

Actividad fenilalanina-amonio liasa (PAL) inducida por el PECTIMORF® en protoplastos de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.).

Lianette Godoy del Pozo* y Esther Diosdado Salces**

*Grupo de Biotecnología Vegetal, Universidad Agraria de La Habana

**Departamento de Biología Vegetal, Universidad de La Habana

RESUMEN

Se estudió el efecto del PECTIMORF en la elicitación de la actividad enzimática fenilalanina-amonio liasa (PAL) en protoplastos del mesófilo de naranjo Agrio (*Citrus aurantium* L.). Luego del proceso de obtención y aislamiento de los protoplastos, fueron mantenidos en reposo durante 20 horas en medio Murashige-Skoog, 1962 (MS) sin PECTIMORF. Transcurrido este tiempo se añadió este oligopectato en 3 concentraciones diferentes (1, 10 y 100 mg/L) y se tomaron muestras a las 4, 8 y 12 horas, con las cuales fueron confeccionados los extractos para el cálculo de la actividad PAL. Los resultados indican que la concentración de 10 mg/L resulta la más eficaz en la elicitación de actividad PAL, donde se alcanza la máxima actividad, a las 8 horas de adicionado el elicitor en el medio de cultivo.

Palabras clave: actividad PAL, PECTIMORF, elicitación, oligopectato, protoplastos

ABSTRACT

It was studied PECTIMORF effects in elicitation of PAL enzymatic activity in mesophyll sour orange protoplasts. After isolation and harvesting, protoplasts were maintained in resting for 20 hours in Murashige-Skoog, 1962 (MS) medium without PECTIMORF. Finally, it was added this oligopectat in three different concentrations (1,10 and 100 mg/L) and were sample at 4, 8 and 12 hours, were done these samples for PAL activity determinations. The results indicated that 10 mg/L was the most efficient concentration as PAL activity elicitor with a maximum at 8 hours after the supplementation the elicitor in the culture medium.

Key word: PAL activity, PECTIMORF, elicitation, oligopectat, protoplasts

INTRODUCCIÓN

El PECTIMORF es una oligosacarina, que se obtiene en Cuba a partir de la degradación de la pectina de la corteza de los frutos de los cítricos (Cabrera *et al.*, 1995), cuyo efecto biológico como regulador del crecimiento, es evaluado en los medios de cultivo para la producción de vitroplantas, así como en experimentos con callos y embriones somáticos de diferentes especies vegetales, en múltiples laboratorios biotecnológicos de los centros de investigaciones cubanos (Diosdado, 1997).

Las oligosacarinas, son elicitores polisacáridos, que producen un aumento en las células de la actividad de la enzima PAL, que es la primera enzima de la vía fenilpropanoide, para la síntesis de fitoalexinas (Messiaen y Van Cutsem, 1994).

En los cítricos, uno de nuestros principales renglones de exportación que tiene gran demanda internacional, este compuesto ha sido efectivo para el desarrollo de embriones somáticos y en diferentes combinaciones con otras fitohormonas, estimula la formación de raíces o multiembriones (Redondo, 1995; Serrano, 1997). También ha sido evaluada su acción en el cultivo de óvulos, donde ha mostrado resultados positivos siendo potenciado su

efecto por la presencia del extracto de malta en el medio de cultivo (Docgo, 1996).

Los programas de mejoramiento genético en los cítricos, están basados fundamentalmente en técnicas biotecnológicas producto de las limitaciones que presenta su mejora tradicional. La hibridación somática es muy empleada en los cítricos con estos fines, pues la utilización de los protoplastos abre una vía para la manipulación genética de este cultivo (Vardi y Galun, 1989).

Por esta razón nos propusimos como objetivo en este trabajo, evaluar la actividad PAL en protoplastos tratados con PECTIMORF, como expresión del efecto de esta oligosacarina, en la inducción de la respuesta ante el estrés sufrido por los protoplastos durante su proceso de obtención.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron hojas de ramas jóvenes bien expandidas, que fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio 0.5% y Tween 80 0.1%, durante 20 minutos y sometidas a la acción de 2 mL de la mezcla enzimática, constituida por Manitol 0.6 M, Cloruro de Calcio (CaCl_2) 0.088 g/50 mL, Fosfato dibásico de sodio (NaH_2PO_4)

0.0095 g/50 mL, Morfolinoetanossulfónico (MES) 0.059 g/50 mL y las enzimas, Celulasa R-S 1%, Macerosima R-10 1% y Pectoliasa Y-23 0.2%.

El método utilizado para el aislamiento de los protoplastos, fue el de filtración-centrifugación (Diosdado, 1997).

Los protoplastos obtenidos se cultivaron en medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) con las concentraciones correspondientes de PECTIMORF (Tabla I), durante 4, 8 y 12 horas.

Se prepararon los extractos en cada intervalo de tiempo señalado en la tabla I y se realizó la medición de la actividad enzimática PAL según el procedimiento expuesto por Garbey (1997).

Para el análisis estadístico se procedió primero a realizar la Prueba de Normalidad por Kolmogorov-Smirnov y la de homogeneidad de varianza, por la Prueba de Bartlett.

Los datos se procesaron mediante un ANOVA Bifactorial, modelo de efectos fijos, donde se consideraron como factores las concentraciones y el tiempo. Las medias se compararon por la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Para todo el procesamiento estadístico se utilizó el paquete estadístico de TONYSTAT (Sigarra, 1985).

TABLA I

Tratamientos con PECTIMORF en protoplastos de mesófilo de naranjo agrio.

Tratamientos	PECTIMORF mg/L	Horas
1	-	4
2	1	4
3	10	4
4	100	4
5	-	8
6	1	8
7	10	8
8	100	8
9	-	12
10	1	12

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al diseñar este experimento tomando en cuenta el estrés que provoca en los protoplastos el tratamiento enzimático para su obtención, se dispuso un periodo de reposo de 20 horas luego del aislamiento, para permitir que las células superaran este estrés. Dicho procedimiento se basó en lo expuesto por De Lorenzo *et al.* (1987), los que comprobaron el carácter transiente de la inducción de la actividad PAL, en suspensiones celulares de *Daucus carota*, al disminuir esta a los niveles basales luego de 20 horas de contacto entre las células y el elicitor. Resultados

similares se han encontrado también en células de perejil (*Petroselinum hortense* Hoffman), tratadas con un elicitor proveniente de la pared celular de *Phytophthora megasperma* (Cervone *et al.*, 1986, citados por Garbey, 1997).

Sin embargo, a pesar de mantener los protoplastos durante 20 horas en medio de cultivo sin elicitor, se registró actividad enzimática en el control (Tabla II), lo cual puede estar dado porque en 20 horas no se hayan recuperado aún del estrés provocado en el proceso de obtención, o estos valores registrados pueden estar dados por las concentraciones basales endógenas de actividad PAL en estas células.

Al analizar la cinética de inducción de actividad PAL en el control, se observa que el valor más alto se registra a las 4 horas (primer tiempo de medición luego de añadido el elicitor en los tratamientos restantes). Este valor disminuye a las 8 horas y se mantiene constante luego de este momento, de manera que a las 12 horas presenta el mismo índice. Esto sugiere que el valor registrado a las 4 horas es debido al estrés producto del tratamiento enzimático, que aún no ha sido superado por las células en el periodo de 20 horas precedentes. Luego de 8 horas, el valor registrado es el correspondiente a los niveles basales de actividad enzimática.

En el análisis correspondiente al efecto de las diferentes concentraciones del elicitor, el valor mayor de actividad PAL fue registrado con PECTIMORF 10 mg/L en todos los tiempos de medición (Tabla II). El registro mayor de actividad enzimática pertenece a las 8 horas, con las tres concentraciones probadas.

TABLA II

Resultados de la Prueba de Duncan para la actividad PAL inducida a los diferentes tiempos.

Tiempo (h)	Media µg/hr. ml de enz.	Sig.
8	7.03	a
12	4.7443	b
4	4.629375	b

$$Sx=1.64^{***}$$

La cinética de inducción de actividad PAL, es similar para las tres concentraciones probadas y estos resultados coinciden con los publicados para suspensiones celulares de *Daucus carota* frente a oligómeros de a-D-galacturonidos (De Lorenzo *et al.*, 1987). Este mismo comportamiento fue observado por Garbey (1997) en callos de *Saccharum officinarum* L. por Valdés (1997) en suspensiones celulares de vicaria y soya, tratados con PECTIMORF y por Maule y Ride (1983) para

Triticum aestivum infectada por *Botrytis cinerea*.

Los resultados de la actividad PAL en protoplastos del mesófilo de las hojas de naranjo Agrio sugieren que la inducción de PAL en protoplastos, se manifiesta más rápidamente que en los demás materiales vegetales. Esto puede deberse a que las células en medio líquido están en contacto directo con el elicitador, lo que favorece una respuesta más rápida. En cambio, en medio sólido no todas las células están en contacto con el elicitador y esto hace que en ellos la actividad PAL se induzca de manera tardía (Diosdado, 1997); pero la causa fundamental de la diferencia de esta actividad entre los protoplastos y las suspensiones celulares (estando ambas en medio líquido), es la ausencia de pared celular, lo que pone a los protoplastos en contacto directo con el elicitador en su medio de cultivo ya que solo poseen la membrana plasmática y la acción del elicitador es aún más rápida en los protoplastos. El máximo de actividad en suspensiones celulares de vicaria y soya se alcanza a las 12 horas (Valdés, 1997) y solo a las 24 horas es que los niveles de esta actividad se acercan a los registrados a las 4 horas de nuestro trabajo; en cambio en protoplastos de naranjo Agrio, el máximo se alcanza a las 8 horas y a las 12 horas ya los valores son semejantes al de las 4 horas, lo cual evidencia lo antes expuesto.

CONCLUSIONES

- El PECTIMORF mostró ser un elicitador eficaz de la actividad PAL, en protoplastos del mesófilo de las hojas de *Citrus aurantium* L. a todas las concentraciones probadas, aunque la mayor elicitación se logró con 10 mg/L a las 8 horas de contacto de los protoplastos con el elicitador.

- La cinética de elicitación de actividad PAL en protoplastos de *Citrus aurantium* L. fue calificada de transiente y mucho más rápida con respecto a otros materiales vegetales de otros cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

Cabrera JC, Gutiérrez A, Falcón A, González S. 1995. Highly pure pectic acid bioactivity oligogalacturonides from *Citrus* peel. Compostela, España. 72 p.

De Lorenzo G, Ranucci A, Bellicampi D, Sali G, Cervone F. 1987. Elicitation of phenylalanine lyase in *Daucus carota* by oligogalacturonides released from sodium polypectate by homogeneous polygalacturonase. Plant Sci.. 51 : 147-150.

Diosdado E. 1997. Efecto de biorreguladores sobre el proceso de embriogénesis somática y el cultivo y fusión de protoplastos de naranjo Agrio (*Citrus aurantium* L.). Tesis de Doctorado. Fac. Biol. U.H. 120 p.

Docgo Ch M. 1996. Efecto de diferentes biorreguladores

sobre el desarrollo *in vitro* de *Citrus aurantium* L. Tesis de Diploma. Fac. Biol. U. H. 36 p.

Garbey P. 1997. Estudio del efecto del oligopectato DP> 12 en callos de *Saccharum officinarum* L. Tesis de Diploma. Fac. Biol. U.H. 43 p.

Maule AJ, Ride J P. 1983. Ammonio lyase and o-methyl transferase activities related to lignification in wheat leaves infected with *Botrytis cinerea*. Phytochemistry. 22 : 1113-1116.

Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologie Plantarium 15, 473-497.

Redondo AD. 1995. Embriogénesis somática en *Citrus aurantium* L. Tesis de Diploma. Fac. Biol. U.H. 30 p.

Serrano V. 1997. Efecto de diferentes biorreguladores sintéticos en el cultivo *in vitro* de embiones somáticos de naranjo Agrio (*Citrus aurantium* L.). Tesis de Diploma. Fac. Biol. U.H. 48 p.

Sigarroa A. 1985. Biometría y Diseño Experimental. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, 734 p.

Valdes B. 1997. Suspensiones celulares de *Catharantus roseus* (L.) G. Don y *Glicine max* (L.) Merr como modelos biológicos para probar biorreguladores sintéticos. Tesis de Diploma. Fac. Biol. U.H. 53 p.

Vardi A, Galun E. 1989. Isolation and culture of Citrus protoplasts. In : Biotechnologie in Agriculture and Forestry. Plant Protoplasts and Genetic Engineering II. 9: 146-159.

Recibido: 2 de mayo del 2001.

Direcc. de los autores: ** Grupo de Biotecnología Vegetal, Fac. de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana, Cuba. **Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado. Plaza 10400. Ciudad de La Habana, Cuba.