

EFECTO DEL MILDIU EN LAS ACTIVIDADES PECTOLITICAS DE PLANTULAS DE GIRASOL

M. TENA ALDAVE; F. MONTES TUBIO; R. LOPEZ VALBUENA*

INTRODUCTION

La degradación de la pared celular del huésped por enzimas producidos o inducidos por el patógeno se ha considerado un fenómeno de tipo general (Albersheim *et al.*, 1969). sin embargo los conocimientos sobre este área se basan fundamentalmente en estudios sobre sistemas que implican a patógenos facultativos (Bateman y Basham, 1976). En la actualidad es muy poco lo que se sabe sobre el mecanismo bioquímico de la infección de girasol por el parásito obligatorio *Plasmopara helianthi* Novot., existiendo solamente algunos trabajos sobre la repercusión de la infección en los contenidos de IAA y fenólicos de la planta (Cohen y Sackston, 1974; Cohen e Ibrahim, 1975).

En la presente comunicación se han estudiado los efectos del mildiu en las actividades pectolíticas de plántulas de girasol. Los trabajos se han efectuado con una variedad susceptible (Peredovick) y una línea resistente (HA-61), a fin de no precisar no solo la implicación de estas enzimas en la bioquímica de la interacción patógeno-planta, sino su posible relación con los mecanismos de resistencia.

METODOLOGIA

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

Para la obtención de extractos con actividad poligalacturonasa (PG) y pectinasa (PMG) el material vegetal, o polvos de acetona derivados del mismo, se homogeneizó con una solución acuosa 5 mM de mercaptoetanol. Los extractos de actividad pectin metil este-

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

rasa (PME) se obtuvieron de forma similar, empleándose como extractante solución 0,1 N de NaCl. en forma similar, empleándose como extractante solución 0,1 de NaCl. En ambos casos los sobrenadantes se usaron directamente como fuente enzimática.

Las actividades PG y PMG se determinaron reductométricamente y viscosimétricamente por los métodos de la literatura (Nelson, 1974; Mullen y Bateman, Paynter y Jen, 1975)* expresándose en μmol de glucosa equivalente / mg prot/h y en unidades viscosimétricas relativa (URV)/ mg-prot , respectivamente. La utilización del ensayo del ácido tiobarbitúrico para la detección de actividades liasas (Ayers *et al.*, 1969) dio siempre resultados negativos. La actividad PME se determinó por los dos procedimientos descritos por Binet (1976).

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry *et al.* (1951).

RESULTADOS Y DISCUSION

Actividades Poligalacturonasas (PG) y Pectinasas (PMG)

Los extractos procedentes de hipocotilos de plántulas de la variedad Peredovic, sanas e inoculadas con mildiú, presentaron actividad PG (PGA y PPNa como sustratos) y PMG (pectina como sustrato).

TABLA 1
Actividades PG y PMG de plántulas de girasol (Peredovick) de 10 días, sanas e inoculadas con mildiú.

Actividad (pH óptimo)	Tipo de ensayo	Sustrato empleado	Plántulas	
			sanas	inoculadas
PG (5.2)	Reductométrico	PGA	1,23 (a)	2,30 (a)
PG (9.0)	"	"	0,80	2,70
PMG (5.2)	"	Pectina	1,72	2,14
PMG (9.0)	"	"	1,29	2,78
endo-Pg (5.2)	Viscosimétrico	PGA	62,26 (b)	11,79 (b)
endo-PG (9.0)	"	"	8,33	18,14
endo-PG (5.2)	"	PPNa	11,96	32,96
endo-PG (9.0)	"	"	20,59	38,59
endo-PMG (5.2)	"	Pectina	5,93	11,48
endo-PMG (9.0)	"	"	5,96	
endo-PMG (9.0)	"	"	5,96	15,31

(a) actividades expresadas en $\mu\text{mol/ml prot/h}$; (b) actividades expresadas en URV/ mg prot . Todos los valores son medias de tres repeticiones.

Los estudios efectuados a varios valores de pH indicaron la existencia de óptimos de actividad PG y PMG a pH 5,2 y 9,0. Los valores de actividades obtenidos, a los respectivos óptimos de pH, se muestran en la tabla 1.

En plantas sanas, los ensayos reductométricos indicaron niveles superiores de actividades PG y PMG ácidas (pH ópt. 5,2) que alcalinas (pH opt. 9,0). Sin embargo, se obtuvo lo contrario en los ensayos viscosimétricos. Esta discrepancia puede deberse a la coexistencia de enzimas de tipo endo y exo. Así, enzimas de tipo exo parecen ser los principales responsables de las actividades PG y PMG ácidas, mientras que las actividades alcalinas parecen debidas predominantemente a enzimas de tipo endo.

Los resultados de plantas inoculadas presentaron dos importantes diferencias en relación con los obtenidos con plantas sanas. Así, por un lado dichas plantas presentaron niveles superiores de actividades PG y PMG, tanto ácidas como alcalinas, mientras que estas últimas se revelaron predominantes tanto en los ensayos reductométricos como viscosimétricos. Estos hechos parecen indicar que el patógeno estimula la producción de enzimas endo-PG y endo-PMG tanto de pH óptimo 5,2 como 9,0.

Los ensayos viscosimétricos con PPNa dieron actividades superiores a los efectuados con PGA. Esta mayor especificidad de sustrato frente a PPNa es una propiedad característica de las endo-PG, debida aparentemente al mayor grado de polimerización de este producto (Ayers et al., 1969).

A fin de obtener una apreciación más completa de la influencia de la inoculación con mildiu en las actividades endo-PG y -PMG, se determinaron éstas en plantas sanas e inoculadas de diversas edades, tabla 2.

TABLA 2

Actividades endo-PG y endo-PMG de hipocótilos de plántulas, sanas (s) e inoculadas (I), de girasol (Peredovick) de hasta 10 días.

Actividad (pH óptimo)	Edad de las plántulas (días)								
	5			7			10		
	S	I	I:S	S	I	I:S	S	I	I:S
endo-PG (5,2)	1,35	6,26	4,64	3,05	7,11	2,33	6,26	11,79	1,88
endo-PG (9,0)	4,11	7,44	1,81	5,75	12,00	2,09	8,33	18,14	2,18
endo-PMG (5,2)	3,40	5,66	1,66	5,24	7,29	1,39	5,93	11,48	1,94
endo-PMG(9,0)	3,50	7,01	2,00	4,50	9,45	2,10	5,96	15,31	2,57

Actividades expresadas en UVR/mg prot. PGA como sustrato. Valores medios de tres repeticiones.

Estudios paralelos con la línea resistente HA-61, mostraron una respuesta a la inoculación muy similar a la descrita para Peredovick.

Actividad Pectin metilesterasa (PME)

Los extractos procedentes de hipocotilos de plántulas de Peredovich de 10 días presentaron actividad PME. Dicha actividad se incrementó con la concentración de NaCl presente en el medio de ensayo, siendo superior a pH 7.5 que a 6.0, tabla 3. Estos resultados están de acuerdo con los datos de la literatura. Así todas las PME de plantas estudiadas presentan pH óptimo básico (rango entre 7-9), siendo prácticamente general la acción estimulante ejercida por cationes mono y divalentes, especialmente Na(I) y Ca(II), (Rexová-Benkavá y Markovic, 1976).

Para algunas PME vegetales (Evans y McHale, 1968) se ha encontrado que la acción estimulante del NaCl va acompañada de una disminución del pH óptimo del enzima. En el caso de girasol la situación resultó enteramente similar, véase columnas de relación de actividades de la tabla 3.

TABLA 3

Influencia de la concentración de NaCl y del pH en la actividad PME de hipocotilos de plántulas de girasol (Peredovick) de 10 días

Concentración NaCl (M)	Actividad PME				Relación de actividades	
	pH inicial 7,5		pH inicial 6,0		PME ($\frac{\text{pHi } 6,0}{\text{pHi } 7,5}$)	
0	0,69 ^a	27,0 ^b	0,34 ^a	6,2 ^b	0,49 ^c	0,23 ^d
0.1	1,66	39,8	0,62	18,3	0,37	0,46
0.2	2,00	43,2	0,87	29,4	0,44	0,68
0.3	4,94	86,5	2,73	72,6	0,55	0,84

(a) Actividades expresadas en Δ pH (30 min.)/mg prot; (b) Idem en μ equiv/mg prot/h. (c) y (d) relación entre actividades expresadas según (a) y (b), respectivamente. Valores medios de tres repeticiones.

La inoculación con mildiu produjo un incremento sensible en la actividad PME. Sin embargo, véase tabla 4, las propiedades del enzima de plantas inoculadas fueron totalmente similares a las de

sanas. Este hecho parece indicativo de que la mayor actividad de plantas infectadas no es de procedencia fúngica, sino que es originada por el huésped.

TABLA 4

Influencia de la concentración de NaCl y del pH en la actividad PME de hipocotilos de plántulas de girasol (Peredovick) de 10 días, inoculadas con mildiu.

Concentración NaCl (M)	Actividad PME				Relación de actividades	
	pH inicial 7.5		pH inicial 6.0		PME ($\frac{\text{pHi } 6.0}{\text{pHi } 7.5}$)	
0	1,71 ^a	45,1 ^b	0,65 ^a	8,2 ^b	0,38 ^c	0,18 ^d
0.1	2,14	58,8	1,31	30,6	0,61	0,52
0.2	2,64	98,8	1,91	59,0	0,72	0,60
0.3	5,89	148,2	3,95	112,0	0,67	0,76

(a), (b), (c), (d) Véase tabla 3. Valores medios de tres repeticiones.

En estudios efectuados con la variedad resistente HA-61, se obtuvieron unas conclusiones prácticamente idénticas. Estos resultados, conjuntamente con los de actividades PG y PMG, muestran una similitud de respuesta frente al patógeno en hipocotilos de plántulas sensibles y resistentes. En consecuencia la estimulación de las actividades pectolíticas estudiadas se puede interpretar como un rasgo característico de la interacción huésped-parásito en el sistema investigado, no implicado en fenómenos de resistencia. Nuestras conclusiones confirman las obtenidas por Jiménez Díaz *et al.* (1980), quienes han demostrado la capacidad de *P. helianthi* de crecer y reproducirse en hipocotilos de plantas de girasol tanto sensibles como resistentes.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERSHEIM, P., T. M. JONES and P. D. ENGLIS, 1969. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7: 171-194.
- AYERS, W. A., G. C. PAPAIVIZAS and R. D. LUMSDEN, 1969. *Phytopathology*, 59: 925-930.

- BATEMAN, D. F. and H. G. BASHAM, 1976. *Physiological Plant Pathology* (R. Heitefuss and P. H. Williams, eds.) pp. 316-355. Springer-Verlag, Berlín.
- BINET, P, 1976. *Physiol. Vég.* 14: 283-295.
- COHEN, Y. and R. K. IBRAHIN, 1975. *Can. J. Bot.* 53: 2625-2630.
- COHEN, Y. and W. E. SACKSTON, 1974. *Can. J. Bot.* 52: 861-866.
- EVANS, R. and D. McHALE, 1968. *Phytochemistry.* 7: 1073-1075.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R., J. M. MELERO, M. A. BLANCO and A. TRAPERO, 1980. *Comunicaciones INIA* (en prensa).
- LOWRY, O. H., N. I. ROSEBROUGHT, A. L. FARR and R. J. RANDALL, 1951. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MONTES, F. and W. E. SACKSTON, 1974. *Proc. 6th Int. Sunflower Conf.* pp. 623-629. Bucharest, Romania.
- MULLEN, J. M. and D. F. BATEMAN, 1975. *Physiol. Plant Pathol.* 6: 233-246.
- NELSON, N., 1944. *J. Biol. Chem.*, 153: 375-380.
- PAYNTER, V. A. and J. J. JEN, 1975. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167: 219-231.
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L. and O. MARKOVIC, 1976. *Adv. Carbohydr Chem. Biochem.* 33: 323-385.