

EFECTO DEL MILDIU Y OTROS AGENTES EN LA ACTIVIDAD FENILALANINA AMONIACO LIASA (PAL) DE PLANTULAS DE GIRASOL

M. TENA ALDAVE Y R. LOPEZ VALBUENA *

Se ha publicado que *Plasmopara helianthi*, patógeno obligatorio causante del mildiu del girasol, produce cambios en el contenido de compuestos fenólicos de la planta huésped, aumentando la cantidad de escopoletina de la misma (Cohen e Ibrahim, 1975). En plantas la fenil alanina amoniaco liasa (PAL) es el primer enzima específico de la ruta biosintética de fenólicos, admitiéndose que constituye un centro primario de control de la misma (Creasy y Zucker, 1974). En muchos sistemas vegetales se ha comprobado que la actividad PAL se modifica notablemente en respuesta a la acción de una serie de factores tales como la iluminación, infección por patógenos, tratamiento con hormonas o con ciertos compuestos químicos, producción de heridas, etc., aunque las respuestas pueden variar totalmente cuando se comparan sistemas distintos (para una revisión reciente véase Camm y Towers, 1977).

En la presente comunicación se ha estudiado el carácter de mildiu como inductor del PAL de hipocotilos de girasol, para lo que se ha comparado su acción con la de otros posibles agentes inductores.

METODOLOGIA

La obtención de inóculo y producción de material vegetal infectado se hizo según Montes y Sackston (1974).

* Dpto. de Bioquímica, E.T.S. Ingenieros Agrónomos
Universidad de Córdoba, Córdoba (España)

Para la extracción y ensayo de la actividad PAL se siguió el procedimiento del Hyodo y Yang (1971).

RESULTADOS Y DISCUSION

Inducción de la actividad PAL

La incubación en suspensión acuosa de trozos (1 cm) de hipocotilos de plántulas de 7 días incrementó notablemente la actividad PAL de los mismos. La iluminación, véase tabla 1, afectó más a la persistencia del efecto que a la cuantía del mismo. Así mientras que el nivel de inducción en ensayos con luz solo llegó a superar en un 32% al obtenido en oscuridad (para 15 horas de incubación), en estos últimos ensayos se mantuvo por más tiempo la actividad PAL inducida.

TABLA 1

Efecto de la iluminación en la actividad PAL de hipocotilos (troceados a 1 cm) de plántulas de girasol (Peredovick) de 7 días.

Ensayo	Tiempo de incubación en presencia del agente estudiado (horas)								
	0	12	15	20	24	30	38	48	72
Luz (L)	7,67	17,90	20,21	19,44	20,97	23,53	17,39	13,81	8,18
Oscuridad (O)	7,67	16,11	15,35	15,86	17,90	20,97	15,35	17,39	15,86
Relación (L/O)	1,00	1,11	1,32	1,23	1,17	1,12	1,13	0,79	0,52

Actividades expresadas en $\mu\text{mol/g}$ peso seco/h. Valores medios de seis repeticiones.

En muchos sistemas vegetales se ha podido constatar que la producción de heridas o el simple troceado origina un incremento de la actividad PAL, a veces achacado a una sobreproducción endógena de etileno (Hyodo y Yang, 1971; Hyodo *et al.*, 1978). En nuestro caso hemos confirmado el efecto estimulante del corte, véase tabla 2. En estos ensayos se comprobó la siguiente secuencia en la cuantía de inducción de la actividad PAL:

TABLA 2

Efecto del corte en la actividad PAL de hipocotilos de plántulas de girasol (Peredovick) de 7 días

Ensayo	Tiempo de incubación en presencia del agente estudiado (horas)									
	20		24		30		48		72	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
Corte 1 cm	217	147	153	166	147	123	116	191	136	238
Corte 2 cm	170	150	103	148	125	100	120	177	155	142

Actividades expresadas como porcentajes de los valores obtenidos, a cada tiempo, en experiencias idénticas efectuadas con hipocotilos no troceados. Valores medios de tres repeticiones.

inducción de la actividad PAL: trozos de hipocotilos de 1 cm > trozos de 2 cm > hipocotilos enteros. La iluminación rebajó el tiempo de incubación necesario para la máxima inducción, pero solo tuvo un débil efecto en la magnitud de ésta.

La presencia de sacarosa (0.1 M) en el medio de incubación incrementó sensiblemente la actividad PAL inducida, véase tabla 3. Durante el período de 12 a 38 horas la luz ejerció un notable efecto sinérgico, aunque a las 48 horas de incubación los ensayos en oscuridad presentaron niveles superiores de actividad PAL. Este

TABLA 3

Efecto de la sacarosa y de la cicloheximida en la actividad PAL de hipocotilos (troceados a 1 cm) de plántulas de girasol (Peredovick) de 7 días.

Ensayo	Tiempo de incubación en presencia del agente estudiado (horas)											
	12		15		20		24		38		48	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
S	170	163	215	155	255	155	247	155	264	162	126	176
S + CH	28	61	52	71	20	46	23	66	4	31	1	33
S + S + CH	—	—	—	—	—	—	99	93	51	69	25	56

Actividades expresadas como porcentajes de los valores obtenidos, a cada tiempo, en experiencias idénticas efectuadas en ausencia de los factores estudiados (sacarosa y cicloheximida). Valores medios de tres a seis repeticiones.

último dato parece nuevamente indicar que la luz influencia la acción ejercida por el inductor en las reacciones de recambio del PAL, de forma que los efectos aparecen antes y tienden a ser menos persistentes. Hast ahora, que sepamos, solo se había descrito a la sacarosa como inductor del PAL en hojas (Zucker, 1969; Creasy *et al.*, 1974).

La experiencia anterior, realizada en presencia de cicloheximida ($10\mu\text{g/ml}$), condujo en ensayos con iluminación a una anulación, prácticamente completa tras 48 horas de incubación, de la actividad PAL inducida, tabla 3. La misma tendencia se apreció cuando muestras que se habían incubado 20 horas en sacarosa y luz se transfirieron a un medio de sacarosa y cicloheximida, aunque en este caso no se llegó a observar la desaparición completa de la actividad PAL, posiblemente debido al menor tiempo de actuación del antibiótico. Una represión de la inducción del PAL se constató igualmente en estudios idénticos a los anteriores pero efectuados en oscuridad, véase asimismo la tabla 3. Sin embargo, en estos ensayos se necesitaron tiempos superiores de exposición a la cicloheximida para conseguirse niveles de inhibición comparables a los obtenidos con luz, hecho que parece consistente con una mayor velocidad de degradación o inactivación del enzima en presencia de iluminación. En cualquier caso los resultados anteriores pueden considerarse indicativos de que, al igual que ocurre con otros sistemas (Zucker, 1969; Creasy *et al.*, 1974; Lamb, 1977), en el estudiado por nosotros la activación del PAL por los agentes inductores corte y sacarosa implica síntesis *de novo* del enzima.

La presencia de zoosporas (aprox. 70.000/ml.) de *P. helianthi* en el medio de incubación también condujo a un notable incremento de la actividad PAL. Sin embargo en este caso, véase tabla 4, la luz resultó prácticamente imprescindible para que se produjera la acción inductora.

Efecto del mildiu en los niveles y características del PAL endógeno

En concordancia con los estudios de inducción, se apreció mayor actividad PAL en hipocotilos de plántulas de girasol infectadas con mildiu, tanto de la variedad Peredovick (sensible) como de la línea HA-61 (resistente), tabla 5. Estos resultados están de acuerdo con la capacidad del patógeno de colonizar hipocotilos de plantas resistentes (Jiménez Díaz *et al.*, 1980).

TABLA 4

Efecto de las zoosporas de P. helianthi en la actividad PAL de hipocótilos (troceados a 1 cm) de plántulas de girasol (Peredovick) de 10 días.

Ensayo	Tiempo de incubación en presencia del agente estudiado (horas)									
	6		20		28		48		72	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
Zoosporas	171	74	134	146	130	91	284	61	267	84

Actividades expresadas como porcentajes de los valores obtenidos, a cada tiempo, en experiencias idénticas efectuadas en ausencia del factor estudiado. Valores medios de dos repeticiones.

TABLA 5

Actividad PAL de hipocótilos de plántulas, sanas (S) e inoculadas (I), de girasol (Peredovick y HA-61) de hasta 10 días.

Plántulas	Edad de las plántulas (días)								
	5			8			10		
	S	I	I:S	S	I	I:S	S	I	I:S
Peredovick	8,70	13,30	1,53	4,09	12,15	2,97	1,79	4,35	2,43
HA-61	9,20	28,14	3,06	3,58	9,71	2,71	1,02	1,02	1,00

Actividades expresadas en $\mu\text{mol/g}$ peso seco/h. Valores medios de tres repeticiones.

La actividad PAL extraída de hipocótilos de plántulas de 8 días de la variedad Peredovick, sanas e inoculadas, presentó idénticos valores de pH óptimo (entre 8,5 y 8,9) y temperatura de inactivación (entre 50 y 60°C). Sin embargo, las energías de activación (E_a) y las constantes de Michaelis del enzima de ambas fuentes fueron distintas. Así el PAL de plántulas sanas tuvo una E_a de $9.740 \text{ cal.mol}^{-1}$ y una K_m de 1,08 mM. Para el enzima de plántulas inoculadas se obtuvieron unos valores de $12.550 \text{ cal.mol}^{-1}$ y 0,79 mM, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- CAMM, E. L. and G. H. N. TOWERS, 1977. *Progress in Phytochemistry* (L. REINHOLD, J. B. HARBORNE and T. SWAIN, eds.) 4: 169-188. Pergamon Press, Oxford.
- COHEN, Y. and R. K. IBRAHIM, 1975. *Can. J. Bot.* 53: 2625-2630.
- CREASY, L. L. and M. ZUCKER, 1974. *Recent Advances in Phytochemistry* (V. C. Runeckles and E. E. Conn, eds.) 8: 1-9. Academic Press, New York.
- CREASY, L. L., M. ZUCKER and P. P. WONG. 1974. *Phytochemistry* 13: 2117-2124.
- HYODO, H. and S. F. YANG, 1971. *Plant Physiol.* 47: 765-770.
- HYODO, H., H. KURODA and S. F. YANG, 1978. *Plant Physiol.* 62: 31-35.
- JIMÉNEZ DÍAZ, R., J. M. MELERO, M. A. BLANCO and A. TRAPERO, 1980. *Comunicaciones INIA*, (en prensa).
- LAMB, C. J., 1977. *Planta.* 135: 169-173.
- MONTES, F. and W. E. SACKSTON, 1974. *Proc. 6th Int. Sunflower Conf.* pp. 623-629. Bucharest, Romania.
- ZUCKER, M., 1969. *Plant Physiol.* 44: 912-922.