

VCH-FC
MAG-B
5259

VARIACION CROMOSOMICA Y DE LAS ISOENZIMAS DE α -AMILASA DURANTE
LA GERMINACION DE LAS SEMILLAS DE ARAUCARIA ARAUCANA (MOL) KOCH,
Y ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA O. KTZE.

Tesis
presentada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas con mención en
Genética

por

ELIZABETH SALAS ZUÑIGA

Profesor patrocinante: Dra. Liliana Cardemil O.

SANTIAGO DE CHILE

Diciembre 1983

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Post-grado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la Candidata

ELIZABETH SALAS ZUÑIGA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Genética.

Patrocinante de Tesis
Dra. Liliana Cardemil O.

Liliana Cardemil O.
.....

Comisión Informante de Tesis
Dr. Tito Ureta A.

Tito Ureta A.
Aída Traverso P.
.....

Dra. Aída Traverso P.
Dr. Carlos Valenzuela

C. Valenzuela
.....

A mis padres,
A mi esposo, por su
amor y comprensión

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Liliana Cardemil por su ayuda intelectual y haberme recibido en su laboratorio.

Con todo cariño agradezco a la Sra. María Antonieta Valenzuela por haberme dedicado su tiempo y haber colaborado en mi formación. También le agradezco por su valiosa ayuda en la técnica de isoelectroenfoque.

Agradezco al señor Ramón Lozada por su apoyo y estímulo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Aída Traverso y al Dr. Hermann Niemeyer F. como también a los integrantes de sus laboratorios, por la colaboración prestada.

A la Sra. Cecilia Toro, por la ayuda prestada en la técnica de electroforesis.

A la Srta. Margarita Cortés por su valiosa ayuda en la realización de los esquemas.

Al Sr. Lilio Vañez por el esfuerzo realizado en la obtención de las fotografías de esta Tesis.

A mis amigas Martita Gajardo, Marcia, Angélica y Oriana, por su constante estímulo, apoyo y colaboración.

A la Sra. Titina Cerda por su dedicación en el trabajo dactilográfico de esta Tesis.

Agradezco a todas las personas que de alguna manera participaron en mi formación y logro de esta Tesis, en forma muy especial al Dr. Arturo Ferreira, Dr. Tito Ureta A. y Master Patricia Iturra.

Finalmente, agradezco en forma muy especial a la Universidad Nacional de Costa Rica, por haberme otorgado la beca que me permitió obtener el grado de Magister en Genética.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xxi
RESUMEN	xxii
ABSTRACT	xxv
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	10
2.1 Reactivos	10
2.2 Estudio del cariotipo	11
2.3 Condiciones de germinación de las semillas	12
2.4 Obtención del extracto	13
2.5 Termorresistencia de la enzi- ma α -amilasa	13
2.6 Cuantificación de proteínas	14
2.7 Ensayo de la actividad enzimá- tica	14
2.8 Identificación de la actividad enzimática como α ó β amilásica	15
2.8.1 Termorresistencia	15
2.8.2 Requerimiento de Ca^{++}	16

	pág.
2.8.3 Labilidad a pH ácido	16
2.9 Determinación del patrón de las isoenzimas de α -amilasa	18
2.9.1 Electroforesis	18
2.9.2 Isoelectroenfoque	19
 RESULTADOS	 20
3.1 Estudio del cariotipo	20
3.2 Obtención del extracto enzimático	21
3.2.1 Efecto de la temperatura en las proteínas totales	21
3.2.2 Identificación de la activi- dad enzimática como α -amilá- sica	26
3.2.2.1 Termorresistencia de la actividad α -amilasa	26
3.2.2.2 Requerimiento de Ca^{++} pa- ra la actividad α -amilá- sica	28
3.2.2.3 Labilidad de α -amilasa a pH ácido	28
3.3 Caracterización de las isoenzimas de α -amilasa de tejido embrionario y gametofito de <i>Araucaria araucana</i> , a diferentes tiempos de imbibición de la semilla	30
3.3.1 Determinación del patrón iso- enzimático por electroforesis	30
3.3.1.1 Tiempo de imbibición: cero horas	32
3.3.1.2 Tiempo de inbibición: 18 horas	33

	pág.
3.3.1.3 Tiempo de imbibición: 48 horas	33
3.3.1.4 Tiempo de imbibición: 90 horas	37
3.3.2 Determinación del patrón isoenzimático por isoelec- troenfoque	37
3.3.2.1 Tiempo de imbibición: cero horas	39
3.3.2.2 Tiempo de imbibición: 18 horas	39
3.3.2.3 Tiempo de imbibición: 48 horas	39
3.3.2.4 Tiempo de imbibición: 90 horas	42
3.4 Comparación del patrón de las iso- enzimas de α -amilasa, obtenido a diferentes tiempos de imbibición de la semilla de <i>Araucaria arauca</i> <i>na</i>	45
3.4.1 Patrón isoenzimático obte- nido por electroforesis	45
3.4.1.1 Tejido embrionario	45
3.4.1.2 Tejido gametofítico	47
3.4.2 Patrón isoenzimático obte- nido por isoelectroenfoque	47
3.4.2.1 Tejido embrionario	47
3.4.2.2 Tejido gametofítico	49

3.5	Caracterización de las isoenzimas de α -amilasa, de tejido embrionario y gametofítico de <i>Araucaria angustifolia</i> a diferentes tiempos de imbibición de la semilla	49
3.5.1	Determinación del patrón isoenzimático por electroforesis	52
3.5.1.1	Tiempo de imbibición: cero horas	52
3.5.1.2	Tiempo de imbibición: 18 horas	52
3.5.1.3	Tiempo de imbibición: 48 horas	55
3.5.1.4	Tiempo de imbibición: 90 horas	55
3.5.2	Determinación del patrón isoenzimático por isoelectrofoque	55
3.5.2.1	Tiempo de imbibición: cero horas	58
3.5.2.2	Tiempo de imbibición: 18 horas	60
3.5.2.3	Tiempo de imbibición: 48 horas	60
3.5.2.4	Tiempo de imbibición: 90 horas	60
3.6	Comparación del patrón de las isoenzimas de α -amilasa obtenido a diferentes tiempos de imbibición de la semilla de <i>Araucaria angustifolia</i>	63
3.6.1	Patrón isoenzimático obtenido por electroforesis	63

	pág.
3.6.1.1 Tejido embrionario	63
3.6.1.2 Tejido gametofítico	65
3.6.2 Patrón isoenzimático obtenido por isoelectroenfoque	65
3.6.2.1 Tejido embrionario	65
3.6.2.1 Tejido gametofítico	68
3.7 Comparación de los patrones isoenzimáticos de α -amilasa en los tejidos de <i>A. araucana</i> y <i>A. angustifolia</i> , a diferentes tiempos de imbibición de la semilla	71
3.7.1 Patrón obtenido por electroforesis	71
3.7.1.1 Tejido embrionario	71
3.7.1.1.1 Tiempo de imbibición: cero horas	71
3.7.1.1.2 Tiempo de imbibición: 18 horas	71
3.7.1.1.3 Tiempo de imbibición: 48 horas	72
3.7.1.1.4 Tiempo de imbibición: 90 horas	72
3.7.1.2 Tejido gametofítico	74
3.7.1.2.1 Tiempo de imbibición: cero horas	74
3.7.1.2.2 Tiempo de imbibición: 18 horas	74
3.7.1.2.3 Tiempo de imbibición: 48 horas	74
3.7.1.2.4 Tiempo de imbibición: 90 horas	75

	pág.
3.7.2 Patrón obtenido por isoelectroenfoque	75
3.7.2.1 Tejido embrionario	75
3.7.2.1.1 Tiempo de imbibición: cero horas	77
3.7.2.1.2 Tiempo de imbibición: 18 horas	77
3.7.2.1.3 Tiempo de imbibición: 48 horas	78
3.7.2.1.4 Tiempo de imbibición: 90 horas	78
3.7.2.2 Tejido gametofítico	80
3.7.2.2.1 Tiempo de imbibición: cero horas	80
3.7.2.2.2 Tiempo de imbibición: 18 horas	80
3.7.2.2.3 Tiempo de imbibición: 48 horas	81
3.7.2.2.4 Tiempo de imbibición: 90 horas	81
DISCUSION	83
BIBLIOGRAFIA	105

LISTA DE TABLAS

	pág.
TABLA I	
pH final de la mezcla del amortiguador acetato, más los diferentes tampones de incubación	17

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Fig. 1 Microfotografías de los cromosomas de <i>A. araucana</i> (Mol.) Koch y <i>A. angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze	22
Fig. 2 Idiograma de la representación de los cromosomas de <i>A. araucana</i> y <i>A. angustifolia</i>	23
Fig. 3 Microfotografía de los cromosomas de la <i>A. angustifolia</i> , teñidos con nitrato de plata amoniacal	24
Fig. 4 Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas totales de embrión de <i>A. araucana</i> , teñidos con Azul de Coomassie G250	25
Fig. 5 Efecto de la temperatura en la actividad de las isoenzimas de α -amilasa. Extracto de embrión tratado a 25°C y 70°C	27

Fig. 6	Efecto del ión calcio en la actividad de las isoenzimas de α -amilasa. Extracto de embrión de <i>A. araucana</i> en presencia de Ca^{++} y en ausencia de Ca^{++}	29
Fig. 7	Efecto del pH en la actividad de las isoenzimas de α -amilasa. Extracto de embrión de <i>A. araucana</i> incubado a pH 5 y pH 3	31
Fig. 8	Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en <i>A. araucana</i> a cero horas de imbibición. Extractos de tejido embrionario y gametofítico	34
Fig. 9	Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en <i>A. araucana</i> a 18 hr de imbibición. Extractos de tejido embrionario y gametofítico	35
Fig. 10	Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa de <i>A. araucana</i> a 48 hr de imbibición. Extractos de tejido embrionario y gametofítico	36

- Fig. 11 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en *A. araucana* a 90 hrs de imbibición. Extractos de tejido embrionario y gametofítico 38
- Fig. 12 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana*, a cero horas de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario y gametofítico 40
- Fig. 13 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana*, a 18 hrs de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario y gametofítico 41
- Fig. 14 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana*, a 48 hrs de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario y gametofítico 43

- Fig. 15 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana*, a 90 hrs de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario y gametofítico 44
- Fig. 16 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A. araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 46
- Fig. 17 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido gametofítico de *A. araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 48

- Fig. 18 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón, obtenido por isoelectroenfoque, de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A. araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 50
- Fig. 19 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón obtenido por isoelectroenfoque, de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido gametofítico de *A. araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 51
- Fig. 20 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en *A. angustifolia* a cero hrs de imbibición. Extractos de tejido embrionario y gametofítico 53

Fig. 21	Patrón electroforético de las iso-enzimas de α -amilasa en <i>A. angustifolia</i> a 18 hrs de imbibición. Extractos de tejido embrionario y gametofítico	54
Fig. 22	Patrón electroforético de las iso-enzimas de α -amilasa en <i>A. angustifolia</i> a 48 hrs de imbibición. Extractos de tejido embrionario y gametofítico	56
Fig. 23	Patrón electroforético de las iso-enzimas de α -amilasa en <i>A. angustifolia</i> a 90 hrs de imbibición. Extractos de tejido embrionario y gametofítico	57
Fig. 24	Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de <i>A. angustifolia</i> , a cero horas de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario y gametofítico	59

- Fig. 25 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A.angustifolia*, a 18 hrs de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embriionario y gametofítico 61
- Fig. 26 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A.angustifolia*, a 48 hrs de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embriionario y gametofítico 62
- Fig. 27 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A.angustifolia*, a 90 hrs de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embriionario y gametofítico 64
- Fig. 28 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A.angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 66

- Fig. 29 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido gametofítico de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 67
- Fig. 30 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón, obtenido por isoelectroenfoque, de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 69
- Fig. 31 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón, obtenido por isoelectroenfoque, de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido gametofítico de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 70

- Fig. 32 Cuadros comparativos de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa, para el tejido embrionario de *A. araucana* y *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 73
- Fig. 33 Cuadros comparativos de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa, para el tejido gametofítico de *A. araucana* y *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 76
- Fig. 34 Cuadros comparativos de los cambios en el patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenidos por isoelectroenfoque, para el tejido embrionario de *A. araucana* y *A. angustifolia* a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 79

Fig. 35 Cuadros comparativos de los cambios en el patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenidos por isoelectroenfoque, para el tejido gametofítico de *A. araucana* y *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 82

Fig. 36 Cuadro comparativo del patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenido por electroforesis para tejido embriionario (1) y tejido gametofítico (2) de *A. araucana*; para tejido embrionario (3) y tejido gametofítico de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 103

Fig. 37 Cuadro comparativo del patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenido por isoelectroenfoque para tejido embrionario (1) y tejido gametofítico (2) de *A. araucana*; para tejido embrionario (3) y tejido gametofítico de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas 104

ABREVIATURAS

ABA	: Acido abscísico
AGNO ₃	: Nitrato de plata
Azul de Coomassie G-250	: Azul brillante de Coomassie G
CaCl ₂	: Cloruro de calcio
CsCl	: Cloruro de cesio
DNA	: Acido desoxirribonucléico
D.O.	: Densidad óptica
EDTA	: Acido etilendiamin-tetraacético
GA ₃	: Acido giberélico
HCl	: Acido clorhídrico
MOPS	: Acido (3-N-Morpholino)propanosul- fónico
NOR	: Zona organizadora del nucléolo
pI	: Punto isoeléctrico
Rm	: Movilidad relativa
mRNA	: Acido ribonucleico mensajero
rRNA	: Acido ribonucleico ribosomal
Tris	: Tris(hidroximetil)aminometano
TCA	: Acido tricloroacético
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamino

RESUMEN

Los antecedentes paleobotánicos muestran que el género *Araucaria* tuvo una distribución más amplia en Sud-América durante el Terciario Inferior. Las estrechas relaciones filogenéticas de las dos especies sudamericanas, *A. araucana* y *A. angustifolia* evidencian probablemente un origen común en el Jurásico. El hecho de que actualmente constituyan "relictos", con distribución restringida en el sur del Brasil y en los Andes australes proporciona una situación de extraordinario interés en lo que se refiere a comparaciones genéticas que permitan dilucidar su historia evolutiva.

El objetivo de este trabajo es establecer las variaciones y similitudes genéticas de ambas especies a base de (i) un estudio del cariotipo y bandeo NOR y (ii) un estudio genético-fisiológico a base de isoenzimas de α -amilasa, utilizados como marcadores del proceso de germinación.

El análisis del cariotipo y bandeo NOR se realizó mediante tinción Feulgen y tinción de nitrato de plata amoniacal. Las isoenzimas de α -amilasa se analizaron por electroforesis e isoelectroenfoque.

Las dos especies de *Araucaria* presentan un número diploide de 26 cromosomas y cada cariotipo se caracteriza por poseer una larga constricción secundaria intercalar, positiva a la tinción argenta, en el par de cromosomas N° 1. Como principal

diferencia de estas especies se encontró la presencia en *A. angustifolia* de una constricción secundaria corta con un satélite terminal, negativa a la tinción argenta, en el par de cromosomas N° 8. A pesar de que en algunos trabajos se ha descrito el número de cromosomas e idiogramas de algunas especies de *Araucaria*, en esta ocasión se documenta por primera vez un estudio comparativo detallado de cariotipo de las especies sudamericanas de *Araucaria*.

En semilla de ambas especies de *Araucaria*, la principal reserva es el almidón y su degradación es iniciada por α -amilasa durante las primeras 90 hrs de imbibición de la semilla.

Al comparar los patrones de las isoenzimas de α -amilasa de tejido gametofítico (origen materno, haploide) y tejido embrionario (origen paterno y materno, diploide) se obtuvieron diferencias y similitudes entre ambas especies y sus respectivos tejidos. Se destaca la aparición y desaparición de isoenzimas específicas a través de la germinación de las semillas.

La frecuencia específica de las bandas de actividad α -amilásica podría ser interpretada como: (i) una activación de los genes responsables que dan como producto final estas isoenzimas; (ii) una modificación post-transcripcional; (iii) una modificación post-traducciona.

Se discuten los cambios de los patrones isoenzimáticos de acuerdo a las fluctuaciones de actividad enzimática y de

proteínas y a base de una posible acción génica diferencial por hormonas vegetales.

ABSTRACT

Studies on paleobotany show that the *Araucaria* genus had a wide distribution in South America during the Lower Tertiary. The strong phylogenetic relationships of both species of South America, *A. araucana* and *A. angustifolia* gives evidences for a common origin during the Jurassic. The fact (that) they constitute relictual forests with a narrow distribution in Brasil and in the austral Andes, leads to a very interesting problematic situation, that is to study the genetic of both species comparatively in order to elucidate their evolutive story.

The purpose of this work is to establish the variation and genetic similarities of both species through i) a karyotype study and NOR banding pattern study; ii) a genetic-physiological study based on the isozymes of α -amylase which have been used as markers of the germination process.

The karyotype and NOR banding was performed using Feulgen and silver-ammoniacal stains, α -amylase isozymes were analyzed by electrophoresis and isoelectric focusing.

Both *Araucaria* species have 26 chromosomes as diploid number and each karyotype is characterized by a long intercalary secondary constriction, which gives positive reaction to silver stain and it is located in chromosome pair N°1. The principal difference between these species is the presence of a short

secondary constriction in chromosome pair N° 8 of *A. angustifolia*. In this dissertation is the first time that a detailed comparative study is documented for the southamerican species of *Araucaria*.

In the seeds of both species the main reserve is starch and the starch hydrolysis is initiated by α -amylase during the 90 hours after the start of seed imbibition.

The α -amylase isozyme patterns of the gametophytic tissue (maternal and haploid) and of the embryonic tissue (paternal and maternal and diploid) show similarities and differences between the tissues and between the species. Specific isozymes of α -amylase appear and disappear during germination and early seedling growth.

The specific frequency of the active forms of α -amylase could be interpreted as: (i) activation of structural genes; (ii) post-transcriptional modifications; (iii) post-translational modifications.

The changes in the isozyme patterns are discussed according to fluctuations in the enzyme activity and total proteins and on the basis of a possible regulation of gene expression by plant hormones.

1. INTRODUCCION

En Sud-América existen dos especies de *Araucaria* : *Araucaria araucana* (Mol) Koch y *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. La primera se encuentra entre las latitudes 37° 30' y 40° 3'S, entre 900 y 1700 m sobre los declives Este-Oeste de los Andes de Chile y Argentina y en la cordillera de la costa, en Chile, entre las latitudes 37° 2' y 38° 4'S (Montaldo, 1974). La segunda, *A. angustifolia*, se encuentra en el Sur-Este del Brasil, entre las latitudes 21° 5' y 30° 0'S y entre los paralelos 43° 3' y 57° 3' de Este a Oeste, en las altas mesetas de Vacacai-Jacui (Hueck, 1952) desde los 150 a 1600 m de altitud.

El género *Araucaria* estuvo ampliamente distribuido a través de Sud-América durante el Jurásico (Seward y Ford, 1906; Seward y Conway, 1934). Sin embargo, existe poca información de cómo las especies actuales se diferenciaron, aunque Skottsberg, 1953 ha postulado un origen antártico para *A. araucana*; Hueck (1952, 1966) piensa que los bosques brasileños de *A. angustifolia* se originaron posiblemente por una migración a partir de una fuente original de *A. araucana*, para formar un bosque único de *Araucaria*, el que se extendió a través de Sud-América austral, en el período comprendido entre el Jurásico y el Terciario. Las Gimnospermas de este bosque fueron

restringidas posteriormente cubriendo áreas de altas montañas en los Andes de Chile y Argentina y en el sur de Brasil, con las diferenciaciones subsecuentes de *A. araucana* y *A. angustifolia* como las conocemos hoy en día.

Las especies son similares en sus aspectos vegetativos, en las semillas, morfología de crecimiento de las plantas y germinación de las semillas (Montaldo, 1974; Tesdorff, 1956).

Se han realizado varios estudios sobre cariotipos en el género *Araucaria*. Recuentos cromosómicos con idiogramas no detallados fueron reportados en el género *Araucaria* por Chamberlain, 1934 a, b; Flory, 1936; y Hair y Beuzenberg, 1958).

En todos los estudios informados de cariotipo de gimnospermas, se ha podido observar un par de cromosomas que posee una constricción secundaria larga (Norstog, 1965; Flory, 1936; Hair y Beuzenberg, 1958; Hodcent, 1968). En especies de angiospermas, estas constricciones se han asociado a la formación del nucléolo (Giménez-Martin *et al.*, 1977). Por lo tanto, la constricción larga de estos cromosomas de gimnospermas podría ser la región organizadora del nucléolo o NOR. Los estudios tanto de posición, como del número de estas regiones cromosómicas, son marcadores genéticos evolutivos, que permiten dar información sobre cambios y reestructuraciones cromosómicas que pudieron haber ocurrido en las especies relacionadas durante la historia de su evolución.

También se han encontrado diferencias fisiológicas observables entre ambas especies. *A. araucana* está bien adaptada a bajas temperaturas. Las semillas de esta especie germinan entre los 15 y 25°C con un óptimo a 18°C (Cardemil y Reineró, 1982). La *A. angustifolia* tiene un óptimo de germinación a los 28°C (Ferreira *et al.*, 1979 a, b). En *A. araucana*, la germinación es más fácil y rápida que en *A. angustifolia*, aunque el desarrollo posterior de la plántula de estas semillas puede ser más rápido en *A. angustifolia* (Tesdorff, 1956). Por otro lado, se ha informado la presencia de α -amilasa en semillas de *A. araucana* (Cardemil y Reineró, 1982), mientras que Ferreira *et al.* (1979) informaron la presencia de α y β amilasas para *A. angustifolia* en tejidos similares. Para *A. araucana*, se ha reportado que la principal reserva nutritiva de las semillas es el almidón; reserva que constituye aproximadamente el 60% del peso seco de la semilla (Cardemil y Reineró, 1982), lo cual sugiere que las amilasas que degradan el almidón están intrínsecamente involucradas en la maduración y germinación de la semilla.

Las amilasas hidrolizan los enlaces α (1 \rightarrow 4) del almidón, pero no los enlaces β (1 \rightarrow 6), que constituyen los puntos de origen de las ramas laterales de la amilopectina y del glicógeno. Las amilasas se han dividido en dos tipos: α - amilasa y β -amilasa.

Las α -amilasas son de tipo endoamilasas, esto es, hidrolizan enlaces α (1 \rightarrow 4), produciendo oligosacáridos, los cuales siguen siendo desdoblados por otras enzimas hidrolíticas produciendo finalmente glucosa y maltosa. Su nombre, α -amilasa, se debe a que los grupos reductores liberados por su acción tienen configuración óptica α (Bernfeld, 1951; Fischer y Stein, 1960). La enzima α -amilasa (α -1 \rightarrow 4-glucosa-4 glucohidrolasa, EC 3.2.1.1) ha sido muy estudiada y caracterizada en plantas superiores (Jacobsen *et al.*, 1970; Goldstein y Jennings, 1975; Okamoto y Akazawa, 1979; Koshiba y Minamikawa, 1981). Se ha demostrado que esta enzima necesita Ca^{++} como cofactor para conservar su actividad (Fischer y Stein, 1960; Jacobsen *et al.*, 1970) y además que es estable a temperaturas hasta 70°C (Juliano y Varner, 1969; Rodaway, 1978; Koshiba y Minamikawa, 1981; Doehlert y Duke, 1983; Reiner *et al.*, 1983).

Las β -amilasas (β -1 \rightarrow 4-glucano maltohidrolasa, EC 3.2.1.2) son exoamilasas. Se caracterizan porque hidrolizan el polisacárido sólo desde el extremo terminal no reductor de la molécula, dando como producto final, maltosa (Bernfeld, 1951; French, 1960). Estas amilasas son llamadas así porque la maltosa originada posee configuración óptica β . La β -amilasa deja como producto una dextrina límite de alto peso molecular (Juliano y Varner, 1969; Bernfeld, 1951). Las β -amilasas no

requieren Ca^{++} como cofactor para conservar su actividad; son termolábiles y estables a pH ácido (Bilderback, 1973; French, 1960).

Las isoenzimas de α -amilasa y β -amilasa han sido encontradas en una variedad de gramíneas como cebada (Jacobsen *et al.*, 1970; Jacobsen y Knox, 1973; Rodaway y Kende, 1978), maíz (Golchtein y Jennings, 1975; Boyer y Preiss, 1981) y de leguminosas *Vigna mungo* (Koshiha y Minamikawa, 1981), arveja (Juliano y Varner, 1969), etc. Las isoenzimas han sido utilizadas como importantes marcadores del desarrollo. Así se han encontrado en maíz (Goldstein y Jennings, 1975; Scandalios, 1974; Chao y Scandalios, 1971) diferentes isoenzimas de α -amilasa según el estado de desarrollo del grano. Las isoenzimas pueden llegar a ser de este modo una expresión del estado de desarrollo y de la diferenciación de los tejidos. Un análisis detallado del cambio en los patrones isoenzimáticos, nos puede ayudar a tener una mejor comprensión de los mecanismos básicos de la diferenciación celular.

Además de las α -amilasa, hay otras isoenzimas que también varían según el estado de desarrollo de la semilla y de la planta; por ejemplo, las peroxidasas. En cebada se han detectado de 8 a 12 peroxidasas dependiendo del tejido y del estado de desarrollo de la planta (Scandalios, 1974). La aparición y desaparición de isoenzimas de peroxidasa de plantas en desarrollo ha sido atribuida a menudo a expresión génica diferencial (Shannon, 1968). La expresión de isoenzimas de

peroxidadas, en el desarrollo de plantas, se mostró que depende de la presencia o ausencia de la hormona ácido indoloacético (Scandalios, 1974); además, se ha visto que la actividad de estas isoenzimas está regulada por diferentes niveles hormonales, Anstine *et al.* (1970), mostraron que por lo menos una de las peroxidadas era sintetizada *de novo*, (como se discutirá más adelante).

En cebada la presencia de α -amilasa es mediada por acción del ácido giberélico (GA_3); (Chrispeels y Varner, 1967, a, b; Varner y Chandra, 1964; Jacobsen *et al.*, 1970; Filner y Varner, 1967; Mozer, 1980; Bernal-Lugo *et al.*, 1981; Ho *et al.*, 1982; Callis y Ho, 1982; Jacobsen y Higgins, 1982). Filner y Varner (1967), incubando capas de aleurona de cebada en agua marcada (H_2O^{18}) y ácido giberélico, lograron demostrar que toda la actividad de α -amilasa podía separarse por centrifugación en gradiente de $CsCl$, en una fracción de mayor densidad y concluyeron que el GA_3 promovía la síntesis *de novo* de la enzima α -amilasa.

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

Bernal-Lugo *et al.* (1981), mostraron que cuando capas de aleurona eran incubadas con GA_3 el nivel de mRNA para la

α -amilasa era 32 veces mayor, comparado con el control (sin GA_3) y que la presencia de ácido abscísico (ABA) también aumentaba el nivel de mRNA tres veces sobre el control (sin ABA) pero inhibía la traducción del mensaje.

Jacobsen (1982), reportó la presencia de dos grupos de isoenzimas de α -amilasa, sintetizadas en capas de aleurona de cebada, en respuesta al GA_3 . Cada grupo estaba compuesto por dos isoenzimas, no existiendo diferencias sustanciales entre cada una de ellas. Las bandas de isoenzimas 1 y 2 (pertenecientes al mismo grupo) aumentaron paralelamente con GA_3 , mientras que las bandas 3 y 4 aparecieron sólo después de 13 horas de incubación con GA_3 . Además, observaron que a concentraciones entre 10^{-9} y 10^{-8} M de GA_3 aparecían las bandas 1 y 2 y a concentraciones de 10^{-7} M de GA_3 aparecían la 3 y 4. Las diferencias entre los dos grupos de α -amilasas, particularmente en características serológicas y mapeo peptídico ha indicado que los dos grupos contienen polipéptidos que se diferencian en la secuencia de aminoácidos y que probablemente son los productos de dos genes diferentes, o de dos grupos de genes. Las diferencias en las respuestas en el tiempo y a los niveles de concentración de GA_3 , indicaría que la expresión genética de estos grupos de α -amilasa estaría controlada por GA_3 .

En el embrión de *A. araucana* (Reinero *et al.*, 1983) se ha reportado también la presencia de diferentes niveles de

giberelinas embrionarias cuando la semilla es sometida a distintos períodos de imbibición. La actividad α -amilasa bajó considerablemente, en presencia de un inhibidor de la síntesis de giberelinas, AMO 1618.

Se decidió, por ventajas de origen común de ambas especies de *Araucaria*, distribución geográfica similar comparar la variación cromosómica en los patrones isoenzimáticos de α -amilasa del tejido embrionario y gametofítico de ambas especies, durante diferentes períodos de imbibición de las semillas.

Las enzimas del metabolismo del almidón son de particular interés en el estudio del desarrollo y diferenciación de las plantas, debido a que poseen múltiples formas isoenzimáticas, algunas son características durante la maduración de las semillas y otras son características durante la germinación. Así en este estudio se intenta establecer variaciones y similitudes, genéticas y genético-fisiológicas entre ambas especies de *Araucaria*, cumpliendo con los siguientes objetivos:

- a) Determinación de las constricciones secundarias o zona NOR en cada especie, con el propósito de establecer si hay o no una activación génica diferencial entre ambas especies.
- b) Detección de la presencia de las isoenzimas de α -amilasa en semillas de ambas especies.

- c) Buscar diferencias en el patrón de isoenzimas de α -amilasa, comparando los patrones isoenzimáticos obtenidos en el tejido gametofítico y en el tejido embrionario.
- d) Comparar los patrones de las isoenzimas de cada tejido a diferentes tiempos de imbibición de las semillas (cero horas, 18 horas, 48 horas y 90 horas), con el fin de establecer diferencias entre las especies y entre los tejidos (embrión y gametofito) durante la germinación de las semillas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivos

Las siguientes compañías suministraron los reactivos señalados más adelante:

- BHD Chemical Ltd., Inglaterra: Yoduro de potasio.
- Calbiochem. Los Angeles, California: Macerozima.
- Distribuidora Científica Santa Elena, Santiago: Metanol.
- J.T. Baker, Chemical Co., Phillipsburg, N.J.: 1-Bromonaftaleno.
- Merck A.G., Darmstadt, Alemania: Yodo, Almidón, Sacarosa, Acido tricloroacético, CaCl_2 , Acetato de sodio, NaCl , Amoníaco, Acido acético, Acetona, HCl , Etanol, Carbón activado.
- Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover, Alemania: Nitrato de plata.
- Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA.: Riboflavina, TEMED, Tris, Azul de bromofenol, Glicerol, Acido maléico, Acrilamida, Bis-acrilamida, Persulfato de amonio, Anfolitos de pH 4-6 y pH 5-8, Fucsina básica, Hidroxiquinolina.

2.2 Estudio del cariotipo

Semillas sin cubierta de ambas especies de *Araucaria*, se hicieron germinar en cápsulas Petri con vermiculita húmeda a 25°C bajo un fotoperíodo de 12 hora . Las semillas con raíces de alrededor de 1 cm de longitud se colocaron en cápsulas Petri, con bolitas de algodón embebidas con una solución saturada de 1-bromonaftaleno o embebidas en 0,02 M de hidroxiquinolona y mantenida por 5 hr a 25°C y 18°C en 1-bromonaftaleno o hidroxiquinolona respectivamente.

Después del tratamiento con las drogas para acortar los cromosomas, las puntas de las raíces fueron fijadas con una mezcla de ácido acético-etanol en 3:1. A la fijación señalada siguió la tinción de Feulgen descrita comunmente, cuando el trabajo era de rutina o una hidrólisis que se desarrolló en dos etapas: primero con ácido acético 45% por 20 min a 60°C, seguido de un tratamiento de HCl 1 N a 60°C por 30 segundos. Después de un lavado con agua destilada, los conos de la raíz fueron sumergidos en una solución de macerozima por 4 hr a 25°C con el objeto de digerir las paredes celulares. La macerozima fue removida con agua destilada y los conos aplastados. El tejido fue secado presionándolo entre el portaobjeto y el cubreobjeto. El cubreobjeto se removió del portaobjeto con hielo seco. El material fue secado al aire por 7 a 10 días y teñido con plata amoniacal de acuerdo al método de Goodpasture y Bloom (1975), excepto que se reemplazó la solución de 50% de AgNO₃ por una

solución de 33%. Los preparados fueron expuestos a la luz con un tiempo variable de 5 a 8 min a 20 cm de distancia de la fuente luminosa. Los preparados óptimos de cromosomas fueron microfotografiados bajo un microscopio Zeiss de contraste de fases. Mediciones de los cromosomas se realizaron con un micrómetro ocular calibrado.

2.3 Condiciones de germinación de las semillas

Se usaron semillas de *Araucaria araucana* (Mol.) Koch y *Araucaria angustifolia* (Bert) Kutz, cosechadas en 1981 y 1982 entre los meses de Marzo y Abril, en la Reserva Forestal de Malcahuello, lat 37° 5'S Chile; e Instituto Forestal de Sao Paulo (Brasil), respectivamente. Ocasionalmente, se usaron semillas de *A. angustifolia* colectadas en el jardín de Mns. E. Vicuña, de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las semillas se guardaron en bolsas plásticas a 4°C, temperatura a la cual permanecen viables por lo menos un año, hasta ser usadas (Reinero, 1981).

Para sincronizar el proceso germinativo, se les escarificó mecánicamente. Las semillas se esterilizaron con hipoclorito de sodio comercial al 5% por 15 minutos; y luego fueron lavadas repetidas veces con agua destilada.

Para germinar, las semillas se colocaron en placas Petri debidamente rotuladas (con hora y fecha), conteniendo vermiculita humedecida, previamente esterilizada; la germinación se llevó a cabo a 25°C con un fotoperíodo de 12 horas.

2.4 Obtención del extracto

La extracción de la enzima se hizo de acuerdo al método de Nyman, 1971, para lo cual se usaron 8 a 12 semillas de *A. araucana* ó *A. angustifolia* de un determinado tiempo de imbibición. Se separaron los embriones y el tejido gametofítico. Los embriones se pesaron, se cortaron en trozos pequeños y se homogenizaron en un mortero frío a 5°C que contenía 4 ml de tampón (acetato de sodio 0,05 M a pH 4,8; CaCl₂ 0,02 M, NaCl 0,06 M). El homogenizado se centrifugó a 12.000 xg en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B por 15 minutos. El sobrenadante se extrajo con pipetas Pasteur, eliminándose la capa superior de lípidos. Este extracto enzimático se mantuvo en hielo hasta el momento de usar. El procedimiento fue el mismo para extraer la enzima del tejido gametofítico, manteniendo la misma relación peso-tejido fresco volumen del tampón.

2.5 Termorresistencia de la enzima α -amilasa

Después del procedimiento de extracción de la enzima, el extracto protéico se calentó a 70°C por 15 min y luego se centrifugó por 2 min a 1.000 xg para separar las proteínas precipitadas; el sobrenadante se usó como fuente de enzima. Siempre se dejó una alícuota sin calentar como control.

2.6 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en los diferentes extractos se determinó por el método turbidimétrico descrito por Stadman, 1951. A una alícuota del extracto crudo de enzima se le adicionó 2,5 ml de ácido tricloroacético al 5%, y se llevó a 5 ml con agua destilada. La curva de calibración se realizó con una solución de seroalbúmina de bovino de 0,1 mg/ml a 3 g/ml.

2.7 Ensayo de la actividad enzimática

La actividad amilolítica se ensayó con una modificación del método descrito por Jones y Varner, 1967, para lo cual a una alícuota de 1 ml del extracto diluido diez veces en agua destilada, se le agregó 1 ml de tampón acetato de sodio 0,05 M a pH 4,8 que contiene CaCl_2 0,02 M, NaCl 0,06 M y almidón soluble 0,03%. Luego, se incubó en un baño termorregulado a 30°C por períodos de 10, 20 y 30 minutos. Una muestra mantenida en hielo, no incubada, sirvió de control y será referida como tiempo 0 de incubación. La reacción se detuvo con 1,5 ml de una solución de KI-I₂ (6 g de KI y 0,6 g de I₂ disueltos en 100 ml de agua destilada). Cada tubo se llevó a un volumen final de 8 ml con agua destilada y se leyó su densidad óptica (D.O.) a 660 nm. La actividad fue expresada como

actividad específica (U/mg proteína); la unidad se define como mg de almidón degradado por minuto o como actividad total, mg de almidón degradado por minuto por g de peso seco de tejido.

La actividad enzimática también se determinó cualitativamente "in gel", y la técnica se describe en la sección de electroforesis.

2.8 Identificación de la actividad enzimática como α ó β -amilásica

Para identificar la actividad enzimática como α -amilásica se utilizaron tres métodos que discriminan entre α y β amilasa (French, 1960; Fischer y Stein, 1960; Jacobsen *et al.*, 1970).

2.8.1 Termorresistencia

Extractos de semillas de 0, 18, 48 y 90 horas de imbibición de ambas Araucarias, se preincubaron a 70°C por 15 min y luego se les determinó la actividad enzimática. Como control se usaron los mismos extractos pero preincubados a 25°C por 15 minutos.

Los extractos calentados a 70°C se usaron como fuente de enzima para los ensayos experimentales de electroforesis, isoelectroenfoque y determinación de peso molecular.

2.8.2 Requerimiento de Ca^{++}

Alícuotas de los extractos precalentados a 70°C, fueron diluídos en el tampón de extracción que contenía EDTA a saturación. A estos extractos se les determinó la actividad enzimática. Como control se usaron los extractos precalentados a 70°C y luego diluídos en tampón sin EDTA.

Los extractos en presencia o en ausencia de EDTA se sometieron a electroforesis y luego se determinó la actividad amilásica en el gel.

2.8.3 Labilidad a pH ácido

Los geles que contenían extracto precalentado a 70°C fueron incubados en diferentes tampones, para determinar actividad amilásica en el gel.

En la Tabla I se muestran los diferentes amortiguadores que se utilizaron.

Como control se usó un gel incubado en tampón Tris-maleaato pH 5,0.

TABLA I. pH final de la mezcla del amortiguador acetato, más los diferentes tampones de incubación.

Tampón	pH	pH final en el tubo
NaCl-glicina	3,0	3,0
Citrato	3,0	3,4
Acetato	4,0	4,1
Fosfato-citrato	4,0	4,1
Acetato	5,0	5,0
Maleato	5,0	5,2
Maleato	6,0	6,3
Succinato	6,0	6,5
Fosfato	7,0	7,1
MOPS	7,0	7,1
Tris-HCl	8,0	7,5
Tris-tricina	8,0	7,7

2.9 Determinación del patrón de las isoenzimas de α -amilasa

2.9.1 Electroforesis

La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida siguiendo el método descrito por Davis, 1964. Se utilizó un gel separador de acrilamida al 7%. En algunas ocasiones, además del gel separado se utilizó un gel concentrador; cada gel se cargó aproximadamente con 200 μ g de proteína del extracto precalentado a 70°C. Se aplicó una corriente de 1,5 mA por tubo (cada tubo tenía 12 cm de longitud y 6 mm de diámetro), durante 5-6 horas. Se usó 50 μ l de una solución de azul de bromofenol al 0,059% como colorante marcador del frente electrofórico. Por cada muestra se utilizaron dos geles, uno se tiñó con una solución de azul de Coomassie (3,5% v/v de ácido perclórico y 0,04% del colorante) con el propósito de revelar las bandas de proteína y el otro fue incubado por 6 horas en tris-maleato, pH 5 conteniendo almidón al 1% como sustrato y CaCl_2 con el objeto de revelar las bandas con actividad amilolítica (Juliano y Varner, 1969). Para ello, después de la incubación los geles se tiñeron con una solución de KI-I_2 al 10% v/v. El almidón no degradado presente en la mayor parte del gel da una coloración azul. Las bandas no coloreadas que aparecen en el gel, se debe a que el almidón ha sido degradado por la enzima y por lo tanto, no hay tinción. La banda enzimática fue

fijada con una solución de ácido acético al 5% (v/v) en metanol al 30% (v/v).

2.9.2 Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque se realizó en geles de poliacrilamida. Se prepararon los geles para electroenfoque de acuerdo a Pearce *et al.*, 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 H₂SO₄ 0,2% (Mancilla, 1980). Cada gel se cargó con concentraciones no mayores de 200 µg de proteína y un volumen no superior a los 200 µl. Se aplicaron 300 voltios durante 2 horas, tiempo necesario para obtener una corriente constante. La medición de pH de los geles se hizo con un electrodo de superficie y se efectuó a la misma temperatura a la cual se realizó el isoelectroenfoque, además se tuvo el cuidado de medir rápidamente el pH, para evitar la carbonatación del gel. Después de medido el pH y la longitud del gel, se procedió a revelar las bandas por actividad enzimática según la metodología anteriormente descrita, para luego volver a medir su longitud total.

Cuando el gel aumentaba en longitud, éste se refrigeraba hasta llegar a su tamaño inicial.

3. RESULTADOS

3.1 Estudio del cariotipo

En ambas especies de *Araucaria* los cromosomas son muy largos. Los tratamientos por hydroxiquinolina o colchicina, acortan los cromosomas alrededor de 1/3 de su longitud real.

Ambas especies de *Araucaria* poseen 13 pares de cromosomas homólogos. La Figura 1A muestra un aplastado de cromosomas mitóticos de *A. araucana* y la Figura 1B muestra el aplastado de cromosomas mitóticos obtenidos de *A. angustifolia*. No se observaron diferencias significativas en relación al número y tamaño de los cromosomas pero sí se observó diferencias notorias a nivel de las constricciones secundarias, ya que en *A. araucana* están presentes solamente en el par de cromosomas N°1, mientras que en la *A. angustifolia* están presentes además, en el par de cromosomas N°8. (Figura 1A y 1B). Los idiogramas (Fig. 2) definen al cromosoma con la constricción intercalar como par cromosómico 1 y es una ordenación decreciente de los cromosomas de acuerdo a la longitud de ellos.

El par metacéntrico N°1 posee una larga constricción intercalar en el brazo más corto, tanto en *A. araucana* como *A. angustifolia*. El cariotipo de *A. angustifolia*, además

está caracterizado por una constricción subterminal, dando origen a un satélite terminal de un par de cromosomas que han sido denotados como par N°8. El satélite está ausente en *A. araucana* (Figura 1A y 1B). En la Figura N°3 se muestra la reacción positiva de la constricción intercalar a la tinción de plata amoniacal de *A. angustifolia* en el par de cromosomas N°1. La constricción se tiñe igualmente en *A. araucana*.

3.2 Obtención del extracto enzimático

3.2.1 Efecto de la temperatura en las proteínas totales

En la Fig. 4 se muestra el patrón electroforético de las proteínas totales, teñidas con azul de Coomassie G250, de los extractos crudos de embrión de *A. araucana*. Se observa que el extracto de embrión, calentado a 70°C, muestra un número menor de bandas de proteínas que el correspondiente extracto no calentado. La actividad específica de los extractos calentados fue aproximadamente 6 veces mayor que la de los extractos no calentados. Los extractos calentados fueron utilizados como fuente de enzima en todos los experimentos realizados. Resultados similares fueron obtenidos para extractos de gametofito de *A. araucana* y para extractos de embrión y gametofito de *A. angustifolia*.

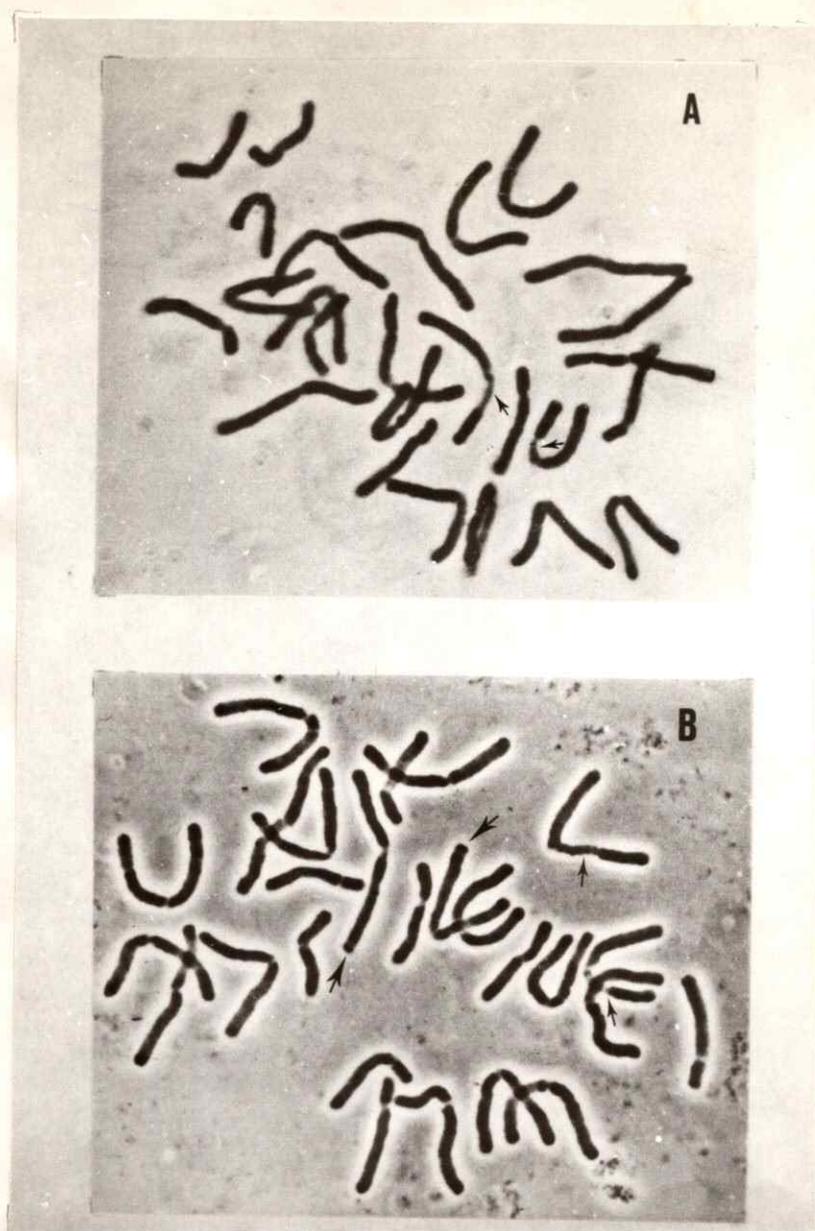


FIG. 1 Microfotografías de los cromosomas de *A. araucana* (Mol.) Koch (1) y *A. angustifolia* (Bert.) O. Ktze (3). Las flechas cortas indican la constricción intercalar en ambas especies. Las flechas largas indican el satélite terminal en *A. angustifolia*. (x 2800).

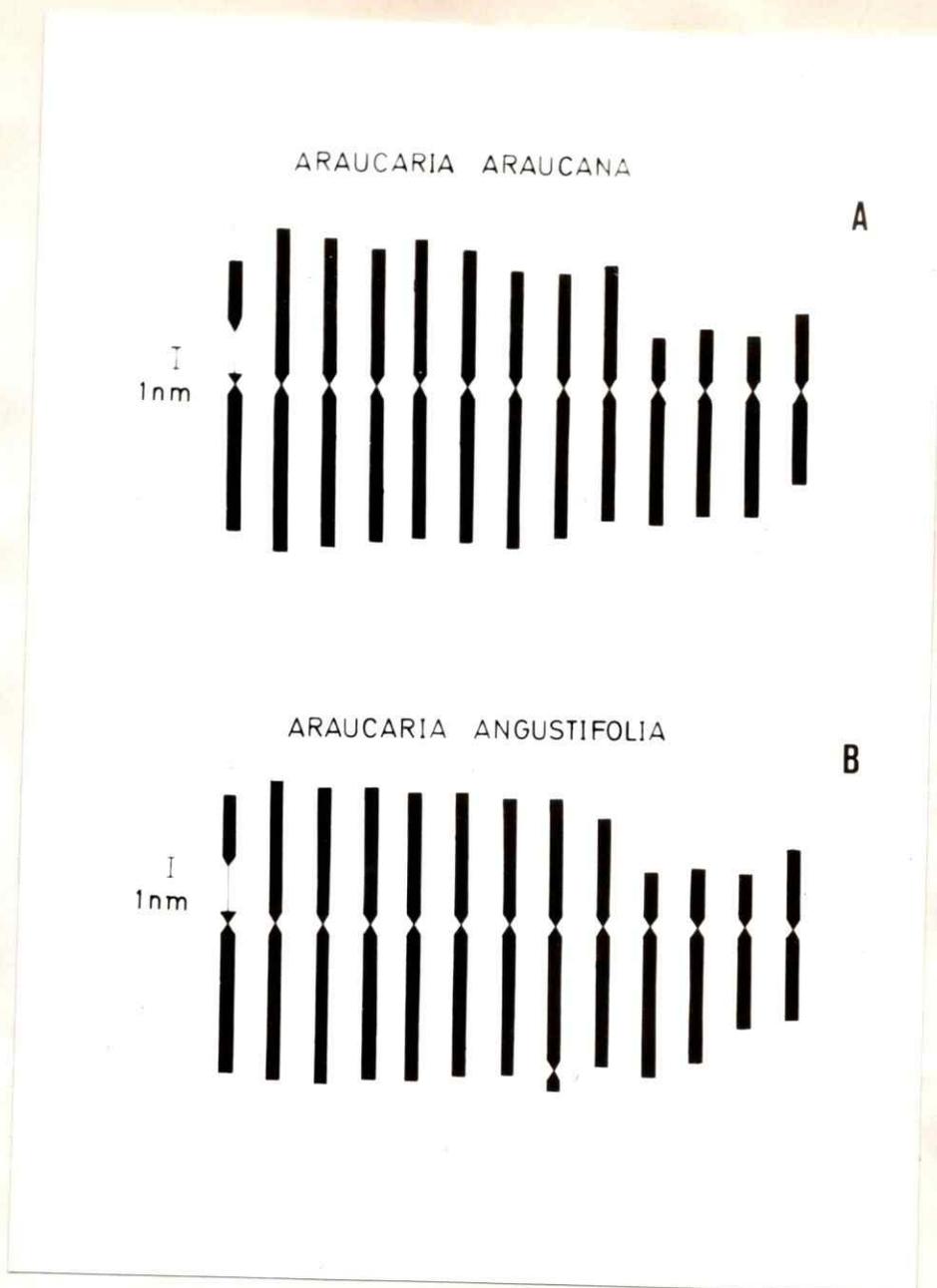


FIG. 2 Idiograma de la representación de los cromosomas de *A. araucana* (1) y *A. angustifolia* (3). Los cromosomas, con la excepción del par N°1, son numerados en orden decreciente de acuerdo a la longitud del cromosoma.



FIG. 3 Microfotografía de los cromosomas de *A. angustifolia*, teñidos con nitrato de plata amoniacal. Las flechas cortas indican la tinción de la constricción intercalar del par de cromosomas denominado como par N°1. Las flechas largas indican el satélite terminal de uno de los cromosomas del par N°8 (x 3360).



FIG. 4 Electroforesis en gel de poliacrilamida, de las proteínas totales de embrión de *A. araucana*, teñidas con Azul de Coomassie G250. Extracto sin calentar (25°C), calentado (70°C).

3.2.2 Identificación de la actividad enzimática como α -amilásica

La identificación de la actividad enzimática como de α -amilasa o β -amilasa, se realizó a través de tres métodos, cada uno de los cuales discrimina entre ambas enzimas porque se utilizan características específicas de ellas.

3.2.2.1 Termorresistencia de la actividad α -amilasa

α -amilasa es termorresistente y por lo tanto no hay pérdida de actividad por preincubación de extractos de esta enzima a 70°C. La β -amilasa es termolábil y por lo tanto la enzima se desnaturaliza a 70°C (Reinero *et al.*, 1983; Bilderback, 1973).

Los resultados de la electroforesis en geles, de los extractos preincubados a 25°C y 70°C, se muestran en la Figura 5. En esta figura se observa que el extracto de embrión de *A. araucana*, con cero horas de imbibición, presentó cinco bandas de actividad para ambos tratamientos. El mismo patrón se obtuvo para tejido gametofítico.

Las bandas isoenzimáticas en ambos tejidos de 18, 48 y 90 horas de imbibición, tampoco fueron alteradas a 70°C con respecto al control de 25°C.

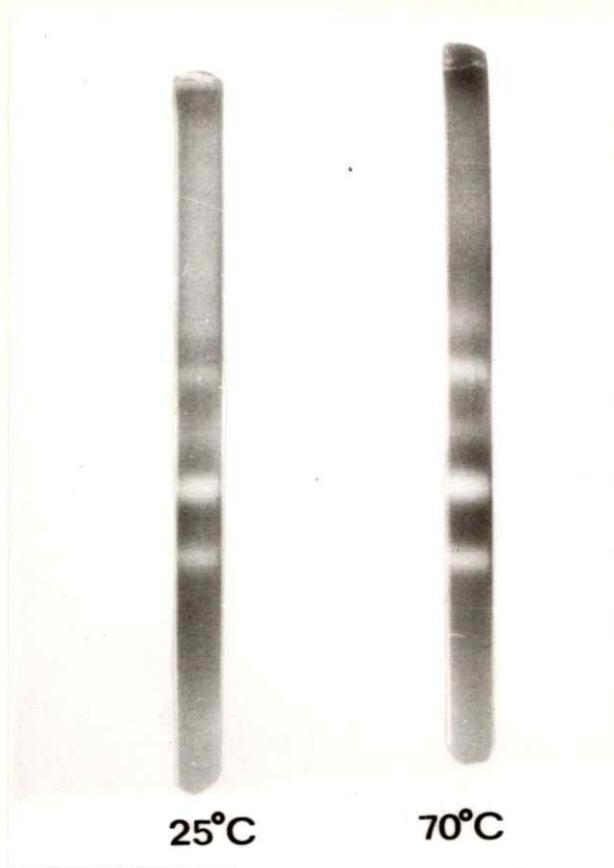


FIG. 5 Efecto de la temperatura en la actividad de las isoenzimas de α -amilasa. Extracto de embrión de *A. araucana* tratado a 25°C y 70°C.

El patrón de bandas isoenzimáticas para *A. angustifolia* también se conservó en ambos tejidos en los dos tratamientos de temperatura y a los mismos tiempos de imbibición.

3.2.2.2 Requerimientos de Ca^{++} para la actividad α -amilásica

La termorresistencia de α -amilasa se debe a que posee como cofactor el ión Ca^{++} (Fischer y Stein, 1960). La ausencia de Ca^{++} en el medio conduce a pérdida de la actividad enzimática. La β -amilasa, sin embargo, tiene actividad en ausencia de Ca^{++} (Koshiba y Minamikawa, 1981; French, 1960).

Los resultados obtenidos indicaron que en ausencia de Ca^{++} no hay bandas de actividad amilolítica. La Figura 6 muestra las cinco bandas de actividad esperada a cero horas de imbibición, para los tejidos de *A. araucana* en el experimento control en que se suministró Ca^{++} y ausencia de bandas en el gel experimental, sin Ca^{++} .

Resultados similares se obtuvieron para el gametifito de *A. araucana* y en ambos tejidos de *A. angustifolia*.

3.2.2.3 Labilidad de α -amilasa a pH ácido

La enzima α -amilasa se desnaturaliza a pH inferiores a 3,7. La β -amilasa actúa a pH ácido y su actividad se



FIG. 6 Efecto del calcio en la actividad de las isoenzimas de α -amilasa. Extracto de embrión de *A. araucana* en presencia de Ca^{++} y en ausencia de Ca^{++} .

manifiesta a pH 3 ó inferior (Jacobsen *et al.*, 1970; French, 1960).

Las bandas de actividad amilolítica obtenidas en geles incubados a pH 3 y a pH 5 (control), provenientes de extractos de embrión de *A. araucana* precalentados a 70°C, se muestran en la Figura 7. Se observa que a pH ácido aparecen dos bandas de actividad, mientras que en el control aparecen las cinco bandas. Los mismo resultados se obtuvieron con gametofito de *A. araucana*.

En los tejidos de *A. angustifolia* se observaron también dos bandas de actividad amilásica a pH 3, mientras que a pH 5 se obtuvieron tres bandas.

3.3 Caracterización de las isoenzimas de α -amilasa, de tejido embrionario y gametofítico de *Araucaria araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de la semilla

3.3.1 Determinación del patrón isoenzimático por electroforesis

Con el fin de establecer diferencias y semejanzas en la expresión génica para las isoenzimas de α -amilasa, entre el tejido embrionario y el gametofítico de semillas de ambas especies, durante el proceso de germinación y desarrollo



FIG. 7 Efecto del pH en la actividad de las isoenzimas de α -amilasa.
Extracto de embrión de *A. araucana* incubado a pH 5 y pH 3.

temprano de la plántula, se procedió a determinar por electroforesis la presencia de múltiples formas de esta enzima.

El estudio de los cambios en los patrones isoenzimáticos durante el desarrollo, es importante ya que se ha observado para *A. araucana* fluctuaciones definidas en la actividad amilolítica durante las primeras 100 horas de imbibición de la semilla (Cardemil y Reiner, 1982). Para el embrión, a cero horas de imbibición, la semilla está en un estado quiescente, y la actividad amilolítica es baja; a las 18 horas hay un aumento de la actividad amilolítica total y de la actividad amilolítica específica; a las 48 horas después de la germinación de la semilla, la actividad es relativamente baja y a las 90 horas la actividad amilolítica está considerablemente aumentada.

A continuación se describen los resultados obtenidos por electroforesis del tejido embrionario y gametofítico de *A. araucana* a diferentes tiempos de imbibición de las semillas.

3.3.1.1 Tiempo de imbibición: cero horas

A este tiempo de imbibición hay presentes en el tejido embrionario y gametofítico, cinco formas de isoenzimas de α -amilasa, cada una de ellas presenta una movilidad relativa (Rm) característica de 0,32; 0,37; 0,48; 0,52 y 0,61. La

única diferencia entre ambos tejidos de la semilla de esta especie, es la mayor intensidad de las bandas del tejido embrionario, lo que está de acuerdo con la mayor actividad en zimática señalada para este tejido (Cardemil y Reiner, 1982), Figura 8.

3.3.1.2 Tiempo de imbibición: 18 horas

A este tiempo de imbibición, ambos tejidos muestran una sola banda de actividad amilolítica como se muestra en la Figura 9. La R_m para la banda es de 0,48.

3.3.1.3 Tiempo de imbibición: 48 horas

A las 48 horas después del comienzo de la imbibición, la separación de las isoenzimas de α -amilasa por carga y peso molecular, revela por primera vez diferencias entre el patrón de las isoenzimas en ambos tejidos. El tejido embrionario presenta cuatro isoenzimas (Figura 10). El tejido gametofítico presenta también cuatro isoenzimas, tres de ellas están presentes en el tejido embrionario. Las R_m para las bandas del tejido embrionario son 0,37; 0,48; 0,52 0,58 y para el tejido game- tofítico son 0,52; 0,58 y 0,61.

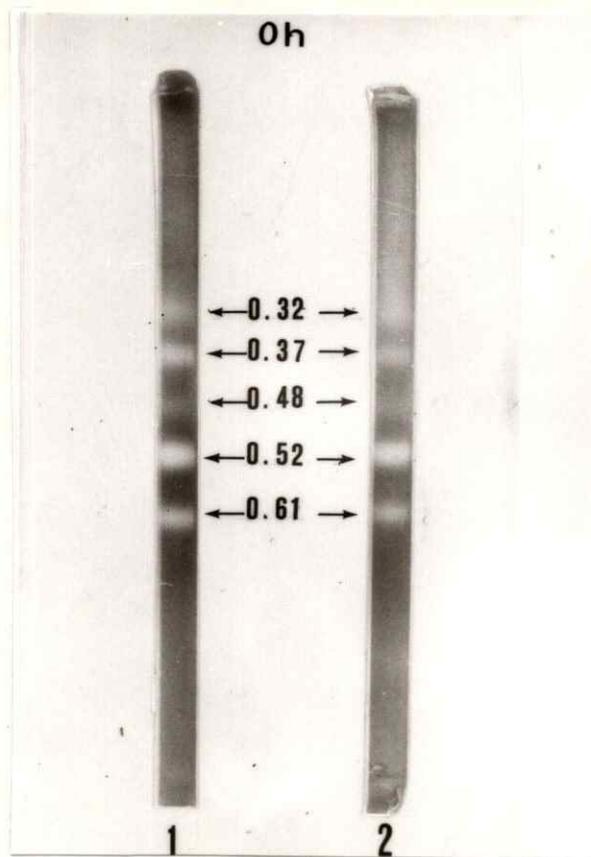


FIG. 8 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en *A. araucana* a cero horas de embibición. Extractos de tejido embrionario (1) y tejido gametofítico (2). Los números señalados en las bandas indican la Rm.

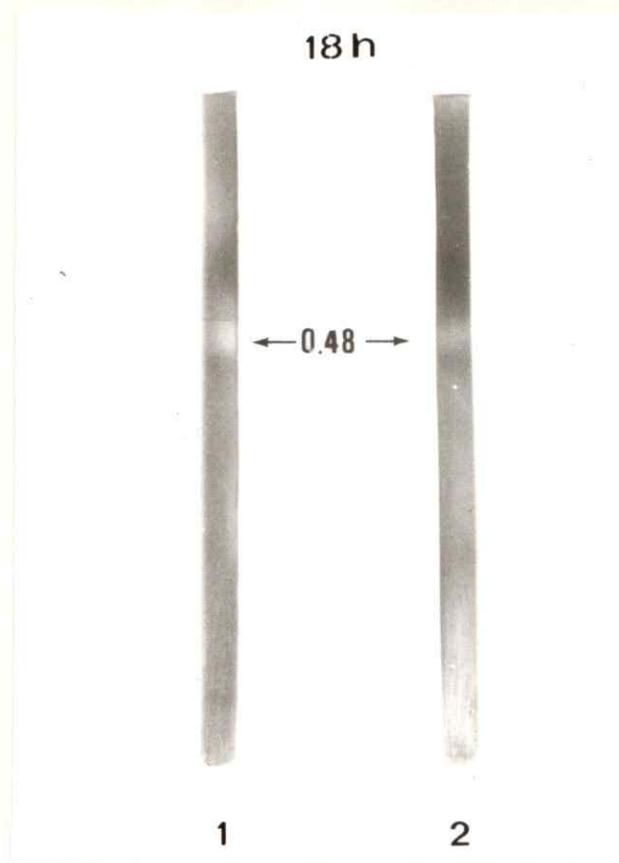


FIG. 9 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa de *A. raucana* a 18 hr de imbibición. Extractos de tejido embrionario (1) y tejido gametofítico (2). El número señalado en la banda indica la Rm.

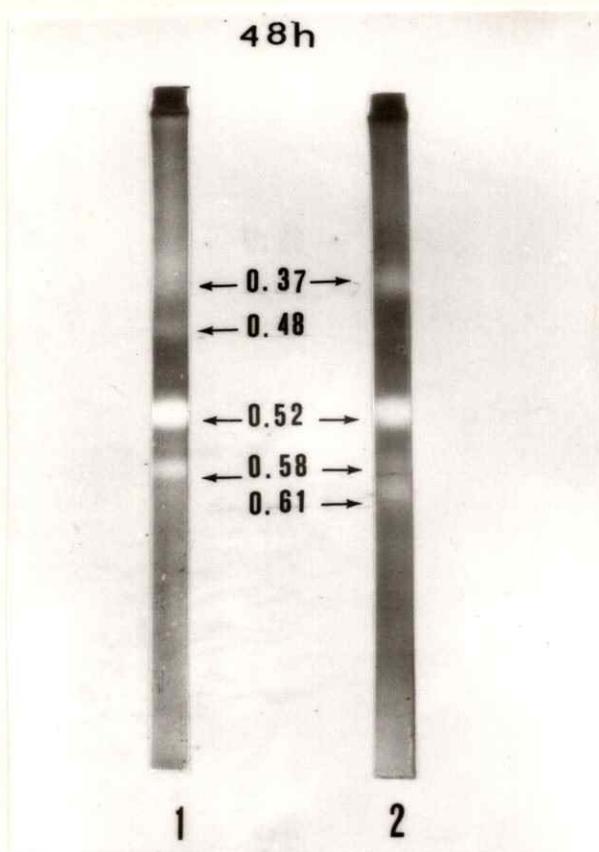


Fig. 10 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana* a 48 hr de imbibición. Extractos de tejido embrionario (1) y tejido gametofítico (2). Los números señalados en las bandas indican la Rm.

3.3.1.4 Tiempo de imbibición: 90 horas

Después de 90 horas de imbibición de la semilla, hay diferencias marcadas en el patrón de migración de las isoenzimas entre el tejido embrionario y el tejido gametofítico. El tejido embrionario presenta cuatro isoenzimas de Rm 0,37; 0,48; 0,52 y 0,61; mientras que el tejido gametofítico presenta dos isoenzimas con una Rm 0,52 y 0,58 (Figura 11). La isoenzima con Rm 0,52 está presente en ambos tejidos.

3.3.2 Determinación del patrón isoenzimático por isoelectroenfoque

Debido a las diferencias anteriormente señaladas en relación a los patrones isoenzimáticos obtenidos por electroforesis, se procedió a caracterizar estas diferencias, por medio de isoelectroenfoque, que separa las proteínas en base a su punto isoeléctrico (pI).

A continuación se describen los resultados obtenidos en el tejido embrionario y gametofítico por isoelectroenfoque a diferentes tiempos de imbibición.

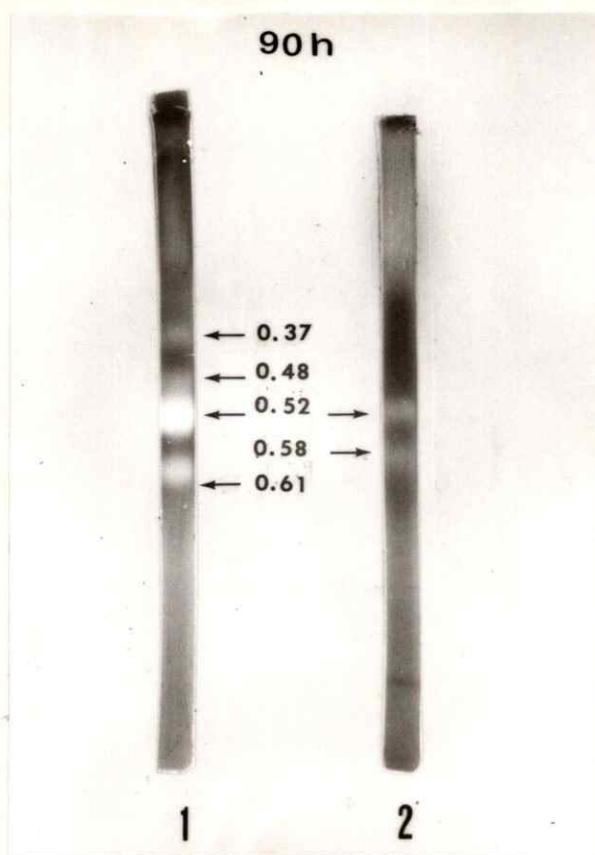


FIG. 11 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa de *A. a-raucana* a 90 hr. de imbibición. Extractos de tejido embrionario (1) y tejido gametofítico (2). Los números señalados en las bandas indican la R_m .

3.3.2.1 Tiempo de imbibición: cero horas

A este tiempo de imbibición de las semillas de *A. araucana*, se encontraron cinco formas isoenzimáticas de α -amilasa, tanto en tejido embrionario como en tejido gametofítico, con los siguientes puntos isoeléctricos: 5,80; 5,40; 5,00; 4,90 y 4,80 (Figura 12). Igual que por electroforesis, no se encontraron diferencias en el patrón isoenzimático de ambos tejidos.

3.3.2.2 Tiempo de imbibición: 18 horas

A este tiempo de imbibición de las semillas de *A. araucana*, se encontraron las mismas formas isoenzimáticas de α -amilasa en ambos tejidos, con los siguientes puntos isoeléctricos: 5,90 y 5,80 (Figura 13). Sin embargo, por electroforesis sólo se presenta una forma isoenzimática igual para ambos tejidos.

3.3.2.3 Tiempo de imbibición: 48 horas

A este tiempo de imbibición de las semillas de *A. araucana*, se encontraron cuatro formas isoenzimáticas en tejido

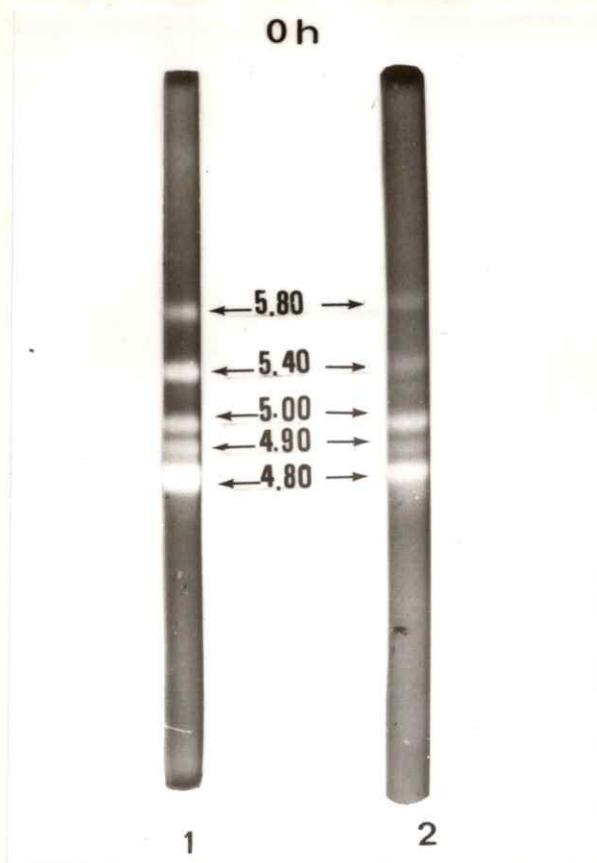


FIG. 12 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana*, a cero hora de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario (2) y tejido gametofítico (2). Los números señaladas en las bandas indican el pI.

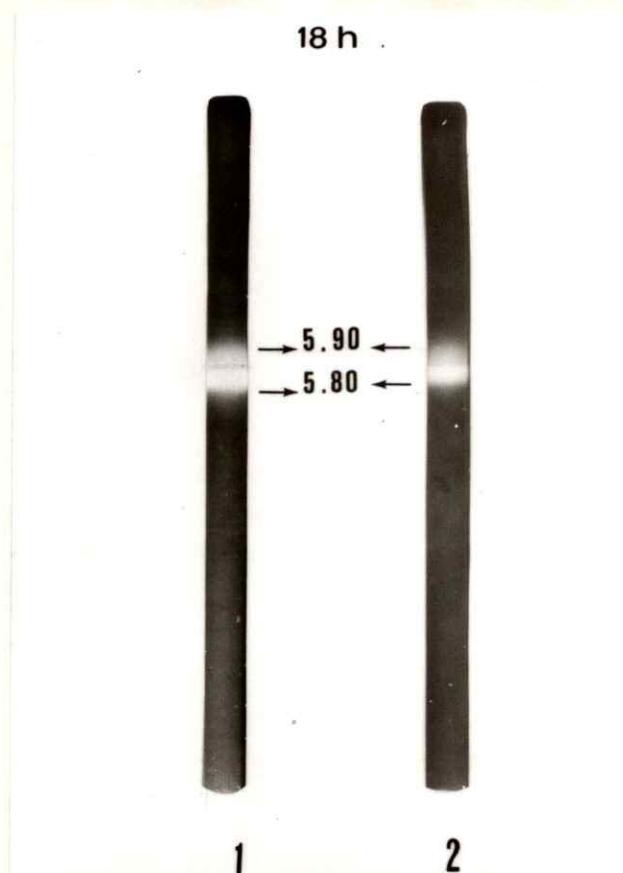


FIG. 13 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana*, a 18 hr de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario (1) y tejido gametofítico (2). Los números señalados en las bandas indican el pI.

embrionario y gametofítico con los siguientes puntos isoeléctricos: 5,80; 5,00; 4,90 y 4,80 (Figura 14). A diferencia del patrón electroforético, en donde hay diferencias entre ambos tejidos.

3.3.2.4 Tiempo de imbibición: 90 horas

A este tiempo de imbibición de las semillas de *A. araucana*, entre ambos tejidos se observan diferencias en el patrón isoenzimático, obtenido por isoelectroenfoque. El tejido embrionario presenta tres formas de isoenzimas de α -amilasa bien definidas con pI de 5,80; 5,40 y 5,30; además de dos formas isoenzimáticas con un pI de 6,00 y 6,40, difíciles de definir por ser bandas con poca actividad. En el tejido gametofítico sólo hay presentes a este tiempo de imbibición dos isoenzimas con pI de 5,30 y 5,10, una de ellas, la de pI 5,10 está presente en el tejido embrionario (Figura 15). Estos resultados confirman las diferencias obtenidas por electroforesis para ambos tejidos, donde el embrión presenta cuatro isoenzimas y el gametofito solamente dos isoenzimas.

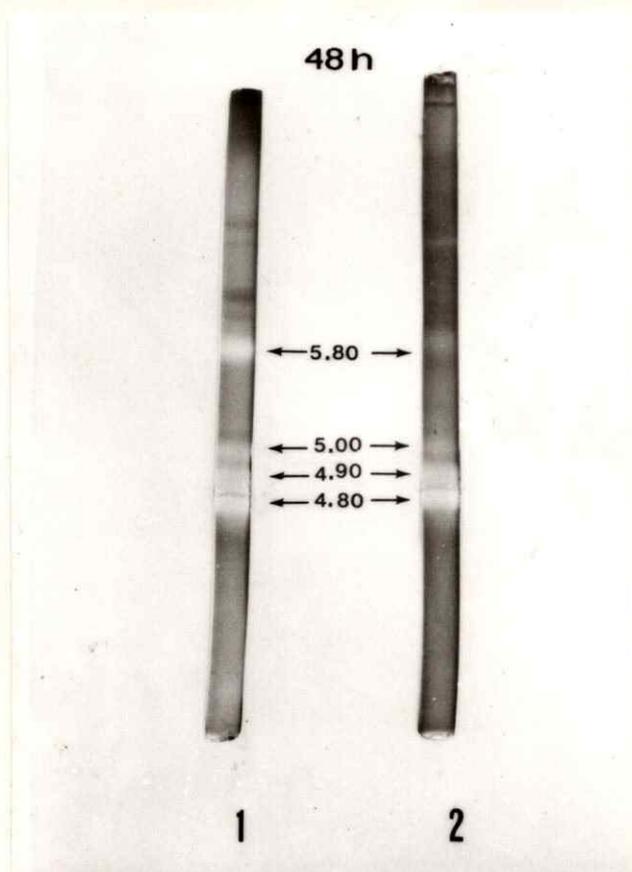


FIG. 14 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana*, a 48 hr de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extracto de tejido embrionario (1) y de tejido gametofítico (2). Los números señalados en las bandas indican el pI.

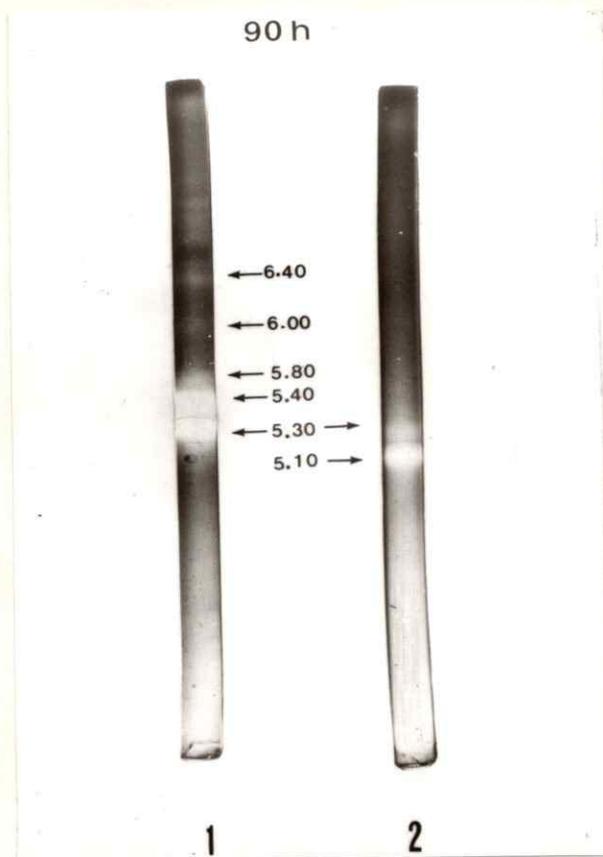


FIG. 15 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. araucana* a 90 hr de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario (1) y de tejido gametofítico (2). Los números señaladas en las bandas indican el pI.

3.4 Comparación del patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenido a diferentes tiempos de imbibición de la semilla de *Araucaria araucana*

3.4.1 Patrón isoenzimático obtenido por electroforesis

3.4.1.1 Tejido embrionario

Según el desarrollo de la semilla, se presentan en el tejido embrionario diferentes patrones isoenzimáticos característicos. Si observamos la Figura 16, a cero horas de imbibición de las semillas hay presentes cinco isoenzimas. De las isoenzimas presentes a tiempo cero de imbibición solamente una isoenzima, de Rm 0,48, está presente a las 18 horas. A las 48 horas hay presentes cuatro isoenzimas, tres de las cuales también están presentes a tiempo cero; la de Rm 0,58 aparece por primera vez. Después de 90 horas de imbibición el patrón electroforético que aparece es similar al de cero horas, a excepción de la banda con Rm 0,32. La única banda presente a todos los tiempos es la banda de Rm 0,48.

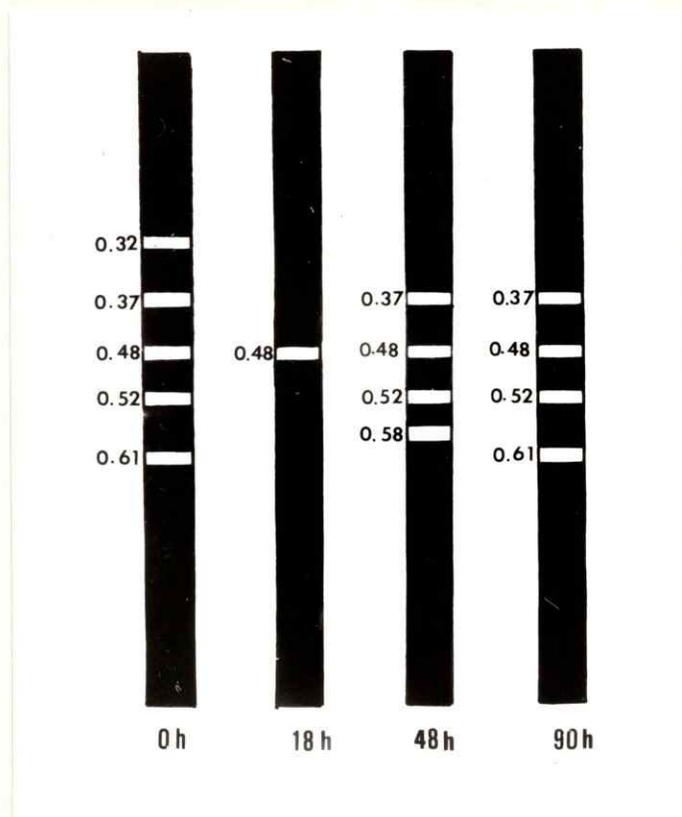


FIG. 16 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A. araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr , 48 hr. y 90 horas.

3.4.1.2 Tejido gametofítico

El patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en el tejido gametofítico cambia también con los tiempos de imbibición. En la Figura 17, se observa que a tiempo cero, antes del comienzo de la imbibición hay presentes cinco isoenzimas; cuatro isoenzimas desaparecen a las 18 hr, para quedar solo la banda de Rm 0,48. A las 48 hr vuelven a aparecer las isoenzimas, de Rm 0,52 y 0,61, que se encontraban a las cero hr y se presentan dos nuevas bandas de Rm 0,37 y 0,58. A las 90 hr de imbibición, hay dos bandas con Rm de 0,52 y 0,58. Este patrón electroforético es diferente al que se presenta a cero hr, ya que solamente hay una banda en común, la de Rm 0,52.

3.4.2 Patrón isoenzimático obtenido por isoelectroenfoque

3.4.2.1 Tejido embrionario

Al observar distintos tiempos de imbibición en la germinación de la semilla de *A. araucana*, se encuentran diferentes patrones isoenzimáticos. A cero hr hay presentes cinco isoenzimas con pI 5,80; 5,40; 5,00; 4,90 y 4,80. A las 18 hr hay solamente dos isoenzimas presentes con pI 5,90 y 5,80. A las 48

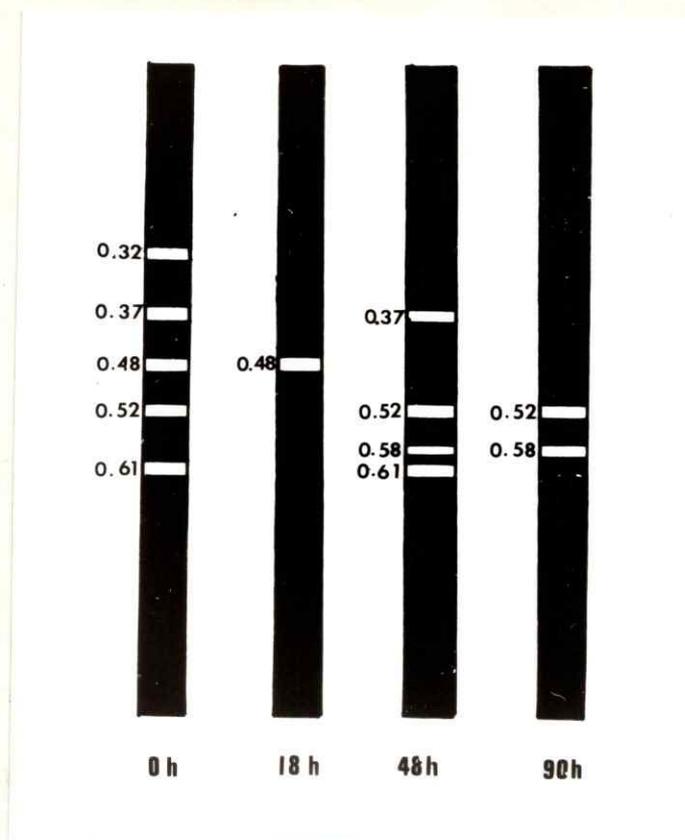


FIG. 17 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido gametofítico de *A. araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr , 48 hr y 90 horas.

horas se encuentran también las cuatro isoenzimas presentes a cero horas de imbibición, a excepción de una con pI de 5,40. A las 90 horas hay presentes tres isoenzimas con pI de 5,80; 5,40 y 5,30; la banda con punto isoeléctrico de 5,30 aparece por primera vez, a este tiempo de imbibición. La banda de punto isoeléctrico 5,8 está presente en todos los tiempos de imbibición estudiados (Figura 18).

3.4.2.2 Tejido gametofítico

A diferentes tiempos de imbibición de la semilla, hay cambios respecto al patrón isoenzimático del tejido gametofítico. Se observa que a cero horas hay presentes 5 isoenzimas con pI de 5,80; 5,40; 5,00; 4,90 y 4,80. A las 18 horas hay presentes solo dos isoenzimas con pI de 5,90 y 5,80. A las 48 horas se repite el patrón de cero horas, a excepción de una isoenzima con punto isoeléctrico de 5,40. A las 90 horas hay presentes dos nuevas isoenzimas de α -amilasa con pI de 5,30 y 5,10 que no estuvieron presentes a ningún otro tiempo de imbibición (Figura 19).

3.5 Caracterización de las isoenzimas de α -amilasa, de tejido embrionario y gametofítico de *Araucaria angustifolia* a diferentes tiempos de imbibición de la semilla

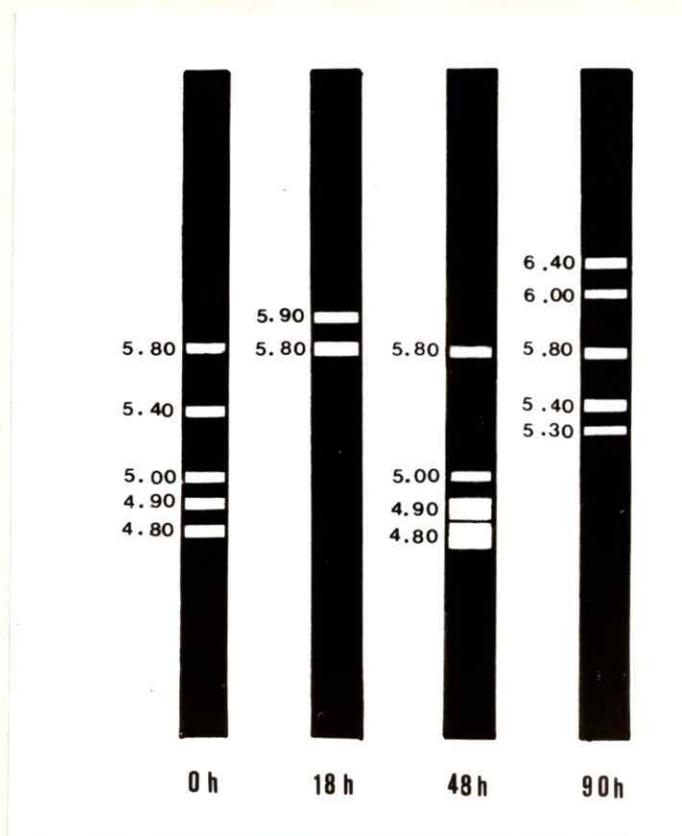


FIG. 18 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón, obtenido por iso electroenfoque, de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A. araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr , 48 hr y 90 horas.

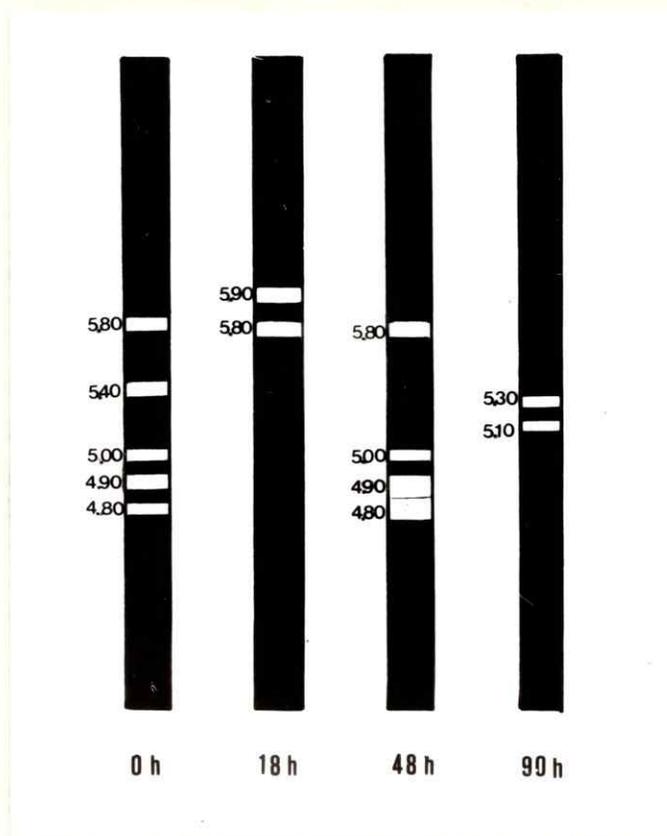


FIG. 19 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón, obtenidos por isoelectroenfoque, de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido gametofítico de *A. araucana*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr , 48 hr y 90 horas.

3.5.1 Determinación del patrón isoenzimático por electroforesis

Por ser *A. angustifolia* la otra única especie de *Araucaria* de Sud-América, es interesante estudiar el patrón isoenzimático de la α -amilasa durante el proceso germinativo de la semilla, efectuando los mismos tiempos de imbibición que para los estudios de *A. araucana*.

3.5.1.1 Tiempo de imbibición: cero horas

A este tiempo de imbibición hay presentes en el tejido embrionario y gametofítico, tres formas de isoenzimas de α -amilasa, cada una de ellas presenta una movilidad relativa (R_m) característica de: 0,26; 0,42 y 0,48. Los resultados se muestran en la Figura 20.

3.5.1.2 Tiempo de imbibición: 18 horas

A este tiempo de imbibición hay presentes en ambos tejidos una sola banda de actividad amilolítica, como se muestra en la Figura 21. La R_m para la banda es de 0,42.

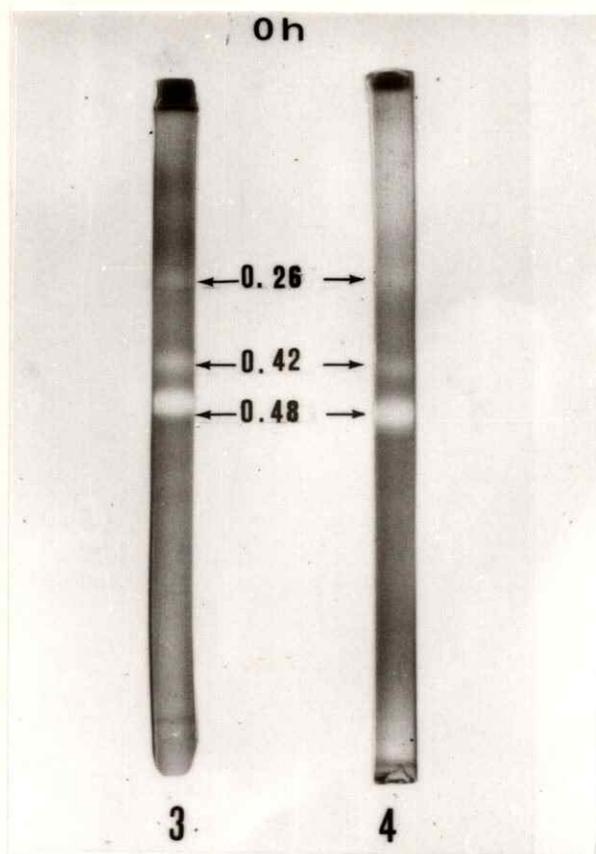


FIG. 20 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en *A. angustifolia* a cero hr de imbibición. Extractos de tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4). Los números señalados en las bandas indican la Rm.

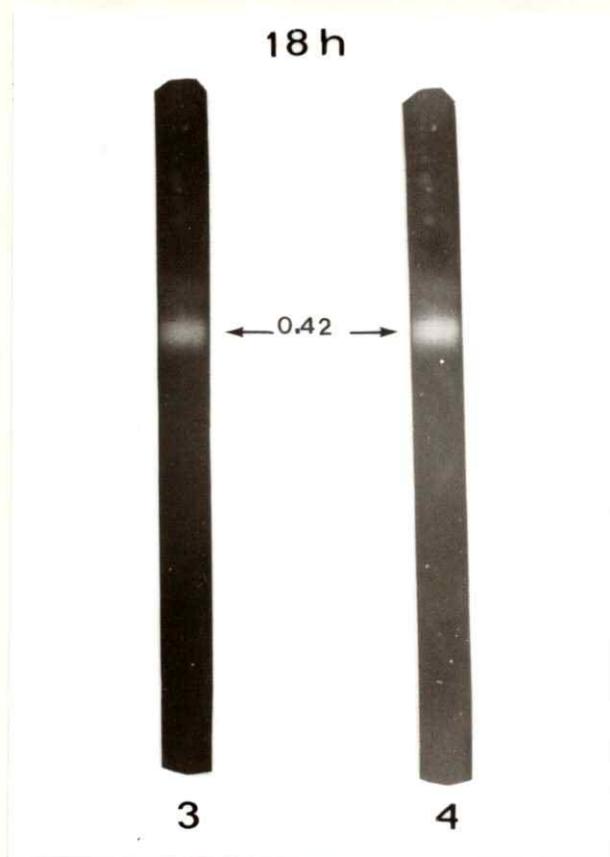


FIG. 21 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en *A. angustifolia*, a 18 hr de imbibición. Extractos de tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4). Los números señalados en las bandas indican la Rm.

3.5.1.3 Tiempo de imbibición: 48 horas

A este tiempo de imbibición hay presentes en tejido embrionario y tejido gametofítico tres formas de isoenzimas de α -amilasa; cada una de ellas con una R_m característica de: 0,26; 0,42 y 0,48 (Figura 22). La única diferencia entre ambos tejidos de la semilla de esta especie, es la mayor intensidad de las bandas con R_m 0,26 y 0,48 del tejido embrionario con respecto al tejido gametofítico.

3.5.1.4 Tiempo de imbibición: 90 horas

A este tiempo de imbibición hay presentes tres isoenzimas con R_m 0,28; 0,42 y 0,48 para tejido embrionario. En el tejido gametofítico hay presentes solamente dos isoenzimas con R_m 0,42 y 0,48. Estos resultados se muestran en la Figura 23.

3.5.2 Determinación del patrón isoenzimático por isoelectroenfoque

Con el fin de caracterizar mejor los patrones isoenzimáticos obtenidos por electroforesis a distintos tiempo de

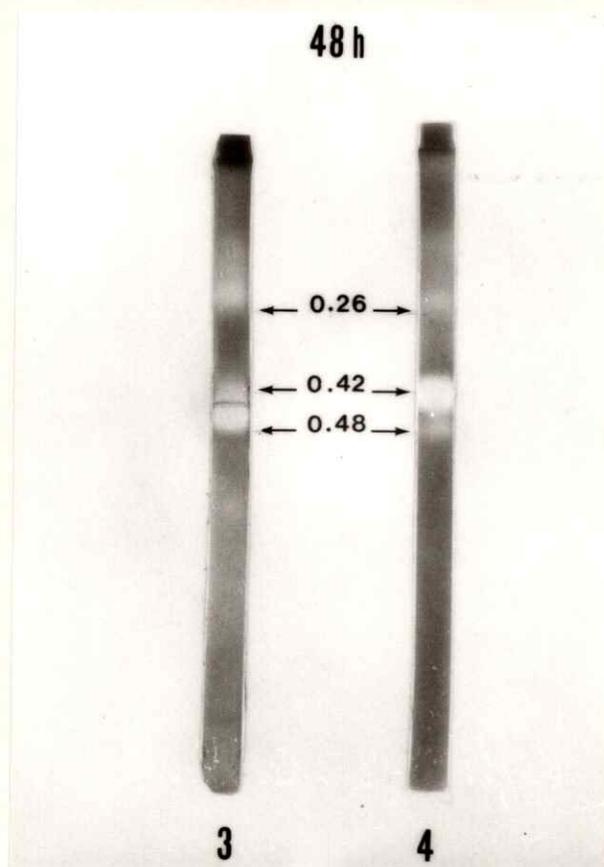


FIG. 22 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en *A. angustifolia*, a 48 hr de imbibición. Extractos de tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4). Los números señalados en las bandas indican la Rm.

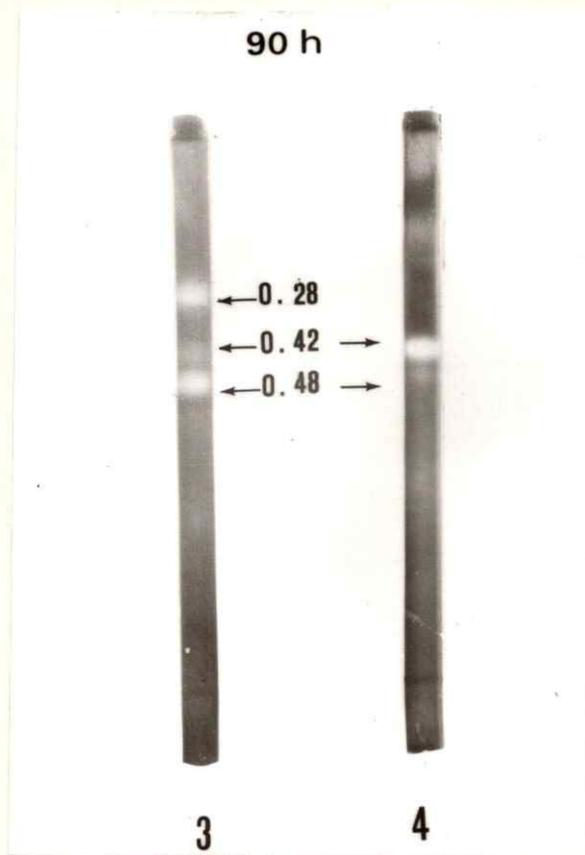


FIG. 23 Patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en *A. angustifolia*, a 90 hr de imbibición. Extractos de tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4). Los números señalados en las bandas indican la R_m .

imbibición, extracto de ambos tejidos de semillas de tiempos de imbibición de cero, 18, 48 y 90 horas, fueron investigados por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida. En esta forma se podría confirmar las diferencias y similitudes en las isoenzimas encontradas por electroforesis.

A continuación, se describen los resultados obtenidos en tejido embrionario y gametofítico por isoelectroenfoque a diferentes tiempos de imbibición.

3.5.2.1 Tiempo de imbibición: cero horas

A este tiempo de imbibición de las semillas de *A. angustifolia* se encontraron cinco formas isoenzimáticas de α -am \bar{i} lasa en tejido embrionario. En el tejido gametofítico, en cambio, se presentan seis isoenzimas. En ambos tejidos están presentes cinco formas isoenzimáticas con los siguientes pI: 5,80; 5,40; 5,30; 5,00 y 4,80. Para el tejido gametofítico está presente además la banda con pI 4,90 (Figura 24), mientras que por electroforesis no se encuentran diferencias entre ambos tejidos.

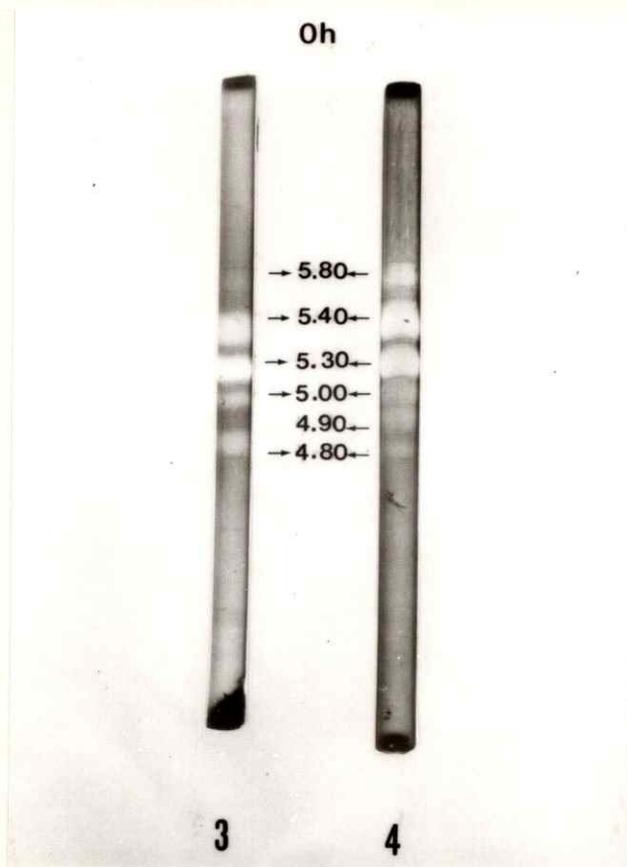


FIG. 24 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. angustifolia*, a ce ro h1 de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4). Los números señalados en las bandas indican el pI.

3.5.2.2 Tiempo de imbibición: 18 horas

A las 18 horas de imbibición el tejido embrionario de *A. angustifolia* presenta una isoenzima con un pI de 6,05 mientras que el tejido gametofítico presenta dos isoenzimas con un pI de 6,15 y 6,05. La isoenzima de pI 6,05 está presente en ambos tejidos (Figura 25). Por electroforesis aparece una sola banda de actividad en ambos tejidos con la misma R_m.

3.5.2.3 Tiempo de imbibición: 48 horas

A este tiempo de imbibición de las semillas de *A. angustifolia*, se encontraron en tejido embrionario y tejido gametofítico tres formas isoenzimáticas comunes en los dos tejidos, con los siguientes puntos isoeléctricos: 5,40; 5,30 y 5,00. También se encontró una diferencia entre ambos tejidos ya que solamente en el tejido embrionario está presente la banda de pI 4,80 (Figura 26).

3,5,2,4 Tiempo de imbibición; 90 horas

A las 90 horas después del comienzo de imbibición de las semillas de *A. angustifolia*, se observaron diferencias en el

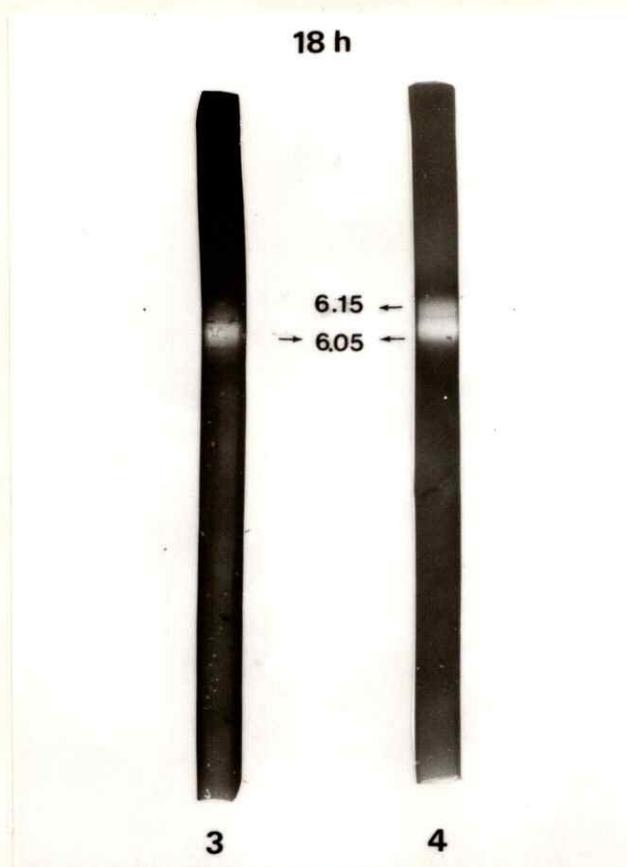


FIG. 25 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. angustifolia*, a 18 hr de imbibición obtenidos por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4). Los números señalados en las bandas indican el pI.

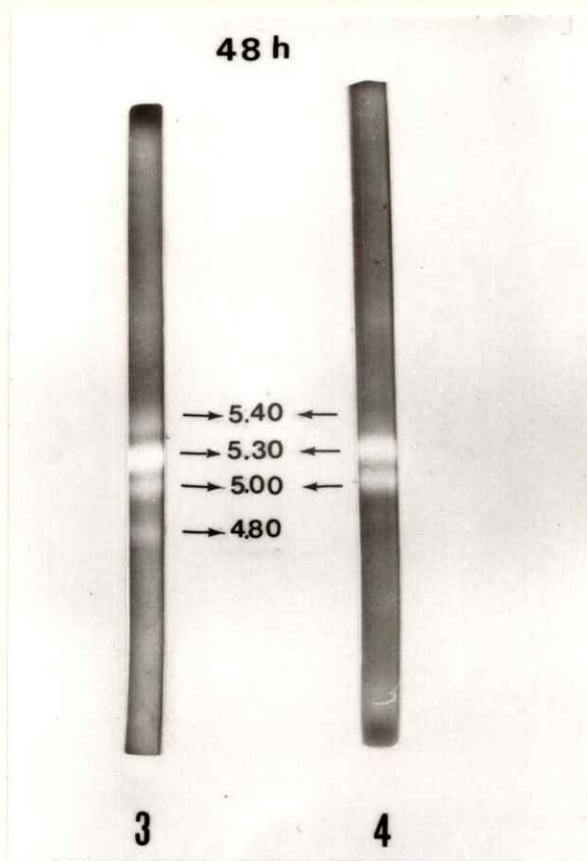


FIG. 26 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. angustifolia*, a 48 hr. de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4). Los números señalados en las bandas indican el pI.

patrón isoenzimático en ambos tejidos. El tejido embrionario presenta cuatro formas isoenzimáticas con pI de 5,40; 5,30; 5,00 y 4,80. El tejido gametofítico presenta a este tiempo de imbibición tres isoenzimas con pI de 5,40; 5,30 y 5,00 en tejido gametofítico (Figura 27). Se observa también diferencia en la actividad de las diferentes formas isoenzimáticas.

3.6 Comparación del patrón de las isoenzimas de α -amilasa obtenido a diferentes tiempos de imbibición de la semilla de *Araucaria angustifolia*

3.6.1 Patrón isoenzimático obtenido por electroforesis

3.6.1.1 Tejido embrionario

Según el grado de desarrollo del proceso de germinación, presenta diferentes isoenzimas, que son características para los tiempos de imbibición escogidos.

En la Figura 28 se observan tres isoenzimas a tiempo cero de imbibición de la semilla. De las isoenzimas presentes a tiempo cero, solamente una con Rm 0,42 está presente a las 18 horas. A las 48 horas reaparecen las tres isoenzimas presentes a tiempo cero. Solo después de 90 horas de imbibición aparece por primera vez una isoenzima con Rm 0,28 no

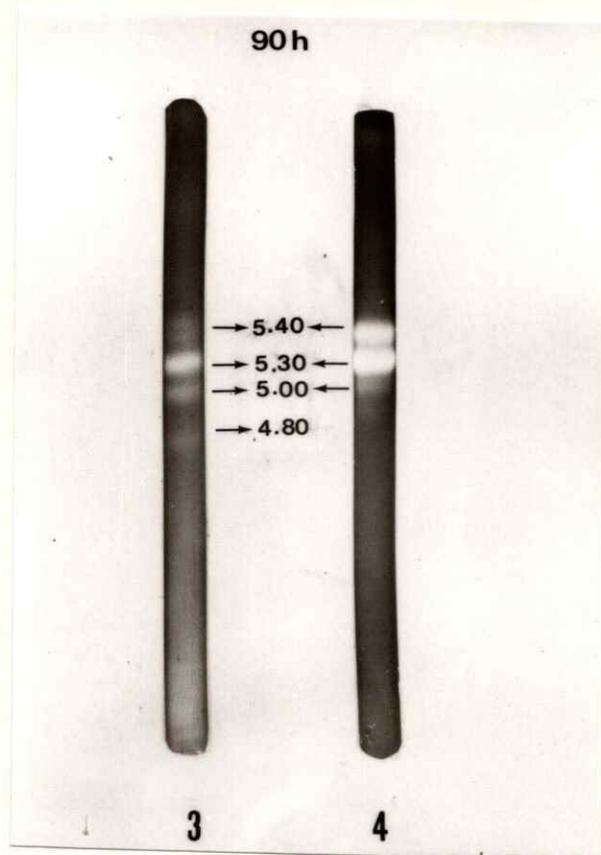


FIG. 27 Patrón de las isoenzimas de α -amilasa de *A. angustifolia*, a 90 hr de imbibición, obtenido por isoelectroenfoque. Extractos de tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4). Los números señalados en las bandas indican el pI.

presente anteriormente, la que reemplazaría a la isoenzima con Rm 0,26. La única banda presente en todos los tiempos de imbibición estudiados es la banda de Rm 0,42.

3.6.1.2 Tejido gametofítico

El patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en el tejido gametofítico cambia con los tiempos de imbibición igual que en el tejido embrionario. A tiempo cero, antes del comienzo de la imbibición, hay presentes tres isoenzimas con Rm 0,26; 0,42 y 0,48. A las 18 horas, está presente solo la banda con Rm 0,42. A las 48 horas vuelven a aparecer las tres isoenzimas que se encontraban a las cero horas. A las 90 horas de imbibición solamente se presentan las dos isoenzimas, con Rm 0,42 y 0,48, que aparecieron a cero horas (Figura 29). La única banda presente en todos los tiempos de imbibición estudiados es la banda de Rm 0,42.

3.6.2 Patrón isoenzimático obtenido por isoelectroenfoque

3.6.2.1 Tejido embrionario

En la Figura 30 se muestra un cuadro comparativo del patrón isoenzimático obtenido por isoelectroenfoque para el tejido embrionario de la semilla de *A. angustifolia* a

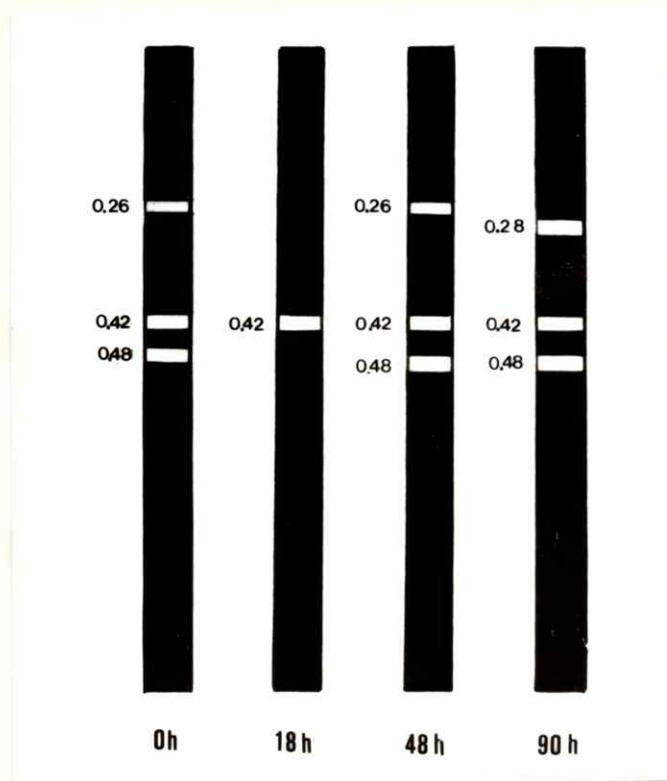


FIG. 28 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr , 48 hr y 90 horas.

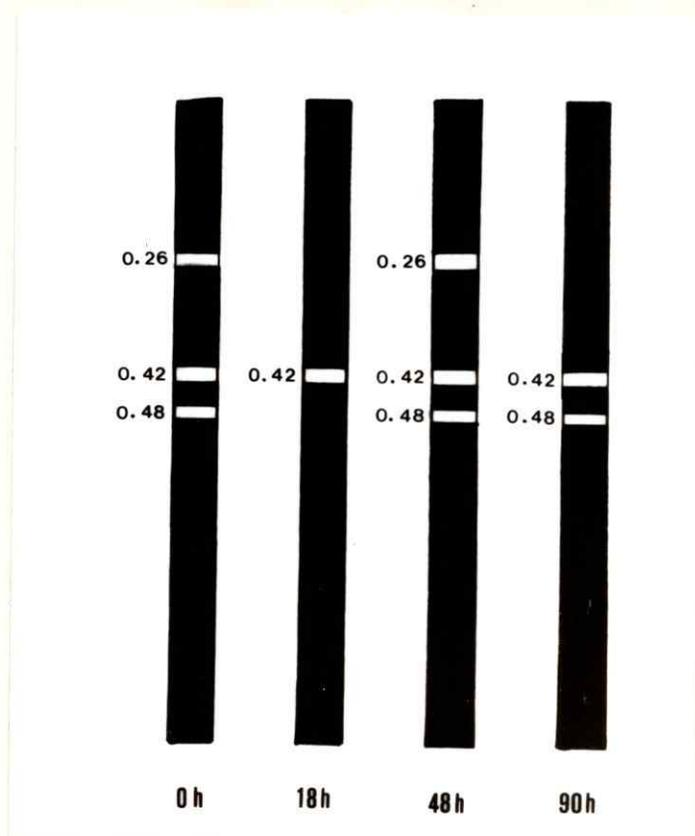


FIG. 29 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido gametofítico de *A. angustifolia* a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr ., 48 hr y 90 horas.

diferentes tiempos de imbibición. A cero horas se observaron cinco isoenzimas con un pI de: 5,80; 5,40; 5,30; 5,00 y 4,80. A las 18 horas hay solamente una isoenzima de pI 6,05 no presente a tiempo cero. A las 48 horas se encontraron presentes cuatro isoenzimas con pI de 5,40; 5,30; 5,00 y 4,80 que se encontraban también a cero horas. A las 90 horas hay cuatro isoenzimas presentes de pI 5,40; 5,30; 5,00 y 4,80 que se encontraron también en los tiempos cero y 48 horas de imbibición.

3.6.2.2 Tejido gametofítico

La Figura 31 muestra un cuadro comparativo de las isoenzimas de α -amilasa, observadas por isoelectroenfoque para el tejido gametofítico, a diferentes tiempos de imbibición de la semilla de *A. angustifolia*. A las cero horas hay presentes seis isoenzimas de pI 5,80; 5,40; 5,30; 5,00; 4,90; 4,80. A las 18 horas aparecen solo dos isoenzimas con pI de 6,15 y 6,05, no presentes a tiempo cero. A las 48 horas reaparecen tres isoenzimas con pI de 5,40; 5,30 y 5,00 que estaban presentes a cero horas. A las 90 horas se mantienen las tres isoenzimas que estaban presentes a las 48 horas.

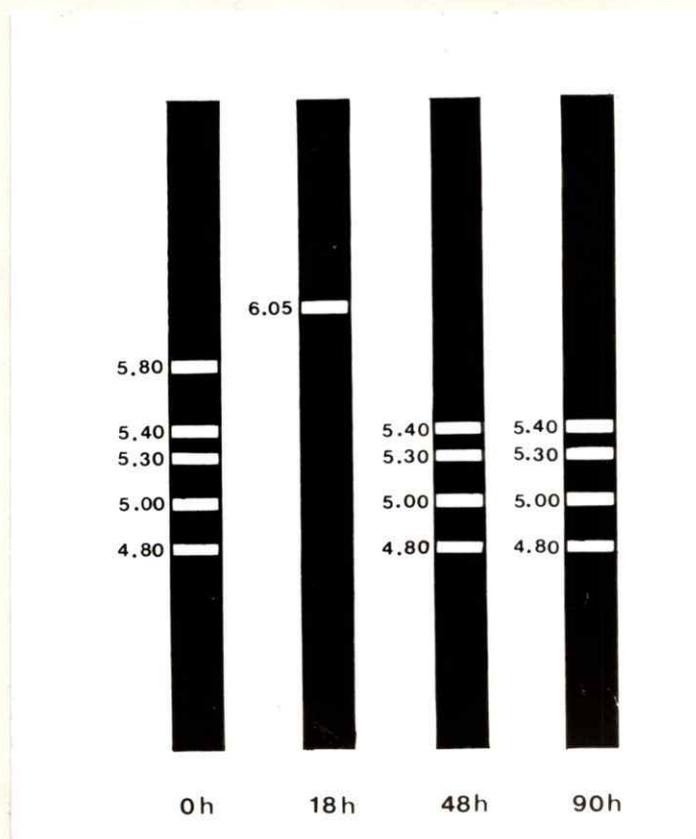


FIG. 30 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón, obtenido por iso electroenfoque, de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr , 48 hr. y 90 horas.

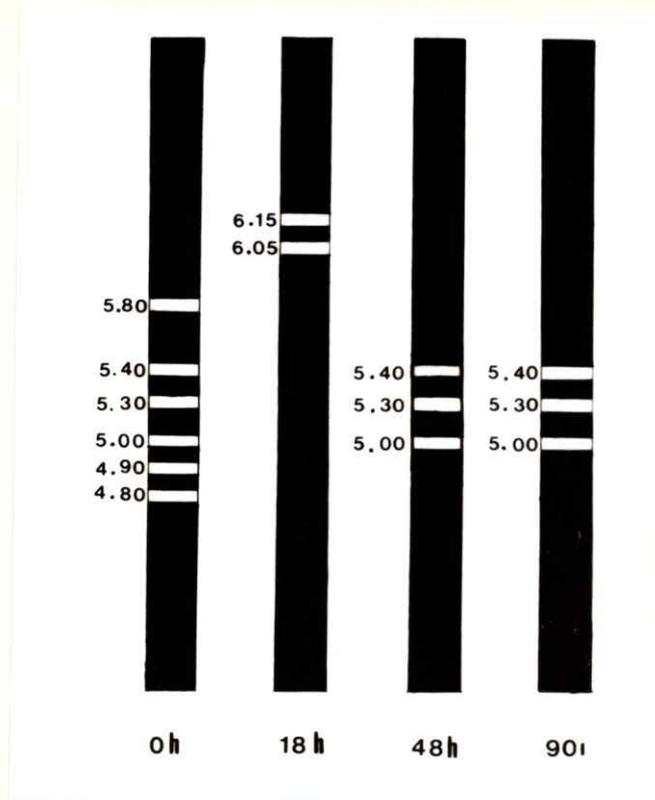


FIG. 31 Cuadro comparativo de los cambios en el patrón, obtenido por isoelectroenfoque, de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido gametofítico de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr , 48 hr . y 90 horas.

3.7 Comparación de los patrones isoenzimáticos de α -amilasa en los tejidos de *A. araucana* y *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de la semilla

3.7.1 Patrón obtenido por electroforesis

3.7.1.1 Tejido embrionario

3.7.1.1.1 Tiempo de imbibición: cero horas

A este tiempo de imbibición hay presentes en tejido embrionario de *A. araucana* cinco formas de isoenzimas de α -am^{il}lasa, cada una de ellas presenta una Rm característica de: 0,32; 0,37; 0,48; 0,52 y 0,61 (Figura 32-1). En el tejido em^{br}ionario de *A. angustifolia* hay presentes tres formas de iso^{enz}imas con las siguientes Rm: 0,26; 0,42 y 0,48 (Figura 32-3). De las cinco bandas que aparecen en *A. araucana* solamente la de Rm 0,48 se presenta también en *A. angustifolia*.

3.7.1.1.2 Tiempo de imbibición: 18 horas

A este tiempo de imbibición el tejido embrionario en am^{bas} especies muestra una sola banda de actividad amilolítica, pero con Rm diferentes. En *A. araucana* la Rm es de 0,48 y en

A. angustifolia es de 0,42, tal como se muestra en la Figura 32.

3.7.1.1.3 Tiempo de imbibición: 48 horas

A este tiempo de imbibición hay presentes cuatro formas isoenzimáticas en el tejido embrionario de *A. araucana* con una Rm característica de 0,37; 0,48; 0,52 y 0,58. En *A. angustifolia* hay presentes tres formas isoenzimáticas con una Rm de: 0,26; 0,42 y 0,48. La única forma isoenzimática en común para tejido embrionario de ambas especies es la de Rm 0,48 (Figura 32).

3.7.1.1.4 Tiempo de imbibición: 90 horas

A este tiempo de imbibición de la semilla se presentan diferencias marcadas en el patrón de migración electroforético de las isoenzimas de α -amilasa en el tejido embrionario, entre las dos especies. En *A. araucana* aparecen cuatro isoenzimas de Rm: 0,37; 0,48; 0,52 y 0,61, mientras que en *A. angustifolia* se presentan únicamente tres isoenzimas con Rm de: 0,28; 0,42 y 0,48. Nuevamente la banda de Rm 0,48 está presente en ambas *Araucarias*.

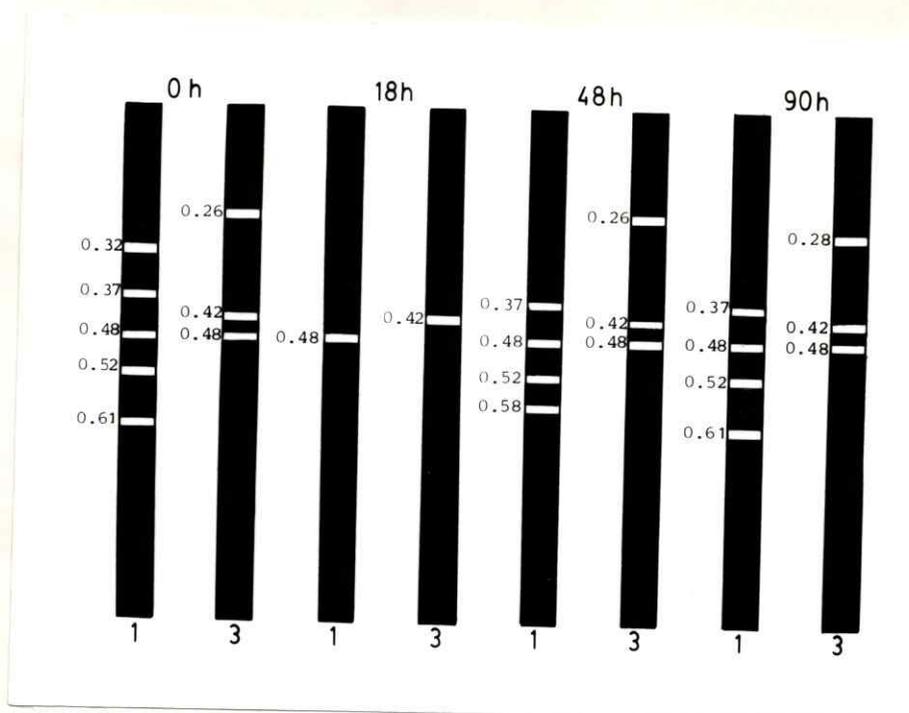


FIG. 32 Cuadros comparativos de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa para el tejido embrionario de *A. araucana* (1) y de *A. angustifolia* (3), a diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr , 48 hr. y 90 horas.

3.7.1.2 Tejido gametofítico

3.7.1.2.1 Tiempo de imbibición: cero horas

A este tiempo de imbibición el tejido gametofítico de *A. araucana* presenta cinco formas isoenzimáticas con Rm de 0,32; 0,37; 0,48; 0,52 y 0,61 (Figura 33-2). En el tejido gametofítico de *A. angustifolia* hay presentes tres formas isoenzimáticas con Rm de 0,26; 0,42 y 0,48 (Figura 33-4). La única isoenzima común entre ambas especies es la de Rm 0,48.

3.7.1.2.2 Tiempo de imbibición: 18 horas

El tejido gametofítico en ambas especies, presenta una sola banda de actividad amilolítica, pero de distinta Rm. En *A. araucana* presenta una Rm de 0,48 (Figura 33-2) y en *A. angustifolia* una Rm de 0,42 (Figura 33-4).

3.7.1.2.3 Tiempo de imbibición: 48 horas

La Figura 33 muestra que hay diferencias marcadas en el patrón de migración electroforética entre las dos especies de *Araucaria*, ya que a este tiempo de imbibición hay

presentes cuatro formas isoenzimáticas en el tejido gametofítico de *A. araucana* con una Rm característica de: 0,37; 0,52; 0,58 y 0,61 (2) y en el tejido gametofítico de *A. angustifolia* hay presentes tres formas isoenzimáticas con una Rm de: 0,26; 0,42 y 0,48 (4).

3.7.1.2.4 Tiempo de imbibición: 90 horas

La Figura 33 muestra que a este tiempo de imbibición de las semillas, también hay diferencias en la migración de las isoenzimas de α -amilasa, ya que en el tejido gametofítico de *A. araucana* hay presentes dos formas isoenzimáticas con una Rm característica de: 0,52 y 0,58 (2) y en el tejido gametofítico de *A. angustifolia* hay presentes dos formas isoenzimáticas con una Rm de 0,42 y 0,48 (4).

3.7.2 Patrón obtenido por isoelectroenfoque

3.7.2.1 Tejido embrionario

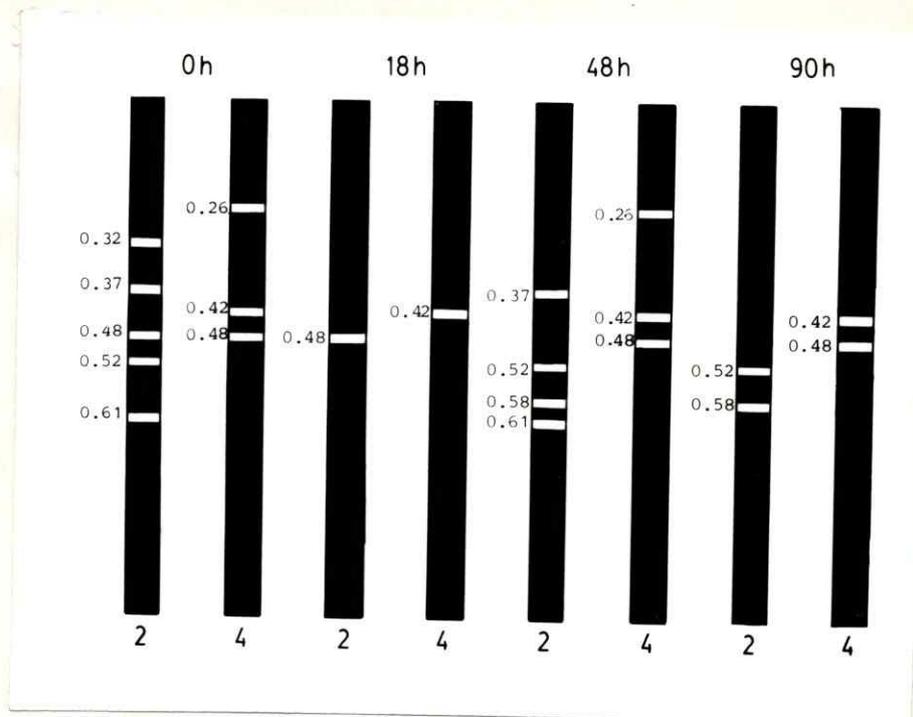


FIG. 33 Cuadros comparativos de los cambios en el patrón electroforético de las isoenzimas de α -amilasa, para el tejido gametofítico de *A. araucana* (2) y *A. angustifolia* (4), a los diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr. , 18 hr. , 48 hr. y 90 horas.

3.7.2.1.1 Tiempo de imbibición: cero horas

A este tiempo de imbibición se encontraron cinco formas isoenzimáticas de α -amilasa en tejido embrionario de *A. araucana* con los siguientes puntos isoeléctricos: 5,80; 5,40; 5,00; 4,90 y 4,80 (Figura 34-1). En el tejido embrionario de *A. angustifolia* se encontraron también cinco formas isoenzimáticas con los siguientes puntos isoeléctricos: 5,80; 5,40; 5,30; 5,00; y 4,80 (Figura 34-3).

Entre ambas especies hay cuatro isoenzimas con puntos isoeléctricos comunes y solamente una forma isoenzimática con un pI diferente.

3.7.2.1.2 Tiempo de imbibición: 18 horas

En el tejido embrionario de *A. araucana* hay presentes dos formas isoenzimáticas a este tiempo de imbibición, con los siguientes pI 5,90 y 5,80 (Figura 34-1). Sin embargo, en *A. angustifolia* el tejido embrionario presenta una sola forma isoenzimática con un pI de 6,05 (Figura 34-3).

3.7.2.1.3 Tiempo de imbibición: 48 horas

A este tiempo de imbibición hay presentes en el tejido embrionario de *A. araucana* cuatro formas isoenzimáticas con los siguientes pI: 5,80; 5,00; 4,90 y 4,80 (Figura 34-1). El tejido embrionario de *A. angustifolia* presenta también cuatro formas isoenzimáticas con los siguientes pI: 5,40; 5,30; 5,00 y 4,80 (Figura 34-3). Ambas especies presentan dos isoenzimas en el tejido embrionario con un pI común.

3.7.2.1.4 Tiempo de imbibición: 90 horas

A este tiempo de imbibición hay presentes cinco isoenzimas en el tejido embrionario de *A. araucana* con un pI de: 6,40; 6,00; 5,80; 5,40 y 5,30 (Figura 34-1) y en el tejido embrionario de *A. angustifolia* cuatro isoenzimas con el siguiente pI: 5,40; 5,30; 5,00 y 4,80 (Figura 34-3). Las isoenzimas con pI 5,40 y 5,30 están presentes en el tejido embrionario de ambas especies. El tejido embrionario de ambas especies presenta también dos isoenzimas con el mismo punto isoeléctrico.

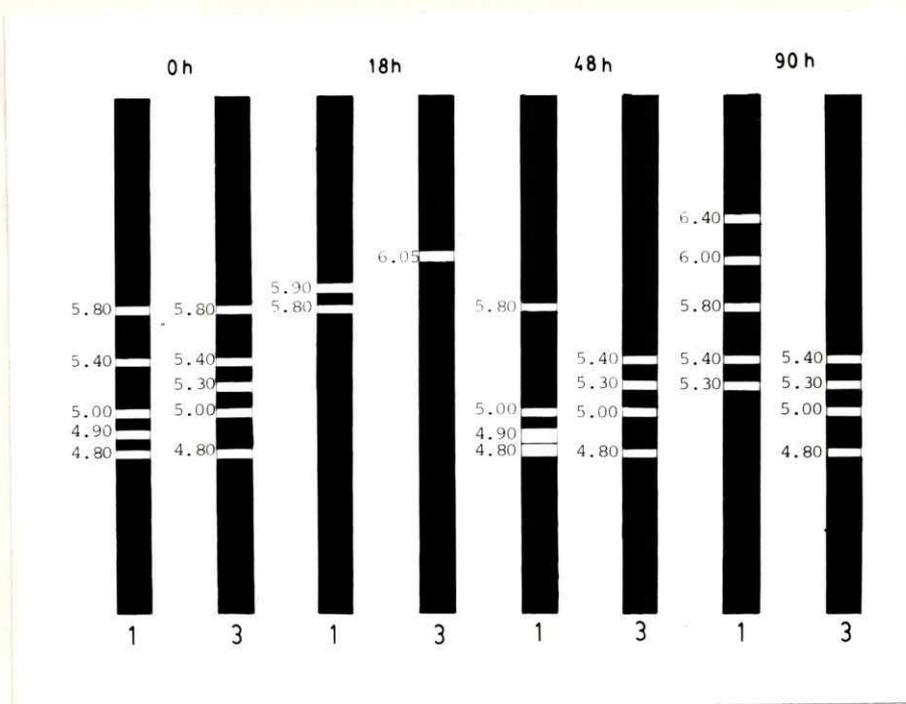


FIG. 34 Cuadros comparativos de los cambios en el patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenidos por isoelectroenfoque, para el tejido embriionario de *A. araucana* (1) y *A. angustifolia* (3), a los diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr , 18 hr., 48 hr y 90 horas.

3.7.2.2 Tejido gametofítico

3.7.2.2.1 Tiempo de imbibición: cero horas

A este tiempo de imbibición el tejido gametofítico de *A. araucana* presenta cinco formas isoenzimáticas con un pI de: 5,80; 5,40; 5,00; 4,90 y 4,80 (Figura 35-2). En el tejido gametofítico de *A. angustifolia* se presentan seis formas isoenzimáticas (Figura 35-4), de las cuales cinco formas son comunes en *A. araucana* y una forma que se encuentra solamente en el tejido gametofítico de *A. angustifolia*, la forma de pI 5,30.

3.7.2.2.2 Tiempo de imbibición: 18 horas

A este tiempo de imbibición se presentan dos formas isoenzimáticas en ambas especies, pero con diferentes puntos isoeléctricos. El tejido gametofítico de *A. araucana* presenta dos formas isoenzimáticas con un pI: 5,90 y 5,80 (Figura 35-2); mientras que en tejido gametofítico de *A. angustifolia* las dos formas isoenzimáticas presentan un pI de: 6,15 y 6,05 (Figura 35-4).

3.7.2.2.3 Tiempo de imbibición: 48 horas

A este tiempo de imbibición en el tejido gametofítico de *A. araucana* hay presentes cuatro formas isoenzimáticas con los siguientes pI: 5,80; 5,00; 4,90 y 4,80 (Figura 35-2). El tejido gametofítico de *A. angustifolia* presenta tres formas isoenzimáticas con pI de: 5,40; 5,30 y 5,00 entre ambas especies (Figura 35-4) hay solo una forma isoenzimática en común con un pI de 5,00.

3.7.2.2.4 Tiempo de imbibición: 90 horas

A este tiempo de imbibición en el tejido embrionario de *A. araucana* hay presentes dos formas isoenzimáticas con pI de 5,30 y 5,10 (Figura 35-2), mientras que en el tejido gametofítico de *A. angustifolia* hay presentes tres formas isoenzimáticas con un pI de: 5,40, 5,30 y 5,00 (Figura 35-4). La forma isoenzimática de 5,30 es común a ambas especies.

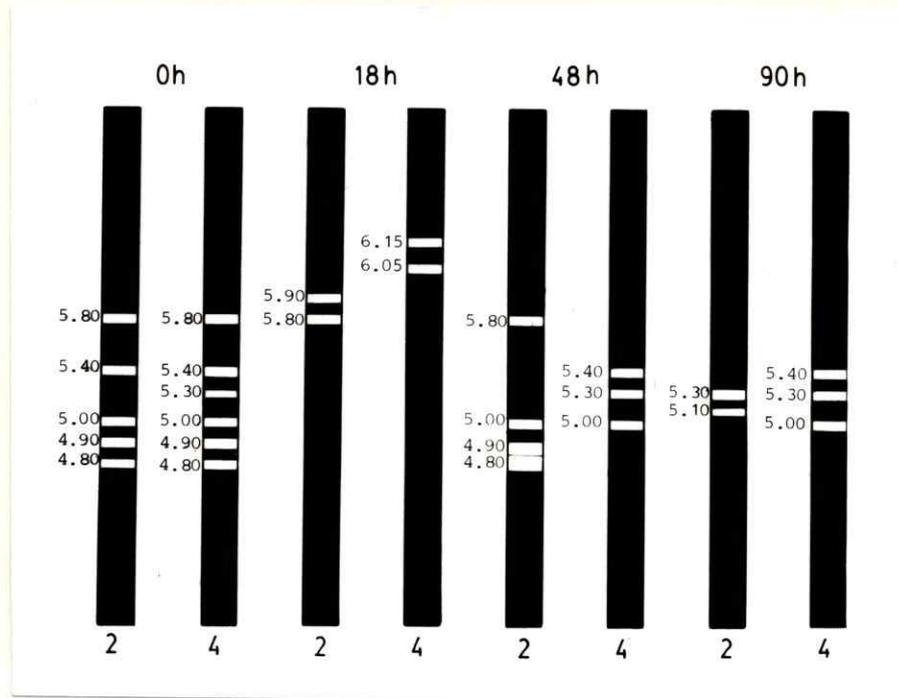


FIG. 35 Cuadros comparativos de los cambios en el patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenidos por isoelectroenfoque, para el tejido gametofítico de *A. araucana* (2) y *A. angustifolia* (4), a los diferentes tiempos de imbibición de las semillas: cero hr., 18 hr., 48 hr. y 90 horas.

DISCUSION

En esta tesis, es la primera vez que se informa un estudio comparativo del cariotipo de ambas especies de *Araucaria* de Sud-América. En algunos trabajos se ha descrito el número de cromosomas e idiogramas no detallados en algunas especies de *Araucaria* (Chamberlain, 1935; Flory, 1936; Hair y Beuzenberg, 1958 y Hodcent, 1968).

Flory realizó un recuento de cromosomas de *Araucaria brasiliana* (ó *A. angustifolia*). Sin embargo, en sus trabajos se omite el detalle del tamaño de los cromosomas, constricciones y satélites. Tales estructuras son difíciles de observar en los aplastados de cromosomas en *Araucaria*, cuando no se utilizan enzimas que remueven la pared celular o reactivos como colchicina, hidroxiquinolina ó 1-bromonaftaleno que acortan los cromosomas. Hodcent, en 1968, hizo un estudio de cariotipo detallado en la *A. araucana*, usando tejido magagametofítico de óvulos en desarrollo, tratados con colchicina. Los trabajos anteriores coincidieron en cuanto al número y cierta homogeneidad en la morfología de los cromosomas, en las dos especies de *Araucaria*.

En base a los resultados de Flory (1936) y los de Hodcent (1968) y a las similitudes morfológicas y fisiológicas descritas por Montaldo (1974), por Tesdorff (1956) y por Cardemil y

Varner (1983); en las especies de *Araucaria* encontradas en América del Sur, se hizo un estudio detallado del cariotipo y de los patrones isoenzimáticos para α -amilasa de estas dos especies.

En el estudio del cariotipo se encontraron similitudes en relación al número, morfología y tamaño cromosómico para *A. araucana* y *A. angustifolia*; resultados mostrados en las Figuras 1 y 2. El número diploide de cromosomas para ambas especies de *Araucaria* es de 26. Esto hace 13 pares de homólogos. Heterocromosomas que pueden ser identificados como cromosomas sexuales no están presentes en ninguna de estas dos especies. En razón de que ambas especies de *Araucaria* son dioicas y excepcionalmente muestran conos masculinos y femeninos en el mismo árbol, es válida la pregunta de si las especies de *A. araucana* y *A. angustifolia* poseen cromosomas sexuales. Hasta ahora no se ha informado de la presencia de heterocromosomas en ninguna gimnosperma. Ambos cariotipos se caracterizan por la presencia de una constricción secundaria larga, intercalar, en el brazo corto del par N°1; la constricción secundaria larga, presente en un par de cromosomas, parece estar ampliamente distribuida en las gimnospermas. La constricción ha sido vista en *Zamia integrifolia* (Norstog, 1965) y en *Phyllocladus glaucus* (Hair y Beuzenberg, 1958), ubicada en la región media del brazo y en *Agathis robusta* (Flory, 1936), *Araucaria angustifolia* (*A. brasiliana*), *Agathis australis* (Flory, 1936; Hair

y Beuzenberg, 1958) y *Araucaria araucana* (Hodcent, 1968), la constricción es intercalar y cercana al centrómero.

En ambas especies la constricción se tiñe bien con nitrato de plata amoniacal. Hasta el presente, está bien establecido que las constricciones secundarias positivas a la tinción de plata amoniacal están involucradas en la síntesis nucleolar (Giménez-Martin *et al.*, 1977; Goodpasture y Bloom, 1975; Schwarzacher *et al.*, 1978). El reactivo de plata amoniacal ha sido utilizado para identificar la NOR en *Allium cepa*, en *Vicia* (Giménez-Martin, 1977) en muchas especies animales (Goodpasture y Bloom, 1975) y en cromosomas humanos (Schwarzacher *et al.*, 1978), según nuestro conocimiento es la primera vez que la constricción secundaria ha sido identificado como NOR en gimnospermas. La constricción entera en el par N°1 es teñida en concordancia con la hipótesis de Heitz (1931) que la constricción misma es el sitio activo para la organización nucleolar. Sin embargo, en las especies de *Araucaria* los seusatélites intercalares también se tiñen, favoreciendo la idea de Mc Clintock (1934), que la actividad organizadora del nucléolo, también está presente en la heterocromatina adyacente a las constricciones secundarias. Los experimentos de Schwarzacher *et al.* (1978), mostraron con micrografías electrónicas que la sustancia que se tiñe con nitrato de plata está localizada en el interior de la zona NOR o alrededor de ella, pero no en los cromosomas mismos. Otros experimentos

también indicaron que la sustancia positiva a la tinción ar-genta era una proteína acídica producto de los genes que co-difican para el rRNA (Giménez-Martin *et al.*, 1977; Daskal *et al.*, 1980; Hubbell *et al.*, 1980).

La mayor diferencia detectable en este estudio, entre los cariotipos de las dos especies de *Araucaria*, es el satélite terminal para el par de cromosomas N°8, que está presente solamente en *A. angustifolia*. La presencia de esta constriction secundaria corta del par de cromosomas N° 8 en *A. angus-tifolia*, conduce a dos preguntas: primera ¿la constriction se-cundaria del par N°8 está relacionada a la organizacion nucleolar? La constriction secundaria terminal del par de cromoso-mas N°8 no dio la tinción plata positiva, por lo cual se po-dría concluir que otros genes para la formación de rRNA en es-ta constriction no están activos; o bien, no están presentes. Para probar ésto, habría que hibridizar *in situ* dicha zona con rRNA. Estudios recientes por medio de hibridizacion DNA/RNA han mostrado la multiplicidad intranuclear de genes que codifican para el RNA ribosomal, y que estos genes están agru-pados sobre las constrictiones secundarias, constituyendo la region organizadora del nucléolo o zona NOR (Giménez-Martin, 1977; Goodpasture y Bloom, 1975).

El hecho de que la constriction secundaria adyacente al satélite terminal no se tiña con plata amoniacal, como lo ha-ce la constriction intercalar del par N°1, parece estar de

acuerdo con las observaciones de que las células embrionarias de las semillas de *Araucaria* tienen dos nucléolos, mientras que las células del megagametofito son haploides, poseen un solo nucléolo (Cardemil y Jordan, 1982).

La presencia del satélite terminal del par N°8 de *A. angustifolia* conduce a la segunda pregunta ¿Cómo se originaron estas diferencias entre las dos especies? Hay dos posibles hipótesis para explicar su origen:

1) El ancestro de las actuales especies de *Araucaria* tuvo un satélite terminal y una constricción secundaria en el par N°8, con el transcurso del tiempo este satélite se perdió por delección en aquellas poblaciones de *Araucaria* mejor adaptadas a las latitudes sur.

2) La constricción no estaba presente en la especie ancestral y probablemente el satélite terminal se originó a través de una translocación entre cromosomas no homólogos, que con el tiempo se hizo homocigota y luego se fijó en las poblaciones naturales.

Diferencias y similitudes genéticas entre ambas especies, además de las informadas a través del estudio del catio tipo y bandeo NOR, pueden detectarse estudiando el patrón isoenzimático de enzimas que participan en el metabolismo del proceso germinativo como es el caso de la α -amilasa. El estudio de isoenzimas ha sido muy utilizado como herramienta para caracterización genética de especies emparentadas (Ureta, 1973 y 1975;

Market, 1975; Scandalios, 1974). En el caso de las especies de *Araucaria* es de especial importancia realizar un estudio comparativo de estas isoenzimas en los dos tejidos de la semilla, ya que el embrión de origen paterno y materno, con células diploides y el megagametofito de origen materno y haploide, poseen un patrón genético diferente. Representan dos generaciones en una misma semilla.

Los primeros estudios comparativos de isoenzimas se iniciaron con experimentos que tuvieron como objetivo determinar que en los extractos utilizados en los estudios electroforéticos y de isoelectroenfoque, solo estaba presente actividad α -amilásica. La electroforesis en gel de poliacrilamida de los extractos calentados a 70°C, provenientes de los tejidos embriónarios y gametofíticos de *A. araucana* y *A. angustifolia* mostraron un patrón proteico muy diferente respecto al extracto no calentado. Los extractos no calentados presentaron actividad amilásica, lo mismo que aquellos tratados a 70°C. Pero la actividad específica de estos últimos se incrementó en un factor de seis, como una consecuencia de la eliminación de algunas proteínas que se desnaturalizaron por calentamiento.

Los trabajos de Bilderback (1973), demostraron que la enzima α -amilasa es resistente a 70°C, mientras que la β -amilasa se desnaturaliza a esta temperatura. Según estos datos,

se puede decir que la actividad existente en todos los extractos calentados a 70°C corresponde a α -amilasa. La electroforesis de todos los extractos tratados a 70°C, mostró un patrón de cinco bandas de actividad amilásica, similar al patrón obtenido con extractos no calentados, lo cual indica que en los tejidos embrionario y gametofítico, y para todos los tiempos de germinación estudiados, sólo existe actividad de α -amilasa en las dos especies de *Araucaria*, al menos hasta las 90 hrs después del inicio de la imbibición de la semilla.

La presencia de solamente α -amilasa en *A. araucana* fue también reportada por Reiner *et al.* (1983), utilizando otras técnicas de análisis.

Otra característica de α -amilasa, que ha permitido detectarla en extractos de cualquier tejido (saliva humana, páncreas humano, *Bacillus subtilis*, cebada, etc.), es la de requerir como cofactor el ión Ca^{++} para su actividad amilolítica (Fischer y Stein, 1960). También de extractos de *Vigna mungo* se purificó la α -amilasa y por extracción del Ca^{++} con EDTA, se demostró que la actividad de la enzima bajaba entre un 50% a un 90%, recobrándose parcialmente cuando se agregaba el ión Ca^{++} al medio (Koshiba y Minamikawa, 1981).

Basándose en esta propiedad, se midió la actividad amilásica, en extractos de los dos tejidos (embrión y gametofito), en ambas especies de *Araucaria*, en presencia y ausencia de Ca^{++} encontrándose solamente actividad donde existía Ca^{++} . Por lo

tanto, la actividad amilásica de estas especies se debe a la presencia de α -amilasa en estos extractos. Esta conclusión es apoyada por el resultado mostrado en la Figura 6. Se observa que únicamente en presencia de Ca^{++} , se obtuvo un patrón de cinco formas isoenzimáticas activas para el tejido embrionario de *A. araucana*, lo mismo que para el tejido gametofítico. En *A. angustifolia* se encontraron resultados similares.

Los resultados de termorresistencia y requerimiento de Ca^{++} nos permiten concluir que todas las formas detectadas por electroforesis e isoelectroenfoque a todos los tiempos de imbibición, son formas de α -amilasa.

La enzima α -amilasa, además de caracterizarse por ser termorresistente, por necesitar como cofactor el ión Ca^{++} , se caracteriza también por ser lábil a pH menor de 4, mientras que la β -amilasa es resistente a pH inferiores a 4 (French, 1960). En gramíneas, se ha reportado la existencia de dos isoenzimas de α -amilasa, que presentan actividad a pH 3,7 como una excepción (Jacobsen *et al.*, 1970), ya que no se han informado otros casos similares.

Tomando en cuenta esta última característica, se trató de encontrar una nueva evidencia, que apoyara la conclusión de que la enzima responsable de la degradación del almidón en *Araucaria* es la α -amilasa. Para ésto, se incubaron los extractos de ambas especies de *Araucaria* en soluciones tampón de pH 3 y pH 5. Los resultados para el embrión de *A. araucana* se muestran en la Figura 7, en la cual se observa que a pH 5

aparece un patrón electroforético de cinco formas isoenzimáticas, mientras que a pH 3 el patrón se redujo a dos bandas con actividad amilolítica, resultado que no se esperaba, de acuerdo a lo reportado por French (1960), quien reportó que a pH menores de 4 la α -amilasa se desnaturaliza. La aparición de estas dos bandas de actividad no puede asignarse a una actividad β -amilasa, debido a que se trabajó con extractos tratados a 70°C y en presencia de Ca^{++} , condiciones que favorecen únicamente la actividad de α -amilasa. Por lo tanto, en esta Tesis se concluye que en estas dos gimnospermas existen dos isoenzimas de α -amilasa resistentes a pH 3, en tejido embrionario y gametofítico.

Los patrones isoenzimáticos para α -amilasa, obtenidos por electroforesis e isoelectroenfoque de extractos de embrión y de gametofito de *A. araucana*, son idénticos cuando la semilla se encuentra en un estado quiescente (cero hr de imbibición). Cada una de las cinco formas detectadas a tiempo cero poseen un R_m y pI característicos dados por diferencias en peso molecular o carga, o ambos. En tres formas isoenzimáticas hay diferencias mínimas de pI , 5,0; 4,9 y 4,8. Sin embargo, la presencia de estas tres formas de la enzima con los pI similares es una característica muy constante de la semilla quiescente como de la semilla que ha estado dos días en imbibición (48 hr).

Las formas isoenzimáticas que la semilla quiescente presenta, fueron formas posiblemente sintetizadas durante el proceso de maduración de la semilla y permanecieron en los

tejidos hasta el momento en que se reinició la actividad metabólica de las semillas. Ellas serían responsables de iniciar la hidrólisis del almidón de reserva en las primeras horas de imbibición (Cardemil y Reineró, 1982).

A las 18 hr del inicio de la imbibición, el patrón de isoenzimas para ambos tejidos ha cambiado. Sólo es posible detectar una banda por electroforesis y dos bandas por isoelectroenfoque. Por electroforesis, las dos formas son indistinguibles y por lo tanto se detecta una sola banda. Por isoelectroenfoque, las pequeñas diferencias en carga entre las formas moleculares permite resolver dos bandas de pI 5,8 y 5,9. Comparando embrión y gametofito se concluye que no hay diferencias en peso ni en carga en las formas moleculares de ambos tejidos, ellas son idénticas.

A las 18 hr del inicio de la imbibición, hay aumento de la actividad amilolítica total en el embrión y gametofito de *A. araucana* al mismo tiempo que la cantidad de proteínas totales disminuyen (Cardemil y Reineró, 1982; Reineró *et al.*, 1983). Es difícil correlacionar esta mayor actividad enzimática detectada a las 18 hr de imbibición con la presencia de solo dos formas enzimáticas para α -amilasa, cuando en las semillas quiescentes existen cinco formas de la enzima y una actividad total menor. Sin embargo, se podría pensar que las isoenzimas presentes a tiempo cero podrían reestructurarse para originar a las 18 hr de imbibición una o dos nuevas formas

que poseen mayor actividad. En cebada, hay evidencias que formas isoenzimáticas de α -amilasa son dímeros de monómeros de igual peso molecular (Rodaway, 1977). Si este es el caso en α -amilasa de *A. araucana* las bandas de pI 5,8 y 5,9 podrían provenir por dimerización o polimerización de formas existentes. Estas isoenzimas poliméricas podrían poseer mayor actividad sobre el sustrato que las formas detectadas a tiempo cero. Otra alternativa podría ser que proteasas presentes en los tejidos de la semilla, pudieran ser responsables de los cambios de Rm y pI detectados en las formas de α -amilasa y por lo tanto, producir mayor actividad de estas nuevas formas originadas en este lapso de tiempo, de cero a 18 hr de imbibición. No se puede descartar, de ninguna manera, la posibilidad que nuevas formas enzimáticas aparezcan a las 18 hr por síntesis *de novo* al mismo tiempo que las formas de isoenzimas existentes a tiempo cero, vayan siendo degradadas paulatinamente.

Sobre las 40 hr de imbibición, después que la semilla ha germinado, cuatro de las cinco formas de α -amilasa presentes a tiempo cero, reaparecen en los tejidos. La reaparición de estas formas coincide con un aumento paulatino de actividad de α -amilasa en el embrión y un aumento de actividad discreto para el gametofito (Cardemil y Reineró, 1982; Reineró *et al.*, 1983). Las proteínas totales también aumentan en este período, lo que sugiere que las múltiples formas de

α -amilasa pudieran reaparecer por síntesis *de novo*. Nuevamente, la alternativa posible es que las dos formas presentes a 18 hr de imbibición volvieran a despolimerizarse o reestructurarse para originar cuatro de las cinco formas originales; aunque esta alternativa no puede explicar por sí sola el aumento paulatino de actividad total observado en el sistema (Cardemil y Reineró, 1982; Reineró *et al.*, 1983).

Después de 90 hr del inicio de la imbibición, el patrón de isoenzimas es diferente en el embrión comparado con el del gametofito. A este tiempo de imbibición, se han producido cambios notables en el desarrollo de la plántula. La plántula ya no posee amiloplastos, éstos se han transformado en cloroplastos (Cardemil y Reineró, 1982). El gametofito en cambio, no presenta cloroplastos, pero sobre el almidón de reserva de sus amiloplastos han actuado además de α -amilasa, otras dos enzimas degradadoras del almidón y presentes también en las semillas, la enzima almidón fosforilasa y la enzima desramificadora (pululanasa), (Cardemil y Varner, 1983).

Estos diferentes cambios estructurales y bioquímicos que ocurren en los amiloplastos de ambos tejidos podrían explicar desde el punto de vista fisiológico, los cambios divergentes en el patrón de isoenzimas de ambos tejidos a las 90 hr de imbibición. En semillas de trigo, Sargeant, 1979; Lowy *et al.*, 1981, han realizado un análisis morfofisiológico correlacionando los cambios de los patrones isoenzimáticos de

α -amilasa con el grado de maduración de los amiloplastos del endosperma de la semilla. Sargeant (1979), logró demostrar que el patrón de isoenzimas de α -amilasa que es característico durante el período de maduración de la semilla, cambia paulatinamente cuando la semilla ya madura inicia la germinación y que las formas de α -amilasa del período de maduración de la semilla no tienen afinidad por los amiloplastos de la semilla madura. Vice-versa, las isoenzimas presentes en la semilla en germinación no se adhieren a los amiloplastos de la semilla inmadura.

Es razonable entonces, concluir que cambios del sustrato y de los organoides que encierran el sustrato de la enzima exija múltiples formas de α -amilasa para cada tiempo de imbibición y que el patrón cambie con el estado de desarrollo del sistema.

En *A. angustifolia*, los cambios en los patrones de isoenzimas de α -amilasa detectados por electroforesis siguen la tendencia general de los cambios detectados en los patrones isoenzimáticos de *A. araucana*, aunque por isoelectroenfoque, siempre se detectan diferencias en el número de bandas en ambos tejidos de la semilla de *A. angustifolia*. Comparando:
- Tanto por electroforesis como por isoelectroenfoque el patrón isoenzimático presenta múltiples formas en las semillas quiescentes de ambas especies.

- A las 18 hr de imbibición, las formas detectables de α -amilasa a tiempo cero, se reducen a una forma detectada por electroforesis en los tejidos de semillas de ambas especies y a dos formas detectadas por isoelectroenfoque para los tejidos de semillas de *A. araucana* como para el tejido gametofítico de *A. angustifolia*. El tejido embrionario de *A. angustifolia* solo presenta una forma isoenzimática de α -amilasa por isoelectroenfoque.

- Después de 48 hr de imbibición, el patrón de isoenzimas de α -amilasa es nuevamente de múltiples formas isoenzimáticas para los tejidos de semillas de ambas especies. La mayoría de estas formas poseen Rm y pI idénticos a las formas de α -amilasa de la semilla quiescente.

- A las 90 hr, en ambas especies, el patrón de isoenzimas es diferente en el tejido embrionario comparado con el tejido megagametofítico.

- Las semillas de *A. angustifolia* igual que las semillas de *A. araucana*, ya han germinado después de 48 hr de imbibición y a las 90 hr de imbibición el tejido embrionario de *A. angustifolia* también posee cloroplastos desarrollados.

Por lo tanto, y aunque para la semilla de *A. angustifolia* no se poseen datos sobre los niveles de actividad total de la enzima y datos sobre los niveles de proteínas totales, es legítimo considerar las mismas razones bioquímico-fisiológicas analizadas para *A. araucana*, como válidas para explicar

los cambios isoenzimáticos durante la germinación y desarrollo temprano de la plántula de las semillas de *A. angustifolia*.

Un resumen esquemático de los datos presentados se muestran en las Figuras 36 y 37, en las que se compara el patrón isoenzimático de los tejidos entre ambas especies a cada tiempo de imbibición de las semillas.

Un análisis comparativo de isoenzimas presentes en ambos tejidos de la semilla, con el objeto de concluir diferencias o similitudes genéticas, es totalmente válido de hacer en gimnospermas, especialmente en estas coníferas. Tejido embrionario y gametofítico de una misma semilla, poseen con absoluta certeza el mismo set materno de genes, porque durante la ontogenia de la semilla, todos los núcleos de las células gametofíticas, derivan de un mismo núcleo meiótico de la megaspora, como también el núcleo aportado por la oogenia durante el proceso de fertilización y que originará posteriormente al embrión. Según Burlingame (1914), la megaspora por meiosis origina cuatro núcleos haploides, de los cuales degeneran tres. El núcleo que permanece en la célula se multiplica por mitosis originando un número de núcleos que Burlingame ha estimado en 2000, en el caso del desarrollo del óvulo de *A. angustifolia*. Estos 2000 núcleos son los núcleos que permanecen en las células que constituyen el tejido gametofítico de reserva y originan también los núcleos oogoniales y arquegoniales. Todas las células del óvulo pueden, por lo tanto,

considerarse un clon desde el punto de vista genético. Así, la diferencia genética entre embrión y gametofito, se debe exclusivamente a los genes aportados por los núcleos espermáticos del grano de polen y que están presentes solo en el embrión.

Los resultados del análisis comparativo de isoenzimas presentes en embrión y gametofito de ambas especies, muestran que aproximadamente las mismas formas isoenzimáticas están presentes en ambos tejidos, tanto en las semillas quiescentes como después de 18 y 48 hr de imbibición. Las diferencias encontradas para embrión y gametofito a las 90 hr de imbibición, deben interpretarse más bien como diferencias en expresión génica, porque es a este tiempo de imbibición, cuando diferencias fisiológicas se empiezan a establecer entre ambos tejidos por diferenciación de los tejidos embrionarios. Sin embargo, no puede descartarse que genes estructurales diferentes para α -amilasa, presentes en uno o en otro tejido, se expresen por primera vez después de 90 hr del inicio de la imbibición de los tejidos.

La desaparición de formas de α -amilasa y aparición de nuevas formas de la enzima a través del tiempo de imbibición, podría significar, desde el punto de vista genético, cualquiera de las siguientes posibilidades.

- Presencia o ausencia de genes estructurales para cada una de las formas de la enzima.
- Regulación de la expresión génica de los genes estructurales a través de genes reguladores o de cualquier otro tipo de interacción génica.

- Procesamiento post-transcripcional de precursores de mRNA que originarían múltiples formas o formas únicas de la enzima.
- Procesamiento post-traducciona l de formas precursores de α -amilasa para constituir formas únicas o múltiples de la enzima.

De las posibilidades anteriormente señaladas, es el control en la expresión génica de α -amilasa por medio de giberelinas (GA_3) y ácido abscísico (ABA) el que ha sido más estudiado en gramíneas.

En 1968, Filner y Varner, incubando capas de aleurona en ácido giberélico (GA_3) y agua marcada (H_2O^{18}) fueron capaces de demostrar que la enzima era sintetizada *de novo*. Toda la actividad de enzima detectada después de 18 hr de incubación de las capas de aleurona en este medio, se recolectaba en forma de fracción de mayor densidad cuando la enzima se sometía a una centrifugación por gradiente de densidad en CsCl. Posteriormente Mozer (1980), logró demostrar por medio de traducción *in vitro* del poliA-mRNA para la síntesis de α -amilasa, que el GA_3 ejercía un control positivo sobre la aleurona de cebada para síntesis de la enzima, ya que controlaba la presencia de poliA-mRNA para la producción de α -amilasa, en cambio ABA ejercía un control negativo en aleurona para síntesis de la enzima, por control traduccional o post-traducciona l del

mRNA presente en las células.

Posteriormente, Bernal-Lugo *et al.* (1981), concluyeron por técnicas de hibridización de northern blot que en presencia de ABA había sólo tres veces la cantidad de poliA-mRNA presente en el control, en cambio en presencia de GA₃ existía en las células de aleurona 36 veces más poliA-mRNA que en el control.

Además, Ho *et al.* (1982), han informado en trigo, que GA₃ actúa sobre el gen Rht₃, el que al parecer ejerce un control regulatorio sobre los genes que codifican las isoenzimas de α -amilasa de las células de aleurona y Jacobsen *et al.* (1982), han demostrado que GA₃ controla la expresión en el tiempo de imbibición de algunas formas de isoenzimas de α -amilasa de aleurona de cebada, de manera que algunas formas son de muy pronta aparición y otras de aparición tardía cuando la aleurona de cebada es incubada en GA₃. En razón de que estos investigadores trabajaron los mapas peptídicos de las formas de α -amilasa, ellos concluyen que hay dos grupos de genes estructurales para las isoenzimas y que estos dos grupos de genes responden diferencialmente a la presencia de GA₃.

En semillas de *A. araucana*, Reinero *et al.* (1982), han estudiado la correlación que existe entre los niveles de actividad total de α -amilasa, de proteínas totales y giberelinas presentes en el tejido embrionario a diferentes tiempos de imbibición de las semillas durante 90 horas. Se encontró

que mientras la cantidad total de giberelinas endógenas era relativamente constante durante este tiempo de imbibición, no lo era en cambio el patrón cualitativo de giberelinas en el tejido; después de 18 hr de imbibición, las giberelinas que presentaban un Rf igual al de GA₃ cambiaban a giberelinas con un Rf igual al de GA₄. En este trabajo fue posible también demostrar, que semillas embebidas por 60 hr con AMO 1618, un inhibidor de la síntesis de giberelinas, poseían una actividad amilolítica menor en un 62,7% respecto al control como también una menor cantidad de proteínas totales. Imbibición de semillas por 60 hr en un medio conteniendo giberelinas embrionarias endógenas y AMO 1618, demostró que la actividad de la enzima se recuperaba a un 80,3% del control. Esto parece indicar que el aumento paulatino de actividad de α -amilasa que se observa después que la semilla ha germinado se debe a un posible control de α -amilasa por giberelinas.

Es conveniente señalar que el análisis comparativo realizado en esta Tesis entre las formas de isoenzimas de α -amilasa detectadas para embrión y gametofito de cada especie, no permite concluir similitudes o diferencias de genes estructurales ni entre los tejidos, ni entre las especies.

Tampoco es posible concluir qué tiempo de regulación génica existe durante la germinación de la semilla y desarrollo temprano de la plántula. Sin embargo, una vez purificadas

las formas isoenzimáticas de α -amilasa de *Araucaria* sp. se realizarán nuevos estudios que permitan establecer la acción reguladora de giberelinas.

Los estudios a futuro, comprenden análisis estructurales de estas formas de α -amilasa por medio de mapas peptídicos, y análisis inmunológicos, que permitirán establecer los genes estructurales involucrados en la producción de la enzima, y estudio de la regulación de la síntesis de la enzima por técnicas de biología molecular, que permitirán establecer el nivel al cual las giberelinas pueden ejercer el control sobre la expresión de los genes estructurales durante la germinación y el desarrollo temprano de la plántula.

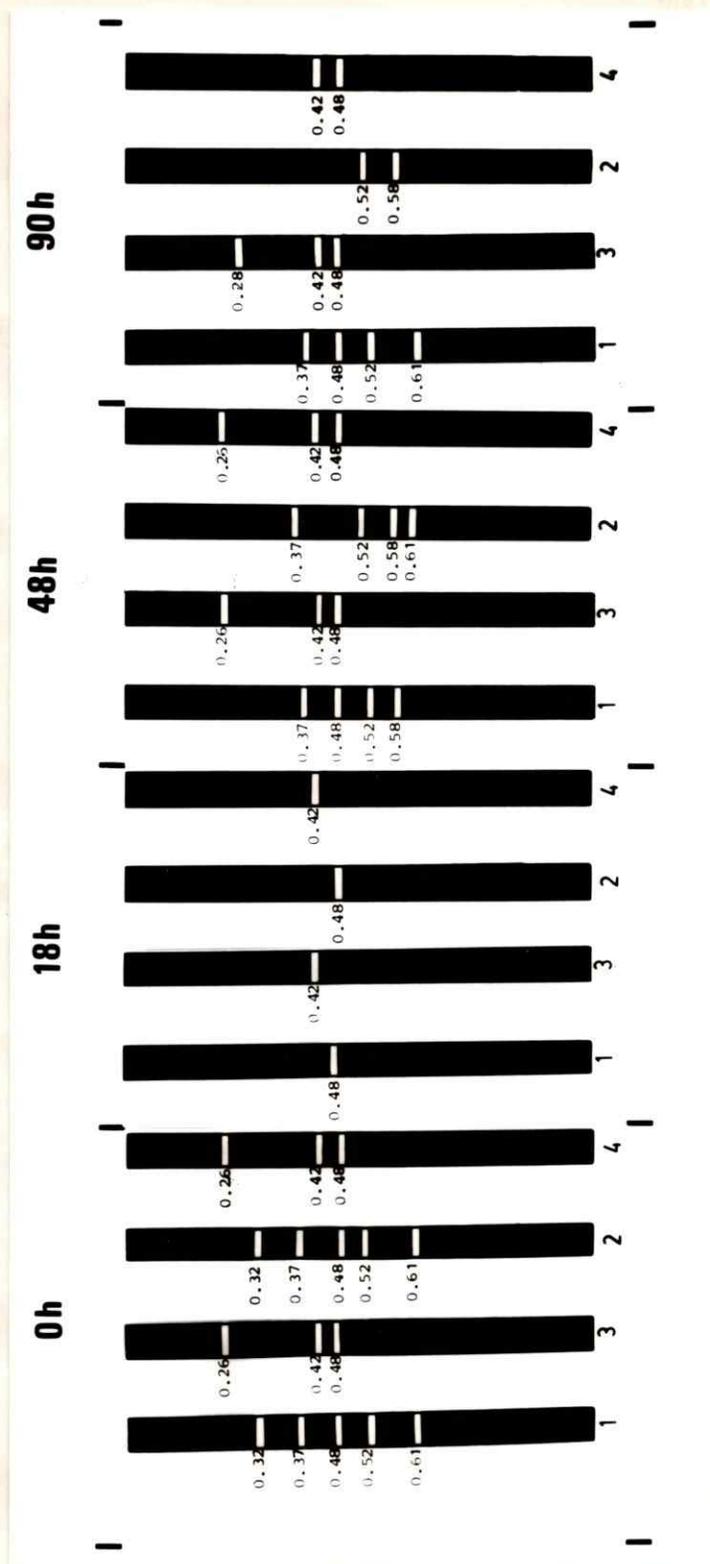


FIG. 36 Cuadro comparativo del patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenido por electroforesis para tejido embrionario (1) y tejido gametofítico (2) de *A. ataucana*; para tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4) de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas.

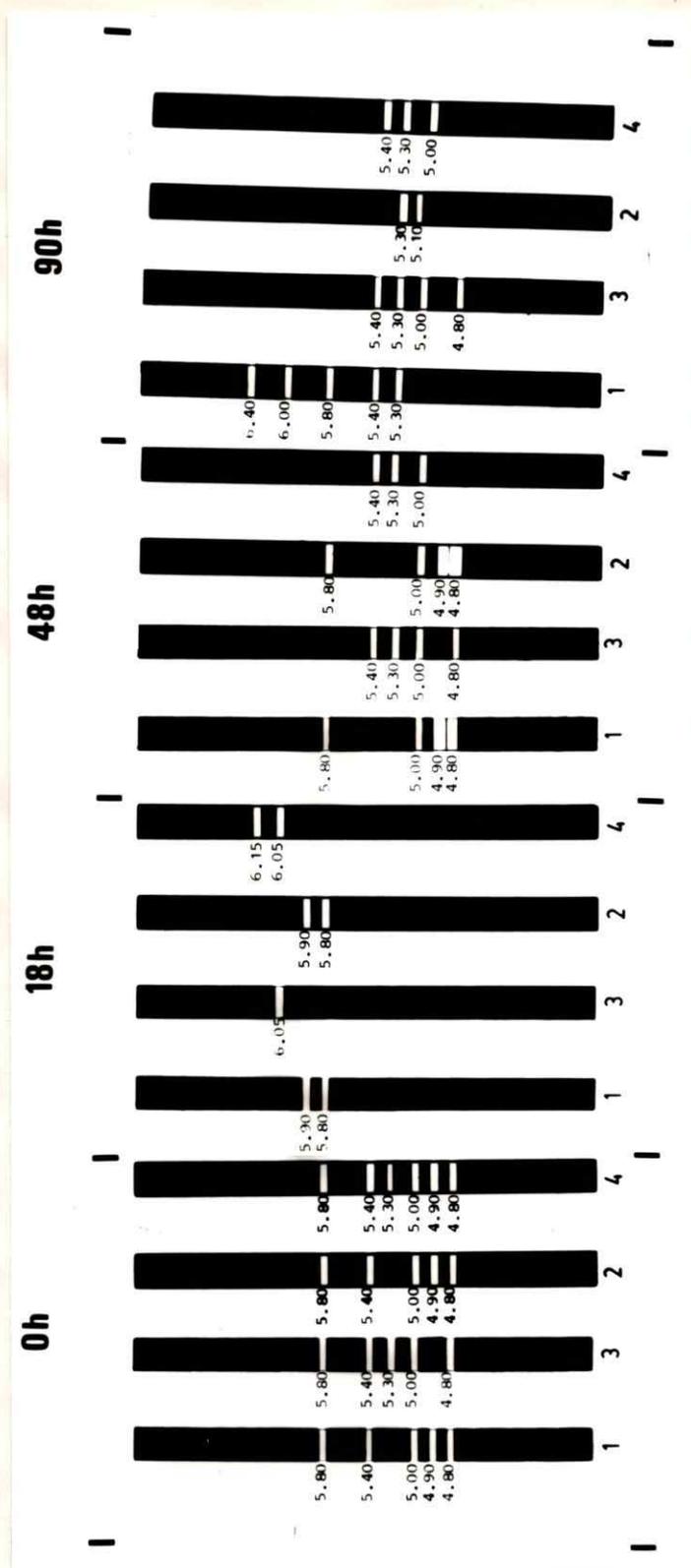


FIG. 37 Cuadro comparativo del patrón de las isoenzimas de α -amilasa, obtenido por isoelectroforesis para tejido embrionario (1) y tejido gametofítico (2) de *A. taucana*; para tejido embrionario (3) y tejido gametofítico (4) de *A. angustifolia*, a diferentes tiempos de imbibición de las semillas.

BIBLIOGRAFIA

1. Arstine, W., J.V. Jacobsen, J.G. Scandalios y J.E. Varner. 1970. Deuterium Oxide as a Density Label of Peroxidases in Germinating Barley Embryos. *Plant Physiol.* 45: 148-152.
2. Bernal-Lugo, I., R.N. Beachy y J.E. Varner. 1981. The Response of Barley Aleurone Layers to Gibberellic Acid Includes the Transcription of New Sequences. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102: 617 - 623.
3. Bernfeld, P. 1951. Enzymes of Starch Degradation and Synthesis. En "Advances in Enzymology". Vol. 12, pp. 380-424. F.F. Nord (ed.) Interscience Publisher Ltd. London.
4. Bilderback, D.E. 1973. A Simple Method to Differentiate Between α and β -amilase. *Plant Physiol.* 51: 594 - 595.
5. Boyer, C.D. y J. Preiss. 1981. Evidence for Independent Genetic Control of the Multiple Forms of Maize Endosperm Branching Enzymes and Starch Synthases. *Plant Physiol.* 67: 1141 - 1145.

6. Burlingame, L. 1914. The Morphology of *Araucaria brasiliensis*. II. The Ovulate Cone and Female Gametophyte. Botanical Gazette 57: 490 - 491.
7. Callis, J. y T.H.D. Ho. 1983. Multiple Molecular Forms of the Gibberellin-Induced α -Amylase from the Aleurone Layers of Barley Seeds. Arch. Biochem. Biophys. 224: 224-234.
8. Cardemil, L. y A. Reiner. 1982. Changes of *Araucaria araucana* Seed Reserves During Germination and Early Seedling Growth. Can. J. of Bot. 60: 1629-1639.
9. Cardemil, L. y M. Jordan. 1982. Light and Electron Microscopy Study of *in vitro* Cultured Female Gametophyte of *Araucaria araucana* (Mol.) Koch. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 107: 329 - 338.
10. Cardemil, L. y J.E. Varner. 1983. The Pathway of Starch Degradation in the Seed of *Araucaria Araucana*, for 100 Hours After the Start of Imbibition. Plant Physiol. 72: 201 (Suppl.).
11. Chamberlain, C.J. 1935. Gymnosperms, Structure and Evolution. Univ. of Chicago Press.

12. Chamberlain, C.J. 1935. The Gymnosperms. Bot. Rev. 1: 183 - 209.
13. Chao S.E. y J.G. Scandalios. 1971. Alpha-Amylase of Mayze: Differential Allelic Expression at the Amy-1 Gene Locus and Some Physicochemical Properties of the Isoenzymes. Genetics 69: 47 - 61.
14. Chrispeels, M.J. y J.E. Varner. 1967. Gibberellic Acid-Enhanced Synthesis and Release of α -Amylase and Ribonuclease by Isolated Barley Aleurone Layers. Plant Physiol. 42: 398 - 406.
15. Chrispeels, M.J. y J.E. Varner. 1967. Hormonal Control of Enzyme Synthesis: on the Mode of Action of Gibberellic Acid and Abscisin in Aleurone Layers of Barley. Plant Physiol. 42: 1008 - 1016.
16. Daskal, Y., Smetana, K. y H. Busch. 1980. Evidence from Studies on Segregated Nucleoli that Nucleolar Silver Staining Proteins C₂₃ and B₂₃ are in the Fibrillar Component. Exp. Cell. Res. 127: 285 - 291.

17. Davis, J.B. 1964. Disc Electrophoresis-II. Method and Applications to Human Serum Proteins. Ann. of N.Y. Acad. Sci. 404 - 427.
18. Doehlert, D.C. y S.H. Duke. 1983. Specific Determination of α -Amylase Activity in Crude Plant Extracts Containing β -Amylase. Plant Physiol. 71: 229 - 234.
19. Ferreira, A.G. y W. Handro. 1970. Aspects of Seed Germination in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. Rvta. Brasil. Bot. 2: 7 - 13.
20. Ferreira, A.G., S.M.C. Dietrich y W. Handro. 1979. Changes in the Metabolism of *Araucaria angustifolia* During the Early Phases of Germination and Growth. Rvta. Brasil. Bot. 2: 67 - 71.
21. Filner, P. y J.E. Varner. 1967. A Test for the Novo Synthesis of Enzymes: Density Labeling with H_2O^{18} of Barley α -Amylase Induced by Gibberellic Acid. Proc. Nat. Acad. Sci. 58: 1520 - 1525.

22. Fischer, E. y E. Stein. 1960. α -Amylases. In "The Enzymes". Vol. 4, part. A, 2a. ed. pp. 313 - 343. Boyer, P., Lardy, H. and K. Myrback (eds.).
23. Flory, W.S. 1936. Chromosome Number of Phylogeny in the Gymnosperms. Jour. Arnold Arb. 12: 83 - 89.
24. French, D. 1960. α -Amylases. In "The Enzymes". Vol. 4, part A. 1a. ed. pp. 345 - 368. Boyer, P., Lardy, H. and K. Myrback (eds.).
25. Giménez-Martin, C., C. de la Torre, J.F. López-Saez y P. Esponda. 1977. Plant Nucleolus: Structure and Physiology. Citobiologie 14: 421 - 462.
26. Goldstein, L.D. y P.H. Jennings. 1975. The Occurrence and Development of Amylase Enzymes in Incubated, Deembryonated Maize Kernels. Plant Physiol. 55: 893-898.
27. Goodpasture, C. y S.E. Bloom. 1975. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining. Chromosoma 53: 37 - 50.
28. Hair, J.B. y E.J. Beuzenberg. 1958. Contributions to a Chromosome Atlas of the New Zealand Flora. N.Z.J. Sci. 1: 617 - 628.

29. Heitz, E. 1931. Die Ursache der Gesetzmäßigen Zahl, Größe, Form und Grobe Planzlicher Nukleolen. *Planta* (Berl.) 12: 775 - 844.
30. Ho, T.H.D., Gross, J.K., Callis, J. y D.C. Feichert. 1982. Genetic Regulation of the GA₃ Induction of α - Amylase in Wheat Aleurone Layers. *Plant Physiol.* 69: 454 (Suppl.).
31. Hodcent, E. 1968. Numeration et Morphologie des Chromosomes du Prothalle Femelle de L'*Araucaria araucana*. *Caryologia* 4: 385 - 388.
32. Hubbell, H.R., Y.F. Low, R.L. Brown y T.C. Hsu. 1980. Cell Cycle Analysis and Drug Inhibition Studies of Silver Staining in Synchronous Hela Cells. *Exp. Cell Res.* 129: 139 - 147.
33. Hueck, K. 1952. Die Araucarien-Walder des Nördlichen Patagonien *Zsch. F. Weltforstwirtschaft* 15(4): 163 - 167.
34. Hueck, K. 1966. Die Walder Südamerikas. "Ökologie Zusammensetzung undwirtschaftliche Bedeutung. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

35. Jacobsen, J.V., J.G. Scandalios y J.E. Varner. 1970. Multiple Forms of Amylase Induced by Gibberellic Acid in Isolated Barley Aleurone Layers. *Plant Physiol.* 45: 367-371.
36. Jacobsen, J.V. y R.B. Knox. 1973. Cytochemical Localization and Antigenicity of α -Amylase in Barley Aleurone Tissue. *Planta (Berl.)* 112: 213 - 224.
37. Jacobsen, J.V. y T.J.V. Higgins. 1982. Characterization of the α -Amylases Synthesized by Aleurone Layers of Himalaya Barley in Response to GA₃. *Plant Physiol.* 70: 1647 - 1653.
38. Juliano, B.O. y J.E. Varner. 1969. Enzymic Degradation of Starch Granules in the Cotyledons of Germinating Peas. *Plant Physiol.* 44: 886 - 892.
39. Jones, R.L. y J.F. Varner. 1967. The Bioassay of Gibberellins. *Planta* 72: 155 - 161.
40. Koshiha, T. y T. Minamikawa. 1981. Purification by Affinity Chromatography of α -Amylase- A Main Amylase in Cotyledons of Germinating *Vigna mungo* Seeds. *Plant and Cell Physiol.* 22(6): 979 - 987.

41. Mancilla, M. 1980. Estudio de la Estructura de Isoapi-
rasas de *Solanum tuberosum*. Tesis para optar el título
de Bioquímica. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéu-
ticas, Universidad de Chile.
42. Market, Cl.L. 1975. Biology of Isoenzymes. *Bio Science*
25 : 365 - 368.
43. Mc Clintock, B. 1934. The Relation of a Particular
Chromosomal Element to the Development of the Nuclei in
Zea mays. *Z. Zellforsch* 21: 294 - 328.
44. Montaldo, P.R. 1975. La Bio-ecología de *Araucaria arau-*
cana (Mol) Koch. Inst. Forest. Latinoamericano de Inv.
y Cap. Bol. 46: 3-55.
45. Mozer, T.J. 1980. Control of Protein Synthesis in Barley
Aleurone Layers by the Plant Hormones Gibberellic Acid
and Absciscic Acid. *Cell* 20: 479 - 485.
46. Norstog, K. 1965. Induction of Apogamy in Megagametophytes
of *Lamia integrifolia*. *Amer. Jour. Bot.* 52: 993 - 999.

47. 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.
48. Lowy, G.D.A., Sargeant, J.G. y J.D. Schofield. 1981. Wheat Starch Granule Protein: The Isolation and Characterization of a Salt-extractable Protein from Starch Granules. *J. Sci. Food Agric.* 32: 371 - 377.
49. Okamoto, K. y T. Akazawa. 1979. Enzymic Mechanisms of Starch Breakdown in Germinating Rice Seeds. *Plant Physiol.* 63: 336 - 340.
50. Pearce, S.L., B.C. Bands, D.V. Banthorepe, B. Davis y C.A. Vernon. 1972. The Isolation and Characterization of Nerve Growth Factor from the Venom of *Vipera russelli*. *Eur. J. Biochem.* 29: 417 - 425.
51. Reineró, A. 1981. Caracterización de la Actividad Amilolítica en Semillas de *Araucaria araucana* (Mol.) Koch. Tesis de Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

52. Reiner, A., O. Balboa y L. Cardemil. 1983. Characterization of the Amylolytic Activity of *Araucaria araucana* (Mol.) Koch. Germinating Seeds. *Plant Cell Physiol.* 24: 182 - 190.
53. Rodaway, S. 1978. Composition of α -Amylase Secreted by Aleurone Layers of Grains of Himalaya Barley. *Phytochemistry* 17: 385 - 389.
54. Rodaway, S. y H. Kende. 1978. No Effect of 5-Fluorouracil on the Properties of Purified α -Amylase from Barley Half-seeds. *Plant Physiol.* 61: 1 - 6.
55. Sargeant, J.G. 1979. The α -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.
56. Scandalios, J.G. 1974. Isoenzymes in Development and Differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 225-258.
57. Schwarzacher, A., V. Mihelsaar y W. Schnedl. 1978. The Nature of the Ag-Staining of Nucleolus Organizes Region. *Electron and Light-Microscopic Studies on Human Cells in Interphase, Mitosis and Meiosis.* *Cytogenet. Cell Genet.* 20: 24 - 39.

58. Seward, A. y S. Ford. 1906. The Araucariae Recent and Extinct. Phil. Trans. Royal Soc. B. 198: 305-411.
59. Seward, A. y V. Conway. 1934. A Phytogeographical Problem. Fossil Plants Form the Kerguelen Archipelago. Ann. Bot. 48: 715 - 741.
60. Shannon, L.M. 1968. Plant Isoenzymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 19: 187 - 210.
61. Skottsberg, C. 1953. Influence of the Antarctic Continent of the Vegetation of Southern Lands. Seventh Pacific Sci. Congress. Wellington 5: 1 - 7.
62. Stadman, E.R., Novelli, G.G. y Lipman, F. J. Biol. Chem. 191, 365 (1951). Citado por Lozada, R. 1981. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
63. Tesdorff, H. 1956. Kreuzungsver suche mit *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch and *Araucaria angustifolia* (Bertolo.) O. Ktze. Z. Forstgenetik and Forsplanzenzuchtung. Frankfurt. 5: 79 - 84.

64. Ureta, T., S.B. Reichberg, J. Radojković y J.C. Slebe. 1973. Comparative Studies on Glucose Phosphorylating Isoenzymes of Vertebrates - IV. Chromatographic Profiles of Hexokinases from the Liver of Several Avian Species. *Comp. Biochem. Physiol.* 45B: 445 - 461.
65. Ureta, T., J.C. Slebe, J. Radojković y C. Lozano. 1975. Comparative Studies on Glucosa Phosphorylating Isoenzymes of Vertebrates - V. Glucose Phosphotransferases in the Liver of Reptiles. *Comp. Biochem. Physiol.* 50B: 515 - 524.
66. Varner, J.E. y G.R. Chandra. 1964. Hormonal Control of Enzyme Synthesis in Barley Endosperm. In "Papers on Regulation of Gene Activity During Development". pp. 147-153. Loomis, W.F. (ed.). Harper and Row, Publishers. New York, Evanston, and London.