

## CONFERENCIAS

**A CLOSE LOOK AT A NORTH AMERICAN LIZARD: TERRITORIALITY, AGGRESSION, AND FITNESS IN A TEMPORALLY VARYING ENVIRONMENT.** (Una visión cercana a una lagartija norteamericana: territorialidad, agresión y adecuación en un ambiente variable temporalmente).

*Fox, S. F.* Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, U.S.A.

Behavior and territoriality of juvenile side-blotched lizards, *Uta stansburiana*, have been studied largely through field experiments at the same site in Texas from 1971 to 1983. The adults are fully territorial but the juveniles only gradually develop this social organization over their first juvenile summer. My studies involve the environmental factors important in shaping the development of territoriality as the juveniles age. Initially, I observed that lizards that survived their juvenile summer were behaviorally different than those that eventually perished. This behavioral difference appeared to be orchestrated by differences in the territories inhabited by juveniles. Territories of survivors were quantitatively different than those of nonsurvivors. Territories of dominant lizards resembled survivors' territories and territories of subordinates resembled nonsurvivors' territories. Either dominant lizards acquired superior territories or superior territories developed dominant lizards. My next two experiments attempted to uncover the causality. When territorial individuals were removed from experimental areas, the remaining lizard did not upgrade their territorial quality by commandeering the vacated, superior habitat. On the other hand, juveniles implanted with testosterone became more aggressive than shams and increased the size and quality of their home ranges.

Temporal variation of selection pressures appears to explain these results. Using dis-

criminant function analysis and its power to separate survivors from nonsurvivors as an index of strength of selection, I have observed years of strong as well as weak selection. Additionally I report morphological (scale characters) and genetic (electrophoretic isozymes) evidence for temporally fluctuating selection pressure against this species at the same site. I suggest that juvenile *U. stansburiana* adjust their territories and aggression around this variability. In years of strong selection juveniles are aggressive and compete agonistically for superior territories that in turn enhance survival. In years of lax selection there is no such benefit to elevated aggression nor to acquisition of any particular type of territory. This latter condition characterized the years in which the removal and testosterone implantation experiments were done. Intact lizards did not capitalize on the opportunity to upgrade their territories by usurping vacated habitat, but artificially-enhanced aggressive lizards did expand and upgrade their territories. Apparently the prevailing level of selection pressures serves to adjust the degree of territorial competition for specific habitat through the proximate means of aggression.

**COMIENZO DEL DESARROLLO DE MAMÍFEROS: DESDE LA ESPECIFICACION REGIONAL A LA DIFERENCIACION CELULAR.** (The beginning of mammalian development: from regional specification to cell differentiation).

*Izquierdo, L.* Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La formación del blastocisto y la diferenciación de los primeros tipos celulares parece un problema insoluble, porque en el huevo fecundado de mamíferos no se reconocen regiones citoplasmáticas distintas, ca-

racterizadas por propiedades morfológicas o citoquímicas, y especialmente porque los blastómeros aislados durante las primeras divisiones así como las mórulas agregadas en cualquier estado son capaces de regular su desarrollo y producir un embrión completo. La clave del desarrollo normal y de la regulación embrionaria, cuando se perturba el desarrollo, podría estar en una especificación regional generada por los contactos entre las células, los cuales preceden la compactación y blastulación.

Las modificaciones de las superficies de contacto, detectadas por microscopía electrónica de barrido y por métodos citoquímicos e inmunológicos, son primeramente lábiles. Pero a medida que avanza el desarrollo las modificaciones se hacen permanentes en los blastómeros aislados y no se pueden inducir por agregación de embriones. En esta etapa ya se han formado uniones celulares específicas y las conexiones transcelulares del citoesqueleto establecen una organización supracelular. Más tarde se observa la internalización de células, el sellamiento entre las células periféricas de la mórula, el desarrollo del blastocisto con la diferenciación de la masa celular al interior y del trofoblasto alrededor. Experimentos de aislamiento demuestran que este último se ha determinado, o sea, que su diferenciación es irreversible. Pronto operan los mecanismos de transporte del trofoblasto y la cavidad blastocélica se expande. Entretanto se degrada la zona pelúcida y el embrión puede anidarse en el endometrio. Esta secuencia de estados es invariante, sugiriendo una relación de causalidad;

y también lo es el tiempo en que transcurre, el cual no es medido por el número de ciclos celulares si no por un reloj cuyo mecanismo es desconocido.

La biología celular propone la actividad génica diferencial como el mecanismo central del desarrollo, en tanto que la biología del desarrollo destaca los mecanismos de especificación regional, porque estos generarían los medios distintos que influirán sobre genotipos iguales. Así ocurriría por lo menos en embriones reguladores como los de mamífero. Aunque en el ratón se detecte actividad transcripcional desde el estado de 1 célula y nuevas proteínas desde el estado de 2 células, algunas de las cuales son codificadas por el genotipo paterno, no se ha reconocido con certeza células con distinto contenido proteico antes que se diferencien la masa celular interna y el trofoblasto. En mórulas avanzadas ya hay células centrales y periféricas que están, por lo mismo, en distintas relaciones con el medio. Pero no se sabe como se traducen estas distinciones en términos de organización o composición molecular y sólo es posible afirmar, por ahora, que la diferenciación se inscribe en un hipotético campo morfogenético centro-periferia que además de afectar células según su lugar en el embrión pareciera afectar diferencialmente las partes de cada célula. A este campo morfogenético podría atribuirse también el fenómeno de regulación embrionaria y, por lo tanto, la relación entre las partes y el todo que se manifiesta en las estrictas proporciones de los embriones normales y de aquellos que han regulado.

## Simposio

### BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS TRIPANOSOMAS PARASITOS

*Bioquímica de Trypanosoma cruzi*

Coordinador: Gustavo Hoecker

#### BIOCHEMISTRY OF *TRYPANOSOMA CRUZI*.

Stopanni O.M., Andrés. Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, Buenos Aires, Argentina.

Se examina la bioquímica del *Trypanosoma cruzi* en varios aspectos relacionados con el metabolismo y la acción inhibitoria de a) drogas utilizadas en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, a saber los nitroheterocíclicos nifurtimox y benznidazol, y b) varias sustancias naturales (lapachonas, miconidina y tingenona), que contribuyen a explicar la acción de los tripanocidas mencionados. El nifurtimox y la  $\beta$ -lapachona indujeron la formación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en epimastigotes vivos, o con fracciones del parásito suplementadas con NAD(P)H; el mismo efecto se obtuvo con nifurtimox, benznidazol y miconidina, en presencia de fracciones mitocondriales o microsomales de mamífero, suplementadas con NAD(P)H. En cambio la  $\alpha$ -lapachona y la tingenona fueron inactivas en todos los casos. Cuando la acción de las drogas se ensayó sobre la biosíntesis de DNA, RNA y proteínas en epimastigotes *in vitro*, todas produjeron inhibición, comprobada por su acción sobre la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina (para DNA), [<sup>3</sup>H]uridina (para el RNA) y L-[<sup>3</sup>H] leucina (para proteínas). Sin embargo, hubo variaciones según la concentración de la droga y el precursor utilizado. Así, a concentración fija de inhibidor, el nifurtimox (10  $\mu$ M), el benznidazol (38  $\mu$ M), la miconidina (3,2  $\mu$ M) y la  $\alpha$ -lapachona (1,6  $\mu$ M) inhibieron preferentemente la biosíntesis de proteínas mientras que la  $\beta$ -lapachona (1,6  $\mu$ M) inhibió preferentemente la biosíntesis de DNA. Por otra parte, el nifurtimox 100  $\mu$ M inhibió en aproximadamente igual grado, la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina, [<sup>3</sup>H]uridina, L-[<sup>3</sup>H]leucina y la  $\beta$ -lapachona

7,6  $\mu$ M inhibió por igual la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina y L-[<sup>3</sup>H]leucina. Cuando se comparó el efecto del nifurtimox y el benznidazol sobre la entrada a la célula y su incorporación a macromoléculas, el primero inhibió la incorporación mucho más que la entrada, pero con benznidazol, no hubo diferencias lo que indica que el benznidazol afectó primariamente el transporte de precursores. La comparación del efecto de las drogas sobre la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina permitió establecer las siguientes correlaciones:  $\beta$ -lapachona >  $\alpha$ -lapachona; nifurtimox > benznidazol; miconidina > tingenona. Un efecto notable de nifurtimox, la  $\beta$ -lapachona y la miconidina fue que después de 3 horas de incubación, los valores de incorporación de la uridina tritiada eran menores que los correspondientes a las dos horas, lo que significa que esas drogas produjeron la degradación de las macromoléculas previamente sintetizadas. De acuerdo con estos efectos, la adición de nifurtimox, benznidazol y  $\beta$ -lapachona a epimastigotes preincubados con precursores tritiados, aumentó la degradación del DNA, RNA y proteínas. El cálculo de la vida media de las macromoléculas radiactivas demostró que el nifurtimox y la  $\beta$ -lapachona fueron selectivamente activos sobre el DNA, mientras que el benznidazol aumentó en igual grado la degradación del DNA, RNA y proteínas. Más aún, después de la incubación de los epimastigotes con nifurtimox y  $\beta$ -lapachona, el número de roturas en el DNA ("single-strand breaks") aumentó significativamente. La comparación de los efectos de las drogas ensayadas sobre a) producción de radicales libres de oxígeno; b) inactivación de la biosíntesis de macromoléculas; c) degradación de macromoléculas y d) acción tripanocida *in vitro*, permite concluir que los productos de reducción parcial del oxígeno contribuyeron en forma significativa a los efectos

tos tripanostáticos del nifurtimox, la  $\beta$ -lapachona y la miconidina. Sin embargo, los resultados con benznidazol y tingenona indican que la generación de radicales libres no es una condición esencial para agentes quimioterápicos activos sobre el *T. cruzi*, y que otros mecanismos bioquímicos posiblemente la inhibición de la DNA o RNA-polimerasas, o del transporte de precursores de macromoléculas pueden tener un papel importante para la acción de esas drogas.

**UNA NUEVA FLAVOENZIMA EN TRYPANOSOMA CRUZI.** A novel *Trypanosoma cruzi* flavin enzyme.

*Agosin, Moisés.* Department of Zoology Riverbend Research Laboratories University of Georgia Athens, Georgia 30602, USA.

A cytosolic flavoprotein enzyme for the protozoan, *Trypanosoma cruzi*, has been purified essentially to homogeneity by DEAE-cellulose and 2', 5'-ADP-cesarose column chromatography. The native enzyme has a molecular weight of 100,000  $\pm$  6,000, is composed of two identical subunits of molecular weight 52,000  $\pm$  1,000, and contains FAD in the ratio of 1 mol FAD per mol of enzyme subunit. The enzyme is NADPH-dependent and has diaphorase activity under aerobic conditions toward cytochrome *c*, ferricyanide, 2, 6-dichloroindophenol, and menadione. The reduction of cytochrome *c* with dimeric occurs by a two-site ping pong mechanism in which NADPH reduces the flavin, which is then reoxidated in two one electron steps by reaction with 2 molecules of cytochrome *c*. The two site nature of the mechanism appears to be related to the dimeric nature of the enzyme, and the binding sites of cytochrome *c* and NADPH are probably on opposite sites of the FAD.

The enzyme has been shown to catalyze conversion of N, N-dimethylaniline into N, N-dimethylaniline-N-oxide in the presence of NADPH and air. The identity of the product has been established by HPLC and paper chromatography elution patterns and by electron impact spectrometry.

Thus, the enzyme may be classified as a FAD-monooxygenase. It differs from its mammalian counter part in its intracellular localization, molecular weight, dimeric nature, and the ability to act as a diaphorase under aerobic conditions. The enzyme represents an important fraction of the total cell protein suggesting that it may be involved in oxidative detoxication processes which may contribute to the known resistance of *T. cruzi* to antiprotozoal drugs. Supported in part by NIH grant AI-16933-04.

**LA HETEROGENEIDAD DE LOS MINICIRCULOS EN TRYPANOSOMA CRUZI ES DEBIDA A ACUMULACION DE MUTACIONES PUNTUALES.** (Sequence heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA minicircles is due to accumulation of point mutations).

*Macina, R.<sup>1</sup>; Sánchez, D.O.<sup>1</sup>; Burrone, O. y Frasch, A.C.C.* Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar". Antonio Machado 151, 1405, Buenos Aires, Argentina y <sup>1</sup>Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina.

El DNA mitocondrial (kDNA) de los tripanosomatidos está formado en su mayoría por círculos encadenados (minicírculos, mc). En trabajos previos hemos demostrado que el kDNA del *T. cruzi* posee uno o más especies homogéneas de moléculas (Biochim. Biophys. Acta 782: 26-33, 1984) que son específicas del aislamiento considerado (Mol. Biochem Parasitol. 11: 169-178, 1984) y que, por lo tanto, constituyen marcadores genéticos de utilidad para su identificación (FEBS Lett. 168: 139-142, 1984). Al comparar moléculas similares presentes en varios clones de *T. cruzi* se comprobó la presencia de polimorfismos para determinadas enzimas (Mol. Biochem Parasitol 16: 61-74, 1985).

Para conocer el mecanismo molecular responsable de estas variaciones se clonaron en el fago M13 y se secuenciaron por el método de Sanger, mc. homólogos obtenidos a partir de 3 clones diferentes de *T. cruzi*. La comparación de las 3 secuencias demostró que los polimorfismos para endonucleasas de restricción observados

previamente se deben a mutaciones puntuales, en su mayoría transiciones. Las mutaciones puntuales en cada una de las 3 secuencias estudiadas son diferentes, con lo que se demuestra que moléculas iguales pueden evolucionar en forma independiente. No se detectaron inserciones ni deleciones de regiones de DNA en las secuencias analizadas. Otros aspectos interesantes de la secuencia obtenida lo constituyen 1) la presencia de bloques de secuencias repetidas y 2) la polarización de citosinas o guaninas en una de las cadenas de DNA, que en algunas regiones llega al 97%. Se agradece la ayuda financiera de CONICET, SECYT y la Organización Mundial de la Salud.

**BIOQUIMICA DE LA QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. (Biochemistry of Chagas's disease chemotherapy).**

*Morello, Antonio; Aldunate, Jorge; Letelier, María Eugenia y Repetto, Yolanda.* Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Casilla 70086. Santiago - 7. Chile.

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Este mal es endémico en Centro y Sudamérica; en Chile afecta aproximadamente a 400 mil personas.

Las drogas actualmente en uso, como el nifurtimox, el benznidazol y el cristal violeta no son satisfactorias por numerosas razones.

El estudio de las diferencias bioquímicas entre parásito y huésped ha contribuido a explicar el modo de acción de drogas en uso y experimentales. Estos estudios constituyen la base para identificar "blancos quimioterapéuticos" y el desarrollo de nuevas drogas antichagásicas. Algunas de estas diferencias bioquímicas son:

*Producción de metabolitos reducidos del oxígeno.* En el metabolismo normal del oxígeno se produce el anión superóxido. A partir de este anión se genera  $H_2O_2$  reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa. El anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y otros radicales son altamente tóxicos para los seres vivos. Muchas

drogas antichagásicas como nifurtimox y cristal violeta actuarían aumentando la concentración de estos agentes químicos. Las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa los transforman y, por lo tanto, protegen a la célula de estos compuestos químicos. El *T. cruzi*, a diferencia del huésped mamífero, es deficiente en estos sistemas enzimáticos y así estas drogas serían selectivamente tóxicas para él. Benznidazol no actuaría vía radicales de oxígeno.

*Síntesis de RNA en T. cruzi.* El allopurinol es un antichagásico experimental que protege a ratones de la infección de *T. cruzi*. El efecto del allopurinol se debería a que es muy parecido químicamente a la adenina. Debido a la baja especificidad de la Succino-AMP sintetasa del parásito por este sustrato, allopurinol sería incorporado al RNA.

*Inhibición de la cadena respiratoria de T. cruzi.* Experimentos que se realizan en nuestro laboratorio indican que algunos antioxidantes derivados del hidroxianisole impiden el crecimiento de *T. cruzi*. Estos compuestos actuarían inhibiendo la respiración por bloqueo de la cadena de transporte de electrones en la única mitocondria que posee el parásito. Financiado por UNDP/WB/WHO/TDR, por CONICYT-CHILE y por la Universidad de Chile (grant B-1854).

REFERENCIAS

1. Free Radicals Metabolites in the Mode of Action of Chemotherapeutic Agents and Phagocytic Cells on *Trypanosoma cruzi*. R. Docampo and S.N.J. Moreno Reviews of Infectious Disease. Vol. 6 N° 2, 233-238, 1984.
2. Recent studies on inhibitors of macromolecular synthesis and function in Trypanosomas. Pharmac. Ther. Vol. N° 25, 239-254. 1984.

**ACIDO SIALICO ENDOGENO Y VARIANTES DE HISTONAS EN T. CRUZI. (Endogenous sialic acid and histone variants in T. cruzi).**

*Toro, C.; López, R. y Galanti, N.* Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo hemoflagelado perteneciente al Orden Kinetoplastida, que produce la enfermedad de

Chagas. Este parásito constituye probablemente uno de los sistemas más complejos de diferenciación en un eucarionte unicelular. Presenta 3 fenotipos durante su ciclo de vida, dependiendo del medio en que se encuentra: esferomastigotes o amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes. Los esferomastigotes constituyen la forma replicativa intracelular, sin flagelo evidente al microscopio de luz. Los epimastigotes son formas con flagelo evidente, que se encuentra y multiplica en el tracto digestivo del vector, *Triatoma infestans* (vinchuca). Los tripomastigotes corresponden a la forma flagelada no proliferante, que se encuentra tanto en orina y heces de la vinchuca como en la sangre periférica de los hospedadores infectados.

Aparte del análisis de sus funciones bioquímicas, se ha enfocado el estudio de *T. cruzi*, fundamentalmente a tres niveles:

1. Superficie celular, que se relaciona con:
  - a) la inducción de una respuesta inmune en el hospedador.
  - b) la evasión a esa respuesta inmune.
  - c) la recepción y transducción de señales para crecimiento en masa (tamaño), aumento en número (proliferación) y diferenciación celular.
  - d) la interacción entre las diferentes formas del parásito con células del vector y/o del hospedador.
2. DNA del kinetoplasto, que se relaciona con:
  - a) algunas funciones propias de este organelo,
  - b) la posibilidad de caracterizar cepas de *T. cruzi* mediante el análisis de fragmentos liberados por diferentes enzimas restrictivas (esquizodema).
3. Núcleo y cromatina, que se relaciona con:
  - a) organización de la cromatina en general y en particular en diferentes fases del ciclo celular,
  - b) proteínas nucleares (estructurales y/o enzimas) que participan en la regulación de la proliferación y la diferenciación del parásito,

c) organización de ciertos genes en el genoma,

d) genes que participan en procesos de crecimiento celular, proliferación y diferenciación celular.

En este trabajo se analiza la posibilidad de utilizar el ácido siálico y las variantes de histonas de *T. cruzi* cepa Tulahuén, como marcadores de la actividad génica a nivel de superficie celular y cromatina, respectivamente, en los diferentes estados de diferenciación del parásito.

En una primera aproximación, se determinó ácido siálico en la forma epimastigote, empleando unión de parásitos homogenizados o vivos a WGA-H<sup>3</sup>. Simultáneamente, se midió la cantidad de ácido siálico en *T. cruzi* por técnicas químicas, después de hidrólisis enzimática o ácida controlada y purificación del ácido siálico en columnas de Dowex.

Por otra parte, se extrajo histonas a partir de cromatina de *T. cruzi* en presencia de inhibidores de proteasas. Las histonas se caracterizaron por espectrofluorometría y por su composición de aminoácidos. Posteriormente, se analizaron en geles de poliacrilamida en una y en dos dimensiones.

Se demostró presencia de ácido siálico endógeno en la forma epimastigote, con aproximadamente un 17% expuesto en la superficie celular. Este resultado discrepa de datos presentados por otros autores, que postulan un origen exógeno del ácido siálico de *T. cruzi*, y define la cantidad expuesta en su superficie.

En cuanto a las histonas, se demostró la presencia de 6 especies, una de ellas con alta movilidad electroforética. Además, por electroforesis en dos dimensiones, se encontró variantes en la mayoría de estas especies.

Estos resultados permitirán establecer relaciones entre presencia de ácido siálico en la superficie y ocurrencia de variantes de histonas en la cromatina de *T. cruzi* con el proceso de diferenciación y/o proliferación celular en este parásito.

(Proyecto 1088, Fondo Nacional de Ciencias y UNDP/BWB/WHO-TDR).

## Simposio

### CORRELACIONES ECOLÓGICAS, MORFOLÓGICAS Y BIOENERGÉTICAS DEL MODO DE ALIMENTACIÓN DE VERTEBRADOS

Coordinador: *Fabián Jaksic*

#### RELACIONES ENTRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL TUBO DIGESTIVO Y DIETA DE PECES LITORALES. (Relationship between morphology of the digestive tract and the diet of littoral fishes).

*Cancino, J.M.; Moreno, C.A. y Garrido, J.* Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

Es bien conocido que los teleósteos herbívoros presentan un tubo digestivo relativamente más largo que los peces carnívoros. Por otra parte, numerosas especies cambian dieta a lo largo de su vida. En estas especies el cambio ocurre frecuentemente de carnivoría a herbivoría, siendo raros los casos de cambio en sentido inverso. En el presente trabajo se estudian estas relaciones en peces del litoral central de Chile, con énfasis en aquellas especies que presentan cambio de dieta (*Aplodactylus punctatus*, *Doydixodon laevifrons* y *Sicyases sanguineus*). Como referencias se incluyen especies carnívoras y datos de la literatura.

Se encontró que *A. punctatus* y *D. laevifrons* cambian su dieta de omnívoro a herbívoro y de carnívoro a omnívoro, respectivamente, mientras que *S. sanguineus* cambia de omnívoro a carnívoro. De acuerdo a las predicciones, se observa que en las dos primeras especies existe un notorio incremento del largo absoluto y relativo del tracto digestivo en función de la longitud total del pez (LT). Este cambio es más acentuado en *A. punctatus* que en *D. laevifrons*. Sin embargo, a pesar del cambio a dieta herbívora, en *A. punctatus* se mantiene una relación lineal entre largo absoluto del tubo digestivo y el peso corporal. Por otra parte, contrario a las predicciones en *S. sanguineus* se observó un leve aumento en la longitud del tracto digestivo (LTD) en términos absolutos, pero en términos rela-

tivos el largo es constante para todos los tamaños ( $LTD/LT \approx 0.50$ ).

Los cambios observados se deben principalmente a la elongación de la superficie de absorción, siendo éste al parecer un criterio menos ambiguo que los otros mencionados frecuentemente en la literatura (ciegos pilóricos, dientes en empalizada, etc.), como indicadores del hábito herbívoro.

#### CORRELACIONES DIETARIAS DE LAS MODALIDADES DE ALIMENTACIÓN EN ANFIBIOS ANUROS. (Dietary correlates of the foraging modes in anuran amphibians).

*Díaz, Nelson F.* Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El análisis de las relaciones tróficas de cualquier grupo animal debe considerar, además de otros aspectos, su rol como predadores y tópicos asociados a esta función. La revisión de la literatura revela para el caso de los Amphibia, la carencia de cantidad suficiente de estudios detallados que describan los hábitos y requerimientos alimentarios o estrategias para la obtención del alimento; incluso estudios básicos que describan los tipos y cantidades de alimento o las preferencias alimentarias de las especies, son también escasos.

Se han revisado los conocimientos existentes respecto a esos aspectos para el caso de anfibios anuros conocidos en Chile. Estos pueden agruparse según sus hábitos acuáticos (especies de *Caudiverbera* y *Telmatobius*), o marginal acuático (especies de *Pleurodema*, *Hylorina*, *Batrachyla*, *Eupso-phus*, *Alsodes*, *Telmatobufo* y *Bufo*). Sólo para una especie (*Batrachyla leptopus*) existe una descripción detallada de su modo de alimentación; para otras especies existen observaciones puntuales, que en todo

caso permiten diferenciar un modo de alimentación en ambientes acuáticos y otro en ambientes no acuáticos. También son escasos los trabajos que describen dietas de anuros chilenos. De la información existente pueden obtenerse algunas generalizaciones:

– sólo restos vegetales, Díptera y Coleóptera, son “ítems” comunes en la dieta en todos los casos descritos; los Insecta tienen en todos los casos una representación importante en las dietas, más marcada en las especies marginal acuáticas; todos los anuros estudiados son omnívoros; las especies acuáticas sólo consumen presas acuáticas.

Se discuten estas generalizaciones y se proponen algunas otras correlaciones posibles:

– una mayor amplitud de nicho trófico podría estar en relación con la plasticidad de la especie para ocupar distintos hábitats; en casos como los de especies simpátricas, o de poblaciones de una misma especie distribuidas en un gradiente altitudinal, parecen ocurrir modificaciones dietarias secundarias a una modificación del nicho espacial.

**CORRELATES OF FORAGING MODES IN LIZARDS: A REVIEW.** (Correlaciones de los modos de alimentación en saurios: una revisión). *Carothers, John H.*, Museum of Vertebrate Zoology and Department of Zoology, University of California, Berkeley, California, U.S.A. 94720.

The study of lizard ecology has played a central role in the development of research on the ecological consequences of foraging mode. This work has pointed to three areas concerning the biology of organisms which are likely to be related to their foraging mode: trophic relationships with predators as well as prey encountered, energetic tradeoffs of the two foraging modes and their related costs, and factors related to reproduction (clutch size).

Huey and Pianka (1981) first suggested that widely foraging lizards should feed preferentially upon clumped, sedentary prey, particularly termites, while sit-and-wait lizards should feed on mobile insects.

This was supported in their studies of lizard diets in the Kalahari desert of Africa, Western Australia deserts, and North American deserts. Brazilian savannah lizards also show this pattern (Magnusson *et al.*, 1985). These results are reinforced by the fact that comparisons were intrafamilial, and hence not a consequence of differing phylogenies and subsequent differing sensory modes for prey detection. Huey and Pianka also found that sit-and-wait lizard predators preyed upon wide-foraging lizards, and suggested that in general there should be an alternation between trophic levels in foraging modes: sedentary prey should be consumed by wide foragers which themselves are subjected to predation by sedentary foragers.

Using doubly-labeled water to measure physiological rates in the field, Anderson and Karasow (1982) found that the actively-foraging teiid lizard *Cnemidophorus tigris* had higher metabolic demands than did the sit-and-wait foraging iguanid *Callisaurus draconoides*, although the higher costs of the wide forager were more than offset by the extra food energy captured. The problem of differing phylogenies confounds the energetic comparisons in the study, but this result is supported in the intrageneric comparisons of Huey and Pianka with Kalahari lizards where metabolisms were estimated using standard equations. Because energy intake rates are higher for wide-foragers, why sit and wait? Huey and Pianka suggest that the increased risk of predation may counteract the benefits of wide foraging, as indicated by proportion of wide-foraging lizards in the diet of a Kalahari desert lizard predator as compared to the general representation of wide-foraging lizards in the community as a whole.

Vitt and Congdon (1978) first suggested that foraging mode should influence clutch size of females. They suggested that wide-foragers should have smaller clutches than sit-and-wait foragers because of their increased transportation costs resulting from increased body weight. Differing phylogenies again confounded their comparisons, but the trend was supported in the



lacertid Kalahari lizards studied by Huey and Pianka as well as in the teiid brazilian lizards studied by Magnusson *et al.*

**CORRELACIONES MORFOLOGICAS, ECOLOGICAS Y BIOENERGETICAS DEL MODO DE CAZA EN AVES RAPACES. (Morphological, ecological and bioenergetic correlates of hunting mode in raptors).**

*Jaksić, F. y Marti, C.D.* Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile y Department of Zoology, Weber State College, Ogden, Utah, USA.

Realizamos un escrutinio de cuatro correlaciones del modo de caza de aves rapaces, dicotomizado como búsqueda y acecho, en cinco ensambles simpátridos de Chile, España, Michigan, Wisconsin y Utah. Examinando 24 especies del orden Falconiformes (rapaces diurnas) y 10 especies del orden Strigiformes (rapaces nocturnas), encontramos que: 1) En Falconiformes, las cargas alares linearizadas son livianas para bailarines, varis y águilas (quienes usan el modo de caza búsqueda) y pesadas para aguiluchos, halcones y pequitos (quienes usan un modo mixto, tanto de acecho como de búsqueda). Entre las strigiformes, las buscadoras (principalmente lechuzas tytoninas y striginas) también presentan cargas alares linearizadas más livianas que las acechadoras (principalmente lechuzas buboninas). Las falconiformes y strigiformes que comparten el mismo modo de caza no difieren significativamente entre ellas en cuanto a este atributo morfológico. 2) En Falconiformes la diversidad dietaria aumenta en el sentido pequitos, varis, halcones, águilas, aguiluchos, bailarines, y en Strigiformes en el sentido striginas, buboninas, tytoninas. Ni dentro Falconiformes ni Strigiformes se observa que rapaces con distinto modo de caza difieran entre ellas en este atributo ecológico, como tampoco entre aquellas rapaces que usan un modo único o mixto de caza. 3) En Falconiformes, el cociente entre peso de la presa y de la rapaz aumenta en el sentido varis, halcones, aguiluchos, pequitos, águilas, bailarines, y en Strigiformes desde tytoninos a striginos y bubo-

ninos. Este atributo ecológico tampoco presenta diferencias significativas entre Falconiformes o Strigiformes que usan distinto modo de caza. 4) Los costos energéticos incurridos por Falconiformes (no hay datos para Strigiformes) que usan un modo mixto de caza son absolutamente mayores para búsqueda que para acecho en los cuatro casos analizados, y en relación al número de capturas de presa son relativamente mayores en tres de ellos, pero información sobre las ganancias energéticas hay disponible para uno sólo. En este caso, el modo búsqueda genera una mayor diferencia (pero no un mayor cociente) entre costo y beneficio que el modo acecho. En los casos restantes dicha diferencia no es conocida, pero varias ventajas asociadas al modo búsqueda se han propuesto que pueden compensar su mayor costo energético. Nuestras principales conclusiones son: 1) El cálculo de la carga alar linearizada de un Falconiforme o Strigiforme permite predecir su principal modo de caza. 2) El uso del modo búsqueda o acecho (sólo o en combinación) no resulta en una explotación diferencial de los recursos alimenticios —en términos de la diversidad y tamaño de las presas consumidas— por las rapaces. 3) Nada puede predecirse acerca del uso proporcional de los dos modos de caza por una misma rapaz sólo en base al costo energético y número de capturas de presa que cada modo representa; para ello es necesario contar con información cuantitativa tanto de los beneficios directos (ganancia calórica por consumo de presas) como de los indirectos (termorregulación, exploración de nuevas áreas de caza, patrullaje de territorio, etc.).

**CONSECUENCIAS ENERGETICAS Y ECOLOGICAS DE HABITOS ALIMENTICIOS EN MAMIFEROS. (Energetical and ecological consequences of food habits in mammals).**

*Contreras, Luis C.* Departamento de Biología y Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile.

Las principales líneas evolutivas de los mamíferos se relacionan con especializaciones tróficas asociadas a los altos niveles de ener-

gía requeridos por organismos homeotermos-endotermos. Tales especializaciones han tenido profundas consecuencias morfológicas, ecológicas y conductuales. Intentaré mostrar la influencia de los hábitos alimenticios (HA) en la tasa metabólica (TM, gasto de energía), y su relación con ciertas características reproductivas. Mostraré, además, la influencia de los HA en la distribución y uso del espacio en mamíferos.

La TM está principalmente determinada por el peso corporal (PC). Sin embargo, los HA también tienen una gran influencia. Un grupo en que esto se ha demostrado con mayor claridad es en murciélagos. En estos los nectarívoros, los frugívoros y carnívoros, y los insectívoros tienen, respectivamente, TM más altas, estándar, y más bajas, que lo esperado en función del PC. Esto se relaciona con el valor energético de cada tipo de alimento y su disponibilidad temporal, lo que a su vez determina la longitud de los períodos reproductivos, las fluctuaciones poblacionales y la distribución geográfica. Otros ejemplos son los mamíferos de distintos taxa y continentes, que convergen hacia una dieta a base de termitas y hormigas, y aquellos que son folívoros. Todos ellos tienen TM, y tasas reproductivas bajas, fluctuaciones poblacionales leves, y son principalmente tropicales.

Por el contrario, los ungulados, lagomorfos, carnívoros y roedores microtinos, tienen un gasto de energía alto, relacionado

con una disponibilidad de alimento alta y constante, y/o de alto contenido calórico. Estos mamíferos tienen altas tasas reproductivas y amplias fluctuaciones poblacionales y no están restringidos a ambientes tropicales.

El nivel de gasto de energía se relaciona con el período de gestación y la velocidad de crecimiento y, por lo tanto, con el tiempo generacional; determinando una relación directa entre TM y tasa intrínseca de crecimiento poblacional. El valor selectivo de un alto gasto de energía en mamíferos placentados sería principalmente tener un alto  $r_{max}$  y como consecuencia una mejor termorregulación.

De acuerdo a este análisis, todas las especies son r-seleccionadas. Si las especies no tienen un  $r_{max}$  alto, es por limitaciones (alimenticias, entre otras) impuestas sobre las características mencionadas. La gran variación en el gasto de energía y consecuentemente en las características reproductivas no son al azar y son un reflejo de los distintos tipos de alimentos y ambientes que los mamíferos han llegado a explotar a través de su deriva natural.

El ámbito de hogar (AH) es otra característica influenciada por los HA. Los mamíferos carnívoros tienen AH mayores que herbívoros de igual tamaño, lo que se explica en parte por la mayor abundancia de productividad secundaria que primaria.

## Simposio

### ORIGEN Y MANTENCION DE VARIABILIDAD GENETICA EN POBLACIONES NATURALES

Coordinador: *F. Rothhammer*

#### ORIGEN Y MANTENCION DE VARIABILIDAD GENETICA EN POBLACIONES NATURALES. INTRODUCCION. (Origin and maintenance of genetic variability in natural populations. Introduction).

*Rothhammer, F.* Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

A fines de la década de los sesenta, el ori-

gen y la mantención de variación genética eran considerados los problemas centrales de la genética de poblaciones. Durante aquellos años en Estados Unidos e Inglaterra, la controversia entre seleccionistas y neutralistas comenzaba a enardecer los ánimos y a provocar gradualmente la alineación de muchos investigadores en dos bandos con visiones aparentemente irrecon-

ciliables. Varios años más tarde esta disputa académica también se extendió a nuestro país y así fue como durante el simposio efectuado en la XXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología en este mismo lugar, varios biólogos presenciaron algo sorprendidos un intercambio de ideas inusualmente impetuosas. En aquella oportunidad, como ha ocurrido tantas veces durante el desarrollo de la genética de poblaciones, primó el apriorismo y se postergó la presentación de evidencia factual.

En esta oportunidad hemos querido re-visitar la misma problemática enfatizando la presentación de hallazgos concretos, con el objetivo de analizar los avances que la disciplina ha experimentado durante los últimos años con respecto a ella.

**CAMBIOS EN LA ARQUITECTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES POR EFECTO FUNDADOR.** (Changes in the genetic architecture of populations by the founder effect). Brncic, Danko y Budnik, Myriam. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El genotipo colectivo de las especies diploides bisexuadas no es un reservorio desorganizado de genes al cual los progenitores aportan sus genes y de donde se extraen al azar las combinaciones genéticas de la progenie. Este punto de vista, sostenido por la genética de poblaciones clásica, ha sido reemplazado por otro que visualiza la arquitectura genética de las poblaciones y de las especies como un complejo sistema integrado de genes estructurales y mecanismos reguladores altamente coadaptados. Por otra parte, las propiedades homeostáticas del acervo genético de las poblaciones, permite preservar la variedad genética producida por recombinación y mutaciones de efecto pequeño. Sólo cuando existen perturbaciones más o menos drásticas del sistema, basadas o unidas a la subdivisión de la población en subunidades pequeñas y aisladas, los efectos de presiones evolutivas como la selección natural y la deriva serían capaces de producir cambios cladogenéticos conducentes a la formación de razas dife-

renciadas (o especies nuevas). Se han elaborado varios modelos de evolución basados en estas ideas ("shifting balance" de Wright 1932; "Revolución Genética" de Mayr, 1963). Para Carson (1982), la especiación (cladogénesis) sólo ocurriría después de una reducción drástica del tamaño efectivo de la población. Un aislado pequeño, debido a la relajación de la selección natural, está sujeto a factores estocásticos que destruyen el sistema integrado de genes. Después de esta fase de *desintegración*, existiría una fase de *reorganización* del empobrecido acervo genético remanente. Esta última se concibe como un proceso lento, gradual y regulado fundamentalmente por factores selectivos direccionales conducentes al establecimiento de nuevos complejos integrados de genes.

El estudio de los cambios genéticos que suelen ocurrir durante el proceso de formación de colonias aisladas, a partir de poblaciones mayores, constituye una de las mejores formas de probar las hipótesis señaladas. La reciente colonización en Chile de la especie paleártica *Drosophila subobscura*, representa un ejemplo de estos procesos asociados a lo que algunos denominan efecto fundador. La comparación de las poblaciones chilenas de *D. subobscura* con las posibles poblaciones ancestrales europeas, indica que tanto a nivel citogenético, de genes estructurales y de sistemas poligenéticos, se han producido cambios apreciables.

**VARIACION GENÉTICA EN ORGANISMOS MARINOS.** (Genetic variation in marine organisms).

Galleguillos, Ricardo y Guíñez, Ricardo. Departamento de Biología y Tecnología del Mar, Pontificia Universidad Católica de Chile, Sede Talcahuano.

La aplicación de las técnicas electroforéticas en animales marinos, ya sea invertebrados o vertebrados, ha permitido una diversidad de estudios que involucran aspectos genéticos poblacionales, genéticos demográficos y relaciones de la genética bioquímica y fisiología. Además de la aplicación de la genética a los cultivos marinos.

Los estudios llevados a cabo en algas, muestran en cambio un déficit grande de intensidad de trabajo, comparado con animales marinos. Como futura área de investigación, las algas presentan problemas muy interesantes desde el punto de vista genético-evolutivo, considerando sus modalidades reproductivas.

En el presente trabajo se discuten resultados obtenidos en *Tiostrea chilensis*; entre la variación de caracteres morfológicos cuantitativos y el grado de heterocigosidad individual, determinado para dos loci polimórficos. Los resultados obtenidos se analizan considerando en general que varios estudios llevados a cabo en invertebrados muestran una relación de heterocigosidad y crecimiento.

Se discuten también los resultados obtenidos en *Porphyra columnia*; en relación al estudio del polimorfismo proteico en diferentes poblaciones de la especie.

**UN MODELO DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES POR EFECTO DE SU ORDENAMIENTO ESPACIAL. (A model of genetic variability in populations by its spatial pattern of distribution).**

*Del Solar, Eduardo.* Instituto de Ecología y Evolución, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

La proposición teórica más general de la genética de poblaciones las define por dos atributos: panmixia y frecuencias génicas. Lo cual implica que las poblaciones se comportan como mezclas homogéneas, porque los individuos se cruzan al azar y las frecuencias génicas son iguales en cualquier sector que ellas ocurran. Toda población que no se ajusta a esta proposición, se dice que tiene estructura.

En este trabajo se examinan los modelos más comunes de estructura espacial: a) modelo de islas, en el cual se presume que la población está constituida por un alto número de subpoblaciones independientes de igual tamaño y con cruzamientos al azar y que en cada generación una proporción de individuos de cada subpoblación se intercambia con todas las demás, independientemente de las distancias que

las separan; b) el modelo "Stepping-stone", que es semejante al anterior, pero se distingue porque la dispersión ocurre exclusivamente entre los vecinos inmediatos y en una proporción constante y c) modelo de aislamiento por distancia, en este se presume una distribución continua, con una densidad constante por unidad de área y los individuos se dispersan al azar. En cada generación se estima la probabilidad de tener un hijo en un punto cuando su progenitor proviene de un punto diferente.

Se propone un modelo de ordenamiento espacial agregado, basado en una supuesta conducta gregaria que exhiben diferentes especies de *Drosophila* y que opera en cuatro ámbitos de probabilidad simple: a) la distribución de los organismos en el espacio que corresponden a los nacidos en una generación, b) la probabilidad del número diferente de descendientes entre puntos del espacio, c) la probabilidad de dispersión y d) la probabilidad de sobrevivida de cada individuo en un tiempo dado.

**ORIGEN Y MECANISMOS DE MANTENCIÓN DE VARIACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES HUMANAS. (Mechanisms of maintenance of genetic variation in human populations).**

*Rothhammer, F.* Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Esta presentación se centrará primero en la descripción cualitativa y cuantitativa de variación genética en distintos niveles de diferenciación poblacional, para luego analizar su origen y mantención.

Los niveles elegidos serán un conjunto de aldeas indígenas sudamericanas pertenecientes a una tribu, diferentes tribus ubicadas en un mismo continente, razas humanas que habitan distintos continentes y, finalmente, especies emparentadas tales como *Homo sapiens*, *Pan troglodytes* y *Gorilla gorilla*.

Se llegará a la conclusión que la heterogeneidad genética descubierta en cada uno de los niveles analizados tiene posiblemente tanto orígenes, como mecanis-

mos de mantención algo diferentes, lo que llevará a recomendar cautela frente a la tentación de proponer o suscribir modelos generales de diferenciación poblacional.

**EVOLUCION EPISODICA Y RAPIDA POR HETEROCRONIA EN EL DESARROLLO. (Episodic and fast evolution through developmental heterochrony).**

*Spotorno, A.E.* Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La ontogenia (o el ciclo de vida) de un organismo puede ser considerada como una sucesión temporal de fenotipos integrados, cuyos eventos claves están determinados, tanto directamente por los genes como por interacciones epigenéticas entre los productos génicos. Sin embargo, la generación de nuevos fenotipos en el tiempo ha sido tradicionalmente adscrita a la adaptación a nuevos ambientes a través de cambios lentos y graduales guiados por selección. Esta última proposición (1) presupone una estrecha correspondencia entre variación genética y fenética, la que será continua e ilimitada y (2) permite la extrapolación simple de los procesos microevolutivos a la macroevolución, descuidando el estudio de la interfase material entre factores ecológicos y genéticos, o sea, el fenotipo.

Los detalles principales de la evolución de algunos grupos ilustran la noción de cambios fenotípicos rápidos y discretos. En la evolución de los cricétidos sudamericanos destaca la constancia de un báculo complejo (osificado a los 4 días por acción de testosterona que también determina el dimorfismo sexual) con tres dígitos distales, también presente en los Múridos. En contraste, *Akodon longipilis* tiene un báculo simple que se osifica a los 25 días de edad; simultáneamente, presenta aumento en tres glándulas accesorias, ausencia de dimorfismo sexual, aumento del tamaño corporal y de la longevidad, y disminución del tamaño de la camada, comparado con las especies genéticamente más próximas, separadas por 0.4 unidades Nei (filogenia estimada por árboles de Wagner basados

en las frecuencias génicas de 30 loci enzimáticos estudiados por electroforesis de proteínas). Estos datos indican que tal especie se ha desplazado hacia una estrategia K, en que un pequeño cambio heterocrónico en la descarga de la testosterona neonatal produciría una sucesión de efectos morfológicos. El retardo de la osificación y la simplificación del báculo no habrían sido seleccionados directamente; más bien, serían efectos secundarios de un cambio favorecido por sus consecuencias reproductivas y ecológicas posteriores. El hecho de que al menos otras 3 especies de cricétidos lejanamente emparentados (en tres continentes) también presentan báculo siempre por paralelismo y sin transición, sugiere que tal morfología es un estado discreto del fenotipo logrado independientemente por varias líneas filéticas.

En la evolución de los homínidos fósiles aparecen cambios graduales (i.e. aumento del tamaño corporal), pero hay un salto alométrico en la capacidad craneana desde *Australopithecus-Homo erectus* a *H. sapiens*; además, los cráneos juveniles y adultos de *Homo* se agrupan con los juveniles de *Australopithecus*, *Pongo*, *Gorilla* y *Pan*, y entre 25 caracteres propiamente humanos, 20 están presentes en los póngidos jóvenes, indicando neotenia y retardo en el desarrollo.

Junto con otros casos en que las perturbaciones naturales (evolución) y experimentales producen fenotipos similares, los casos presentados sugieren que el programa genético del desarrollo desplegado durante la ontogenia provee una variedad de fenotipos potenciales (preaptaciones) eventualmente seleccionados directamente (adaptaciones) o indirectamente (exaptaciones), los que aparecen por acción de pequeños y rápidos cambios genéticos que alteran la cronología ontogenética. El actual paradigma evolutivo no es erróneo, sólo incompleto y parcial: las leyes de la ontogenia y de la especiación, aún no formuladas en términos sintéticos, pueden aumentar su capacidad explicativa por medio de nueva síntesis teórica.

(Proyecto B-1979-8523, D.I.B., Universidad de Chile y Beca PNUD-UNESCO, CHI-84/003).

## Simposio

### TRANSMISION DE SEÑALES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS: ACOPLAMIENTO ENTRE EXCITACION Y CONTRACCION EN MUSCULO

Coordinador: *E. Jaimovich*

**CORRIENTES DE ENTRADA DE IONES RELACIONADAS CON EL PROCESO DE EXCITACION-CONTRACCION EN FIBRAS MUSCULARES ESQUELETICAS. (Inward going ionic currents related to excitation-contraction coupling process in skeletal muscles fibers).**

*Arispe, N.; Argibay, J.; Rojas, E.\* y Rojas, L.* Centro de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela y Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile\*.

El mecanismo de disparo de la contracción en músculo esquelético está ligado, en condiciones normales, a la producción de un potencial de acción en las membranas del sistema tubular transverso. La señal, desde las membranas, es comunicada al retículo sarcoplasmático (SR), promoviendo la liberación de iones  $Ca^{2+}$ , los cuales inician la contracción. El problema mayor aún no resuelto es el mecanismo por medio del cual la despolarización o las consecuentes entradas de iones establecen comunicación con el SR para dar origen a la liberación de los iones  $Ca^{2+}$ . En este trabajo se presenta una discusión sobre las corrientes iónicas hacia el interior celular, que se observan en fibras musculares esqueléticas de *Bufo marinus*, cuando son sometidas a despolarizaciones con el método de fibra cortada. En solución Ringer normal, desplazamientos del potencial de membrana entre  $-50$  y  $-70$  mV, da origen a flujos de corrientes transportadas por iones  $Na^+$ , los cuales presentan dos valores máximos separados temporalmente. Pequeñas variaciones del voltaje entre  $-50$  y  $-60$  mV demuestran que ambos máximos varían en amplitud, llegando a ser mayor el de más lenta aparición y corresponden a dos poblaciones de canales iónicos con diferentes cinética y sensibilidad de voltaje. Los máximos de conductancia para estos valores de voltaje ocurren al-

rededor de 1 ms. para las corrientes más rápidas ( $I_{Na, r}$ ) y alrededor de 2 ms. para las corrientes más lentas ( $I_{Na, l}$ ). Ambos canales iónicos permiten el paso fácilmente de iones  $Li^+$  y son afectados por TTX y veratridina. Se discute la cinética de acción de estas drogas sobre la base de sensibilidad o ubicación espacial diferente de los canales. En soluciones con iones  $Ca^{2+}$ , bloqueadores específicos para canales de  $Na^+$  y  $K^+$  y libre de iones  $Cl^-$  se observan para despolarizaciones mayores de  $-40$  mV, unas corrientes tardías de cinética muy lenta, cuyos calores máximos se alcanzan a los cientos de ms. Los canales responsables de estas corrientes, además de  $Ca^{2+}$ , pueden permitir el paso de iones  $Ba^{2+}$ , son prácticamente impermeables a iones  $Mg^{2+}$  y son bloqueados por iones  $Co^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ . La cinética de bloqueo y la aplicación de despolarizaciones repetidas, definen la ubicación de estos canales preferencialmente sobre las membranas del sistema tubular transverso.

**CANALES DE CALCIO Y CANALES DE POTASIO ACTIVADOS POR CALCIO EN MUSCULO ESQUELETICO. (Calcium and calcium-activated potassium channel in skeletal muscle).**

*Latorre, Ramón.* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago.

En el músculo esquelético nos encontramos con una gran variedad de canales iónicos que, directa o indirectamente, contribuyen a la contracción muscular. En particular los canales de calcio y los canales de potasio activados por calcio contribuyen a un gran número de funciones celulares en el músculo y otros tipos de células. Entre estas funciones podemos nombrar, además de la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y hormonas, motilidad y

funciones de marcapaso. Sin embargo, debido a la inaccesibilidad de los dos grandes sistemas de membrana del músculo, los túbulos transversales y el retículo sarcoplásmico, el estudio de las propiedades de los canales iónicos contenidos en estas membranas, mediante las técnicas electrofisiológicas actuales, presenta problemas insuperables. Una manera de resolver este problema es recurrir a las técnicas de reconstitución de canales iónicos en bicapas planas de lípidos. Recientemente, dos avances importantes en este campo han permitido el registro de los canales de calcio, a nivel de canal unitario, contenidos en la membrana del músculo. El primero es el desarrollo de una preparación de membranas altamente enriquecida en túbulos transversales, éstos contienen una gran densidad de receptores de dihidropiridinas (receptor que, supuestamente, forma parte de la(s) proteínas que constituyen el canal de calcio) y, segundo, el descubrimiento de derivados de las dihidropiridinas capaces de estabilizar el canal en su conformación abierta. Empleando estos avances, se ha podido registrar y caracterizar las propiedades de los canales de calcio contenidos en los túbulos transversales de músculo esquelético de rata en bicapas planas de lípidos. Mediante las técnicas de reconstitución también ha sido posible detectar y caracterizar en membranas artificiales un canal de potasio activado por calcio que también está contenido en las membranas de túbulos transversales. Este canal es activado por concentraciones micromolares de calcio y por el potencial eléctrico y, aunque su función fisiológica no está clara, es posible que este canal intervenga en la repolarización de la membrana del túbulo y/o en controlar los flujos de calcio.

La salida de calcio del retículo sarcoplásmico es una etapa necesaria en la etapa de acoplamiento de la excitación con la contracción en músculo esquelético, pensándose que esta es mediada por un canal de calcio. Usando la técnica de fusión para insertar proteínas de retículo sarcoplásmico en bicapas de lípidos, se ha podido detectar que permiten el paso de calcio y que están contenidos en la fracción que corresponde al retículo sarcoplásmico pesado. Estos canales se han identificado con base en su

activación por nucleótidos, inhibición por rojo de rutenio y por su selectividad a cationes divalentes.

En resumen, las técnicas de reconstitución han abierto la posibilidad de estudiar los diferentes tipos de canales iónicos contenidos en aquellos sistemas de membrana de la membrana muscular que no permiten el acceso a microelectrodos. Estos canales están siendo estudiados en la actualidad en sistemas reconstituidos en cuanto a sus propiedades biofísicas y su posible modulación por el metabolismo celular.

**MOVIMIENTOS DE CALCIO DURANTE LOS PROCESOS DE ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION Y DE RELAJACION EN MUSCULO DE CRUSTACEO. (Calcium movements during excitation-contraction coupling and relaxation process in crustacean muscles).**

*Rojas, Eduardo; Nassar, Verónica y Luxoro, Mario.* Departamento de Fisiología y Biofísica, Departamento de Biología Universidad de Chile.

Hemos medidos el curso temporal de los movimientos de calcio en fibras musculares de balanus y langosta usando la bioluminiscencia de la proteína acuorina que reacciona con calcio iónico a concentraciones mayores que  $10^{-7}$  M.

Es posible cargar con calcio el retículo de la fibra muscular despolarizando la membrana con potasio (Na-adma: 450 NaCl, 10 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 50 MgCl<sub>2</sub>; K-adma: 450 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 50 MgCl<sub>2</sub>, mM) durante 5 minutos. Para descargar el calcio desde el retículo se agrega cafeína al adma (5-20 mM) con lo que se induce una contractura seguida por relajación de la fibra antes de remover la cafeína.

El destino del calcio que entra a la fibra desde el medio externo durante la despolarización de la membrana está fundamentalmente determinado por el estado de carga del retículo. Por ejemplo, la tensión máxima alcanzada durante una contractura inducida por K-adma aumenta en una serie de contracturas sucesivas y llega a niveles de saturación después de tres o cuatro contracturas sucesivas. La relajación de la fibra muscular después de la contractura induci-

da por K-adma se debe al transporte de calcio por una ATP-asa que requiere ATP y  $Mg^{2+}$  y que es sensible a vanadato por el lado del mioplasma. La velocidad máxima de este transporte permite dar cuenta de la constante de tiempo del proceso de relajación lenta después de las contracturas inducidas por potasio y por cafeína. Hemos establecido, además, que si se bloquea este transporte de calcio y si se estimula el retículo, previamente cargado, usando cafeína (5-10 mM), se inducen oscilaciones lentas tanto en los niveles de calcio iónico detectados con la acurina, como en la tensión.

Incubando las fibras permeabilizadas químicamente con digitonina en un medio con  $^3H$ -inositol se obtiene una marca rápida de todos los fosfolípidos del inositol y hemos podido medir la cinética de la liberación de calcio del retículo cargado inducida por inositol trifosfato ( $IP_3$ ).

**CARACTERIZACION FUNCIONAL DE MEMBRANAS AISLADAS DEL MUSCULO ESQUELETICO; POSIBLES COMPONENTES DEL ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION. (Functional characterization of membranes isolated from skeletal muscle, and of components tentatively involved in excitation-contraction coupling).**

*Hidalgo, C.; Carrasco, M.A.; Donoso, P.; Liberona, J.L.; Magendzo, K.; Riquelme, G. y Jaimovich, E.* CECS y Depto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El proceso de acoplamiento excitación-contracción en músculo esquelético involucra la transmisión de una señal desde las membranas de los túbulos transversales hacia el retículo sarcoplasmático. La naturaleza de esta señal es aún desconocida, pero estudios recientes han postulado que en respuesta a

la despolarización de los túbulos transversales, se liberaría inositol trifosfato de la membrana del túbulo hacia el interior de la fibra muscular, el que actuaría como mensajero químico y produciría liberación de calcio del retículo sarcoplasmático.

Con el objeto de estudiar cuáles son las entidades moleculares involucradas en el proceso de acoplamiento, se han aislado membranas de músculo, principalmente de mamíferos. Sin embargo, debido a que la gran mayoría de los estudios electrofisiológicos del acoplamiento excitación-contracción se han realizado en músculo de rana, nuestro laboratorio ha desarrollado métodos para obtener fracciones purificadas de músculo esquelético de este anfibio. Mediante fraccionamiento por centrifugación diferencial y separaciones en gradientes de densidad, hemos obtenido tres tipos diferentes de preparaciones de membranas de músculo esquelético: membranas altamente purificadas de retículo sarcoplasmático y de túbulos transversales, y una fracción parcialmente purificada de membranas de superficie. Para establecer el origen y la pureza de nuestras preparaciones de membranas, hemos usado una variedad de marcadores estructurales y enzimáticos y la presencia de diferentes tipos de receptores.

Recientemente hemos logrado demostrar que las membranas de túbulos transversales contienen el sistema enzimático responsable de fosforilación de fosfatidil inositol a la forma monofosforilada y difosforilada, precursores, respectivamente, de los compuestos solubles inositol difosfato y trifosfato. Estos estudios indican que al menos una parte del ciclo de síntesis del inositol trifosfato está presente en las membranas aisladas, lo que es un requisito indispensable para sustanciar un papel de este compuesto en el acoplamiento excitación-contracción en músculo esquelético.



## Simposio

### FISIOLOGIA DE LAS PLANTAS A CONDICIONES ADVERSAS

Coordinador: L. Cardemil

**FRUCTANOS: UN SISTEMA PARA ESTUDIAR LA RESPUESTA DE PLANTAS A FENOMENOS AMBIENTALES.** (*Fructans: A system to study plant response to environment phenomena*).

*Pontis G., Horacio.* Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Los fructanos son polímeros de fructosa ampliamente distribuidos en el reino vegetal. No sólo se los encuentra en mono y dicotiledóneas, sino también en algas verdes. Los fructanos son considerados como otro tipo de polisacárido de reserva, pero podrían jugar también el rol de "buffers osmóticos", ya que las plantas donde se los encuentra son en general especies capaces de soportar durante su ciclo de vida períodos de frío o sequía, y en ellos es cuando la actividad osmótica de los fructanos podría atemperar los efectos de enfriamientos, congelación y desecación. En consecuencia, pueden constituir un sistema adecuado para estudiar las reacciones de las plantas a fenómenos ambientales a nivel bioquímico.

Hay numerosos estudios que indican que las plantas forrajeras provenientes de climas fríos y templados reaccionan acumulando fructanos cuando son expuestas a bajas temperaturas (5°C). La iniciación de la acumulación de fructanos ha sido seguida midiendo la actividad de la enzima sacarosa: sacarosa fructosil transferasa (SST), la cual ha sido demostrado que aumenta su nivel cuando las plantas han sido sometidas a un shock de frío. Se podría pensar, por lo tanto, que la medición de sacarosa: sacarosa fructosil transferasa (SST) podría ser utilizada para estudiar el mecanismo por medio del cual las plantas forrajeras responden a un cambio brusco de temperatura. Sin embargo se ha demostrado que en tubérculos de Topinambur (*Helianthus tuberosus*) y en hojas de lechuga (*Lactuca sativa*)

la actividad de sacarosa: sacarosa fructosil transferasa (SST) es inducida cuando el nivel de sacarosa alcanza un cierto valor. No existen evidencias directas sobre la existencia de un mecanismo similar en las plantas forrajeras, pero una de las respuestas que se observan a un brusco enfriamiento (25° - 5°C) es la acumulación inmediata de sacarosa. Es válido, por lo tanto, preguntarse si las enzimas que metabolizan sacarosa están en alguna forma vinculadas a la respuesta de las plantas a un shock de frío.

Para tratar de responder a esta pregunta se han realizado experimentos con plantas de trigo (*Triticum aestivum*), crecidas a 25°C. Luego de 17 días en ese régimen de temperatura fueron transferidas a una cámara a 4°, manteniendo las condiciones de iluminación exactamente iguales. El cambio brusco de temperatura produjo dentro de la hora un aumento en el nivel de sacarosa en las hojas, mientras que los fructanos sólo comenzaron a incrementarse a las 18 horas de transferidos a la baja temperatura. Como se ha demostrado que el proceso fotosintético en general es menos sensible a un cambio de temperatura en las plantas forrajeras que los procesos que controlan el crecimiento, el incremento de sacarosa y la subsecuente iniciación de la acumulación de fructanos podría interpretarse como una rápida alteración del balance entre la asimilación o fijación del carbono y su utilización. Si este fuera el caso, debería reflejarse en las actividades de las enzimas vinculadas a estos procesos.

La medición de las actividades de sacarosa sintasa, sacarosa fosfato sintasa, UDP-Glucosa pirofosforilasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa citoplasmática, UDPasa e invertasa, ha mostrado que la única enzima donde se nota un cambio y aumento de actividad dentro de la hora de producirse el shock de frío es la sacarosa sintasa. Esta observación estaría de acuerdo con la hipótesis original

sobre la acumulación de sacarosa provocada por una disminución de la demanda. Pero al mismo tiempo plantea la paradoja que la enzima aceptada como la responsable de la síntesis de sacarosa (sacarosa fosfato sintasa) no modifica su actividad a lo largo del shock de frío, y si en cambio la enzima sacarosa sintasa, aceptada usualmente como la responsable del clivaje de sacarosa.

Esta aparente contradicción podría explicarse si a la sacarosa sintasa se la asigna un rol conectado con el transporte de sacarosa producida por la fotosíntesis, estando, por lo tanto, su rol vinculado a la regulación entre la oferta y demanda de sacarosa.

**RESISTENCIA AL FRIO EN ESPECIES VEGETALES LEÑOSAS DEL SUR DE CHILE. (Cold hardiness in woody plants of Southern Chile).**

*Alberdi L., Miren.* Instituto de Botánica, Universidad Austral de Chile, Casilla 567 Valdivia.

Las bajas temperaturas ejercen un papel importante en la vida de las plantas. Estas influyen sobre su crecimiento y desarrollo, a la vez que determinan en gran medida su distribución geográfica. La capacidad de sobrevivencia de un vegetal, en un determinado hábitat depende en alto grado de su capacidad de resistir al frío. Esta propiedad es específica y puede variar de acuerdo a la edad, al grado de desarrollo y a los estímulos ambientales. En algunas plantas, el incremento de la resistencia al frío se asocia con la acumulación de ciertos metabolitos, entre otros, carbohidratos y aminoácidos, a los que se ha conferido un rol crioprotector. En este trabajo se informa sobre el curso estacional de la resistencia al frío en diferentes órganos de especies leñosas frecuentes en comunidades boscosas del sur de Chile presentes en un gradiente altitudinal (9m a 1040 m.s.n.m.). Como medida de resistencia se utilizaron las temperaturas capaces de dañar el 50% del tejido analizado ( $TL_{50}$ ). Adicionalmente se entrega información sobre la relación existente entre el grado de resistencia foliar de *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst. y la acumulación de algunos carbohidratos (sacaro-

sa, rafinosa, glucosa, etc.), y aminoácidos, en diferentes estados de su desarrollo.

Las especies investigadas presentaron una mayor resistencia al frío en invierno y una menor en primavera y verano. Las especies provenientes de mayor altitud fueron generalmente más resistentes que las ubicadas a menor altura. Etapas iniciales del desarrollo (germinación), fueron muy sensibles al frío. Las plántulas resistieron temperaturas más bajas que los individuos adultos. En *N. dombeyi* la mayor resistencia invernal se asoció con mayores niveles de carbohidratos y prolina libre en las hojas. Estos fueron también más altos en hojas de plántulas, dotadas de mayor resistencia, que en hojas de individuos adultos más sensibles.

Se concluye que las especies que se desarrollan bajo condiciones microclimáticas más adversas, poseen un mayor grado de resistencia invernal que las provenientes de hábitat más benignos. A menudo una mayor resistencia invernal se asoció con una distribución geográfica más austral de las especies. Con respecto a la acumulación de sustancias crioprotectoras en *N. dombeyi*, en el período de mayor tolerancia de frío, se plantea la interrogante de si este es un factor acompañante o determinante de esta propiedad. Además, se da a conocer la presencia de bacterias epifíticas nucleantes de hielo en hojas de esta especie.

Proyectos 1212/84 Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico y S-83-19 DIUACH.

**RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A DAÑO TERMICO Y MECANICO. (Plant Resistance to Heat Shock and Injury).**

*Cardemil, Liliana.* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago.

*Prosopis tamarugo* es un árbol de crecimiento rápido que fija nitrógeno, mientras que *Araucaria araucana* es de crecimiento lento y produce celulosa. *Prosopis tamarugo* está bien adaptado a regiones áridas y calurosas, mientras que *Araucaria araucana* está adaptada a regiones de alta montaña y a temperaturas templadas frías. Semillas y plántulas de *Prosopis tamarugo* soportan diferencias de temperatura hasta de 20°C entre día y noche e invierno y verano. Las semillas pue-

den germinar a 45°C regadas con agua de mar y las plántulas y árboles jóvenes crecen a una velocidad normal y fijan nitrógeno regadas con agua que es 65% agua de mar (resistencia a alta salinidad). Con respecto a *Araucaria araucana*, semillas después de su dispersión son cubiertas por la nieve o inmediatamente después de iniciada la germinación. Sólo en primavera, cuando la nieve se funde, el crecimiento y desarrollo de las plántulas es reiniciado. Muchas adaptaciones fisiológicas de este árbol son temperatura dependiente.

Las plantas responden a situaciones extremas de temperatura sintetizando nuevas proteínas, cuya presencia puede detectarse por electroforesis en geles o por cuantificación de RNA mensajero por técnicas de hibridación de Northern Blot. También responden a situaciones de injuria mecánica sintetizando 10 veces el nivel normal de la proteína de pared celular.

Se propone, utilizando estas dos especies de árboles chilenos, probar la hipótesis de que "árboles nativos están mejor adaptados a su medio ambiente natural, porque en ellos existe un alto grado de expresión molecular de los genes que funcionan en tolerancia térmica y en resistencia al daño mecánico". El alto grado de expresión puede deberse a mecanismos de regulación de la función del gen o a una mayor cantidad de genes de resistencia presente en el individuo. Técnicas de Biología molecular permiten dilucidar entre estas dos alternativas y también realizar una selección rápida de individuos de alta resistencia. Esta selección puede conducir al aislamiento de los genes de resistencia, clonarlos y por manipulación genética introducirlos en otras especies susceptibles.

Proyecto B1580/8545, Universidad de Chile.

**EFFECTO DE PRODUCTOS NATURALES EN LA RESISTENCIA DE PLANTAS A INSECTOS.**  
(Effect of natural products in the resistance of plants to insects).

*Corcuera, Luis J.* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago.

La sobrevivencia de las plantas depende, entre otros factores, de la existencia de mecanismos que evitan o disminuyen el daño causado por patógenos e insectos. En algunos casos, la resistencia de plantas está determinada por la presencia de productos naturales en la planta que causan efectos deletéreos al insecto. En este trabajo se discutirá el papel de varios metabolitos secundarios en las interacciones entre gramíneas e insectos.

La resistencia de la cebada a los áfidos *Schizaphis graminum* y *Rhopalosiphum padi* y al lepidóptero *Heliothis zea* está parcialmente determinada por la presencia del alcaloide indólico gramina. Este compuesto causa efectos tóxicos en los insectos y disminuye su alimentación, pues es repelente. En el caso del trigo, centeno y maíz, el principal factor de resistencia es el grupo de ácidos hidroxámicos.

Factores ambientales adversos pueden modificar el contenido químico de la planta. Altas temperaturas pueden aumentar el contenido de gramina en las hojas de la cebada. Plantas sometidas a déficit hídrico, aunque no varían notoriamente su contenido de gramina o ácido didroxámico, pueden acumular otros compuestos. Uno de ellos, glicina-betaina, aumenta la reproducción de los áfidos alimentados con dietas artificiales. Esto podría explicar el aumento en susceptibilidad de la cebada a áfidos bajo condiciones de déficit hídrico.

Se concluye que en las gramíneas hay compuestos que pueden aumentar la resistencia de las plantas a los insectos, en tanto que hay otros que pueden aumentar la susceptibilidad. Además, condiciones ambientales pueden provocar variaciones en las concentraciones de estos compuestos y por tanto afectar la interacción planta-insecto.

(Proyecto N-1654 de la Universidad de Chile y N° 1035 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico).



## Simposio Internacional

### MOLECULAR APPROACHES TO THE STUDY OF EVOLUTION

Enfoques Moleculares al Estudio de la Evolución

Patrocinado por Programa CHI 84-003

Coordinador: *Tito Ureta*

#### MOLECULAR EVOLUTION: AN OVERVIEW.

(Evolución molecular: una visión general).

*Ureta, T.* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Following the development of methods for the elucidation of amino acid sequences of proteins and of base sequence of DNA, several questions about the biochemical mechanisms underlying the evolutionary process have become answerable, at least in principle. Some findings in the field of so-called *Molecular Evolution* will be reviewed, as follows:

1. Evolution at the protein level is characterized by the accumulation of point mutations which do not affect the function of the molecule; thus, they are neutral, or nearly so, to natural selection (non-darwinian evolution).

2. Proteins with the same function often show strong structural homology. Nonetheless, similarities in amino acid sequences can also be found when comparing functionally different proteins.

3. The rate of amino acid substitutions in a given protein is constant per year per site among different lineages, which suggest the operation of a molecular evolutionary clock.

4. Rates of nucleotide substitutions are higher for genes or part of genes which have less functional importance than more "important" genes or part of genes; in the latter the mutant products would be rejected by negative natural selection.

5. Conservative amino acid substitutions which are less disruptive of the structure, and presumably of the function of a protein, occur more often than radical replacements.

6. Most structural genes of eukaryotic cells are not strictly colinear with the proteins they specify, *i.e.*, the genes are split into coding (exons) and non-coding (introns) regions. Exons may code for discrete folding domains of a protein and may undergo rearrangements of several kinds resulting in new genes. In keeping with 4. above, introns of homologous genes show more nucleotide substitutions than the corresponding exons.

7. The emergence of new functions results frequently from gene duplication followed by stochastic point mutations, but also by mosaic fusion of parts from unrelated genes. The presence of non-coding DNA segments strikingly homologous to DNA coding for functional proteins, *i.e.*, pseudogenes, may be a source of genetic variability from which new functions may arise through evolutionary drift.

A few observations bearing on the points summarized above will be discussed (for reviews see 1-9).

#### REFERENCES

1. AYALA, F.J. (1984). Molecular polymorphism: how much is there and why there is so much? *Develop. Gen.* 4: 379-391.
2. BLAKE, C. (1983). Exons - present from the beginning? *Nature* 305: 535-637.
3. CRICK, F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science* 204: 264-271.
4. DOOLITTLE, R.F. (1985). The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends Biochem. Sci.* 10: 233-237.
5. KIMURA, M. (1982). The neutral theory as a basis for understanding the mechanism of evolution and variation at the molecular level. In M. Kimura, ed. *Molecular Evolution, Protein Polymorphism and the Neutral Theory*, pp. 3-56. Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer Verlag, Berlin.
6. KIMURA, M. & OHTA, T. (1974). On some principles governing molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 71: 2848-2852.
7. MILNER-WHITE, E.J. (1984). Isoenzymes, isoproteins and introns. *Trends Biochem. Sci.* 9: 517-519.

8. VANIN, E.F. (1984). Processed pseudogenes. Characteristics and evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 782: 231-241.
9. WILSON, A.C.; CARLSON, S.S. & WHITE, T.J. (1977). Biochemical evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 573-639.

**LONG-TERM SURVIVAL OF DNA AND THE RECOVERY OF DNA OF EXTINCT ORGANISMS. (Sobrevida a largo plazo del DNA y la recuperación de DNA de organismos extintos).**  
*Higuchi G., Russell and Wilson C., Allan.*  
 Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, CA 94720.

The new DNA technology has made it possible to recover small bits of genetic information from organismal remains. These techniques allow the determination of the surviving nucleotide sequence of these gene fragments. So far we have obtained DNA sequence information from the quagga, an extinct member of the horse family, out of DNA preserved in dried skin. We are currently trying to clone DNA of the woolly mammoth out of DNA preserved in a carcass frozen in Siberia for 40,000 years. Others have reported DNA preserved and clonable in human remains such as 2000 year-old Egyptian mummies.

The goals of these studies are to: (1) establish the length of time that DNA sequence information might survive and be recoverable from organismal remains and, (2) use this information to better establish the relationship between extinct and living forms. For example, we have used the DNA sequence information obtained from the extinct quagga to help establish its relationship to living horses and zebras, a matter of some recent controversy.

**'PHASMID' P4: ON THE EVOLUTION OF AN EXTRACHROMOSOMAL 'REGULATORY ELEMENT' WITH THE CAPACITY FOR LYTIC, LYSOGENIC AND PLASMID MODES OF PROPAGATION.**

*Lagos, Rosalba\* and Goldstein, Richard.*  
 Molecular Genetics & Epidemiology, Maxwell Finland Laboratory for Infectious Diseases, Boston University School of Medicine, 774 Albany St., Boston Ma. 02118.

In order to undergo lytic viral development, the 11.6 kb P4 DNA replicon requires 18 morphogenic and lysis functions of a helper phage such as P2. Despite this 'dependency', P4 is heteroimmune with respect to its helpers. Nonetheless, the P4 replicon maintains the genetic capacity to substantially alter expression of its heterologous helper since it can: (i) derepress an integrated copy of the helper (1); (ii) *transactivate* the 18 required genes of a helper under conditions where the helper genome is unable to turn on its own expression; (iii) redirect the virion capsid assembly pathway normally specified by helper-encoded genes such that smaller than normal helper size capsids are produced (2, 3). Such small capsids encapsidate the P4 genome though they are too small to completely encapsidate the helper genome. Hence, P4 'interferes' with the lytic development of its helper (4).

Ca. 40% of the P4 genome is 'nonessential' for helper-dependent lytic growth. Among the genes encoded in this region are the *int* gene and *att* site function required for site specific integration into the host chromosome. P4 appears to have an unusually broad host range since it has been found to both replicate within and integrate into the chromosome of *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Salmonella sp* and all other gram negative organisms surveyed (5).

In the absence of a 'helper' virus, the spontaneously occurring ( $10^{-4}$ ) mutant P4 *vir1* can propagate as a plasmid (5). During the initial plasmid 'establishment' period, when pP4 *vir1* is not maintained with great fidelity the host cell filaments and grows at a slowed rate. During the stable 'maintenance' stage which follows, only one P4-encoded gp is detected, and host cell morphology and growth rates are normal (6, 7). This stage of propagation is characterized by a chromosomally integrated 'mastercopy' of the P4 genome, essential for stable, plasmid maintenance. The integrated copy functions as a template to replenish extrachromosomal copy number (8).

Recent studies of pP4  $Km^r$  insertion and deletion mutants show that the 'mastercopy' may also perform the critical function of regulating gene expression of episomal copies. Plasmids unable to integrate express

gp's involved in lytic growth at high levels and are rapidly lost in the absence of antibiotic selection (6, 7). When maintained under selection, host growth slows and filamentation occurs. Such perturbation of plasmid: host commensalism results from antagonism of the essential host transcription termination factor rho by the P4-coded psu gp (8). Our studies indicate that the regulation of pP4 *vir1* expression is mediated by a *trans*-acting plasmid borne factor provided by the mastercopy and perhaps also by normal episomal copies. The region of P4 involved in this critical regulatory function appears to be that part of the P4 genome which is "nonessential" for helper-dependent lytic phage development.

\* Present address: Departamento de Biología, Universidad de Chile, Santiago.

#### REFERENCES

1. GEISSELSODER, DEHO; CHIDAMBARAM & GOLDSTEIN. (1981). *J. Mol. Biol.* 148: 1-19.
2. SHORE, DEHO, TSIPIS & GOLDSTEIN. (1978). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75: 400-404.
3. GEISSELSODER, CHIDAMBARAM & GOLDSTEIN. (1978). *J. Mol. Biol.* 126: 447-456.
4. DIANA, DEHO, GEISSELSODER & GOLDSTEIN. (1978). *J. Mol. Biol.* 126: 433-445.
5. GOLDSTEIN, SEDIVY & LJUNGQUIST. (1982). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79: 515-519.
6. KIM, LAGOS & GOLDSTEIN. 1985). *Cell*, submitted.
7. LAGOS & GOLDSTEIN. (1985). *J. Bacteriol.* 158: 208-215.
8. LAGOS, JIANG; KIM & GOLDSTEIN. (1985). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, submitted.

#### INTERNAL FACTORS IN EVOLUTION. (Factores internos en evolución).

Varela, F.J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

In this presentation I shall discuss how both evolutionary change and stasis in the presence of random mutational events might be due to constraining patterns arising out of the intricate dynamics present in genetic and cellular structures. Such patterns are global structural dispositions proper to the type of dynamics concerned, and not a result of selection or historical contingencies, an important insight of recent studies on dynamic self-organization (1).

Developmental constraints are one clear instance of such internal factors (2).

I shall discuss two fundamental kinds of emerging dynamical patterns: rhythmic cycles and bifurcation through increasing interconnectivity. These behaviors will be demonstrated in simple genetic networks, but the consequence are valid for more realistic cases. These two cases illustrate the kind of evidence for my main conclusion: even under strong selective conditions the statistical characteristic of a given genetic group will reflect to an important, and sometimes exclusive, degree the internal factor proper to its constitution. Thus selection plays here only the role of providing minimal external constraint to be satisfied, and not of directional force. This conclusion is in line with various other contemporary criticism of the established Darwinian-Mendelian evolutionary theory (3). Relative to a changing environment, evolutionary pathways resemble a continuous drift (4) guided by internal factors, rather than a progression of maximized adaptations (5).

#### REFERENCES

1. VARELA, F. (1982). Self-organization: beyond appearances and into the mechanism. In: P. Dumouchel and J.P. Dupuy, *L'Autoorganisation*, Eds du Seuil, Paris.
2. BONNER, J.T. (1981). *Evolution and Development*, Springer-Verlag, Berlin.
3. WAKE, D.B.; ROTH, G. and WAKE, M.G. (1983). On the problem of stasis in organismal evolution, *J. Theor. Biol.* 101: 211-224.
4. MATURANA, H. and VARELA, F. (1984). *El Arbol del Conocimiento*, Editorial Universitaria, Santiago.
5. GOULD, S.J. and LEWONTIN, R.C. (1979). The spandrels of San Marco and the panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme, *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 205: 581-598.

#### EVOLUTION AND THE STRUCTURAL DOMAINS OF PROTEINS. (Evolución y los dominios estructurales de las proteínas).

Babul, J. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile.

The study of the three dimensional structure of a large number of proteins has re-

vealed several levels of structural organization such as secondary structure, aggregates of secondary structure or supersecondary structure, and segments of the polypeptide that form independent globular regions or domains (1).

In any given environment the amino acid sequence is known to determine the native conformation of a protein, although a unique sequence is not necessary to obtain a particular folding or a homologous one. The genetic information contained in the primary structure has been modified naturally by mutation or experimentally with a variety of procedures without affecting the native conformation of the protein or its biological function. Natural selection has generated families of proteins with divergent sequences but with the same folding pattern and biological function, as in the case of cytochrome *c* (1).

Much attention has been given recently to structural and functional domains (2). The fact that structural domains are often found to be well separated in space, that differing domains within a protein might have different supersecondary structure, and that the same functional domain may be present in different proteins, has led to the proposal of their divergent evolution from a common ancestral structure. Probably the gene coding for this structure has been duplicated and fused with a variety of different genes, such as in the case of the nucleotide binding domain of several kinases and dehydrogenases (3).

On the other hand, it has been proposed that the short coding segments found in most genes of higher organisms (exons) might correspond to functional domains, since the interrupting segments of non-coding DNA (introns) tend to be located between discrete supersecondary elements. This suggests that genes evolved by combination of small protein coding units through gene rearrangements, gene duplication or both (4).

Evolutionary aspects related to an enzyme considered of importance in the regulation of glycolysis, namely phosphofructokinase, will also be presented. Comparison of the amino acid sequences of phosphofructokinases from *E. coli* (Pfk-1 isozyme), *B.*

*stearothermophilus*, and rabbit muscle (5, 6) suggests that the structure of this enzyme has been highly conserved during evolution. Nevertheless, the other isozyme from *E. coli* (Pfk-2), which unlike the mentioned phosphofructokinases does not exhibit sigmoidal kinetics with respect to fructose-6-P (7), does not present homologous features with either the bacterial or the mammalian enzymes (8), indicating a different evolutionary origin. On the other hand, a mutant of Pfk-2 which is not susceptible to inhibition by MgATP<sup>2-</sup> has been obtained (9). A minor change in structure (one or two amino acids) is responsible for the change in this regulatory property, and also for a change in the order of interaction of the substrates with the enzyme and the release of the products (10). The three dimensional structures of these enzymes are needed in order to have a better insight about the evolution of this important regulatory enzyme. (Supported by DIB, Universidad de Chile; Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico; PNUD-UNESCO CHI 81/001 and O.A.S.)

#### REFERENCES

- SCHULZ, G.E. and SCHIMMER, R.H. *Principles of Protein Structure*, Springer, New York, 1979.
- CHOTIA, C. (1984). Principles that determine the structure of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 537-572.
- ROSSMAN, M.G. and ARGOS, P. (1981). Protein folding. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 497-532.
- BAJAJ, M. and BLUNDELL, T. (1984). Evolution and the tertiary structure of protein. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13, 453-492.
- POORMAN, R.A.; RANDOLPH, A.; KEMP, R.G. and HEINRIKSON, R.L. (1984). Evolution of phosphofructokinase - gene duplication and creation of new effector sites. *Nature* 309, 467-469.
- HELLINGA, H.W. and EVANS, P.R. (1985). Nucleotide sequence and high level expression of the major *Escherichia coli* phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* 149, 363-373.
- BABUL, J. (1978). Phosphofructokinases from *Escherichia coli*. Purification and characterization of the nonallosteric isozyme. *J. Biol. Chem.* 253, 4350-4355.
- DALDAL, F. (1984). Nucleotide sequence of the gene *pfkB* encoding the minor phosphofructokinase of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 28, 337-342.
- GUIXE, V. and BABUL, J. (1985). Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for MgATP<sup>2-</sup>. *J. Biol. Chem.* 260, 11.001-11.005.



10. CAMPOS, G.; GUIXE, V. and BABUL, J. (1984). Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme with a different mechanism. *J. Biol. Chem.* 259, 6147-6152.

**FUNCTION, STRUCTURE AND EVOLUTION OF FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE. (Función, estructura y evolución de fructosa-1,6-bisfosfatasa.**

*Marcus, Frank; Rittenhouse, Judith; Gontero, Brigitte and Harrsch B., Peter.* Department of Biological Chemistry and Structure, University of Health Sciences/The Chicago Medical School, North Chicago, Illinois 60064, U.S.A.

Fructose-1,6-bisphosphatase (FbPase), which catalyzes the hydrolysis of fructose 1,6-bisphosphate to fructose 6-phosphate and inorganic phosphate, is an important regulatory enzyme in gluconeogenesis. The enzyme isolated from different sources is a tetramer composed of identical subunits of molecular weights ranging from 36,500 to 40,000 and a common feature of most fructose-1,6-bisphosphatases is its allosteric inhibition by AMP. The complete amino acid sequence of the enzymes from pig kidney cortex (1) and sheep liver (2) has been determined and the comparison of these two structures reveals 90% of sequence identity. The sequence information has permitted the identification of several reactive sites of functional and structural significance in FbPase. We have now continued structural and functional studies with other FbPases which have distinctive properties different from those of the mammalian enzyme. The enzymes include yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), spinach chloroplast, and *Escherichia coli* FbPase.

FbPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has properties similar to other gluconeogenic FbPases but an unusual characteristic of the yeast enzyme is that it can be phosphorylated *in vitro* by cyclic AMP-dependent protein kinase. Phosphorylation also occurs *in vivo*, presumably as part of a signalling mechanism for the enzyme's degradation (3). To probe the structural basis for the phosphorylation of yeast FbPase, purified FbPase was phospho-

rylated, digested with trypsin, and the resulting peptides were fractionated by reversed-phase HPLC. Automated Edman degradation of five of the purified non-phosphorylated peptides showed amino acid sequences highly homologous to mammalian FbPase. By contrast, the site of phosphorylation was located in a dissimilar NH<sub>2</sub>-terminal region which extends beyond the NH<sub>2</sub>-terminus of mammalian FbPases.

Chloroplast FbPase is an essential enzyme in the photosynthetic pathway of CO<sub>2</sub> fixation into sugars and the properties of this enzyme are clearly distinct from cytosolic gluconeogenic FbPases. Light-dependent activation via a ferredoxin/thioredoxin system and insensitivity to AMP inhibition are unique characteristics of the chloroplast enzyme (4). We have purified spinach chloroplast FbPase and the enzyme was reduced, S-carboxymethylated and cleaved with either cyanogen bromide or trypsin. The resulting peptides were purified by reversed-phase HPLC. Automated Edman degradation of some of the purified peptides showed amino acid sequences highly homologous to mammalian FbPase. These findings indicate a common evolutionary origin for gluconeogenic and chloroplast FbPase, enzymes catalyzing the same reaction but having different functions and modes of regulation.

Preliminary sequence data of FbPase from a procaryotic organism, *Escherichia coli*, shows that tryptic peptides from the *E. coli* enzyme can also be aligned within the amino acid sequence of mammalian FbPase, suggesting a common evolutionary origin for all fructose-1,6-bisphosphatases. (Supported by NIH Grants AM 21167 and 26564, and USDA Grant 83-CRCR-1-1299).

REFERENCES

- MARCUS, F.; EDELSTEIN, I.; REARDON, I. and HEINRIKSON, R.L. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7161-7165.
- FISHER, W.K. and THOMPSON, E.O.P. (1983). *Aust. J. Biol. Sci.* 36, 235-250.
- HOLZER, H. (1984). In *Enzyme regulation by reversible phosphorylation-further advances* (Cohen, P. ed.), pp. 143-154, Elsevier, Amsterdam.
- BUCHANAN, B.B. (1980). *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31, 341-374.

### REGULATORY PROPERTIES AND THE DEVELOPMENT OF STRUCTURE IN PHOSPHOFRUCTOKINASE.

*Hofer Hans, W.* Faculty of Biology, University of Konstanz P.O. Box 5560, D-7750 Konstanz, Fed. Republic of Germany.

Two metabolic pathways for the degradation of glucose 6-phosphate developed during phylogenesis: (i) oxidation followed by decarboxylation, and (ii) phosphorylation after isomerization to fructose 6-phosphate. The phosphate residue for the phosphorylation reaction is contributed by either ATP or pyrophosphate. This step, catalyzed by phosphofructokinase, is exergonic in various cells and organs and serves as one of the major control points of glycolysis. Allosteric regulation of phosphofructokinase is exerted by three different types of effectors: (1) inhibition by energy-rich compounds (ATP, phosphoenolpyruvate, phosphocreatine), (2) activation by the products of ATP hydrolysis ( $P_i$ , 5'-AMP ADP), and (3) activation by phosphorylated sugar derivatives (fructose 2,6-bisphosphate, glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate).

Phosphofructokinases from different sources exhibit considerable variation of their regulatory properties, ranging from unregulated Michaelis-Menten type kinetics to multiple allosteric regulation by more than 20 naturally occurring compounds. In addition, phosphofructokinases from prokaryotes have approximately half the molecular weight of those from eukaryotes. The amino acid sequence of rabbit muscle phosphofructokinase was recently elucidated by Poorman *et al.* (Nature 309 (1984), 467-469). They demonstrated a distinct homology between the N- and the C-terminal halves of the enzyme and also that both halves are similar to the phosphofructokinase from a prokaryote, *Bacillus stearothermophilus*. This enzyme is allosterically inhibited by phosphoenolpyruvate but not by ATP. However, immunologic data and sequence homologies indicate that phosphofructokinase from *B. stearothermophilus* is closely related to non-allosteric, as well as to ATP-inhibited, phosphofruc-

tokinase from lactobacteriaceae. Therefore, it appears phosphofructokinase structure has been highly conserved during evolution. Minor changes of its amino acids (within functionally important domains) apparently led to the expression of different allosteric properties which accommodate the functional requirements of energy metabolism for a given organism.

### THE EVOLUTION OF HEXOKINASE ISOZYMES. (Evolución de las isoenzimas de hexoquinasa).

*Ureta, T.; Radojković, J. y Preller, A.* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Hexose phosphorylation by ATP is accomplished in most organisms by enzymes which may be classified as sugar-specific kinases (glucokinase, fructokinase, mannokinase), or as hexose-kinases *sensu stricto* (ATP:D-hexose 6-phosphotransferases, EC 2.7.1.1), which are relatively unspecific for the natural hexoses (1). Enzymes presenting intermediate specificity (*e.g.* mannofructokinases) have been also described (2). The specific kinases are commonly found in microorganisms while the hexokinases are ubiquitous.

Enzymes catalyzing sugar phosphorylation in vertebrates are of the unspecific type. Four isozymes have been described and designated as HK-A, HK-B, HK-C and HK-D, each displaying characteristic features. Hexokinases A, B and C are monomers of 100,000 daltons and are allosterically inhibited by a product of the reaction, glucose-6-P. Hexokinase D, similarly to the fungal or bacterial kinases, is a monomer of 50,000 daltons and is not allosterically inhibited by glucose-6-P. The expression of the genes specifying those isozymes seems to be differentially regulated inasmuch as distinct isozymic patterns are observed in most animals, tissues, during development, or under various dietary or hormonal conditions (3, 4).

We will focus on two points of hexokinase evolution. The first refers to the origin of the isozymic system in vertebrates. Next to nothing is known thus far about

amino acid sequences of the hexokinase isozymes and therefore, current evolutionary speculations must rely on indirect structural comparison. Comparative immunological studies have been performed in a few cases which will be reviewed (5-7). These studies, in addition to quantitative comparisons of the available amino acid compositions (3, 6), allow the conclusion that the four hexokinases have a common origin early in vertebrate evolution. As a working hypothesis we will propose that a gene coding for a kinase of 50,000 daltons underwent duplication and fusion to produce a *hk* ancestral gene coding for a kinase of 100,000 daltons. After additional duplications, genes coding four hexokinases of 100,000 daltons appeared. One of the genes reverted to a shorter gene (*hk-D*) coding for hexokinase D (50,000 daltons) with loss of the glucose-6-P allosteric site (8).

The second point we will address is concerned with the degree of divergence of hexokinase A in mammals. Immunological studies, using conventional (7) as well as monoclonal (9) antibodies, will be presented as support of the hypothesis that vertebrate hexokinase isozymes accumulate amino acid substitutions at independent rates (7, 10). (Supported by grants from the Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile and from the Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología).

## REFERENCES

1. URETA, T.; RADOJKOVIC, J.; LAGOS, R.; GUIXE, V. & NUÑEZ, L. (1979). Phylogenetic and ontogenetic studies of glucose phosphorylating isozymes of vertebrates. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12: 587-604.
2. DEL VALLE, J.A. & ASENSIO, C. (1978). Distribution of adenosine-5'-triphosphate (ATP)-dependent hexose kinases in microorganisms. *BioSystems* 10: 265-282.
3. URETA, T. (1982). The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B: 549-555.
4. NIEMEYER, H.; URETA, T. & CLARK-TURRI, L. (1975). Adaptive character of liver glucokinase. *Mol. Cell. Biochem.* 6: 100-126.
5. LAWRENCE, G.M.; WALKER, D.G. & TRAYER, I.P. (1983). Antigenic cross-reactivities between mammalian hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta* 743: 219-225.
6. LAWRENCE, G.M. & TRAYER, I.P. (1984). Hexokinase isozymes: antigenic cross-reactivities and amino acid compositional relatedness. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 233-238.
7. NUÑEZ, L.; DE IOANNES, A. & URETA, T. (1985). Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes from vertebrates. VIII. Immunochemical studies on mammalian hexokinase A. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B: 247-254.
8. URETA, T.; LAZO, P.A. & SOLS, A. (1985). Allosteric inhibition of brain hexokinase by glucose 6-phosphate in the reverse reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 239: 315-319.
9. FINNEY, K.G.; MESSER, J.L.; DEWITT, D.L. & WILSON, J.E. (1984). Monoclonal antibodies against rat brain hexokinase. Effects on catalytic function and binding to the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 259: 8232-8237.
10. URETA, T.; SMITH, A.D. & WILSON, J.E. (1986). Hexokinase A from mammalian brain: comparative peptide mapping and immunological studies with monoclonal antibodies. *Submitted for publication.*