $\alpha$ -amilasa..	67
3.1.9	Secuencia de la región amino-terminal de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> .....	71
3.1.10	Análisis inmunológico .....	73
3.1.11	Ruptura de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> con bromuro de cianógeno.....	76
3.2	Regulación hormonal de la expresión génica de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de plántulas de <u>Araucaria araucana</u> .....	83
3.2.1	Efecto fisiológico del ácido giberélico sobre la actividad de $\alpha$ -amilasa de plántulas de <u>A. araucana</u> .....	83

	página
3.2.2 Efecto del ácido abscísico sobre la actividad de $\alpha$ -amilasa en plántulas de <u>A. araucana</u> .....	87
4. DISCUSION .....	90
Caracterización de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de <u>A. araucana</u> .....	90
Efecto del ácido giberélico y ácido abscísico sobre la expresión génica de la $\alpha$ -amilasa .....	109
5. BIBLIOGRAFIA .....	117

## LISTA DE TABLAS

		página
TABLA 1	Purificación de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de <u>Araucaria araucana</u> .....	49
TABLA 2	Composición de aminoácidos de tres isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>Araucaria araucana</u> .....	69
TABLA 3	Comparación de la composición amino- acídica de la $\alpha$ -amilasa de semillas de <u>A. araucana</u> con las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>Hordeum vulgare</u> .....	72
TABLA 4	Secuencia aminoacídica NH <sub>2</sub> terminal de tres isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de semillas de <u>Araucaria araucana</u> .....	74
TABLA 5	Comparación de la secuencia amino- terminal de una isoenzima de la $\alpha$ -amilasa de semillas de <u>Araucaria</u> <u>araucana</u> con otras $\alpha$ -amilasas .....	75

TABLA 6	Digestión con bromuro de cianógeno de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de semillas de <u>Araucaria araucana</u> .....	82
TABLA 7	Efecto del CCC en la actividad de $\alpha$ -amilasa y en la concentración de proteínas totales de plántulas y megagametofitos con 90 horas de tratamiento .....	85
TABLA 8	Efecto del ácido abscísico en la actividad de $\alpha$ -amilasa y en la concentración de proteínas totales de plántulas y megametofitos con 90 horas de tratamiento .....	88

## LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1 Sección longitudinal de una semilla quiescente y las etapas del desarrollo de la plántula de <u>A. araucana</u> .....	22
FIGURA 2 Perfil de elución de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de <u>A. araucana</u> desde una columna de afinidad CHA-Sefarosa .....	51
FIGURA 3 Patrón electroforético en condiciones nativas de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de <u>A. araucana</u> .....	53
FIGURA 4 Perfil de elución de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> desde una columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa .....	55
FIGURA 5 Patrón electroforético de las $\alpha$ -amilasas eluidas desde una columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa .....	56

	página
FIGURA 6 Perfil de elución de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> desde una columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa .....	57
FIGURA 7 Patrón electroforético de las fracciones centrales de cada pico con actividad de $\alpha$ -amilasa obtenido de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa....	58
FIGURA 8 Patrón electroforético en condiciones nativas de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de <u>A. araucana</u> extraídas en presencia de inhibidores de proteasas .....	60
FIGURA 9 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa obtenidas de semillas quiescentes de <u>A. araucana</u> .....	62
FIGURA 10 Patrón de isoelectroenfoque de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de <u>A. araucana</u> .....	63

FIGURA 11 Punto isoelectrico de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa y su masa molecular .....	65
FIGURA 12 Correlación entre la movilidad relativa de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> en gel nativo y su pI .....	66
FIGURA 13 Análisis de glicosilación de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> en gel de poliacrilamida-SDS .....	68
FIGURA 14 Western blot de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> .....	77
FIGURA 15 Western blot con diferentes concentraciones de isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> .....	78
FIGURA 16 Mapa peptídico de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> digeridas con bromuro de cianógeno y analizadas en gel de poliacrilamida-SDS .....	80

FIGURA 17 Mapa peptídico de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana digeridas con bromuro de cianógeno y analizadas en gel de poliacrilamida-SDS ..... 81

FIGURA 18 Patrón electroforético en condiciones nativas de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas de A. araucana tratadas durante 90 horas con CCC ..... 86

FIGURA 19 Patrón electroforético en condiciones nativas de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas de A. araucana tratadas durante 90 horas con ácido abscísico ..... 89

## ABREVIATURAS

ABA	Acido abscísico
AMO 1618	2'-Isopropil-4'-cloruro de trimetilamonio-5-metilfenil piperidin carboxilato
cDNA	Acido desoxiribonucleico complementario
CCC	cloruro de 2-cloroetil-trimetilamonio
CNBr	Bromuro de cianógeno
CHA	Ciclohepta-amilosa
DEAE celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
GA <sub>3</sub>	Acido giberélico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
hnRNA	Acido ribonucleico nuclear heterogéneo
IEF	Isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina
M.M.	Masa molecular
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
mRNA-poli A <sup>+</sup>	Acido ribonucleico mensajero poliadenilado
PAS	Reactivo ácido peryódico-Schiff
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
PVDF	Membrana de difluoruro de polivinilideno
RE	Retículo endoplásmico
Rm	Movilidad relativa

SDS	Dodecilsulfato de sodio
TLCK	N- $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometil cetona
TPCK	N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
Tris	Tris (hidroximetil)-amino metano

## RESUMEN

Las semillas de Araucaria araucana contienen almidón (61% de su peso seco) cuyo desdoblamiento y síntesis de sacarosa mantiene el crecimiento y desarrollo de la plántula hasta que ésta puede establecerse como planta autotrófica. La degradación del almidón durante este tiempo se correlaciona con la actividad amilolítica presente en el embrión y en el gametofito. Una de las enzimas que inicia la degradación del almidón en ambos tejidos es la  $\alpha$ -amilasa. La actividad de esta enzima fluctúa durante las primeras 90 hrs de imbibición de la semilla. Existen múltiples formas enzimáticas de la  $\alpha$ -amilasa con un patrón muy característico que cambia con el tiempo de germinación y desarrollo de la plántula. El objetivo de esta tesis fue probar las siguientes hipótesis:

"En la semilla de A. araucana las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa son codificadas por diferentes genes o grupos de genes estructurales. Si es así, diferencias en el análisis de su estructura primaria reflejará esas diferencias genéticas".

"La expresión de los genes que codifican para la  $\alpha$ -amilasa en semillas y plántulas de A. araucana podría ser mediada por la acción de giberelinas endógenas y por ácido abscísico. Si este es el caso, la presencia o ausencia de estas hormonas produciría cambios en el patrón isoenzimático de la  $\alpha$ -amilasa que es

característico de una etapa particular del desarrollo y podría explicar también las diferencias en niveles de actividad de la enzima entre el megagametofito (n) y la plántula (2n)".

Para probar las hipótesis se caracterizó parcialmente la estructura de las isoenzimas presentes en semillas de Araucaria araucana. Para ésto, las isoenzimas de la semilla quiescente fueron purificadas por etapas sucesivas con tratamiento a 70°C, precipitación con glicógeno y por cromatografía de afinidad, Sefarosa-ciclohepta amilosa. En geles de poliacrilamida-SDS se determinaron las masas moleculares. Estos fluctuaron entre 45,7 y 55,2 kDa. Los puntos isoeléctricos de estas isoformas fueron de: 6,0; 5,8; 5,6; 5,1; 5,0 y 4,8. Geles bidimensionales permitieron correlacionar el punto isoeléctrico con la masa molecular de algunas de las isoenzimas. Las isoformas con punto isoeléctrico de 5,8; 5,6; 5,1 y 5,0 correspondieron a aquéllas de 53,5; 50,2; 47,0 y 52,0 kDa respectivamente. Se descartó la posibilidad que las diferentes isoformas fueran producto de proteólisis de una única forma original con el uso de los inhibidores de proteasas: fluoruro de fenil metil sulfonilo o N-tosil-L- fenilalanina clorometilcetona.

Las isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa purificadas fueron fraccionadas por cromatografía de intercambio iónico DEAE celulosa. Las dos isoformas mayores fueron separadas una de otra y del resto de las formas enzimáticas con un gradiente lineal salino de 0 a 0,6 M de NaCl bajo concentraciones levemente diferente de CaCl<sub>2</sub>.

La electrotransferencia de las isoenzimas a una membrana de difluoruro de polivinilideno previamente teñida con azul de Coomassie, permitió aislar preparativamente cada una de ellas y determinar la composición aminoacídica de las isoenzimas de 53,5; 50,2 y 47,0 kDa. La composición aminoacídica reveló que estas isoenzimas fueron ricas en glicina, ácido aspártico/asparragina, alanina, serina, prolina y ácido glutámico/glutamina. La secuencia aminoacídica terminal de las isoenzimas electrotransferidas a una membrana de inmobilon, fue determinada por degradación de Edman usando un secuenciador automático. Los derivados feniltiohidantoíneos de los respectivos aminoácidos fueron identificados por HPLC en fase inversa. Los resultados revelaron que la secuencia amino terminal de las isoenzimas eran idénticas entre ellas. La comparación de la composición aminoacídica entre las isoenzimas de Araucaria araucana con las isoenzimas de alto y bajo pI de Hordeum vulgare y con las de Vigna radiata analizadas por la relación de Cornish-Bowden sugiere que no existe relación entre éstas y las de Hordeum vulgare y las de Vigna radiata. También la comparación de la secuencia amino terminal de las isoformas de A. araucana con las de Oriza sativa y Hordeum vulgare reveló que eran distintas a las  $\alpha$ -amilasas de Gramíneas. Sin embargo, los anticuerpos policlonales generados contra las  $\alpha$ -amilasas de alto y bajo pI de cebada dieron inmunoreacción cruzada con las isoenzimas de

$\alpha$ -amilasa de A. araucana existiendo aproximadamente treinta veces menor identidad de los anticuerpos por la proteína de Araucaria araucana que con las de cebada.

Los mapas peptídicos para cada una de las isoformas de  $\alpha$ -amilasa de A. araucana separadas en gel de poliacrilamida-SDS se realizó por tratamiento de la proteína con bromuro de cianógeno. Los patrones peptídicos obtenidos mostraron que había diferencias y similitudes genéticas entre ellas. El análisis de glicosilación de las formas de  $\alpha$ -amilasa de A. araucana realizado por tinción fluorescente con ácido peryódico-dansilhidrazina, reveló que estas isoenzimas podrían ser glicoproteínas.

Semillas embebidas durante 90 hrs con  $\beta$ -cloroetil trimetilamonio (CCC), inhibidor de la síntesis de giberelinas, afectó la expresión génica de tres isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de la plántula y disminuyó la expresión de las otras isoformas presentes a este tiempo. Acido giberélico ( $GA_3$ ) agregado al medio de incubación en semillas tratadas con CCC, permitió la recuperación de la actividad amilásica y la expresión de todas las formas de la enzima presente a esa edad de la plántula. En cambio, el tratamiento de las semillas con ácido abscísico (ABA) afectó a sólo una de ellas teniendo un efecto leve sobre las otras isoformas. Por consiguiente,  $GA_3$  y ABA controlan la expresión de los genes de la  $\alpha$ -amilasa o grupos de genes que dan origen a éstas isoenzimas en la plántula. La actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa del gametofito no se vio afectada por el inhibidor de la síntesis de giberelinas ni por el ácido

abscísico. Esto podría deberse a que la regulación de la expresión en el megagametofito es diferente a aquella encontrada en la plántula.

Las diferencias halladas en la composición aminoacídica, en los análisis de los mapas peptídicos, en la afinidad por el calcio y la expresión diferencial de las isoenzimas por las hormonas sugieren que estas isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas de A. araucaria son codificadas por distintos genes o grupos de genes estructurales.

## ABSTRACT

Araucaria araucana seeds contain starch (61% of dry weight) whose degradation and sucrose synthesis maintains growth and development of the seedling, until it can establish itself as an autotrophic plant. Starch degradation during this time is correlates with the amylolytic activity present in the embryo and gametophyte. One of the enzymes which starts starch degradation in both tissues is  $\alpha$ -amylase, whose activity fluctuates during the first 90 hours of seed imbibition. There are multiple enzymatic forms of  $\alpha$ -amylase in A. araucana, with a very characteristic pattern that changes with the germination and developmental stage of the seedling. The purpose of this thesis was to test the hypothesis:

"In A. araucana seeds the  $\alpha$ -amylase isoenzymes are codified by different genes or groups of structural genes. If this is so, then the differences in their primary structural analysis will reflect these genetic differences".

"The expression of the genes codifying for  $\alpha$ -amilase in A. araucana seed and seedlings could be mediated by the action of endogenous gibberellins and abscisic acid. If this is the case, the presence or absence of these hormones would produce changes in the  $\alpha$ -amylase isoenzymatic pattern, which is characteristic of a specific developmental stage, and could also explain the differences in the enzymatic activity levels between megagametophyte and seedlings".

To test the hypothesis, the structure of  $\alpha$ -amylase isoenzymes of A. araucana seeds was partially characterized. The quiescent seed isoenzymes were purified through successive steps which included: 70°C treatment, precipitation with glycogen and affinity chromatography, cyclohepta-amylose-Sepharose 6B. The determination of molecular weights was done in polyacrylamide-SDS gels. These weights fluctuate between 45.7 and 55.2 kDa. Isoelectric points of these isoforms were: 6.0, 5.8, 5.6, 5.1, 5.0 and 4.8. Bidimensional electrophoresis allowed correlation of the isoelectric points with the molecular weight of some of the isoenzymes. Isoforms at isoelectric points 5.8, 5.6, 5.1 and 5.0 corresponded to molecular weights of 53.5, 50.2, 47.0 and 52.0 kDa. The possibility that different isoforms could be the product of proteolysis of a single original form was eliminated by the use of protease inhibitors.

Purified  $\alpha$ -amylase isoenzymes were separated by DEAE cellulose ionic exchange chromatography. The two main isoforms were separated from each other and the rest of the enzymatic forms by a lineal saline gradient of 0 to 0,6 M NaCl, and slightly different CaCl<sub>2</sub> concentrations.

The electrotransference of the isoenzymes to a polyvinylidene difluoride membrane previously dyed with Coomassie Blue, enabled the isolation and the determination of the aminoacid composition of three isoenzymes of 53.5, 50.2 and 47.0 kDa. Aminoacid composition revealed that these isoenzymes were rich in glycine, aspartic acid/asparagine, alanine, serine,

proline and glutamic acid/glutamine. The terminal aminoacidic sequence of the isoenzymes electrotransferred to an immobilon membrane was determined by Edman degradation, using an automatic sequencer. The phenylthiohydantoins derivatives of the corresponding aminoacids were identified by reverse phase HPLC. Results revealed that the terminal aminoacidic sequences of the isoenzymes were identical. Comparison of the aminoacids composition between the A. araucana isoenzymes with the high and low pI barley isoenzymes, and with those of Vigna radiata analyzed via the Cornish-Bowden relation, suggested that there was no relation between these and those of Hordeum vulgare and Vigna radiata. Also the comparison of the terminal aminoacidic sequence of the A. araucana isoforms with those of the Gramineae  $\alpha$ -amylase revealed that they were different. However, polyclonal antibodies generated against the high and low pI barley  $\alpha$ -amylase gave cross immunoreaction to the A. araucana  $\alpha$ -amylase isoenzymes; there was approximately thirty times less reaction of antibodies for the A. araucana proteins than for those of barley.

Peptide maps A. araucana  $\alpha$ -amylase isoforms separated in polyacrylamide-SDS gels were obtained by treating the protein with cyanogen bromide. These peptide patterns suggest that there were genetic differences and similarities between them.

Glycosilation analysis of the A. araucana  $\alpha$ -amylase forms was effected with fluorescent protein dye with periodic acid-danzylhydrazine, revealing that these isoenzymes could be glycoproteins.

In seeds imbibed for 90 hours with  $\beta$ -chloroethyltrimethyl ammonium (CCC) which inhibits gibberellin synthesis, gene expression of three  $\alpha$ -amylase isoenzymes in the embryo was affected and the expression of the other isoforms present at the time was diminished. When gibberellic acid was added to the incubation medium of seeds treated with CCC the amylolytic activity and the expression of all forms of the enzyme present at that age of the seedling were recovered. Treatment of the seeds with abscisic acid for 90 hours affected only one of the isoforms, and had a slight effect on the others. Therefore, GA<sub>3</sub> and ABA control expression of the  $\alpha$ -amylase genes or groups of genes giving rise to these isoenzymes in the embryo. The enzymatic activity of the gametophyte  $\alpha$ -amylase was not affected by the gibberellin synthesis inhibitor, nor by abscisic acid. This could be due to the fact that the regulation of the expression in the megagametophyte is different from that found in the seedling.

Differences found in aminoacidic composition, in peptide map analyses, in affinity for calcium and the differential expression of the isoenzymes by hormones, suggest that the  $\alpha$ -amylase isoenzymes in A. araucana seeds could be codified by different genes or groups of structural genes.

## INTRODUCCION

### Alfa-amilasa y otras enzimas similares que degradan almidón

La degradación del almidón se produce durante el proceso de germinación de la semilla. Está bien establecido que la  $\alpha$ -amilasa es una de las enzimas más importantes relacionadas con la degradación del almidón presente en el endosperma de las semillas de gramíneas (Bilderback, 1974; Bog-Hansen y Daussant, 1974; Mac Gregor, 1977; Tanaka y Akazawa, 1970) y en las semillas de leguminosas, (Juliano y Varner, 1969; Spencer y col., 1980) Sin embargo, para la degradación completa del almidón a glucosa se requiere de la acción concertada o coordinada de otras enzimas glicolíticas, tales como  $\beta$ -amilasa, gama-amilasa, dextrinasa límite,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -1,4 glucano fosforilasa (Juliano y Varner, 1969; Preiss, 1982; Akazawa y Hara-Nishimura, 1985).

Las amilasas son enzimas que hidrolizan enlaces  $\alpha(1-4)$  de polisacáridos correspondientes a homopolímeros de residuos de glucosa enlazados por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $\alpha(1\rightarrow6)$ : glicógeno y almidón. Basándose en la posición del enlace que éstas hidrolizan y en la estereoquímica del producto generado durante la reacción, se distinguen varios tipos de amilasas: endoamilasas ( $\alpha$ -amilasas

E.C. 3.2.1.1) que hidrolizan enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  internos tanto de la amilosa como de la amilopectina, produciendo oligosacáridos con un grupo reductor libre con configuración óptica alfa (Bernfeld, 1951; Fischer y Stein, 1960); exoamilasas ( $\beta$ -amilasas E.C. 3.2.1.2) que se caracterizan por hidrolizar el almidón desde el extremo terminal no reductor de la molécula, dando como producto, maltosa que tiene configuración óptica beta. La degradación del almidón por  $\beta$ -amilasa se detiene en los puntos de ramificación, generando dextrinas límites de alto peso molecular, con dos o tres residuos de glucosa externos a dicho punto de ramificación (Juliano y Varner, 1969; Bernfeld, 1951). Un tercer grupo son las amiloglucosidasas, glucoamilasas o gamma-amilasas (E.C. 3.2.1.3) que hidrolizan los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $\alpha(1\rightarrow6)$ , liberando glucosa desde el extremo terminal no reductor del glucano. A diferencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa, las amiloglucosidasas son capaces de hidrolizar completamente  $\alpha$ -D-poliglucanos ramificados y no ramificados dando como producto final glucosa. Un cuarto grupo de enzimas hidrolíticas llamadas  $\alpha$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.20) hidrolizan enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  desde el extremo no reductor de dextrinas liberando glucosa. A una velocidad inferior este tipo de enzima también hidroliza los enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  generando oligoglucanos (Mac Gregor y Lenoir, 1987). Sun y Henson (1990) proponen que  $\alpha$ -glucosidasa actúa en forma sinérgica con  $\alpha$ -amilasa hidrolizando los gránulos de almidón de cebada, señalando que este sinergismo

es debido a la capacidad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de hidrolizar enlaces glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow 2)$  y  $\alpha(1\rightarrow 3)$ , además del enlace  $\alpha(1\rightarrow 4)$ . La localización de esta enzima dentro de la estructura del gránulo no ha sido determinada (Abdel-Akher y col., 1952; Wolfrom y Thompson, 1956).

Además de las amilasas y de la  $\alpha$ -glucosidasa existe otro tipo de enzima denominada dextrinasa límite (E.C. 3.2.1.10) que participa en la degradación del almidón, hidrolizando exclusivamente enlaces  $\alpha(1\rightarrow 6)$  en amilopectina y  $\alpha$ -dextrina. Finalmente, se puede mencionar la presencia de fosforilasas encontradas en la papa que actúan sobre el almidón degradándolo a partir del extremo no reductor, por fosforólisis de los enlaces  $\alpha-1,4$  del glucano liberando  $\alpha$ -D-glucosa 1-fosfato y una dextrina límite residual.

#### **Caracterización físico-química de $\alpha$ -amilasa**

Bilderback (1973) demostró que la enzima  $\alpha$ -amilasa de gramíneas es resistente a  $70^{\circ}\text{C}$ , mientras que la  $\beta$ -amilasa se desnaturaliza a esta temperatura. Otra característica de esta proteína es su labilidad a pH inferior a 4,0 (French, 1960). Sin embargo, Jacobsen y col. (1970), usando la variedad Himalaya, separaron la  $\alpha$ -amilasa en 4 bandas de actividad en gel de agarosa. Las bandas uno y dos que comprendían el 25% de la

actividad, no fueron inactivadas por pH 3,7 y no presentaron requerimiento de  $\text{Ca}^{+2}$ . Las otras dos bandas tuvieron las características clásicas de la  $\alpha$ -amilasa: inactivación a pH 3,7 y una dependencia estricta de calcio para su actividad. En el tejido embrionario de A. araucana se han detectado dos isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa con actividad a pH 3.0 (Salas y Cardemil, 1986).

Al igual que la  $\alpha$ -amilasa de animales, hongos y bacterias las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa encontradas en semillas de cereales son metaloenzimas que contienen  $\text{Ca}^{+2}$ . La actividad y estabilidad de la proteína depende de la presencia de este cofactor (Fischer y Stein, 1960). Estudios realizados por Bush y col. (1989) indican que el calcio es requerido para estabilizar la estructura de la  $\alpha$ -amilasa de cebada en el retículo endoplásmico (RE) de la capa de aleurona donde las enzimas son sintetizadas. Experimentos de intercambio isotópico con  $^{45}\text{Ca}$ , permitieron demostrar que todas las isoenzimas presentes en las semillas de cebada requieren un átomo de Ca por molécula de enzima. Sin embargo, algunas de las isoenzimas difieren en su afinidad por el ión  $\text{Ca}^{+2}$ . Todas las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa fueron inactivadas irreversiblemente cuando se las incubó en un medio con baja concentración de calcio. Esta inactivación se atribuyó a cambios en la estructura secundaria, los que fueron detectados por dicroísmo circular y en consecuencia afectó la estructura terciaria de la proteína. Este cambio de estructura terciaria en

ausencia de calcio produce un corrimiento en el espectro de fluorescencia del triptófano y una mayor susceptibilidad a la acción de proteasas (Bush y col. 1989).

Mitchell (1972) y Rodaway (1978) han informado que la  $\alpha$ -amilasa purificada de cebada (cv Himalaya) en germinación da reacción positiva al reactivo ácido peryódico-Schiff (PAS). Por consiguiente, se le ha considerado como una glicoproteína. Por cromatografía de gases, ellos informaron la presencia de residuos de N-acetil glucosamina, glucosa y manosa en concentración de 0,5 mol de cada azúcar por polipéptido de la  $\alpha$ -amilasa. Rogers (1985) ha demostrado que las isoformas de alto punto isoeléctrico tienen solamente un sitio posible de glicosilación (Asn-X-Thr/Ser) no encontrándose esta secuencia en las isoformas de bajo punto isoeléctrico.

La digestión de los gránulos de almidón, es iniciada por la biosíntesis de la  $\alpha$ -amilasa, dextrinasa límite y  $\alpha$ -glucosidasa en la capa de aleurona y/o en las células del escutelo (Akazawa y Hara-Nishimura, 1985). Durante la germinación la  $\beta$ -amilasa está presente en la forma inactiva siendo activada por la acción de enzimas proteolíticas las cuales se presume son secretadas por el escutelo y la capa de aleurona.

La hidrólisis del almidón en el endosperma genera glucosa y maltosa, los que finalmente son movilizados hacia el embrión en crecimiento en forma de sacarosa para mantener el crecimiento temprano de la plántula (Chrispeels y col. 1967).

#### **Isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa.**

Durante la germinación de semillas de cebada (*Hordeum* sp) se ha identificado dos grupos de la  $\alpha$ -amilasa, basándose en diferencias en sus puntos isoeléctricos (pI) (Jacobsen y Higgins, 1982; Callis y Ho, 1983): isoformas Amy 1 con pI aproximado de 5,0 y las isoformas Amy 2 con pI 5,0 - 6,4. Las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de alto pI o Amy 2 predominan durante las primeras 48 horas de germinación de la semilla y comienzan a declinar a las 96 horas. El grupo de bajo pI o Amy 1 incrementa a las 48 horas, de tal manera que a las 72 horas ambos grupos están presente en cantidades equimolares (Callis y Ho, 1983). Se ha observado en trigo, que las isoformas de alto pI inician la degradación del gránulo de almidón; en cambio la función de las isoenzimas de bajo pI durante la germinación es incierta, pues ellas no se adsorben ni degradan gránulos de almidón intactos; sin embargo, estas isoformas son activas sobre almidón soluble y su función

puede ser degradar carbohidratos de alto peso molecular y oligosacáridos cuando éstos son liberados del gránulo por las isoenzimas de alto pI (Sargeant, 1979).

Las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa Amy 1 y Amy 2 tienen una masa molecular de 44 kDa y son indistinguibles en sus actividades (Jacobsen y Higgins, 1982; Callis y Ho, 1983). Análisis de isoelectroenfoque (IEF) de la  $\alpha$ -amilasa de cebada muestra que hay 4 isoformas Amy 1 y 2 isoformas Amy 2 (Mac Gregor y Mac Gregor, 1987; Jacobsen y col., 1988; Simon y Jones, 1988).

Experimentos de pulso y caza con [ $^{35}\text{S}$ ] metionina usando protoplastos de células de aleurona de cebada, demuestran que las diferentes formas de isoenzimas Amy 1 se originan por modificación post-traducciona de moléculas precursoras de la  $\alpha$ -amilasa (Jacobsen y col., 1988). Aunque la naturaleza de tal modificación no se conoce, ésta involucra un cambio en la carga de la proteína sin efecto sobre su masa molecular. Aoyagi y col. (1990) confirman que oocitos de Xenopus laevis inyectados con plasmidos conteniendo el DNA complementario (cDNA) de la  $\alpha$ -amilasa Amy 1 de cebada, sintetizan y secretan isoformas de la enzima con pI de 4,85 y 4,7 permitiendo postular que la proteína con pI de 4,85, es el precursor de la forma con pI 4,7 generado por una modificación post-traducciona. Nada se conoce acerca de la modificación post-traducciona dentro del grupo de la  $\alpha$ -amilasa Amy 2.

El análisis de los mapas peptídicos de los dos grupos de isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa tratados separadamente con proteasa V8 de Staphylococcus aureus y bromuro de cianógeno (CNBr), muestra diferencias en la secuencia aminoacídica (Callis y Ho, 1983). Sin embargo, las isoformas del mismo grupo tienen patrones peptídicos muy similares.

Estudios de traducción in vitro en los que se usaron mRNA poli A<sup>+</sup> obtenidos de capas de aleurona que fueron previamente tratadas con GA<sub>3</sub> durante 24 horas, mostraron que estaban presentes tanto las isoformas de alto como las de bajo pI (Callis y Ho, 1983). Estos resultados indicaron que las diferencias entre los dos grupos de la  $\alpha$ -amilasa no son generados por modificaciones post-traduccionales. Por consiguiente, estos dos grupos de la  $\alpha$ -amilasa son codificadas por dos poblaciones diferentes mRNA de la  $\alpha$ -amilasa.

Empleando técnicas de DNA recombinante, dos grupos de investigadores (Rogers y col., 1983; Chandler y col., 1984) han obtenido dos tipos de clones de cDNA para cebada: el clon E y el clon pHV19, que corresponden a las isoenzimas de bajo y de alto pI de la  $\alpha$ -amilasa. Una comparación de las secuencias nucleotídicas de los clones de cDNA E obtenido por Rogers (Rogers y col., 1983) con pHV19 de cDNA obtenido por Chandler y col. (1984) y que provienen de los mRNA de las isoenzimas de bajo y alto pI de la  $\alpha$ -amilasa de cebada, indica que dichas secuencias

son homólogas en un 72% en la región codogénica y en un 55% en la región que codifica para el péptido señal de los polipéptidos maduros.

Muthukrishnan y col. (1984), prepararon el DNA genómico de 6 líneas de adición trigo y cebada, y localizaron las secuencias génicas de la  $\alpha$ -amilasa usando como sondas genéticas el clon 103 (alto pI) y el clon E (bajo pI). Ellos encontraron que los genes de la  $\alpha$ -amilasa estaban localizados sobre dos cromosomas diferentes, 1 y 6. Los experimentos de hibridización, mostraron que los genes de la  $\alpha$ -amilasa ubicados sobre el cromosoma 1 son homólogos con el clon E (bajo pI) mientras que los genes localizados en el cromosoma 6 presentaron una estrecha homología con el clon 103 (alto pI).

## **Regulación de la expresión génica**

### **1. Control transcripcional**

En gramíneas, la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa ha recibido especial atención porque es regulada por  $GA_3$  (Jacobsen y col., 1970; Sargeant, 1979). Se detecta poca actividad de la  $\alpha$ -amilasa en la semilla madura; sin embargo, ésta aumenta en el endosperma durante la germinación debido a la presencia de un embrión viable. El aporte de  $GA_3$  a mitades de semillas desembrionadas

reemplaza el requerimiento del embrión para la inducción de la  $\alpha$ -amilasa (Yomo y Varner 1971; Varner y Ho, 1976; Ho, 1979). Después de tres a cuatro horas de incubación de capas de aleurona con  $GA_3$  se induce la síntesis *de novo* de la  $\alpha$ -amilasa (Filner y Varner, 1967; Ho y Varner, 1978).

Este incremento en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa está bajo control transcripcional ya que  $GA_3$  aumenta el nivel del mRNA-poli A<sup>+</sup> (Ho y Varner, 1974) y el nivel de los mRNAs específicos para la  $\alpha$ -amilasa (Higgins y col., 1976; Muthukrishnan y col., 1979).

Mozer (1980), trabajando con capas de aleurona de cebada, tratadas y no tratadas con  $GA_3$ , pudo aislar el mRNA para la  $\alpha$ -amilasa y traducirlo *in vitro* usando un sistema libre de células de germen de trigo. Observó que la cantidad de la  $\alpha$ -amilasa era mayor en los tejidos tratados con  $GA_3$ , por lo tanto dedujo que la acción de esta hormona era a nivel transcripcional.

Bernal-Lugo y col. (1981) aislaron una fracción de mRNA-poli A<sup>+</sup> enriquecida en mRNA de la  $\alpha$ -amilasa de capas de aleurona de cebada por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, la cual fue usada para preparar el cDNA. Experimentos de hibridización del RNA total usando el cDNA como sonda, permitió detectar que el contenido del mRNA de la  $\alpha$ -amilasa aumentaba aproximadamente 40 veces en capas de aleurona tratadas con  $GA_3$ .

Rogers (1985) utilizando los cDNA de los clones E y pM/c, que corresponden a las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de bajo y de alto pI, respectivamente, cuantificó el nivel de mRNA de bajo y de alto pI de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa en capas de aleurona tratadas con GA<sub>3</sub> encontrando que había una cantidad relativamente alta de mRNA correspondiente a la isoenzima de bajo pI en las células de aleurona no tratadas, el cual aumentaba aproximadamente unas 20 veces cuando se trataba con bajos niveles de GA<sub>3</sub> (10<sup>-9</sup> M). Por otra parte, el nivel de mRNA correspondiente a la isoforma de alto pI era muy bajo en las células no estimuladas, pero aumentaba, aproximadamente, unas 100 veces bajo tratamiento con altas concentraciones de GA<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup> M) al cabo de las 16 horas de tratamiento. Por consiguiente, los genes de la  $\alpha$ -amilasa de cebada, organizados como dos subfamilias de genes son regulados diferencialmente sobre los dos cromosomas diferentes. Los diferentes niveles de mRNA para las familias génicas de la  $\alpha$ -amilasa y su respuesta diferencial al GA<sub>3</sub> se refleja en los niveles de las correspondientes isoenzimas (Jacobsen y Chandler, 1987).

Jacobsen y col. (1985), demostraron que en los protoplastos de las capas de aleurona de cebada de la variedad Himalaya, tratados durante 24 horas con GA<sub>3</sub> 1  $\mu$ M se incrementó el nivel de mRNA aproximadamente unas 50 veces en relación al control. La presencia de ABA 25  $\mu$ M redujo el nivel de mRNA a la mitad

respecto al control, y en el caso en que ambas hormonas estaban presentes en el medio de incubación, se observó una inhibición de la respuesta al GA<sub>3</sub>. Jacobsen y Beach (1985) determinaron el efecto de GA<sub>3</sub> + ABA sobre la transcripción de los genes de la  $\alpha$ -amilasa ensayando la actividad transcripcional in vitro usando núcleos aislados de protoplastos y la síntesis de RNA fue medida por la incorporación de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP, seguido por hibridización con el clon pHV19, el cual contiene la información genética para la  $\alpha$ -amilasa de alto pI de aleurona de cebada. Ellos encontraron que la proporción de los transcritos de RNA total y los transcritos de RNA ribosomal disminuyeron en presencia de GA<sub>3</sub>, en cambio los transcritos de la  $\alpha$ -amilasa aumentaron 5,5 veces en las células de los protoplastos tratados con GA<sub>3</sub>, comparado a los de protoplastos no tratados con la hormona. En cambio, la síntesis de mRNA para la  $\alpha$ -amilasa fue inhibida en los núcleos de los protoplastos tratados con GA<sub>3</sub> + ABA.

La presencia de mRNA estable en las semillas en germinación ofrece una ventaja, debido a que se deben generar enzimas hidrolíticas durante un cierto lapso de tiempo para movilizar el material de reserva. Jones (1969), Vigil y col. (1973), demostraron que la incubación de las capas de aleurona de cebada con GA<sub>3</sub> promovía una extensa proliferación del retículo endoplásmico.

Ho y Varner (1974) han demostrado que el inhibidor de la transcripción, cordicepina (3'-deoxiadenosina), es efectivo para inhibir la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa inducida por GA<sub>3</sub>; sin embargo, cordicepina no impide la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa cuando es agregado 12 horas después del tratamiento con la hormona. Este hecho indica que los mRNAs de la  $\alpha$ -amilasa son sintetizados durante las primeras 12 horas del tratamiento con GA<sub>3</sub> y que la tasa de recambio de estos mRNAs es muy lenta, lo que demuestra que los mRNAs son estables. La vida media de estos mRNAs se ha estimado superior a las 100 horas (Ho y col., 1987). Sin embargo, la estabilidad del mRNA se ve afectada si las capas de aleurona de cebada son sometidas a estrés térmico (Belanger y col., 1986). Ellos incubaron capas de aleurona de cebada a una temperatura de 40°C, a la cual se indujo la síntesis de las proteínas de estrés calórico y en forma paralela hubo una disminución de la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa inducida por GA<sub>3</sub>. Análisis de las secuencias de mRNAs de  $\alpha$ -amilasa por traducción in vitro e hibridización dot blot con un cDNA demostró que los mRNA de  $\alpha$ -amilasa, normalmente estables en condiciones normales de temperatura, fueron degradados en capas de aleurona tratadas con calor.

La degradación del mRNA de la  $\alpha$ -amilasa se correlacionó con una rápida destrucción del RE observado por microscopía electrónica. Debido a que el RE es el sitio de síntesis y

procesamiento de las proteínas secretoras, se sugiere que la asociación de este organelo con los mRNAs que codifican para las proteínas secretoras conferirían estabilidad a estos transcritos.

La estabilidad de los mRNAs de la  $\alpha$ -amilasa también ha sido atribuida a la presencia inusual del codón de inicio AUG dentro de una estructura secundaria muy estable en el extremo 5' del mRNA y un alto contenido GC en la región codogénica (Rogers, 1985).

## 2. Control traduccional

Al adicionar ABA a tejidos de aleuronas tratados con  $GA_3$ , se inhibió la síntesis y la secreción de la  $\alpha$ -amilasa (Chrispeels y Varner, 1966). Esta inhibición ocurría si la adición de ABA era posterior a la incubación del tejido con  $GA_3$ , lo cual indicó que el ABA no actúa al mismo nivel que  $GA_3$ . Mozer (1980) comparó el patrón de proteínas sintetizadas por capas de aleurona tratadas con  $GA_3$ , con ABA y con  $GA_3$  + ABA, durante diferentes tiempos, con las proteínas sintetizadas por un sistema de traducción in vitro de RNA-poli A<sup>+</sup>, seleccionado por columna óligo (dT) celulosa, obtenido de las capas de aleurona tratadas en forma similar. In vivo, el  $GA_3$  favoreció la síntesis específica de la  $\alpha$ -amilasa respecto a otras proteínas. El ABA no alteró drásticamente la

síntesis de las proteínas, pero indujo la síntesis de nuevas proteínas y detuvo completamente la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa. Los perfiles proteicos obtenidos del sistema de traducción in vitro usando RNA-poli A<sup>+</sup> presente en los tejidos, fueron similares en los diferentes tiempos. La síntesis de la  $\alpha$ -amilasa in vivo en tejido tratado con GA<sub>3</sub> + ABA es menor comparado con el tejido tratado con GA<sub>3</sub> en estos tiempos. El mRNA para la  $\alpha$ -amilasa está presente en tejidos tratados con las dos hormonas, pero no es traducido eficientemente in vivo; lo cual sugiere que el ABA controla la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa a nivel traduccional.

En semillas de Araucaria araucana (Mol.) Koch, Cardemil y Reiner (1982) determinaron que un 61% del peso seco de la semilla corresponde a almidón, encontrándose un 31% en el embrión y un 63% en el megagametofito.

La disminución del almidón observada en el embrión durante las primeras 90 horas de germinación de la semilla, se correlaciona con un incremento en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y de la fosforilasa (Cardemil y Varner, 1984). El contenido de almidón de la radícula desaparece antes que la del hipocótilo y de los cotiledones lo cual, presumiblemente, genera el potencial de presión necesario para el crecimiento y la protrusión de la radícula. En cambio, el contenido de almidón del megagametofito disminuye lentamente principalmente por la acción de la fosforilasa durante las primeras 90 horas de germinación

(Cardemil y Varner, 1984). El producto de la degradación de la reserva del megagametofito es transportado a la cavidad donde se hallan los cotiledones, los cuales sirven como órganos haustoriales permitiendo el crecimiento y desarrollo de la plántula (Lozada y Cardemil, 1983).

En el embrión de A. araucana, los niveles de giberelinas endógenas cambian durante las primeras 90 horas de imbibición, correlacionándose estos cambios con los niveles de la actividad  $\alpha$ -amilasa y la concentración de las proteínas totales (Reinero y col., 1983). En las semillas quiescentes y en aquellas con 18 horas de imbibición predomina una giberelina del tipo GA<sub>3</sub>. Después de la germinación y hasta las 90 horas de imbibición de la semilla la giberelina tipo GA<sub>3</sub> disminuye, llegando a predominar una giberelina con la misma movilidad cromatográfica que GA<sub>4</sub>. En las semillas embebidas con AMO 1618, un inhibidor de la síntesis de las giberelinas, la  $\alpha$ -amilasa muestra solamente un 37% de la actividad inicial. La actividad es completamente restaurada si las giberelinas endógenas del embrión son adicionadas a las semillas embebidas en AMO 1618, sugiriendo que la presencia de la  $\alpha$ -amilasa en los embriones de A. araucana depende de la presencia de giberelinas específicas (Reinero y col., 1983).

Estudios realizados con un extracto crudo y utilizando IEF muestran la presencia de cinco isoenzimas y otras bandas menores en semillas quiescentes, las cuales son idénticas en ambos tejidos: embrionario y gametofítico (Salas y Cardemil, 1986). Este patrón cambia a través del proceso de germinación de la semilla, observándose sólo dos bandas a las 18 horas y reapareciendo cuatro de las cinco isoformas originales a las 48 horas en ambos tejidos; en cambio a las 90 horas, el patrón de isoenzimas cambia notablemente, tiempo en el cual el nivel de giberelinas ha incrementado (Reinero y col., 1983).

En Gimnospermas no existen más antecedentes sobre esta enzima, ni sobre su regulación fisiológica que los mencionados anteriormente. Por ello, es interesante estudiar dicha proteína en las semillas de Araucaria araucana que tienen un embrión de origen diploide y un megagametofito de origen materno, haploide que podría ser la explicación de los niveles menores de la actividad de la enzima encontrados por Reinero y col. (1983). Sin embargo, el megagametofito es un tejido constituido por células con muchos núcleos haploides, sobre 12 y por lo mismo uno esperaría una cantidad y actividad de la enzima mayor que la presente en el embrión. Como ésto no ocurre, la regulación de la expresión génica en el embrión debe ser diferente a la del megagametofito.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

Lo anteriormente señalado lleva a formular las siguientes hipótesis:

"En la semilla de A. araucana las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa son codificadas por diferentes genes o grupos de genes estructurales. Si es así, diferencias en el análisis de su estructura primaria reflejará esas diferencias genéticas".

"La expresión de los genes que codifican para la  $\alpha$ -amilasa en semillas y plántulas de A. araucana podría ser mediada por la acción de giberelinas endógenas y por ácido abscísico. Si este es el caso, la presencia o ausencia de estas hormonas produciría cambios en el patrón isoenzimático de la  $\alpha$ -amilasa que es característico de una etapa particular del desarrollo y podría explicar también las diferencias en los niveles de la actividad de la enzima entre el megagametofito (n) y la plántula (2n).

Los objetivos planteados en esta tesis son:

1. Caracterizar parcialmente la estructura de las isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa presente en el embrión y megagametofito de semillas de Araucaria araucana.

2. Estudiar la regulación de la expresión génica de la  $\alpha$ -amilasa por giberelinas endógenas y ácido abscísico.

## MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Reactivos químicos y materiales cromatográficos

Las siguientes compañías suministraron los reactivos y materiales señalados más adelante:

- Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts: micro-concentradores.
- Merck A.G., Darmstadt, Alemania: acetato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, glucosa, ácido fosfórico, almidón soluble, yoduro de potasio, yodo, dicromato de potasio, carbonato de sodio, formaldehído, glicerol, ácido sulfúrico, 2-propanol, cloruro de magnesio, ácido bórico, citrato de sodio, sulfato de amonio, ácido clorhídrico.
- Millipore, Corporation, Bedford, USA: membrana de difluoruro de polivinilideno.
- Riedel de Haen A.G. Seelze-Hannover, Alemania: nitrato de plata.
- Schleicher and Schuell, Inc. Keene, N.H. USA: membrana de nitrocelulosa.

- Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA: glicógeno de ostra, sefarosa 6B epoxiactivada,  $\beta$ -ciclodextrina, Tris, azul de Coomassie G-250 y R-250, fluoruro de fenil metil sulfonilo, N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona, acrilamida, bis-acrilamida, ácido maleico, dodecil sulfato de sodio, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol, estándares de masa molecular para geles en SDS, anfolitos de pH 4-6 y 5-8, ácido abscísico, bromuro de cianógeno, glicina, azida de sodio, Tween-80, albúmina sérica de bovino, gelatina, azul de nitrotetrazolio, 5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato,  $\beta$ -cloro-etiltrimetil amonio, ácido giberélico, N-  $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometil cetona, dansilhidrazina, Tween-20, veronal sódico, DEAE-celulosa.

- Sudelab S.A.: metanol, etanol, ácido acético.

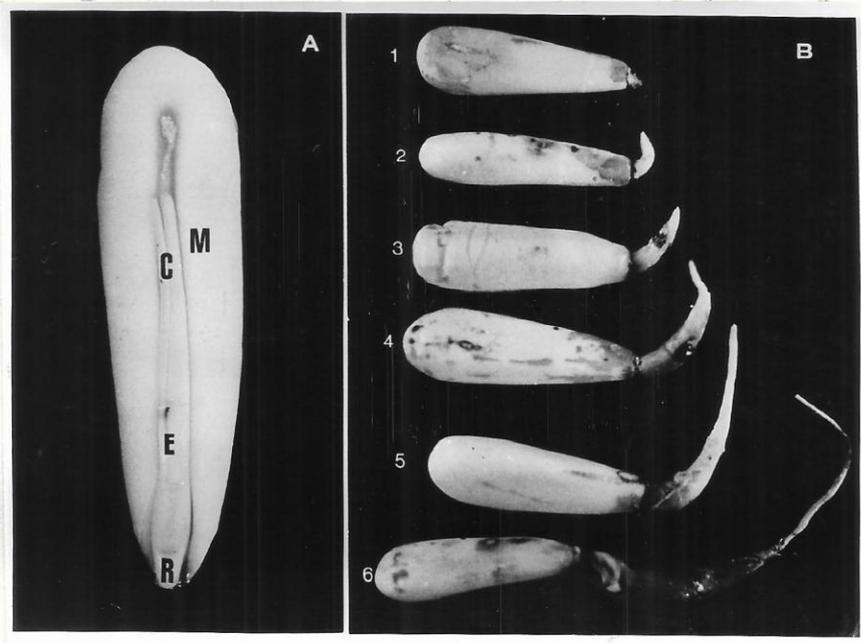
## 2.2 Caracterización de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes

### 2.2.1 Extracción de la enzima de semillas quiescentes

En esta tesis se realizaron análisis en semillas quiescentes y plántulas, por consiguiente, es preciso señalar que el término plántula corresponde al período posterior a las 40 hrs de germinación, tiempo en el cual emerge la radícula de la semilla (Bewley y Black, 1978).

Los experimentos para caracterizar la  $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes fueron realizados con el tejido embrionario y el megagametofito juntos pues, el patrón de las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa es el mismo en ambos tejidos (Salas y Cardemil, 1986). En cambio, aquellos experimentos descritos para conocer acerca de la regulación hormonal de la expresión génica de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa se realizaron con la plántula, separando ésta con sus cotiledones del megagametofito, una vez que la plántula recibió el tratamiento correspondiente (Figura 1A y 1B).

Las semillas de Araucaria araucana (Mol.) Koch fueron recolectadas en 1988, 1989, 1990 entre los meses de Marzo y Abril, en la Reserva Forestal de Malalcahuello, situada a 37° 5' latitud sur de Chile. Las semillas se guardaron en bolsas plásticas a 4°C hasta ser usadas.



**FIGURA 1.** Sección longitudinal de la semilla quiescente y las etapas de desarrollo de la plántula de *A. araucana*.

A. Sección longitudinal de una semilla quiescente: C, cotiledones; E: eje embrionario; R: radícula; M: megagametofito. B: Diferentes etapas del desarrollo de la plántula de *A. araucana*. 1: 40; 2: 90; 3: 140; 4: 180; 5: 220 y 6: 260 hrs de desarrollo de la plántula.

Las semillas fueron escarificadas mecánicamente y se esterilizaron con hipoclorito de sodio comercial al 5% por 15 minutos. Luego fueron lavadas repetidas veces con agua destilada.

La extracción de la enzima a partir de las semillas quiescentes (sin embeber) se hizo de acuerdo al método de Nyman (1971). Las semillas se homogeneizaron en amortiguador de extracción a 4°C. Este contenía acetato de sodio 0,04 M a pH 4,8, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, NaCl 0,06 M. El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm (8.000 x g rotor SS 34) en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B por 15 minutos. El sobrenadante se extrajo con una pipeta Pasteur, eliminándose la capa superior de lípidos. Este sobrenadante que contiene la mayor parte de las proteínas se calentó a baño María a 70°C por 15 minutos. Después de calentado, fue enfriado en un baño de hielo que hizo precipitar las proteínas y fue centrifugado a 8.000 rpm (5.000 x g, rotor SS 34) por 5 minutos. El sedimento que contenía las proteínas precipitadas, se descartó. Al sobrenadante se le adicionó etanol absoluto frío (0°C) hasta obtener una concentración final de etanol de 40%. El extracto etanólico fue dejado en hielo por 30 minutos. La muestra fue centrifugada una vez más a 10.000 rpm (8.000 x g, rotor SS 34) por 20 minutos y el precipitado fue descartado.

Al sobrenadante de esta última centrifugación se le adicionó una solución de glicógeno de ostra al 4% (p/v) de acuerdo al método de Schramm y Loyter (1966), con el objeto de precipitar la  $\alpha$ -amilasa. Para ésto se adicionó 50  $\mu$ l de solución de glicógeno por ml de extracto enzimático y luego se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm (8.000 x g, rotor SS 34). El precipitado glicógeno- $\alpha$ -amilasa fue resuspendido en el amortiguador de extracción, se dejó reposar durante 2 hrs a temperatura ambiente y luego fue dializado extensamente a 4°C en presencia del mismo amortiguador, realizando seis cambios de la solución amortiguadora durante 6 horas.

### **2.2.2 Purificación de la enzima $\alpha$ -amilasa por cromatografía de afinidad**

La  $\alpha$ -amilasa fue purificada por cromatografía de afinidad sobre Sefarosa 6B-epoxiactivada sustituida con ciclohepta-amilosa (CHA), de acuerdo al método de Vretblad (1974). Para la inmovilización de CHA sobre Sefarosa 6B, 8 gramos de Sefarosa-epoxiactivada fueron colocados en un vaso de precipitado con un exceso de agua destilada por 1 hora. Luego el gel fue transferido a una solución de NaOH 0,1 M y el exceso de líquido fue removido por succión. En seguida, se le adicionó 24 ml de

NaOH 0,1 M conteniendo 600 mg de CHA. En esta última solución, el gel fue mantenido por 19 hrs a 45°C en un baño con agitación. Después de la incubación, el gel fue lavado en un embudo Büchner con agua destilada por 30 minutos seguido de un lavado con una solución de glucosa (25 mg/ml de agua) por otros 30 minutos. Luego se volvió a lavar con agua destilada por 30 minutos y finalmente con amortiguador acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 por 2 horas. El gel fue vertido en una columna de vidrio de 9 x 300 mm y equilibrado con el amortiguador acetato de sodio pH 4,8.

La purificación de la  $\alpha$ -amilasa se realizó de acuerdo al método de Silvanovich y Hill (1976). Para ésto la proteína fue absorbida en la columna CHA-sefarosa, la que fue lavada con el amortiguador de extracción hasta que la absorbancia a 280 nm fue igual o inferior a 0,03. La proteína ligada a la columna CHA-Sefarosa fue eluída con el amortiguador de extracción conteniendo 8 mg/ml de CHA. El CHA fue removido por diálisis en el mismo amortiguador y la solución enzimática libre de CHA fue concentrada por centrifugación a 4.000 rpm (1.250 x g, rotor SS 34) usando un microconcentrador Centricom 10 (Amicom).

### 2.2.3 Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

Las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana, purificadas por cromatografía de afinidad, fueron fraccionadas a través de una columna de DEAE-celulosa de 1,0 x 25 cm. La columna fue equilibrada con el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Para lograr la separación de las isoenzimas se ensayaron dos amortiguadores: a) Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 en el cual se incrementó la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 5 mM a 10 mM desde la fracción número 20 a la fracción número 70 y el gradiente de NaCl de 0,0 a 0,6 M se aplicó desde la fracción número 56.

b) Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, que contenía  $\text{CaCl}_2$  10 mM. Las fracciones fueron eluidas con un gradiente lineal de 0,0 a 0,6 M de NaCl. En seguida, se cuantificó la actividad de  $\alpha$ -amilasa en cada fracción obtenida de acuerdo al método descrito en la sección 2.2.5.

El análisis de las fracciones con actividad de  $\alpha$ -amilasa se realizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida realizado bajo condiciones nativas (zimograma) de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.2.7.

#### 2.2.4 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas del extracto purificado por cromatografía de afinidad se determinó por el método de Bradford (1976). A una alícuota de 100  $\mu$ l de enzima, se le agregó 1 ml de reactivo de Bradford y se leyó su absorbancia a 595 nm. La curva de calibración de 1 a 10  $\mu$ g de proteína se realizó con una solución de albúmina sérica de bovino de 0,1 mg/ml.

#### 2.2.5 Ensayo de la actividad enzimática

La actividad amilolítica se cuantificó de acuerdo al método de Jones y Varner (1967) modificado. A una alícuota de 25  $\mu$ l de extracto enzimático, se le agregó 0,8 ml de amortiguador acetato de sodio 0,05 M, pH 4,8 que contenía  $\text{CaCl}_2$  0,02 M, NaCl 0,06 M y almidón soluble al 0,03% (p/v). Luego, se incubó en un baño termorregulado a 37°C por 20 minutos. Otra muestra fue mantenida en hielo la cual sirvió de control y fue referida como tiempo 0 de incubación. La reacción se detuvo con 1 ml de una solución de KI-I<sub>2</sub> (6 g de KI y 0,6 g de I<sub>2</sub> disuelto en 100 ml de agua destilada) al 1% (v/v). Cada tubo se llevó a un volumen final de 2,2 ml con agua destilada y su absorbancia se leyó a 585 nm. La actividad fue expresada unidades por mg de proteína ( $\text{U/mg}^{-1}$

proteína) y la unidad se define como mg de almidón degradado por minuto por ml de enzima. También fue expresada como actividad total en mg de almidón degradado por minuto por g de peso seco de tejido.

#### **2.2.6 Estudios con inhibidores de proteasas**

Con la finalidad de demostrar que la presencia de las múltiples isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa en las semillas quiescentes de A. araucana no son el resultado de una actividad protelítica, se usaron inhibidores de proteasas durante la obtención de la enzima. Para ello las semillas fueron escarificadas y esterilizadas de acuerdo al procedimiento señalado anteriormente. La homogeneización de las semillas se realizó con el amortiguador de extracción adicionado con 1 mM de PMSF o TPCK como inhibidores de proteasas. Además, se obtuvo un extracto enzimático en ausencia del inhibidor como control. La purificación de la enzima, la cuantificación de las proteínas y la cuantificación de la actividad de  $\alpha$ -amilasa se efectuó de acuerdo a los métodos descritos en la sección 2.2.2, 2.2.4 y 2.2.5, respectivamente.

Las múltiples isoformas en los extractos enzimáticos obtenidos en ausencia y presencia de los inhibidores de proteasas, fueron identificadas en un gel nativo de poliacrilamida de acuerdo al procedimiento señalado en la sección siguiente.

### 2.2.7 Electroforesis

La actividad de la  $\alpha$ -amilasa y el grado de purificación de la enzima fueron analizados en geles de poliacrilamida nativos usando un gel concentrador al 3,75% y un gel separador al 7%, a partir de una solución de acrilamida: bis-acrilamida 30:0,8. El gel se cargó con 30  $\mu$ g de la  $\alpha$ -amilasa en los carriles que se usaron para detectar las bandas de proteínas. Otros carriles se cargaron con 240 ng de la enzima para detectar las bandas por actividad de  $\alpha$ -amilasa. Después de la electroforesis, parte del gel conteniendo los carriles cargados con 30  $\mu$ g de proteínas, fue teñido con reactivo de plata de acuerdo al método de Nielsen y Brown (1984). Para ello el gel fue fijado en una solución de metanol 50% (v/v) conteniendo ácido acético al 12% (v/v) por 1 hr y lavado dos veces por al menos 30 minutos con una solución de etanol al 10% (v/v) conteniendo ácido acético al 5% (v/v). Luego, el gel fue incubado por 5 minutos en dicromato de potasio 3,4 mM

conteniendo ácido nítrico 3,2 mM y teñido con nitrato de plata 12 mM por 20 minutos. Finalmente, los geles fueron lavados con carbonato de sodio 0,28 M con 0,5 ml de formaldehído por litro y la reacción detenida con ácido acético al 3% (v/v). Las bandas reveladas para la actividad de  $\alpha$ -amilasa fueron detectadas en el gel. Este se incubó por 30 minutos en un amortiguador Tris-maleato 0,05 M, pH 5,0 conteniendo almidón al 1% como sustrato y  $\text{CaCl}_2$  (Juliano y Varner, 1969). Después de la incubación los geles se tiñeron con una solución de  $\text{KI-I}_2$  al 10% (v/v). El almidón no degradado presente en la mayor parte del gel da una coloración azul, en cambio las bandas claras que aparecen en el gel, se deben a que el almidón ha sido degradado por la enzima. Las bandas enzimáticas fueron fijadas con una solución de ácido acético al 5% (v/v) en metanol al 30% (v/v).

#### **2.2.8 Determinación de la masa molecular de las isoenzimas de $\alpha$ -amilasa**

La electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo 0.1% de dodecilsulfato de sodio (SDS) fue realizada de acuerdo al procedimiento de Laemmli (1970). La concentración de acrilamida

en el gel concentrador fue de un 3.75% y de 10% en el gel separador a partir de una solución acrilamida: bis-acrilamida descrita en sección 2.2.7.

Se cargó un canal del gel con 30  $\mu\text{g}$  de la enzima  $\alpha$ -amilasa purificada, previamente desnaturalizada en amortiguador de carga que tiene una concentración final de Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol al 0,001% (p/v) como colorante. Las proteínas fueron completamente disociadas al calentar la muestra por 90 segundos en agua hirviendo.

Las proteínas estándares de masa molecular conocida fueron preparadas al igual que la muestra y se separaron en el mismo gel, usando 2  $\mu\text{g}$  de cada proteína. Estas fueron  $\beta$ -galactosidasa (116.000 daltons), fructosa fosfato quinasa (84.000 daltons), piruvato quinasa (58.000 daltons), fumarasa (48.500 daltons), lactato deshidrogenasa (36.500 daltons), triosa fosfato isomerasa (26.600 daltons).

Las proteínas fueron visualizadas usando el método de Nielsen y Brown (1984), descrito en la sección 2.2.7.

### 2.2.9 Determinación del punto isoelectrónico de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa y su relación con la masa molecular

El isoelectroenfoque se realizó en un gel de poliacrilamida. Se preparó el gel para isoelectroenfoque de acuerdo a Pearce y col. (1972), con anfolitos de rango de pH 4-6 y 5-8. El cátodo (reservorio superior) se sumergió en una solución de NaOH 0,02 M y el ánodo (reservorio inferior) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2% (v/v). Se cargaron dos carriles del gel: uno con 410 ng de proteínas y el otro con 50  $\mu$ g de proteína. Se aplicó 300 voltios durante 2 hrs, tiempo necesario para obtener una corriente constante. La medición de pH del gel se hizo con un electrodo de superficie. Después de medido el pH del gel, se procedió a revelar las bandas para actividad enzimática en la sección del gel cargado con baja cantidad de proteína, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.2.7. La otra sección del gel, cargado con mayor cantidad de proteínas, fue teñido brevemente con una solución de azul de Coomassie [0,2% (p/v) del colorante disuelto en una mezcla de propanol, ácido acético y agua en una proporción de 25:10:65] con el propósito de revelar las bandas de proteínas y desteñido con una solución de 2-propanol:ácido acético:agua (10:10:80). Después de la tinción de esta última sección del gel, las bandas fueron cortadas y equilibradas en un amortiguador Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 y SDS al 1% (p/v). Luego, fueron calentados por 90 segundos

en un baño de agua hirviendo en amortiguador de Laemmli en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Cada banda fue colocada en un carril de un gel de poliacrilamida-SDS al 10%.

Las proteínas estándares de masa molecular conocida fueron separadas en el mismo gel usando 2  $\mu$ g de cada proteína. Los estándares fueron fosforilasa B (106.000 daltons), albúmina de suero de bovino (80.000 daltons), ovoalbúmina (49.500 daltons), anhidrasa carbónica (32.500 daltons), inhibidor de tripsina de poroto de soya (27.500 daltons) y lisozima (18.500 daltons).

Las proteínas fueron visualizadas usando el método de Nielsen y Brown (1984), descrito en la sección 2.2.7.

#### **2.2.10 Correlación entre la movilidad relativa de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa y su pI.**

Las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa fueron separadas en un gel nativo de poliacrilamida al 7% preparado de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.2.7. Después de realizada la electroforesis, se cortó una banda longitudinalmente de 1,5 cm de ancho por 6,0 cm de largo conteniendo las diferentes isoformas de la  $\alpha$ -amilasa. Esta sección del gel se rotó en un ángulo de 90° y se dispuso sobre un segundo gel para isoelectrofoque de acuerdo a Pearce y col. (1972), descrito en la sección 2.2.9.

Después de realizado el isoelectroenfoque, el gradiente de pH sobre el gel fue determinado a intervalos de 1,0 cm con un electrodo de superficie. En seguida, la actividad de  $\alpha$ -amilasa en el gel fue revelada de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.2.7.

#### **2.2.11 Detección de carbohidratos en las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa**

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS usando el sistema de amortiguador de Laemmli (1970). La concentración del gel concentrador y separador fue de un 4 y 10% respectivamente, preparado a partir de una solución de acrilamida: bis-acrilamida 30:0.8. En un canal del gel se cargó 10  $\mu$ g de la enzima purificada por cromatografía de afinidad y en otro canal se dispuso 10  $\mu$ g de lectina de papa como control. Ambas proteínas fueron mezcladas con 20  $\mu$ l de amortiguador de carga de Laemmli (1970) y calentadas en un baño hirviendo durante 90 segundos, previo a la carga en el gel.

Después de la electroforesis, el gel fue teñido de acuerdo al método de Eckhardt y col. (1976), para lo cual el gel fue fijado durante la noche en solución de metanol al 40% (v/v). Posteriormente se incubó por 2 hrs en ácido peryódico al 0,5%

(p/v) a temperatura ambiente, siendo lavado luego con ácido acético al 5% (v/v) por 30 minutos. Después de retirar completamente el exceso de ácido peryódico, los geles se mantuvieron durante 2 hrs en acetato de sodio 0,09 M, pH 5,6, conteniendo dansilhidrazina al 0,09%. Después de la incubación el exceso de marca fue removida con una solución de Tris 0,02 M, pH 7,4 conteniendo NaCl 0,5 M y Tween-20, 0,05% (v/v) .

La fluorescencia de las glicoproteínas fue cualitativamente examinada en el gel húmedo sobre un transiluminador de luz ultravioleta a 254 nm.

El gel fue fotografiado utilizando un film Kodak de 400 ASA y con filtro amarillo. Después de ser fotografiado el gel se tiñó con azul de Coomassie, para obtener las bandas de proteínas.

#### **2.2.12 Composición aminoacídica de la $\alpha$ -amilasa**

La composición aminoacídica se analizó después de realizar una purificación preparativa de cada isoenzima. Para ello las isoenzimas purificadas fueron separadas en un gel nativo de poliacrilamida al 7% utilizando Tris-borato 0,045 M, pH 8,0 como amortiguador de electroforesis. Después de la electroforesis, las isoenzimas fueron electrotransferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de acuerdo al procedimiento

de Matsudaira (1987). Para ésto, los geles fueron lavados por 5 minutos con amortiguador de transferencia (3-[ciclohexilamino]-1-ácido propanosulfónico 10 mM en metanol al 10% (v/v), pH 11,0). La membrana PVDF fue lavada con metanol al 100% y mantenida en tampón de transferencia antes de ponerla en contacto con el gel. El gel se dispuso entre la membrana PVDF y varias hojas de papel filtro y se realizó la transferencia a 6 volts por 1 hr y posteriormente a 12 volts por 4 horas.

Después de la electrotransferencia, la membrana PVDF conteniendo las proteínas fue lavada con agua desionizada por 5 minutos y teñida con azul de Coomassie R-250 al 0,5% (p/v) en metanol al 50% (v/v) por 5 minutos, para luego ser desteñida con una solución de metanol al 50% (v/v) conteniendo ácido acético al 10% (v/v). Finalmente se lavó en agua desionizada por 5-10 minutos.

Para obtener los aminoácidos, las bandas de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa visualizadas en la membrana, fueron cortadas en tiras de 4 x 9 mm. Los análisis fueron realizados por la Monsanto Corporate Research, Chesterfield, MO. Para ello cada tira se colocó en un tubo al que se hizo llegar vapores de HCl 6 N, luego fue sellado al vacío y mantenido por 24 hrs a 115°C. Los aminoácidos liberados fueron extraídos con 2 lavados de 200  $\mu$ l de una solución de metanol al 30% (v/v) conteniendo HCl 0,1 N, los cuales fueron llevados a sequedad.

Los aminoácidos extraídos fueron resuspendidos en 90  $\mu$ l de citrato de sodio 0,2 M, pH 5,4. Cincuenta  $\mu$ l de esta solución conteniendo los aminoácidos fueron inyectados en un analizador de aminoácidos Beckman 6300. El analizador separa los aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de poliestireno sulfonado. Los aminoácidos son cuantificados mediante determinación colorimétrica aplicando ninhidrina. La lectura de la absorbancia a 540 y 440 nm permitió cuantificar los  $\alpha$ -aminoácidos y la prolina, respectivamente.

#### 2.2.13 Análisis de la secuencia aminoacídica NH<sub>2</sub>-terminal

Las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa purificadas (10  $\mu$ g de cada una) fueron separadas en un gel nativo de poliacrilamida al 7% de una solución de acrilamida: bis-acrilamida 30:0,8, usando como amortiguador de electroforesis Tris-borato 0,045 M, pH 8,0. Después de la electroforesis, las isoenzimas fueron electrotransferidas a una membrana PVDF de acuerdo al método de Matsudaira (1987), tal como se describió en la sección 2.2.12.

Para obtener la secuencia aminoacídica NH<sub>2</sub>-terminal, las bandas de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa visualizadas sobre la membrana PVDF con la tinción de azul de Coomassie, fueron seccionadas en tiras de 4 x 9 mm. Los análisis fueron realizados

por la Monsanto Corporate Research, MO., de acuerdo al método de degradación de Edman, usando un secuenciador automático equipado con un analizador de feniltiohidantoíneos usando el programa Ó3RPTH. Los aminoácidos liberados, como derivados feniltiohidantoíneos, fueron identificados por análisis en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa sobre una columna C-18 Brownlee (150 x 3.9 mm). La absorción de los derivados feniltiohidantoíneos fue monitoreada a 254 nm.

#### **2.2.14 Detección inmunológica de la $\alpha$ -amilasa inmovilizada en papel de nitrocelulosa (Western blotting)**

##### **2.2.14.1 Electrotransferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa**

Las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa obtenidas de semillas quiescentes de A. araucana y purificadas por cromatografía de afinidad, fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 10% conteniendo 0,1% de SDS, usando el sistema de amortiguador discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Se cargaron 2 geles: en el primero de ellos se colocó en un carril 0,135  $\mu$ g de  $\alpha$ -amilasa de cebada como control y en el otro carril 40  $\mu$ g de  $\alpha$ -amilasa de A. araucana. El segundo gel se cargó con cantidades crecientes de

$\alpha$ -amilasa de A. araucana de 20, 25, 30 y 35  $\mu\text{g}$ . Después de efectuada la electroforesis se realizó la electrotransferencia de la proteína del gel al papel de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin y col. (1979). Para ésto, se cortaron 2 hojas de papel filtro Whatmann y una hoja de nitrocelulosa de acuerdo al tamaño exacto del gel. El papel de nitrocelulosa humedecido en agua desionizada se colocó sobre el gel y las hojas de papel filtro, embebidos en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v) a pH 8,3) cubrieron por cada lado al gel con el papel de nitrocelulosa. Luego, este sistema fue dispuesto en una grilla plástica y colocado en la cámara de electrotransferencia con el amortiguador anteriormente señalado. La hoja nitrocelulosa se ubicó hacia el ánodo de la cámara y la electroforesis se realizó a 180 mA durante 8 hrs a 10°C.

#### **2.2.14.2 Detección de proteínas electrotransferidas**

Después de la electrotransferencia todas las incubaciones del papel de nitrocelulosa se efectuaron a temperatura ambiente, de acuerdo al siguiente procedimiento:

a - Se lavó el papel de nitrocelulosa durante 10 minutos en Tris 0,1 M, azida de sodio 0,05% (p/v), Tween-80 0,04% (v/v), a pH 8,0.

b - Se sumergió por 1 hora en amortiguador de bloqueo [Tris 0,1 M, azida de sodio 0,05% (p/v), albúmina sérica de bovino 0,25% (p/v), gelatina 0,25% (p/v) y Tween-80 0,04% (v/v) a pH 8,0].

c - Se incubó el papel de nitrocelulosa con el anticuerpo de reacción cruzada generado contra  $\alpha$ -amilasa de alto y bajo pI de cebada (gentilmente cedido por el Dr. David Ho).

Para ello se usó una dilución de 1/5000 para detectar  $\alpha$ -amilasa de cebada y de 1/500 para detectar  $\alpha$ -amilasa de A. araucana.

d - Se lavó el filtro de nitrocelulosa 3 veces durante 15 minutos cada vez, con Tris 0,1 M, azida de sodio 0,05% (p/v), Tween-80 0,04% (v/v) a pH 8,0.

e - Se incubó luego con anticuerpo de cabra originado contra inmunoglobulinas (IgG) de conejo y conjugado con fosfatasa alcalina usándose una dilución de 1/20000 y 1/7500 para revelar la  $\alpha$ -amilasa de cebada y A. araucana, respectivamente.

f - Se lavó 3 veces el papel durante 10 minutos cada vez, con Tris 0,1 M, azida de sodio 0,05% (p/v), Tween-80 0,04% (v/v), SDS 0,05% (p/v) a pH 8,0.

g - Se lavó una vez más con amortiguador veronal sódico 0,15 M, acetato de sodio 0,15 M, pH 9,55.

h - La reacción de color se realizó aplicando amortiguador veronal 0,15 M, pH 9,55 que contiene  $MgCl_2$  4 mM, azul de nitrotetrazolio 0,1 mg/ml y 5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato 0,5 mg/ml.

i - Finalmente, se detuvo la reacción sumergiendo el papel de nitrocelulosa en agua desionizada y se dejó secar sobre papel filtro Whatmann.

#### 2.2.15 Tratamiento con bromuro de cianógeno

Las isoenzimas purificadas por cromatografía de afinidad de Sefarosa-CHA, fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron visualizadas por tinción con azul de Coomassie R-250 de acuerdo al método descrito en la sección 2.2.9. El gel fue cortado en tiras de 3 x 10 mm, conteniendo cada una de éstas, una isoenzima diferente. Cada tira del gel conteniendo la proteína fue liofilizada y tratada con 0,5 ml de ácido fórmico al 70% (v/v) conteniendo 50 mg de CNBr por 16 horas a 25°C de acuerdo al método de Jahnen y col. (1990). Después del tratamiento con CNBr, las bandas fueron lavadas brevemente en un amortiguador de equilibrio de Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 y SDS al 0,1% (p/v). Luego, fueron calentados a 68°C por 4 minutos en un amortiguador

de carga de Laemmli en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se hizo un control para cada isoenzima, incubando la proteína en ácido fórmico al 70% (v/v) sin CNBr, bajo las mismas condiciones que la proteína tratada. Cada banda fue colocada en un carril de un gel de 1,2 mm de grosor de poliacrilamida-SDS al 15% usando una solución de acrilamida: bis-acrilamida en proporción 37:1 de acuerdo al método de Fling y Gregerson (1986). Para la electroforesis se usó un amortiguador discontinuo de Laemmli modificado, para lo cual el gel separador se preparó con una alta concentración de Tris 0,75 M. El amortiguador de electroforesis fue Tris de 0,05 M con glicina 0,19 M y SDS 0,1%, pH 8,5. La alta concentración de Tris en el gel separador (0,75 M) y en el amortiguador de corrida (0,05 M), mejoró la resolución de péptidos y proteínas (Fling y Gregerson, 1986).

Las proteínas estándares de alta y baja masa molecular fueron separadas en el mismo gel usando 2  $\mu$ g de cada proteína. Las proteínas estándares de alta masa molecular fueron fosforilasa (94.000 daltons), albúmina (67.000 daltons), ovoalbúmina (43.000 daltons), anhidrasa carbónica (30.000 daltons), inhibidor de tripsina (20.100 daltons), mioglobina I y II (14.600 daltons). Las proteínas estándares de baja masa molecular fueron péptidos de mioglobina cuyas masas moleculares son 14.400, 10.670, 8.160 y 2.510 daltons.

Después de la electroforesis el gel fue teñido con el reactivo de plata de acuerdo al método de Nielsen y Brown (1984), descrito en la sección 2.2.7.

## **2.3 Regulación de la expresión génica de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa**

### **2.3.1 Efecto de un retardante de crecimiento sobre la actividad de la $\alpha$ -amilasa de plántulas de A. araucana**

Tres grupos de semillas fueron usados. Un grupo fue incubado en vermiculita y regadas con 20 mM de cloruro de  $\beta$ -cloroetiltrimetilamonio (CCC) durante 90 horas. Un segundo grupo que correspondió al experimento control, fue regado con agua. Un tercer grupo de semillas fue un segundo control en que las semillas fueron embebidas en presencia CCC de 20 mM y de ácido giberélico  $10^{-5}$  M.

Después de las 90 hrs de imbibición, las plántulas con sus cotiledones y los megagametofitos de los tres tratamientos se esterilizaron en hipoclorito de sodio 5% (v/v) por 15 minutos y se enjuagaron repetidas veces con agua destilada. Cada uno de los tejidos por separado fue homogeneizado en amortiguador de extracción, a 5°C, compuesto por acetato de sodio 0,05 M a pH

4,8,  $\text{CaCl}_2$  0,02 M, NaCl 0,06 M y PMSF o TPCK o TLCK 1 mM como inhibidores de proteasas. Los seis diferentes homogenizados se centrifugaron a 10.000 rpm (8.000 x g, rotor SS 34) en una centrífuga Sorvall RC-5B por 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos, los cuales contienen la totalidad de las proteínas, se calentaron a baño María a 70°C por 15 minutos. Después de calentados, fueron enfriados en un baño de hielo y se centrifugaron a 8.000 rpm (5.000 x g, rotor SS 34) por 5 minutos, descartándose el precipitado. El sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] a 0°C hasta un 20, 40, 60 y 80% de saturación. Las proteínas de los seis extractos que fueron precipitadas usando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta un 60% de saturación, fueron resuspendidos en amortiguador de extracción y dializados durante 40 hrs a 7°C con repetidos cambios del amortiguador. Los extractos dializados fueron centrifugados a 5.000 rpm (2.000 x g, rotor SS 34) durante 10 minutos para remover la proteína no disuelta. La actividad de  $\alpha$ -amilasa fue cuantificada en todos los extractos de acuerdo al método de Jones y Varner (1967), y las proteínas totales fueron cuantificadas de acuerdo al método de Bradford (1976). Para ello, a una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático, se le agregó 5 ml de reactivo de Bradford y el contenido fue agitado. La absorbancia a 595 nm fue medida después

de 2 minutos y antes de 1 hora. La curva de calibración de 10 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína se realizó con una solución de albúmina sérica de bovino de 1 mg/ml.

Los extractos enzimáticos obtenidos de las plántulas y de los megagametofitos tratados y de los controles, fueron sometidos a electroforesis en gel nativo de poliacrilamida al 7% (solución acrilamida: bis-acrilamida, 30:0,8) y la actividad amilolítica fue determinada en el gel, de acuerdo al método de Juliano y Varner (1969), descrito en la sección 2.2.7.

### **2.3.2 Efecto del ácido abscísico sobre la actividad de $\alpha$ -amilasa en plántulas de A. araucana**

Dos grupos de semillas fueron embebidos durante 90 hrs en presencia de ácido abscísico a una concentración de  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M y en forma paralela un tercer grupo de semillas fue regado con agua destilada permaneciendo durante este tiempo a  $28^{\circ}\text{C}$ . Al cabo de las 90 hrs las plántulas con sus cotiledones y los megagametofitos fueron esterilizados con hipoclorito de sodio 5% (v/v) durante 15 minutos y enjuagadas con agua destilada 5 veces. La extracción de la enzima de cada uno de ellos se realizó de

acuerdo al método de Nyman (1971) y con los inhibidores de proteasas como ha sido descrito anteriormente en la sección 2.2.6.

La actividad de la  $\alpha$ -amilasa y el contenido de proteínas totales de los diferentes extractos fue cuantificada de acuerdo al método descrito por Jones y Varner (1967) y al método de Bradford (1976), descritos previamente en la sección 2.2.5 y 2.3.1, respectivamente.

La actividad de  $\alpha$ -amilasa de los extractos obtenidos de las plántulas y de los megagametofitos sometidos al tratamiento hormonal, como asimismo aquéllos del control, fueron cuantificados en un gel nativo de poliacrilamida. Se cargaron 49,2  $\mu$ g y 531  $\mu$ g de la enzima  $\alpha$ -amilasa, obtenida del tejido correspondiente a la plántula y del tejido gametofítico respectivamente, en los diferentes carriles del gel. Después de la electroforesis los geles fueron teñidos de acuerdo al método de Juliano y Varner (1969), para detectar la actividad  $\alpha$ -amilasa como se describió previamente en la sección 2.2.7.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterización de la $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de Araucaria araucana

##### 3.1.1 Purificación de la $\alpha$ -amilasa

La primera etapa de purificación de la enzima  $\alpha$ -amilasa de semillas de A. araucana se logró por calentamiento del sobrenadante, obtenido del homogeneizado de semillas quiescentes, a 70° durante 15 minutos, lo cual permitió la eliminación de las proteínas termolábiles.

La segunda etapa de purificación de la enzima consistió en adicionar al sobrenadante obtenido de la centrifugación del extracto calentado en la etapa anterior, etanol absoluto a 0°C, hasta alcanzar una concentración final de 40%. El etanol permitió precipitar a otras proteínas contaminantes presentes en el extracto crudo de la enzima. A continuación, la  $\alpha$ -amilasa fue precipitada del sobrenadante con la adición de glicógeno de ostra, ya que  $\alpha$ -amilasa se une al glicógeno y el glicógeno es insoluble en etanol al 40%. La co-precipitación de la enzima  $\alpha$ -amilasa con el glucano altamente ramificado, permitió separar la enzima de otras proteínas contaminantes. También permitió

reducir la posible inactivación de la proteína en la columna de afinidad, etapa posterior de la purificación, debido a la oxidación de los fenoles presentes en el sobrenadante después de la precipitación con el etanol.

La Tabla 1 resume el procedimiento de la purificación de la enzima  $\alpha$ -amilasa de semillas de A. araucana. El extracto crudo, usado para la precipitación con glicógeno, tuvo una actividad específica de  $0,02 \text{ U mg}^{-1}$ , mientras el precipitado con glicógeno tuvo una actividad específica de  $1,32 \text{ U mg}^{-1}$ , obteniéndose en esta etapa  $37,86 \text{ mg}$  de proteína y una purificación de  $66,00$  veces. El rendimiento de la actividad después de precipitar con glicógeno fue de  $72,10\%$ .

La tercera etapa de purificación implica el uso de una cromatografía de afinidad en la cual el ligando  $\beta$ -ciclodextrina, sustrato artificial de la  $\alpha$ -amilasa, está unido a Sefarosa 6B. Las partículas de sefarosa presentan entonces una afinidad específica por la  $\alpha$ -amilasa y no por la  $\beta$ -amilasa; por lo tanto, en una cromatografía de afinidad se retendrá la  $\alpha$ -amilasa. La actividad de la  $\alpha$ -amilasa después de la cromatografía de afinidad a través de la columna CHA-sefarosa fue de  $47,20 \text{ U mg}^{-1}$ , lo que significó una purificación de  $2.360$  veces, con un rendimiento de  $6,13\%$  de la actividad de  $\alpha$ -amilasa respecto al extracto crudo.

**TABLA 1**

Purificación de la  $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de A. araucana por precipitación con glicógeno y cromatografía de afinidad CHA-Sefarosa.

Fracción	Concentración de proteínas mg/ml	Proteínas totales mg	Actividad específica U*/mg	Unidades totales	Purifi- cación	Rendi- miento %
Extracto crudo	3,27	4333,80	0,02	69,34	1	100
Precipitado con glicógeno	2,22	37,86	1,32	49,97	66,00	72,10
CHA-Sefarosa 6B	0,13	0,09	47,20	4,25	2360,00	6,13

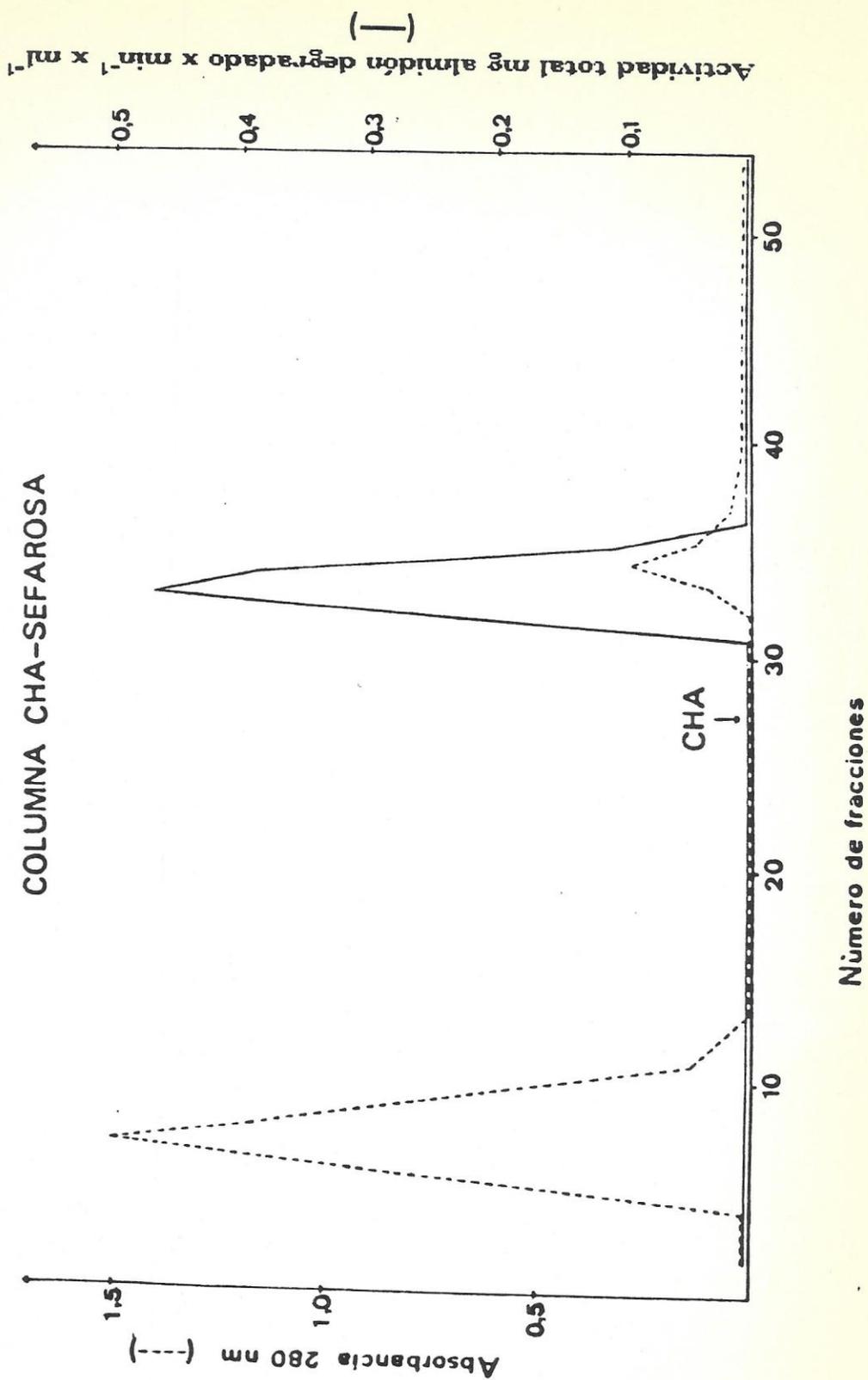
Unidad: mg de almidón degradado por minuto por ml de enzima.

La Figura 2 muestra el perfil de elución del extracto de la enzima obtenido después de la purificación con glicógeno al eluirla desde la columna CHA-sefarosa. El perfil de elución muestra un primer pico de proteínas, que corresponde al volumen de vacío en el cual no se detectó actividad de  $\alpha$ -amilasa. Después de la elución de estas proteínas, se agregó ciclohepta amilosa al amortiguador de elución obteniendo una fracción proteica con actividad de  $\alpha$ -amilasa.

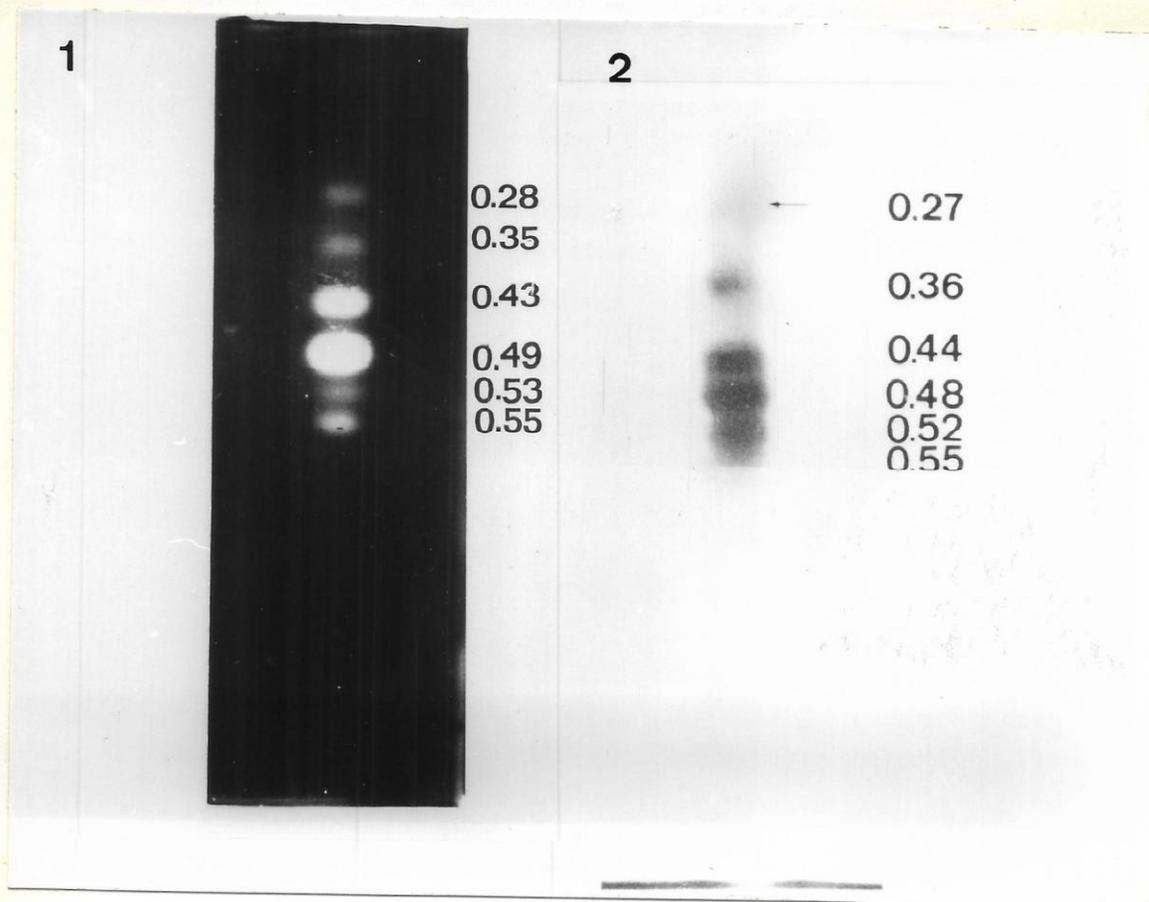
La identificación de esta fracción proteica con actividad de  $\alpha$ -amilasa se hizo por electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida. Se observan 6 isoenzimas aunque en otras electroforesis pueden observarse bandas menores con actividad de  $\alpha$ -amilasa (Figura 3). Las 6 isoenzimas se corresponden con las 6 bandas de proteínas reveladas en gel teñido con reactivo de plata. Cada una de ellas presenta una movilidad relativa ( $R_m$ ) característica de 0,28; 0,35; 0,43; 0,49; 0,53 y 0,55.

FRACCIONAMIENTO DE  $\alpha$ -AMILASA DE Araucaria araucana SOBRE

COLUMNA CHA-SEFAROSA



**FIGURA 2.** Perfil de elución de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de A. araucana desde una columna de afinidad CHA-Sefarosa equilibrada con el amortiguador acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. La flecha indica la posición donde CHA (8 mg/ml) fue adicionado al amortiguador.

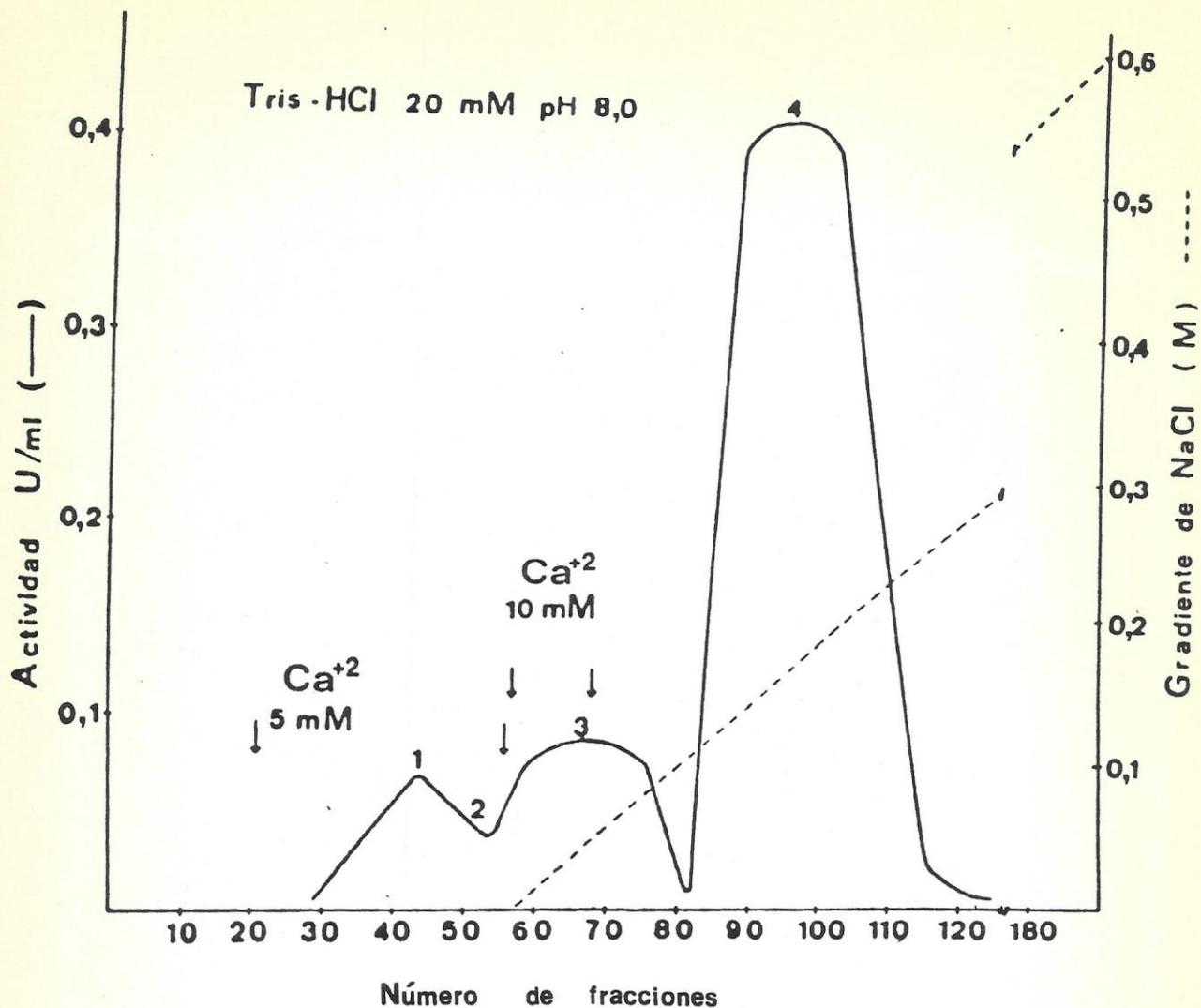


**FIGURA 3.** Patrón electroforético de las isoenzimas nativas de  $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de *A. araucana*. Zimograma (1) y gel teñido con el reactivo de plata (2) después de haber sido purificadas por cromatografía de afinidad CHA-Sefarosa.

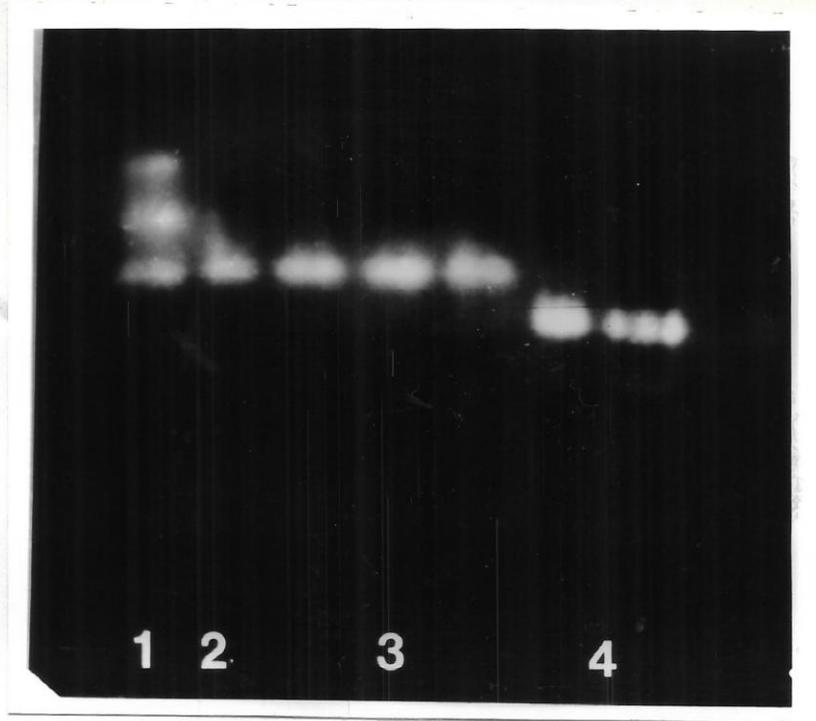
### 3.1.2 Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

Con el objeto de separar las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana entre sí, éstas fueron fraccionadas en una columna de intercambio iónico, DEAE-celulosa aplicando un gradiente lineal salino. De acuerdo a la primera condición de elución aplicada, se obtuvieron 3 picos con actividad de  $\alpha$ -amilasa, lográndose en el segundo pico la completa separación de una de las dos isoenzimas con mayor actividad que presenta un  $R_m$  de 0,43 señalado en el zimograma de la Figura 3. Esta isoenzima eluyó al adicionar el amortiguador de elución  $\text{CaCl}_2$  10 mM y un gradiente salino entre 0 y 70 mM de NaCl. En la Figura 4, se observa el perfil de elución obtenido y en la Figura 5 el zimograma realizado con las fracciones concentradas de cada pico con actividad de  $\alpha$ -amilasa.

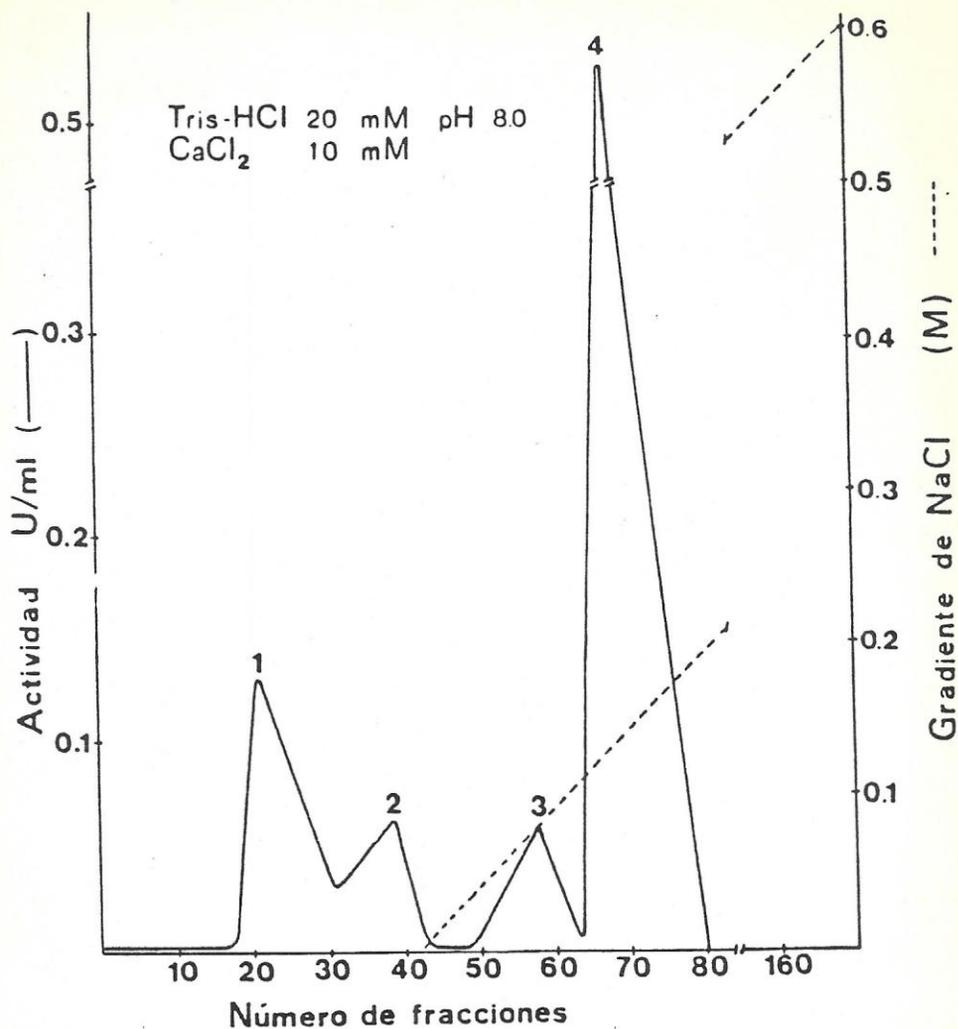
La segunda isoenzima fraccionada corresponde a aquélla con  $R_m$  de 0,49 visualizada en un gel nativo (Figura 3). Esta isoenzima eluyó de la columna DEAE-celulosa usando el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. conteniendo  $\text{CaCl}_2$  10 mM, y a una concentración de NaCl comprendida entre 30 y 120 mM. El perfil de elución y el zimograma obtenido se observa en las Figuras 6 y 7, respectivamente.



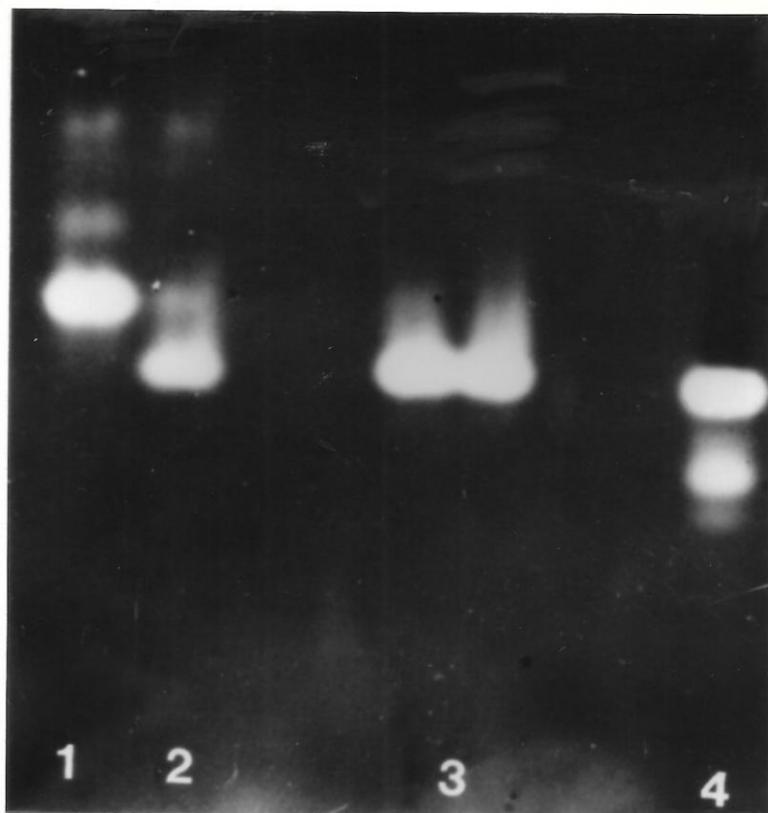
**FIGURA 4.** Perfil de elución de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de *A. araucana* desde una columna de intercambio iónico DEAE-celulosa usando el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. La elución se realizó aplicando una solución de  $\text{CaCl}_2$  5 mM y posteriormente  $\text{CaCl}_2$  10 mM (indicado por las flechas) y con un gradiante lineal de 0,0-0,6 M de NaCl aplicado desde la fracción número 56 (---). La actividad de  $\alpha$ -amilasa (-) está expresada en U/ml.



**FIGURA 5.** Patrón electroforético de las fracciones con actividad de  $\alpha$ -amilasa obtenido de la cromatografía de intercambio iónico DEAE-celulosa. Los números 1, 2, 3 y 4 corresponden a las fracciones señaladas en el perfil de la Figura 4.



**FIGURA 6.** Perfil de elución de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de *A. araucana* desde una columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa equilibrada con el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 y CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Elución con un gradiente de 0,0 a 0,6 M de NaCl aplicado desde la fracción número 42 (---). La actividad de  $\alpha$ -amilasa (-) está expresada en U/ml.

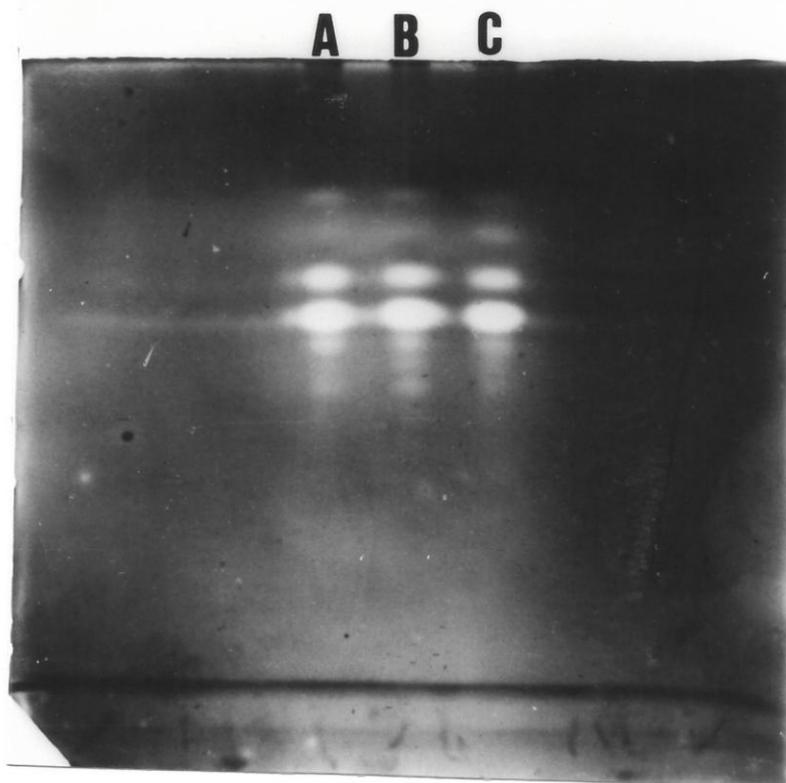


**FIGURA 7.** Patrón electroforético de las fracciones centrales de cada pico con actividad de  $\alpha$ -amilasa obtenido de la cromatografía de intercambio iónico DEAE-celulosa. Los números 1, 2, 3 y 4 corresponden a las fracciones con actividad amilásica señaladas en el perfil de elución de la Figura 6.

### 3.1.3 Extracción de la $\alpha$ -amilasa de A. araucana en presencia de inhibidores de proteasas

La extracción de la enzima realizada en presencia de dos inhibidores de proteasas PMSF y TPCK, permitió descartar la posibilidad que las múltiples isoformas de  $\alpha$ -amilasa obtenidas por electroforesis fuese causado por la acción de proteasas presentes en el extracto crudo, sobre una forma única de  $\alpha$ -amilasa de la semilla.

Estos resultados se observan en el zimograma de la Figura 8. En ella se comparan las bandas con actividad de  $\alpha$ -amilasa presente en los extractos obtenidos en presencia de inhibidores de proteasas, de PMSF (Figura 8B) y TPCK (Figura 8C) respecto a aquél obtenido en ausencia de inhibidor, control (Figura 8A). En los tres casos se puede observar la presencia de las 6 isoenzimas y otras bandas menores con actividad de  $\alpha$ -amilasa. La movilidad relativa de cada una de las bandas observadas en el zimograma fueron de igual valor a los observados en la Figura 3.



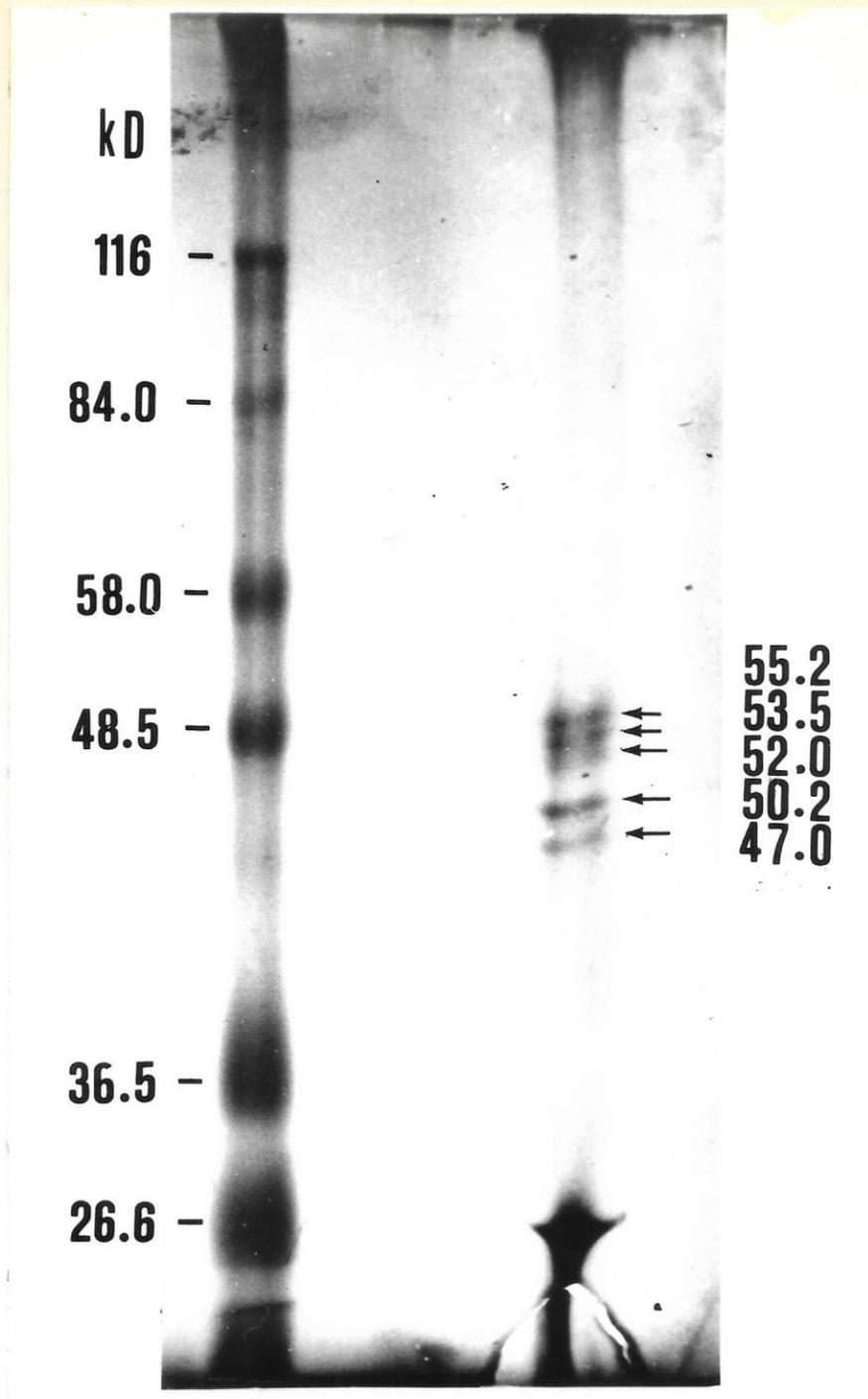
**FIGURA 8.** Patrón electroforético de las isoenzimas nativas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de A. araucana extraídas en presencia de inhibidores de proteasa. A:  $\alpha$ -amilasa obtenida en ausencia de inhibidor. B y C:  $\alpha$ -amilasa obtenida en presencia de inhibidores de proteasa, de PMSF (8B) y TPCK (8C).

### 3.1.4 Masa molecular de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa

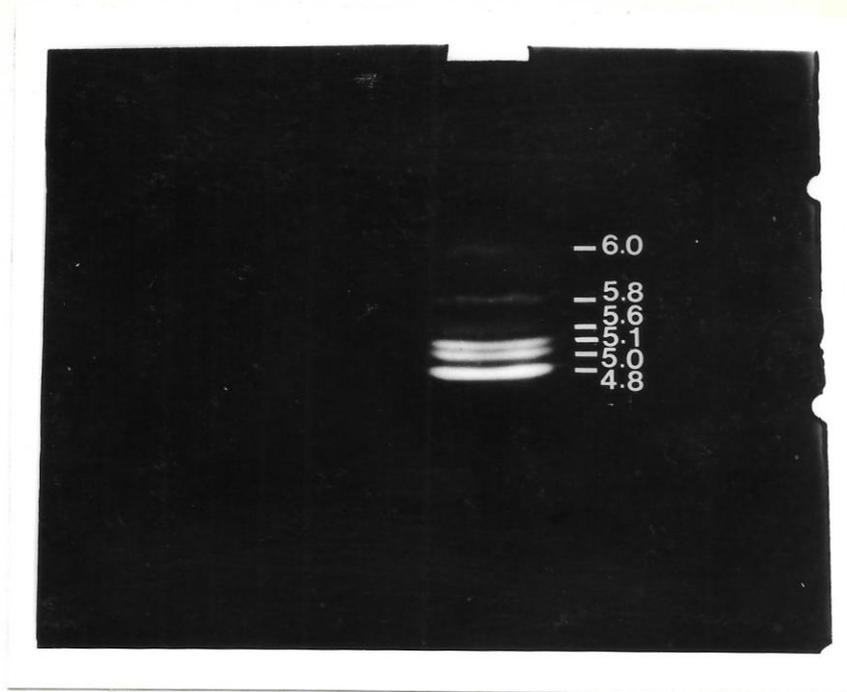
El grado de pureza de la enzima  $\alpha$ -amilasa obtenida por cromatografía de afinidad y la masa molecular de las isoenzimas fue determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. En la Figura 9 se observan 5 de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana cuyos M.M. son: 47,0; 50,2; 52,0; 53,5 y 55,2 kDa. La determinación de las masas moleculares de las bandas menores se obtuvo por detección inmunológica de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada en papel de nitrocelulosa (analizados en sección 3.1.10), permitiendo señalar que los M.M. de estas bandas son de 45,7 y 51,2 kDa.

### 3.1.5 Determinación del punto isoeléctrico de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa y su relación con la masa molecular

Análisis de las proteínas por IEF reveló que las semillas de A. araucana, presentan 6 bandas cuyos pI son: 6,0; 5,8; 5,6; 5,1; 5,0 y 4,8 (Figura 10). La transferencia de estas proteínas a un segundo gel de poliacrilamida-SDS, permitió determinar que aquéllas con pI de 5,8; 5,6; 5,1 y 5,0 presentan un M.M. de 53,5;



**FIGURA 9.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa puras de semillas quiescentes de A. araucana. El canal de la izquierda muestra proteínas de masa molecular estándar y el de la derecha muestra las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa y la determinación de sus respectivas masas moleculares.



**FIGURA 10.** Patrón de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de A. araucana obtenido por isoelectroenfoque.

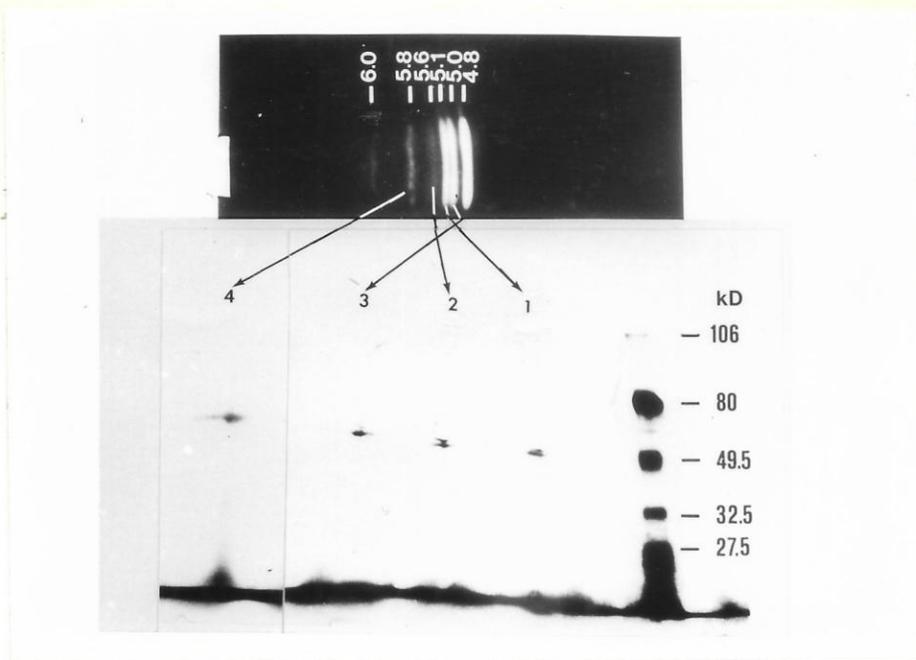
50,2; 47,0 y 52,0 kDa, respectivamente (Figura 11). Debido a la baja concentración de las otras tres isoformas de M.M. 55,2; 51,2 y 45,7 kDa no se pudo correlacionar el pI con su respectivo M.M.

### **3.1.6 Correlación entre la movilidad relativa de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa en gel nativo y su pI**

Para determinar el pI de cada una de las isoenzimas separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida realizado bajo condiciones nativas, se hizo una electroforesis bidimensional. Puede observarse en la Figura 12 que las isoformas con movilidad relativa de 0,28; 0,35; 0,43, 0,49 y 0,53 presentan un pI de 5,8; 5,6; 5,1, 4,8 y 5,0 respectivamente. A la otra isoforma con Rm de 0,55 no fue posible determinar su pI dada la baja actividad que presenta esta isoenzima.

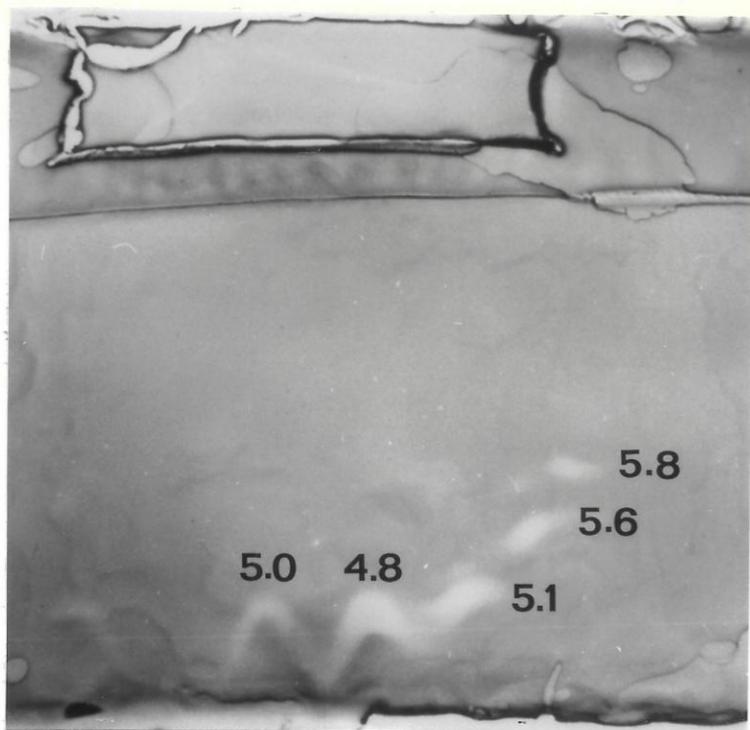
### **3.1.7 Análisis de glicosilación de las isoformas de la $\alpha$ -amilasa**

Numerosos informes han revelado que las isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa de gramíneas están parcialmente glicosiladas (Rodaway, 1978), por ésta razón se usó el reactivo peryodato-dansilhidrazina a las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A.



**FIGURA 11.** Punto isoeléctrico de las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa y su masa molecular.

Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida-SDS de isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana separadas previamente por isoelectroenfoque.



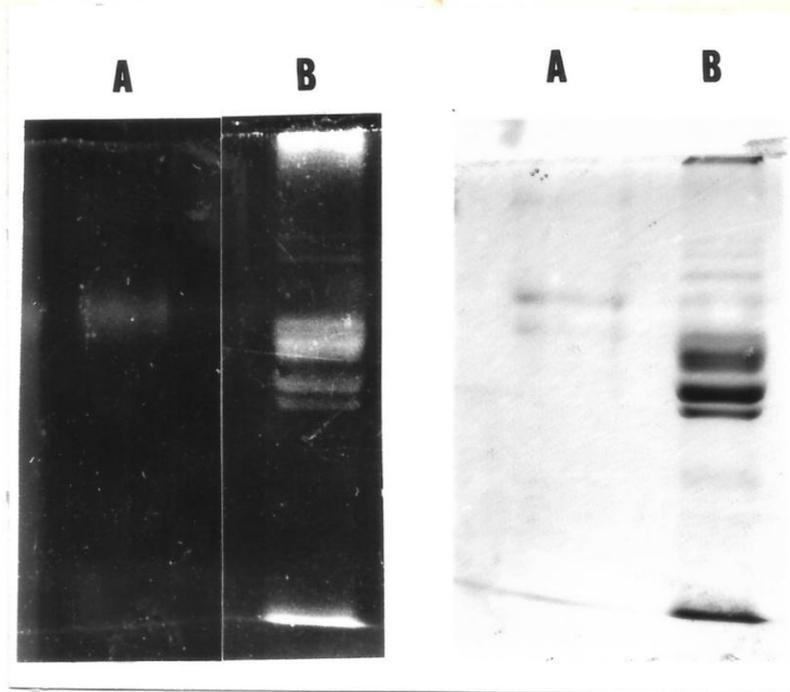
**FIGURA 12.** Correlación entre la movilidad relativa de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa en gel nativo y su pI. Una sección de gel de poliacrilamida conteniendo las isoenzimas nativas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana separadas por electroforesis fue girado en un ángulo de  $90^\circ$  sobre un segundo gel con anfolitos de rango de pH 4-6 y 5-8. El gel fue teñido con KI-I<sub>2</sub>.

araucana separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. El análisis de esta tinción, reveló que las 6 isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa de A. araucana reaccionan con el reactivo peryodato-dansilhidrazina, lo que sugiere que son glicoproteínas (Fig. 13).

La tinción fluorescente de las isoformas se logró por oxidación del carbohidrato presente en la proteína con ácido peryódico, lo cual generó grupos aldehídos que reaccionaron con el reactivo dansilhidrazina formando hidrazonas fluorescentes (Estep y Miller, 1986).

### 3.1.8 Composición de aminoácidos de la $\alpha$ -amilasa

Se obtuvo la composición aminoacídica de sólo tres isoenzimas, que fueron separadas por electrotransferencia preparativa a una membrana de PVDF. Estas tres isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa analizadas corresponden a las isoformas de masas moleculares de 53,5; 50,2 y 47,0 kDa, de puntos isoeléctricos de 5,8; 5,6 y 5,1 y de  $R_m$  de 0,28; 0,35 y 0,43 respectivamente; las otras isoenzimas no fueron analizadas debido a la baja cantidad de proteína presente en la membrana de difluoruro de polivinilideno (Tabla 2).



**FIGURA 13.** Análisis de glicosilación de las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana en gel de poliacrilamida-SDS.  
 A la derecha: gel teñido con azul de Coomasie  
 A la izquierda: gel teñido con ácido peryódico-dansilhidrazina  
 Carril A : 10  $\mu$ g de lectina de papa(control)  
 Carril B: 10  $\mu$ g de  $\alpha$ -amilasa de A. araucana

TABLA 2

Composición de aminoácidos de tres isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de  
Araucaria araucana

Aminoácidos	Número de residuos por molécula		
	$\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u>		
	Isoenzima 53,5 kD pI 5,8	Isoenzima 50,2 kD pI 5,6	Isoenzima 47 kD pI 5,1
*ASX	49 (9,9)	68 (15,1)	67 (15,8)
THR	17 (3,4)	19 (4,2)	19 (4,5)
SER	53 (10,8)	42 (9,3)	40 (9,4)
*GLX	45 (9,1)	40 (8,9)	31 (7,3)
PRO	20 (4,1)	10 (2,2)	14 (3,3)
GLY	155 (31,4)	120 (26,6)	85 (20,0)
ALA	45 (9,1)	53 (11,8)	51 (12,0)
VAL	17 (3,4)	15 (3,3)	23 (5,4)
MET	3 (0,6)	3 (0,7)	3 (0,7)
ILE	13 (2,6)	10 (2,2)	17 (4,0)
LEU	25 (5,1)	17 (3,8)	23 (5,4)
TYR	7 (1,4)	6 (1,3)	8 (1,9)
PHE	9 (1,8)	8 (1,8)	11 (2,6)
HIS	8 (1,6)	8 (1,8)	7 (1,7)
LYS	23 (4,7)	28 (6,2)	21 (5,0)
ARG	4 (0,8)	4 (0,9)	4 (0,9)
**TRP	N.D.	N.D.	N.D.
**CYS	N.D.	N.D.	N.D.

\* Asparragina y glutamina durante la hidrólisis fueron desaminados a los respectivos aminoácidos ácidos.

\*\* No determinado, se destruye por la hidrólisis ácida.

La composición aminoacídica de las tres isoenzimas es muy similar. El análisis reveló que éstas son ricas en glicina, presentando además un contenido relativamente alto de ácido aspártico/asparragina, ácido glutámico/glutamina, serina, alanina, prolina. Los aminoácidos menos representados y en orden decreciente son fenilalanina, histidina, tirosina, arginina y metionina.

Al comparar la composición aminoacídica de las isoenzimas de A. araucana entre sí, se observa que la isoenzima de 53,5 kDa presenta un número menor de residuos de asparragina/ácido aspártico y un número mayor de residuos de serina y prolina respecto a las otras dos isoenzimas y aproximadamente dos veces el número de residuos de glicina respecto a la isoenzima de 47,0 kDa.

Durante la hidrólisis, asparragina y glutamina fueron desaminados a ácido aspártico y glutámico respectivamente. Solamente triptófano y cisteína no pudieron ser determinados por este procedimiento porque se degradaron durante el análisis. La cuantificación de los residuos de metionina se obtuvo por análisis peptídico de estas tres formas cuando estas proteínas fueron tratadas con bromuro de cianógeno, en conjunto con el análisis de la secuencia aminoacídica del extremo aminoterminal que se hizo de cada uno de ellos (sección 3.1.9).

La Tabla 3 compara la composición aminoacídica de la isoenzima de  $\alpha$ -amilasa de semillas de A. araucana de M.M. de 47,0 kDa con las de Hordeum vulgare. En esta tabla puede apreciarse que las isoenzimas de las semillas de esta gramínea presentan un alto contenido de metionina, leucina y tienen aproximadamente dos veces el contenido de tirosina, cuatro veces el contenido de arginina y la mitad de los residuos de serina respecto a las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana. El número de residuos de glicina presente en las isoenzimas de H. vulgare es considerablemente menor respecto al cuantificado en la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana.

### 3.1.9 Secuencia de la región amino-terminal de la $\alpha$ -amilasa de Araucaria araucana

Otro análisis químico que permitió caracterizar a las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana fue determinar la secuencia aminoacídica del extremo amino-terminal, con la finalidad de establecer algún grado de similitud o relación entre ellas y entre éstas y las isoformas de gramíneas. Entre 25 a 28 aminoácidos del extremo  $\text{NH}_2$  terminal fueron secuenciados en las mismas isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa analizadas anteriormente. Análisis de las secuencias aminoacídicas obtenidas, muestra que

**TABLA 3**

Comparación de la composición aminoacídica de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana con las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de Hordeum vulgare

Aminoácidos	Números de residuos por molécula					
	$\alpha$ -amilasa de <u>Hordeum vulgare</u> pI 4,6-5,2		$\alpha$ -amilasa de <u>Hordeum vulgare</u> pI 5,9-6,4		$\alpha$ -amilasa de <u>A. araucana</u> pI 5,1	
ASX	55	(12,6)	60	(14,1)	67	(15,8)
THR	17	(3,9)	20	(4,7)	19	(4,5)
SER	22	(5,0)	15	(3,5)	40	(9,4)
GLX	25	(5,7)	34	(8,0)	31	(7,3)
PRO	17	(3,9)	17	(4,0)	14	(3,3)
GLY	48	(11,0)	55	(12,9)	85	(20,0)
ALA	47	(10,7)	40	(9,4)	51	(12,0)
CYS	8	(1,8)	8	(1,9)	N.D.	
VAL	28	(6,4)	28	(6,6)	23	(5,4)
MET	13	(3,0)	6	(1,4)	3	(0,7)
ILE	23	(5,3)	28	(6,6)	17	(4,0)
LEU	34	(7,8)	32	(7,5)	23	(5,4)
TYR	16	(3,7)	17	(4,0)	8	(1,9)
PHE	16	(3,7)	19	(4,4)	11	(2,6)
HIS	13	(3,0)	9	(2,1)	7	(1,7)
LYS	23	(5,2)	16	(3,7)	21	(5,0)
ARG	17	(3,9)	12	(2,8)	4	(0,9)
TRP	16	(3,7)	11	(2,6)	N.D.	

\*Los valores entre paréntesis corresponden al número de residuos expresados en porcentaje.

éstos son idénticos en las tres isoformas analizadas (Tabla 4). Este fragmento amino terminal no presenta un sitio probable de glicosilación tal como Asn-X-Ser/Thr.

Al comparar esta secuencia aminoacídica del extremo NH<sub>2</sub>-terminal de las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana con secuencias de otras proteínas mantenidas en el banco de datos (NBRF de Monsanto Corporate Research, Chesterfield, MO) no se encontró ninguna secuencia homóloga.

En la Tabla 5 se compara la secuencia aminoacídica del extremo amino terminal de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana con la  $\alpha$ -amilasa de H. vulgare (cebada) y Oriza sativa (arroz). Se puede observar que no hay homología entre ellas.

### 3.1.10 Análisis inmunológico

Con el objeto de establecer si existe una homología entre las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana y de los cereales, anticuerpos policlonales originados contra las isoenzimas de alto y bajo punto isoeléctrico de cebada fueron utilizados para establecer el grado de inmunoreacción cruzada entre los anticuerpos y las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana. En este ensayo se encontró que estos anticuerpos generados contra la

TABLA 4

Secuencia aminoacidica del extremo NH<sub>2</sub>-terminal de tres  
isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa de semillas de *Araucaria araucana* .

Isoenzima 53,5 kDa

NH<sub>2</sub>-X E V I V T F A M N Q R T V F G R V F K I V G N S V E L

Glu Val Ile Val Thr Phe Ala Met Asp Glu Arg Thr Val Phe Gly Arg Val Phe Lys Ileu Val Gly Asp Ser Val Glu Leu

Isoenzima 50,2 kDa

NH<sub>2</sub>-X E V I V T F A M N Q R T V F G R V F K I V G N S V E L

Isoenzima 47 kDa

NH<sub>2</sub>-X E V I V T F A M N Q R T V F G R V F K I V G N S V E L

TABLA 5

Comparación de la secuencia aminoterminal de una isoenzima de  $\alpha$ -amilasa de semillas de *Araucaria araucana* con otras  $\alpha$ -amilasas

$\alpha$ -amilasa de *A. araucana*

NH<sub>2</sub>-X E V I V T F A M N Q R T V F G R V F K I V G N S

Gln Val Ileu Val Thr Phe Ala Met Asn Gln Arg Thr Val Phe Gly Arg Val Phe Lys Ileu Val Gly Asn Ser

$\alpha$ -amilasa de *O. sativa*

NH<sub>2</sub>- Q V L F Q G F N W E S W K E N G G W Y N F L M G K

Gln Val Leu Phe Gln Gly Phe Asn Trp Gln Ser Trp Lys Gln Asn Gly Gly Trp Tyr Asn Phe Leu Met Gly Lys

$\alpha$ -amilasa de *H. vulgare*

NH<sub>2</sub>- Q V L F Q G F N W E S W K Q S G G W Y N M M M G K

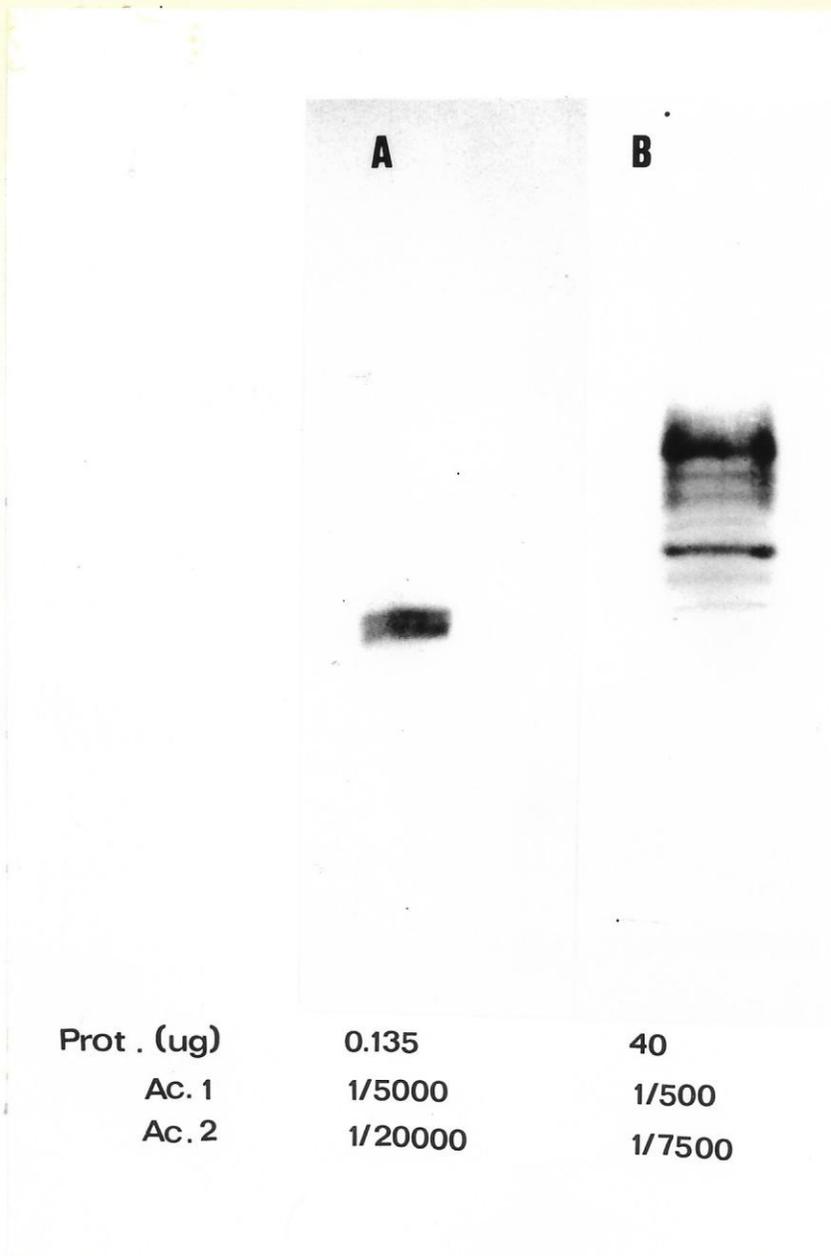
Gln Ser

$\alpha$ -amilasa de cebada dan inmunoreacción cruzada con las isoenzimas de semillas de A. araucana, siempre que se utilice una concentración mayor del anticuerpo primario (1/500) y una concentración superior del antígeno (40  $\mu$ g) respecto al control en que la dilución del anticuerpo fue de 1/5000 y con una concentración del antígeno de 0.135  $\mu$ g (Figura 14).

Resultados similares se obtuvieron al incrementar la concentración de la enzima  $\alpha$ -amilasa de A. araucana desde 20 a 35  $\mu$ g de proteína (Figura 15). En esta figura se observa además que el grado de reacción de los anticuerpos de la  $\alpha$ -amilasa de cebada es mayor con las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana de 55,2 y 50,2 kDa.

### **3.1.11 Ruptura de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de A. araucana con bromuro de cianógeno**

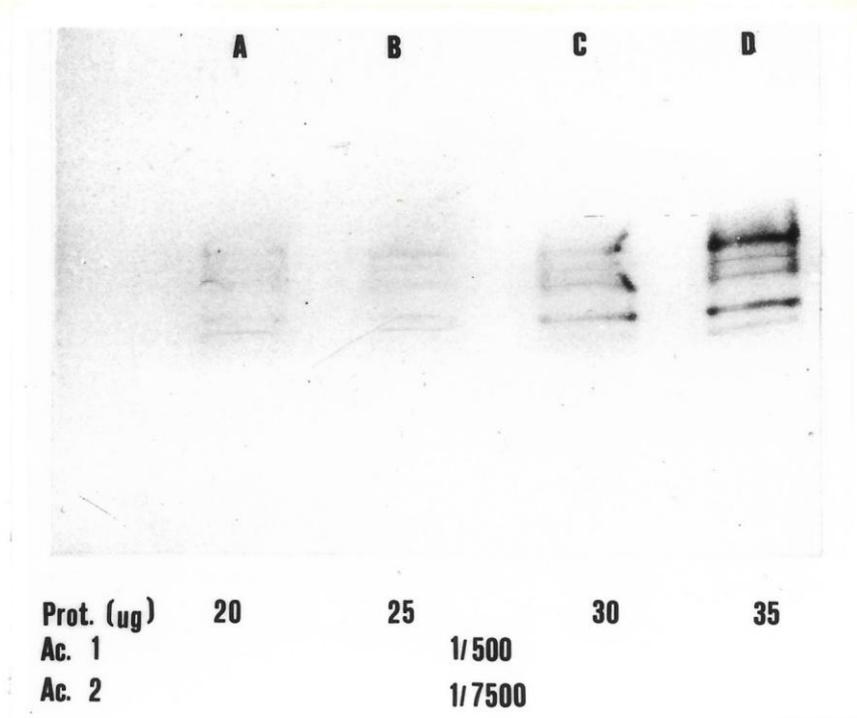
Con la finalidad de averiguar las diferencias en la estructura primaria entre las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana éstas proteínas fueron tratadas con CNBr in situ en secciones del gel, en medio ácido durante 16 horas. El bromuro de cianógeno escinde la cadena polipeptídica solamente en aquel enlace peptídico donde metionina aporte el grupo carboxilo. El reactivo reacciona con el azufre de la cadena lateral de la



**FIGURA 14.** Western blot de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de Araucaria araucana incubadas con anticuerpos policlonales generados contra la  $\alpha$ -amilasa de cebada.

Carril A : 0,135  $\mu$ g de la  $\alpha$ -amilasa de cebada (Control)

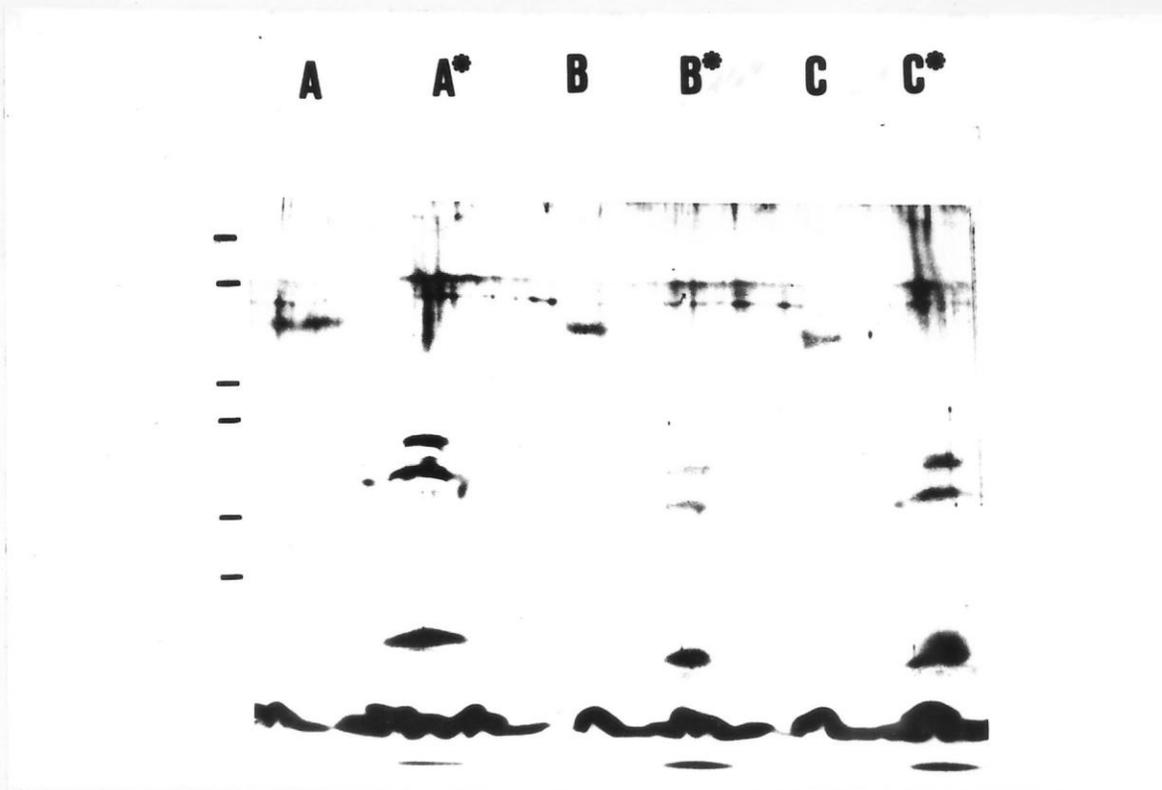
Carril B: 40  $\mu$ g de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana



**FIGURA 15.** Western blot con diferentes concentraciones de isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana incubado con anticuerpos policlonales generados contra la  $\alpha$ -amilasa de cebada.

metionina y se forma una mezcla de lactona de la homoserina, homoserina y metiltiocianato. En la Figura 16 y 17 se muestra el patrón de fragmentación o ruptura obtenida de las isoenzimas de 55,2 kDa, 53,5 kDa, 52,0 kDa, 50,2 kDa y 47 kDa de la  $\alpha$ -amilasa.

El tratamiento de cada isoenzima con CNBr genera 3 péptidos además de un péptido que contiene nueve aminoácidos. Este péptido de 9 aminoácidos fue deducido del análisis de la secuencia aminoacídica del extremo NH<sub>2</sub>-terminal realizado de tres isoenzimas, en el cual no es posible ver en el gel debido a su masa pequeña que lo hace migrar fuera del gel. Las masas moleculares de los fragmentos obtenidos de tal digestión, son diferentes, excepto el péptido de 26 kDa que es común a la isoenzima de 55,2 y 50,2 kDa; el de 25 kDa que es común a la isoenzima de 53,5; 52,0 y 47,0 kDa y el de 5,9 kDa que es común a la isoenzima de 55,2 y 53,5 kDa tratadas con CNBr (Tabla 6).

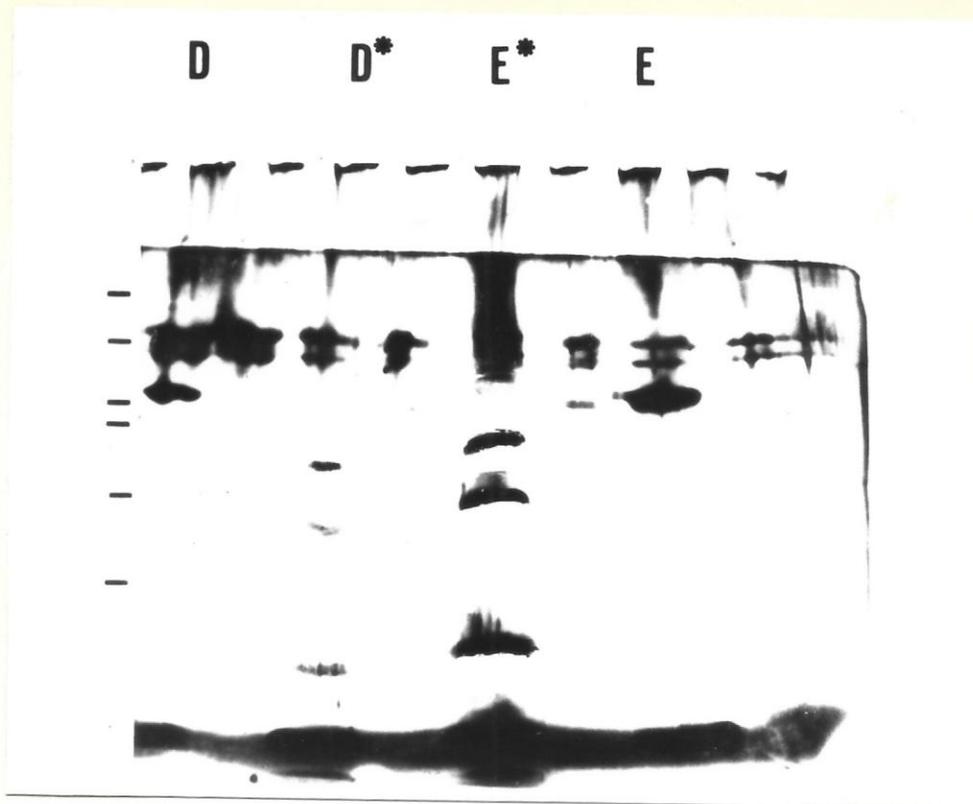


**FIGURA 16.** Mapas peptídicos de isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana digeridas con 50 mg de bromuro de cianógeno y analizadas en gel de poliacrilamida-SDS al 10%.

A, B, y C isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa no tratadas, cuyas masas moleculares corresponden a 55,2; 53,5 y 52,0 kDa.

A\*, B\* y C\* péptidos generados por digestión con bromuro de cianógeno de las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana.

A la izquierda del gel de proteínas están señalados los marcadores de masa molecular de 94,0; 67,0; 43,0; 30,0; 20,1 y 14,6 kDa.



**FIGURA 17.** Mapas peptídicos de isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de Araucaria araucana digeridas con 50 mg de bromuro de cianógeno y analizadas en gel de poliacrilamida-SDS al 10%.

D, E isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa no tratadas, cuyas masas moleculares corresponden a 47,0 y 50,2 kDa.

D\*, E\* péptidos generados por digestión con bromuro de cianógeno de las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa.

A la izquierda del gel de proteínas están señalados los marcadores de masa molecular de 94,0; 67,0; 43,0; 30,0; 20,1 y 14,6 kDa.

**TABLA 6**

Digestión con bromuro de cianógeno de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas de Araucaria araucana

Masas moleculares de los fragmentos (kDa)

Isoenzima 55,2 kDa	Isoenzima 53,5 kDa	Isoenzima 52,0 kDa	Isoenzima 50,2 kDa	Isoenzima 47,0 kDa
26,0			26,0	
	25,0	25,0		25,0
23,0				
		22,0		
	21,0			
			20,0	
				17,0
5,9	5,9			
		5,4		
			5,2	
				5,0

### 3.2 Regulación hormonal de la expresión génica de las isoenzimas de la $\alpha$ -amilasa de plántulas de Araucaria araucana

#### 3.2.1 Efecto fisiológico del ácido giberélico sobre la actividad de $\alpha$ -amilasa de plántulas de A. araucana

La actividad amilolítica del tejido embrionario de semillas embebidas por 60 hrs con AMO 1618, un inhibidor de la síntesis de giberelinas fue de un 37,3% respecto a la actividad determinada en semillas controles. Estos antecedentes motivaron a investigar cuáles eran las formas isoenzimáticas que eran dependientes de la presencia de giberelinas endógenas de las semillas. Con la finalidad de dar respuesta a esta interrogante, se trataron semillas de A. araucana durante 90 hrs (estado de desarrollo de la plántula, Figura 1B) con CCC, un inhibidor de la enzima kaureno sintetasa, que participa en la vía de síntesis de giberelinas. El efecto de CCC 20 mM se reflejó en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa, ya que ésta disminuyó en un 71,8% en el extracto obtenido de la plántula y en un 8,7 en aquel obtenido del megagametofito, respecto a la actividad cuantificada en los extractos enzimáticos de semillas embebidas en agua. La actividad fue restaurada a un 79,5% en la plántula y a un 91,3% en el

megagametofito, respecto del control cuando las semillas fueron embebidas por 90 hrs con CCC 20 mM y una concentración fisiológica de GA<sub>3</sub> 10<sup>-5</sup> mM (Tabla 7).

El tratamiento anterior se reflejó en el patrón de isoenzimas obtenido en el zimograma (Figura 18). Las intensidades de las bandas de las isoenzimas revelan la actividad relativa de cada banda. En el patrón electroforético en geles no denaturantes realizado con los extractos enzimáticos de las plántulas tratadas con CCC 20 mM, se observó que desaparecen 3 bandas de actividad de  $\alpha$ -amilasa de las 8 observadas en el control, las demás bandas disminuyen en actividad.

En las semillas tratadas con CCC y GA<sub>3</sub> se restablece la actividad de la  $\alpha$ -amilasa presente en la plántula, reapareciendo las bandas afectadas en el tejido tratado con el inhibidor.

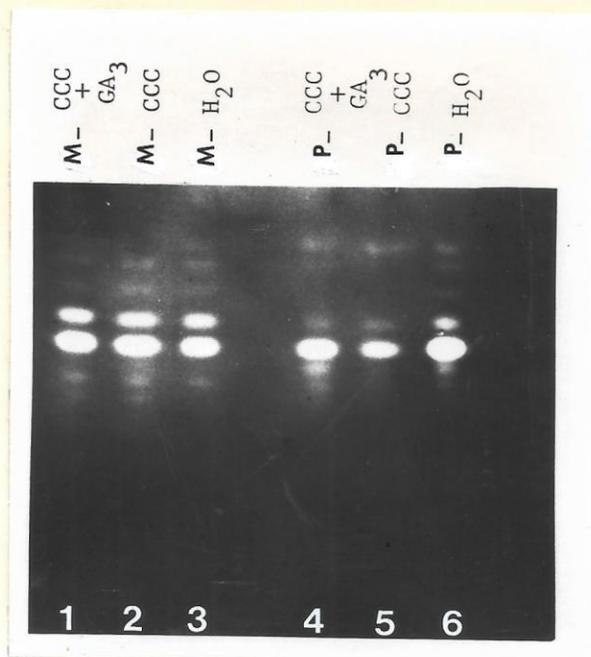
Los extractos enzimáticos obtenidos de los megagametofitos embebidos separadamente en agua, CCC y CCC + GA<sub>3</sub> fueron analizados también en geles nativos. En el patrón electroforético se observan 7 bandas de actividad en los 3 extractos enzimáticos obtenidos de las semillas, disminuyendo levemente la actividad de las bandas de los extractos obtenidos de semillas tratadas con CCC, como de aquellos embebidos en CCC y GA<sub>3</sub> exógeno.

**TABLA 7**

Efecto del CCC en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y en la concentración de proteínas totales de plántulas y megagametofitos con 90 hrs de tratamiento

Tratamiento	Actividad total mg almidón deg. $\times g^{-1}$ de peso seco $\times min^{-1}$	Concentración de proteínas mg prot $\times g^{-1}$ de peso seco	Act.específica $U^* \times mg^{-1}$ prot.	Act.relativa %
<b>Plántula</b>				
H <sub>2</sub> O	0,28 $\pm$ 0,004	0,71 $\pm$ 0,004	0,39 $\pm$ 0,003	100,0
CCC 20 mM	0,07 $\pm$ 0,002	0,66 $\pm$ 0,004	0,11 $\pm$ 0,002	28,2
CCC 20 mM + GA <sub>3</sub> 10 <sup>-5</sup> M	0,21 $\pm$ 0,003	0,68 $\pm$ 0,004	0,31 $\pm$ 0,005	79,5
<b>Megagametofito</b>				
H <sub>2</sub> O	0,07 $\pm$ 0,004	0,30 $\pm$ 0,004	0,23 $\pm$ 0,010	100,0
CCC 20 mM	0,06 $\pm$ 0,004	0,28 $\pm$ 0,004	0,21 $\pm$ 0,012	91,3
CCC 20 mM + GA <sub>3</sub> 10 <sup>-5</sup> M	0,06 $\pm$ 0,002	0,29 $\pm$ 0,002	0,21 $\pm$ 0,010	91,3

Unidad: mg de almidón degradado por minuto por gramo de peso seco de tejido.



**FIGURA 18.** Patrón electroforético de las isoenzimas nativas de  $\alpha$ -amilasa de semillas de A. araucana tratadas durante 90 horas con CCC

(1) Extracto de tejido gametofítico de semillas embebidas en 20 mM de CCC y  $10^{-5}$  M de  $GA_3$ .

(2) Extracto de tejido gametofítico de semillas embebidas en 20 mM de CCC

(3) Extracto de tejido gametofítico de semillas embebidas en agua.

(4) Extracto de plántulas con sus cotiledones embebidas en presencia de 20 mM de CCC y  $10^{-5}$  M de  $GA_3$ .

(5) Extracto de plántulas con sus cotiledones embebidas en presencia de 20 mM de CCC.

(6) Extracto de plántulas con sus cotiledones embebidas en agua.

### 3.2.2 Efecto del ácido abscísico sobre la actividad de $\alpha$ -amilasa en plántulas de A. araucana

El ácido abscísico actúa como un antagonista en numerosos procesos inducidos por  $GA_3$ , por consiguiente, se investigó el efecto del ABA sobre la actividad de  $\alpha$ -amilasa. Análisis de las actividades relativas de la  $\alpha$ -amilasa cuantificadas en los extractos enzimáticos obtenidos de las plántulas con sus cotiledones tratados con la hormona a una concentración de  $10^{-5}$  M y  $10^{-4}$  M, muestra una disminución de 19,1% y en un 33,4% de la actividad, respecto al control (Tabla 8). En cambio, la actividad de la  $\alpha$ -amilasa cuantificada en los extractos enzimáticos obtenidos de los megagametofitos tratados con la hormona no disminuyó respecto al tejido control.

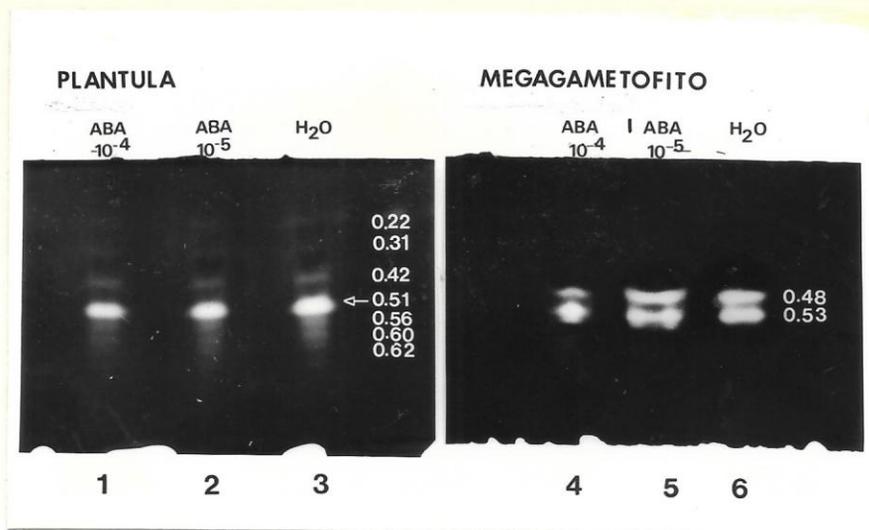
El zimograma realizado con la  $\alpha$ -amilasa extraída de las plántulas tratadas con ABA (Figura 19) revela la disminución en actividad de la enzima, siendo afectada principalmente aquella con  $R_m$  de 0,51. En cambio, no se observa variación en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa obtenida de los megagametofitos tratados con la hormona.

**TABLA 8**

Efecto del ácido abscísico en la actividad de  $\alpha$ -amilasa y en la concentración de las proteínas totales de las plántulas y megagametofitos con 90 hrs de tratamiento

Tratamiento	Actividad total mg almidón deg. $\times g^{-1}$ de peso seco $\times min^{-1}$	Concentración de proteínas mg prot $\times g^{-1}$ de peso seco	Act.específica $U^* \times mg^{-1}$ prot.	Act.relativa %
<b>Plántula</b>				
H <sub>2</sub> O	1,38 $\pm$ 0,008	6,46 $\pm$ 0,005	0,21 $\pm$ 0,006	100,0
ABA 10 <sup>-5</sup> M	1,09 $\pm$ 0,008	6,35 $\pm$ 0,005	0,17 $\pm$ 0,003	80,9
ABA 10 <sup>-4</sup> M	0,88 $\pm$ 0,008	6,19 $\pm$ 0,005	0,14 $\pm$ 0,001	66,6
<b>Megagametofito</b>				
H <sub>2</sub> O	0,54 $\pm$ 0,006	6,27 $\pm$ 0,006	0,09 $\pm$ 0,004	100,0
ABA 10 <sup>-5</sup> M	0,54 $\pm$ 0,005	6,25 $\pm$ 0,002	0,09 $\pm$ 0,006	100,0
ABA 10 <sup>-4</sup> M	0,53 $\pm$ 0,005	6,20 $\pm$ 0,000	0,09 $\pm$ 0,003	100,0

Unidad: mg de almidón degradado por minuto por gramo de peso seco de tejido.



**FIGURA 19.** Patrón electroforético en condiciones nativas de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas de A. araucana tratadas durante 90 horas con ácido abscísico.

- (1) Extracto enzimático de plántulas con sus cotiledones embebidas en presencia de  $10^{-4}$  M de ABA.
- (2) Extracto enzimático de plántulas con sus cotiledones embebidas en presencia de  $10^{-5}$  M de ABA.
- (3) Extracto enzimático de plántulas con sus cotiledones embebidas en agua.
- (4) Extracto enzimático de tejido gametofítico embebido en presencia de  $10^{-4}$  M de ABA.
- (5) Extracto enzimático de tejido gametofítico embebido en presencia de  $10^{-5}$  M de ABA.
- (6) Extracto enzimático de tejido gametofítico embebido en agua.

## DISCUSION

### Caracterización de $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes de A. araucana

En esta tesis se ha logrado purificar las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de semillas quiescentes, para una ulterior caracterización, basándose en la propiedad de termoestabilidad que la enzima posee a 70°C, otorgada por la presencia de calcio en la proteína, como ha sido demostrado por Salas y Cardemil (1986). El calcio tiene un rol importante, pues otorga la estabilidad de la estructura terciaria de la proteína. Bush y col. (1989) han señalado que la remoción de calcio de la  $\alpha$ -amilasa de cebada provoca la inactivación de la proteína debido a cambios en la estructura secundaria y terciaria lo cual también ha sido señalado respecto de  $\alpha$ -amilasa pancreática de porcino (Steer y col., 1973; Hsiu y col., 1964). Además, se ha encontrado que el calcio tiene un efecto estimulador sobre la secreción de proteínas. Esto es un fenómeno ubicuo en las células eucarióticas. Bush y col. (1986) demostraron que el calcio promueve la secreción de la  $\alpha$ -amilasa de cebada afectando el transporte celular, más que facilitando el movimiento de la enzima a través de la pared celular. El calcio estimula

selectivamente la secreción de las moléculas de la  $\alpha$ -amilasa tipo R (resistente a la degradación hidrolítica por endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H), sin afectar la forma S de la enzima (susceptible al ataque de la endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H) como se ha informado en las semillas de arroz (Mitsui y col., 1985). El rol del calcio en la  $\alpha$ -amilasa de Araucaria araucana, está relacionado con la actividad y estabilidad de la holoenzima, porque pierde su actividad cuando el calcio es removido del medio con ácido etilendiamino-tetra acético (Salas y Cardemil, 1986). El calcio aparentemente no tendría ninguna función en la secreción de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana ya que la enzima no es secretada ni movilizada de un tejido a otro (Reinero y Cardemil, 1983).

La purificación mayor de la enzima se obtuvo por precipitación de la  $\alpha$ -amilasa con glicógeno en presencia de etanol permitiendo la separación de la enzima de otras proteínas. Esta primera purificación incrementó la actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa respecto al extracto crudo. La obtención de la enzima purificada se logró con el uso de la cromatografía de afinidad sefarosa-CHA con lo cual se obtuvo la elución selectiva de la enzima. Thoma y col. (1971), sugieren que el sitio activo de la enzima es complementario al tamaño de la ciclohepta-amilosa ( $\beta$ -ciclodextrina). Sin embargo, este sustrato no puede ser digerido por la enzima, ya que ésta hidroliza enlaces con

isomería  $\alpha$ . Además, éste es un ligando específico para permitir la adsorción selectiva o unión específica de la  $\alpha$ -amilasa, no así de  $\beta$ -amilasa la cual se une a ciclohexamilosa ( $\alpha$ -ciclodextrina). De esta manera, la preparación enzimática obtenida presenta una alta actividad específica respecto a la purificación lograda con glicógeno. El perfil de elución mostró que la principal actividad adsorbida sobre la columna corresponde a la  $\alpha$ -amilasa, definida por su requerimiento de calcio y su estabilidad al calor.

La ausencia de proteínas contaminantes en la preparación enzimática purificada es corroborada por el análisis de los geles nativos realizados con el extracto puro y teñidos con el reactivo de plata, los cuales permiten detectar seis bandas de proteínas. Estas bandas se correlacionan con las seis bandas de actividad presentes en el mismo tipo de análisis electroforético, presentándose además un número similar de bandas cuando se realiza una electroforesis de las proteínas desnaturadas. Los zimogramas realizados con la  $\alpha$ -amilasa extraída y purificada de semillas de distinta procedencia (Chillán y Malalcahuello) siempre presentaron el mismo patrón electroforético.

Cada una de estas seis isoformas detectadas en semillas a tiempo 0 de imbibición poseen un pI característico, dado por diferencias en sus cargas eléctricas. Las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana presentan un pI de 6,0; 5,8; 5,6; 5,1; 5,0 y 4,8; cinco de ellas demostradas por Salas y Cardemil

(1986). Los distintos pI pueden explicarse por las diferencias entre las estructuras primaria, secundaria y/o terciaria de las isoenzimas.

Esto significa que en las formas más aniónicas hay una mayor exposición de los grupos carboxílicos al medio, generando una carga superficial más negativa que las menos aniónicas. En cebada, las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa están clasificadas en dos grupos. Esta separación radica en la diferencia en el pI que presenta un grupo respecto al otro; sin embargo, en A. araucana todas ellas presentan un pI muy próximo que fluctúa entre 4,8 y 6,0 no permitiendo una separación en grupos que pudiesen clasificarse como de alto y bajo pI.

La electroforesis bidimensional realizada bajo condiciones nativas, permitió correlacionar el punto isoeléctrico con la movilidad relativa de cada isoforma. El número de isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana observadas en el zimograma se corresponde con el número de isoformas observadas en el patrón obtenido por isoelectroenfoque.

La M.M. de las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana son de 45,7; 47,0; 50,2; 51,2; 52,0; 53,5 y 55,2 kDa. Estas isoenzimas presentan una M.M. superior al informado para la  $\alpha$ -amilasa de Gramíneas, cuya M.M. oscila entre 40 y 45 kDa (Rodaway, 1978; Koshiha y col., 1981; Jacobsen y col., 1982; Beers y col., 1990).

En la actualidad no existen antecedentes sobre caracterización de otras  $\alpha$ -amilasas en plantas que evolutivamente estén más próximas a A. araucana, por consiguiente, en este trabajo la mayoría de las comparaciones se realizan con la  $\alpha$ -amilasa de Gramíneas que han sido las más estudiadas (Akazawa y col., 1985; Akazawa y col., 1988). La electroforesis bidimensional permitió correlacionar el pI con la M.M. de algunas de las isoformas.

La heterogeneidad de las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana observada en los respectivos zimogramas no se puede atribuir a un artificio producido por una acción proteolítica sobre la  $\alpha$ -amilasa porque durante el proceso de extracción y purificación de la enzima el extracto se calentó a 70°C, temperatura a la cual las proteasas se destruyen y se usaron diversos inhibidores de proteasas que inhiben a distintas clases de proteasas, lo cual permite rechazar la posibilidad de degradación parcial de la forma original. Además, de acuerdo al análisis de la composición de aminoácidos obtenida de las isoenzimas de M.M. de 53,5; 50,2 y 47,0 kDa, se observó una apreciable diferencia entre ellas en el número de residuos de asparragina/ácido aspártico, glicina, serina, prolina y glutamina/ácido glutámico presente. Esta diferencia en el número de los aminoácidos anteriormente mencionados, es un argumento más para señalar que se trata de isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa.

La cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa permitió separar las isoformas de mayor actividad bajo condiciones de elución diferente. La isoenzima de  $R_m$  0,43 cuyo  $pI$  es 5,1 y M.M. 47,0 kDa eluyó a una fuerza iónica inferior adicionando al amortiguador de elución  $CaCl_2$  5 mM y posteriormente una solución de  $CaCl_2$  10 mM, diferente a la condición de elución aplicada para separar aquella con  $R_m$  de 0,49 con  $pI$  4,8, la cual es obtenida pura cuando el medio de elución presenta 10 mM de  $CaCl_2$  y la fuerza iónica del amortiguador de elución es mayor en la fracción recogida. Esto permite señalar que una determinada concentración de calcio ejerce una elución selectiva reflejando diferencias en la distribución de carga sobre la superficie de cada una de estas isoenzimas. Esta diferencia en la carga podría afectar la ubicación topográfica de estas isoenzimas sobre el amiloplasto o al interior de éste, ya que la ubicación de la  $\alpha$ -amilasa en diferentes compartimentos celulares probablemente es posible por la distribución específica de cargas en la superficie de la molécula. Un cambio en la distribución de la carga produciría diferentes asociaciones macromoleculares y, por consiguiente, alteraría la ubicación en la célula. Además, la estabilidad de la enzima dentro de la célula puede depender de asociaciones estables con otras moléculas, que pueden ser controladas por la distribución de cargas (Markert, 1975).

Para obtener mayor información de la estructura primaria de estas isoenzimas, se evaluó la composición aminoacídica de las isoformas de 53,5; 50,2 y 47,0 kDa. La proteína de 53,5 kDa cuyo pI es de 5,8 presenta un 7,1% de aminoácidos básicos (lisina, histidina y arginina) y un 19% de aminoácidos ácidos (aspártico y glutámico). La proteína de 50,2 kDa con pI de 5,6 presenta un 8,9% de aminoácidos básicos y un 24% de aminoácidos ácidos y la proteína de 47,0 kDa la más aniónica respecto a las otras dos, con un pI de 5,1 contiene un 7,6% de aminoácidos básicos y 23,1% de aminoácidos ácidos, lo que podría ser la causa de la diferencia encontrada en los pI de estas isoenzimas, porque difieren en el contenido de aminoácidos con grupos ionizables. Además, podría haber una diferencia entre ellas respecto a la exposición de los grupos carboxílicos, presentando una mayor exposición de estos grupos en aquella con M.M. de 47,0 kDa y pI 5,1. Así mismo, se debe considerar la diferencia de amidas de los residuos de ácido glutámico y ácido aspártico que cada una de las formas presenta. Esta diferencia podría estar influyendo en la carga de la proteína y, por consiguiente en su pI. El grado de amidación presente en cada isoenzima no se puede conocer, porque al hidrolizar las proteínas para realizar este análisis, las amidas se hidrolizan transformándose en los ácidos correspondientes. Los resultados de estos análisis, sin embargo,

no permiten establecer cuántas amidas o ácidos carboxílicos de asparragina/ácido aspártico y glutamina/ácido glutámico existen en la estructura nativa de las isoformas.

La composición aminoacídica de las tres isoformas analizadas, revela un alto contenido en glicina y de residuos de prolina, los cuales pueden influir en la conformación de cada una de las cadenas polipeptídicas, ya que la glicina determina conformación de lámina plegada y la prolina determina torsiones angulares. La presencia de treonina y lisina pueden jugar un rol similar porque estos aminoácidos desestabilizan la configuración de  $\alpha$ -hélice.

La composición aminoacídica de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana muestra contenidos relativamente altos de aspartato/asparragina y de glicina y esta tendencia también es hallada en la  $\alpha$ -amilasa de cebada (Rodaway, 1978) y trigo (Tkachuck y Kruger, 1974). El alto contenido de aspartato/asparragina encontrado en la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana (9,9 a 15,8%) es una característica propia de todas las  $\alpha$ -amilasas. En todas ellas se ha encontrado un valor superior al 9,8% hallado para estos dos aminoácidos, según una recopilación de datos y análisis realizado por Dayhoff y col. (1978) sobre 314 proteínas diferentes.

Aunque la composición aminoacídica no permite concluir sobre la estructura secundaria y terciaria, como lo permite la determinación de la secuencia, la composición aminoacídica

analizada por la relación de Cornish-Bowden (1983) permite saber el grado de relación que puede tener una proteína respecto a otra. Con tal finalidad, Cornish-Bowden ha propuesto utilizar la siguiente relación:

$$S\Delta n = 1/2 \sum (N_{iA} - n_{iB})^2$$

en que A y B son dos proteínas que contienen  $N_A$  y  $N_B$  residuos aminoacídicos totales, respectivamente. Cada una de ellas presenta  $n_{iA}$  en A,  $n_{iB}$  en B correspondiendo al tipo de aminoácido, para valores de  $i=1-18$  (18 tipos de aminoácidos comúnmente distinguidos en las determinaciones de las composiciones aminoacídicas).

De acuerdo a la ecuación anterior, considera que si:

- 1 -  $S\Delta n$  es menor que  $0,42 N$ , las proteínas analizadas están muy relacionadas.
- 2 -  $S\Delta n$  presenta un valor entre  $0,42 N$  y  $0,93 N$  la relación entre las proteínas es débil.
- 3 -  $S\Delta n$  es mayor que  $0,93 N$  la composición aminoacídica no proporcionaría las bases para pensar que entre ellas existe algún grado de relación.

El valor  $S\Delta n$  para las isoenzimas de A. araucana de 50,2 y 53,5 kDa y el correspondiente para las isoenzimas de 47,0 y 53,5 kDa son de 1,1 y 1,2 respectivamente, indicando que la composición aminoacídica no permite sostener que existe una

relación entre ellas. En cambio, la composición de aminoácidos indica que hay un grado de relación entre la isoenzima de 47,0 y 50,2 kDa de A. araucana ya que  $S\Delta n$  da un valor de 0,47. Ahora si este índice es comparado entre las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana de 47,0; 50,2 y 53,5 kDa con la  $\alpha$ -amilasa de Vigna radiata de 45 kDa (Dicotiledónea) los valores oscilan entre 2,1 y 3,0. Por otro lado, el análisis entre las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana y las isoformas de alto y bajo pI de Hordeum vulgare (Monocotiledónea) los valores obtenidos varían entre 1,9 y 3,6. Por consiguiente, las tres isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana por estos análisis no parecieran estar relacionadas a las  $\alpha$ -amilasas de Vigna radiata, ni a las de Hordeum vulgare.

El análisis inmunológico de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana realizado con anticuerpos policlonales generados contra ambos grupos de isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de cebada demuestra que hay inmunoreacción cruzada entre ellos y todas las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana siempre y cuando se aumente la concentración de las isoformas de A. araucana y del anticuerpo primario. Esto demuestra que ambas  $\alpha$ -amilasas presentan similitudes antigénicas. Esta inmunoreacción cruzada obtenida permite señalar que la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana y cebada son parecidas en la proteína o en la porción oligosacárida que tiene cada una de las enzimas. Dicho análisis demuestra la presencia de

regiones o dominios conservados en ambas enzimas a pesar de existir entre ambas especies vegetales una gran distancia filogenética. Esta distancia filogenética por lo demás, es corroborada porque hay treinta veces más identidad entre los anticuerpos de cebada con sus respectivas enzimas que con las  $\alpha$ -amilasas de A. araucana.

$\alpha$ -amilasa de A. araucana incubada con anticuerpos específicos contra las isoenzimas de cebada de bajo pI y con anticuerpos específicos contra las isoenzimas de alto pI (resultados no mostrados), confirma que las  $\alpha$ -amilasa de A. araucana están relacionadas inmunoquímicamente con ambos grupos de  $\alpha$ -amilasa de cebada. Este experimento sustenta además la presencia de las múltiples isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa presentes en las semillas de A. araucana, las cuales no son producto de las técnicas de aislamiento ni tampoco se deben a la acción de una proteasa existente en el extracto.

Comparaciones realizadas entre las secuencias de la  $\alpha$ -amilasa de insectos y mamíferos muestran que éstas enzimas presentan un alto grado de conservación evolutiva respecto a otros genes analizados, tal como rodopsina (Zucker y col., 1985) alcohol deshidrogenasa (Kreitman, 1983) y ribonucleasa informada recientemente por Beintema y col. (1986).

Todas las  $\alpha$ -amilasas de animales, insectos, plantas y bacterias contienen regiones pequeñas de homología, sugiriendo que éstos genes están lejanamente relacionados y que hay fuertes restricciones sobre los residuos del sitio activo de la enzima (Hickey y col., 1987).

La secuencia aminoacídica del extremo amino terminal de las isoenzimas de M.M. de 53,5; 50,2 y 47,0 kDa es idéntica tal cual ocurre con la región  $\text{NH}_2$  terminal de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de cebada (O'Neill y col., 1990). Este resultado indica que la secuencia  $\text{NH}_2$  terminal en cada uno de estos grupos:  $\alpha$ -amilasa de A. araucana (Gimnospermas) y la  $\alpha$ -amilasa de cebada (Angiosperma) es conservada. Si bien existe una gran disimilitud al comparar las secuencias  $\text{NH}_2$  terminal de las isoenzimas de A. araucana con las de Gramíneas, en ambas se halla aproximadamente un 50% de aminoácidos hidrofóbicos. Esta disimilitud es obvio que esté restringida a la región  $\text{NH}_2$  terminal entre las  $\alpha$ -amilasas de gramíneas y las de A. araucana, pues estos dos grupos están evolutivamente distantes. Las secuencias comúnmente conservadas entre organismos evolutivamente lejanos son las regiones críticas, las cuales son funcionalmente importantes para estas proteínas.

Rogers (1985) analizó las secuencias aminoacídicas de las  $\alpha$ -amilasas de tres grupos de organismos evolutivamente distantes, tales como mamíferos, plantas y bacterias. El encontró que todas

las  $\alpha$ -amilasas contienen tres segmentos diferentes con secuencias bien conservadas presentes en intervalos similares a lo largo de la cadena polipeptídica; la comparación de estos segmentos realizada usando un programa de alineamiento sugiere que las similitudes entre las diferentes secuencias no son debidas al azar. El primer segmento en las enzimas de cebada contiene un sitio de unión para el calcio. Los otros segmentos comunes podrían representar regiones funcionales importantes, relacionadas quizás con el sitio activo. Sería interesante a futuro saber si en las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana se hallan estas secuencias altamente conservadas, aunque se podría especular que el segmento que contiene el sitio de unión para el calcio puede estar también presente en A. araucana, ya que es una enzima cuya actividad es dependiente de calcio.

Las seis isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana dan reacción positiva con peryodato-dansilhidrazina sugiriendo que éstas podrían ser glicoproteínas. Las isoenzimas que presentan mayor marca de dansilhidrazina incorporada, corresponden a aquellas de M.M. de 53,5 y 52,0 kDa. El tratamiento de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, previo a la electroforesis, despliega por completo cada cadena polipeptídica, lo cual permite señalar que solamente los carbohidratos unidos covalentemente al polipéptido reaccionan con el reactivo dansilhidrazina.

Actualmente existe información contradictoria con respecto a la presencia de carbohidratos unidos covalentemente a la proteína. Según Mitchell (1972) y Rodaway (1978) la  $\alpha$ -amilasa de cebada contiene carbohidratos. Mitchell estimó que la  $\alpha$ -amilasa de cebada contenía aproximadamente un 3% de carbohidratos, lo cual incluye cantidades no determinadas de glucosa, manosa, xilosa, fucosa y glucosamina. En el caso de la  $\alpha$ -amilasa de cebada de la variedad Himalaya se ha informado la presencia de N-acetilglucosamina, glucosa y manosa. Según Tkachuck y Kruger (1974) informaron que la  $\alpha$ -amilasa de trigo no contiene residuos de carbohidratos, pero en cambio presenta niveles significativos de trimetilación de los residuos de lisina (Motojima y col., 1982), mientras el sorgo tiene un 2% de carbohidratos en la molécula (Fischer y Stein, 1960).

Se ha propuesto que el oligosacárido podría permitir que la enzima glicosilada sea transportada y se localice en un lugar específico dentro de la célula. Por lo tanto, se podría especular que la glicosilación que presenta la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana permitiría posiblemente el transporte de la enzima al amiloplasto y su ubicación en una región específica de este organelo, por consiguiente, podría estar relacionada con la adhesión sobre este organelo (Markert, 1975; Wold, 1981).

Las cinco isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana de M.M. 55,2; 53,5; 52,0; 50,2 y 47,0 kDa dan fragmentos peptídicos diferentes generando tres péptidos: un fragmento más grande con un M.M. entre 26 y 25 kDa, un segundo fragmento más pequeño presenta un M.M. que oscila entre 17 y 23 kDa y un tercer segmento, aún más pequeño, con un M.M. entre 5,0 y 5,9 kDa. Sin embargo, pese a que la ruptura química de cada una de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana genera un patrón de fragmentación único, las isoenzimas de 55,2 y 50,2 kDa presentan un péptido en común de 26,0 kDa y las isoenzimas de 53,5; 52,0 y 47,0 kDa presentan un péptido similar de 25 kDa. En cambio, el segundo fragmento obtenido del tratamiento de cada una de las isoenzimas con CNBr, es el que presenta una mayor variabilidad en cuanto al tamaño del péptido obtenido, registrándose valores de 23, 21, 22, 20 y 17 kDa en las cinco isoenzimas tratadas. Respecto al tercer fragmento obtenido, se puede señalar que las isoenzimas de 55,3 y 53,5 kDa podrían presentar una metionina a igual distancia del aminoácido C-terminal o dos residuos de metionina en idéntica posición, pues presentan un péptido de igual tamaño y las otras tres isoenzimas 52,0; 50,2 y 47,0 kDa tratadas generaron péptidos con pequeñas diferencias en tamaño de 5,4; 5,2 y 5,0 kDa respectivamente. Además, es preciso señalar que de acuerdo al análisis de la secuencia amino terminal las isoformas de 53,5; 50,2 y 47,0 kDa presentan una metionina en

posición 9, de tal manera que entre ellas habría un segmento en común de 1 kDa. En este análisis se muestra que cada isoenzima genera un patrón de fragmentación único, lo cual permite señalar que cada uno de los polipéptidos difieren en su estructura primaria en la posición de los residuos de metionina. Esto refleja un cambio en la posición del codón que codifica para la metionina a nivel del DNA. Por consiguiente, estas proteínas deben generarse a partir de diferentes mRNAs producidos por expresión de diferentes genes (como en el caso de la  $\alpha$ -amilasa de Gramíneas). Sin embargo, los resultados no permiten descartar definitivamente que exista un procesamiento diferencial de un hnRNA derivado de un único gen (en  $\alpha$ -amilasa de hígado de ratón y de glándulas salivares) (Young y col., 1981). Entre estas dos posibilidades y apoyándose en el análisis de la composición aminoacídica y en el patrón peptídico obtenido al tratar las isoenzimas con CNBr se favorecería la primera de las alternativas planteadas.

Las pruebas experimentales que permiten concluir la presencia de las múltiples isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa en semillas de A. araucana son:

a. Las  $\alpha$ -amilasas extraídas en presencia de inhibidores de proteasas presentan un patrón electroforético igual a aquel

obtenido al realizar la extracción en ausencia de los inhibidores. Por consiguiente, estas proteínas no son el resultado de una acción proteolítica.

b. La composición aminoacídica de las tres isoenzimas analizadas revela que las isoformas de 53,5 y 50,5 kDa presentan diferencias cuantitativas en el número de los residuos de asparragina/ácido aspártico, serina y glicina. Las isoenzimas de 53,5 y la de 47,0 kDa, además se diferencian en el número de residuos de glutamina/ácido glutámico y prolina. Esta diferencia en el número de los residuos mencionados anteriormente es siempre igual o mayor a 10, lo cual es un argumento a favor de que se trata isoenzimas diferentes y no corresponde a un artificio del proceso de purificación o del análisis mismo que no podría explicar estas diferencias tan significativas.

c. El análisis de los mapas peptídicos obtenidos del tratamiento con CNBr demuestra que cada proteína tiene una estructura primaria distinta. Por consiguiente, las diferencias estructurales que estas proteínas presentan están condicionadas genéticamente, es decir, podrían ser el resultado de la expresión de genes diferentes.

d. El efecto regulatorio que ejercen el GA<sub>3</sub> y el ABA sobre algunas de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa presentes durante el

crecimiento temprano de la plántula, también sugiere que las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa pueden ser codificadas por diferentes genes.

Las enzimas involucradas en el metabolismo del almidón representan ejemplos clásicos de la heterogeneidad de una actividad enzimática compuesta de varias proteínas separables, que catalizan la misma reacción. A estas múltiples formas se les denomina isoenzimas. De acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC-IUB, este término estaría restringido a esas formas enzimáticas, de las cuales surgen diferencias determinadas genéticamente en la estructura primaria. Dicha definición o terminología es aplicable a la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana, pues los diferentes patrones peptídicos obtenidos al tratar las isoenzimas con CNBr y la diferencia en la composición aminoacídica permite señalar que las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana tienen secuencias primarias diferentes. Por consiguiente, la heterogeneidad de la  $\alpha$ -amilasa presente en semillas de A. araucana está basada aparentemente sobre la existencia de isoenzimas (en un sentido estricto), las cuales son codificadas por distintos genes o familias multigénicas.

El reconocimiento de la presencia de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa en la semilla y en la plántula de A. araucana lleva a plantearse la pregunta acerca de la importancia fisiológica que éstas tendrían durante la germinación de la semilla y en el

crecimiento temprano de la plántula. La respuesta no se conoce, sin embargo, uno puede especular que el almidón es un sustrato complejo el cual se halla en el amiloplasto. La degradación enzimática de las moléculas de almidón dependerá del acceso de las enzimas al sustrato. Reinero y col. (1983) han establecido que la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana está en el citosol, por consiguiente, la adsorción de las formas enzimáticas sobre el amiloplasto debe preceder para realizar la hidrólisis del sustrato. La superficie de los gránulos de almidón puede presentar una barrera a algunas formas enzimáticas, posiblemente debido al ordenamiento físico que pueden tener las cadenas de amilosa y amilopectina cercana a la superficie de éstos. Marsh y col. (1982) han demostrado las diferencias en cargas eléctricas presentes en la superficie del organelo.

Cardemil y Reinero (1982) han establecido diferencias en el tamaño de los amiloplastos en los diferentes tejidos que constituyen al embrión, encontrando que los amiloplastos, según el tejido que sea, fluctúan entre 4,3 y 7,5  $\mu\text{m}$ . En cambio, los amiloplastos del megagametofito miden 13,5  $\mu\text{m}$ . Por consiguiente, la presencia de las diferentes formas enzimáticas de la  $\alpha$ -amilasa halladas en las semillas quiescentes permitiría explicar la degradación de los amiloplastos de tamaños diferentes encontrados en distintos tejidos, que posiblemente no solamente difieren de

tamaño sino que éstos podrían presentar diferencias físicas atribuidas al contenido de amilopectina y amilosa, accesibilidad al agua y grado de cristalización del almidón.

Además, en una etapa del desarrollo, algunas de las formas tendrían una mayor afinidad por los gránulos con diferentes cantidades de amilopectina o amilosa y otras por gránulos parcialmente digeridos que contienen oligosacáridos de tamaño relativamente grande, los cuales son productos de la degradación inicial del almidón (Bertoft y col., 1982). Debido a la acción de las enzimas amilolíticas y de otras enzimas hidrolíticas que participan en las diferentes etapas del desarrollo ocurren cambios en la conformación del amiloplasto, por consiguiente, es razonable la aparición de nuevas formas enzimáticas las cuales se adsorben mejor sobre los amiloplastos parcialmente digeridos que sobre esos intactos o se adsorben mejor sobre esos que cambian de amiloplasto a cloroplasto.

#### **Efecto del ácido giberélico y ácido abscísico sobre la expresión génica de la $\alpha$ -amilasa**

El control ejercido por  $GA_3$  sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa ha sido ampliamente investigado en las células de la capa de aleurona de cebada y ha sido empleado como un sistema modelo para

explicar su modo de acción (Yomo y Varner, 1971; Ho y Varner, 1974; Rodaway, 1978; Mozer, 1980; Ho y Shih, 1980; Bernal-Lugo y col., 1981). La acción de la hormona también ha sido estudiada en otros cereales tales como arroz y trigo (Eastwood y col., 1969; Bilderback, 1974; Okamoto y Akazawa, 1979; Okamoto y col., 1980; Lowy y col., 1981). Sin embargo, el conocimiento relacionado con el control de la movilización del almidón por GA<sub>3</sub> en otras semillas es limitado (Juliano y Varner, 1969; Van der Wilden y col., 1980; Leung y col., 1982; Chrispeels y col. 1982). En las coníferas los únicos datos aportados son en A. araucana, Pinus ponderosa y Pinus sylvestris. En A. araucana se ha informado la presencia de un factor con características de hormona extraído de los embriones de la semilla (Cardemil y Jordan, 1982). Este factor estimula los cambios morfológicos y aumenta alguna de las enzimas presentes en el megagametofito en cultivo cuando el extracto embrionario es aplicado al medio. Sin embargo, en P. ponderosa este factor no parece ser la giberelina porque la aplicación de GA<sub>3</sub> no reemplaza al embrión o al eje embrionario (Bilderback, 1974). En P. sylvestris, Nyman (1971) también ha investigado la influencia del embrión sobre la actividad de la  $\alpha$ -amilasa del tejido gametofítico y encontró que la aplicación de GA<sub>3</sub> no puede sustituir la presencia del embrión.

Reinero y col. (1983) han señalado que hay una correlación entre el aumento en la actividad de  $\alpha$ -amilasa y el aumento en los niveles de giberelinas durante las 40 hrs de imbibición de la semilla.

En esta tesis se observó que CCC, inhibidor de la síntesis de giberelinas, afecta la producción de la  $\alpha$ -amilasa de plántulas de A. araucana respecto a las plántulas controles regadas con agua durante este tiempo. La ausencia de giberelinas afectó la expresión de tres de las ocho isoenzimas presentes en la plántula y el resto de las isoenzimas disminuyó su actividad. Por consiguiente, la expresión de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de la plántula es dependiente de la presencia de giberelinas. En cambio, CCC no afectó la actividad de la  $\alpha$ -amilasa extraída del megagametofito embebido en dicho inhibidor y no se observaron cambios en el patrón electroforético realizado con los diferentes extractos enzimáticos obtenidos de los megagametofitos tratados y los no tratados con el inhibidor. El tejido megagametofítico, posee una epidermis cutinizada y presenta mucha reserva de almidón. Debido a las características de este tejido, es factible que la absorción de CCC y de la hormona aplicada al medio sea limitada.

Debido a que  $GA_3$  y ABA son reguladores antagónicos de un número de respuestas en capas de aleurona (Johnson y col., 1971; Nolan y col., 1988), es posible que los efectos de ABA sobre la

expresión de la  $\alpha$ -amilasa pueden ser análogos a la remoción de  $GA_3$ . Sin embargo, el tratamiento de semillas de A. araucana con ABA durante 90 hrs afectó la producción principalmente de la isoenzima con  $R_m$  de 0,51 teniendo un efecto leve sobre las formas restantes presentes a este tiempo. En cambio, la remoción de  $GA_3$  provoca la desaparición de tres isoformas viéndose afectada la actividad de la misma isoenzima de  $R_m$  0,51 durante el tratamiento con ABA. Estos resultados llevan a concluir que  $GA_3$  y ABA ejercen un control sobre la expresión génica de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa presentes en la plántula de A. araucana. La actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa del megagametofito no se vio afectada por el inhibidor de la síntesis de giberelinas ni por ácido abscísico. Esto podría deberse a que la regulación de la expresión en el megagametofito es diferente a aquella encontrada en el embrión. Las diferencias en la regulación de la expresión génica podrían deberse a las diferencias fisiológicas que se empiezan a establecer entre ambos tejidos por diferenciación de los tejidos embrionarios durante el proceso de germinación. Además, es preciso señalar que el megagametofito contiene una gran cantidad de material de reserva, razón por la cual es un tejido muy compacto, lo que podría impedir el acceso del inhibidor y de la hormona.

Las plántulas que emergen de las semillas tratadas con ABA son más pequeñas que aquéllas regadas durante ese tiempo con agua. Por consiguiente, la elongación del eje embrionario es dependiente de la síntesis de GA<sub>3</sub>.

En las semillas de cebada, según Higgins y col. (1982) y Mozer (1980) han informado que el ácido abscísico produce efectos inhibitorios tanto a nivel de la síntesis del mRNA como a nivel de la síntesis de proteínas. Ho (1985) ha propuesto que el ABA induce una(s) proteína(s) que puede(n) estar encargada(s) de la conversión metabólica de ABA a ácido faseico, el cual puede inhibir la producción de la  $\alpha$ -amilasa estimulada por GA<sub>3</sub>. Hejgaard y col. (1983), Mundy (1984), Mundy y col. (1983) han propuesto que el ABA induce la síntesis de un inhibidor. Ellos proponen que el inhibidor puede funcionar como un regulador activo de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa durante la germinación y crecimiento temprano de la plántula. Sin embargo, existen muchos antecedentes que permiten afirmar que el efecto antagónico entre giberelina y ácido abscísico en capas de aleurona es a nivel transcripcional del gen de  $\alpha$ -amilasa. Los resultados obtenidos del tratamiento de las semillas A. araucana con cada una de estas hormonas no permite afirmar si se trata de un control transcripcional o traduccional o sobre los dos procesos.

Las conclusiones obtenidas en esta tesis permiten señalar que:

- 1 - Las semillas quiescentes de A. araucana presentan seis isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa, cuyos puntos isoeléctricos son de 6,0; 5,8; 5,6; 5,1; 5,0 y 4,8.
- 2 - Las masas moleculares de las isoenzimas, fluctúan entre 45,7 y 55,2 kDA.
- 3 - Estas isoenzimas son ricas en glicina, ácido aspártico/asparragina, alanina, serina, prolina y ácido glutámico/glutamina.
- 4 - Las secuencias aminoacídicas NH<sub>2</sub> terminal de las tres isoenzimas analizadas son idénticas entre ellas y distintas a la  $\alpha$ -amilasa de Gramíneas.
- 5 - Anticuerpos policlonales contra las  $\alpha$ -amilasas de alto y bajo pI de cebada dan inmunoreacción cruzada con las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana, existiendo una menor reacción de identidad del anticuerpo por la proteína de A. araucana que con las de cebada, lo que permite deducir que hay partes conservadas de la molécula.
- 6 - Análisis de los mapas peptídicos obtenidos al tratar las isoenzimas con CNBr sugiere que hay similitudes y diferencias genéticas entre ellas.
- 7 - Las seis isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana reaccionan con peryodato-dansilhidrazina, sugiriendo que estas podrían ser glicoproteínas.

8 - Inhibidores de la síntesis de giberelinas inhiben la expresión génica de tres de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de la plántula y disminuye significativamente la expresión de las otras presentes en ella. Acido giberélico agregado al medio de incubación de las semillas tratadas con CCC, permitió la recuperación de la actividad amilásica y la expresión de todas las isoformas presentes a esa edad de la plántula. De ésto se concluye que la expresión génica de estas isoenzimas es regulada por ácido giberélico.

9 - Acido abscísico afecta la expresión génica de todas las isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa de la plántula de A. araucana.

La actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa del megagametofito no se vio afectada por el inhibidor de la síntesis de giberelinas ni por ABA.

10 - Los experimentos realizados no permiten señalar si  $GA_3$  y ABA afectan la expresión génica de la  $\alpha$ -amilasa en la plántula de A. araucana a nivel transcripcional o traduccional, ya que solamente se cuantificó una disminución de su actividad, que podría ser reflejo de un control a nivel de uno o de los dos procesos señalados anteriormente.

Los resultados relacionados con la caracterización parcial de la estructura de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa presente en el embrión y en el megagametofito de la semilla de A. araucana junto a aquéllos que indican que tanto  $GA_3$  y ABA controlan la expresión

de  $\alpha$ -amilasa, permiten apoyar las dos hipótesis planteadas. La existencia de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa en semillas de A. araucana es dependiente de la presencia de diferentes genes o grupos de genes estructurales y la regulación de éstos en la plántula estaría bajo control hormonal.

Experimentos adicionales deberían realizarse para dilucidar la posible existencia de diferentes poblaciones de mRNAs codificados por varios genes estructurales y diferencialmente afectados por las hormonas, ácido giberélico y ácido abscísico. Para este propósito, la obtención de cDNA específicos para los diferentes mRNAs de la  $\alpha$ -amilasa sería particularmente útil. Además del análisis del número de genes que codifican para las  $\alpha$ -amilasas presentes en el embrión de las semillas de A. araucana y consecuentemente la existencia de diferencias en los mRNAs de la  $\alpha$ -amilasa, deberían realizarse experimentos adicionales con la finalidad de analizar la contribución que tienen las modificaciones postraduccionales en la presencia de las diferentes isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa. Estudios de este tipo nos permitirá un análisis más detallado de la expresión de las isoenzimas de la  $\alpha$ -amilasa de A. araucana y del efecto de las hormonas sobre las isoenzimas específicas de la  $\alpha$ -amilasa.

## BIBLIOGRAFIA

Abdel-Akher, M., Hamilton, J.K., Montgomery, R., y Smith, F. (1952) A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 4970-4971.

Akazawa, T. y Hara-Nishimura, I. (1985) Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 441-472.

Akazawa, T., Mitsui T. y Hayashi, M. (1988) Recent progress in  $\alpha$ -amylase biosynthesis. En "The Biochemistry of Plants" 14, Press J., ed., Academic Press, New York, 465-492.

Aoyagi, K., Sticher, L., Wu, M. y Jones, R. (1990) The expression of barley  $\alpha$ -amylase genes in Xenopus laevis oocytes. *Planta* 180: 333-340.

Beers, E. y Duke, S.H. (1990) Characterization of  $\alpha$ -amylase from shoots and cotyledons of pea (Pisum sativum L.) seedlings. *Plant Physiol.* 92: 1154-1163.

Beintema, J.J., Fitch, W.M. y Carsana, A. (1986) Molecular evolution of pancreatic-type ribonucleases. *Mol. Biol. Evol.* 3: 262-275.

Belanger, F.C., Brodl, M.R. y Ho, T.H.D. (1986) Heat shock causes destabilization of specific mRNAs and destruction of endoplasmic reticulum in barley aleurone cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1354-1358.

Bernal-Lugo, I., Beachy, R.N. y Varner, J.E. (1981) The response of barley aleurone layers to gibberellic acid included the transcription of new sequences. *Biophys. Res. Comm.* 102: 617-623.

Bernfeld, P. (1951) Enzymes of starch degradation and synthesis. En: "Advances in Enzymology", Vol. 12, pp. 380-424. FF. Nord (ed.) Interscience Publisher Ltd., London.

Bertoft, E. y Henriknäs, H. (1982) Initial stages in  $\alpha$ -amylolysis of barley starch. *J. Inst. Brew.* 88: 262-265.

Bewley, J.D. y Black, M. (1978) Development, Germination and Growth. En: "Physiology and Biochemistry of Seeds". Vol. 1, pp.1-6. Berlin Heidelberg New York. Springer Verlag.

Bilderback, D.E. (1973) A simple method to differentiate between  $\alpha$  and  $\beta$ -amylase. *Plant Physiol.* 51: 594-595.

Bilderback, D.E. (1974) The regulatory role of the embryo on the development of isocitrate lyase activity during germination of Ponderosa pine seed. *Physiol. Plant.* 31: 200-203.

Bog-Hansen, T.C. y Daussant, J. (1974) Immunochemical quantitation of isoenzymes.  $\alpha$ -amylase isoenzymes in barley malt. *Anal. Biochem.* 61: 522-527.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bush, D.S., Cornejo, M.J., Huang, C.N. y Jones, R.L. (1986)  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated secretion of  $\alpha$ -amylase during development in barley aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 82: 566-574.

Bush, D., Sticher, L., Van Huystee, R., Wagner, D. y Jones, R. (1989) The calcium requirement for stability and enzymatic of two isoforms of barley aleurone  $\alpha$ -amylase. *J. Biol. Chem.* 264: 19392-19398.

\* Callis, J. y Ho, T.H.D. (1983) Multiple molecular forms of the gibberellin-induced  $\alpha$ -amylase from the aleurone layers of barley seeds. Arch. Biochem. Biophys. 224: 224-234.

Cardemil, L. y Reinerio, A. (1982) Changes in Araucaria araucana (Mol.) Koch seeds reserves during germination and early seedling growth. Can. J. Bot. 60: 1629-1638.

Cardemil, L. y Jordan, M. (1982) Light and electron microscopic study of in vitro cultured female gametophyte of Araucaria araucana (Mol.) Koch seeds. Z. Pflanzenphysiol. 107: 329-338.

Cardemil, L. y Varner, J.E. (1984) Starch degradation metabolism towards sucrose synthesis in germinating Araucaria araucana seeds. Plant Physiol. 76: 1047-1054.

Chandler, P.M., Zwar, J.A., Jacobsen, J.V., Higgins, T.J.V. e Inglis, A.S. (1984) The effect of gibberellic acid and abscisic acid on  $\alpha$ -amylase mRNA levels in barley aleurone layers. Studies using an  $\alpha$ -amylase cDNA clone. Plant Mol. Biol. 3: 407-418.

Chrispeels, M.J. y Varner, J.E. (1966) Inhibition of gibberellic acid induced formation of  $\alpha$ -amylase by abscission II. Nature 212: 1066-1067.

Chrispeels, M.J. y Varner, J.E. (1967) Gibberellic-acid enhanced synthesis and release of  $\alpha$ -amylase and ribonuclease by isolated aleurone layers. *Plant Physiol.* 42: 398-406.

Chrispeels, M.J., Higgins, T.J.V., Craig, S. y Spencer, D. (1982) Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetics of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons. *J. Cell Biol.* 93: 5-14.

Cornish-Bowden, A. (1983) Relatings proteins by amino acid composition. En "Methods in Enzymology", Vol. 91 "Enzyme Structure", Part I, pp. 60-75. Hirs, C.H.W., Timasheff, S.N. (eds.).

Dayhoff, M.O., Hunt, L.T. y Hurst-Calderone, S. (1978) "Atlas of protein sequence and structure". Vol. 5, suppl. 3 (ed. Dayhoff, M.O.) 363.

Eastwood, D., Tavener, R.J.A. y Laidman, D.L. (1969) Sequential action of cytokinin and gibberellic acid in wheat aleurone tissue. *Nature* 221: 1267-1270.

Estep, T.N. y Miller, T.J. (1986) Optimization of erythrocyte membrane glycoprotein fluorescent labeling with dansylhydrazine after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 157: 100-105.

Eckhardt, A.E., Hayes, C.E. y Goldstein, I.J. (1976) A sensitive fluorescent method for the detection of glycoproteins in polyacrilamide gels. Anal. Biochem. 73: 192-197.

Filner, P. y Varner, J.E. (1976) A test for the novo synthesis of enzymes: Density labeling with  $H_2O^{18}$  of barley  $\alpha$ -amylase induced by gibberellic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. 58: 1520-1525.

Fischer, E. y Stein, E. (1960)  $\alpha$ -amylases. En: "The Enzymes", Vol. 4, part A. 1a. ed., pp. 313-343. Boyer, P., Lardy, H. y Myrback, K. (eds.).

Fling, S.P. y Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. Anal. Biochem. 155: 83-88.

French, D. (1960)  $\alpha$ -amylases. En: "The Enzymes", Vol. 4, part A. 1a. ed., pp. 345-368. Boyer, P., Lardy, H. y Myrback, K. (eds.).

Hejgaard, J., Svendsen, I. y Mundy, J. (1983) Barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor. II N-terminal amino acid sequence and homology with inhibitors of the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family. Carlsberg. Res. Commun. 48: 91-94.

Hickey, D.A., Benkel, B.F., Boer, P.H., Genest, Y., Abukashawa, S. y Ben-David, G. (1987) Enzyme-coding genes as molecular clocks: The molecular evolution of animal alpha-amylases. J. Mol. Evol. 26: 252-256.

Higgins, T.J.V., Zwar, J.A. y Jacobsen, J.V. (1976) Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for  $\alpha$ -amylase in barley aleurone layers. Nature 260: 166-169.

Higgins, T.J.V., Jacobsen, J.V. y Zwar, J.A. (1982) Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA levels in barley aleurone layers. Plant Mol. Biol. 1: 191-215.

Ho, D.T.H. y Varner, J.E. (1974) Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 4783-4786.

Ho, D.T.H. y Varner, J.E. (1978) Density labeling of proteins with  $^{13}\text{C}$ -labeled aminoacids. Arch. Biochem. Biophys. 187: 441-446.

Ho, D.T.H. (1979) Hormonal control of enzyme formation in barley aleurone layers. En: "Molecular Biology of Plants". Rubenstein, I., Phillips, R.L., Green, C.E. y Gengenbach, B.G. eds. Academic Press, New York, pp. 217-239.

Ho, D.T.H., Shih, S.C. y Kleinhofs, A. (1980) Screening for barley mutants with altered hormone sensitivity in their aleurone layers. Plant Physiol. 66: 153-157.

Ho, D.T.H. (1985) Hormonal and genetic regulation of  $\alpha$ -amylase synthesis in the aleurone layers of cereal grains. En: "New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates", pp. 121-128. Hilland, R.D. y Munck, L. (ed.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Ho, D.T.H., Nolan, R.C., Lin, L.S., Brodl, M.R. y Brown, P.H. (1987) Regulation of gene expression in barley aleurone layers. En: "Molecular Biology of Plant Growth Control" - UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. (NS), ed. Fox, J.E. y Jacobs, M. 44: 35-49. New York, Liss.

Hsiu, J., Fischer, E.H. y Stein, E.A. (1964). Alpha-amylases as calcium-metalloenzymes. II. Calcium and the catalytic activity. *Biochemistry* 3: 61-66.

- Jacobsen, J.V., Scandalios, J.G. y Varner, J.E. (1970) Multiple forms of amylase induced by gibberellic acid in isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 45: 367-371.
- Jacobsen, J.V. y Higgins, T.J.V. (1982) Characterization of the  $\alpha$ -amylases synthesized by aleurone layers of Himalaya barley in response to GA<sub>3</sub>. *Plant Physiol.* 70: 1647-1653.

Jacobsen, J.V. y Beach, L.R. (1985) Control of transcription of  $\alpha$ -amylase and rRNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellin and abscisic acid. *Nature* 316: 275-277.

Jacobsen, J.V., Zwar, J.A. y Chandler, P.M. (1985) Gibberellic-acid responsive protoplasts from mature aleurone of Himalaya barley. *Planta* 163: 430-438.

Jacobsen, J.V. y Chandler, P.M. (1987) Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. En: "Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development". Davies, P.J. ed. Martinus-Nijhoff, Norwell, M.A., pp. 164-193.

Jacobsen, J.V., Bush, D.S. y Jones, R.L. (1988) Evidence for precursor forms of the low isoelectric point  $\alpha$ -amylase isozymes secreted by barley aleurone cells. *Plant Physiol.* 88: 1168-1174.

Jahnen, W., Ward, L.D., Reid, G.E., Moritz, R.L. y Simpson, R.J. (1990) Internal amino acid sequencing of proteins by in situ cyanogen bromide cleavage in polyacrilamide gels. *Biochem. Biophys. Commun.* 166: 139-145.

Johnson, K.D. y Kende, H. (1971) Hormonal control of lecithin synthesis in barley aleurone cells: regulation of the CDP-choline pathway by gibberellin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 11: 2674-2677.

Jones, R.L. y Varner, J.E. (1967) The bioassay of gibberellins. *Planta* 72: 155-161.

Jones, R.L. (1969) Gibberellic acid and the fine structure of barley aleurone layers. II Changes during the synthesis and secretion of  $\alpha$ -amylase. *Planta* 88: 73-86.

Juliano, B.O. y Varner, J.E. (1969) Enzymic degradation of starch granules in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiol.* 44: 886-892.

Koshiha, T. y Minamikawa, T. (1981) Purification by affinity chromatography of  $\alpha$ -amylase. A main amylase in cotyledons of germinating Vigna mingo seeds. *Plant Cell Physiol.* 22: 979-987.

Kreitman, M. (1983) Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase gene of Drosophila melanogaster. *Nature* 304: 412-417.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685.

Leung, D.W.M., Bewley, J.D. y Reid, J.S.G. (1982) Mobilization of the major stored reserves in the embryo of ternugreek (Trigonella foenum-graecum L., Leguminosae), and correlated enzymes activities. *Planta* 153: 95-100.

Lowy, G., Sargeant, J.G. y Schofield, J.D. (1981) Wheat starch granule protein, the isolation and characterization of a salt extractable protein from starch granules. J. Sci. Food Agric. 32: 371-377.

Lozada, R. y Cardemil, L. (1983) Mechanism of sucrose transport by seedling cotyledons of Araucaria araucana (Mol.) Koch. Plant Physiol. 72: 394-396.

Mac Gregor, A.W. (1977) Isolation, purification and electrophoretic properties of an  $\alpha$ -amylase from malted barley. J. Inst. Brew. 83: 100-103.

Mac Gregor, A.W. y Lenoir, C. (1987) Studies on  $\alpha$ -glucosidase in barley and malt. J. Inst. Brew. 93: 334-337.

Mac Gregor, E.A. y Mac Gregor, A.W. (1987) Studies of cerebral  $\alpha$ -amylase using cloned DNA. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 5: 129-142.

Markert, C.L. (1975) Biology of isozymes. Pags 1-8 En C.L. Markert, ed. Isozymes I. Molecular Structure. Academic Press, New York.

Marsh, R.A. y Waight, S.G. (1982) The effect of pH on the zeta potential of wheat and potato starch. *Starch* 34: 149-152.

Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038.

Mitchell, E. (1972) Homogeneous  $\alpha$ -amylase from malted barley. *Phytochemistry* 11: 1673-1676.

Mitsui, T., Akazawa, T., Christeller, J.T., Hara-Nishimura, I. y Akazawa, T. (1985) Biosynthesis of rice seed  $\alpha$ -amylase secretion by the scutellum. *Arch. Biochem. Biophys.* 241: 315-328.

Motojima, K. y Sakaguchi, K. (1982) Part of the lysil residues in wheat  $\alpha$ -amylase is methylated as N- -trymetil lysine. *Plant Cell Physiol.* 23: 709-712.

Mozer, T.J. (1980) Control of protein synthesis in barley aleurone layers by the plant hormones gibberellic acid and abscisic acid. *Cell* 20: 479-485.

Mundy, J., Svendsen, I. y Hejgaard, J. (1983) Barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization. Carlsberg Res. Commun. 48: 81-90.

Mundy, J. (1984) Hormonal regulation of  $\alpha$ -amylase inhibitor of synthesis of germinating barley. Carlsberg Res. Commun. 49: 439-444.

Muthukrishnan, S., Chandra, G.R. y Albaugh, G.P. (1979) Hormone-induced increase in levels of functional mRNA and  $\alpha$ -amylase mRNA in barley aleurones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6181-6185.

Muthukrishnan, S., Gill, B.S., Swegle, M. y Chandra, G.R. (1984) Structural genes for  $\alpha$ -amylases are located on barley chromosomes 1 and 6. J. Biol. Chem. 259: 13637-13639.

Nielsen, B.L. y Brown, L. (1984) The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 141: 311-315.

Nolan, R.C. y Ho, D.T.H. (1988) Hormonal regulation of gene expression in barley aleurone layers. Planta 174: 551-560.

Nyman, B. (1971) Light, seeds coat and gibberellic acid in relation to the amylase activity in germinating Scots pine seeds (Pinus silvestris). Plant Physiol. 25: 112-117.

Okamoto, K. y Akazawa, T. (1979) Enzymic mechanisms of starch breakdown in germinating rice seeds. 7. Amylase formation in the epithelium. Plant Physiol. 63: 336-340.

Okamoto, K. y Akazawa, T. (1980) Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. 9. De novo synthesis of  $\beta$ -amylase. Plant. Physiol. 65: 81-84.

O'Neill, S.D., Kumagai, M.H., Majumdar, A., Huang, N., Sutliff, T.D. y Rodríguez, R.L. (1990) The  $\alpha$ -amylase genes in Oryza sativa. Characterization of cDNA clones and mRNA expression during seed germination. Mol. Gen. Genet. 221: 235-244.

Pearce, S.L. Bands, B.C., Bandthorepe, D.V., Davis, B. y Vernon, C.A. (1972) The isolation and characterization fo nerve growth factor from the renom of Vipera ruselli. Eur. J. Biochem. 29: 417-425.

Preiss, J. (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. Annu. Rev. Plant Physiol. 33: 431-454.

Reinero, A., Balboa, O. y Cardemil, L. (1983) Characterization of the amylolytic activity of Araucaria araucana (Mol.) Koch germinating seeds. *Plant Cell Physiol.* 24: 456-465.

Rodaway, S. (1978) Composition of  $\alpha$ -amylase secreted by aleurone layers of grains of Himalaya barley. *Phytochemistry* 17: 385-389.

Rogers, J.C. y Milliman, C. (1983) Isolation and sequence analysis of a barley  $\alpha$ -amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 258: 2370-2375.

Rogers, J.C. (1985) Two barley alpha amylase genes are regulated differently in aleurone cells. *J. Biol. Chem.* 260: 3731-3738.

Salas, E. y Cardemil, L. (1986) The multiple forms of  $\alpha$ -amylase enzyme of the Araucaria species of South America: A. araucana (Mol.) Koch and A. angustifolia (Bert.) O. Kutz. *Plant Physiol.* 81: 1062-1068.

Sargeant, J.G. (1979) The  $\alpha$ -amylase isoenzymes of developing and germinating wheat grain. En: "Recent Advances in the Biochemistry of Cereals". pp. 339-343. Laidman, D.L. and R.G. Wyn Jones (eds.). Academic Press, London, New York, San Francisco.

Schramm, M. y Loyter, A. (1966) Purification of  $\alpha$ -amylases by precipitation of  $\alpha$ -amylase-glycogen complexes. Meth. Enzymol. 8: 533-537.

Silvanovich, M.P. y Hill, R.D. (1976) Affinity chromatography of cereal  $\alpha$ -amylase. Anal. Biochem. 73: 430-433.

Simon, P. y Jones, R.L. (1988) Synthesis and secretion of catalytically active barley  $\alpha$ -amylase isoforms by Xenopus oocytes injected with barley mRNAs. Eur. J. Cell Biol. 47: 213-221.

Spencer, D., Higgins, T.J.V., Button, S.C. y Davey, R.A. (1980) Pulse-labeling studies on protein synthesis in developing pea seeds and evidence of a precursor form of legumin small subunit. Plant Physiol. 66: 510-515.

Steer, M.L. y Levitzki, A. (1973) The metal specificity of mammalian  $\alpha$ -amylase as revealed by enzyme activity and structural probes. FEBS Lett. 31: 89-92.

Sun, Z. y Henson, C.A. (1990) Degradation of native starch granules by barley  $\alpha$ -glucosidases. Plant Physiol. 94: 320-327.

Tanaka, Y. y Akazawa, T. (1970)  $\alpha$ -amylase isoenzymes in gibberellic acid-treated barley half-seeds. *Plant Physiol.* 46: 586-591.

Thoma, J.A., Spradlin, J.E. y Dygert, S. (1971) Plant and animal amylases. En: P.S. Boyer, ed. *The Enzymes*, Ed. 3, Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 115-189.

Tkachuck, R. y Kruger, J.E. (1974) Wheat  $\alpha$ -amylases II. Physical characterization. *Cereal Chem.* 51: 508-529.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.

Van der Wilden, W., Gilkes, N.R. y Chrispeels, M.J. (1980) The endoplasmic reticulum of mung bean cotyledons. Role in the acumulation of hydrolases in protein bodies during seedling growth. *Plant Physiol.* 38: 139-144.

Varner, J.E. y Ho, T.H.D. (1976) The role of hormones in the integration of seedling growth. En: "The Molecular Biology of Hormone Action", Brown, D. ed. (New York: Academic Press), pp. 173-194.

Vigil, E.L. y Ruddat, M. (1973) Effect of gibberellic acid and actinomycin D on the formation and distribution of rough endoplasmic reticulum in barley aleurone cells. *Plant Physiol.* 51: 549-558.

Vretblad, P. (1974) Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose- $\beta$ -amylase system. *FEBS Letters* 47: 86-89.

Yomo, H. y Varner, J.E. (1971) Hormonal control of a secretory tissue. In: "Current Topics in Developmental Biology", 6. Moscona, A.A. and Monroy, A. eds. (New York: Academic Press), pp. 111-144.

Wold, F. (1981) In vivo chemical modification of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 783-814.

Wolfson, M.L. y Thompson, A. (1956) Occurrence of the (1-3)-linkage in starches. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 4116-4117.

Young, R.A., Hagenbüchle, O. y Schibler, U. (1981) A single mouse  $\alpha$ -amylase gene specifies two different tissue-specific mRNAs. Cell 23: 451-458.

Zucker, C.S., Cowman, A.F. y Rubin, G.M. (1985) Isolation and structure of a rhodopsin gene from D. melanogaster. Cell 40: 851-858.