

Determinación de la actividad de la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) en muestras vegetales tratadas con Brotomax®

Determination of the activity of the enzyme Phenylalanine Ammonium Lyase (PAL) in plant samples treated with Brotomax®

Víctor Miguel Frías Martínez y Curro Romero Sierra

Departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación de Agrométodos S.A., Madrid, España; España, curroromero@agrometodos.com.

How to cite: Frías Martínez, V.M. y Romero Sierra, C. 2024. Determinación de la actividad de la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) en muestras vegetales tratadas con Brotomax®. En libro de actas: *II Congrés de la Tomata Valenciana. L'Autèntica*. València, 30 de maig de 2024. <https://doi.org/10.4995/TOMAVAL2024.2024.18665>

Abstract

Secondary metabolites in plants are organic molecules that fulfil non-essential but necessary functions. Among these, phenolic compounds or phenylpropanoids play a fundamental role. They are biochemically modulated and synthesised via two principal pathways, the shikimic acid pathway and, to a lesser extent, the malonic acid pathway.

The enzyme Phenylalanine Ammonium Lyase (PAL) is found in the shikimic acid pathway and is responsible for naturally synthesising polyphenols, phytoalexins and phytotoxins in plants. The results obtained by the Spanish National Research Council (CSIC) show how applying Brotomax® to a healthy grapevine plantation can increase the enzymatic activity of PAL in the leaves, with statistically significant differences compared to untreated or control plants. Better results are also obtained when the elicitor is applied via irrigation as opposed to foliar application.

Brotomax® does not directly provide the plant with phenolic compounds, instead it influences the biochemical modulation of these compounds and lets nature regulate and balance their action.

Keywords: *enzyme, phenylalanine ammonium lyase (PAL), Brotomax, phytoalexin, polyphenols, elicitor.*

Resumen

Los metabolitos secundarios de las plantas son moléculas orgánicas que cumplen funciones no esenciales, pero sí necesarias. Dentro de ellos ocupan un papel fundamental los componentes fenólicos o fenilpropanoides, los cuales son modulables bioquímicamente y sintetizados principalmente en dos rutas, la ruta del ácido shikímico y en menor medida en la ruta del ácido malónico.

La enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) se encuentra en la ruta del ácido shikímico y es la responsable de la síntesis de los polifenoles, fitoalexinas y fitotoxinas en las plantas de manera natural. Los resultados obtenidos en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) demuestran cómo la aplicación de Brotomax® en una plantación sana de uva de mesa, es capaz de incrementar la actividad enzimática de la PAL en hojas, existiendo diferencias estadísticas respecto al no tratado o testigo. También se obtienen mejores resultados cuando realizamos la aplicación vía riego de dicho elicitador en comparación a su aplicación vía foliar.

Brotomax® no aporta directamente los compuestos fenólicos a la planta, sino que incide en la modulación bioquímica de los mismos; y deja que la naturaleza regule y equilibre su acción.

Palabras clave: *enzima, fenilalanina amonio liasa (PAL), Brotomax, fitoalexina, polifenoles, elicitador.*

1. Introducción

Las plantas producen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son moléculas que están directamente relacionadas con funciones vitales de la planta, mientras que los secundarios son moléculas orgánicas que cumplen funciones no esenciales en la misma, tales como: mecanismos de defensa contra ataques de microorganismos patógenos, reconstruir y reforzar las paredes celulares, establecer el color de la flor y los frutos, contribuir sustancialmente a los sabores y olores, actuar de antioxidantes de células, atraer polinizadores, favorecer el cuajado, absorber la radiación UV, repelentes contra herbívoros, etc.

Dentro de los metabolitos secundarios de las plantas, ocupan un lugar preferente los polifenoles o fenilpropanoides, ampliamente distribuidos en el reino vegetal y modulables bioquímicamente. El contenido en polifenoles varía en cada planta dependiendo de la especie o variedad. Las investigaciones científicas avalan sus efectos fisiológicos positivos sobre la salud humana, en la prevención y tratamiento de enfermedades, y en la participación en la calidad de los alimentos.

La mayor parte de los compuestos fenólicos existentes son sintetizados en dos rutas metabólicas fundamentales en las plantas, la ruta del ácido shikímico y, en menor medida, en la ruta del

ácido malónico. El resultado de la ruta del ácido shikímico son los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triptófano y tirosina. La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina.

La enzima **fenilalanina amonio liasa (PAL)** es la responsable de la síntesis de polifenoles en las plantas y está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario. El aminoácido esencial fenilalanina parte del metabolismo primario de las plantas y entra en el metabolismo secundario cuando la enzima PAL cataliza la eliminación de un amonio convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico, precursor de fenoles simples como los ácidos cumárico y benzoico, y fenoles complejos como flavonoides, fitoalexinas, ligninas, suberinas, estilbenos, entre otros.

Las plantas se defienden de las infecciones causadas por patógenos mediante su propio sistema de defensa sintetizando unas sustancias conocidas como **fitoalexinas** (post – infección). Dichas sustancias son tóxicas para un amplio espectro de patógenos. Por el contrario, las llamadas toxinas pre-infeccionales son compuestos constitutivos de las plantas y están presentes en los tejidos sanos en distintas concentraciones con el objetivo de protegerlos de una posible infección, denominándose fitotoxinas. Ambas sustancias son sintetizadas por la PAL de forma natural, aunque existe un aumento considerable de dicha actividad cuando tenemos un daño potencial causado a la planta por un agente patógeno o una situación de estrés biótico o existe un mecanismo defensivo preventivo desencadenado por la aplicación de un producto elicitor.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio ha sido conocer, la incidencia de los tratamientos con **Brotomax®** sobre la actividad de la enzima PAL, responsable de la síntesis de polifenoles en las plantas y, entre otras funciones, favorecer la formación de lignina, prevenir la penetración de la infección en los tejidos vegetales, además de inducir la síntesis de flavonoides con propiedades antioxidantes, gracias a su capacidad de inhibir la producción de radicales libres.

3. Desarrollo de la innovación

La experiencia se realizó en una plantación comercial de uva de mesa (*Vitis vinífera*) negra sin pepita de la variedad “Melody®” de 6 años y marco de plantación de 3,50 x 2,90 m, en un parral bajo malla y plástico situado en la localidad de Hoya del Campo (Murcia). El sistema de riego se caracteriza por tener emisores cada 75 cm dentro de cada ramal y un caudal de 2- 4 L/Ha.

El diseño experimental fue de bloques al azar, con cuatro repeticiones por cada tratamiento o tesis (T1: Brotomax® vía riego a razón de 6 L/Ha; T2: Brotomax® vía foliar a razón de 3 L/Ha; T3: Testigo – No tratado) y cada bloque se dividió en tres subparcelas de 3,50 m x 39 m de largo (10 plantas/parcela).

Se realizaron las aplicaciones de la Tesis 1 (T1) vía riego y la Tesis 2 (T2) vía foliar el día 02/05/19 observándose un estado fenológico “J”, cuajado. Las condiciones climáticas fueron las típicas de la época y zona.

A los 21 días tras la aplicación se tomaron 24 hojas al azar por tratamiento y repetición, obteniendo finalmente una muestra homogénea de las distintas tesis o tratamientos realizados. Dichas muestras fueron transportadas en frío hasta el Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Sevilla (CSIC) - Instituto de la Grasa donde, tras ser recepcionadas, se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su análisis.

De cada muestra se utilizaron 4 g (por duplicado) para la obtención del extracto enzimático (Figura 1), realizándose cuatro medidas de cada uno de ellos. Los resultados se han expresado como la media aritmética \pm su desviación estándar en las distintas determinaciones.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

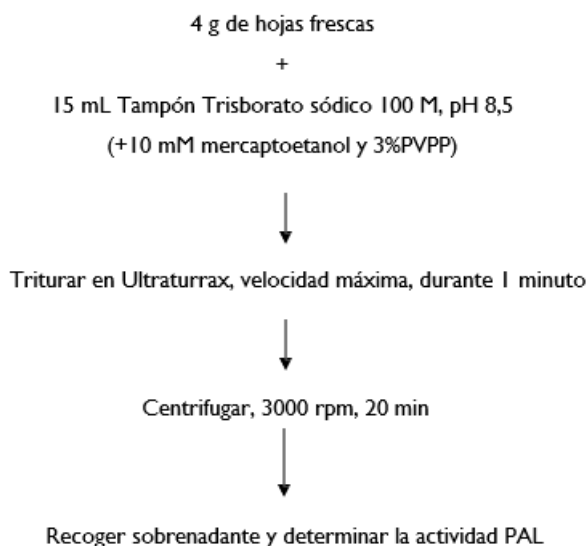


Figura 1. Protocolo para la obtención del extracto enzimático

Para la correcta determinación de dicha actividad enzimática lo primero que se necesita es la obtención de extractos que contengan las enzimas en su forma nativa, evitando las alteraciones de esta durante el proceso extractivo. Para ello, se ha utilizado una solución tampón, al pH

adecuado, y se han mantenido las muestras y reactivos a baja temperatura (baño de hielo y/o nitrógeno líquido) durante todas las etapas de obtención y purificación de los extractos.

Una vez obtenido los extractos correspondientes se sigue el protocolo que se describe a continuación (Figura 2) y que consiste en poner en contacto la enzima presente en el extracto con un sustrato específico, determinando a continuación en el espectrofotómetro y a la longitud de onda específica para cada reacción, el incremento o disminución de absorbancia que se produce como consecuencia de la acción de la enzima sobre el sustrato. Las unidades de la actividad de la enzima PAL se calculan en función de dichos cambios de absorbancia referidos a 1 g de material vegetal y por minuto.

DETERMINACIÓN ACTIVIDAD DE LA FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL)

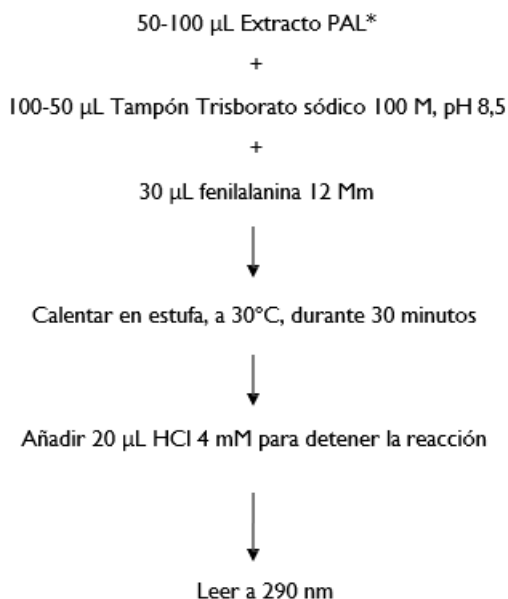


Figura 2. Esquema del protocolo realizado para la determinación de la actividad de la enzima PAL

4. Resultados

La acción del producto **Brotomax**[®] como elicitador ha sido demostrada en diversas especies de interés agrícola. En los cítricos, es bien conocida su acción estimulante en la biosíntesis de flavanonas y flavonas, así como de la expresión de la fitoalexina escoparona en frutos infectados

en tangelo Nova, produciéndose como consecuencia el incremento de resistencia frente al ataque por *Phytophthora*. En olivo, ha quedado establecida su influencia sobre la síntesis de compuestos fenólicos que incrementan el potencial antioxidante y antifúngico en diferentes variedades. En algodón, aumenta el contenido fenólico, clorofilas y producción de etileno, los cuales tienen una repercusión directa en el incremento de los mecanismos de defensa natural de las plantas de algodón frente a *F. oxysporum*. En viña, aumenta el contenido total de polifenoles en los diferentes órganos, así como la reducción de la obstrucción de vasos xilemáticos en los nuevos tallos y raíces formadas. También existen estudios referentes al aumento de la composición fenólica en hollejo, mosto y pepita. En fresa, se ha demostrado que se activan genes relacionados con las defensas de las plantas, induciendo a la producción de polifenoles y al aumento de la resistencia frente a *Colletotrichum acutatum*.

Todas estas investigaciones ponen de manifiesto que el producto **Brotomax®** aumenta los compuestos fenólicos, por lo que es interesante conocer si ese aumento de fenilpropanoides está relacionado con un aumento de la actividad enzimática de la PAL, enzima compleja y versátil entre cuyas funciones destaca la regulación del metabolismo de los compuestos fenólicos, tales como resveratrol, ligninas, suberinas y derivados del ácido cinámico, todos ellos relacionados con los mecanismos de defensa de las plantas.

En el estudio se ha realizado el análisis estadístico para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos o tesis para la actividad de la enzima PAL. Para ello se realizó un análisis de varianza con un factor (ANOVA), que dio como resultado el rechazo de la hipótesis nula de igualdad de medias de las tres tesis.

Se ha aplicado el test LSD (Least Significant Difference) de Fisher de comparaciones múltiples que nos ha permitido comparar las medias de las tres tesis entre sí. Como resultado se ha obtenido que existen diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$), siendo el tratamiento o Tesis 1 (T1) la que presenta mayor diferencia respecto al tratamiento o Tesis 3 (T3). Los resultados obtenidos se observan en la Figura 3.

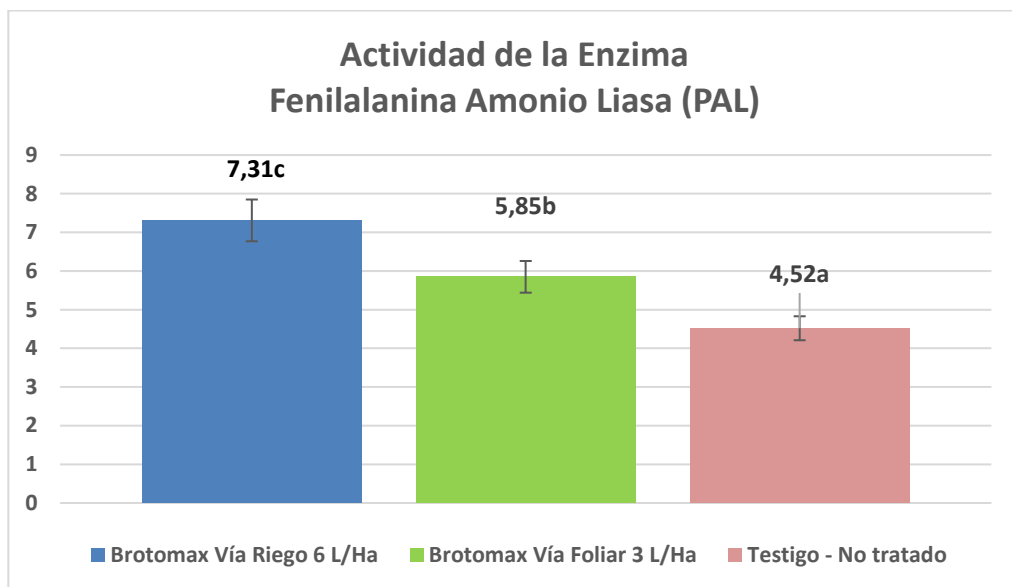


Figura 3. Datos medios de las distintas determinaciones de la actividad de la enzima PAL (incremento de absorbancia por gramo de material y por minuto) de las diferentes Tesis (T1, T2, T3)

Los resultados obtenidos revelan que el tratamiento o Tesis 1 (T1) realizado vía riego a razón de 6 L/Ha con **Brotomax**[®] obtiene mejores resultados frente al tratamiento o Tesis 2 (T2) aplicada vía foliar a razón de 3 L/Ha, aunque ambos tratamientos presentan una mayor actividad enzimática de la PAL respecto al no tratado o testigo (Tesis 3), existiendo diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

5. Conclusiones

Brotomax[®] es un elicitor capaz de incrementar considerablemente la actividad de la enzima PAL, existiendo una mayor actividad cuando realizamos en tratamiento vía riego.

Brotomax[®] no aporta directamente los polifenoles a la planta, sino que incide en la modulación bioquímica de los mismos, y deja que la naturaleza regule y equilibre su acción.

6. Referencias bibliográficas

- Alain-M., B. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol. Biochem.* 2000. 38: 81-96.
- Ávalos-García, A. y E. Pérez-Urria. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiol. Veg.* 2, 119-145.

- Berra, B., Caruso, D., Cortesi, N., Fedeli, E., Rasetti, M.F. y Galli, G. 1995. Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. *Rivista Italiana Sost Grasse*. 72, 285-291.
- Botía, J.M., Fuster, M.D., Porras I., García Lidón A., Sabater F., Ortuño A., Del Río J.A. 1995. Brotomax: un posible modulador de la expresión de flavonoides en cítricos. *Levante Agrícola* 34, 44-47.
- Botía, J.M., Fuster, M.D., Porras I., García Lidón A., Ortuño A., Lacasa A., Del Río J.A. 1997. Efecto de Brotomax sobre los procesos de resistencia en frutos de Tangelo Nova frente al ataque de *Phytophthora parasítica*. 1997. *Levante Agrícola*, 36, 67-68.
- Botía, M., Ortuño, O., Benavente-García, Báidez A.G., Frías J, Marcos, D., Del Río J.A. 2000. Efecto del Brotomax sobre el crecimiento, rendimiento en aceite y expresión de compuestos fenólicos en frutos de *Olea europea L.* (Variedad Picual y Villalonga). *Mercacei* 20-26/03, 16-19.
- Clifford MN. 2004. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med* 70, 1103-1114.
- Clifford, M.N., 1992. Sensory and dietary properties of phenols. *Proceeding of the 16th international conference of grape polyphenol*. 16 (11): 18-23.
- Dewick, P. M. 2002. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*: John Wiley & Sons.
- Del Río Conesa, J.A., Gómez López, P., González Báidez, A., Ortuño Tomás, A.M., García, G., Frías, V., Aguado, A. 2004. Mejora de la germinación, vigor y resistencia frente a infecciones por *Fusarium oxysporum* en plantas de algodón por tratamientos con Brotomax. *Phytoma* 157, 54-59.
- Del Río J.A., Ortuño A., Botía, J.M., Frías, V. 1998. Influencia del Brotomax sobre la síntesis de compuestos fenólicos y su relación con el potencial antifúngico y antioxidante en *Olea europaea*. *Phytoma* 102, 150 – 153.
- Dixon, R. A., Pavia, N. L. 1995. Stress- induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085- 1097
- Fuster, M.D., Porras I., García Lidón, A., Sabater, F., Ortuño, A., Del Río, J.A. 1994. Efecto del Brotomax sobre el crecimiento y producción de flavonoides en frutos de Tangelo Nova. *Levante Agrícola*, 33, 60-64.
- Fuster, M.D., García Puig, A., Porras I., García Lidón A., Sabater F., Botía, J.M., Ortuño A., Del Río J.A. 1995. Selection of citrics highly productive in secondary metabolites of industrial interest. Modulation of synthesis and/or accumulation processes. *Current Trends in Fruit and Vegetables Phytochemistry*, 81-85.
- Gutierrez, J.C. et al. 2000. Estudio del efecto de Brotomax sobre la tolerancia a *Verticillium dahliae* en el cultivo del algodón upland *Gossypium hirsitium L* en Andalucía. *Phytoma* 122, 144 -148.
- Jiang, F. y Dusing, G.J. 2003. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Current Vascular Pharmacology*. 1 (22), 135-156.

- Muñoz Blanco, J., Caballero J.L., Garrido Gala, J., Soliveri, J., Copa Patiño, J.L., Martínez Ros, J.M., Rodríguez Olmos, A., Frías, V., Perdices Hoyo, M. 2014. Natural elicitors of plant defense response in strawberry. *Journal of Berry Research* 4, 37 -45.
- Muñoz Blanco, J., Caballero J.L., Soliveri, J., Copa Patiño, J.L., Martínez Ros, J.M., Rodríguez Olmos, A., Frías, V., Perdices Hoyo, M. 2014. Natural elicitors of plant defense response in strawberry. *Freshuelva* 27.
- Posada Jaramillo, M., Pineda-Salinas, V. y Agudelo- Ochoa, G. M. 2003. Los antioxidantes de los alimentos y su relación con las enfermedades crónicas.
- Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A. The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutr. Hosp.* Vol 27 no 1, Madrid ene/feb.2012.
- Sija, S.L., Potty, V.P., Santhoshlal, P.S. 216. Detection of phenylalanine ammonia-lyase activity in different plant parts of *Anacardium occidentale* L. *Int J Pharm Bio Sci* 7(4), 100 – 104.
- Sirin, S., Bbaoglu, Aydas S., Aslim, B. 2006. Biochemical evaluation of Phenylalanine Ammonia Lyase from Endemic Plant *Cyathobasis fruticula* (Bunge) Aellen. For the Dietary Treatment of Phenylketonuria. *Food Technol. Biotechnol* 54 (3) 296–303.
- Sgarbi, E., Baroni Fornasiero, R., Paulini Lins, A., Medeghini Bonatti, P. 2003. Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Science* 165, 951-957.