



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**APROXIMACIÓN BIOQUÍMICA AL ESTUDIO
DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN
INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA DEL
CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) AL
PATÓGENO *Fusarium oxysporum* f. sp.
*dianthi***

Leidy Johana Vanegas Cano

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2019

**APROXIMACIÓN BIOQUÍMICA AL ESTUDIO
DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN
INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA DEL
CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) AL
PATÓGENO *Fusarium oxysporum* f. sp.
*dianthi***

Leidy Johana Vanegas Cano

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Bioquímica

Director:
Dr.Sc. Harold Duban Ardila Barrantes

Línea de Investigación:
Bioquímica de las interacciones hospedero-patógeno
Grupo de Investigación:
Estudio de actividades metabólicas vegetales

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de química
Bogotá D. C., Colombia

2019

A mí familia, mis papas y hermanos, quienes con sus consejos me ayudaron a culminar este capítulo de mi vida. Y a Andrés Herrera, quien supo alentarme en este proceso.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, que me ha complementado como profesional.

Al Departamento de Química, a su cuerpo docente y a todos los que hacen parte de él.

A Colciencias por la aprobación del proyecto identificado con el código 1100174558226.

A mi director de tesis profesor Harold Duban Ardila Barrantes por su orientación, paciencia, dedicación y, sobre todo, por el apoyo y las enseñanzas constantes durante todo este proceso.

A mis compañeros del grupo de investigación que hacen e hicieron parte de Laboratorio Estudio en Actividades Metabólicas vegetales, a Eliana Bustos, Fabiola Santos, Patricia Martínez, Santiago, Germán, Catalina. A todos gracias por hacer amenos los momentos frustrantes y difíciles, y por compartir y potenciar los buenos.

Al grupo de investigación Bio-orgánica perteneciente a la Universidad Militar Nueva Granada, por su apoyo en el préstamo de instalación y equipos.

Resumen

El marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) es la enfermedad que más afecta el cultivo de clavel. Comprender la naturaleza de la interacción entre la planta y el patógeno, puede ayudar a elucidar los mecanismos determinantes de la resistencia a la enfermedad. Es por ello que en la presente investigación se evaluó la acumulación de hormonas asociadas a las rutas de señalización del ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA), a nivel de simplasto durante la interacción clavel-Fod. Así mismo, se evaluaron algunas enzimas asociadas con la activación de dichas rutas; guayacol peroxidasa (GPX), polifenoloxidasas (PFO), lipoxigenasa (LOX), fenilalanina amonio liasa (PAL) y fosfolipasa D (PLD). Para ello, se seleccionaron condiciones experimentales para la extracción y determinación de cada una de estas enzimas a partir de simplasto de la planta. Posteriormente, para su evaluación en la interacción con el patógeno, se realizó un ensayo de inoculación usando dos variedades de clavel con niveles contrastantes de resistencia a la enfermedad: Golem (R) y Solex (S). Se determinó que a nivel de simplasto de raíz, se presenta una acumulación de las hormonas ácido salicílico (SA) y salicilato de metilo (MeSA), a los 1 y 2 días post-inoculación (dpi), respectivamente. Esta respuesta se relacionó con la inducción diferencial de la enzima GPX al 1 dpi en la variedad resistente, asociada al incremento en los niveles transcripcionales para un gen codificante para una GPX simplástica. A su vez el jasmonato de metilo (MeJA), presentó un aumento por efecto de la inoculación en tiempos tempranos y tardíos en los dos genotipos evaluados. Por otra parte, a nivel de tallo, a 1 dpi se presentó inducción de la actividad enzimática de GPX, PFO, PAL y PLD, indicando una respuesta multicomponente; asociada en el caso de la enzima GPX a un aumento a nivel transcripcional. Así mismo en este órgano se presentó un incremento de MeSA en los 1 y 14 dpi, mientras que SA se acumuló en tiempos tardíos; la acumulación de MeJA fue evidente a tiempos tempranos en ambos genotipos. Esta investigación evidencia por primera vez la complejidad de los procesos de señalización en la resistencia al marchitamiento vascular.

Palabras clave: *Dianthus caryophyllus*, ácido salicílico, ácido jasmónico, simplasto.

Abstract

Vascular wilting caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) is the most important disease affecting carnation crop. Understanding the biochemical nature of this interaction, could help to determine which mechanisms are determining the resistance to this disease. In the present investigation, the symplastic level of hormones in the signaling pathways of jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) during the carnation-Fod interaction were evaluated. Likewise, the activity of some enzymes associated with the activation of these pathways were assessed; guaiacol peroxidase (GPX), polyphenoloxidase (PFO), lipoxygenase (LOX), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and phospholipase D (PLD). To do that, experimental conditions were selected for the extraction and determination of each enzyme from the plant's symplast. Subsequently, an inoculation bioassay was carried out using two carnation cultivars presenting contrasting levels of resistance to the disease: Golem (R) and Solex (S). It was determined that at root symplastic level, SA and methyl salicylate (MeSA) were accumulated in early times (1 and 2 dpi). In the same way, MeJA accumulates at both, early and late times after inoculation. This response was associated to the differential induction of the GPX enzymatic activity at 1 dpi, which was related to the transcriptional levels increase shown for a gene coding for a symplastic GPX. On the other hand, at the stem level, at 1 dpi, induction of the enzymatic activity of GPX, PFO, PAL and PLD occurred, indicating a multicomponent response; associated in the case of the GPX enzyme to an increase at the transcriptional level. Likewise, in this organ an increase of MeSA was presented at 1 and 14 dpi, whereas SA accumulated in late times; the accumulation of MeJA was evident at early times in both genotypes. This investigation evidences for the first time the complexity of the signaling processes in resistance to vascular wilt.

Keywords: *Dianthus caryophyllus*, salicylic acid, jasmonic acid, symplast.

Tabla de Contenido

Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de gráficas	XV
Lista de tablas	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIX
Introducción	1
1. OBJETIVOS.....	5
1.1 OBJETIVO GENERAL	5
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	6
2.1 RECONOCIMIENTO Y SEÑALIZACIÓN EN INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO	6
2.2 VIAS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL.....	8
2.2.1 Ácido salicílico	9
2.2.2 Ácido jasmónico.....	11
2.3 DEFENSA VEGETAL DINÁMICA O INDUCIBLE	12
2.3.1 Guayacol peroxidasa (E.C.1.11.1.7)	13
2.3.2 Polifenoloxidasas (E.C. 1.14.18).....	15
2.3.3 Lipoxigenasa (E.C. 1.13.1.13).....	17
2.3.4 Fosfolipasa D (EC 3.1.4.4).....	18
2.3.5 Fenilalanina amonio liasa (E.C. 4.3.1.5)	19
2.4 SIMPLASTO.....	21
2.5 MODELO EXPERIMENTAL <i>Dianthus Caryophyllus</i> L. – <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> raza 2	22
2.5.1 Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.).....	22
2.5.2 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	23
2.5.3 Enfermedad Marchitamiento vascular.....	24
3. MATERIALES Y METODOS.....	26
3.1 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL	26
3.2 REMOCIÓN DE APOPLASTO Y OBTENCIÓN DE FRACCIÓN SIMPLASTICA A PARTIR DE TALLOS Y RAÍCES DE CLAVEL (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	27
3.3 SELECCIÓN DE CONDICIONES PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ENZIMAS A NIVEL DE SIMPLASTO	27
3.3.1 Selección de condiciones para la extracción de enzimas a partir de simplasto de raíz y tallo de clavel.....	27
3.3.2 Cuantificación de proteína	31
3.3.3 Selección de condiciones experimentales para la determinación de los niveles de actividad para las enzimas en estudio (GPX, PFO, LOX, PAL y PLD) en simplasto de tallos y raíces de clavel	31
3.4 EVALUACIÓN A NIVEL DE SIMPLASTO DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS DURANTE LA INOCULACIÓN CLAVEL (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> RAZA 2	32
3.4.1 Multiplicación del patógeno y preparación del inóculo	32

3.4.2	Ensayo <i>in vivo</i> y mantenimiento del material vegetal.....	33
3.4.3	Determinación de actividades enzimáticas de GPX, PFO, LOX, PAL y PLD durante la inoculación con el patógeno	34
3.4.4	Preparación de los extractos metabólicos en simplasto.....	34
3.4.5	Determinación del contenido total de fenoles en simplasto de raíz y tallo de clavel	35
3.4.6	Determinación de ácido salicílico, ácido jasmónico, salicilato de metilo y jasmonato de metilo en simplasto de raíz y tallo de clavel	35
3.5	EVALUACIÓN DE LOS NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE LAS ENZIMAS GPX Y PAL EN TALLOS Y RAICES DE CLAVEL USANDO RT-qPCR	36
3.5.1	Diseño de primers	37
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1	SELECCIÓN DE CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE SIMPLASTO A PARTIR DE RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL	39
4.2	SELECCIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN SIMPLASTO DE RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL	45
4.2.1	Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel	45
4.2.2	Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel	49
4.2.3	Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima LOX en simplasto de raíz y tallo de clavel	53
4.2.4	Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima PAL en simplasto de raíz y tallo de clavel.....	56
4.2.5	Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima PLD en simplasto de raíz y tallo de clavel.....	60
4.3	EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS GPX, PFO, LOX, PAL Y PLD, EN RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL DURANTE LA INTERACCIÓN CON <i>Fod</i>	63
4.3.1	Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en simplasto de raíz	64
4.3.2	Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en simplasto de tallo.....	71
4.4	NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE GENES CODIFICANTES PARA ENZIMAS SIMPLÁSTICAS PAL Y GPX, EN RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL DURANTE LA INTERACCIÓN CON <i>Fod</i>	79
4.4.1	Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en los niveles transcripcionales del gen <i>dca57541.1</i> codificante para una PAL simplástica en raíz de clavel	79
4.4.2	Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en los niveles transcripcionales de un gen codificante para una GPX simplástica en raíz de clavel	82
4.4.3	Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en los niveles transcripcionales del gen <i>dca57541.1</i> codificante para una PAL simplástica en tallo de clavel	84
4.4.4	Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en los niveles transcripcionales de un gen codificante para una GPX simplástica en tallo de clavel.....	86
4.5	EVALUACIÓN DE LOS NIVELES TOTALES DE FENOLES Y ACUMULACIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO Y ÁCIDO SALICÍLICO EN SIMPLASTO DE RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) DURANTE SU INTERACCIÓN CON EL PATÓGENO <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	88
4.5.1	Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en el contenido total de fenoles en simplasto a nivel de las raíces del clavel.....	89

4.5.2 Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en la concentración de hormonas asociadas a la resistencia vegetal en simplasto de raíz de clavel usando HPLC.....	91
4.5.3 Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en el contenido total de fenoles en simplasto a nivel del tallo del clavel.....	96
4.5.4 Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en la concentración de hormonas de señalización en simplasto de tallo de clavel	98
4.6 DISCUSIÓN GENERAL DEL PAPEL DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA DEL CLAVEL (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) AL PATÓGENO <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	102
Conclusiones	110
Recomendaciones	112

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Formación de tetraguaiacol a partir de la oxidación de guayacol catalizado por la enzima guayacol peroxidasa (GPX), empleando H ₂ O ₂ como co-sustrato.	15
Figura 2. Reacción de O-hidroxilación de monofenoles a O-quinonas catalizada por la enzima polifenoloxidasa.	16
Figura 3. Reacción de oxidación del sistema de dobles enlaces de un ácido graso insaturado, para dar lugar a hidroperóxido, catalizada por la enzima lipoxigenasa.	18
Figura 4. Reacción de hidrolisis del enlace ester para dar lugar a <i>p</i> -nitrofenol y fosforilcolina, catalizada por la enzima fosfolipasa D.....	19
Figura 5. Reacción de eliminación de un amonio por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) convirtiendo la fenilalanina en ácido <i>trans</i> -cinámico.	20
Figura 6 Flor de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	22
Figura 7. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	23
Figura 8. Diseño experimental del ensayo in vivo de variedades de clavel inoculadas con el patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> raza 2.....	34
Figura 9. Modelo de señalización que involucra las hormonas MeJA, MeSA, SA y las enzimas GPX, PFO, PAL y LOX en simplasto, propuesto para raíces de la variedad resistente (A) y susceptible (B) durante su interacción con Fod.	104
Figura 10. Modelo de señalización que involucra las hormonas MeJA, MeSA, SA y las enzimas GPX, PFO, PAL y PLD en simplasto, propuesto en para tallo de la variedad resistente y susceptible durante su interacción con Fod.	107

Lista de gráficas

	Pág.
Gráfica 1. Niveles de actividad de las enzimas A) GPX y B) PFO en simplasto de raíz y tallo de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) de los diferentes buffers de extracción empleados.....	41
Gráfica 2. Niveles de actividad de las enzimas A) PAL y B) LOX en simplasto de raíz y tallo de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) de los diferentes buffers de extracción empleados.....	43
Gráfica 3. Niveles de actividad de las enzimas PLD en simplasto de raíz y tallo de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) de los diferentes buffers de extracción empleados.	44
Gráfica 4. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel.	46
Gráfica 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel.	47
Gráfica 6. Efecto de la concentración de Guayacol sobre la actividad de GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel.	48
Gráfica 7. Representación Lineweaver-Burk de la actividad enzimática GPX en simplasto de tallos y raíces de clavel para el sustrato guayacol.	49
Gráfica 8. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel.	50
Gráfica 9. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel.	51
Gráfica 10. Efecto de la concentración de catecol sobre la actividad de PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel.	52
Gráfica 11. Representación Lineweaver-Burk de la actividad enzimática PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel para el sustrato catecol.	53
Gráfica 12. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel.	54
Gráfica 13. Efecto de la concentración de ácido linoleico sobre la actividad de LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel.	55
Gráfica 14. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel.	57
Gráfica 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel.	58

Gráfica 16. Efecto de la concentración de ácido linoleico sobre la actividad de LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel.....	58
Gráfica 17. Representación Lineweaver-Burk de la actividad enzimática PAL en simplasto de tallo y raíz de clavel para el sustrato Fenilalanina.	59
Gráfica 18. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima PLD en simplasto de tallo y raíz de clavel.	61
Gráfica 19. Efecto de la concentración de p-Nitrofenilfosforilcolina sobre la actividad de PLD en simplasto de tallo y raíz de clavel	62
Gráfica 20. Representación Lineweaver-Burk de la actividad enzimática PLD en simplasto de tallos y raíces de clavel para el sustrato p-Nitrofenilfosforilcolina.	63
Gráfica 21. Niveles de actividad GPX en simplasto de raíz, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	65
Gráfica 22. Niveles de actividad PFO en simplasto de raíz, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	67
Gráfica 23. Niveles de actividad LOX en simplasto de raíz, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	68
Gráfica 24. Niveles de actividad PAL en simplasto de raíz, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	69
Gráfica 25. Niveles de actividad PLD en simplasto de raíz, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas.....	70
Gráfica 26. Niveles de actividad GPX en simplasto de tallo, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	73
Gráfica 27. Niveles de actividad PFO en simplasto de tallo, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	75
Gráfica 28. Niveles de actividad LOX en simplasto de tallo, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	75
Gráfica 29. Niveles de actividad LOX en simplasto de tallo, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	77
Gráfica 30. Niveles de actividad PLD en simplasto de tallo, durante la interacción de <i>Fod</i> en las variedades Resistente y Susceptible.	78
Gráfica 31. Niveles de ARNm codificante para una PAL simplástica a nivel de raíz, durante la interacción con <i>Fod</i> en la variedad Resistente.	80
Gráfica 32. Niveles de ARNm codificante para una PAL simplástica a nivel de raíz, durante la interacción con <i>Fod</i> en la variedad Susceptible.....	81
Gráfica 33. Niveles de ARNm codificante para una GPX simplástica a nivel de raíz, durante la interacción con <i>Fod</i> en la variedad Resistente.	83
Gráfica 34. Niveles de ARNm codificante para una GPX simplástica a nivel de raíz, durante la interacción con <i>Fod</i> en la variedad Susceptible.....	84
Gráfica 35. Niveles de ARNm codificante para una PAL simplástica a nivel de tallo, durante la interacción con <i>Fod</i> en la variedad Resistente.....	86
Gráfica 36. Niveles de ARNm codificante para una PAL simplástica a nivel de tallo, durante la interacción con <i>Fod</i> en la variedad Susceptible.	86
Gráfica 37. Niveles de ARNm codificante para una GPX simplástica a nivel de tallo, durante la interacción con <i>Fod</i> en la variedad Resistente.....	87
Gráfica 38. Niveles de ARNm codificante para una GPX simplástica a nivel de tallo, durante la interacción con <i>Fod</i> en la variedad Susceptible.	88
Gráfica 39. Contenido total de fenoles en simplasto de raíz de clavel, durante la interacción con <i>Fod</i> en variedades Resistente y Susceptible.....	90

Gráfica 40. Perfil cromatográfico para extractos de simplasto obtenidos a partir de tallo de clavel: A) Variedad resistente (Golem), B) Variedad susceptible (Solex).....	92
Gráfica 41. Concentración de salicilato de metilo en simplasto de raíz de clavel, durante la interacción con <i>Fod</i> en variedades Resistente y Susceptible.....	93
Gráfica 42. Concentración de ácido salicílico en simplasto de raíz de clavel, durante la interacción con <i>Fod</i> en variedades Resistente y Susceptible.....	94
Gráfica 43. Concentración de jasmonato de metilo en simplasto de raíz de clavel, durante la interacción con <i>Fod</i> en variedades Resistente y Susceptible.....	95
Gráfica 44. Contenido total de fenoles en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con <i>Fod</i> en variedades Resistente y Susceptible.	97
Gráfica 45. Concentración de salicilato de metilo en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con <i>Fod</i> en variedades Resistente y Susceptible.....	99
Gráfica 46. Concentración de ácido salicílico en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con <i>Fod</i> en variedades Resistente y Susceptible.....	99
Gráfica 47. Concentración de jasmonato de metilo en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con <i>Fod</i> en variedades Resistente y Susceptible.....	101

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Tratamientos de extracción evaluados para la obtención de extractos enzimáticos enriquecidos de simplasto.	28
Tabla 2. Condiciones evaluadas para la determinación de las enzimas GPX, PFO, LOX, PAL y PLD.	31
Tabla 3. Lista de primers usados para la cuantificación por PCR en tiempo real de los niveles de mRNA para los genes codificantes para GPX y PAL.	38
Tabla 4. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel.	49
Tabla 5. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de PFO en simplasto de raíz y tallo de clavel.	53
Tabla 6. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de LOX en simplasto de raíz y tallo de clavel.	56
Tabla 7. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de PAL en simplasto de raíz y tallo de clavel.	59
Tabla 8. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de PLD en simplasto de raíz y tallo de clavel.	62

Lista de Símbolos y abreviaturas

Esta lista se incluye algunas abreviaciones en inglés teniendo en cuenta su continuo uso en la literatura especializada

Abreviatura	Término
ABA	Ácido absicico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AOS	Aleno oxido sintasa
BSA	Albumina de suero bovino
CDPK	Calcium-Depent Protein Kinases
DPI	Días post-inoculación
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
ET	Etileno
ETI	Inmunidad activada por efectores
Fod	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>
GPX	Guayacol peroxidasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HR	Respuesta hipersensible
JA	Ácido jasmónico
LOX	Lipoxigenasa
LRR	Repeticiones ricas en leucina
MAMPS	Damage-Associated Molecular Pattern
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MeJA	Jasmonato de metilo
MeSA	Salicilato de metilo
PA	Ácido fosfatídico
PAL	Fenilalanina amonio liasa

PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns
PDA	Agar papa-dextrosa
PFO	Polifenoloxidasas
PLD	Fosfolipasa D
PR	Pathogenesis-related protein
PRR	Pattern-Recognition Receptors
PTI	Inmunidad activada por PAMPS
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
qPCR	PCR cuantitativa
RT-qPCR	Transcripción reversa y posterior PCR cuantitativa
RLK	Kinase Like Receptor
RLP	Protein Like Receptor
RNA	Ácido ribonucleico
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
TGA	Factor de unión al elemento <i>cis</i> TGACG
WRKY	Tryptophan-Arginine-Lysine-Tyrosine

Introducción

La floricultura en Colombia es una de las actividades que más aporta a la economía del país generando importantes ingresos de divisas internacionales; el 95% de la producción total de flores cultivadas en nuestro país son exportadas a Estados Unidos, Japón y Rusia (Manrique, 2014). Para el año 2018, la exportación de flores cortada alcanzó los 1470 millones de dólares (DANE, 2018). Particularmente, el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) representa el 11.7% del total de la producción generada en 7532 hectáreas distribuidas principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y eje Cafetero (Asocolflores, 2018). Esto ha permitido que el 17% de las exportaciones en el mercado internacional del clavel provengan de nuestro país, posicionándolo como el segundo productor a nivel mundial después de Holanda (Asocolflores, 2018). Sin embargo, la producción del clavel y las ganancias generadas durante esta actividad, han disminuido debido al elevado costo que conlleva el manejo de enfermedades del tipo infeccioso, especialmente el marchitamiento vascular causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) (Soto, Pabón & Filguera, 2009).

Para el control del marchitamiento vascular, el sector floricultor ha desarrollado un plan de manejo integrado que se basa en prevenir la entrada y diseminación del patógeno, con medidas higiénicas que evitan la contaminación de esquejes sanos durante las etapas de propagación y producción. Este manejo, además de aumentar los costos en la producción genera un control apenas aceptable de la enfermedad, siendo frecuente en los cultivos (Pizano, 2000). Otras medidas implementadas, es el uso de variedades resistentes y métodos de control biológico (Arbeláez, 2000). Sin embargo, para llevar a cabo un desarrollo más eficiente de este tipo de alternativas es necesario desarrollar nuevas investigaciones que busquen elucidar la regulación de respuestas bioquímicas involucradas en la resistencia y/o susceptibilidad a la enfermedad.

Estudios realizados en diferentes especies vegetales han permitido determinar que la regulación de respuestas de defensa en plantas, puede involucrar distintas vías de

señalización. Dentro de estas se han identificado moléculas como el ácido salicílico (SA), algunas oxilipinas como jasmonato de metilo o ácido jasmónico (JA), el etileno (ET) y el ácido absicico (ABA) (Chaturvedi & Shah, 2007; Adie et al. 2007). El SA está asociado con resistencia a patógenos que exhiben una fase biotrófica en su ciclo de vida, así como con la activación de resistencia sistémica adquirida; esta última provee protección a un amplio espectro de patógenos, como bacterias, virus y hongos (Glazebrook, 2005; Díaz-Puentes, 2012). Por el contrario, patógenos necrotróficos que derivan sus nutrientes de células muertas del hospedero, son más sensibles a las defensas mediadas a JA/ET (Bari & Jones, 2009). La acumulación de estas hormonas favorece diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de las plantas, dentro de los que se destacan la acumulación de enzimas antioxidantes (Bari & Jones, 2009; Jaiti, Verdeil & Hadrami, 2009; Qi et al. 2012). En general se ha aceptado que estas rutas son antagónicas, siendo altamente reguladas en diferentes momentos de la interacción en función del estilo de vida que presenta el patógeno involucrado (Robert-Seilaniantz, Grant & Jones, 2011; Pieterse et al. 2012). Sin embargo, evidencia reciente ha demostrado que este tipo de repuestas son muy complejas y la posible sinergia de ambas rutas no puede ser descartada (Alazem & Lin, 2015; Ding, Yang, Yang, Cao & Zhou, 2016)

Diferentes investigaciones indican que cada una de las vías de señalización se ha especializado para mediar respuestas de defensa a tipos particulares de patógenos. En el caso de patógenos del género *Fusarium*, estas hormonas pueden contribuir en la respuesta de defensa dependiente de la especie vegetal parasitada y el patógeno específico involucrado. Por ejemplo, el caso del trigo (*Triticum aestivum*), la aplicación exógena de jasmonato de metilo, y ácido jasmónico y etileno, en plantas inoculadas con *Fusarium pseudograminearum* y *Fusarium graminearum* respectivamente, mostraron un aumento en la resistencia a estos patógenos. Por otro lado, la aspersion de SA y derivados del mismo, no tuvo un efecto significativo en la resistencia de la planta a estos mismos patógenos (Desmond et al. 2006; Li & Yen, 2008). En otros estudios, por el contrario, reportan que la aspersion de SA, tanto a nivel de raíz como en las hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*), disminuye el desarrollo del marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Mandal et al. 2008). Estos estudios muestran que la participación de estas hormonas en la resistencia a patógenos del género *Fusarium*, depende de manera específica del tipo de interacción planta-patógeno bajo estudio.

Como parte de la respuesta de defensa asociada a estas rutas de señalización, se ha determinado que estas hormonas favorecen la inducción de ciertas enzimas que están implicadas en la respuesta de defensa vegetal. Por ejemplo, se ha reportado en algunos modelos que, durante la infección, altos niveles de JA generan aumento en los niveles transcripcionales y de actividad de enzimas como guayacol peroxidasa (GPX), polifenoloxidasa (PFO) y lipoxigenasa (LOX) (Otha et al. 1991; Tejeda-Sartorius, Martínez-Gallardo, Olalde-Portugal & Délano-Frier, 2007; Jaiti et al. 2009). Por otro lado, la acumulación de SA ha sido asociada con mayor frecuencia a incrementos entre otras enzimas, como la fosfolipasa D (PLD) y la fenilalanina amonio liasa (PAL) (Kinke et al. 2009; Kalachova, Lakovenko, Kretinin & Kravets, 2013). Es por ello que la acumulación de las diferentes hormonas vegetales puede estar asociada en cada modelo planta-patógeno, al aumento de enzimas particulares que pueden jugar un papel importante en la regulación de la resistencia vegetal.

En el caso específico del modelo clavel-*Fod* se ha determinado que la actividad de PFO y POD, enzimas asociadas principalmente con la ruta ET/JA, aumenta en variedades resistentes infectadas con el patógeno. Sin embargo, en este mismo modelo, la infección con el patógeno puede tener también un efecto en los niveles de una enzima asociada con la acumulación de SA, como lo es la enzima PAL (Ardila, Martínez, & Higuera, 2011). Es por ello que en este modelo planta-patógeno, no se tiene claridad sobre las rutas de señalización involucradas en resistencia; eran necesarios estudios que permitieran relacionar de manera simultánea, tanto la acumulación de enzimas, como la de estas hormonas vegetales, así como con la resistencia a la enfermedad.

En la presente investigación, con el fin de aumentar el conocimiento sobre los fenómenos bioquímicos asociados con la resistencia en este modelo, se evaluaron de manera simultánea, algunas respuestas asociadas a la acumulación de enzimas y de hormonas vegetales a nivel de simplasto vegetal. Al ser el simplasto vegetal aquella fracción interna citoplasmática en donde se presentan los eventos más tempranos de transducción de señales a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, era de esperarse que se presentaran los cambios más tempranos para estos parámetros bioquímicos. Esta respuesta se realizó tanto a nivel del tallo, como a nivel de la raíz, con el fin de profundizar sobre la regulación espacio temporal de la respuesta y tener un panorama del sistema como un todo; sin

olvidar claro está, las especificidades propias que se presentan en cada órgano de la planta.

Los resultados de la presente investigación permitieron complementar estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación y demostraron que la respuesta de la planta es compleja y multicomponente, dependiente del tipo de interacción (compatible o incompatible) y del órgano objeto de estudio. Así mismo, permitieron por primera vez, determinar la relación existente entre algunas de las hormonas de señalización y ciertas enzimas propias de la defensa vegetal en este patosistema. Los resultados de la presente investigación han sido socializados de manera parcial en diferentes eventos a nivel nacional e internacional, como son a la fecha:

Inducción diferencial en el simplasto de actividades enzimáticas involucradas en la resistencia del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. III congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular. Bogotá (Colombia).

Evidencia bioquímica de la activación de la ruta que involucra MeSA en simplasto de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Noviembre 2018.; 33° Latin-American congress of Chemistry. La Habana (Cuba). Octubre 2018.

Así mismo, esta investigación esta enmarcada dentro de los proyectos que se realizan dentro del grupo de investigación y complementa de manera importante la información que sobre el modelo clavel-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* se tiene a la fecha; sin duda el conocimiento de los procesos básicos involucrados en las interacciones planta-patógeno, es insumo fundamental para el desarrollo de nuevas alternativas de control a las enfermedades de origen parasitario.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Aportar al estudio de las vías de señalización involucradas en la resistencia del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Seleccionar las condiciones de extracción y determinación de enzimas asociadas con las vías de señalización del ácido jasmónico y del ácido salicílico a partir de simplasto de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L)

Determinar la actividad de enzimas asociadas a las vías de señalización del ácido jasmónico (guayacol peroxidasa, polifenoloxidasas, lipoxigenasa) y del ácido salicílico (Fosfolipasa D, fenilalanina amonio liasa) en simplasto de tallos y raíces de clavel durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Evaluar los niveles totales de fenoles y acumulación de ácido jasmónico y ácido salicílico en simplasto de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Evaluar los niveles transcripcionales de aquellas enzimas asociadas a las rutas de señalización en estudio, que presentaron diferencias de actividad asociada con la resistencia del clavel al marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

2.1 RECONOCIMIENTO Y SEÑALIZACIÓN EN INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO

Las plantas están sujetas al ataque de una amplia variedad de patógenos microbianos e insectos herbívoros (Rangel, Castro, Beltrán, Reyes & García, 2010). Muchos de estos patógenos infectan a los tejidos de la planta, los colonizan y causan patologías que puede finalmente llevarlas a la muerte. Es por ello, que estas cuentan con barreras físicas y químicas preformadas, así como mecanismos inducibles que incluyen cambios moleculares, bioquímicos y morfológicos con el fin de limitar la propagación y eliminar al organismo invasor. Sin embargo, para ello se requiere un reconocimiento de la amenaza que constituye el patógeno y el desarrollo de un proceso defensivo específico en su contra. De esta manera, el reconocimiento contribuye para que las interacciones planta-microorganismo sean específicas y que una raza de patógeno determinado sea específico a una especie vegetal en particular. Del mismo modo limita el rango de patógenos a tan solo algunos de los fitopatógenos existentes, convierte a la enfermedad en la excepción y no en la regla (Agrios, 1995).

Un punto central en el conocimiento actual de los mecanismos de reconocimiento es que involucran la percepción de moléculas conservadas características de grupo enteros de microorganismos (*PAMPS-Pathogen Associated Molecular Patterns*), tales como la quitina en hongos, lipopolisacáridos, peptidoglicano y flagelina en bacterias. Además, algunos PRR (*Pattern-Recognition Receptors*) reconocen señales de daños que provienen del hospedero (MAMPs, *Damage-Associated Molecular Pattern*), como péptidos o fragmentos de pared celular liberado durante la infección o heridas. La unión de PAMPS o MAMPs activa los PRRs y desencadena cambios fisiológicos y bioquímicos en las células que resultan en la inmunidad desencadenada por PAMPS (PTI), la cual determina la resistencia basal asociada generalmente a resistencia no hospedero (defensa no específica) y en algunos casos a resistencia hospedero. Esta inmunidad incluye estallido de calcio y especies reactivas de oxígeno (EROS), así como la activación de MAPKs (Mitogen-

Activated Protein Kinases) y CDPKs (Calcium-Dependent Protein Kinases), dejando una masiva reprogramación transcripcional (Gómez-gómez, 2004; Bent, 1996; Tameling & Matthieu, 2007; Monaghan & Zipfel, 2012).

Estas respuestas de defensa no específica se activan ante el ataque de muchos organismos potencialmente patógenos de la planta y está determinada por la presencia de los receptores a nivel de membrana (PRRs, *Pattern-Recognition Receptors*). Todos los PRRs de plantas son receptores con actividad quinasa localizados en la membrana plasmática (RLKs) o proteínas como receptores (RLPs) con dominios funcionales modulares. Los RLKs contienen tres dominios: extracelular, transmembranal y un dominio quinasa. Los RLP a su vez, contienen un dominio extracelular y un dominio transmembranal, pero solo tiene un corto dominio citosólico que no presenta, sin un dominio obvio de señalización (Zipfel, 2009; Monaghan & Zipfel, 2012).

Sin embargo, muchos microorganismos fitopatógenos dentro de su proceso de evolución se han adaptado a estos sistemas de reconocimiento y han desarrollado factores de virulencia que suprimen partes de este sistema de reconocimiento, facilitando la colonización del hospedero (Bent & Mackey, 2007). Dichos factores conocidos como efectores permiten que el microorganismo pueda infectar de manera exitosa la planta, debido principalmente a su capacidad para perturbar de manera determinante los procesos de defensa de la planta (Bent, 1996). De igual manera, dentro del mismo contexto evolutivo muchas plantas han desarrollado receptores que permiten reconocer estos factores y generar una respuesta de defensa (Bent & Mackey, 2007; Tameling & Matthieu, 2007). Es así como, los efectores que actuaban inicialmente como factores de virulencia ahora son de avirulencia y permiten un reconocimiento en la planta del patógeno potencialmente virulento. Estos receptores específicos generalmente conocidos como proteínas R, pueden actuar de diversas maneras, ya sean por interacción directa con el factor avirulento a nivel de la membrana plasmática o a nivel citoplasmático, o por interacción indirecta reconociendo algunas moléculas que se generan debido a la presencia del patógeno en la planta (Bent & Mackey, 2007). Este reconocimiento es la base de la ETI (*Effector-Triggered Immunity*), la cual está constituida por un conjunto de respuestas de defensa similares a las presentadas por la PTI, pero activadas de manera espacio y temporalmente coordinada diferente, siendo más rápidas y efectivas que esta última.

La mayoría de las proteínas R presentan multidominios NB-LRRs, llamados así por su dominio de unión a nucleótido (NB) para la interacción con ATP o GTP; y las repeticiones ricas en leucina (LRR) (Coaker & Baker, 2013). Este grupo de proteínas R se encuentra en el citoplasma y tiene una arquitectura similar a la encontrada en las proteínas encargadas del reconocimiento de infección intracelular. Algunas proteínas NB-LRRs poseen una región similar al del receptor N-terminal Toll/interleukina-1 (TIR-NB-LRR), mientras que otros presentan una región colied-colied (CC-NB-LRR) o un dominio N-terminal de función desconocida. Con respecto a su extremo N-terminal, la presencia del dominio TIR o CC previamente descrito influye en la señalización y reconocimiento de las proteínas efectoras del patógeno (Feys & Parker, 2000; Meyers, Kozik, Griego, Kuang & Michelmore, 2003).

A través de interacciones directa o indirectas entre los efectores específicos descritos y las proteínas R, se activa una segunda línea de inmunidad potente de la planta, llamada resistencia gen por gen. Esta resistencia, también denominada inmunidad desencadenada por su efector (ETI), ocurre entre un cultivar de plantas específica que posee un gen R y un patógeno que lleva un gen de avirulencia (*avr*), dicha incompatibilidad genética se refleja en muchos modelos planta-patógeno por la HR "*Hypersensitive Response*", la cual se caracteriza por una rápida muerte celular de las primeras células infectadas e involucra la elaboración de un importante número de defensas inducibles (Jonathan, Jones & Dangl, 2006; He et al. 2007). A pesar de que este modelo es válido en ciertas interacciones planta-patógeno, no permite explicar modelos en donde la relación gen por gen no se presenta y se necesita la presencia de más de un par de genes para que se presente la resistencia en la planta.

2.2 VIAS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL

La activación de la defensa vegetal es inducida ya sea por el reconocimiento de los PAMPS por los PRRs o el reconocimiento de efectores por proteínas R, resultando en una inmunidad activada por PAMPS (PTI) o en una inmunidad actividad por efectores (ETI), respectivamente. De acuerdo con diversos estudios, dentro de los procesos involucrados en las vías de señalización se destacan el rápido flujo de iones calcio (Ca^{2+}) al interior de la célula y producción de EROS, tales como anion superóxido y peróxido de hidrógeno. Cuando los EROS son producidos a elevadas concentraciones en el sitio de infección,

ellos pueden tener directamente propiedades antimicrobiales; mientras que a bajas concentraciones actúan como moléculas señal. Tras la inducción en el cambio de potencial de membrana y en flujo de iones se activan MAPK quinasas, así como la activación simultánea de CDPKs que tienen un papel central en la señalización celular. La producción de EROS en el estallido oxidativo puede involucrar mecanismos como la actividad de NADPH oxidasas y peroxidasas extracelulares, estas últimas también son fuentes de producción de EROS, específicamente de H₂O₂. Dentro de los mecanismos activados, también se encuentra la deposición de calosa en la pared celular, bloqueando la penetración del hongo en la célula; y dentro de los plasmodesmos con el fin de evitar la propagación entre las células de virus (Bent, 1996; Dodds & Schwechheimer, 2002; Hammond-Kosack & Jones, 2015).

Generalmente estos eventos tempranos se encuentran acompañados por la biosíntesis de diferentes hormonas que juegan un papel central durante la modulación específica de la respuesta de defensa, ya sea en el punto de infección (Respuesta local) o en tejidos alejados del mismo (Respuesta sistémica). Estas respuestas originan cambios en la expresión de genes, los cuales son mediados por factores de transcripción de la familia WRKY (Tryptophan-Arginine-Lysine-Tyrosine, por sus siglas en inglés) y TGA (factor de unión al elemento *cis* TGACG) (Hammond-Kosack & Jones, 2015). Dentro de estas hormonas vegetales se destacan entre otros el ácido jasmónico y el ácido salicílico, compuestos químicos que cumplen un papel central en la señalización de las respuestas de defensa vegetal, generando dos rutas de señalización que se regulan de manera independiente durante el estrés biótico. Si bien es cierto que estas rutas de señalización se cruzan en ciertos puntos, se ha aceptado que son rutas antagonistas que señalizan respuestas de defensa diferentes.

2.2.1 Ácido salicílico

El aumento en la expresión de los genes relacionados con la defensa está regulado por moléculas de señalización como el etileno, el SA y JA. Generalmente, el SA es requerido para la resistencia a patógenos biotrofos y hemibiotrofos, mientras que el JA y el etileno median la resistencia a patógenos y a la mayoría de insectos herbívoros. La señalización mediada entre el SA y el JA juegan un papel importante en la prolongación de la respuesta de defensa, mediante la inducción Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, por sus siglas

en inglés). Aunque la investigación en los mecanismos de SAR se ha centrado en el papel del SA como agente regulador en los últimos años se han incrementado investigaciones y el conocimiento sobre el papel del JA en esta compleja relación (Díaz-Puentes, 2012; Rangel et al. 2010).

Para el caso de SA esta molécula, parece jugar un papel esencial en la ruta de transducción de señales que conduce a la activación de genes que codifican no solo para proteínas PR, sino también para el establecimiento de la HR, considerada como aquella muerte celular programada que se desarrolla para delimitar el área de infección de un patógeno, así como en la SAR. Distintos estudios han mostrado que como primer evento una vez reconocido el patógeno en muchas interacciones planta-patógeno, se induce la acumulación de SA. Las proteínas R del tipo CC-NBS-LRR inducen la síntesis de SA a través de las proteínas NDR1 y RIN4, mientras que las proteínas R del tipo TIR-NBS-LRR inducen la síntesis de SA a través de las proteínas EDS1 y PAD4 (Forouhar, Yang, Kumar & Tong, 2005; Vlot, Klessig & Park, 2008; Vlot, Dempsey & Klessig, 2009). Posterior a la acumulación de SA en el citoplasma, una parte de este es convertido a salicilato de metilo (MeSA) por la enzima SAMT (Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase, por sus siglas en inglés). Simultáneamente, otra parte del SA interactúa con la catalasa y las acorbatoperoxidasa bloqueando sus actividades, y por lo tanto, aumentando los niveles intracelulares de H₂O₂, el cual a bajas concentraciones potencia la expresión de genes de defensa; mientras que a altas concentraciones, conllevan a los dos procesos que se presentan a continuación: (Díaz-Puentes, 2012).

En el primer proceso debido a la acumulación de ROS, se genera un cambio en el estado de redox de la célula, induciendo o reprimiendo la transcripción de genes que participan en la defensa de la planta. En segundo proceso como consecuencia del aumento en los niveles de EROS se presenta la inducción de HR en la célula, liberando proteínas PR (Pathogenesis-related Protein, por sus siglas en inglés) y moléculas con actividad antimicrobiana. Las proteínas PR que son acumuladas en el espacio intercelular y en las vacuolas, y muchas de ellas muestran actividad antimicrobiana *in vitro*, por ejemplo: la PR2 una glucanasa, la PR3 y PR8 quitinasas, la PR9 una peroxidasa, la PR12 una defensina, la PR13 una tionina y la PR1 una proteína con diversas funciones que ha demostrado inhibir la germinación de *Phytophthora infestans*. Las proteínas PR además liberan

moléculas que podrían adicionalmente inducir la defensa vegetal y la potencial respuesta de la planta. La resistencia a una enfermedad está dada por numerosas proteínas PR que actúan en conjunto, por lo que se ha propuesto que la sobre expresión o el silenciamiento de una sola de estas proteínas, no tendría un efecto determinante en la resistencia o susceptibilidad de la planta (Tornero, Gadea, Conejero & Vera, 1997; Riviere, Marais & Galiana, 2008; Díaz-Puentes, 2012).

2.2.2 Ácido jasmónico

El ácido jasmónico y algunos de sus derivados que actúan en conjunto con el etileno, tiene un papel central en la defensa ante la infección de patógenos heterótrofos (Farmer, Alméras & Krishnamurthy, 2003; Glazebrook, 2005). Se ha considerado que la relación entre el SA y el JA es antagónica, aunque, evidencias acumuladas en ciertos modelos vegetales indican que esa no es la norma. La relación entre las dos moléculas es influenciada por numerosos factores: ambientales, clase de patógeno, cambio en el estado redox de la célula y las proporciones entre estas dos hormonas. Se ha observado que a bajas concentraciones hay sinergia entre ellos y expresión simultanea de marcadores clásicos del JA (ej. la defensina *pdf1-2* y tionina *thi1-2*) y del SA (ej. *pr1*); mientras que, a altas concentraciones los dos ácidos son antagónicos e inducen lisis celular por ROS.

Evidencias sugieren que JA está implicado en la inducción de genes que actúan principalmente en defensa contra patógenos, en lugar de contra insectos. Por ejemplo, moléculas inductoras de origen fúngico inducen la acumulación transitoria de JA, así como la síntesis de varias clases de fitoalexinas en cultivos de células en suspensión, para varias especies de plantas (Blechert et al. 1995). La aplicación exógena de jasmonatos inducen los mismos compuestos antimicrobiales, aparentemente por la activación transcripcional de genes que codifican enzimas involucradas en su biosíntesis (Blechert et al. 1995). El gen defensina *pdf1.2*, que codifica una proteína con actividad antifúngica demostrada, es inducido fuertemente por patógenos o jasmonato de metilo, pero no por ácido salicílico (Penninckx et al. 1996). Finalmente, el jasmonato y etileno son sinérgicos en la inducción de algunas proteínas PR, extensina de pared celular y enzimas involucrada en la biosíntesis de fenilpropanoides, así como la expresión de familias de genes codificante para proteínas PR1 y PR5, los cuales pueden ser también inducidos después de la infección por varios patógenos y por tratamientos con SA o algunos de sus análogos

(Peña-cortes et al. 2005; Halim, Vess, Scheel & Rosahl, 2006). Para el caso de *Fusarium oxysporum*, al ser un patógeno clasificado como heterótrofo, se ha encontrado que el ácido jasmónico puede ser determinante para la expresión de resistencia en plantas de tomate a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Mandal, Mitra & Mallick, 2008). Actualmente no es claro cuáles son y cómo se relacionan, las rutas de señalización que determinan la resistencia para muchos de los modelos planta-patógeno, incluyendo el modelo clavel-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Una vez el proceso de señalización se ha llevado a cabo a nivel intracelular e intercelular, se presenta una respuesta de defensa específica contra el patógeno agresor conocida como respuesta de defensa activa o dinámica que tiene como objetivo aletargar el patógeno y evitar la colonización de la planta.

2.3 DEFENSA VEGETAL DINÁMICA O INDUCIBLE

Una vez la planta ha reconocido el patógeno se activan una serie de mecanismos de defensa mediante una cascada de señalización específica. Los mecanismos de defensas que son inducidos como consecuencia del reconocimiento son responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen principalmente muerte celular por reacción hipersensible, la acumulación de metabolitos, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno. Dichos mecanismos pueden manifestarse con la aparición de lesiones, debido a la muerte celular programa, incluyendo la expresión simultánea de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y con la producción de altas cantidades de proteínas relacionadas con la defensa (PR), que a su vez se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida (Van Loon, Rep & Pieterse, 2006; Huckelhoven, 2007). Durante la respuesta inducible se presenta la participación de metabolitos y enzimas que regulan finalmente todos estos procesos de defensa y son determinantes para que los genotipos resistentes expresen su fenotipo durante la interacción con el patógeno agresor.

La respuesta de defensa en plantas incluye la acumulación de diversos metabolitos secundarios que son determinantes en la resistencia o susceptibilidad. Un análisis detallado de las plantas cuando son sometidas a estrés biótico podría permitir la identificación de los compuestos que pueden ser importantes en la interacción planta-

patógeno. Los perfiles metabólicos de hecho, podrían ser la herramienta más importante en la identificación de los primeros compuestos que señalan la percepción del estrés, ya que se ha propuesto que, en algunos casos, podrían actuar incluso antes de que cualquier cambio en el transcriptoma o proteoma, pudiera ser detectado (Bino et al. 2004; Shulaev, Cortes, Miller & Mittler, 2008). En el caso específico, de los perfiles metabólicos realizados en plántulas de clavel durante la interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, se presenta de manera específica a nivel de tallo la acumulación de compuestos de naturaleza fenólica, como los son los derivados de ácido antranílico, cuya formación depende tanto de la variedad, como de la raza del patógeno involucrado en la infección (Niemann, Van Der Kerk, Niessen & Versluis, 1991). A nivel de raíz, se favorece la acumulación de ácido ferúlico, escopoletina, cumarina y derivados de acridona; estos dos últimos, acumulados de manera constitutiva en variedades resistentes al patógeno (Higuera, 2001). En este mismo órgano y en tallo, se identificó un triglicósido del Kempferol conocido como kaempferido 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -glucopiranosido, que se encuentra de manera constitutiva y está clasificado como fitoanticipina, debido a que presenta propiedades antifúngicas, inhibiendo la germinación de conidias y el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Curir, Dolci, Lanzotti & Taglialatela, 2001). A su vez se reportan otros compuestos con actividad antifúngica directa hacia el patógeno como los ácidos protocatecuico, vanílico, además de flavonas como datistecina y glicósido peltatósido (Curir, Dolci, Lanzotti & De Cooman, 2003).

A continuación, se presenta una revisión bibliográfica general sobre algunas de las enzimas que participan en defensa vegetal y que serán objeto de estudio en la presente investigación.

2.3.1 Guayacol peroxidasa (E.C.1.11.1.7)

La GPX es una enzima implicada en la diferenciación y desarrollo de las plantas y en respuestas defensivas contra patógenos. Un incremento en la actividad y/o en la expresión de isoenzimas de peroxidasa es característico de la defensa de las plantas (Esteban-Carrasco, Zapata, López-Serrano, Sabater & Martín, 2002; Morkunas & Gmerek, 2007). Las peroxidasa no poseen actividad antifúngica por sí mismas, pero están involucradas en respuestas a enfermedades porque junto con enzimas como las polifenoloxidasas,

catalizan la oxidación de compuestos fenólicos para la polimerización de la lignina. Las reacciones químicas básicas de las PODs están bien establecidas, e involucran especialmente un ciclo con peróxido de hidrógeno y donores de hidrógeno (Figura 1). En las plantas, cuando se presentan situaciones de estrés por frío, estrés mecánico, osmótico o por defensa al ataque de fitopatógenos, es característico que se produzca como respuesta un incremento súbito en el contenido de sustancias oxidantes, teniendo lugar una rápida generación de anión superóxido y acumulación de H₂O₂ en el apoplasto. Aparentemente, esta acumulación de peróxido tiene diferentes funciones: induce señales para la transcripción de proteínas de defensa, así como para la síntesis de fitoalexinas; además, actúa como una forma directa de defensa debido a la naturaleza microbiana del H₂O₂ provocando cambios en la estructura de la pared celular mediante una rápida insolubilización de las proteínas existentes en la misma, lo que conduce a su endurecimiento (Vera-Estrella, Higgins & Blumwald, 1994). Se ha propuesto que algunas peroxidasas son importantes en la generación de peróxido en la planta y están asociadas a resistencia a patógenos (Bindschedler et al. 2006).

A nivel estructural las peroxidasas presentes en los diferentes reinos se pueden clasificar en 3 superfamilias (Battistuzzi, D'Onofrio, Loschi & Sola, 2001). En plantas encontramos peroxidasas de la superfamilia I que se caracteriza por ser intercelulares con ancestros bacterianos, generalmente asociadas a diversos procesos citoplasmáticos y peroxidasas de la familia III, proteínas extracelulares asociadas fuertemente a los procesos de fortalecimiento de paredes celulares y en la generación de H₂O₂ para realizar diversas reacciones de polimerización (Herder, Lievens, Rombauts, Holsters & Goormachtig, 2007). Dentro de las peroxidasas del tipo I encontramos las ascorbato-peroxidasas enzimas que están involucradas en los sistemas antioxidantes de protección celular junto con las enzimas catalasa y las enzimas glutatión reductasa (De Gara, de Pinto & Tommasi, 2003).

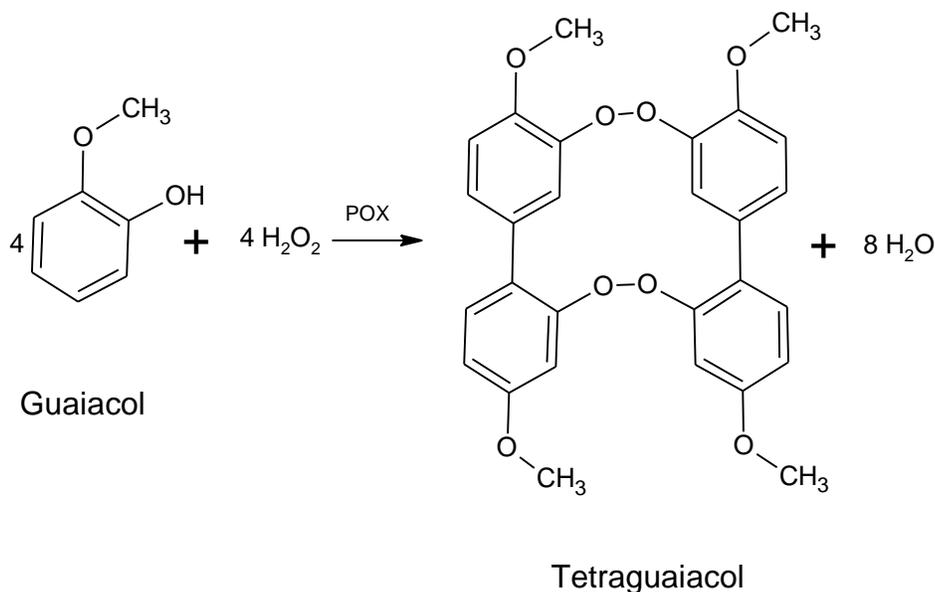


Figura 1. Formación de tetraguaiacol a partir de la oxidación de guaiacol catalizado por la enzima guaiacol peroxidasa (GPX), empleando H_2O_2 como co-sustrato.

Como es evidente entonces, el papel que esta enzima cumple en el metabolismo de las especies altamente reactivas de oxígeno no se limita solamente a su generación, sino que también existen isoformas asociadas con los sistemas antioxidantes que protegen a las células por daño debido a las especies altamente reactivas de oxígeno (EROS). Dicho papel está relacionado con la capacidad que presentan para descomponer H_2O_2 , una especie altamente oxidante generada por el metabolismo oxidativo (Polkowska-Kowalczyk, Wielgat & Maciejewska, 2007).

2.3.2 Polifenoloxidasas (E.C. 1.14.18)

Las PFO son metaloproteínas de cobre conocidas también como tirosinasas, polifenolasas, catecoloxidasas, cresolasas o catecolasas (Yoruk & Marchal, 2003). La PFO cataliza la *o*-hidroxilación de monofenoles (actividad de monofenolasa) y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad de fenolasa) con oxígeno como el primer oxidante (Figura 2). La participación del cobre como cofactor en las PFOs, es esencial para su actividad (Pérez-Gilbert & Carmona, 2000; Laveda, Núñez-Delgado, García-Carmona & Sánchez-Ferrer, 2001). Las quinonas generadas por las PFO son altamente reactivas, debido a sus características electrofílicas las cuales permiten modificar covalentemente y entrecruzar una variedad de constituyente celulares, incluyendo proteínas. Estas reacciones son al parecer responsables del papel que se les ha dado a estas enzimas en las respuestas de

defensa vegetal. Todas las PFO caracterizadas hasta el momento son proteínas codificadas en el núcleo que se dirigen al tilacoide y donde participan en diversas reacciones asociadas al oxígeno molecular. Estudios bioinformáticos realizados con diferentes PFO purificadas de plantas, hongos y mamíferos, han permitido determinar la presencia de dominios altamente conservados (Van Gelder, Flurkey & Wichers, 1997). En dichos estudios, se ha demostrado que las secuencias de aminoácidos de las PFO vegetales, presentan una secuencia señal de 80 a 90 aminoácidos, que por modificaciones postraduccionales localiza el polipéptido en los cloroplastos, más exactamente en las membranas tilacoidales. También se ha observado, en un importante número de las secuencias, la presencia de regiones de transmembrana ubicadas hacia el extremo C-terminal del polipéptido (Van Gelder et al. 1997).

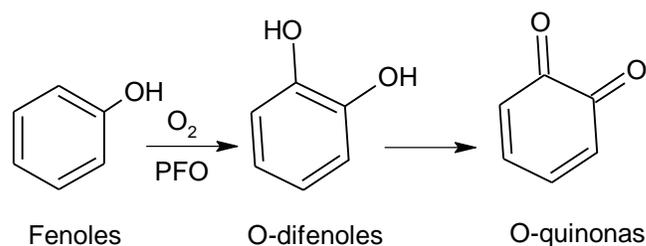


Figura 2. Reacción de O-hidroxilación de monofenoles a O-quinonas catalizada por la enzima polifenoloxidasasa.

Los pesos moleculares de las PFO varían significativamente de una fuente vegetal a otra. Se ha demostrado que las isoformas de la PFO de muchas especies vegetales tienen una masa molecular que puede variar desde 32 hasta más de 200 kDa, aunque en su mayoría se encuentran dentro del intervalo de 35-70 kDa (Yoruk & Marschall, 2003). En manzana (*Malus* sp.), por ejemplo, se encontró que las formas nativas después de eliminación del péptido señal y luego de ser detectadas en condiciones de desnaturalización parcial tenían pesos moleculares de 64 y 42 kDa, respectivamente (Marqués, Fleuriet & Macheix, 1995).

Aunque las polifenoloxidasas han sido implicadas en distintas rutas del metabolismo secundario (Gandia-Herrero, Escribano & García-Carmona, 2005), sus funciones dependen de su ubicación en la planta. Es así, como la participación de estas enzimas en los procesos de oxidación para la formación de quinonas junto a las lacassas, las ha relacionado con el pardeamiento enzimático en frutas y tubérculos (Ding, Chachin & Ueda, 1998; Jharna, Santhoor & R. Lalitha. 1997; Mayer, 2006). A su vez, teniendo en cuenta la naturaleza de sus productos, se les ha otorgado un papel importante en la respuesta

vegetal ante heridas causadas ya sea por factores bióticos o abióticos. (Beckman, 2000; Constabel, Lynn, Patton & Christopher, 2000; Chunhua et al. 2001). La participación de las polifenoloxidasas en estos procesos se ha deducido teniendo en cuenta que desde el momento en el que se presenta la disrupción de las membranas celulares y subcelulares del tejido afectado, se suscita una importante formación de quinonas, las cuales eventualmente podrían participar en distintos procesos de la célula. Estudios ha demostrado el papel central que tienen las polifenoloxidasas en defensa vegetal ha sido presentada en trabajos realizados en tomate (*Solanum lycopersicum*), en donde realizando modificaciones con RNA interferente, se redujo de manera sustancial los niveles de esta enzima y se presentó un aumento significativo de la susceptibilidad al patógeno *Pseudomonas syringae* (Li & Steffens, 2002.) Así mismo, la sobreexpresión de la polifenoloxidasa en esta misma planta generó un aumento importante en la resistencia a este patógeno (Thipyapong, Hunt & Steffens, 2004) Otras investigaciones han relacionado a las polifenoloxidasas con la resistencia de distintas plantas a insectos por la modificación antinutricional de algunas proteínas durante el ataque de estos organismos (Constabel et al. 2000).

2.3.3 Lipoxigenasa (E.C. 1.13.1.13)

Las lipoxigenasas (LOX) son polipéptidos de cadena larga y sencilla de 839 aminoácidos. Estas enzimas catalizan la oxigenación de ácidos grasos a sus hidroperóxidos derivados. Aquellos que están involucrados en la biosíntesis de JA incluyen una 13-lipoxigenasa que produce ácido 13-hidroperoxi-octadecatrienoico, un sustrato para varias enzimas, incluyendo la aleno oxido sintasa (AOS), enzima que participa en la biosíntesis de JA (Figura 3) (Schaller, 2001). La expresión y actividad de LOXs son modulados en respuestas a heridas mecánicas y ataque por insectos y patógenos (Bell, Creelman & Mullet, 1995; Kolomiets, Chen, Gladon, Braun & Hannapel, 2000). Se ha reportado que la acumulación en transcritos y actividad de LOXs en respuesta a infecciones para varios sistemas se correlaciona con la resistencia de plantas contra patógenos.

Estudios realizados en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, se determinó por medio de knock-down de *Lox2* la disminución en la síntesis JA durante el estrés producidas por heridas mecánicas (Bell et al. 1995). Por otra parte, en hojas de papa (*Solanum tuberosum*) infectadas con *Pseudomonas syringae*, se ha descrito la acumulación de compuestos

como ácido 9-hidroperoxi-octadecanoico derivados del metabolismo de la 9-lipoxigenasa. La acumulación de dicho compuesto fue mucho más rápida y pronunciada en esta interacción disminuyendo los síntomas asociados *P. syringae* en comparación durante la infección por *Phytophthora infestans* (Göbel, Feussner, Hamberg & Rosahl, 2002). Por su parte, la acumulación de transcritos *POTLX-3* fue específica en la interacción con *P. infestans* y durante el desarrollo de respuesta hipersensible causado por el patógeno incompatible *P. syringae* (Kolomiets et al. 2000). Por lo tanto, se propone que este LOX2 es necesario para la formación de moléculas señal inducidas por heridas; mientras que la acumulación de transcritos del gen *potlx-3*, es específica para el ataque del patógeno *Phytophthora parasítica*.

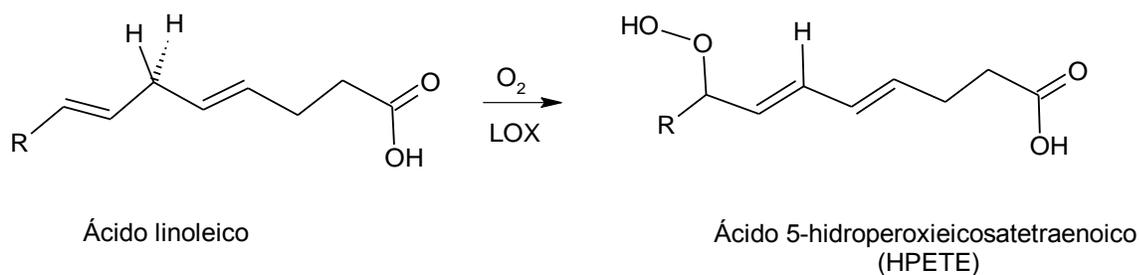


Figura 3. Reacción de oxidación del sistema de dobles enlaces de un ácido graso insaturado, para dar lugar a hidroperóxido, catalizada por la enzima lipoxigenasa.

Se ha sugerido que LOX está implicada en el desarrollo de respuesta hipersensible (HR) (Rustérucci et al. 1999; Kolomiets et al. 2000). En varios sistemas de patógenos vegetales, la ocurrencia de HR está ligeramente relacionada con el aumento de la actividad, proteína o niveles de ARNm de LOXs (Vaughn & Lulai, 1992; Rustérucci et al. 1999). Los estudios transgénicos han demostrado que la expresión de un gen LOX del tabaco está directamente implicada en la HR y en la resistencia a *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* (Rancé et al. 1998). Los productos de la vía 9-LOX contribuyen al desarrollo de la muerte celular hipersensible inducida por una elicitorina en las hojas de tabaco.

2.3.4 Fosfolipasa D (EC 3.1.4.4)

La fosfolipasa D (PLD) hidroliza diferentes fosfolípidos de membranas, produciendo ácido fosfatídico (Figura 4). Estas enzimas se caracterizan por tener diversos papeles en el metabolismo y la regulación celular, que van desde la señalización hormonal (ácido salicílico, ácido absicico, jasmonatos, auxina y ácido giberelico) y respuesta a estrés

ambiental (sequia, heladas, heridas y toxicidad por metales pesados) (Rainteau et al. 2012). Al participar en diversos tipos de procesos asociados a la dinámica celular o subcelular, varios genes de PLD pueden ser inducidos en diferentes especies de plantas expuestas a un patógeno o un elicitor, y modificar respuesta de defensas contra varios patógenos virulentos y avirulentos (Andersson, Kourtchenko, Dangl, Mackey, & Ellerstrom, 2006; Anthony, Khan, Costa, Pais, & Bogre, 2006).

El ácido fosfatídico es un segundo mensajero secundario formado a partir de lípidos estructurales, por la actividad hidrolizante de la fosfolipasa D. Se ha demostrado que la acumulación de SA induce la activación de PLD en cultivos de células en suspensión. Algunos reportes han citado que la señalización de SA también se ha enlazado con fosfolípidos y enzimas en el metabolismo de fosfolípidos (Kinke et al. 2009; Kalachova et al. 2013). El ácido fosfatídico producido por la actividad de la fosfolipasa D, involucra la activación de NADPH-oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno (Testerink & Munnik, 2005).

La actividad de las enzimas PLDs está asociada a su capacidad para hidrolizar un alcohol primario como un aceptor de una fracción fosfatidil y en unir una molécula de agua. Así en la presencia de un alcohol primario, esta enzima cataliza una reacción de transfosforilación que conduce a la formación de fosfatidilalcohol en lugar de ácido fosfatídico (Munnik, Arisz, De Vrije & Musgrave, 1995).

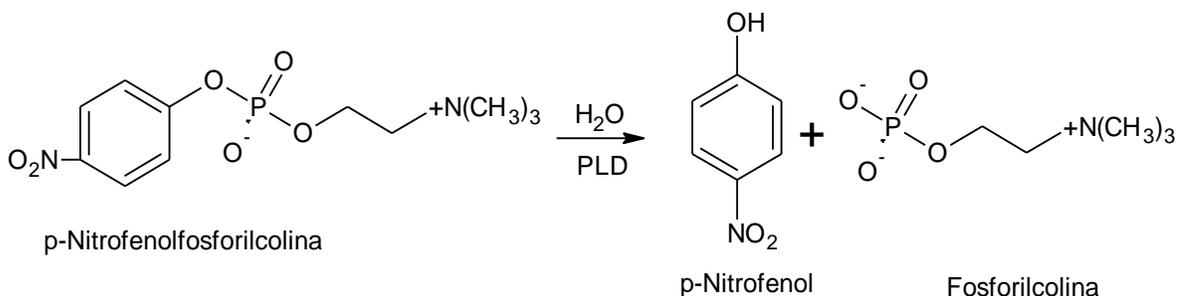


Figura 4. Reacción de hidrólisis del enlace éster para dar lugar a *p*-nitrofenol y fosforilcolina, catalizada por la enzima fosfolipasa D.

2.3.5 Fenilalanina amonio liasa (E.C. 4.3.1.5)

La Fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la primera reacción de la ruta fenilpropanoide. Esta enzima permite convertir la fenilalanina en ácido *trans*-cinámico (Figura 5), que a su vez es precursor de un amplio rango de compuesto en plantas (Dixon & Paiva, 1995). A

partir de fenilalanina por reacciones de hidroxilación, metilación, deshidratación, entre otras, ácidos como *p*-cumarico, cafeico, ferúlico y sinápico. Estos metabolitos son translocados desde el citoplasma vía retículo endoplasmático hacia el apoplasto, en donde participan en lignificación y fortalecimiento de las paredes celulares (Bernards & Lewis, 1992).

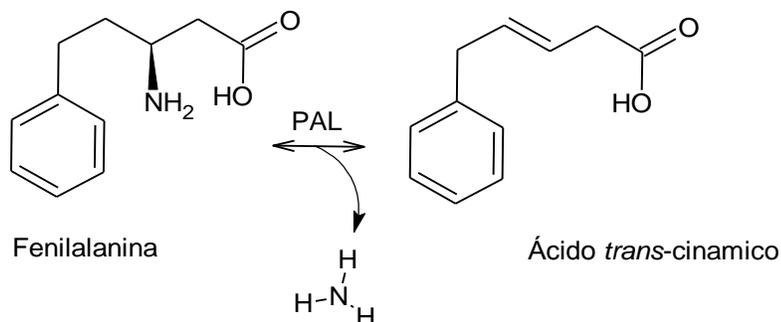


Figura 5. Reacción de eliminación de un amonio por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) convirtiendo la fenilalanina en ácido *trans*-cinámico.

Se ha reportado que plantas tratadas con SA incrementa la acumulación de transcritos de PAL. De igual manera, la inhibición en la actividad de PAL afecta el desarrollo de SAR en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) inoculadas con el virus del mosaico de tabaco. Este hallazgo unido a la observación de que la aplicación de SA solo restaura parcialmente SAR en plantas suprimidas con PAL, ha llevado a sugerir que además de niveles elevados de SA, la presencia de otros fenólicos preformados derivados de PAL y/o la síntesis *de novo* de otros productos fenilpropanoides, pueden ser importante para la inducción e SAR (Pallas, Paiva, Lamb & Dixon, 1996). De acuerdo con los estudios realizados por Smith-Becker et al. 1998., la infección de plantas de pepino (*Cucumis sativa*) con *Pseudomonas syringae*, generan la inducción de la actividad de PAL, seguido por un incremento en los niveles de SA y 4-hidroxibenzoico. Esto permitió postular a este último compuesto generado por la ruta fenilpropanoide, como clave en el desarrollo de SAR. Por otro lado, en el modelo clavel-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, se ha determinado que la infección tiene un efecto en los niveles de la enzima, en raíces de plantas resistentes al patógeno (Ardila et al. 2011).

2.4 SIMPLASTO

La comunicación intercelular es una característica intrínseca y esencial de todos los organismos multicelulares. En el caso de las plantas, el transporte a larga distancia ocurre a través de dos tejidos conductivos, xilema y floema; mientras que, para el movimiento de corto alcance las plantas usan las vías apoplasto/simplasto. Los nutrientes, hormonas y otras moléculas de señalización liberadas en el apoplasto son transportadas a la célula por portadores específicos o son percibidas por receptores de membrana para activar vías de señalización. El transporte simplástico es una vía única, encontrada solo en plantas y mediada por plasmodesmos, los cuales son poros revestidos de la membrana plasmática que proporcionan conexiones y atraviesan las paredes de células adyacentes. Estos contribuyen a la formación de una red citoplasmática en todo el cuerpo de la planta en la mayoría de los tipos celulares. Por lo cual, aparte de proporcionar una ruta directa de célula a célula, permite superar las limitaciones de la rígida pared celular que rodean a las células. Así mismo median en el floema, procesos como la carga y descarga de diferentes metabolitos incluyendo aquellas señales que controlan la distribución de nutrientes y las respuestas sistémica alrededor de la planta como lo pueden ser ciertas proteínas, hormonas, mRNA, siRNA, etc. Además de las moléculas endógenas, los virus y algunos otros patógenos han evolucionado para usar los plasmodesmos como vía para propagarse dentro de las plantas (Burgs, 2004; Lamber, Stuart-Chapin III & Pons, 2008)

Se ha reportado que *Magnaporthe oryzae* pueden crecer dentro de células de arroz (*Oryza sativa*) para infectar células adyacentes usando hifas invasivas. Este patógeno secreta efectores que son traslocados de célula a célula a través de los plasmodesmos por medio de movimientos del simplasto (Giraldo & Valent, 2013). De igual manera, los plasmodesmos son vías de transporte para los virus, ya que son utilizados para translocar su genoma y favorece la infección en células adyacente de la planta. Sin embargo, durante el proceso de infección se inducen vías de señalización que modifican el transporte celular como respuesta de defensa de la planta. Las proteínas relacionadas a patogenicidad inducidas en respuesta al ataque de patógeno activamente alteran el transporte del simplasto mediante la regulación funcional de los plasmodesmos o su estructura. De hecho, las proteínas relacionadas a patogenicidad han sido localizadas en los plasmodesmos. La respuesta sistémica adquirida también depende del transporte

intercelular a través de los plasmodesmos (Baker, Zambryski, Staskwicz & Dinesh-Kumar, 1997; Sevilem, Miyashima & Helariutta, 2013).

2.5 MODELO EXPERIMENTAL *Dianthus Caryophyllus* L. – *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2

2.5.1 Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

Es una herbácea perteneciente a la familia *Caryophyllaceae* y al género *Dianthus*. El clavel es originario de las costas mediterráneas, se caracteriza porque su tallo es articulado y nudoso; de hojas lineales opuestas, paralilenervias, de color verde claro, recubiertas por una capa cerosas. Sus flores son de fragancia dulce y vistosas, normalmente, florece durante todo el año (Government, 2015). A partir de la forma típica se han obtenido híbrido y variedades con flores dobles, provistas de grandes corolas y tonalidades. Los colores más normales son el rojo, rosado, blanco, salmón y amarillo y bicolores. La mayoría de las variedades de claveles comercialmente importantes son estériles y, por lo tanto, se propagan vegetativamente, con el fin de mantener las características seleccionadas (Abascal, 2017).



Figura 6 Flor de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

Clasificación taxonómica:

Reino: Vegetal

Tipo: Fanerógama

Subtipo: Angiosperma

Phyllum: Dicotiledónea

Clase: Centrospermales

Familia: Caryophyllaceae

Género: *Dianthus*

Especie: *Dianthus caryophyllus* L.

Los claveles representan aproximadamente el 12% de la exportación mundial de flores, siendo una de las más cotizadas en el mercado internacional; además de la diversidad de los colores de sus flores, presenta una duración después de cortados y resistencia al embalaje y transporte (Castilla, González & Lara, 2014). De entre los países que cultivan la planta de clavel se encuentra Colombia, debido a su ubicación en la zona ecuatorial,

ofrece condiciones adecuadas para producción de dicha flor todo el año de forma rentable, ya que no es necesario utilizar sistemas de control climático (calentar o enfriar estructuras de protección) (Quintero et al. 2012). Además de presentar factores climáticas claves para la producción de la flor como buen tamaño, colores intensos y alta calidad (Abascal, 2017).

2.5.2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

El hongo se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento. El micelio es generalmente aéreo, abundante algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero comúnmente, con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar. Presenta una reproducción principalmente asexual y se caracteriza por producir tres clases de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas, estas últimas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las macroconidias y de paredes gruesas, mediante las cuales el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en ausencia de plantas hospedera (Arbeláez, 2000).



Figura 7. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Fuente: Fernanda castiblanco

Clasificación taxonómica

Super reino: Eucariota

Reino: Micetae

División: Amastigomyceta

Subdivisión: Deuteromycotina

Forma-clase: Deuteromycetes

Forma-orden: Moniliares

Forma-familia: Tuberculariaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum*

Forma especial: *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthus*

Fusarium oxysporum tiene alrededor de 120 formas especialis de acuerdo al hospedero que infectan y se observan una alta especialización en las plantas hospedante que pueden atacar. Esta selectividad patogénica se debe a que solamente las plantas hospedantes y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos nutricionales del hongo de manera que sólo puede crecer y desarrollarse en ese tipo de plantas. Para *Fusarium oxysporum* f.

sp. *dianthi* se ha propuesto la existencia de 8 razas fisiológicas y han demostrado que la raza prevalente en la Sabana de Bogota es la raza 2 (Cevallos, González & Arbeláez, 1990)

2.5.3 Enfermedad Marchitamiento vascular

El marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* ha sido una de las enfermedades más limitantes y que mayores pérdidas ha ocasionado en el mundo. Hasta 1975 los cultivos colombianos estuvieron libres de la enfermedad, pero a partir de este año, la frecuente importación de esquejes infectados procedentes de Holanda, Francia, Alemania, Israel y Estados Unidos hizo que esta enfermedad se presentara con una importancia creciente (Arbeláez, 2000).

La enfermedad se inicia con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidosporas en latencia presentes en los tejidos muertos del hospedante y estimuladas por los exudados secretados por las raíces de las plantas de clavel recién sembradas. Las hifas del hongo penetran directamente la epidermis de las raíces, pasan a la corteza ya la endodermis y entran a los vasos del xilema (Baayen, Elgersma, Demminsk & Sparnaaij 1988; Arbeláez, 2000). En las variedades susceptibles el patógeno coloniza los vasos de el tallo y degrada el área invadida, disolviendo las paredes celulares y formando grandes cavidades llenas de aire y residuos de los vasos lignificados, los que interrumpen el paso de agua a través del tallo ocasionando la muerte de la planta (Baayen, Ouellette & Rioux, 1996). Además de secretar un conjunto de fitotoxinas y péptidos que favorecen el proceso de colonización, este patógeno presenta la secreción de proteínas que le permiten detoxificar las fitoanticipinas presentes en los tejidos de clavel (Curir et al. 2000; Di pietro, Madrid, Caracuel, Delgado & Roncero, 2003).

La enfermedad se caracteriza por la aparición unilateral de los síntomas característicos de marchitamiento como consecuencia de un grave estrés hídrico debido principalmente a la obstrucción de los vasos xilemáticos. Al principio las raíces permanecen intactas, pero con la evolución de la enfermedad, éstas se pudren.

Hay un amarillamiento parcial de las hojas y doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma a causa de la interferencia en el crecimiento; en estados iniciales en las hojas puede observarse la mitad clorótica y la mitad de un color verde normal. Los síntomas

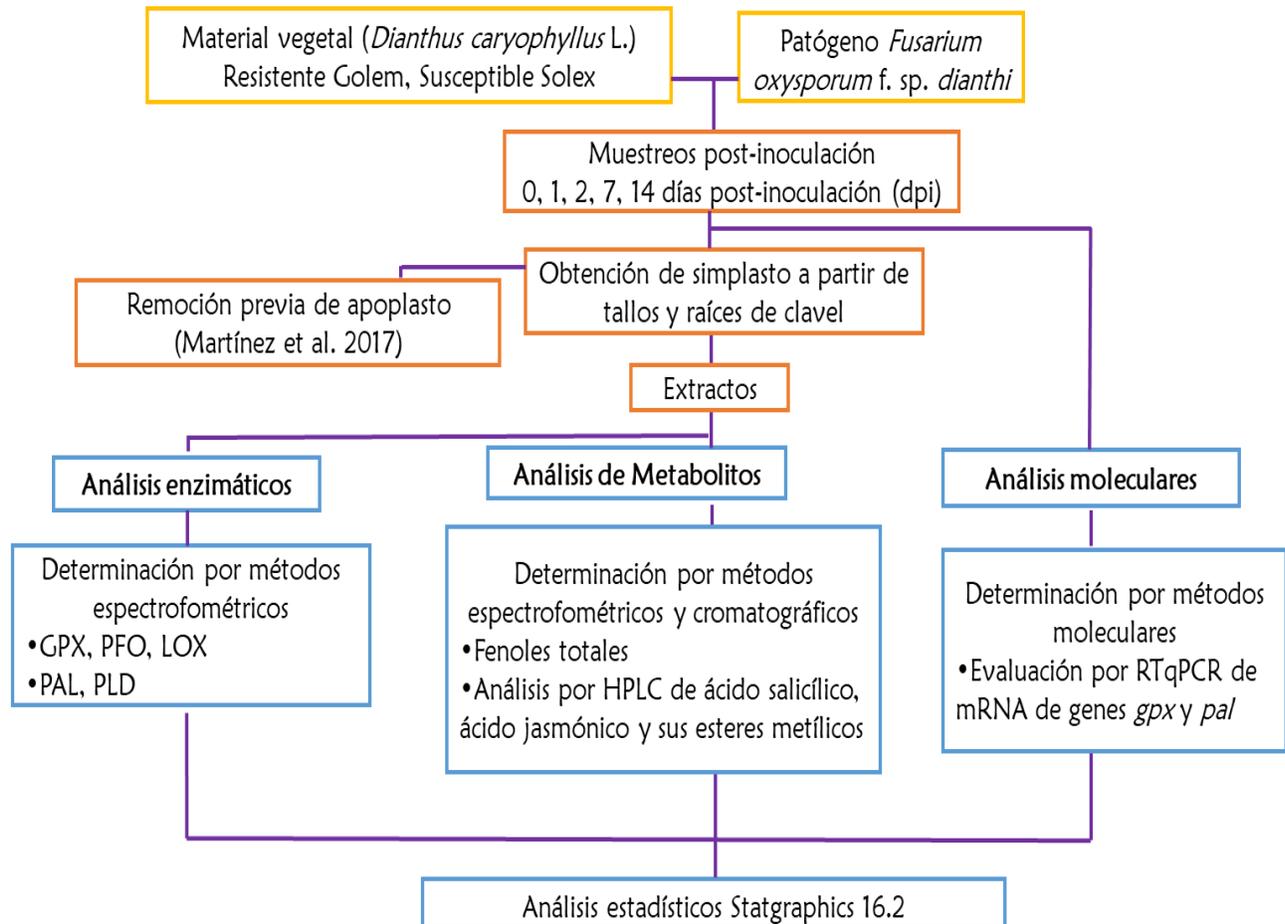
de la enfermedad avanzan afectando la planta hacia arriba causando disminución del crecimiento de la planta con un marchitamiento generalizado y la posterior muerte. Un aspecto muy importante para el diagnóstico de la enfermedad que la diferencia fácilmente de otras enfermedades vasculares es una coloración blanquecina, amarillenta o marrón en los haces vasculares y deshilachamiento de los tejidos sin afectar la médula (Gárces, Orozco, Bautista & Valencia, 2001).

La resistencia de las plantas, la raza fisiológica del hongo y las condiciones ambientales son factores que determinan la severidad de la enfermedad. El avance tecnológico ha permitido encontrar algunos genotipos con resistencia a la enfermedad con el desarrollo de técnicas de cruzamiento (Ben-Yephet, Reuven & Shtienberg, 1997). Sin embargo, la información que se tiene sobre los mecanismos bioquímicos de resistencia son pocos en estas variedades. Diversos estudios se han realizado con el fin de estudiar y comprender los fenómenos más relevantes de la histopatología y bioquímica de los mecanismos de defensa que se presentan en los genotipos resistentes de clavel. Estudios realizados en el modelo Clavel-Fusarium han permitido determinar que la actividad de PFO y GPX aumenta en variedades resistentes infectadas con el patógeno causante del marchitamiento vascular. Se ha propuesto que el papel de estas enzimas puede estar asociados diferentes fenómenos que incluyen la lignificación, proceso que aumenta la rigidez de la pared celular y en la oxidación de polifenoles a quinonas, los cuales pueden presentar actividad antimicrobiana (Ardila & Higuera, 2005; Cuervo, Martínez, Ardila & Higuera, 2009). Así mismo se encontró que en este mismo modelo, la infección con el patógeno puede tener un efecto en los niveles de la enzima PAL en raíces de plantas resistentes al patógeno (Ardila et al. 2011). Es bien sabido el papel de esta enzima en la biosíntesis de SA y en consecuencia el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida, así como la inducción de genes que codifican para proteínas PR (Pathogenesis related, por sus siglas en inglés) (Dempsey, Shah & Klessig, 1999). A pesar de esta evidencia, no se conoce a la fecha cuáles son las hormonas asociadas a la acumulación de estas enzimas en los tejidos de la planta y no se conoce, por tanto, las rutas de señalización involucradas en resistencia.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL

A continuación, se presenta un diagrama de flujo general de la metodología empleada para dar cumplimiento a los objetivos propuestos en la presente investigación. En este se describen todas las fases experimentales abordadas, las cuales se detallarán más adelante en cada uno de los casos.



3.2 REMOCIÓN DE APOPLASTO Y OBTENCIÓN DE FRACCIÓN SIMPLÁSTICA A PARTIR DE TALLOS Y RAÍCES DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.)

Para los diferentes ensayos realizados en la presente investigación, el tejido vegetal objeto de estudio, se sometía a un procedimiento de fraccionamiento que permitió obtener de manera independiente tanto la fracción apoplástica, como la que se asume en la presente investigación, es la fracción simplástica. Esto considerando que, de acuerdo al procedimiento empleado, esta última se encuentra enriquecida por la fracción citoplasmática de la célula y el material remanente insoluble (Cakmak, Cakmak, Dumlupinar & Tekinay, 2012). Las condiciones para la obtención de esta fracción enriquecida incluyen la previa extracción del apoplasto de los tejidos de la planta (Martínez-González et al 2018). Para ello es necesario un proceso de infiltración al vacío con una solución de extracción, seguido de una centrifugación para extraer el fluido apoplástico (Martínez, Martínez & Ardila, 2017). En esta metodología, se realiza inmersión del tejido vegetal objeto de estudio (tallos o raíces) en solución buffer fosfato pH 6,5, 0.1 M, NaCl 50 mM y 0.1% de β -mercaptoetanol (v/v), con posterior tratamiento con 3 pulsos de vacío de 20 s a 70kPa. Luego de centrifugar a 1000 x g durante 20 min 4°C, en dos ocasiones con el fin de eliminar la mayor cantidad de apoplasto posible (Martínez et al. 2017), el material vegetal remanente se utiliza para obtener la fracción simplástica enriquecida que se destinará a los posteriores análisis de la investigación.

3.3 SELECCIÓN DE CONDICIONES PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ENZIMAS A NIVEL DE SIMPLASTO

3.3.1 Selección de condiciones para la extracción de enzimas a partir de simplasto de raíz y tallo de clavel

Con el fin de seleccionar las mejores condiciones de extracción para las medidas de actividad enzimática, se usaron métodos experimentales reportados previamente para estas enzimas en material vegetal complejo por nuestro grupo de investigación (Ardila & Higuera, 2005; Ardila, Baquero, & Martínez, 2007; Ardila et al. 2011). Con el fin de mantener la estabilidad y eliminar interferentes durante las determinaciones enzimática, se

evaluaron tres tratamientos de extracción (T1, T2 y T3) para las enzimas guayacol peroxidasa (GPX), polifenoloxidasas (PFO), lipoxigenasa (LOX) y fenilalanina amonio liasa (PAL) (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos de extracción evaluados para la obtención de extractos enzimáticos enriquecidos de simplasto.

Tratamiento	Tratamiento con acetona	Buffer de extracción
T1	No	Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ pH 6,5 100 mM
T2	Si	Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ pH 6,5 100 mM
T3	Si	Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ pH 6,5 100 mM + PVPP 1%

Las condiciones de extracción para la enzima PLD se mantuvieron bajo los mismos tratamientos, pero evaluando el buffer Tris-HCl pH 7,0 50 mM; esto es debido a la interferencia que presentan los iones fosfatos con cofactores como el ión Ca⁺² requeridos en la determinación de la actividad enzimática (Herman & Chrispeel, 1980).

El protocolo de extracción consistió en pesar 0,2 g del material vegetal enriquecido en simplasto macerado con nitrógeno líquido, en tubos eppendorf independientes por triplicado. En el caso de los tratamientos T2 y T3, se les adicionó 1 mL de acetona fría (-20°C) y después de agitar por 30 s se centrifugó a 10 000 g por 10 minutos. Este procedimiento se realizó dos veces con la completa eliminación del solvente en cada centrifugación. La extracción de las enzimas tanto para el material macerado intacto (T1), como para el material previamente tratado con acetona (T2 y T3), se llevó a cabo mediante agitación con la solución extractante correspondiente. Finalmente, el extracto enriquecido se centrifugó a 12 000 g por 30 minutos, siendo transferido a un tubo eppendorf para ser almacenado a -20°C para la posterior determinación de actividades enzimáticas.

Las condiciones descritas anteriormente fueron utilizadas para la extracción de PLD, pero utilizando el buffer de extracción Tris-HCl 50 mM pH 7,0. Todas las extracciones se realizaron por triplicado para cada órgano de la planta y para cada tratamiento. La selección de las mejores condiciones de extracción se llevó a cabo utilizando el programa Statgraphics 16.0, con un análisis de varianza sencillo (ANOVA), evaluando diferencias entre tratamientos y un nivel de significancia de 0,05 ($\alpha=0,05$). Las actividades enzimáticas se

determinaron por métodos espectrofotométricos de acuerdo con las condiciones que son descritas posteriormente.

3.3.1.1 Determinación de la actividad de la enzima Guayacol peroxidasa (E.C. 1.11.1.7)

La cuantificación de la actividad de la actividad GPX, se realizó de acuerdo a Mandal et al. (2008) con las modificaciones de Ardila (2013). Para ello se midió la oxidación de guayacol a tetraguayacol por métodos espectrofotométricos. La mezcla de reacción consistió en 300 μ L de buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM pH 5,0, 100 μ L de guayacol 40 mM, 100 μ L de peróxido de hidrogeno 40 mM y 10 μ L del extracto simplástico. La formación de tetraguayacol se siguió a una longitud de 470 nm durante 2 minutos con lecturas enzimáticas cada 10 s, empleando un espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV. Los resultados se expresaron como μ mol de tetraguayacol producido/min*mg proteína.

3.3.1.2 Determinación de la actividad de la enzima Polifenoloxidasas (E.C. 1.14.18.)

La determinación de la actividad para PFO se realizó de acuerdo a lo reportado en estudios previos en el grupo de investigación (Ardila & Higuera, 2005). La mezcla de reacción consistió en mezclar 50 μ L del extracto simplástico y 400 μ L del catecol 100 mM en buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5 100 mM. La actividad de dicha enzima se siguió por la oxidación de catecol a quinona a una longitud de onda de 475 nm durante 2 minutos, usando el espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV. Los resultados se expresaron como μ mol de quinona/min*mg proteína.

3.3.1.3 Determinación de la actividad de la enzima Lipoxigenasa (E.C. 1.13.1.13)

La actividad de LOX se midió por método espectrofotométrico (Kermasha, Dioum & Bisakowski, 2001) con algunas modificaciones realizadas en esta investigación. Previo a la adición del extracto simplástico, el sustrato se agitó por 25 minutos a 30°C. Dicho sustrato consistió en 10 μ L ácido linoleico en 900 μ L de buffer Tris-HCl (100 mM pH 9) con la adición de iso-octano (4%). La mezcla de reacción se agitó por 10 minutos a 25°C y la actividad de LOX se determinó por la formación de Ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE) a 234 nm. El blanco de reacción se trabajó a las mismas condiciones, pero con

la enzima previamente desnaturalizada (15 minutos a 92°C). La actividad de la enzima se expresó como μmol de HPETE/min*mg de proteína.

3.3.1.4 Determinación de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (E.C. 4.3.1.5)

La actividad PAL se determinó por métodos espectrofotométrico (Assis, Maldonado, Muñoz, Merodio & Escribano, 2001) con algunas modificaciones de acuerdo con Ardila et al. 2007. Para la medición de PAL, 100 μL del extracto simplástico fueron adicionados a 400 μL de L-fenilalanina 20 mM en buffer Tris-HCl (100 mM, pH 9) e incubado 15 min a 37°C. La reacción enzimática fue detenida por calentamiento (15 min a 92°C) y posteriormente el ácido cinámico generado se evaluó por absorbancia a una longitud de onda de 270 nm. Como blanco de reacción se emplearon las mismas condiciones, pero con el extracto enzimático previamente inactivado por calentamiento (15 min a 92°C) (espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV). La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de ácido cinámico por minuto. La actividad de la enzima se expresó como nmol de ácido cinámico/min*mg de proteína.

3.3.1.5 Determinación de la actividad de la enzima fosfolipasa D (E.C. 3.1.4.4)

La cuantificación enzimática de PLD se realizó de acuerdo a lo reportado por Cha, Lee, Koh y Choi (1994), con modificaciones para esta especie vegetal implementadas en la presente investigación. La mezcla de reacción consistió en 20 μL de extracto simplástico, 20 μL buffer Tris-HCl 50 mM pH 7, CaCl_2 12 mM y 15 μL de *p*-Nitrofenilfosforilcolina (*p*-NPPC) 15 mM. La reacción se incubó a 37°C por 15 minutos y la actividad se determinó por la liberación de *p*-nitrofenol detectado a 405 nm, empleando un espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV. El blanco de reacción se trabajó a las mismas condiciones, pero con la enzima previamente desnaturalizada (15 minutos a 92°C). La actividad de PLD se expresó como μmol de *p*-nitrofenol/min*mg de proteína.

3.3.2 Cuantificación de proteína

Se determinó según el método Bradford linealizado por Zor & Sellinger (1996). Se empleó una curva de calibración con una solución patrón 1mg/1mL de BSA en un rango de 1-15 µg de proteína. Para la reacción se toman 20 µl de extracto y 500 µl de reactivo de Bradford, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se hicieron lecturas a 450 nm y 590 nm.

3.3.3 Selección de condiciones experimentales para la determinación de los niveles de actividad para las enzimas en estudio (GPX, PFO, LOX, PAL y PLD) en simplasto de tallos y raíces de clavel

Una vez seleccionadas las condiciones de extracción de las enzimas simplásticas objeto de estudio, se procedió con la selección de los parámetros para la determinación de las actividades enzimáticas. Teniendo en cuenta que era la primera vez que se trabaja con la fracción simplástica en tallo y raíz de clavel, fue necesario seleccionar parámetros como pH, temperatura y concentración de sustrato, para cada una de las enzimas. Dicha selección fue necesaria para tener la mayor sensibilidad en las determinaciones. La tabla 2 resume los parámetros evaluados para cada una de las enzimas objeto de estudio de acuerdo a las metodologías anteriormente descritas. La selección se realizó de manera escalonada, en donde una vez identificada la primera variable, se procedía con la siguiente.

Tabla 2. Condiciones evaluadas para la determinación de las enzimas GPX, PFO, LOX, PAL y PLD.

Parámetros	GPX	PFO	LOX	PAL	PLD
pH	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	4, 5, 6.5, 7, 8, 9	7, 8, 9, 10	5, 6, 7, 8, 8.5, 9, 9.15	4, 5, 6, 7, 8
Temperatura (°C)	5, 20, 30, 40, 50, 90	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60	--	5, 20, 30, 40, 50, 90	--
Concentración de sustrato (s)	5, 10, 20, 30, 40, 60 mM Guayacol 40 mM H ₂ O ₂	10, 30, 50, 80, 150, 200, 250 mM Catecol	24, 34, 50, 67, 84, 100 mM ácido linoleico	5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 mM L-fenilalanina	2, 5, 7, 9, 12, 15, 20 mM <i>p</i> -NPPC

3.4 EVALUACIÓN A NIVEL DE SIMPLASTO DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS DURANTE LA INOCULACIÓN CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* RAZA 2

En esta investigación, se buscó evidencia experimental de la activación a nivel del simplasto, de la biosíntesis de hormonas de señalización y de enzimas asociadas con la resistencia del clavel al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Para tal fin, se realizó un ensayo *in vivo* en el cual esquejes de clavel con tres semanas de enraizamiento de la variedad Solex (Susceptible) y Golem (Resistente), fueron inoculados con el patógeno de acuerdo a las condiciones reportadas en estudios previos (Ardila, 2013). Luego de la inoculación se realizaron muestreos a diferentes días post-inoculación (dpi) (0, 1, 2, 7 y 14 dpi), de acuerdo con las condiciones establecidas previamente y al diseño experimental descritos más adelante. Así mismo, se evaluó durante este periodo algunos parámetros bioquímicos y moleculares que permitían determinar la respuesta de las variedades a la interacción con el patógeno, como lo son acumulación de hormonas como: ácido salicílico (SA), salicilato de metilo (MeSA), ácido jasmónico (JA) y jasmonato de metilo (MeJA), contenido total de fenoles, y actividad enzimática de: Guayacol peroxidasa (GPX), polifenoloxidasas (PFO), lipoxigenasa (LOX), fosfolipasa D (PLD) y fenilalanina amonio liasa (PAL). Los tiempos seleccionados se establecieron con el fin de encontrar respuestas tempranas en donde se presentan fenómenos de defensas determinantes de la interacción en la variedad resistentes (1 y 2 dpi) (Ardila & Higuera, 2005; Ardila, Torres, Martínez & Higuera, 2014) y respuestas más tardías asociadas a etapas donde se presume puede iniciar la colonización de la planta por parte del patógeno en la variedad susceptible (7 y 14 dpi).

3.4.1 Multiplicación del patógeno y preparación del inóculo

El aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2 fue suministrado por la empresa QFC SAS-Florval a partir de variedades susceptibles con sintomatología típica de marchitamiento vascular. Por medio de microscopía (40X) se evidenciaron las macroconidias características de la especie y la raza se identificó a través de herramientas moleculares como PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) (Abd-

elsalam, Aly, Abdel-satar, Khalil & Verreet, 2003; Chiocetti et al. 2009). El patógeno se mantuvo en medio PDA hasta la preparación del inóculo.

La obtención del inóculo se realizó a partir de un aislamiento previamente revirulentado por inoculación en esquejes de claveles susceptibles al marchitamiento vascular. En dicho proceso, los esquejes son inoculados y mantenidos como es descrito por Ardila (2013). Posterior a las 6 semana post-inoculación, cuando la sintomatología de marchitamiento se hizo evidente, los esquejes se colectaron y posteriormente fueron seccionados a 1cm de la raíz. Estos cortes de aproximadamente 4 mm de espesor son lavados dos veces con agua destilada por 30 s, una vez con solución de hipoclorito al 1% por 30 s, una vez con solución de etanol al 10% por 30 s, y finalmente con agua estéril por 30 s. Posteriormente, el tejido es sembrado en medio PDA y mantenido a 25°C por 5 días. La presencia de micelio sobre el tejido en estudio, permitió la recuperación del patógeno revirulentado. A partir de esta se realiza pases diferentes a cajas de Petri con medio sólido de PDA con el fin de realizar la preparación del inóculo.

Para la preparación del inóculo, la propagación masiva de conidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2, se realizó en medio líquido Czapek Dox Brott a 25°C y en agitación durante 5 días. Cumplido este periodo, el medio se filtra en condiciones asépticas para retirar el micelio sobrenadante y se lleva a una concentración de 1×10^6 conidias/mL (por conteo con cámara de Neubauer). Esta suspensión fue utilizada para la inoculación del material vegetal descrita en el siguiente numeral.

3.4.2 Ensayo *in vivo* y mantenimiento del material vegetal

Para la inoculación se utilizó esquejes de clavel con distintos niveles de resistencia, los cuales fueron proporcionados por la empresa Florval QFC SAS. El proceso de inoculación se realizó de acuerdo con lo reportado en Higuera, 2001. Para los tratamientos inoculados, la mitad de los esquejes de cada una de las variedades (Golem y Solex), se inocularon por inmersión de las raíces durante 30 s en una suspensión de 1×10^6 conidios/mL. Los esquejes se sembraron en bandejas con sustrato libre de patógenos y en una mezcla de suelo y cascarilla de arroz en una relación 50/50. Dicho sustrato se inoculó con una solución nutritiva que contenía una concentración de 1×10^3 conidios/mL. La otra mitad de los esquejes fueron tratados con agua estéril y mantenidos en el mismo sustrato con

solución nutritiva, pero sin la adición de inóculo. Esto constituye 4 tratamientos: Resistente control (T1), Resistente inoculado (T2), Susceptible control (T3) y Susceptible inoculado (T4). Los tratamientos se mantuvieron bajo las mismas condiciones y temperatura con riego de agua por aspersión. La distribución de los esquejes fue completamente al azar de acuerdo con el diseño experimental completamente aleatorizado propuesto (Figura 6).

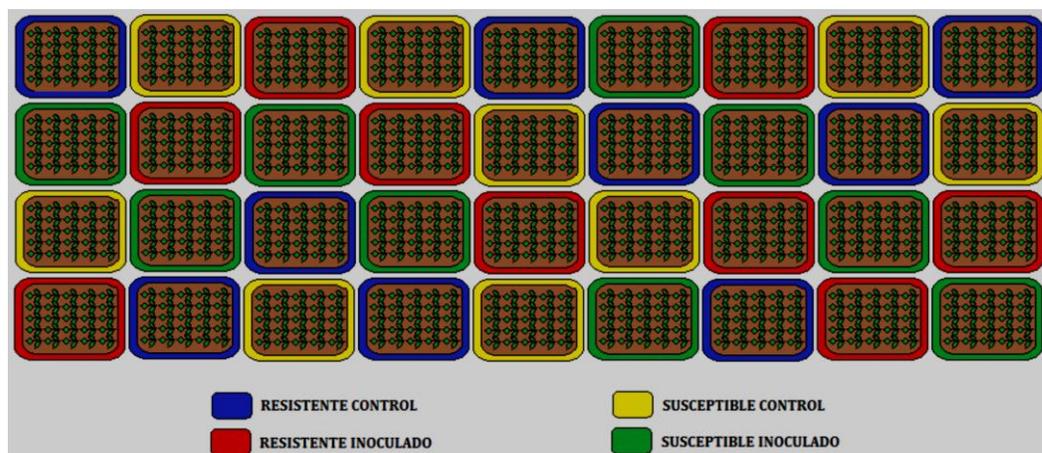


Figura 8. Diseño experimental del ensayo in vivo de variedades de clavel inoculadas con el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2.

3.4.3 Determinación de actividades enzimáticas de GPX, PFO, LOX, PAL y PLD durante la inoculación con el patógeno

Bajo las condiciones de extracción y cuantificación previamente seleccionadas para cada una de las enzimas, se evaluó su posible inducción diferencial en simplasto de tallos y raíces de clavel durante la interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. En cada una de las determinaciones se realizó para todos los tratamientos, en los tiempos indicados, usando triplicado biológico y duplicado técnico.

3.4.4 Preparación de los extractos metabólicos en simplasto

La extracción de los compuestos metabólicos se realizó utilizando metanol al 80% (Biglari, AlKarkhi & Easa, 2008) con ligeras modificaciones por Ardila (2013). La obtención del extracto se llevó a cabo con la adición de 1 mL de solvente en 200 mg, de material vegetal enriquecido en simplasto previamente macerado. El homogeneizado se sometió a ultrasonido durante 15 minutos, después de la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se almacenó en la oscuridad a -20°C, para los análisis descritos

posteriormente. Las evaluaciones se realizaron usando triplicado biológico y duplicado técnico.

3.4.5 Determinación del contenido total de fenoles en simplasto de raíz y tallo de clavel

El contenido total de compuestos fenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía 50 μL de los extractos metanólicos, 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y 100 μL de H_2O destilada-desionizada. Después de 5 min se adicionaron 200 μL de Na_2CO_3 7% y 200 μL de agua destilada-desionizada. La mezcla de reacción se midió luego de 1 h de incubación a T amb a una absorbancia de 764 nm (espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV). Se comparó con una curva de calibración preparada usando 0, 5, 10, 15, 20, 25, 35, 50 ppm de ácido gálico (Sigma®). Los resultados de fenoles totales fueron dados como ppm de ácido gálico por mg de material vegetal.

3.4.6 Determinación de ácido salicílico, ácido jasmónico, salicilato de metilo y jasmonato de metilo en simplasto de raíz y tallo de clavel

La determinación cuantitativa de las hormonas vegetales, ácido salicílico y ácido jasmónico, con sus correspondientes esteres metílicos, se realizó mediante HPLC usando patrones de referencia en cada caso. Para ello alícuotas de 200 μl del extracto metanólico, fueron concentradas en un concentrador al vacío (*speed vac*), para posteriormente redissolver en 200 μl de una solución de acetonitrilo/metanol/agua (1:1:12, v/v/v) (Floerl et al. 2012). Esta solución se filtró (PTFE 0,45 μm) y se depositó en un inserto dentro de un vial. Se inyectaron 10 μL de la muestra a un cromatógrafo líquido Shimadzu® prominence LCMS 2020. Se utilizó una columna RP-18 Phenomenex® (250 mm x 4.60 mm, 5 micras) y un detector UV-VIS Prominencia® PDA. Las condiciones de separación fueron las siguientes: fase móvil A: HCOOH 0,1%, fase móvil B: Acetonitrilo 100%, con el gradiente que se describe a continuación: 0-3 min A 100%, 18-21 min B 7%, 40-45 min B 30%, 59-63 min B 100% y finalmente 66-70min B 0%. El Flujo usado fue de 0,7 mL/min y la detección de los metabolitos fue monitoreada desde las longitudes de onda 190 a 800 nm.

Se realizaron curvas de calibración con patrones estándar comerciales para determinar la concentración y el tiempo de retención de los metabolitos de interés en los extractos obtenidos a partir de los tejidos de interés. Los patrones utilizados fueron ácido jasmónico (Sigma-Aldrich), ácido salicílico (Sigma-Aldrich), salicilato de metilo (Sigma-Aldrich) y jasmonato de metilo (Sigma-Aldrich). Las áreas bajo la curva para cada señal de interés fueron determinadas en cada uno de los extractos para la cuantificación de cada metabolito, usando como longitud de onda de análisis 270nm. Se verificó el posible efecto matriz en los tiempos de retención de los compuestos eluidos y que los valores encontrados en las muestras obtenidas del clavel, se encontraran dentro de los valores de concentración usados en la curva de calibración. Los resultados se expresaron como μg del metabolito por mg de material vegetal, usando triplicado biológico en cada uno de los tratamientos. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía utilizando Statgraphics 16.0.

3.5 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE LAS ENZIMAS GPX Y PAL EN TALLOS Y RAICES DE CLAVEL USANDO RT-qPCR

Considerando los resultados obtenidos en términos de la actividad enzimática durante el ensayo *in vivo*, se determinaron los niveles transcripcionales de los genes codificantes para las enzimas PAL y GPX, a nivel de tallo y raíz durante la inoculación con el patógeno. Para ello se empleó la técnica RTqPCR de acuerdo a estudios previos del grupo de investigación (Ardila, 2013) y usando como gen de referencia el codificante para una histona (Monroy, Chacón, Farfán, Peralta & Ardila, 2018). Para ello, tanto tallos como raíces de clavel fueron macerados con nitrógeno líquido en un mortero previamente lavado con una solución de dietil pirocarbonato (DEPC) y autoclavado. Se pesaron aproximadamente 0,4 g de raíces y 0,2 g de tallos del material macerado y se llevó a cabo la extracción utilizando Trizol (Invitrogen ®) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El RNA se cuantificó por lecturas de absorbancia a 260 nm (Genesys ® 10UV Thermo). Para asegurar la calidad de los ácidos nucleicos usados en las determinaciones, se usó la relación A260/A280 entre 1,9 hasta 2,0 como criterio de pureza. Para evitar la contaminación de ADN, se trató 2 μg de RNA total con ADNasa de acuerdo con las

condiciones recomendadas por el proveedor. Posteriormente, la síntesis de cDNA a partir de RNA se realizó utilizando oligo dT y la transcriptasa inversa M-MLV (virus de leucemia murina de Moloney (Invitrogen®) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El análisis transcripcional se realizó sobre este cDNA usando la técnica *realtime* PCR. Para ello se usó el reactivo SYBR® Green MasterMix IQ™ de Biorad y el equipo C1000Thermalcycle acoplado a un CFX96 Biorad del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Con el fin de usar la misma cantidad de cDNA en cada reacción (10 ng), se realizó cuantificación por fluorescencia (Qbit® Invitrogen). La determinación de niveles transcripcionales se realizó usando la aproximación relativa (Pfaffl, 2001) teniendo como gen de referencia, el codificante para una histona reportado con la identificación *Dca5219.1* en el genoma del clavel (<http://carnation.kazusa.or.jp/>). De acuerdo con estudios del grupo de investigación, este gen puede ser usado como gen de referencia en la interacción clavel-*Fod* (Monroy et al. 2018).

3.5.1 Diseño de primers

Mediante herramientas bioinformáticas se seleccionaron aquellas secuencias sobre las cuales se realizaría el diseño de primers, cumpliendo que correspondieran a isoformas simplásticas de las enzimas GPX y PAL. Para ello, se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma del clavel (<http://carnation.kazusa.or.jp/>), de secuencias codificantes para las enzimas objeto de estudio. Posteriormente sobre aquellas secuencias seleccionadas, se evaluó la presencia de secuencias codificantes para péptidos señal de localización intracelular, se acuerdo al protocolo sugerido en estudios de proteínas apoplásticas (Martínez-González et al. 2018) En el caso de la GPX, se seleccionaron la secuencia *Dca3620.1* y *26220.1*, las cuales, al no presentar péptido señal, fueron clasificadas como posibles isoformas simplásticas. Sobre dichas secuencias se realizó el diseño de primers usando la herramienta *primer 3*, generando primers para dichas secuencias, que cumplieran con los requerimientos necesarios para los análisis en RT-qPCR, como son tamaño entre 100 y 300pbs, su composición en términos de G/C y la temperatura de anillaje. Posteriormente después de verificar la amplificación de los primers en cDNA obtenido a partir de tallo y raíz de clavel, se seleccionó la pareja de primers *Dca3620.1* descrito en la tabla 3.

En el caso de la PAL, se tomó una pareja de primers previamente diseñados en nuestro grupo de investigación (Ardila, 2013). Para verificar que dicho primers fuera de secuencia codificante a nivel de simplasto, se tomó la secuencia Dca 57541.1 de clavel a partir de la cual fueron diseñados y se verificó por signal P y Target P su localización intracelular (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de primers usados para la cuantificación por PCR en tiempo real de los niveles de mRNA para los genes codificantes para GPX y PAL.

Nombre de la proteína	Primers	Secuencia 5´-3´	Tamaño del fragmento
Guayacol peroxidasa	GPX directo	CGCCAACACGACTAATACGA	161
	GPX reverso	TGACAGCGAAACTCTTGACAG	
Fenilalanina amonio liasa	PAL directo	ACTTGGTCCCGCTTTCCTAC	85
	PAL reverso	GTGAGGATCTCACCGTTGG	
Histona	HIS directo	CACAGGTACCGTCCTGGAAC	160
	HIS reverso	GTGCCAACACAGCATGACTC	

3.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación se llevó a cabo usando el programa Statgrafics 16.1, utilizando un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de 0,05 ($\alpha=0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

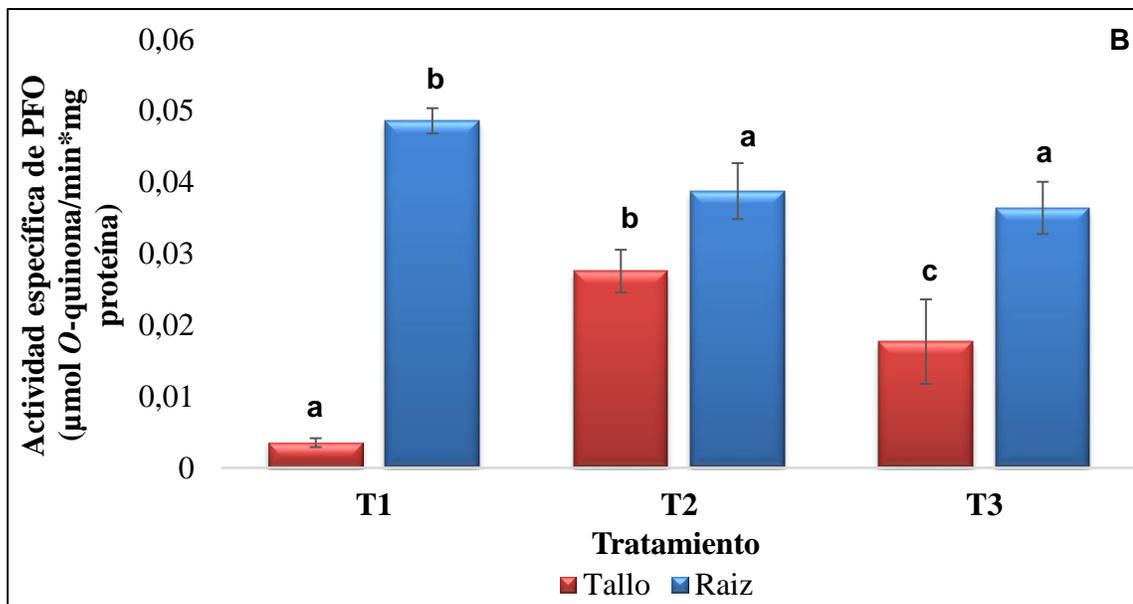
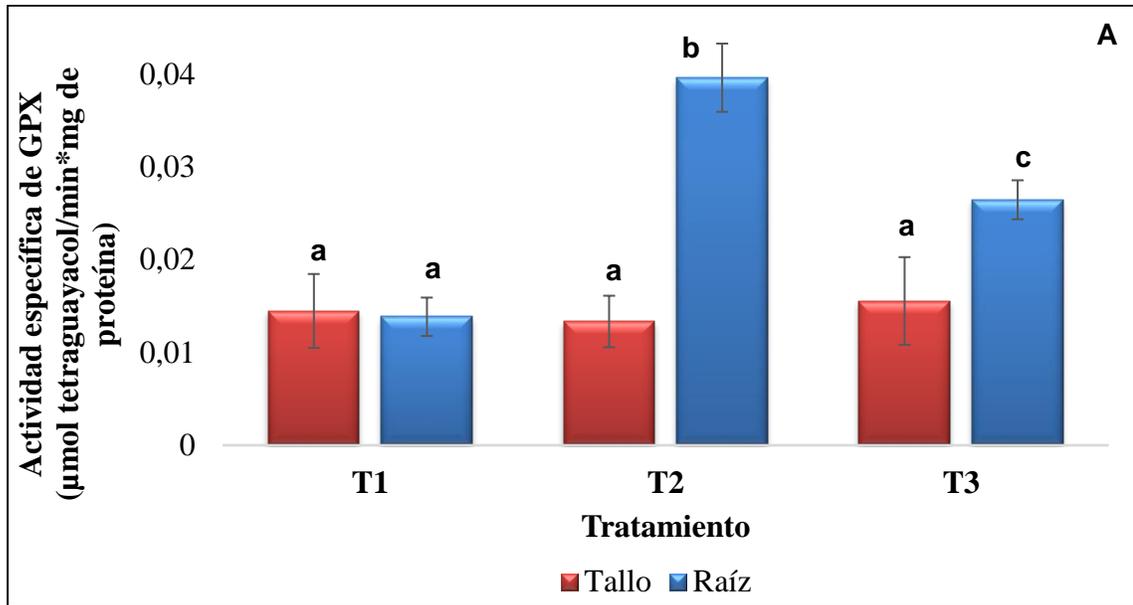
4.1 SELECCIÓN DE CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE SIMPLASTO A PARTIR DE RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL

La capacidad de reconocer patógenos potenciales es una habilidad determinante en la supervivencia de las plantas (Hammond-kosack & Jones, 2015), durante este reconocimiento se desencadenan cambios bioquímicos y fisiológicos profundos en las células vegetales. A pesar de los estudios que describen la importancia de estas respuestas bioquímicas a diferentes niveles subcelulares, a la fecha los estudios bioquímicos en clavel se han enfocado exclusivamente en el análisis de extractos totales que no permiten discriminar y determinar el papel que cumplen los diferentes compartimientos de la célula vegetal en la respuesta a *Fod*. Es por ello que, en el presente estudio, se evalúan dichas respuestas usando extractos enriquecidos con simplasto de la célula vegetal de clavel; es de esperar que, a este nivel en la planta, se activen estos procesos de manera temprana, una vez han ocurrido otros fenómenos propios del reconocimiento inicial y se han desencadenado la expresión de genes de defensa. Para la obtención de esta fracción era necesario previamente, remover la fracción extracelular o apoplástica mediante condiciones experimentales que han sido estandarizadas previamente por nuestro grupo de investigación (Martínez et al. 2017).

Teniendo en cuenta que era la primera vez que se trabaja con la fracción simplástica de tallos y raíces de clavel, era necesario seleccionar las condiciones experimentales de extracción para la obtención de extractos crudos de las enzimas GPX, PFO, LOX, PAL y PLD. Este tipo de procesos son necesarios si se requieren eliminar posibles interferentes en dicha fracción que afectarán posteriormente los resultados (Ardila & Higuera, 2005; cuervo et al. 2009; Arrieta-Guevara, Higuera-Mancipe & Martínez-Peralta, 2010). Para ello

se evaluaron los tres tratamientos de extracción descritos en la sección de materiales y métodos (Tabla 1).

Los resultados encontrados para las enzimas GPX y PFO, en extractos enriquecidos de simplasto de raíz y tallo, se presentan en la gráfica 1 (A y B). Se observa que los mayores niveles de actividad GPX obtenida de raíces, se presentaron para el tratamiento 2, el cual incluye lavados previos con acetona fría (-20°C) y posterior extracción con buffer fosfato pH 6,5 100mM. De igual manera, los mayores niveles de actividad PFO para simplasto de tallo, se presentaron para este mismo tratamiento. Aunque en los demás órganos no existen diferencias entre los tratamientos, es evidente con estos resultados, que los lavados con acetona permitieron eliminar compuestos interferentes que pueden inhibir la actividad de las enzimas objeto de estudio (Gegenheimer, 1990). Estos resultados también indicaron que la adición del compuesto polivinilpolipirrolidona (PVPP) en el buffer de extracción (T3), no generó un aumento en la actividad de estas enzimas. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados en este tipo de enzimas para las que se ha descrito que el tratamiento con acetona es un requisito para su análisis espectrofotométrico (Ardila & Higuera, 2005; Ardila, 2006). En el caso de las enzimas GPX en tallos y PFO en raíces, fue evidente que el efecto favorable en la actividad al realizar el tratamiento con acetona no se presentó; esto evidencia que efectivamente existe una distribución diferencial de isoenzimas que pueden tener diferencias en su sensibilidad tanto al solvente, como a los componentes interferentes presentes en la matriz. Esto confirma que es necesario siempre realizar ensayos previos de extracción con el fin de realizar estudios de una enzima en una matriz vegetal particular. Sin embargo, es claro que se debe seleccionar un solo tratamiento para las diferentes enzimas con fines comparativos; teniendo en cuenta los resultados presentados hasta este momento, se propone que T2 tiene el potencial para ser el tratamiento a seleccionar.

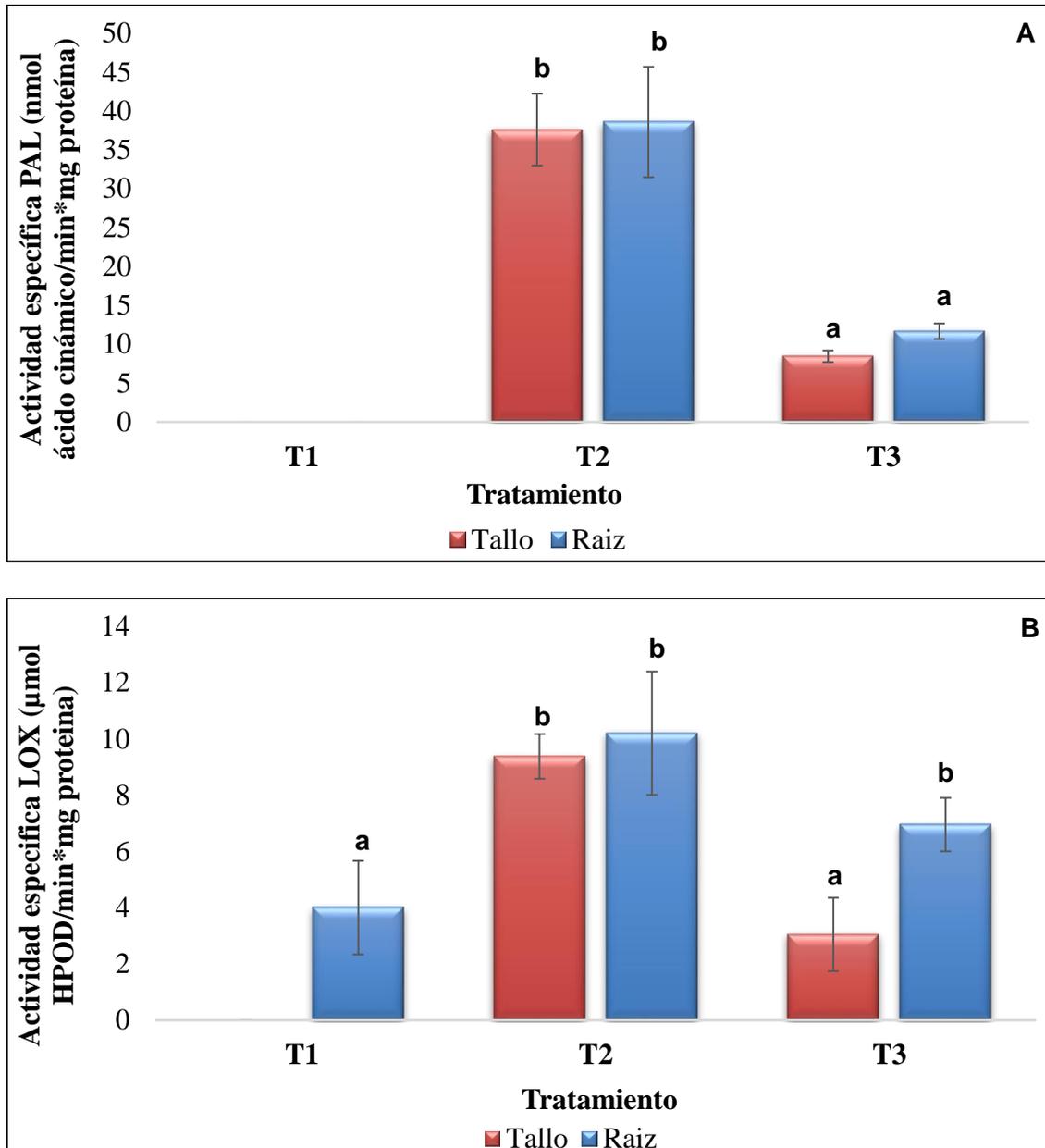


Gráfica 1. Niveles de actividad de las enzimas A) GPX y B) PFO en simplasto de raíz y tallo de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) de los diferentes buffers de extracción empleados. T1 = Buffer fosfato 100 mM pH 6,5 T2 = Lavados con acetona fría (-20°C) +Buffer fosfato 100 mM pH 6,5; T3 = Lavados con acetona fría (-20°C) +Buffer fosfato 100 mM pH 6,5+1% polivinilpolipirrolidona (PVPP). Cada barra representa el promedio de las réplicas biológicas, así mismo se reporta la desviación estándar de cada tratamiento (n = 3). Las diferencias entre tratamientos se reportan con letras diferentes ($P < 0,05$).

Por otra parte, el tratamiento que mejores resultados generó en las condiciones de extracción para la enzima PAL en ambos tejidos evaluados fue este mismo tratamiento T2 (Gráfica 2A). Este efecto favorable en la extracción para PAL en simplasto de clavel ha sido ya descrito en otras especies vegetales (Arrieta-Guevara et al. 2010, González-Mendoza et al. 2018). La disminución de la actividad enzimática observada para PAL

empleando T1, es muy probablemente debida al efecto inhibitorio que presentan los compuestos fenólicos y otros compuestos que son eliminados con la acetona en T2 y T3. Es evidente que el uso de PVPP en el buffer de extracción (T3), disminuye la actividad enzimática PAL, muy probablemente al efecto que tiene este compuesto en la formación de complejos con proteínas (Cutler, 2004); este efecto generaría que estas se retengan en la fase insoluble y no puedan ser finalmente obtenidas en el extracto enzimático. Esta disminución de la actividad presentada por PAL empleando PVPP ya ha sido previamente reportada en clavel, usando material completo (Ardila et al. 2007).

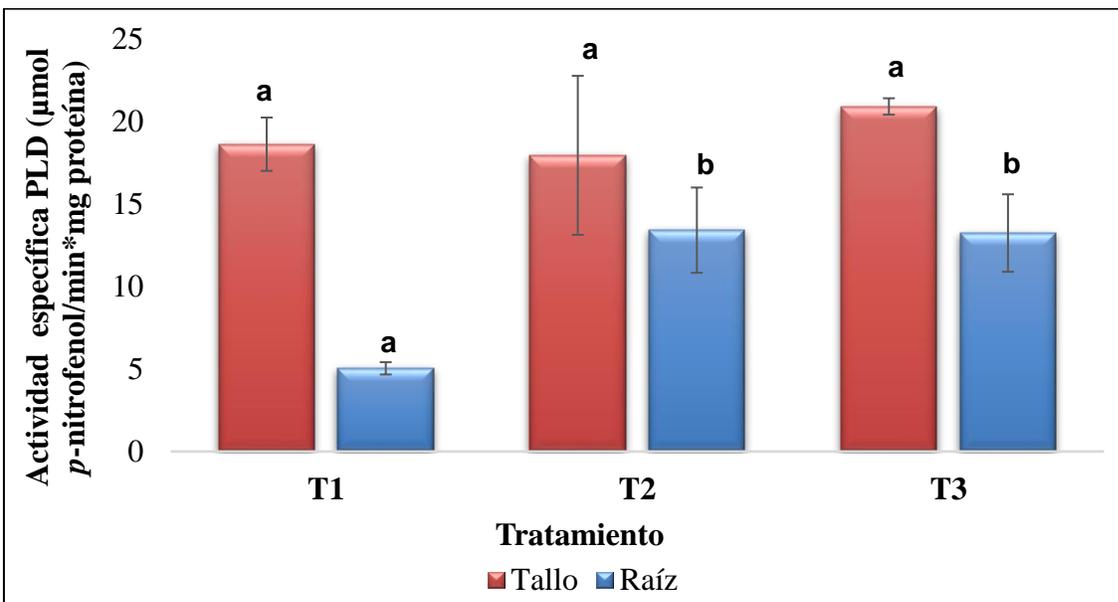
De manera similar a lo encontrado para PAL, en LOX, el tratamiento T2 es el que presenta los mejores resultados de extracción (Gráfica 2B). Es probable que el efecto inhibitorio por la presencia de los compuestos fenólicos en los extractos, también se presente para esta enzima. Estos resultados coinciden con reportes que indican que los compuestos fenólicos pueden afectar negativamente la capacidad catalítica de esta enzima, al unirse covalentemente a un ión ferroso (Fe^{+2}), que se encuentra en el sitio activo (Chedea & Jisaka, 2011; Skrzypczak-Jankun, Chorostowska-Wynimko, Selman & Jankun, 2007). En general, los resultados encontrados para la actividad LOX en simplasto de clavel concuerdan con resultados similares en extracto crudo de otros modelos vegetales (Gökmen, Serpen, Atli & Köksel, 2007; Anthony et al. 2017). Por último, es importante resaltar que este es el primer reporte de la extracción de LOX a nivel de simplasto de tallo y raíz de clavel, estudios anteriores se habían realizado empleando solamente extractos totales de pétalos (Berry, Debat & Larreta-Garde, 1997).



Gráfica 2. Niveles de actividad de las enzimas A) PAL y B) LOX en simplasto de raíz y tallo de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) de los diferentes buffers de extracción empleados. T1 = Buffer fosfato 100 mM pH 6,5 T2 = Lavados con acetona fría (-20°C) +Buffer fosfato 100 mM pH 6,5; T3 = Lavados con acetona fría (-20°C) +Buffer fosfato 100 mM pH 6,5+1% polivinilpolipirrolidona (PVPP). Cada barra representa el promedio de las réplicas biológicas, así mismo se reporta la desviación estándar de cada tratamiento (n = 3). Las diferencias entre tratamientos se reportan con letras diferentes ($P < 0,05$).

Con respecto a la enzima PLD, es importante comentar que para su extracción se utilizó el buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.0, debido a que el uso de soluciones buffer de sales de fosfatos en presencia de CaCl_2 , generan una precipitación de sales insolubles. Esto genera una disminución del Ca^{2+} soluble, el cual es empleado como co-factor por esta enzima (Cha et al. 1994; Wang, 2001). Los resultados encontrados (Gráfica 3), indicaron que no existen

diferencias significativas entre los diferentes tratamientos evaluados a nivel del tallo; las diferentes condiciones de extracción no generan cambios en la estructura de esta enzima y los posibles inhibidores presentes en T1 no afectan su actividad. Esto no sucede en el caso de la raíz considerando que los tratamientos que incluyen lavados previos con acetona (T2 y T3), presentan niveles superiores de actividad para esta enzima. De todas maneras, es evidente que usando el tratamiento T2, se puede realizar una extracción adecuada en ambos órganos de la planta. Es evidente que bajo dichas condiciones no hay cambios conformacionales que afectan la accesibilidad del sustrato o en general la estructura nativa de la enzima; se ha reportado que los posibles inhibidores presentados en el T1 pueden tener un efecto importante en la actividad de esta enzima (Pappan & Wang, 1999; Sandoval, 2012).



Gráfica 3. Niveles de actividad de las enzimas PLD en simplasto de raíz y tallo de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) de los diferentes buffers de extracción empleados. T1 = Buffer Tris-HCl pH 7,0 50 mM T2 = Lavados con acetona fría (-20°C) +Buffer Tris-HCl pH 7,0 50 mM; T3 = Lavados con acetona fría (-20°C) +Buffer Tris-HCl pH 7,0 50 mM +1% polivinilpolipirrolidona (PVPP). Cada barra representa el promedio de las réplicas biológicas, así mismo se reporta la desviación estándar de cada tratamiento (n = 3). Las diferencias entre tratamientos se reportan con letras diferentes ($P < 0,05$).

Una vez evaluadas las diferentes condiciones de extracción para las enzimas GPX, PFO, PAL, LOX y PLD a partir de simplasto de tallo y raíz en clavel, es evidente que en su mayoría presentan características bioquímicas similares, viéndose afectadas por algunos interferentes que son eliminados en buena proporción usando acetona. Así mismo fue evidente el efecto negativo que tiene en algunos casos la presencia de la PVPP, el cual

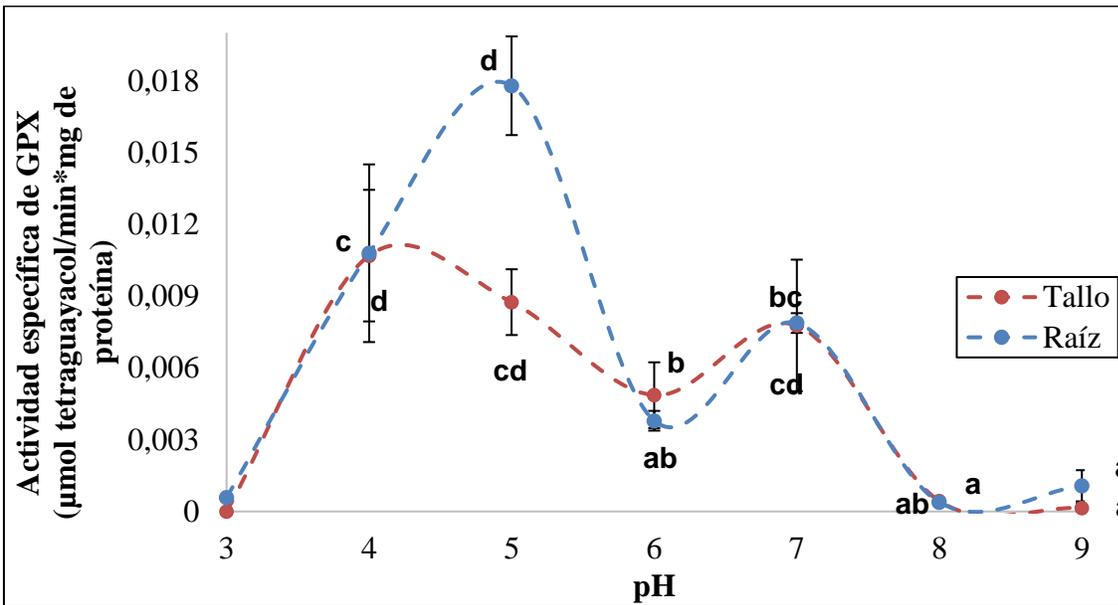
además de retirar potenciales contaminantes, tiene el potencial de retener algunas de las proteínas de interés. Es por ello que el segundo tratamiento (T2), fue el seleccionado para la extracción de las enzimas en el presente estudio. La selección de una única solución extractora para todas las enzimas, además de tener de ventajas experimentales, permite que se puedan realizar análisis comparativos entre ellas de manera más consistente.

4.2 SELECCIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN SIMPLASTO DE RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL

Bajo las condiciones de extracción seleccionadas y teniendo en cuenta que es la primera vez que se trabaja con la fracción simplástica en esta especie vegetal, se llevó a cabo la selección de las mejores condiciones para la determinación de actividades enzimáticas. La selección de los parámetros se realizó teniendo en cuenta reportes previos de literatura y trabajos realizados en nuestro grupo de investigación (Kermasha et al. 2001; Cha et al. 1994; Ardila & Higuera, 2005; Ardila et al. 2007; Cuervo et al. 2009). Se evaluaron para las GPX, PFO, y PAL parámetros como pH, temperatura y concentración de sustrato. Para las enzimas PLD y LOX, teniendo en cuenta la limitación de sustrato, sólo se evaluaron pH y concentración del mismo como parámetros que afectan la actividad enzimática.

4.2.1 Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel

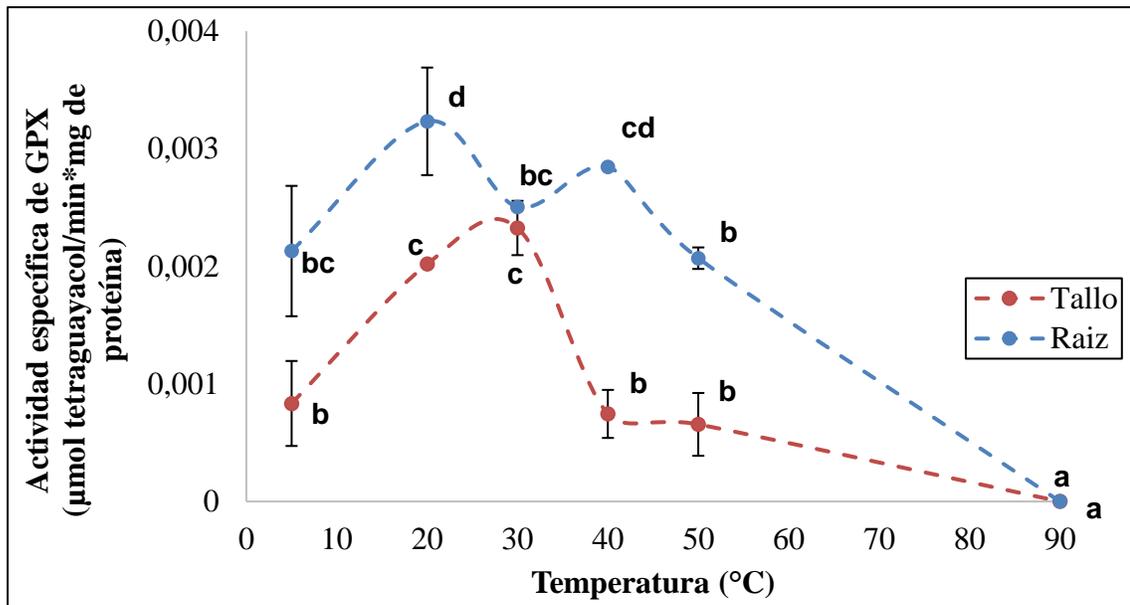
Las peroxidasas contienen un grupo hemo en su sitio activo, cuya función es oxidar donantes de hidrogeno por medio del peróxido de hidrógeno (Ngadze et al. 2012). Para su determinación *in vitro*, se ha usado tradicionalmente la oxidación de diferentes donores de electrones como es el caso del guayacol (Ghamsari, Keyhani & Golkhoo, 2006); este sustrato se ha usado también en el estudio previo de estas proteínas en extractos totales de clavel (Ardila et al. 2014). Los resultados obtenidos en la selección del pH óptimo para GPX a partir de simplasto de tallos y raíces de clavel, se muestra en la gráfica 4.



Gráfica 4. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

A nivel de tallo se observa que los mayores niveles de actividad específica de GPX se obtienen a pH 4. De igual manera, a pH 5 y 7 se pueden realizar determinaciones de la GPX con un alto nivel de sensibilidad. Por el contrario, en condiciones básicas, pH 8 y 9, se presentó una disminución significativa de la actividad, posiblemente debido a cambios conformacionales de la enzima que pueden afectar el sitio activo (Gegenheimer, 1990). A nivel de raíz, en el pH 5 se presentó una mayor actividad con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Teniendo en cuenta que el pH del citosol normalmente se encuentra en el rango de pH (6,5-7,5), es de esperarse que los valores óptimos para esta enzima se encuentren a dichos niveles, no obstante, los resultados sugieren pHs óptimos menores a 7,0, posiblemente debido a la presencia de peroxidasas vacuolares y de peroxisomas, que también hacen parte de la fracción simplástica y las cuales trabajan a pHs ácidos. A pesar de presentar una tendencia similar en tallo y raíz, se presentaron diferencias significativas en el rango de pH 4-6, posiblemente debido a la presencia de isoformas diferenciales de GPX en los tejidos evaluados, como ha sido reportado para otras fuentes vegetales (Hiraga et al. 2000; Passardi, Tognolli, De Meyer, Penel & Dunand, 2006; Mathé, Barrel, Jourda & Dunand, 2010). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionó el pH 5,0 para el estudio de esta enzima en ambos órganos; este pH ha sido reportado previamente en otros estudios de esta enzima por otros autores (Mika

& Lüthje, 2003; Cuervo et al. 2009; Tayefi-Nasrabadi, Dehghan, Daeihassani, Movafegi & Samadi, 2011).

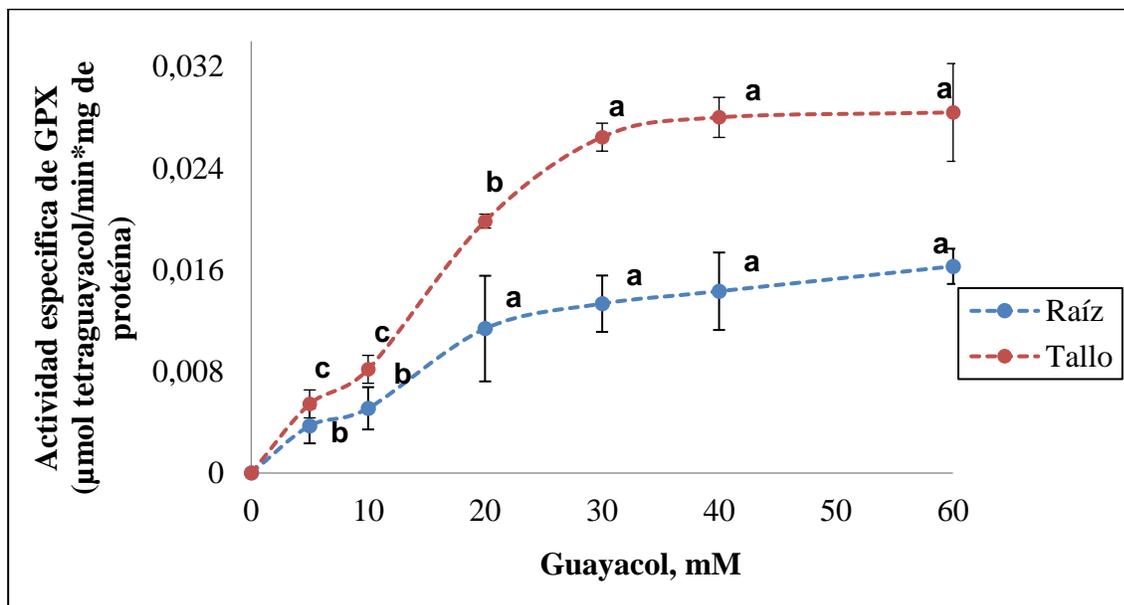


Gráfica 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

El efecto de la temperatura en la actividad de GPX se presenta en la gráfica 5. A nivel de tallo los mayores niveles de actividad se presentaron entre 20-30°C; mientras que a nivel de raíz se observaron diferencias estadísticas significativas a 20 y 40°C ($P < 0,05$). Estos resultados concuerdan con las peroxidasas apoplásticas, citosólicas y solubles de varios tejidos de plantas que muestran temperaturas óptimas entre 30°C y 60°C (Mika & Lüthje, 2003; Bernards et al. 1999). Por otro lado, como era de esperarse, se presentó una disminución de la actividad de GPX a los 5°C y a partir de los 40°C en los tejidos evaluados. A pesar de que a medida que aumenta la temperatura incrementa la velocidad de reacción, un aumento elevado de esta puede afectar negativamente la estabilidad de la enzima y generar desnaturalización, lo que posiblemente conlleva una disminución de la actividad catalítica de GPX a temperaturas mayores de 40°C (Bisswanger, 2013).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionó 20°C como temperatura de trabajo para esta enzima. Otros reportes relacionados con peroxidasas han reportado temperaturas en estos mismos rangos. Por ejemplo, las temperaturas de trabajo para GPX de *Solanum tuberosum* que se encuentran entre 40°C y 60°C (Bernards et al. 1999) y de 0-20°C para una GPX de *Fagopyrum esculentum* (Suzuki, Honda, Mukasa & Kim, 2006).

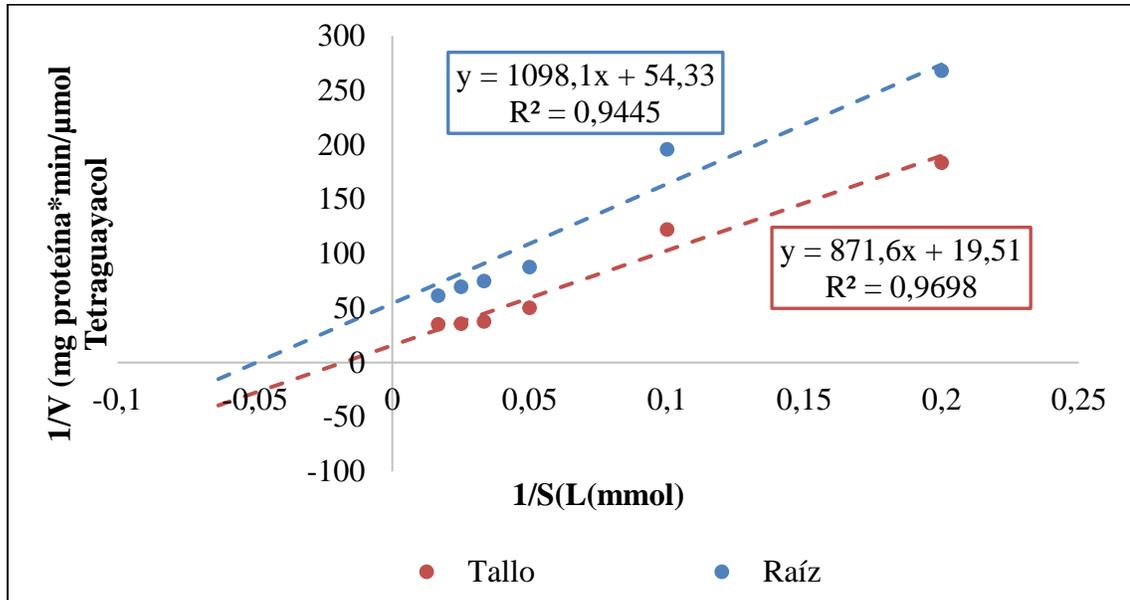
La grafica 6 presenta el efecto de la concentración de guayacol a una concentración constante de H₂O₂ sobre la actividad GPX de simplasto de tallo y raíz de clavel. Las GPX oxidan un amplio rango de sustratos con una alta especificidad a compuestos de tipo fenólico, como es el caso del guayacol (Almagro et al. 2009). Particularmente, para la actividad a nivel de simplasto se utilizó guayacol debido a su baja toxicidad y alta afinidad para las peroxidadasas extracelulares, citosólicas, vacuolares y de pared celular (Bernards et al. 1999; Mika & Lüthje, 2003). Los resultados obtenidos muestran que, a una concentración de 40 mM de guayacol, la enzima se encuentra saturada y alcanza la velocidad máxima.



Gráfica 6. Efecto de la concentración de Guayacol sobre la actividad de GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

Por otro lado, teniendo en cuenta que se estaba trabajando con extractos crudos no purificados, se determinaron parámetros cinéticos como el Km y Vmáx aparente, calculados a partir de doble recíproco (linealización de Lineweaver-Burk) de los datos mostrados en la gráfica 6. De acuerdo a los resultados encontrados, los valores de Km y Vmáx con guayacol como sustrato fueron para raíz 20 mM y 0,02 µmol/min*mg proteína respectivamente, y para tallo el Km fue de 43 mM y la Vmáx de 0,05 µmol/min*mg proteína (Gráfica 7). La comparación de los valores de Km, indican que las enzimas GPX de la fracción estudiada en raíz, presentan una mayor afinidad por el sustrato respecto a tallo. Es probable, que esto sea debido a la presencia de diferentes isoformas que se expresan

en cada uno de estos órganos de la planta. Este es un fenómeno ya reportado en otras especies vegetales, incluyendo al clavel (Cuervo et al. 2009; Gupta, Palma & Corpas, 2016).



Gráfica 7. Representación Lineweaver-Burk de la actividad enzimática GPX en simplasto de tallos y raíces de clavel para el sustrato guayacol.

Las condiciones experimentales seleccionadas para la determinación de la actividad enzimática GPX en simplasto de raíz y tallo, se encuentra en la tabla 4.

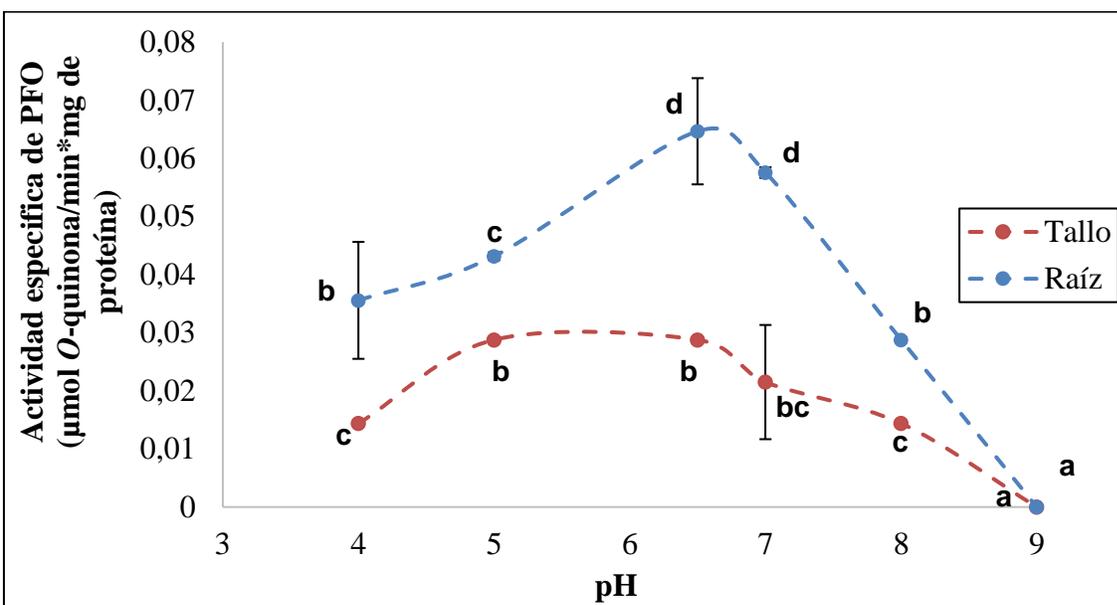
Tabla 4. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de GPX en simplasto de tallo y raíz de clavel.

Parámetros	Valor óptimo
<i>pH</i>	5,0
<i>Temperatura (°C)</i>	20
<i>Concentración de Guayacol (mM)</i>	40

4.2.2 Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel

La enzima polifenoloxidasasa (PFO) ha sido ampliamente reportada en citoplasma y plastidios de plantas y tiene como función participar en la producción de H_2O_2 y la oxidación de fenoles involucrados en respuesta a patógenos (Vaughn & Duke, 1984; Yoruk & Marshal, 2003). La gráfica 8 presenta los resultados obtenidos de la actividad enzimática PFO presente en simplasto de tallos y raíces, en función del pH. Se encontró que a pH 6,5 se presentan los mayores niveles de la enzima en ambos tejidos. A diferencia de lo

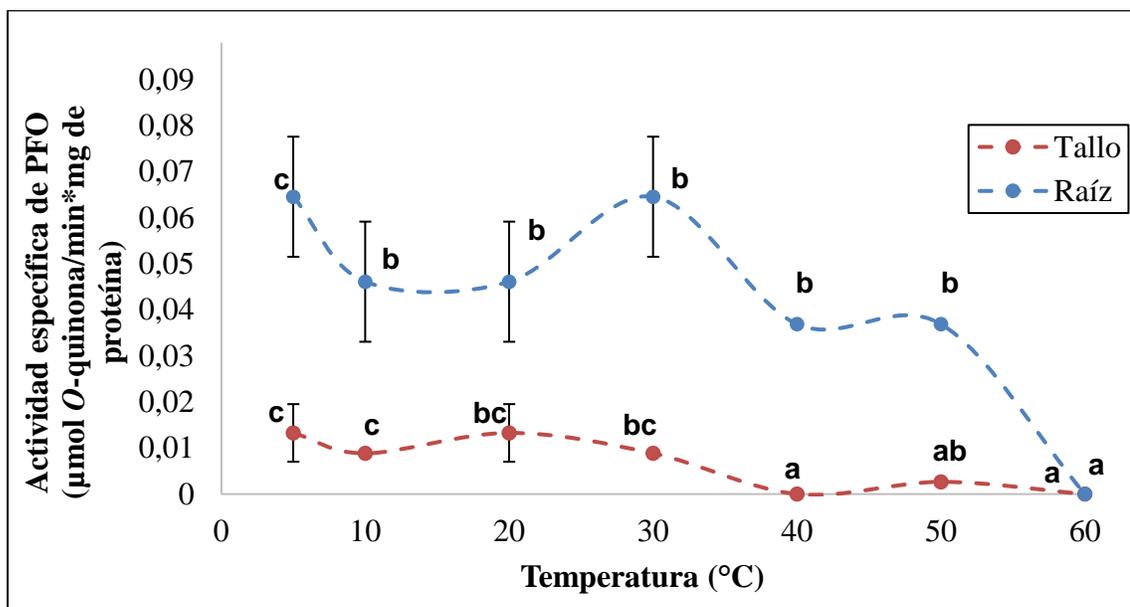
obtenido para la enzima GPX, la actividad de PFO es la misma al que se encuentra en el citoplasma de la célula, el cual se encuentra en el rango de 6,5 a 7,5. Se ha reportado que el comportamiento cinético de la PFO se altera dependiendo del pH debido a los cambios conformacionales en su estructura tridimensional (Janovitz-Klapp, Richard, Goupy & Nicolas, 1990; Valero & García, 1998). El pH óptimo encontrado para PFO en clavel, es similar al reportado para otras especies vegetales como: granos de cacao (pH 6,8) (Lee, 1991) y pulpa de babano (pH de 6,5-7,0) (Palmer, 1963; Yang, Fujita, Ashrafuzzaman, Nakamura & Hayashi, 2000). Estos resultados constituyen el primer reporte del pH óptimo para esta enzima a nivel de simplasto en clavel, resultados anteriores en esta planta fueron obtenidos con extractos provenientes de material vegetal completo donde se reportó un pH óptimo de 7,0 (Ardila & Higuera, 2005).



Gráfica 8. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

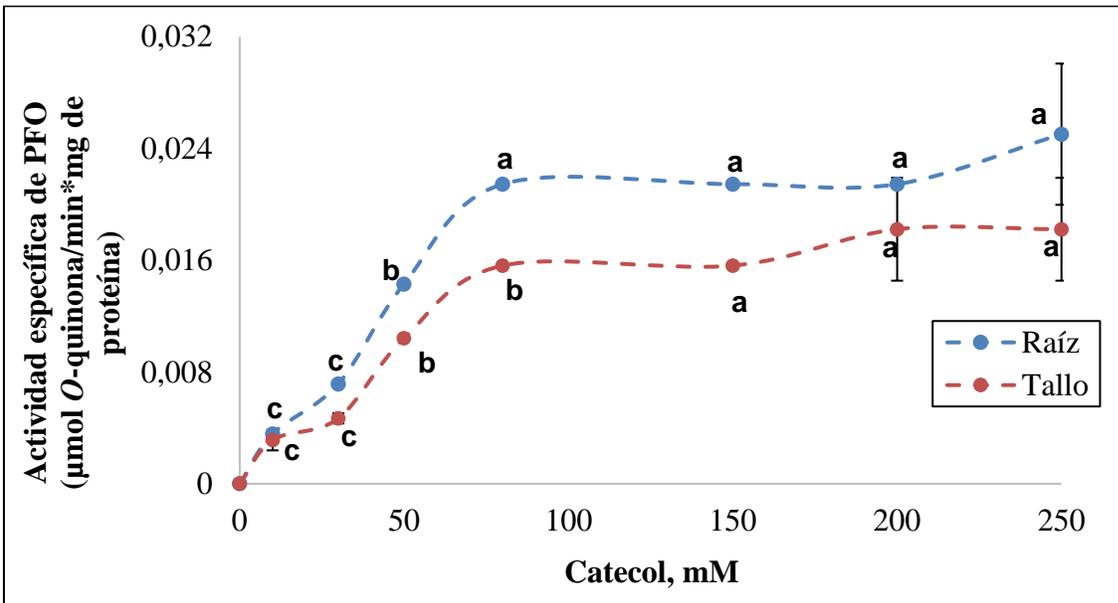
Respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad de PFO en simplasto de clavel se observó tanto a nivel de raíz como en tallo, un comportamiento similar (Gráfica 9). En esta gráfica se evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el rango de temperaturas de 5-30°C. Sin embargo, se observa una disminución de la actividad de PFO a partir de los 30°C; la cual puede deberse a que en temperaturas superiores a 30°C existe una disminución en la solubilidad de oxígeno, uno de los sustratos requeridos para la actividad enzimática de PFO o a posibles cambios conformacionales de

la proteína (Janovitz et al. 1990; Whitaker, 1993). De acuerdo a los resultados obtenidos, la temperatura de trabajo seleccionada para ambos tejidos fue de 5°C. Comparando estos resultados con otros reportes de PFO la temperatura óptima varía en diferentes fuentes vegetales de 25-35°C en lechuga, 25-45°C uva y 30-50°C aceituna (Valero & García, 1998; Ünal, Taş & Şener, 2011; Gençer, Sinan & Arslan, 2012). Sin embargo, la temperatura de 5°C para clavel se seleccionó debido a que la manipulación prolongada de la enzima genera pérdida de su actividad enzimática, por lo que las mediciones se realizaron de manera inmediata una vez obtenido el extracto a esta temperatura.



Gráfica 9. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

Las PFOs de plantas tienen una amplia especificidad de sustratos y son capaces de oxidar una amplia variedad de mono, di o polifenoles (Gawlik-Dziki, Szymanowska & Baraniak, 2007). Particularmente, para la actividad de PFO se utilizó catecol, un sustrato que a menudo es elegido para determinar la actividad de dicha enzima en frutos y distintas fuentes vegetales (Janovitz et al. 1990; Zhou, Smith & Lee, 1993; Cho & Ahn, 1998). La gráfica 10 muestra los resultados obtenidos del efecto de la concentración de catecol, utilizado como sustrato, sobre la actividad de PFO en simplasto de raíz y tallo de clavel. En esta observa que se presenta un comportamiento típico de una cinética enzimática de Michaelis-Menten, de manera que la enzima se encuentra saturada y alcanza una velocidad máxima a una concentración de catecol de 100 mM.



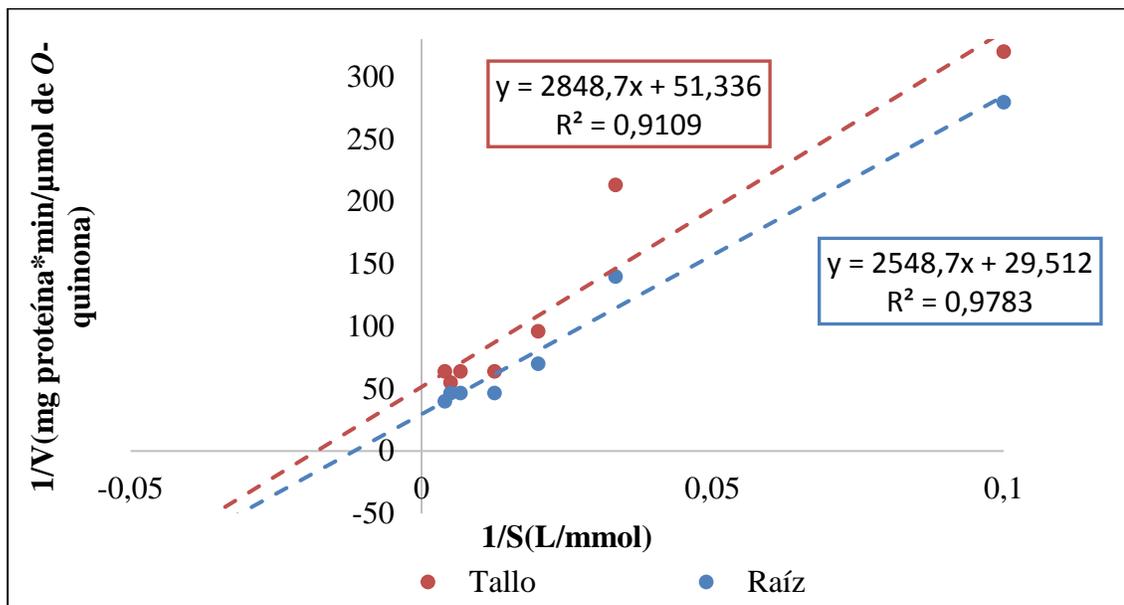
Gráfica 10. Efecto de la concentración de catecol sobre la actividad de PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel.

La determinación de los valores cinéticos de la enzima PFO por el sustrato catecol, permitió establecer para raíz un valor de K_m de 86 mM y de $V_{máx}$ de 0,03 mmol/min*mg proteína, y para tallo de 55 mM (K_m) y 0,02 mmol/min*mg proteína ($V_{máx}$) (Gráfica 11). Los resultados muestran que existen diferencias de afinidad por el sustrato por parte de la enzima simplástica PFO presente en los tejidos evaluados de clavel. Estas diferencias de valores de K_m aparentes entre tallo y raíz posiblemente se deban a una distribución diferencial de la PFO entre estos tejidos de la planta, como ha sido reportado en otros tejidos vegetales (Vaughn & Duke, 1981; Thipyapong, Joel & Steffens, 1997). Además, estos valores son mayores a los reportados previamente por otros autores para PFO empleando catecol como sustrato en *Brassica oleracea* (broccoli) ($K_m=12$ mM) y *Thymus longicaulis* ($K_m=18$ mM) (Dogan & Dogan, 2004; Gawlik-Dziki et al. 2007).

Las condiciones seleccionadas luego de la estandarización de las condiciones óptimas de reacción para la actividad enzimática PFO en simplasto de raíz y tallo, se encuentra en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de PFO en simplasto de raíz y tallo de clavel.

Parámetros	Valor óptimo
<i>pH</i>	6,5
<i>Temperatura (°C)</i>	5
<i>Concentración de Catecol (mM)</i>	100



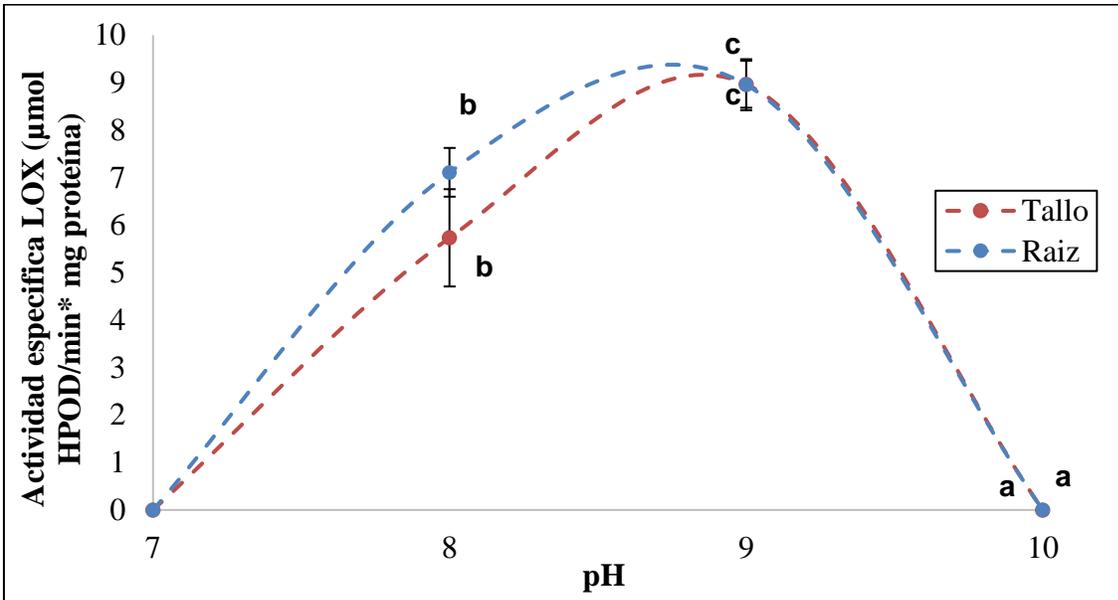
Gráfica 11. Representación Lineweaver-Burk de la actividad enzimática PFO en simplasto de tallo y raíz de clavel para el sustrato catecol.

4.2.3 Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima LOX en simplasto de raíz y tallo de clavel

Las lipoxigenasas (LOX) son enzimas oxidoreductasas que catalizan la adición de oxígeno molecular a ácidos grasos poliinsaturados y se han encontrado principalmente a nivel citosólico (Kermasha et al. 2001; Andreou & Feussner, 2009). Esta enzima está presente en un amplio rango de órganos y tejidos biológicos, siendo reportada en semillas de leguminosa de granos y tubérculos de papa, así como en plantas de soja, tomate, pepino y banano (Kermasha et al. 2001; Feussner & Wasternack, 2002). En clavel previo a este estudio, solo se había determinado su presencia en pétalos de la planta, donde se ha propuesto ejerce un papel durante la senescencia de la flor (Rouet-Mayer, Bureau & Laurière, 1992; Hudak & Thompson, 1997). Es por ello que en la presente investigación se seleccionaron algunas condiciones experimentales para la determinación de su actividad en simplasto de tallo y raíz de clavel. En consideración a las limitaciones del sustrato, para

esta enzima se evaluó el efecto que tenía el pH y la concentración del mismo; la temperatura se basó en datos reportados en bibliografía (Kermasha et al. 2001).

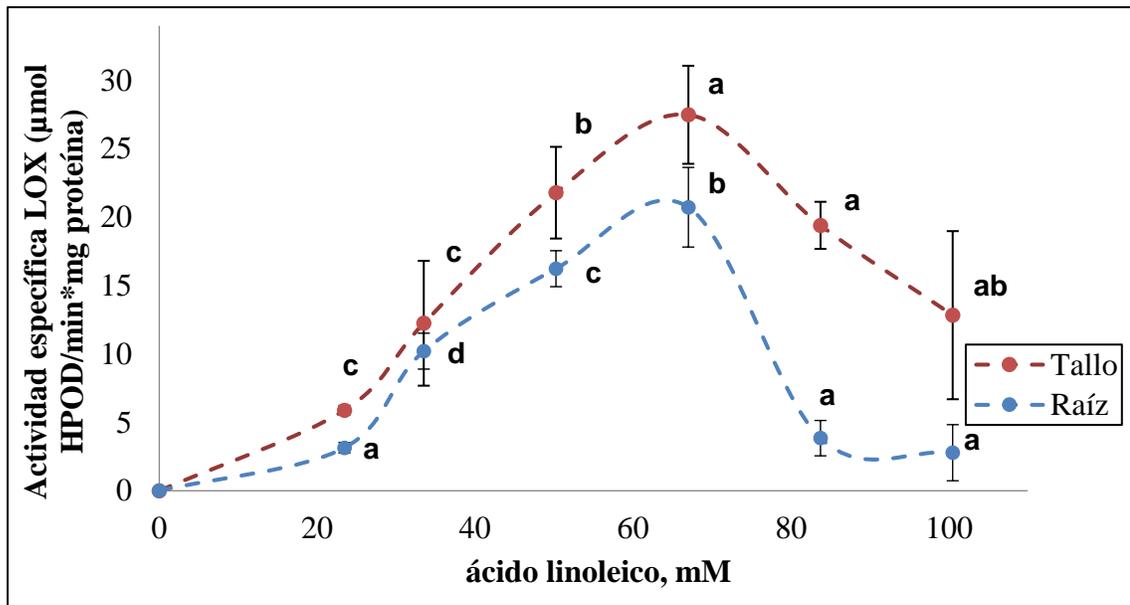
La gráfica 12 muestra el efecto del pH sobre la actividad LOX, en donde se evidencia que a nivel de simplasto de los dos tejidos evaluados, se presenta un comportamiento similar; a un pH de 9,0 se obtiene los mayores niveles de actividad de LOX. Estos resultados están de acuerdo a lo reportado en la literatura en donde se reportan pHs neutros y alcalinos como rangos óptimos para la actividad de esta enzima (Galliard & Phillips, 1971; Axelrod, Cheesbrough, & Laakso, 1981; Kermasha et al. 2001). De igual manera, a pH superiores o inferiores al óptimo se observa una disminución de la actividad, posiblemente debido a cambios estructurales de la enzima, tal y como ha sido reportado en otras fuentes vegetales por Vega, Ismail, Sedman y Kermasha (2006); en dichos casos se ha propuesto que la disminución de la actividad se debe a modificaciones en la proporción de hojas- β respecto a helices- α ; es decir a cambios en las proporciones de estructuras secundarias en la proteína que afectan finalmente su estructura nativa.



Gráfica 12. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

En la gráfica 13 se presentan los resultados del efecto de la concentración de ácido linoleico sobre la actividad enzimática de LOX simplástica en raíz y tallo de clavel. Se

observa que dicha enzima alcanza una velocidad máxima a una concentración de 65 mM en ambos tejidos evaluados.



Gráfica 13. Efecto de la concentración de ácido linoleico sobre la actividad de LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

Sin embargo, es evidente que en el rango de concentraciones 80-100 mM, los niveles de actividad disminuyen drásticamente. Es probable que bajo estas concentraciones se genere una inhibición de la actividad enzimática de LOX por retroalimentación (Ludwig et al. 1987). Se ha reportado que LOX puede inhibirse por elevadas concentraciones de ácido linoleico o sus derivados, lo que explicaría en clavel la disminución de la actividad a concentraciones de sustrato elevadas (Berry et al. 1997; Butovich & Lukyanova, 2008). Por ejemplo, Berry et al. (1997) reportan que la lipoxigenasa extraída de soja se inhibe a una concentración de 100 mM de ácido linoleico, valor similar al obtenido para la lipoxigenasa de clavel. Es por ello que se presume que esta enzima puede estar regulada por fenómenos de retroalimentación ocasionados por los productos de reacción o por cambios conformacionales causados a altas concentraciones de sustrato. Por otro lado, debido a las limitaciones en el sustrato fue necesario seleccionar el parámetro temperatura de acuerdo a lo que reporta la literatura. Finalmente, los parámetros utilizados en la determinación de la actividad de LOX se muestra en la tabla 6.

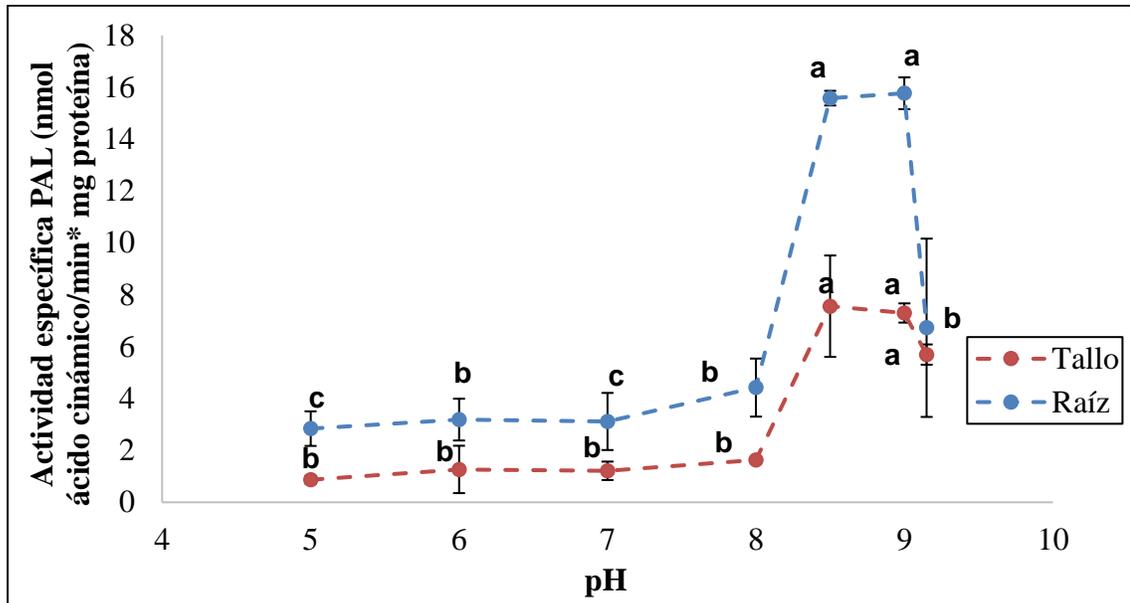
Tabla 6. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de LOX en simplasto de raíz y tallo de clavel.

Parámetros	Valor óptimo
<i>pH</i>	9,0
<i>Temperatura (°C)</i>	25*
<i>Concentración de ácido linoleico(mM)</i>	50

*Kermasha et al. 2001

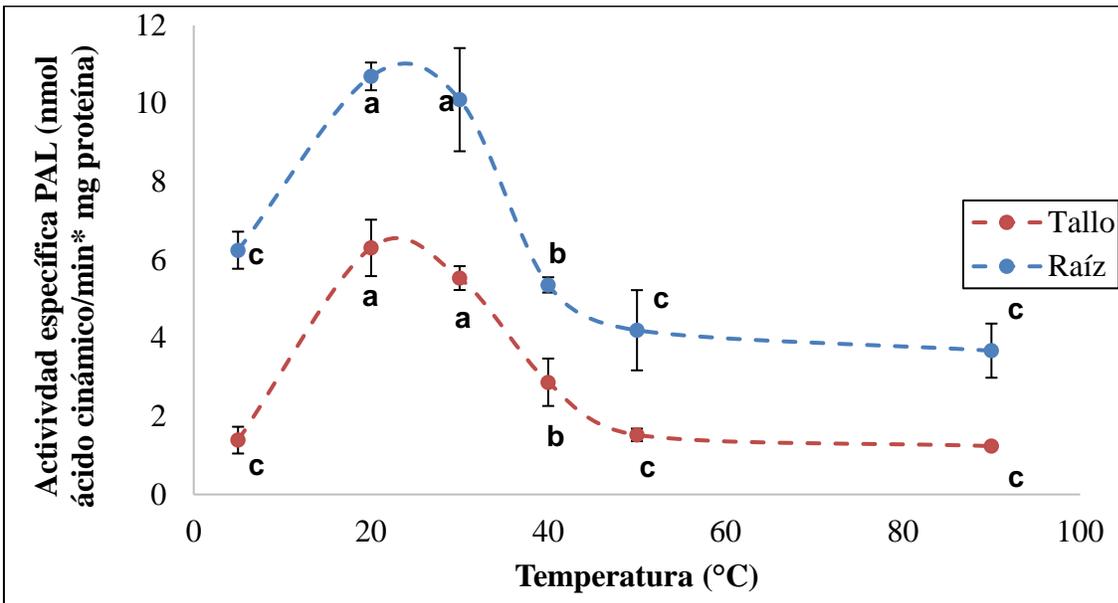
4.2.4 Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima PAL en simplasto de raíz y tallo de clavel

Con el fin de seleccionar las condiciones experimentales para realizar la determinación de la actividad de PAL, se siguió la misma secuencia de experimentos descrita previamente. En la gráfica 14 se presentan los resultados obtenidos en la selección del pH, en donde se observa la mayor actividad en un rango de pH entre 8,5-9,0, para ambos tejidos evaluados. Estos resultados se encuentran dentro del rangos de pH reportados para distintas fuentes vegetales (Hanson & Havir, 1981; Camacho, Anzelloti & González-Fontes, 2002; Arrieta-Guevara et al. 2010); y coinciden con datos obtenidos previamente en tejido completo de clavel. (Ardila et al. 2007). Es bien sabido que el pH del simplasto puede variar y aumentar debido a la presencia de diferentes tipos de estrés de tipo abiótico o biótico; es por ello que pasar a un pH básico en dichas condiciones, permitiría un aumento en la actividad de esta enzima. (Gonugunta, Srivastava & Raghavendra, 2009; Kader & Lindberg, 2010; Pise & Upadhyay, 2015).

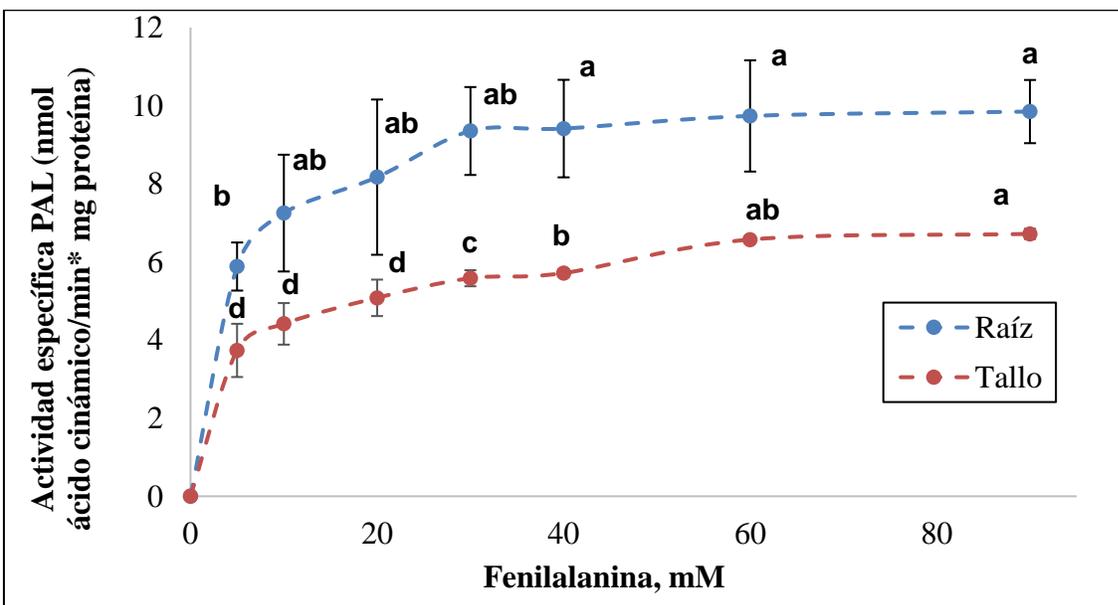


Gráfica 14. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

Por otro lado, los resultados de los parámetros temperatura y concentración de sustrato evaluados en simplasto de raíz y tallo de clavel se presentan en la gráfica 15 y 16, respectivamente. Se evidencia que para dichos parámetros los mayores niveles de actividad se presentan en los rangos 20-30°C y 20 mM de concentración de sustrato fenilalanina, respectivamente. Por otro lado, se calcularon parámetros cinéticos en extractos crudos no purificados, y se obtuvieron valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes para raíz de 4,3 mM y 10 nmol/min*mg proteína y para tallo de 3,9 mM y 6,5 nmol/min*mg proteína, respectivamente (Gráfica 17).



Gráfica 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).



Gráfica 16. Efecto de la concentración de ácido linoleico sobre la actividad de LOX en simplasto de tallo y raíz de clavel ($P < 0,05$).

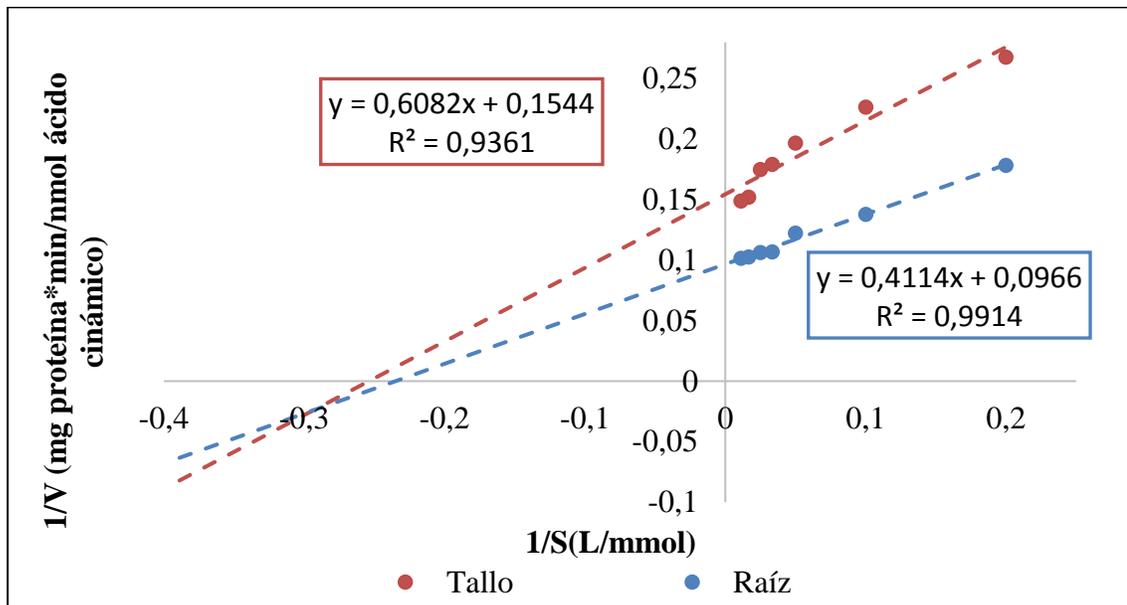
Los resultados observados en el caso de la enzima PAL en términos pH, temperatura y concentración de sustrato, además de ser similares a lo reportado previamente en extracto total de clavel (Ardila et al. 2007) coinciden también con lo encontrado en otros tejidos vegetales como lulo (*Solanum quitoense* Lam) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Arrieta-Guevara et al. 2010, Camacho et al. 2002). Por otro lado, a pesar de que los valores de K_m son mucho mayores a los reportados para otras especies vegetales como *Nicotiana*

tabacum, con valores entre 0,011 y 0,055 mM (Nagai, Kojima, Shimosaka & Okazaki, 1988), se encuentran cercanos de los rangos reportados para PAL en otras fuentes vegetales como *Arabidopsis thaliana* (3 mM) y *Bambusa oldhamii* (4 mM) (Cochrane, Davin & Lewis, 2004; Hsieh, Ma, Yang & Lee, 2010).

Los resultados obtenidos de pH, T y concentración de sustrato para las enzimas PAL, muestran que es muy probable que a nivel de simplasto existan similitudes estructurales entre las isoformas presentes en tallo y raíz de clavel. La tabla 7 resume las condiciones seleccionadas para la determinación de la actividad enzimática PAL en raíz y tallo de clavel.

Tabla 7. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de PAL en simplasto de raíz y tallo de clavel.

Parámetros	Valor óptimo
pH	8,5
Temperatura (°C)	30
Concentración de L-fenilalanina(mM)	20

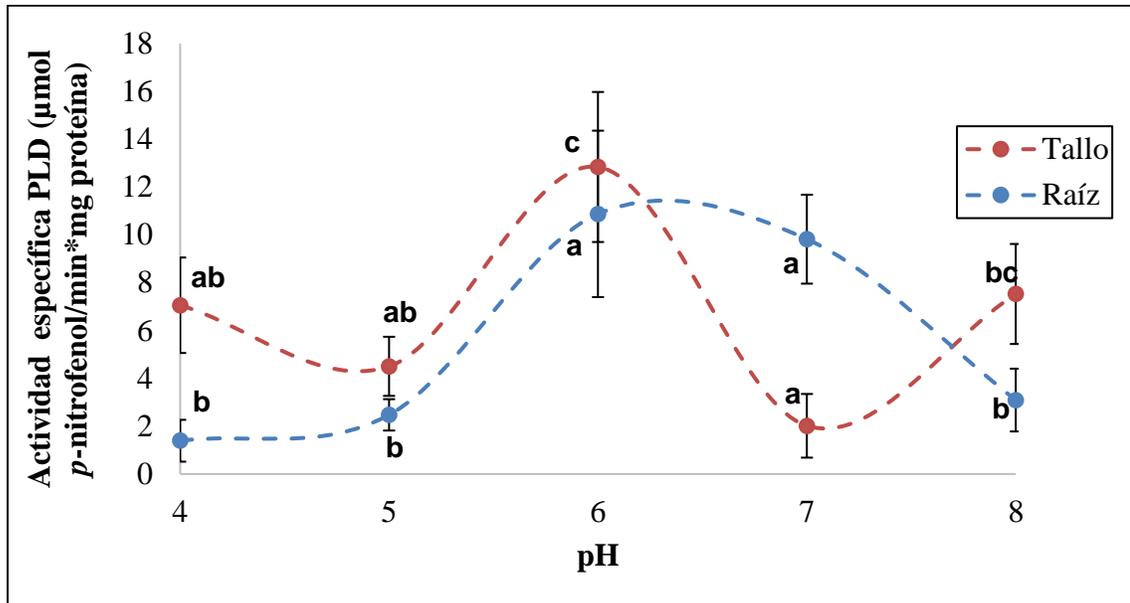


Gráfica 17. Representación Lineweaver-Burk de la actividad enzimática PAL en simplasto de tallo y raíz de clavel para el sustrato Fenilalanina.

4.2.5 Selección de condiciones óptimas para la determinación de actividad de la enzima PLD en simplasto de raíz y tallo de clavel

Las PLD son enzimas que hidrolizan fosfolípidos para producir ácido fosfatídico y colina, siendo involucrada en germinación de semillas, envejecimiento y sequía; de igual manera se ha propuesto cambios de la misma ante un amplio espectro de condiciones de estrés que incluyen, congelamiento, sequía, heridas por insectos, e infección por patógenos, entre otras. La mayoría de los estudios relaciona el incremento en la actividad de PLD a catabolismo de lípidos y degradación de membranas (Wang, 1999, 2001; Yamaguchi, Tanabe, Minami & Shibuya, 2004; Li & Wang, 2018). En clavel, la enzima PLD influye en el catabolismo de lípidos en pétalos de la flor (Brown, Paliyath & Thompson, 1990; Vrije & Munnik, 1997). Sin embargo, estudios realizados en otros tejidos de la planta, son a la fecha inexistentes. Es por ello que, para el estudio de esta enzima en simplasto de tallos y raíces, fue necesario previamente establecer las condiciones de reacción como pH y concentración de sustrato (*p*-Nitrofenilfosforilcolina; *p*-NPPC); la temperatura empleada se basó en datos obtenidos bibliográficamente teniendo las limitaciones en cantidad de sustrato (Cha et al. 1994).

En la gráfica 18 se presenta el efecto del pH en la actividad de esta enzima en raíz y tallo de clavel, usando la misma concentración de CaCl₂ (12 mM). En esta se observa a nivel de raíz un rango óptimo de pH 6-7, disminuyendo la actividad PLD hacia pH extremos. Por su parte, a nivel de tallo la enzima PLD presentó una mayor actividad a pH 6, disminuyendo hacia pH superiores e inferiores. Estos resultados sugieren que al igual para otras enzimas, existe un efecto de desnaturalización a pHs ácidos y básicos, presentando los mayores valores a pHs neutros como ocurre para PFO; es importante recordar que este comportamiento es de esperarse coincida con el pH del citoplasma. Estos resultados concuerdan con lo mencionado para otros tejidos vegetales, en donde el pH neutro ha sido empleado en la determinación de la actividad enzimática de PLD (Allgyer & Wells, 1979; Okamura & Yamashita, 1994; Kappan & Wang, 1999).



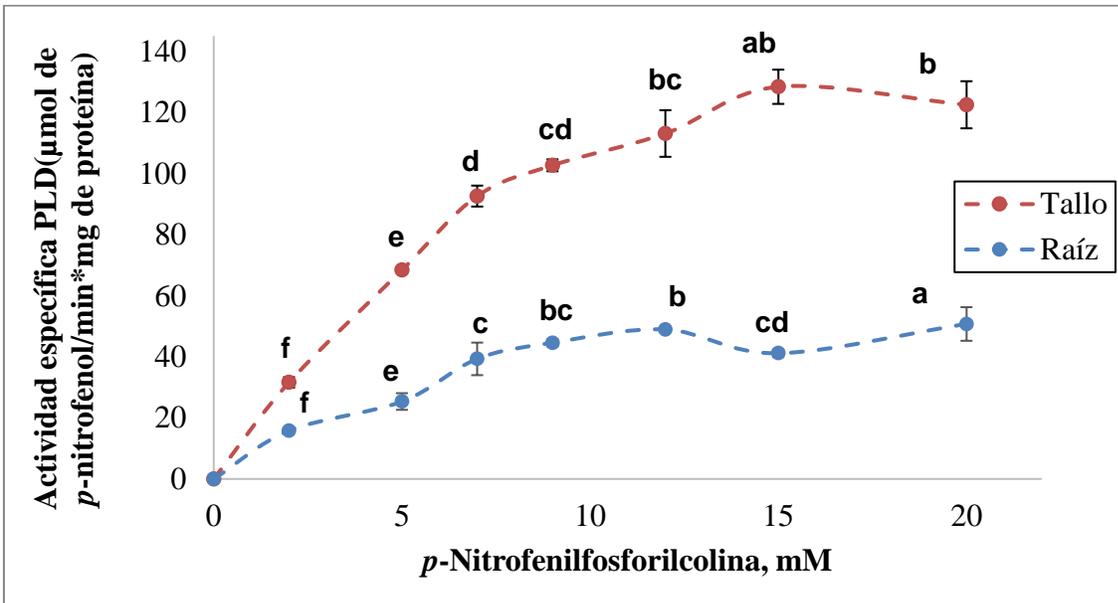
Gráfica 18. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima PLD en simplasto de tallo y raíz de clavel. Se presenta las diferencias significativas con letras diferentes ($P < 0,05$).

El efecto de la concentración de *p*-Nitrofenilfosforilcolina (*p*-NPPC) en la actividad de PLD de simplasto de tallo y raíz de clavel, se presenta en la gráfica 19. Los resultados muestran un comportamiento de tipo Michaelis-Menten, en ambos tejidos, alcanzando una velocidad máxima a una concentración de 15 mM de *p*-NPPC. Se calcularon para los extractos de tallo y raíz, valores de parámetros cinéticos aparentes; para raíz un K_m de 7 mM y una $V_{máx}$ 70 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína, mientras que para tallo un K_m 12 mM y una $V_{máx}$ de 227 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína (Gráfica 20). Los datos de K_m obtenidos difieren respecto a valores reportado para otras PLDs (Gupta & Wold, 1980; Cha et al. 1994). Específicamente para el caso del clavel, se han reportado valores de K_m para PLD de pétalos, que son mayores a los reportados en la presente investigación (Brown et al. 1990; Pappan & Wang, 1999). Al usar otros sustratos con cadenas acilo más largas, era de esperarse, diferencias con respecto al *p*-NPPC; existen diferentes afinidades en función del tipo de sustrato que se use en el ensayo. Por otro lado, se utilizó la temperatura de acuerdo a lo reportado por la literatura (Cha et al. 1994; D'Arrigo, Piergianni, Scarcelli & Servi, 1995). Finalmente, las condiciones utilizadas para la medición de la actividad PLD se presentan en la tabla 8.

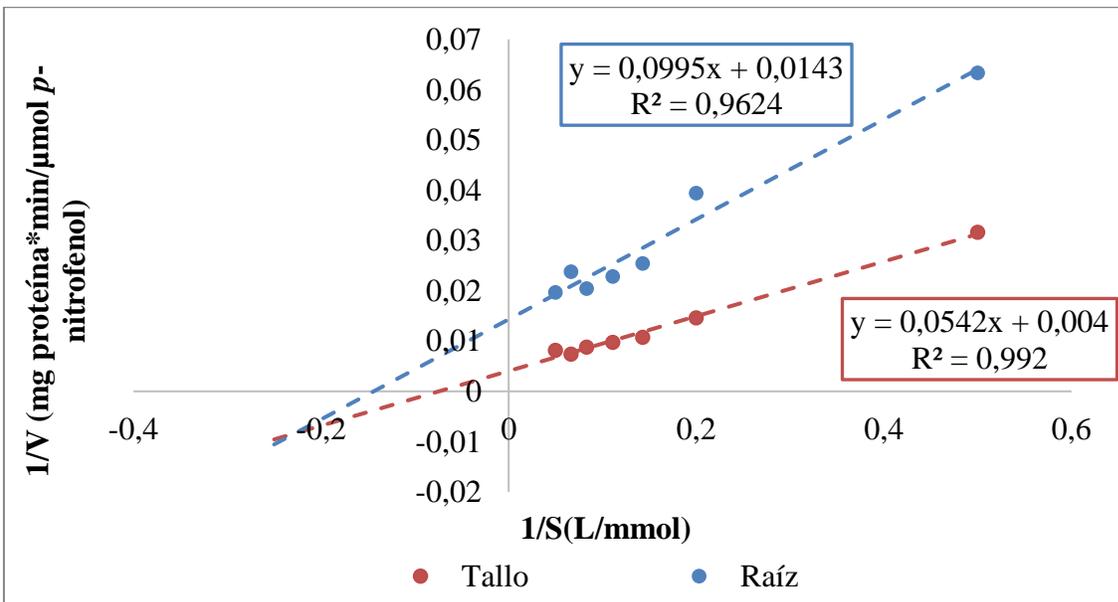
Tabla 8. Parámetros óptimos para la determinación de la actividad enzimática de PLD en simplasto de raíz y tallo de clavel.

Parámetros	Valor óptimo
<i>pH</i>	6,0
<i>Temperatura (°C)</i>	37*
<i>Concentración de p-NPPC (mM)</i>	15

*Cha et al. 1994



Gráfica 19. Efecto de la concentración de p-Nitrofenilfosforilcolina sobre la actividad de PLD en simplasto de tallo y raíz de clavel ($P < 0,05$).



Gráfica 20. Representación Lineweaver-Burk de la actividad enzimática PLD en simplasto de tallos y raíces de clavel para el sustrato *p*-Nitrofenilfosforilcolina.

4.3 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS GPX, PFO, LOX, PAL Y PLD, EN RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL DURANTE LA INTERACCIÓN CON *Fod*

Una vez establecidas las condiciones de extracción y los parámetros experimentales para evaluar la actividad de cada una de las enzimas, se procedió a evaluar sus niveles en simplasto de tallo y raíz de clavel durante la inoculación con el patógeno *Fod*. Esto se llevó a cabo mediante el ensayo comparativo previamente descrito en la sección de materiales y métodos (2), usando dos variedades con niveles de resistencia contrastantes: Golem (R) y Solex (S).

Con respecto al ensayo *in vivo* realizado en el presente estudio, es importante comentar que se usaron condiciones de inoculación similares a las usadas por el patógeno para el ingreso a su hospedero en los cultivos comerciales. Esto permite tener certeza que los resultados que se presentan hacen parte de los procesos bioquímicos propios de la interacción entre el clavel y *Fod*, tal y como se ha reportado en estudios previos realizados por el grupo de investigación (Ardila et al., 2014). Así mismo, es importante comentar que los resultados de incidencia y severidad de la enfermedad durante el ensayo, evidenciaron que efectivamente existen diferencias contrastantes en los niveles de resistencia a la enfermedad (Anexo C). De acuerdo a estos resultados la variedad susceptible inoculada presentó niveles de incidencia a la enfermedad superiores que lo presentado por variedad resistente Golem; esto indica que dos genótipos son contrastantes y las diferencias bioquímicas encontradas para ambas variedades, pueden estar relacionadas a diferencias en la resistencia a la enfermedad.

Los resultados en esta parte de la investigación se presentarán en cada órgano de manera independiente, haciendo una discusión general de la respuesta encontrada en cada caso. Por otro lado, los resultados para las enzimas PFO y LOX, se presentarán en conjunto ya que han sido ampliamente descritas en modelos en donde se ha reportado un papel central para el ácido jasmónico y sus derivados. Así mismo, se presentarán las enzimas PLD y PAL, considerando su asociación con la hormona ácido salicílico. Por otro lado, la enzima

GPX se presentará de manera independiente en consideración a diferentes reportes que la han involucrado como respuesta en las dos rutas de señalización.

En próximos capítulos se discutirá de manera conjunta los resultados encontrados en toda la planta, considerando el aporte que tienen las enzimas, metabolitos y transcritos, en la descripción de las rutas de señalización de la enfermedad; el objetivo central de la presente investigación.

4.3.1 Efecto de la inoculación con *Fod* en simplasto de raíz

A continuación, se presentan los resultados específicos de la raíz, órgano en el cual se presenta el primer contacto con el patógeno y en donde se han encontrado en estudios previos del grupo de investigación, ciertas repuestas bioquímicas asociadas con la resistencia a la enfermedad (Ardila et al. 2011; Ardila et al. 2014). Es importante comentar que, si bien son pocos los estudios que muestren evidencia del estilo de vida del patógeno en este órgano, se ha propuesto teniendo en cuenta la evidencia existente, que es de tipo hemibiotrófica, iniciando en los primeros días con una fase biotrófica temprana. Esta información es importante pues permitirá hacer una discusión de los resultados en esta parte de la planta.

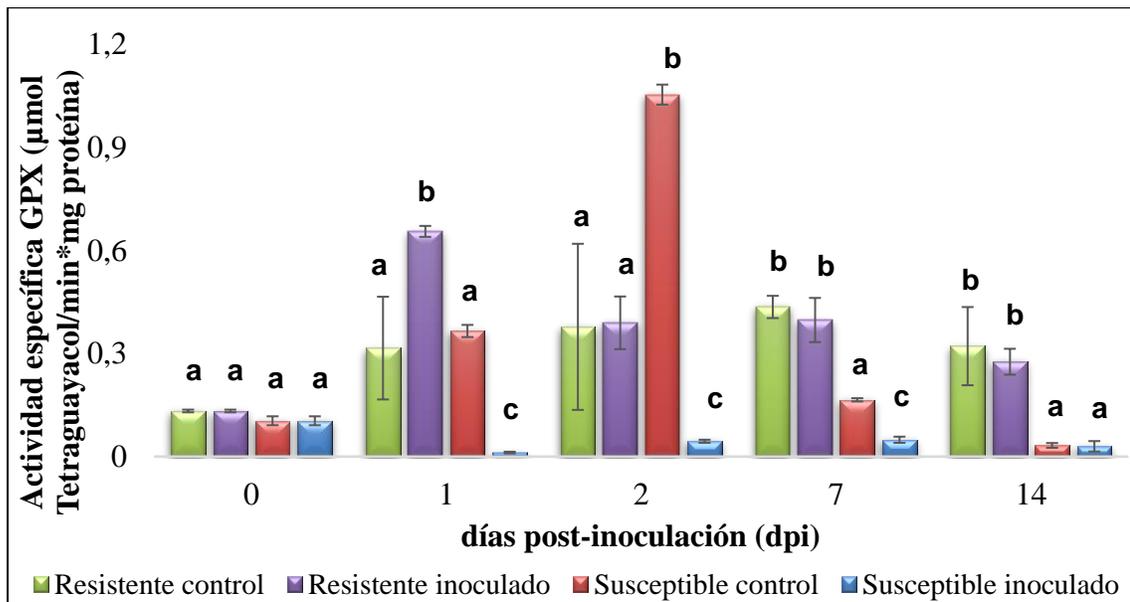
4.3.1.1 Actividad GPX presente en simplasto de raíz de clavel durante la inoculación con *Fod*

La actividad GPX simplástica en raíces de clavel (gráfica 21), mostró una inducción diferencial al día 1 post-inoculación en la variedad resistente (Golem) inoculada siendo exclusiva en ese tiempo. Por el contrario, en la variedad susceptible (Solex), la inoculación con el patógeno no generó ningún aumento de la actividad al comparar con su control, de hecho, en esta variedad inoculada se presentan valores significativamente menores que el control, en todos los días evaluados. Estos resultados sugieren la participación de esta enzima, en los mecanismos que se activan a nivel de simplasto de clavel para la variedad resistente objeto de estudio.

Considerando los resultados de esta investigación y estudios previos, es probable que la inducción de GPX a este nivel celular, pueda estar relacionada con la detoxificación del H₂O₂ citoplasmático producido a causa de la infección con el patógeno. Estudios previos realizados a nivel de apoplasto y en material vegetal completo de clavel, han mostrado una

acumulación de H_2O_2 en la variedad resistente a las 48 hpi (Ardila, 2013; Cuervo, 2017). De tal manera, que es posible que este H_2O_2 se internalice a la célula o pueda ser liberado por vacuolas, peroxisomas y mitocondrias, incrementando su concentración intracelular como parte de los mecanismos de señalización que se activan durante la infección por *Fod*, y que la inducción de la enzima GPX, sea necesaria también para regular la acción de esta molécula señal; la regulación de especies antioxidantes a nivel citosólico es fundamental para evitar la muerte celular que puede ser favorable para patógenos necrotróficos y hemibiotrófos (Heller & Tudzynski, 2011; Segal & Wilson, 2018; Cuervo, 2017).

Esta propuesta está de acuerdo, con reportes que indican la presencia de peroxidasas citosólicas y vacuolares, cuya función es detoxificar los niveles de H_2O_2 celulares, usando como sustratos fenoles y generando agua (Almagro et al. 2009; Bernards et al. 1999). Es bien sabido que la liberación de H_2O_2 por la célula conduce a la formación de sustancias con actividad antifúngica, activación de genes relacionados a defensa y la regulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Heller & Tudzynski, 2011; Almagro et al. 2009), los cuales se han propuesto, son procesos que se activan en este modelo planta patógeno (Ardila et al. 2014; Cuervo, 2017).

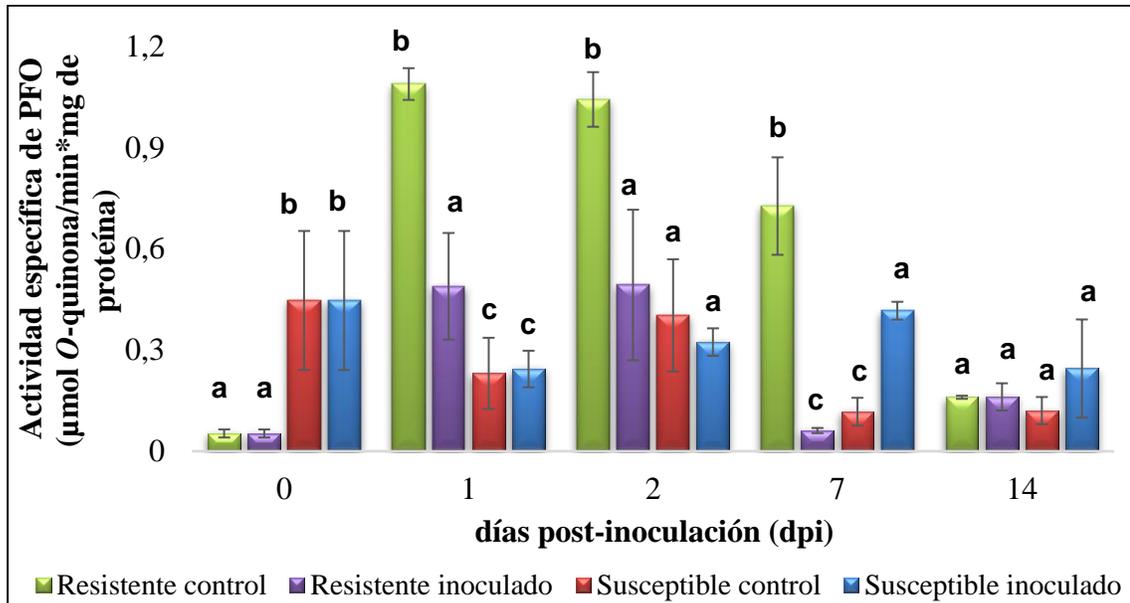


Gráfica 21. Niveles de actividad GPX en simplasto de raíz, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.3.1.2 Actividad PFO y LOX presente en simplasto de raíz de clavel durante la inoculación con *Fod*

Con respecto a las enzimas PFO y LOX, enzimas del tipo oxidoreductasa asociadas con diferentes procesos bioquímico a nivel basal de las plantas, se evidenció que, para la variedad resistente, la inoculación con el patógeno no generó un aumento a nivel de simplasto (gráficas 22 y 23). De hecho, la actividad enzimática disminuyó significativamente por efecto de la inoculación con el patógeno a este nivel para ambas enzimas. En el caso de la variedad susceptible, por otro lado, la inoculación con el patógeno generó un aumento de la actividad a tiempos tardíos como son 7 días para PFO y 14 para LOX; tiempos en donde se espera la activación de la fase necrotrofica.

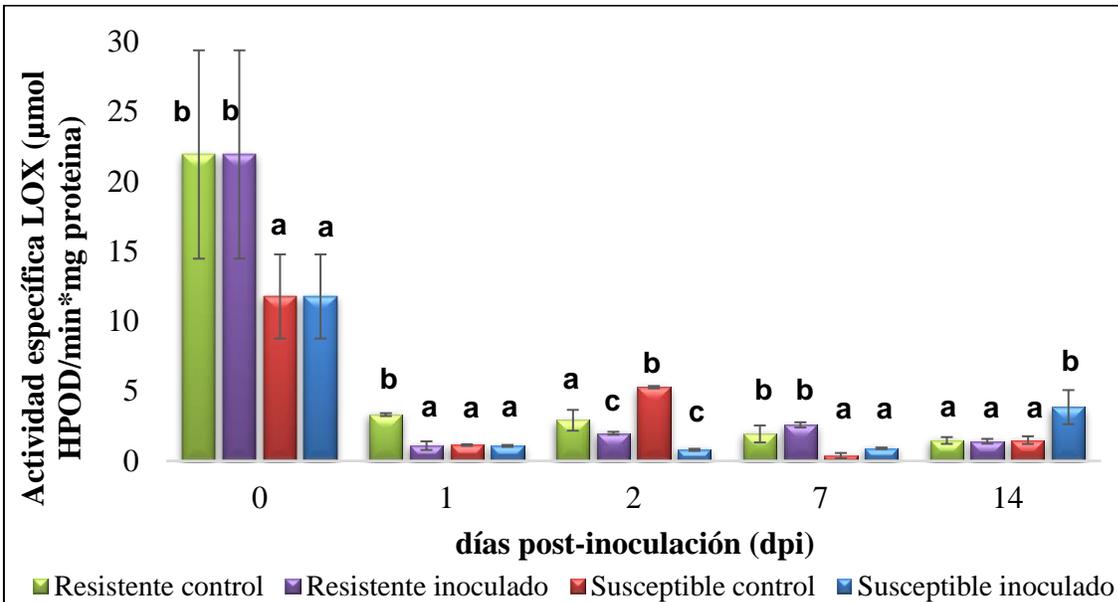
En primer lugar, es probable que la disminución que se presenta en los niveles de actividad enzimática PFO y LOX en la variedad resistente, se deba a que se presente una disminución propia de su expresión durante la interacción. Algunos estudios han propuesto que la inoculación con patógenos del género *Fusarium* sp., pueden generar una disminución significativa en la expresión de ciertos genes asociados a defensa en plantas, si se comparan con respecto a los controles no inoculados (Chen et al. 2014). Se ha propuesto que este proceso este asociado a una redirección de la respuesta de defensa a algunos genes específicos que tienen mayor protagonismo en la respuesta bioquímica. A pesar de los diferentes estudios que han involucrado a estas enzimas con defensa vegetal (Anthony et al. 2017; Taranto et al. 2017), es evidente que al menos en este órgano, estas enzimas no tienen un papel en el simplasto durante la respuesta al patógeno *Fod*. Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados a nivel de este mismo órgano con tejidos completos, en donde se determinó que la inoculación no generaba cambios en la actividad PFO para la variedad resistente (Ardila, 2006)



Gráfica 22. Niveles de actividad PFO en simplasto de raíz, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Por otro lado, el incremento de la PFO y LOX presente en la variedad susceptible inoculada (Gráficas 22 y 23), es probablemente asociada a una respuesta bioquímica debida al establecimiento de la fase necrotrófica del patógeno. A pesar de que no existen estudios en los que se detalle el momento exacto en el que se activa la fase necrotrófica de *Fod* en clavel, se ha reportado que en patógenos con estilo de vida hemibiotrofo, el inicio de la fase necrotrófica varía dependiendo del patógeno en cuestión, para *Macrophomina phaseolina* a las 6 hpi, *Colletotricum graminicola* a las 72 hpi y *Fusarium oxysporum* a los 6 dpi (Vargas et al. 2012; Lyons et al. 2015; Chowdhury, Basu & Kundu, 2017). En nuestro modelo clavel-*Fod* es posible que la fase necrotrófica inicie antes de los 7 dpi, lo cual tendría un efecto en la estructura celular de los genotipos susceptibles; es probable que se presente una liberación de PFO desde el cloroplasto hacia el citoplasma favoreciendo su extracción bajo las condiciones del presente estudio. Aunque se ha reportado que PFO puede contribuir en diferentes procesos asociados a la defensa vegetal (Mayer, 2006; Taranto et al. 2017), al parecer esto no sucede en raíces de clavel. Así mismo sucede en el caso de la enzima LOX, la cual presentó un aumento de su actividad en el día 14 post-inoculación, lo cual podría ser el resultado de una activación tardía de los mecanismos de defensa (Rancé, Fournier & Esquerré-Tugayé, 1998; Porta & Rocha, 2002).

No se puede descartar que el aumento de actividad descrito para esas enzimas PFO y LOX, sea debido a la presencia de enzimas del hongo que están siendo secretadas a estos tiempos tardíos en la variedad susceptible favoreciendo la colonización. Existen reportes de la presencia de PFO y LOX en diferentes hongos fitopatógenos (Oliw, 2002; Mayer, 2006; Marusek, Trobaugh, Flurkey & Inlow, 2006).



Gráfica 23. Niveles de actividad LOX en simplasto de raíz, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

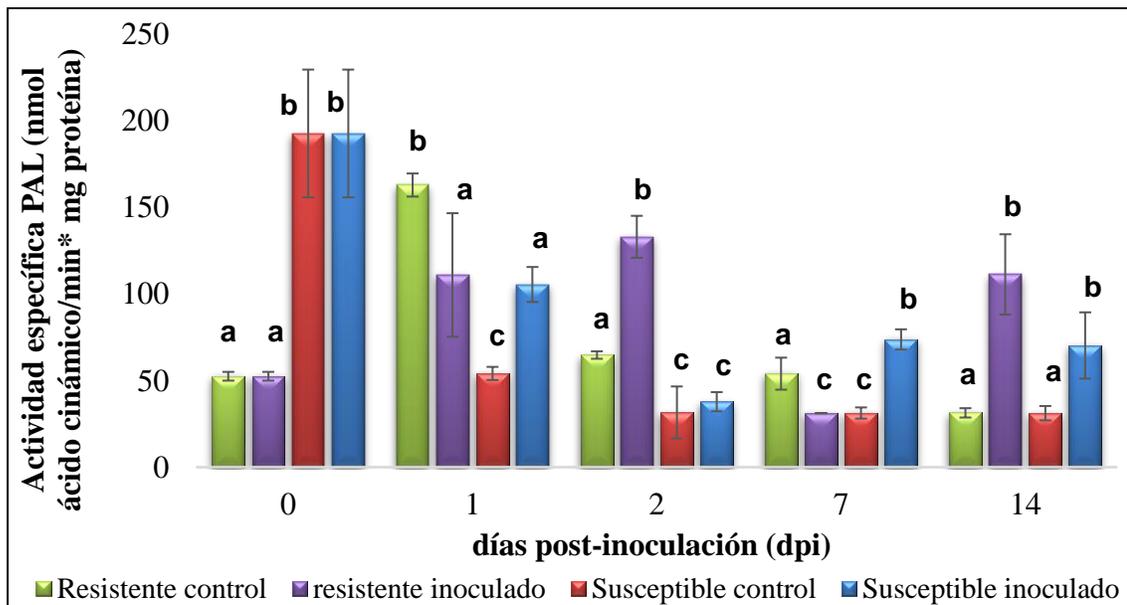
4.3.1.3 Actividad PAL y PLD presente en simplasto de raíz de clavel durante la inoculación con *Fod*

Los cambios evaluados a nivel de simplasto de raíz de PAL y PLD, por efecto de la inoculación se presentan en la gráfica 24 y 25, respectivamente. Se pudo determinar que para el caso de la enzima PAL, los niveles de actividad presentaron un aumento significativo en la variedad resistente inoculada a los 2 y 14 dpi. En el caso de la variedad susceptible, dicha enzima también presentó un aumento significativo, pero en los días 1, 7 y 14 dpi. Estos resultados demuestran que el aumento de la actividad de esta enzima está relacionado con la activación de mecanismos asociados a la resistencia basal de la planta, que pueden presentarse tanto en genotipos resistentes y susceptibles.

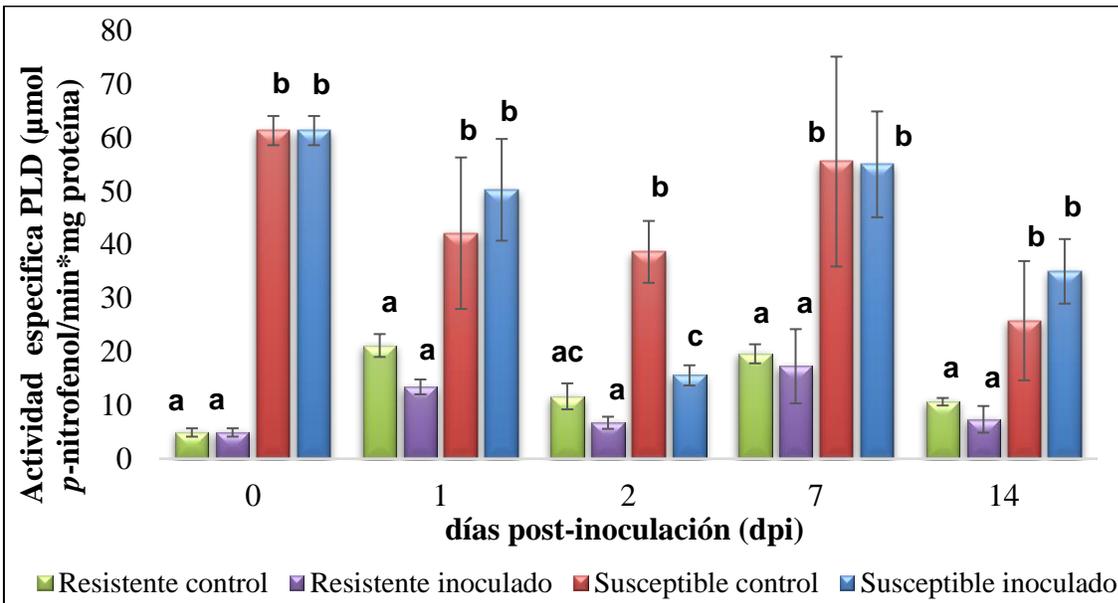
Estos resultados discrepan de lo encontrado en estudios previos realizados por el grupo de investigación, ya que un aumento en la actividad solamente se había encontrado en la

variedad resistente usando raíces completas (Ardila et al. 2011). Sin embargo, es probable que, al trabajar con tejidos completos, se presenten interferentes en la variedad susceptible que afecten la determinación de la actividad o que la respuesta al ser más baja en este genotipo, solo se pueda encontrar haciendo análisis directamente en simplasto; el efecto de “dilución” en la respuesta se eliminaría al hacer análisis directamente en compartimentos celulares.

A pesar de que, en clavel se ha demostrado la acumulación de EROs en sistemas radiculares a nivel de apoplasto y en material vegetal completo, en la presente investigación no se evidencia cambios en la actividad de PLD para ninguna de las variedades evaluadas. A pesar de que un aumento en la actividad de PLD ha sido asociada a la producción de superóxido, una especie reactiva de oxígeno que está involucrada en varias respuestas de defensa (Qualliotine-Mann, Agwu, Ellenburg, McCall & McPhail, 1993), en el presente estudio, estas variedades no presentan cambios en la actividad para la misma. Esto indica que la actividad de PLD en raíces puede estar asociada a otros fenómenos propios del funcionamiento de la raíz, como el tráfico vesicular durante la expansión celular de los pelos radiculares (Ohashi et al. 2003), pero no al parecer, con los mecanismos de defensa que a nivel de la raíz se activan contra *Fod*.



Gráfica 24. Niveles de actividad PAL en simplasto de raíz, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



Gráfica 25. Niveles de actividad PLD en simplasto de raíz, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

En general de acuerdo con los resultados encontrados en la presente investigación, la inducción de enzimas a nivel de simplasto de la raíz es un fenómeno complejo, que involucra múltiples procesos bioquímicos y diferentes niveles de regulación. Si bien es cierto, que se presentan algunos indicios sobre los fenómenos que se pueden activar a nivel de simplasto en las raíces resistentes, como es un aumento de la enzima GPX, es claro que la complejidad de respuestas en este órgano es alta y es poca la información que se puede aportar desde esta aproximación. Es necesario abordar este tipo de respuestas usando otro tipo de herramientas holísticas (ómicas) que permitan evaluar el conjunto de respuestas que son de interés en este modelo.

A pesar de ello, los resultados encontrados en este órgano muestran que enzimas como la GPX presentan algún papel a nivel citoplasmático durante la respuesta de las plantas resistentes. Lo cual esta de acuerdo con el papel que se tiene para esta enzima en la regulación de especies reactivas de oxígeno, fenómeno que ha sido reportado como central en la respuesta del clavel a este nivel (Ardila, 2013). Así mismo, es claro que, para el caso de la PAL, la respuesta se presenta de manera simultanea en ambas variedades indicando que, en las plantas susceptibles y resistentes la activación de estas enzimas se realice por el reconocimiento de MAMPS y PAMPs como parte de una respuesta basal que puede ser activada en ambos genotipos. Sin embargo, es probable que estos mecanismos

sean más eficientes en el caso de las variedades resistentes y desencadenen otro tipo de respuestas no evaluadas en la presente investigación. Con el fin de conocer que cual es el efecto de la inoculación en la planta completa, se realizó también la evaluación a nivel del tallo.

4.3.2 Efecto de la inoculación con *Fod* en simplasto de tallo

Los resultados obtenidos a partir del tallo se presentan bajo la misma estructura de los descritos anteriormente a nivel de la raíz. Es importante recordar que, en este órgano, se han reportado también respuestas de particular interés que han sido ampliamente discutidas en estudios previos usando tejido completo (Ardila & Higuera, 2005; Ardila et al. 2007; Ardila et al. 2011). Así mismo, es importante recordar que, en este órgano de la planta, tampoco se ha descrito en que momento se activa la fase necrotrófica de *Fod* en las interacciones compatibles; se presume que a 7 y 14 dpi esta fase ya ha iniciado.

4.3.2.1 Actividad GPX presente en simplasto de tallo de clavel durante la inoculación con *Fod*

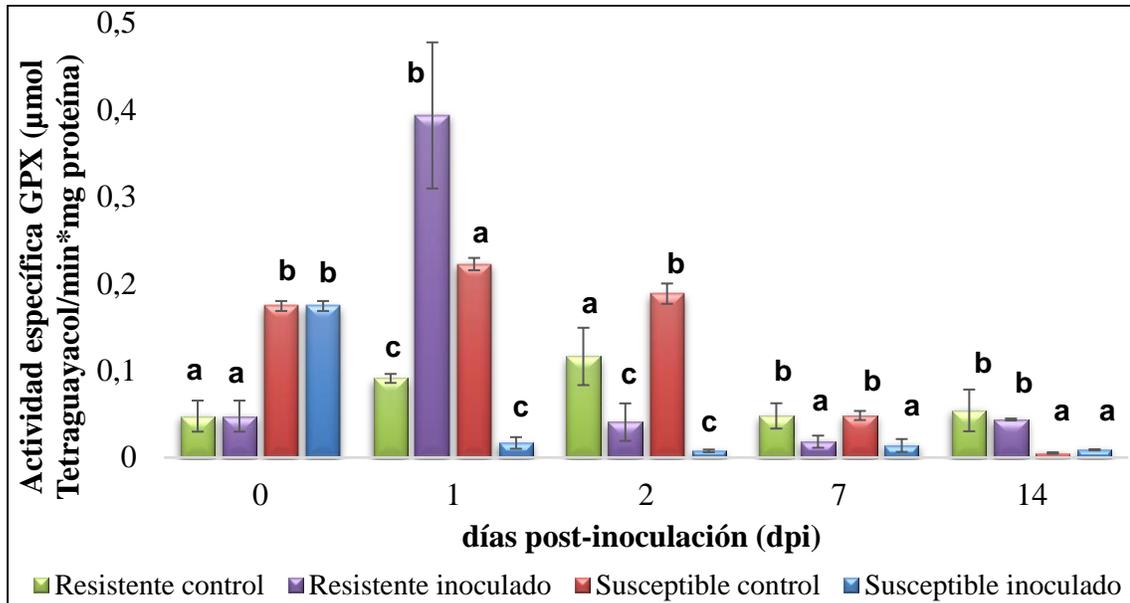
Los resultados obtenidos para la enzima GPX a nivel del simplasto de tallo, se presentan en la gráfica 26. Se evidencia que para esta enzima se presentan diferencias significativas por efecto de la inoculación con el patógeno en la variedad resistente al 1 dpi ($P < 0,05$), mientras que para la para la variedad susceptible no se presentó inducción de esta enzima para ninguno de los tiempos evaluados; de hecho, la actividad disminuyó en los días 1, 2 y 7 dpi. Estos resultados son similares a los encontrados a nivel de la raíz de la planta, indicando que existe una respuesta bastante similar en este tejido; es probable también que se requiera regular los niveles internos de especies reactivas de oxígeno a este nivel.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Ardila et al. 2014, quienes, evaluando material vegetal completo, encontraron en este mismo órgano, un aumento significativo de la actividad a las 12, 24, y 48 horas post-inoculación (hpi). Así mismo, dicho aumento coincide con estudios previos realizados usando tejido completo de otra variedad de clavel resistente (Bárbara), en donde se evidenció un aumento temprano de la actividad GPX a nivel del tallo, sin cambios significativo en el genotipo susceptible (Cuervo et al. 2009).

Es importante resaltar que de acuerdo a un estudio realizado en nuestro grupo de investigación en el espacio extracelular o apoplasto (Cuervo, 2017), esta enzima presenta

también inducción, pero a tiempos más tardíos (7 días). Esto indica que efectivamente la activación de los mecanismos de defensa que asocian estas enzimas, se activa primero a nivel del simplasto. Se ha reportado la presencia de peroxidasas en diversos compartimentos celulares que al parecer pueden activarse en el clavel para generar la correspondiente respuesta de defensa contra el patógeno. Según estudios previos en nuestro grupo de investigación, existe una acumulación significativa de H₂O₂ en este órgano de la planta en los genotipos resistentes. Es por ello que se ha propuesto que una inducción diferencial de enzimas como GPX, puede presentarse en tiempos tempranos con el fin de contrarrestar la elevada concentración de H₂O₂ que pueda afectar el estado fisiológico de planta y favorecer la acción de un patógeno necrotrófico como lo es *Fod*. Estos resultados están de acuerdo con la inducción temprana de GPX durante la interacción con patógenos del género *Fusarium* en genotipos resistentes de otras especies (Prasad, Reddy, Anandam & Reddy, 2003; Huang & Backhouse, 2005; Mandal et al. 2008; Madadkhah et al. 2012).

La disminución que existe en la actividad de GPX a nivel del simplasto del genotipo susceptible, puede estar asociada al mismo fenómeno descrito en raíz; la secreción de proteasas por parte del hongo al citoplasma de la planta. Así mismo, no se debe descartar que la inoculación con el patógeno pueda generar una disminución significativa en la expresión global de ciertos genes asociados con la defensa de plantas (Chen et al. 2014). Estudios posteriores descritos en la presente investigación, usando herramientas moleculares permitirán tener más evidencia sobre los fenómenos involucrados en este proceso.



Gráfica 26. Niveles de actividad GPX en simplasto de tallo, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.3.2.2 Actividad PFO y LOX presente en simplasto de tallo de clavel durante la inoculación con *Fod*

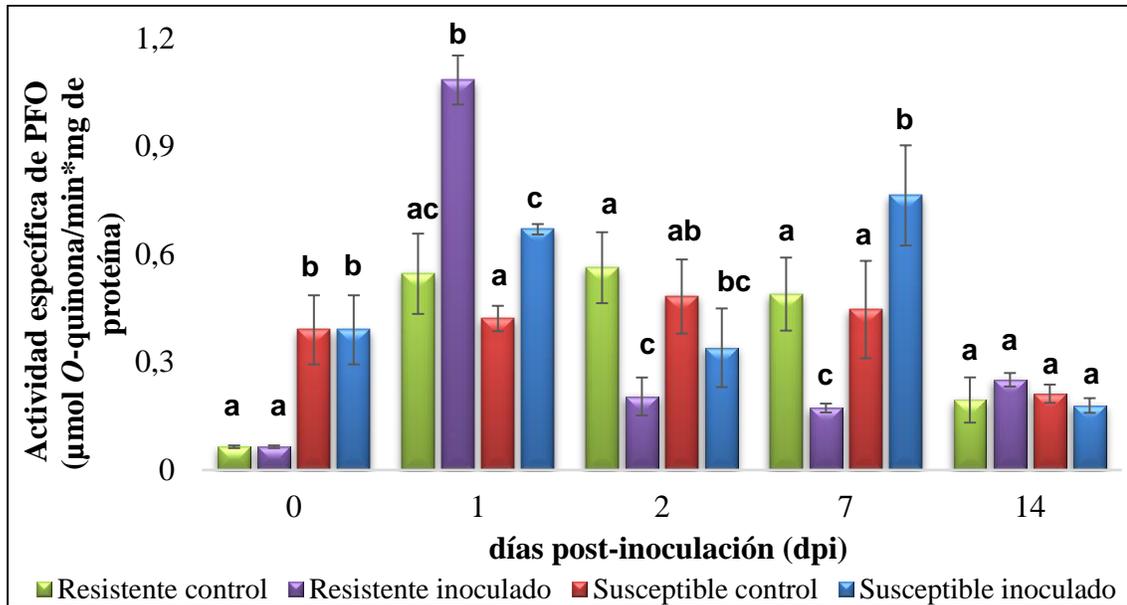
En cuanto a la evaluación de la actividad de las enzimas PFO y LOX en simplasto de tallo, los resultados se muestran en las gráficas 27 y 28, respectivamente. La enzima PFO presentó un incremento de la actividad en el 1 dpi y disminuyó en los 2 y 7 dpi en la variedad resistente; mientras que en la variedad susceptible esta enzima incrementó su actividad en los 1 y 7 dpi. Por otro lado, la actividad LOX disminuyó de manera significativa por efecto de la inoculación con el patógeno, en las dos variedades objeto de estudio y en la mayor parte de los tiempos evaluados.

La inducción de PFO observada para ambas variedades por efecto de la inoculación con el patógeno, evidencia que es una respuesta que está relacionada con mecanismos de defensa basales, que pueden ser activados en variedades resistentes y susceptibles. Estos resultados no coinciden con lo encontrado a nivel del tallo para esta misma enzima usando tejido completo en donde se reportó que esta inducción se presenta solamente en la variedad resistente (Ardila & Higuera, 2005). Esto es muy probablemente debido al efecto de *dilución* que se presenta al usar tejidos completos; tener una fracción con menor cantidad de interferentes proteicos, permite encontrar respuestas que no se pueden detectar en extractos crudos completos. Este mismo fenómeno también fue descrito en la

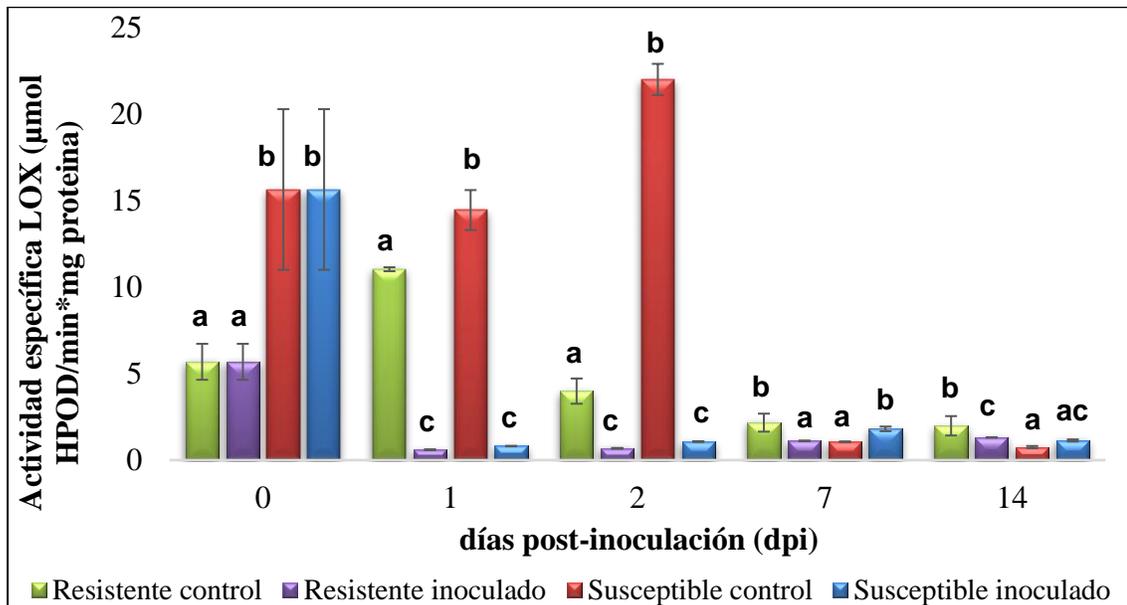
presente investigación a nivel de la raíz para la actividad enzimática PAL, al usar extractos simplásticos. Sin embargo, es evidente que el aumento en la variedad resistente es mucho mayor al descrito en la variedad susceptible, lo cual esta de acuerdo al fenómeno descrito ya para este tipo de respuesta de defensa; las respuestas son mas tempranas y con mayor intensidad en genotipos resistentes.

El aumento de la PFO puede estar asociado a la activación transcripcional de los genes codificantes para esta enzima *pfo* o por la liberación de formas latentes (Mohammadi & Kazemi, 2002; Taranto et al. 2017), lo cual puede ser favorable en oxidación de compuestos fenólicos a quinonas. Se ha demostrado que estos fenólicos almacenados se liberan y se difunden fuera de sus compartimentos vacuolares hacia la célula, allí son oxidados por las PFO y polimerizados entre sí con proteínas celulares y carbohidratos de la pared celular, para formar estructuras "lignificadas". Este tipo de mecanismos de defensa ha sido reportado previamente en clavel, en donde aparte de lignificación de la pared celular, se desarrolla estructuras en el xilema como las tilosas evitando la movilidad de *Fod* a distintas partes de la planta (Baayen et al. 1996; Higuera & Ebrahim-Nesbat, 1997).

Para el caso de la enzima LOX, la actividad disminuyó en todos los días tanto en la variedad resistente como susceptible. Este comportamiento fue similar al encontrado en raíz para ambas variedades (Gráfica 23), y es probable que sea debido a la acción de proteasas secretadas por el patógeno con el fin de afectar la respuesta de defensa de la planta. Así mismo es posible que la disminución en la actividad de LOX esté relacionada a la inactivación de la enzima o a la reducción de la síntesis de proteínas debido a la colonización del patógeno en la planta (Buonaurio & Servili, 1999; Babitha, Prakash & Shetty, 2006). Este fenómeno ha sido reportado a nivel transcripcional también, durante la inoculación con patógenos del género *Fusarium* sp., usando diferentes herramientas transcriptómicas (Chen et al. 2014).



Gráfica 27. Niveles de actividad PFO en simplasto de tallo, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



Gráfica 28. Niveles de actividad LOX en simplasto de tallo, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.3.2.3 Actividad PAL y PLD presente en simplasto de tallo de clavel durante la inoculación con *Fod*

Los niveles simplásticos de las enzimas PAL y PLD en tallo se presentan en la gráfica 29 y 30, respectivamente. Se evidenció que, por efecto de la inoculación en la variedad resistente, la enzima PAL presentó un aumento significativo al 1 dpi, mientras que a los 2

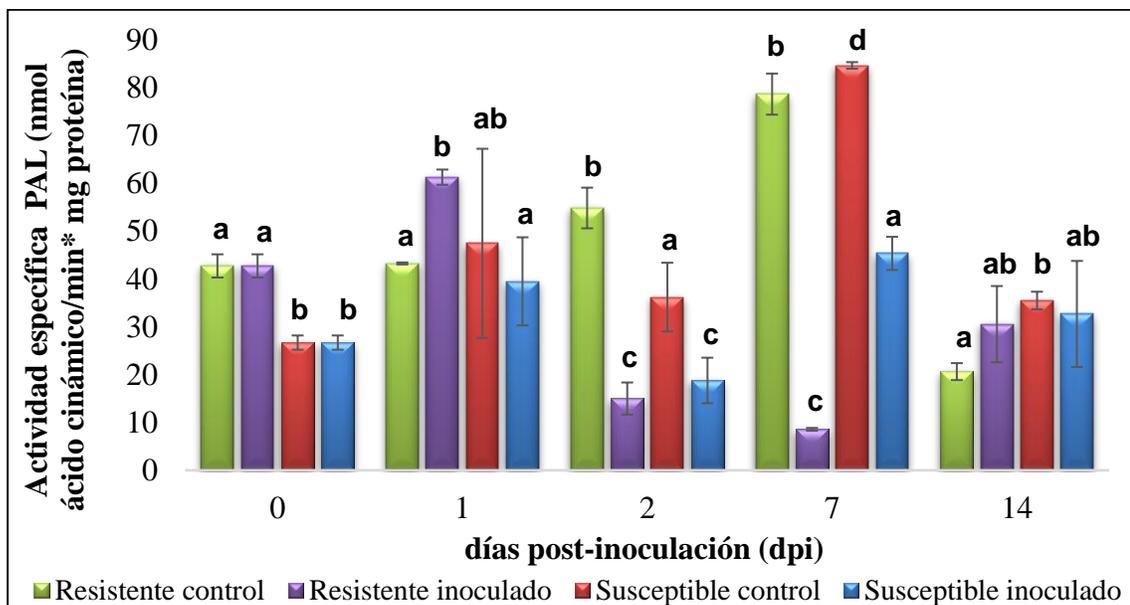
y 7 dpi la inoculación generó una disminución de la actividad para ambas variedades. En el caso de la actividad PLD, la inoculación generó un aumento a 1 dpi en la variedad resistente, mientras que en la variedad susceptible se generó un aumento con menor intensidad a los 2 dpi. En todos los demás tiempos, no se presentaron cambios significativos para ninguna de las variedades.

Estos resultados indican que, entre las repuestas metabólicas asociadas con la presencia del patógeno en el tallo, se encuentra la estimulación de la ruta fenilpropanoide, la cual se requiere para la síntesis de compuesto fenólicos, importantes por su actividad microbiana y por su papel en el reforzamiento de la pared celular (Nieman et al. 1991; Dixon & Paiva, 1995; Curir, Dolci & Galeotti, 2005). Es interesante comentar que esta es la primera vez que se reporta una inducción significativa para esta enzima en tallos de clavel; estudios previos realizados sobre PAL en tallo discuten sobre el papel de la misma en la interacción y se dice que es probable que la evidencia experimental de su inducción solo se pueda encontrar haciendo análisis compartimentalizados en los que se evite el efecto de “*dilución de la respuesta*” que se presenta cuando los tejidos se analizan completamente (Ardila, 2013); a pesar del aumento en compuestos fenólicos en este tejido no había evidencia de un aumento en esta actividad enzimática. De acuerdo a este estudio, se confirma que efectivamente esta enzima se induce a nivel simplástico y que participa en los mecanismos asociados a la resistencia en tallo. Por otro lado, la disminución de PAL presentada posteriormente para los tiempos posteriores por efecto de la inoculación es probable que sea debida a la disminución global de la expresión de algunos genes por efecto de la inoculación; este fenómeno ha sido ampliamente documentado en patosistemas que involucran patógenos del género *Fusarium* sp. (Chen et al. 2014).

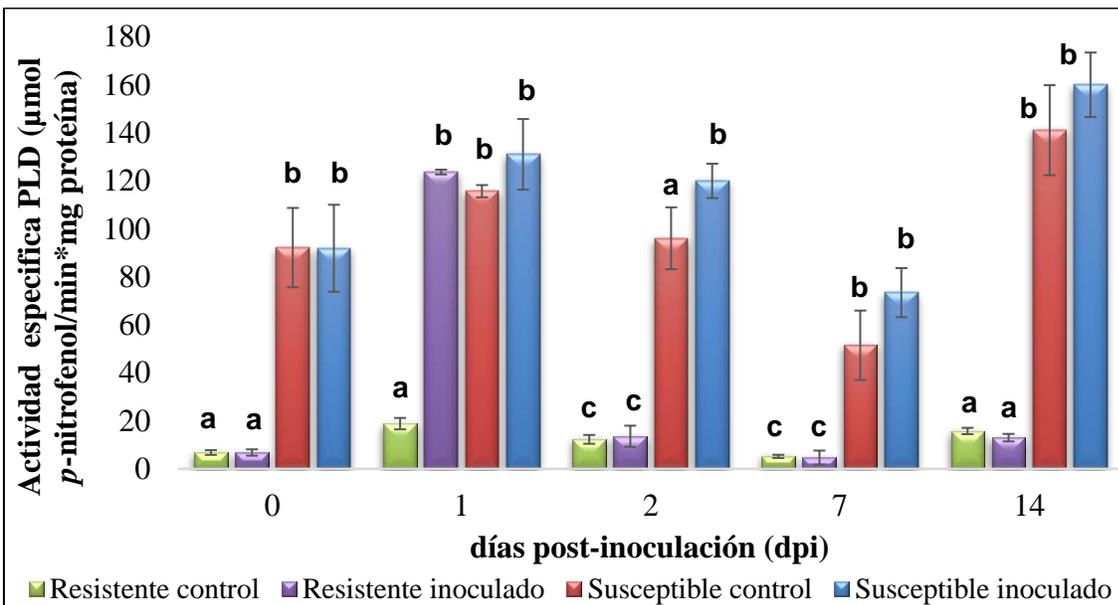
Por otro lado, el incremento en la actividad de PLD al 1 dpi descrito en la presente investigación demuestra que, a tiempos tempranos de la infección con el patógeno, dentro de la primera respuesta presente en los genotipos resistentes debe estar la generación de moléculas señal que involucran la acción de esta enzima. Al considerar la intensidad de esta misma repuesta para el caso de la variedad susceptible, la cual fue de menor intensidad y más tardía, es evidente que esta respuesta bioquímica es mucho más rápida e intensa en el genotipo resistente. Estos resultados son similares con otros estudios que

reportan un incremento temprano de PLD en tejidos vegetales (Young, Wang & Leach, 1996; Yamaguchi, Minami & Shibuya, 2003).

Las PLDs son enzimas que hidrolizan diferentes fosfolípidos de membrana, produciendo ácido fosfatídico (PA) y sus correspondientes grupos esterificados, como pueden ser la colina o etanolamina. Tanto las enzimas PLD, como el ácido fosfatídico (PA) son involucrados en las respuestas de las plantas a la infección por patógenos (Young et al. 1996), inductores de defensa (Yamaguchi et al. 2003) y, heridas (Li et al. 2017), etc. Se ha demostrado que la PLD y la formación de PA son señales requeridas para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yamaguchi et al. 2004). Sin embargo, a pesar de que a nivel de simplasto no se evaluó la acumulación de H₂O₂, se evidenció que a nivel de apoplasto y en material vegetal completo se presentó una acumulación del mismo a las 24 hpi en la variedad resistente (Ardila et al 2014); es posible que el incremento de PLD esté relacionado con incremento de H₂O₂ en tejidos de clavel. Se ha reportado que el PA derivado de PLD puede interactuar directamente con homólogos de oxidasas (RBOH) en la membrana plasmática y regular la producción de H₂O₂ y estrés oxidativo (Zhao, 2015; Jianwu & Xuemin, 2018). Sin embargo, se requieren más estudios que permitan corroborar estas propuestas que permitan determinar la presencia de HR en este tejido de la planta, así como ensayos funcionales con mutantes de clavel comprometidos en la producción de peróxido en los tejidos vegetales.



Gráfica 29. Niveles de actividad PAL en simplasto de tallo, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



Gráfica 30. Niveles de actividad PLD en simplasto de tallo, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

De acuerdo con los resultados obtenidos a nivel de simplasto de tallo, es posible que en este órgano se presente la activación de mecanismos de defensa asociados a la activación de procesos como la biosíntesis de metabolitos secundarios provenientes de la ruta fenilpropaioide; es interesante recordar en este momento, que el ácido salicílico efectivamente proviene de esta ruta. Sin embargo, la evidencia presentada hasta este punto es parcial y se requiere contrastar con otros estudios que permitan determinar a nivel proteómico y transcriptómica, la respuesta completa asociada a la interacción clavel-*Fod*.

4.4 NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE GENES CODIFICANTES PARA ENZIMAS SIMPLÁSTICAS PAL Y GPX, EN RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL DURANTE LA INTERACCIÓN CON *Fod*

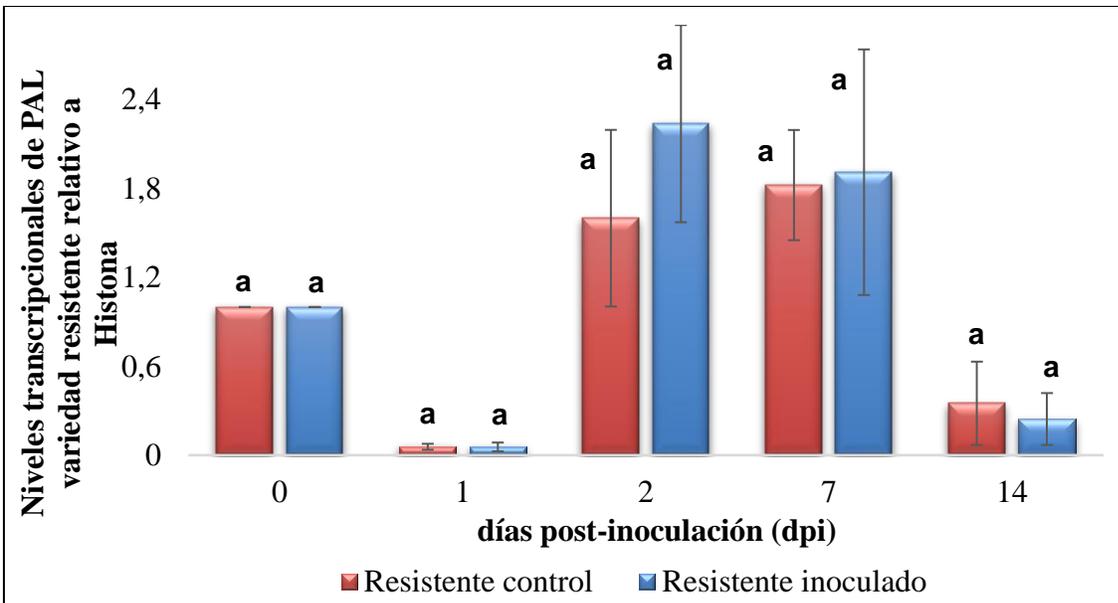
Con el fin de tener más evidencia experimental que permitiera confirmar algunas de las respuestas bioquímicas de interés encontradas hasta este punto, se realizó el análisis transcripcional de genes que codifican para algunas enzimas simplásticas presentes en el clavel. El diseño correspondiente de los primers para estos casos se realizó usando secuencias para las cuales se les había verificado su posible localización simplástica mediante herramientas bioinformáticas que permiten verificar la posible secreción por vías clásicas o no clásicas (Sección 2.5.1 de Materiales y métodos). De esta manera se verificó que las secuencias usadas para el diseño no presentarán señales de localización extracelular reportadas a la fecha (Tabla 3).

Por otro lado, el uso de secuencias específicas provenientes de la base de datos de la planta en el diseño de primers (<http://carnation.kazusa.or.jp/>), permitió corroborar que no se presentará la amplificación de secuencias provenientes del patógeno. Esta aproximación se realizó solamente en aquellos casos que habían presentado un cambio a nivel de la actividad enzimática; a pesar de que este último parámetro es finalmente el indicativo más directo de la funcionalidad de la enzima, los análisis a nivel transcripcional permiten validar en algunos casos la respuesta bioquímica encontrada.

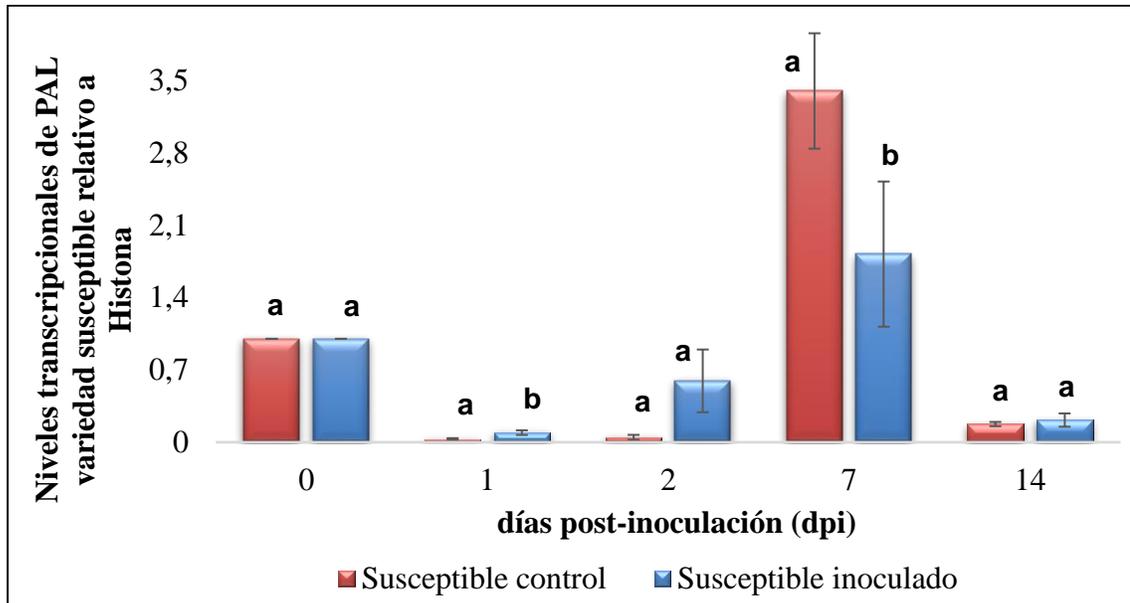
4.4.1 Efecto de la inoculación con *Fod* en los niveles transcripcionales del gen *dca57541.1* codificante para una PAL simplástica en raíz de clavel

De acuerdo con los resultados de actividad observados para PAL a nivel de la raíz, se evaluaron los niveles transcripcionales de genes codificantes para esta enzima usando primers específicos diseñados para la secuencia del gen *Dca57541.1*, el cual codifica para una PAL simplástica de clavel. En la gráfica 31 se observa que, para la variedad resistente inoculada con *Fod*, no se evidenció aumento en los niveles transcripcionales para la enzima PAL simplástica seleccionada en ninguno de los tiempos evaluados. Por el contrario, en la variedad susceptible se presentó un incremento en los niveles

transcripcionales al día 1, y una posterior disminución de los transcritos al 7 dpi (Gráfica 32). Por otro lado, teniendo en cuenta que la actividad enzimática de PAL en la variedad susceptible inicia al día 1 y se mantiene en los 7 y 14 dpi, se propone que la inducción vista al primer día post-inoculación, puede ser debida al aumento en los niveles transcripcionales del gen *Dca57541.1*.



Gráfica 31. Niveles de ARNm codificante para una PAL simplástica a nivel de raíz, durante la interacción con *Fod* en la variedad Resistente. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



Gráfica 32. Niveles de ARNm codificante para una PAL simplástica a nivel de raíz, durante la interacción con *Fod* en la variedad Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

El incremento en la actividad PAL en la variedad resistente a nivel de raíz no está relacionado con un aumento en los niveles transcripcional del gen *Dca57541.1*; esto indica que es probable la presencia de otros fenómenos de regulación implicados. Fenómenos como la disponibilidad del transcritos para llevarse a cabo la traducción (Shirsat & Nair, 1986; Reddy et al. 2000) o a modificaciones post-traduccionales sobre la proteína PAL (Zhang, Gou & Liu, 2013; Zhang & Liu, 2015), han sido reportados en otras especies vegetales.

Respecto a la variedad susceptible, el incremento en los transcritos para las plantas inoculadas al 1 dpi, coincide con el aumento en los niveles de actividad enzimática presentado en este mismo día. Sin embargo, la inducción de PAL presentada en los demás días evaluados, no concuerdan con los niveles transcripcionales. Resultados similares se han reportado en otros estudios, en donde los niveles de ARNm para las plantas inoculadas incrementaron a las 6 y 96 hpi de manera independiente con un aumento en la actividad enzimática (Ardila et al. 2011).

Nuestros resultados sugieren que la enzima PAL puede estar siendo regulada a nivel transcripcional en el caso de la variedad susceptible. Sin embargo, para la variedad

resistente es posible que se presentes mecanismos de regulación post-transcripcionales o post-traduccionales.

4.4.2 Efecto de la inoculación con *Fod* en los niveles transcripcionales de un gen codificante para una GPX simplástica en raíz de clavel

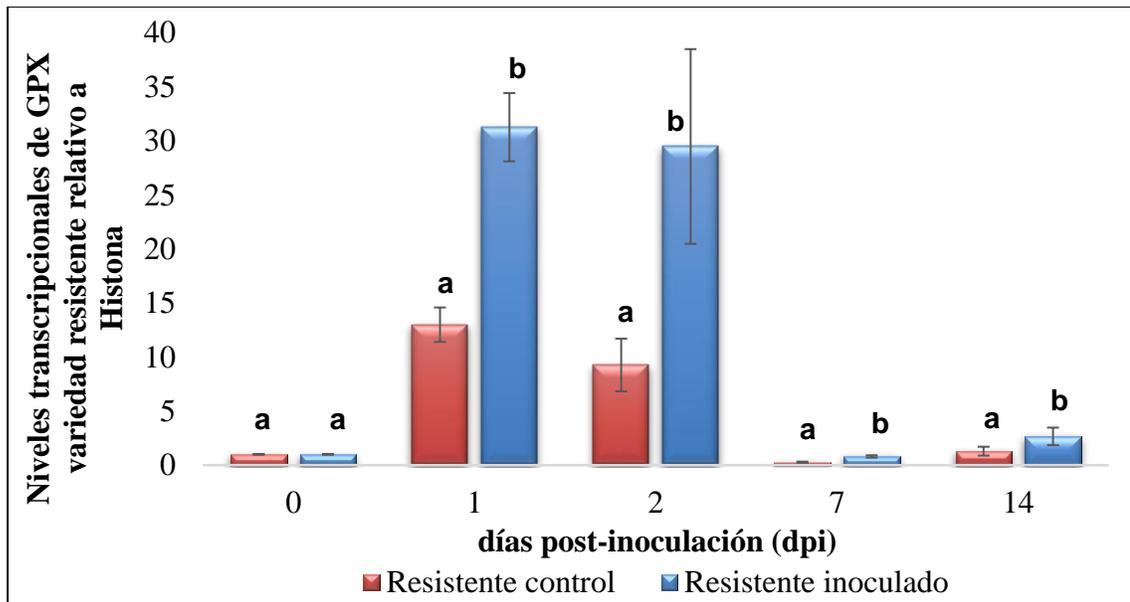
Bajo las mismas consideraciones descritas anteriormente, se prosiguió con la evaluación de los niveles transcripcionales para la enzima GPX simplástica a nivel de la raíz. Para ello se diseñaron primers específicos a partir de la secuencia del gen *Dca3620.1*, el cual codifica para una GPX simplástica de clavel. Los resultados transcripcionales para este gen se describen en las gráficas 33 y 34, utilizando como gen de referencia el codificante para la histona *Dca5219.1*.

Los resultados obtenidos para la variedad resistente se presentan en la gráfica 33. Se evidencia que en los días 1 y 2 dpi los niveles transcripcionales en el tratamiento inoculado, incrementan 3 veces más que su respectivo control. En los demás días evaluados este comportamiento se mantiene, pero en una menor proporción (Gráfica 33). Por su parte, la variedad susceptible sólo presentó un incremento a los 2 dpi y disminuyó al 7 dpi (Gráfica 34). Estos resultados evidencian que la inoculación con el patógeno en la variedad resistente, genera una acumulación diferencial de los transcritos para una GPX simplástica. De acuerdo a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación para proteínas apoplásticas (Cuervo, 2017), es evidente que la respuesta asociada a la defensa de la planta a nivel de la raíz, conlleva al aumento en los niveles de estas enzimas en diferentes niveles de compartimentalización celular (apoplasto y simplasto), indicando que la regulación de los niveles de peróxido de hidrógeno, se debe llevar a cabo en todo el tejido y no solo a nivel extracelular.

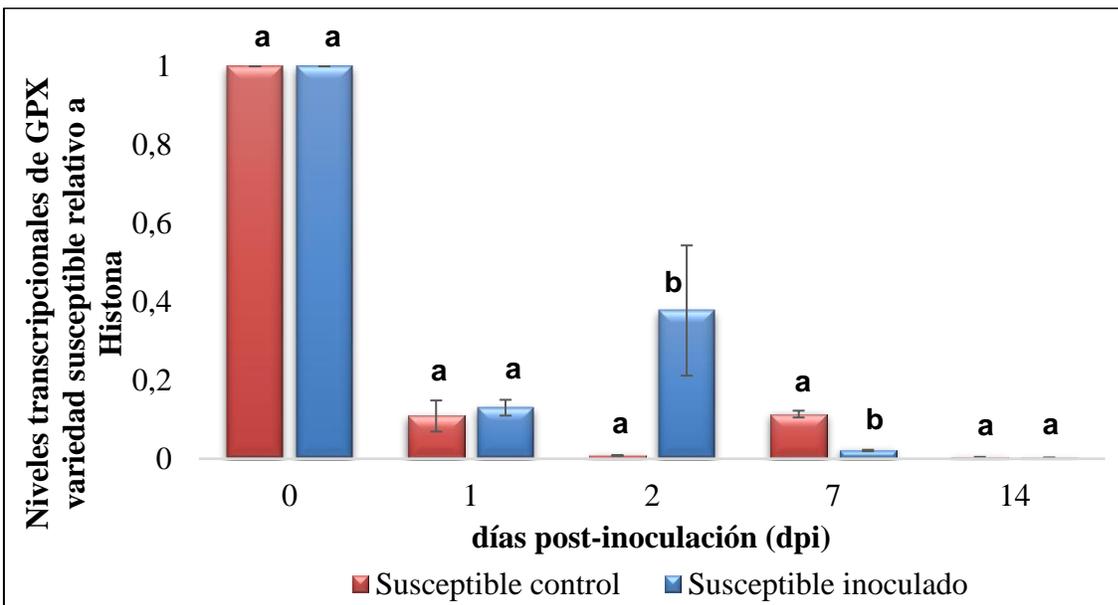
De acuerdo a la presente investigación se encuentra que, a 1 dpi en la variedad resistente, el aumento a nivel transcripcional concuerda con el aumento en la actividad enzimática; esto indica una posible regulación a nivel transcripcional para esta enzima en tiempos tempranos de la interacción. Sin embargo, a tiempos más tardíos, a pesar del incremento en el ARNm en los demás días, no hubo cambios significativos en la actividad enzimática (Gráfica 21). Esto posiblemente se debe a que existen mecanismos de regulación

postranscripcional que estén afectando la estabilidad, la localización o la actividad de la enzima activa (Gabaldón, Gómez-Ros, Núñez-Flores, Esteban-Carrasco & Barceló, 2007; Iris, Stulemeijer & Joosten, 2008; Waszczak et al. 2015). Es probable que las GPX sean blancos de estas modificaciones y afecten la actividad de la proteína. Por otro lado, al comparar los niveles de ARNm obtenidos en la variedad susceptible con la actividad de GPX (Gráfica 21), los resultados no son consistentes; es evidente que también en este genotipo deben existir mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional que posiblemente regulen los niveles finales de las enzimas activas.

Sin embargo, no se debe olvidar que solo se evaluó la expresión de una sola de las secuencias y es posible que otras enzimas estén también afectando la actividad final determinada. En el caso correspondiente de las peroxidasas apoplásticas, se han encontrado un número importante de isoformas codificadas por un importante número de genes (Almagro et al. 2009).



Gráfica 33. Niveles de ARNm codificante para una GPX simplástica a nivel de raíz, durante la interacción con *Fod* en la variedad Resistente. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



Gráfica 34. Niveles de ARNm codificante para una GPX simplástica a nivel de raíz, durante la interacción con *Fod* en la variedad Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

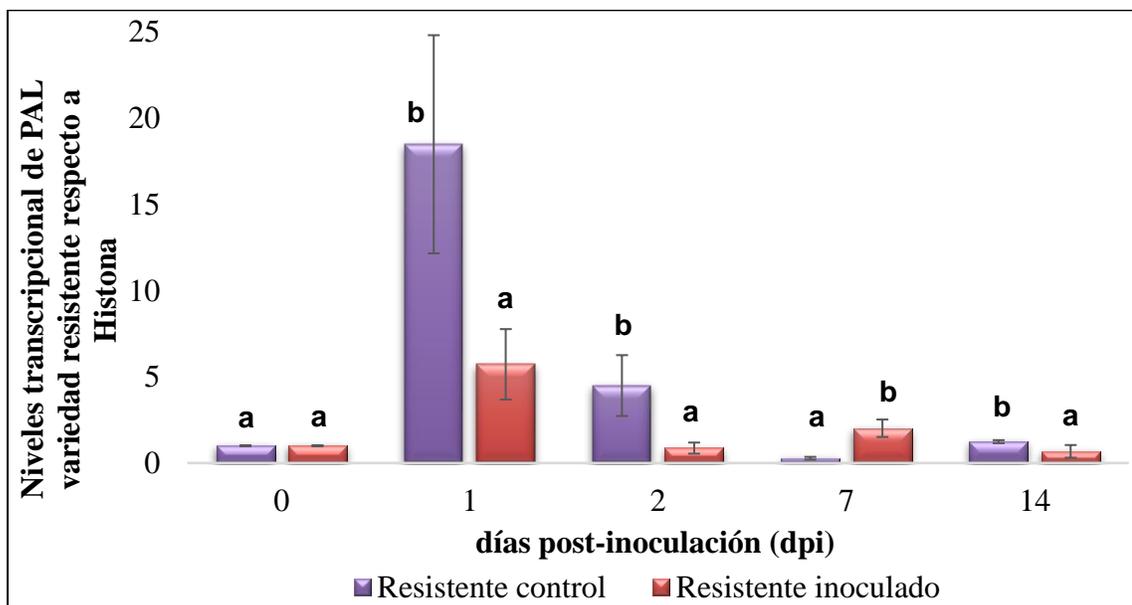
4.4.3 Efecto de la inoculación con *Fod* en los niveles transcripcionales del gen *dca57541.1* codificante para una PAL simplástica en tallo de clavel

Para el caso de la enzima PAL en tallo, la cual aumento sus niveles de actividad al día 1 para la variedad resistente inoculada, se quiso comprobar si dicho aumento estaba relacionado con el incremento transcripcional del gen *dca57541.1* codificante para una PAL simplástica. Nuestros resultados sugieren que este aumento en la actividad es independiente de los cambios en los niveles de transcrito para esta secuencia.

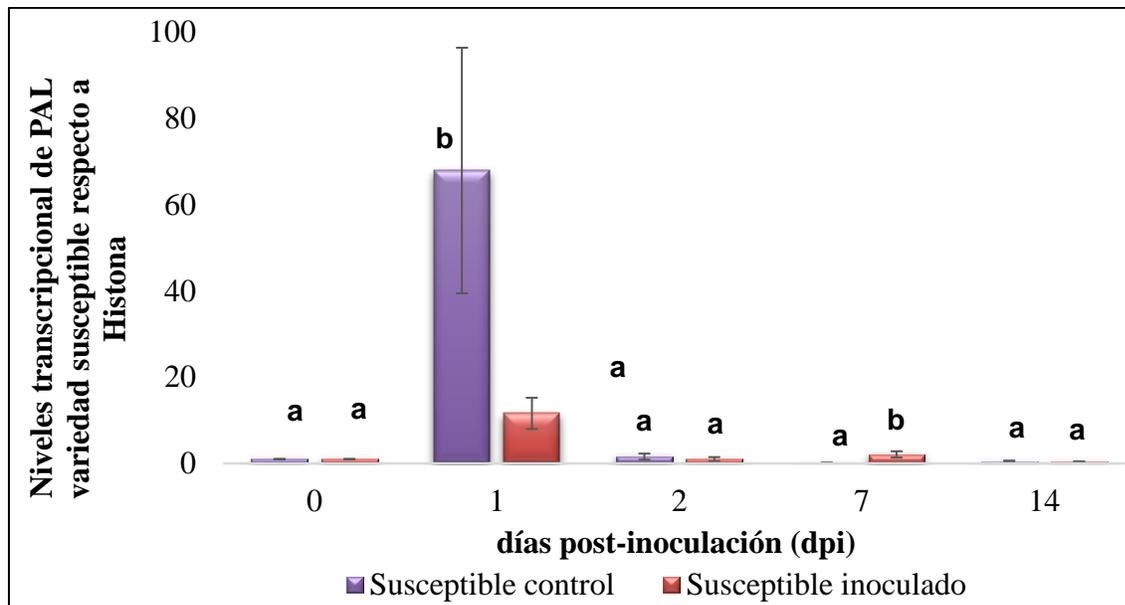
Se evidenció que tanto la variedad resistente como susceptible no presentaron cambios en los niveles de ARNm que puedan ser asociados a la infección con el patógeno *Fod*, de hecho, los transcritos disminuyeron para la variedad resistente a los 1, 2, 14 dpi (Gráfica 35) y para la variedad susceptible al 1 dpi (Gráfica 36). Para ambas variedades se observó un incremento de transcritos al 7 dpi. Disminución en la expresión de algunos genes de defensa durante la inoculación con patógenos del genero *Fusarium*, han sido descritos usando herramientas transcriptómicas (Chen et al. 2014)

Al comparar con los niveles de actividad enzimática encontrado en simplasto de tallo (Gráfica No. 29), es evidente que no hay una relación para ninguna de las variedades evaluadas. Estos resultados indican que no hay estimulación temprana a nivel transcripcional para PAL en este órgano de la planta durante la infección con el patógeno, pese al aumento en la actividad en la variedad resistente. Es evidente que, en este órgano, al igual que lo observado en raíz, la regulación transcripcional no parece estar modulando la actividad enzimática observada. Por lo tanto, es posible que el incremento en la actividad encontrado sea debido a fenómenos de regulación post-traduccional de la enzima.

Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (Ardila, 2013), en donde el aumento de la actividad enzimática PAL están determinados por otros fenómenos de regulación diferentes al transcripcional. Sin embargo, vale la pena recordar que en otras especies que se ha podido determinar que sólo del 20 al 40% de las diferencias en la abundancia de proteínas pueden atribuirse a la abundancia variable de ARNm, es decir que la abundancia relativa de una proteína no necesariamente está relacionada con la abundancia de su transcrito (Tian et al. 2004; Nie, Wu & Zhang, 2006). Procesos regulatorios adicionales a nivel de la traducción, de modificaciones post-transcripcionales o de degradación de proteínas pueden afectar la abundancia de una proteína (Vogel & Marcotte, 2012); es probable que estos procesos incluyan a la PAL de clave.



Gráfica 35. Niveles de ARNm codificante para una PAL simplástica a nivel de tallo, durante la interacción con *Fod* en la variedad Resistente. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



Gráfica 36. Niveles de ARNm codificante para una PAL simplástica a nivel de tallo, durante la interacción con *Fod* en la variedad Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

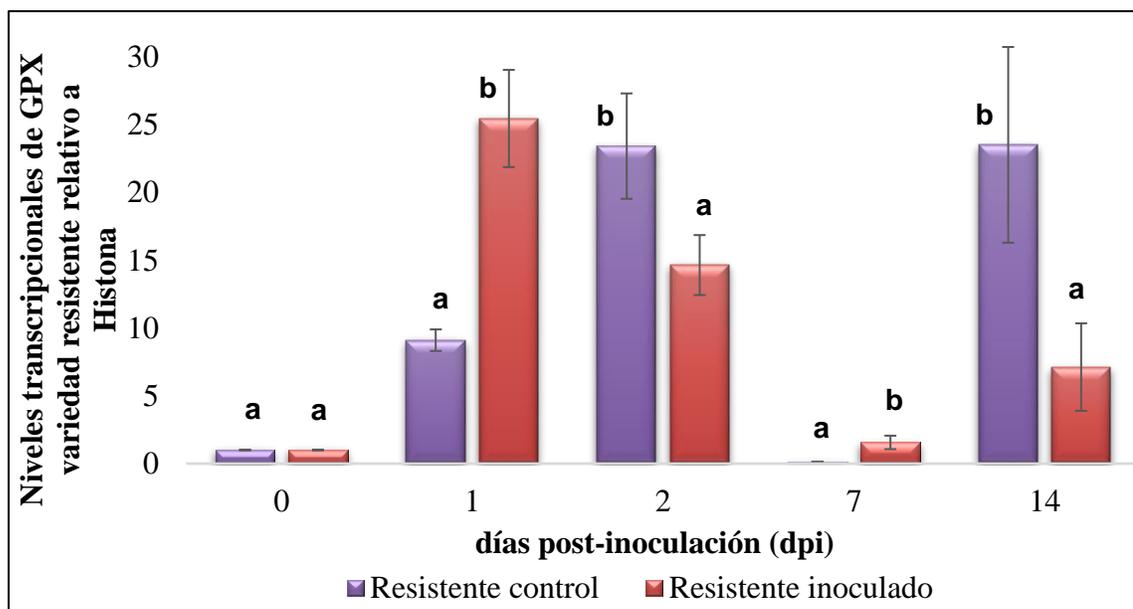
4.4.4 Efecto de la inoculación con *Fod* en los niveles transcripcionales de un gen codificante para una GPX simplástica en tallo de clavel

Para el caso de la enzima GPX en tallo, se diseñaron primers específicos a partir de la secuencia *dca3620.1*, la cual codifica para una GPX simplástica de clavel. Los resultados para los niveles transcripcionales de este gen a nivel del tallo de las variedades objeto de estudio (Resistente y Susceptible), se describen en la gráfica 37 y 38.

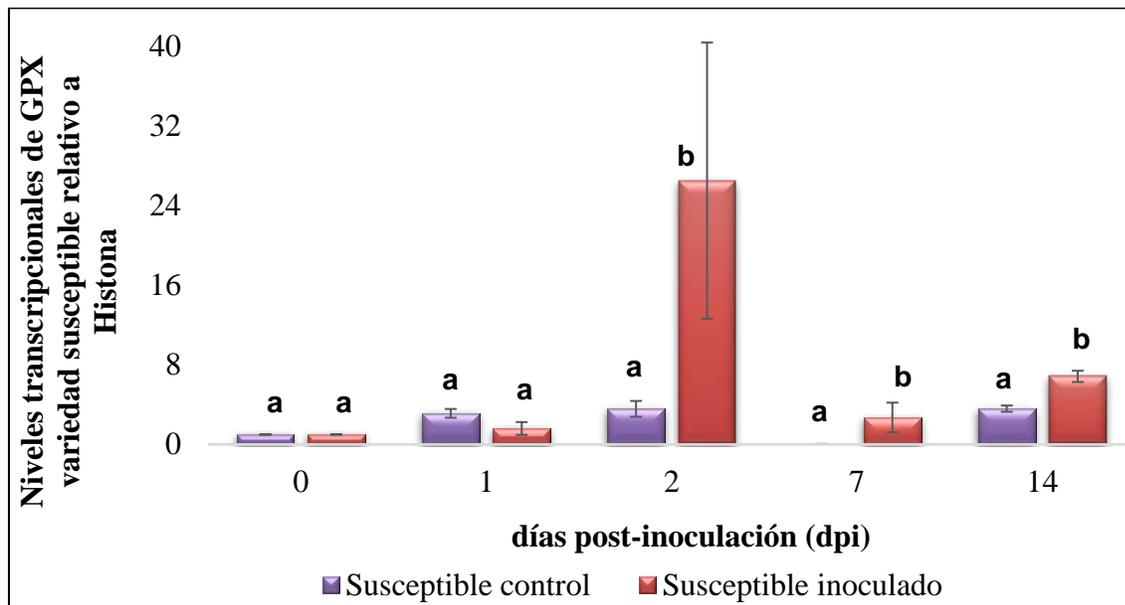
De acuerdo con los análisis realizados se evidencia que la presencia del patógeno *Fod* generó en la variedad resistente, un aumento significativo en la transcripción del gen que codifican para la enzima GPX simplástica al 1 y 7 dpi (Gráfica 37). Teniendo en cuenta que, en esta variedad se presentó también un aumento en la actividad enzimática en los mismos tiempos, se propone que, en este caso, si se puede presentar que la regulación a nivel de la transcripción del gen *dca3620.1*, pueda tener un efecto en la actividad de esta enzima (Gráfica 26). Por el contrario, en el caso de la variedad susceptible el aumento por

efecto de la inoculación al 2 dpi, que corresponde 7 veces a lo encontrado en el control, no representa un incremento en la actividad enzimática (gráfica 38).

Estos resultados evidencian que, a nivel de tallo, la inoculación con el patógeno *Fod* genera una inducción diferencial de la transcripción del gen codificante para dicha enzima simplástica, muy probablemente relacionada con el aumento de la actividad enzimática. Por el contrario, en el caso de la variedad susceptible, esta relación no existe, indicando que en este genotipo deben existir otros mecanismos que posiblemente afectan la estabilidad o actividad de la enzima, tal y como ha sido reportado para otros autores (Waszczak et al. 2015). Estos resultados coinciden con reportes previos de nuestro grupo de investigación, en donde se evidenció que el aumento de la actividad en tejido completo, esta asociada a cambios a nivel transcripcional (Ardila et al. 2014). En diversas interacciones planta-patógeno se han reportado también resultados similares a los reportados por la presente investigación (Desmond et al. 2006; Hao, Wang, Huang & Tao, 2012; Lanubile, Bernardi, Marocco, Logrieco & Paciolla, 2012).



Gráfica 37. Niveles de ARNm codificante para una GPX simplástica a nivel de tallo, durante la interacción con *Fod* en la variedad Resistente. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



Gráfica 38. Niveles de ARNm codificante para una GPX simplástica a nivel de tallo, durante la interacción con *Fod* en la variedad Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.5 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES TOTALES DE FENOLES Y ACUMULACIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO Y ÁCIDO SALICÍLICO EN SIMPLASTO DE RAÍZ Y TALLO DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) DURANTE SU INTERACCIÓN CON EL PATÓGENO *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Uno de los objetivos centrales de la presente investigación era encontrar eventos de señalización relacionados con resistencia o susceptibilidad, que se activan a nivel de simplasto de clavel durante la interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*). Es por ello que en la presente etapa de la investigación se evaluaron algunas hormonas vegetales que han sido ampliamente relacionadas con resistencia vegetal.

Es bien sabido que las vías de señalización que involucran hormonas como el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA), se han especializado para mediar respuestas de defensa a tipos particulares de patógenos. A pesar de que existen reportes de vías de señalización asociadas a resistencia a patógenos del género *Fusarium*, a la fecha en el

modelo clavel-*Fod* se desconoce que vías de señalización están involucradas en la resistencia del clavel a este patógeno.

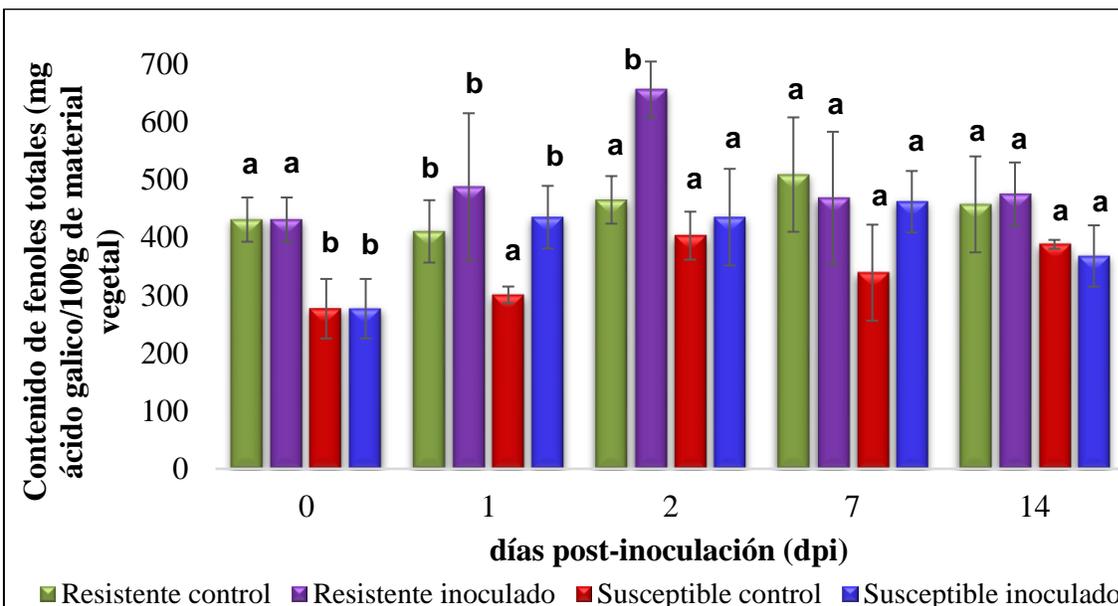
Como un complemento al estudio de las vías de señalización en simplasto de clavel, se determinó el contenido total de fenoles, ya que permite un acercamiento en el comportamiento general de los metabolitos. El análisis conjunto de estos resultados permitió obtener información de los fenómenos responsables de la señalización durante esta interacción planta-patógeno y se postulan aquellos mecanismos que pueden estar asociados con la resistencia a la enfermedad.

4.5.1 Efecto de la inoculación con *Fod* en el contenido total de fenoles en simplasto a nivel de las raíces del clavel

La determinación del contenido total de fenoles se realizó de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos (sección 2). Se encontró que, en raíz de la variedad susceptible, se generó un aumento de los niveles de fenoles totales al 1 dpi, así mismo, la variedad resistente presentó una acumulación del contenido total de fenoles al 2 dpi. (Gráfica 39). Estos resultados se relacionan como era de esperarse, con la actividad enzimática de PAL presentados en estos mismos tiempos para ambas variedades (Gráfica 24); se conoce que la ruta fenilpropanoide donde participa esta enzima, es una de las principales generadoras de fenoles a nivel citosólico (Dixon & Paiva, 1995; Hyun et al. 2011).

Estos resultados concuerdan a lo reportado previamente en nuestro grupo de investigación para la variedad resistente L.P Candy usando el tejido de las raíces completo (Ardila, 2013). En el estudio realizado por Higuera 2001, se encontró un aumento en los niveles de ciertos compuestos fenólicos usando HPLC en este órgano de la planta por efecto de la inoculación con el patógeno. Sin embargo, en dicho estudio la acumulación se presentó a partir de las 96 hpi y no desde el 2 dpi encontrado en esta investigación. Esto posiblemente se deba al proceso de extracción mismo, ya que en este estudio se utilizó metanol al 80% (V/V), en cuyo caso permita la extracción de componente fenólicos más polares, que no son extraídos con acetona, este último utilizado como solvente de extracción por Higuera 2001. De esta manera, es probable que los compuestos que se inducen al 1 y 2 dpi, sean aquellos fenoles de mayor polaridad; diferentes flavonoides glicosilados han sido reportados en tallos y raíces de estas plantas resistentes a la enfermedad.

De acuerdo con los resultados es posible sugerir que los metabolitos que se inducen en los primeros dos días después de la inoculación estén relacionados con la primera línea de defensa química en las plantas, ya que se acumulan a tiempo tempranos de la interacción y pueden participar como precursores de diferentes fenómenos asociados al fortalecimiento de paredes celulares durante el evento de la interacción con el patógeno (Beckman, 2000; Shulaev et al. 2008). Se ha demostrado que tras la infección los fenólicos almacenados se liberan y se difunde fuera de sus compartimientos vacuolares hacia la célula en general. En dichas células se polimerizan entre sí, además de polimerizarse con proteínas y carbohidratos de la pared celular para formar estructuras lignificadas. Los fenoles pueden ayudar a bloquear los sitios inmediatos de infección sustancias que destruyen las células en cuestión y, en el proceso, crean macromoléculas inertes grandes y duraderas (Beckman, 2000; Lattanzio, Lattanzio & Cardinali, 2006).

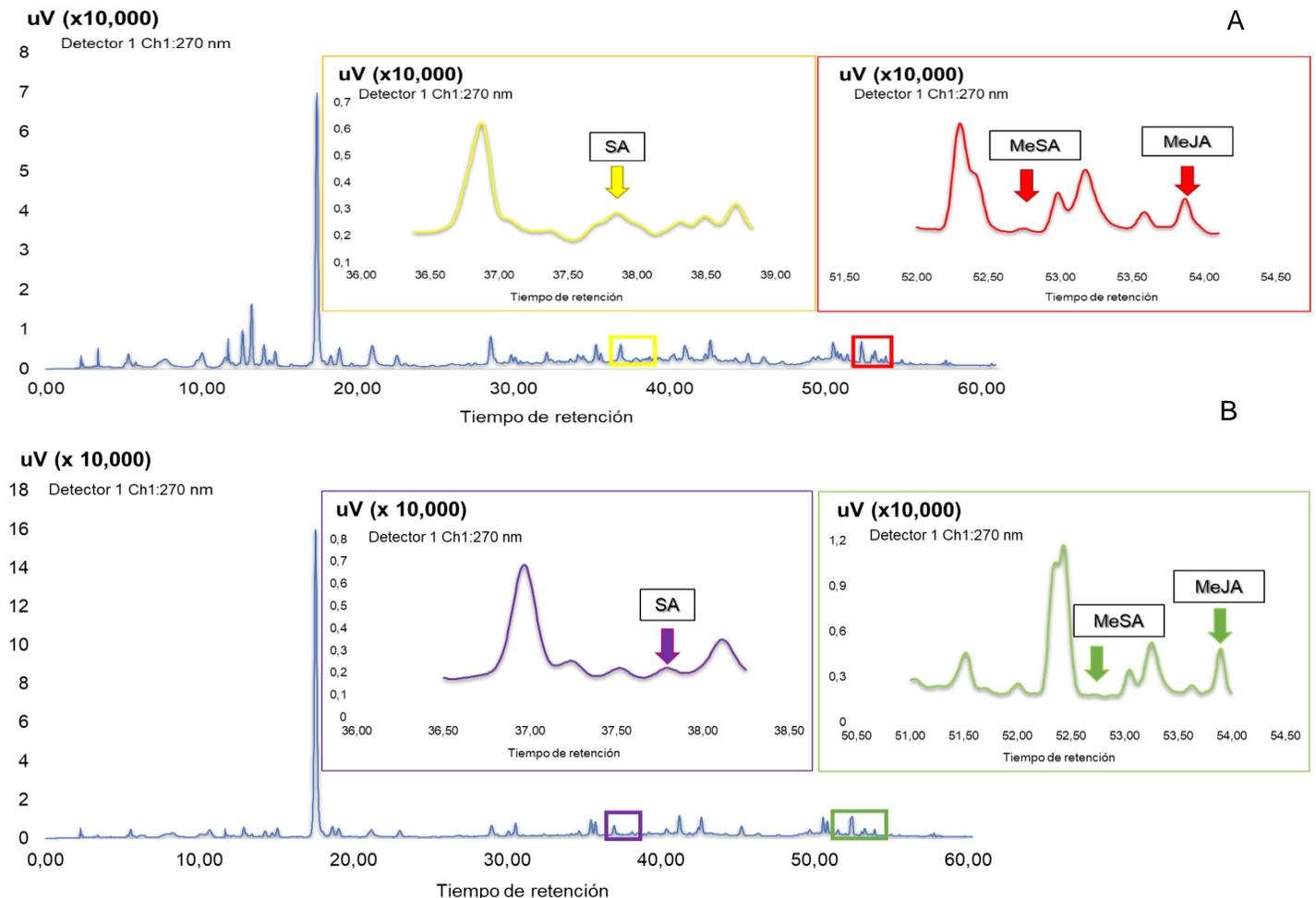


Gráfica 39. Contenido total de fenoles en simplasto de raíz de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4.5.2 Efecto de la inoculación con *Fod* en la concentración de hormonas asociadas a la resistencia vegetal en simplasto de raíz de clavel usando HPLC

En esta etapa de la investigación se analizó la acumulación de Salicilato de metilo (MeSA), Ácido salicílico (SA), Ácido Jasmónico (JA) y Jasmonato de Metilo (MeJA) en plantas de clavel durante la infección con el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*), para ello, se usaron las condiciones de extracción y análisis cromatográfico, descritas en la sección 2 de materiales y métodos.

Es importante recordar que se utilizaron patrones estándar certificados, con el fin de determinar el tiempo de retención de las hormonas en los extractos de los tejidos vegetales evaluados. Así mismo, se realizó verificación del posible corrimiento en los tiempos de retención por efecto matriz, usando suplementación de los patrones en los extractos objeto de análisis (Resultados no mostrados). Estos ensayos son fundamentales cuando se pretende realizar la cuantificación de compuestos específicos en matrices vegetales complejas. A continuación, se presenta un perfil típico obtenido a partir de simplasto de tallo de clavel tanto para la variedad resistente, como para la susceptible (Gráfica 40). En la gráfica se presentan las señales usadas para la cuantificación de los metabolitos de interés de acuerdo con su respectivo tiempo de retención. Es importante resaltar que los perfiles cromatográficos difieren entre ambas variedades, lo que puede ser debido a diferencias en su *background* genético o a diferencias fisiológicas propias de la variedad.

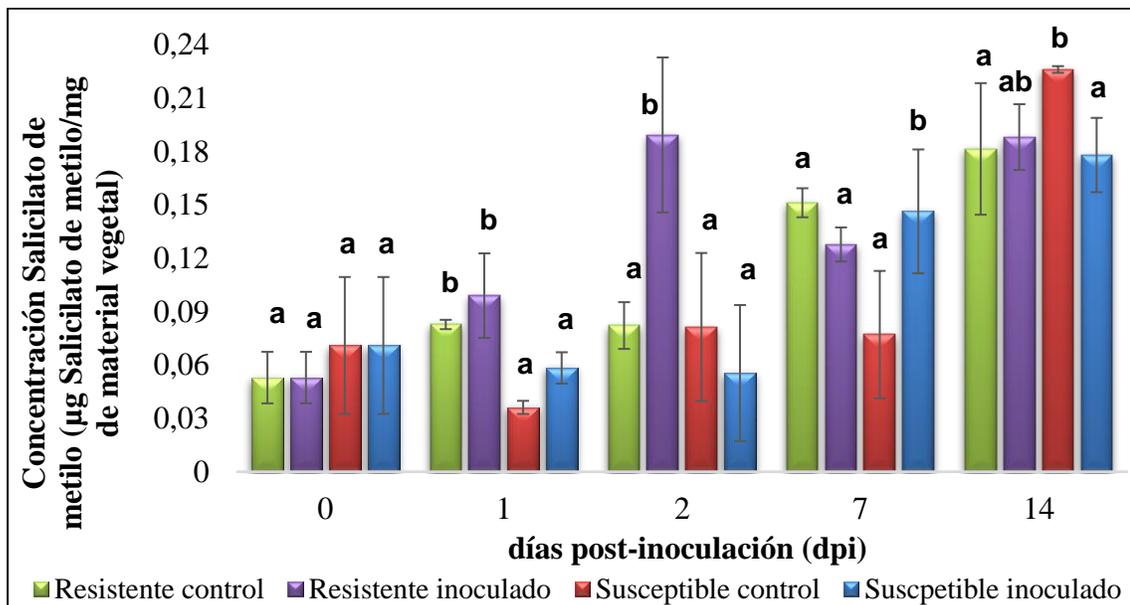


Gráfica 40. Perfil cromatográfico para extractos de simplasto obtenidos a partir de tallo de clavel: A) Variedad resistente (Golem), B) Variedad susceptible (Solex).

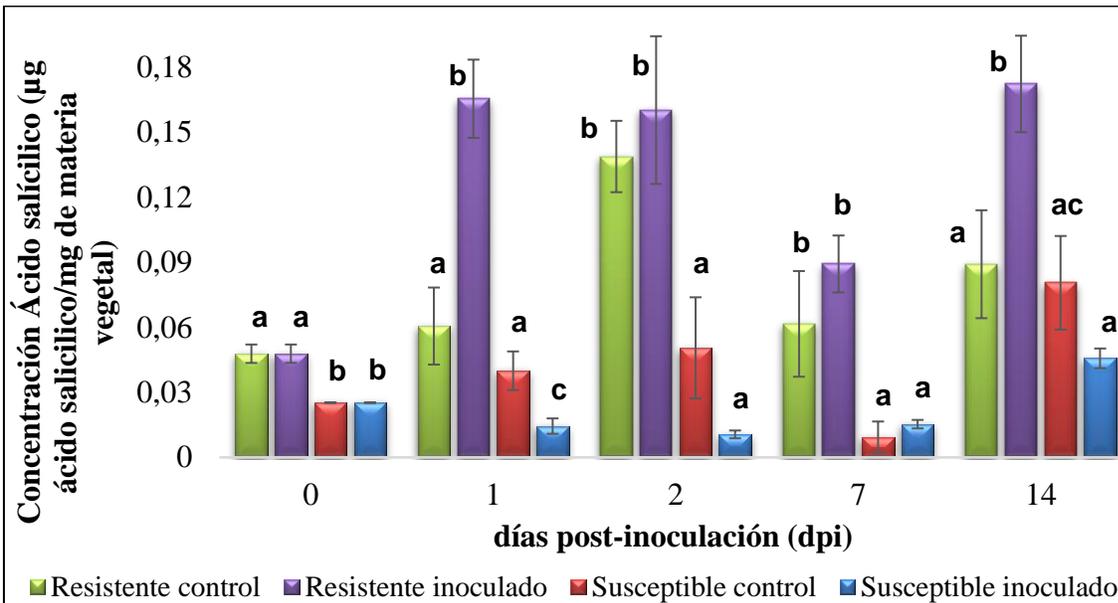
Para el compuesto Ácido Jasmónico (JA), los niveles presentados en todos los extractos se encontraron por debajo del límite de detección de la técnica; en todos los casos se realizó la verificación de que el área bajo la curva encontrada de cada señal en las muestras problema, se encontraran dentro del rango evaluado en la curva de calibración. Es por ello que en el caso particular de este compuesto no se presentan resultados en la presente investigación. Para su cuantificación en próximos estudios, se sugiere realizar la detección usando otros sistemas como espectrometría de masas; es bien sabido que esta herramienta permite en modo SIM (*Single Ion Monitored*), hacer la detección de compuestos específicos con alta sensibilidad.

Con respecto a los resultados obtenidos para la acumulación de salicilato de metilo a nivel de la raíz en las dos variedades evaluadas (Gráfica No. 41), se observa que la inoculación con el patógeno genera en la variedad resistente, un aumento a los 2 dpi de este compuesto, mientras que, en la variedad susceptible, un aumento tardío y menos significativo, se presenta a 7dpi.

Por otro lado, para el caso del ácido salicílico (Gráfica No. 42), su acumulación en la variedad resistente fue evidente a tiempos tempranos y tardíos (1 y 14 dpi) por efecto del patógeno, incrementando en ambos tiempos alrededor de 0,18 μg de SA mg^{-1} en el tratamiento inoculado, lo que corresponde a dos veces más que su respectivo control. En cuanto a la variedad susceptible, no hubo diferencias significativas respecto al control, a excepción del 1 dpi donde la concentración de SA disminuyó en el tratamiento inoculado (Gráfica 42).

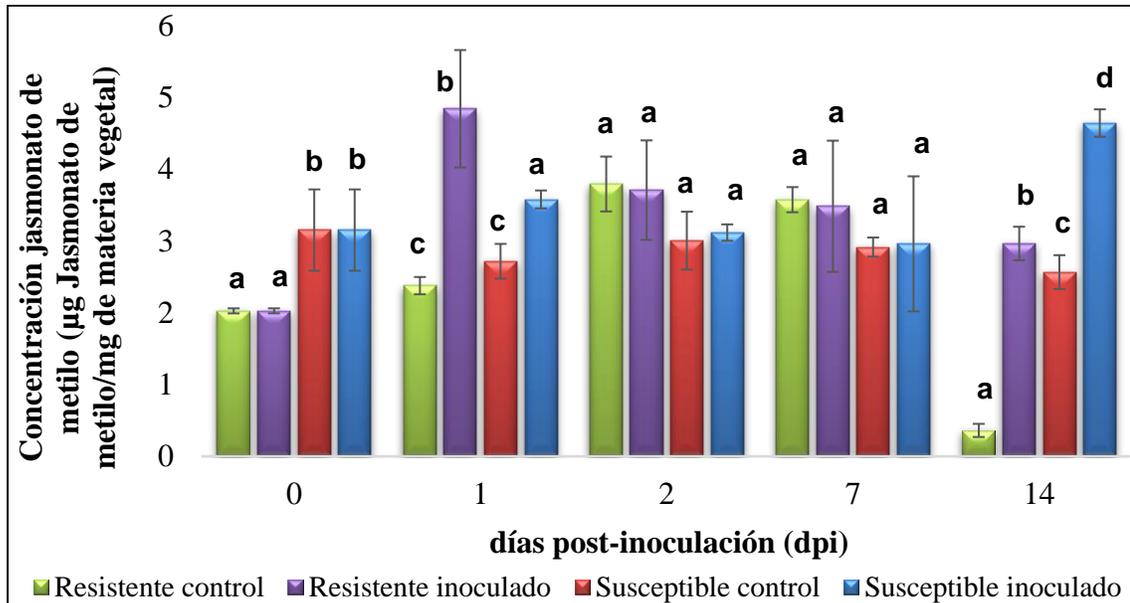


Gráfica 41. Concentración de salicilato de metilo en simplasto de raíz de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



Gráfica 42. Concentración de ácido salicílico en simplasto de raíz de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Por otro lado, la acumulación de jasmonato de metilo (MeJA) se presentó en ambas variedades tanto a tiempos tempranos como tardíos, correspondientes a los 1 y 14 dpi (Gráfica 43). Sin embargo, el incremento registrado en la variedad resistente inoculada fue casi 3 veces más que su respectivo control, mientras que, en la variedad susceptible inoculado, al 14 dpi la acumulación de MeJA llegó solamente al doble de lo encontrado en el tratamiento control. Esto muestra que la inoculación con *Fod* en la variedad resistente, genera un aumento mayor y mas temprano de esta hormona, que el encontrado en la variedad susceptible; esto es un indicio que la regulación de sus niveles pueden estar asociados a eventos de señalización determinantes en la resistencia a la enfermedad del marchitamiento vascular.



Gráfica 43. Concentración de jasmonato de metilo en simplasto de raíz de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

De acuerdo con los presentes resultados, se evidencia que el proceso de inoculación con *Fod*, generó un aumento en las hormonas evaluadas a nivel de simplasto de raíces de clavel. Particularmente, la acumulación de MeSA presentada en la variedad resistente concuerda con otros reportes, en donde se evidencia un incremento en la concentración de este compuesto en distintos modelos planta-patógeno (Shulaev, Silverman & Raskin, 1997; Seskar, Shulaev & Raskin, 1998). Es importante mencionar que la inducción de MeSA se registró al 2 dpi, lo que corresponde a un día después de la acumulación de SA. Es probable que la acumulación de MeSA a partir de SA, se presente por la activación de la enzima ácido salicílico metiltransferasa (SA methyl transferasa, SAMT). Se ha demostrado que altos niveles de SA en hojas de tabaco, dan lugar a altos niveles de MeSA (Shulaev et al. 1997), y que su acumulación en tejidos asociados a la infección se ha relacionado con la respuesta hipersensible (HR) (Seskar et al. 1998). De acuerdo a los resultados de la presente investigación y asumiendo un estilo de vida hemibiotrófico de *Fod* en el clavel, es probable que la acumulación de MeSA y SA regule positivamente la defensa contra *Fod*, en estos primeros días de la interacción (1 y 2 días) cuando es probable que se presente una fase biotrófica del patógeno.

Es importante resaltar que en la variedad resistente la acumulación de MeJA se presentó de manera simultánea al SA en simplasto de las raíces de la variedad resistente. Se ha

reportado en otros modelos que la acumulación de estas hormonas de señalización, se puede llevar a cabo de manera simultánea durante la interacción con otras *formas specialis* de *Fusarium oxysporum* (Attaran, Zeier, Griebel & Zeier, 2009; Makandar et al. 2010). No obstante, el papel que tienen estas hormonas varía dependiendo del modelo planta-patógeno; se ha reportado que en *Arabidopsis* por el contrario, la señalización de JA promueve la atenuación de la activación de la señalización de SA (Makandar et al. 2010; Tamaoki et al. 2013) y por ende la susceptibilidad en la planta hospedante.

En estudios realizados por Król, Igielski, Pollmann y Kępczyńska (2015), se demostró que el tratamiento de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L) con jasmonato de metilo (MeJA), presentó un aumento en la resistencia al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, mediante el aumento de moléculas señal como el ácido salicílico (SA) y de enzimas como la PAL (Andi, Taguchi, Toyoda, Shiraishi, & Ichinose, 2001; Repka, Fischerova & Šilhárová, 2004). Estos resultados demuestran que en marchitamientos vasculares que involucran a patógenos de la especie *Fusarium oxysporum*, puede presentarse una respuesta multicomponente que puede involucrar a las dos rutas objeto de estudio.

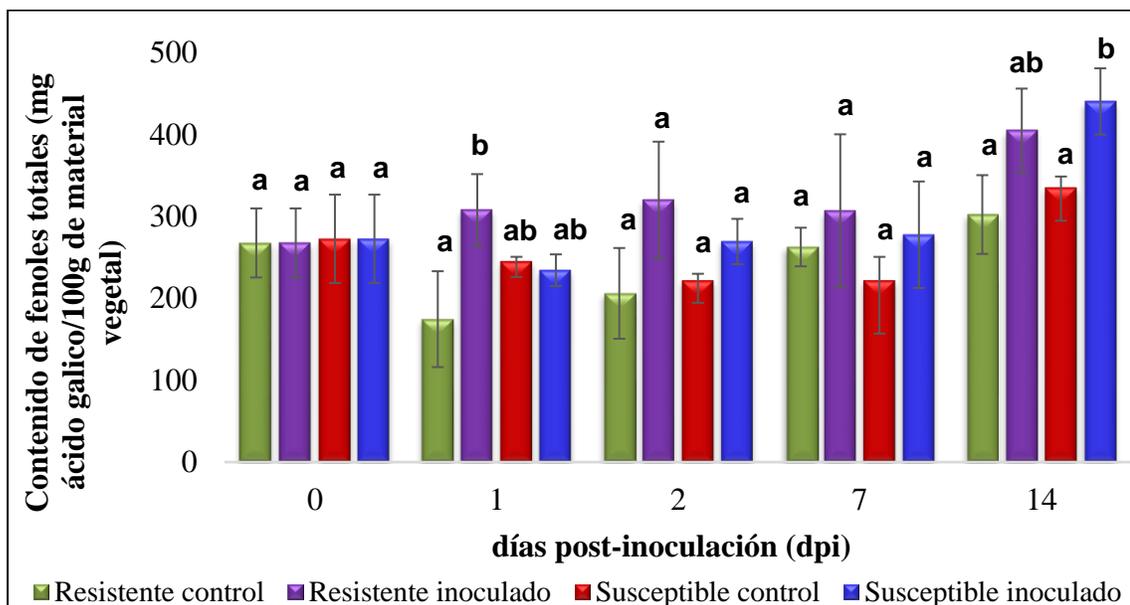
Es evidente que se requieren estudios funcionales con mutantes de clavel que estén afectadas en la producción de estas hormonas para conocer más sobre los procesos bioquímicos involucrados; el uso de estos ensayos funcionales ha permitido el avance en el conocimiento de estas rutas de señalización en diferentes modelos planta-patógeno (Attaran et al. 2009; Makandar et al. 2010; Thatcher, Gao & Singh, 2016).

4.5.3 Efecto de la inoculación con *Fod* en el contenido total de fenoles en simplasto a nivel del tallo del clavel

Durante la evaluación de los niveles de fenoles en simplasto del tallo, se evidenció que estos metabolitos aumentan en la variedad resistente inoculada con respecto al control desde el 1 dpi, mientras que para la variedad susceptible el incremento se presentó a los 14 dpi (Gráfica 44). Estos resultados son similares a lo reportado por nuestro grupo de investigación, en donde la acumulación del contenido de fenoles totales se presenta a las 6 y 96 hpi en material vegetal completo de clavel (Ardila, 2013). Este fenómeno bioquímico se ha reportado en otras especies vegetales infectadas con formas *specialis* de *Fusarium*

oxysporum en donde la acumulación de fenoles se presenta a tiempos tempranos en variedades resistentes (Mandal et al. 2008; Swarupa, Ravishankar & Rekha, 2014).

Es posible que el aumento en los compuestos fenólicos a nivel del simplasto, este asociado al fortalecimiento de las paredes celulares de la planta durante la infección en estas primeras etapas; un aumento de estos compuestos a nivel del simplasto se requeriría para ser exportados y se localizados en el apoplasto donde se llevan a cabo dichos procesos de biosíntesis de ligninas (Beckman, 2000; Mandal & Mitras, 2007; Santiago, De Armas, Legaz & Vicente, 2009). Se ha reportado en clavel, que la producción de metabolitos derivados de ácido benzoico y ácido cinámico, pueden cumplir funciones en el reforzamiento de la pared celular o evitar el avance del patógeno a través de la planta (Niemann et al. 1991; Curir et al. 2003). La actividad enzimática de PFO y PAL presentada en tallo al 1 dpi (Gráfica 27 y 29, respectivamente) concuerda con la inducción de los compuestos fenólicos en la variedad resistente, lo que es evidencia de que dichos resultados hacen parte de las respuestas de una defensa temprana que puede ser importante en determinar la resistencia o susceptibilidad de la planta hacia el marchitamiento vascular causado por *Fod*.

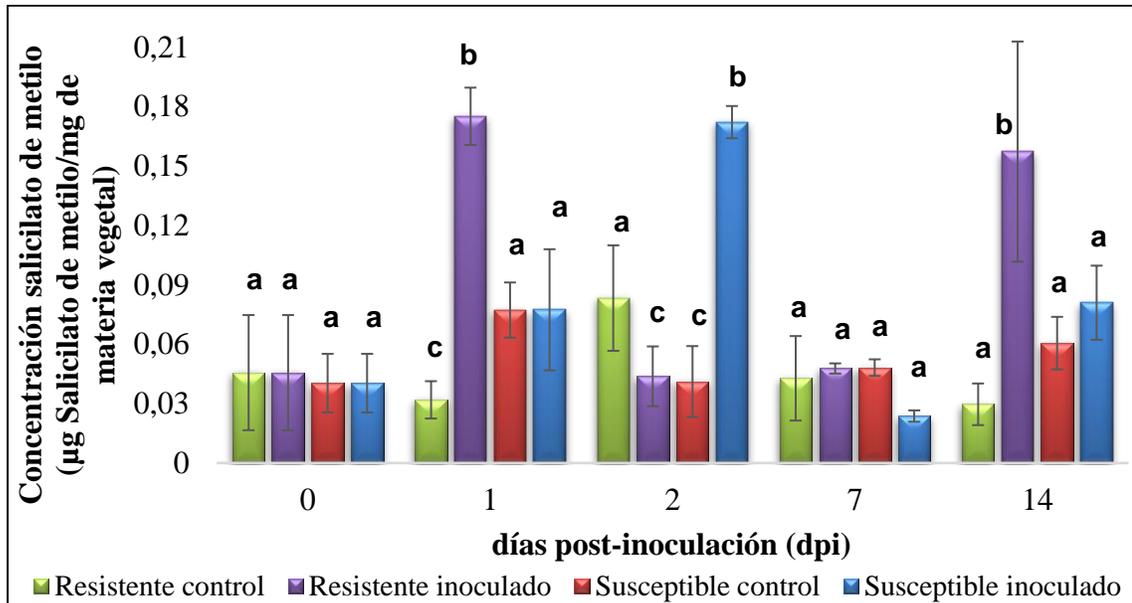


Gráfica 44. Contenido total de fenoles en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

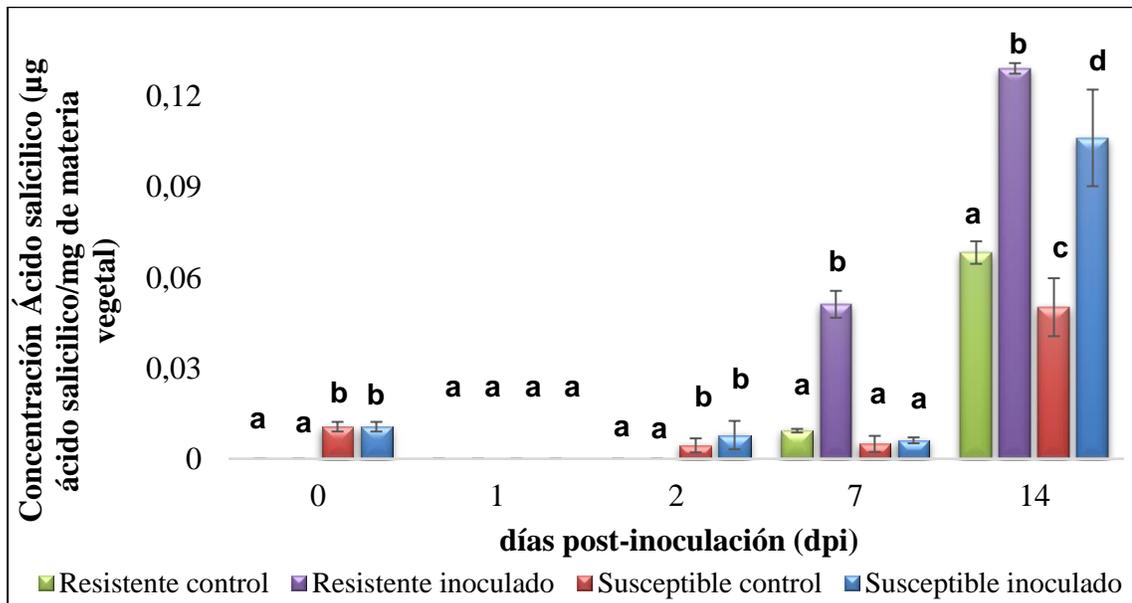
4.5.4 Efecto de la inoculación con *Fod* en la concentración de hormonas de señalización en simplasto de tallo de clavel

Los resultados obtenidos en tallo sobre la acumulación de SA, MeSA y MeJA se muestran en las gráficas 45, 46 y 47 respectivamente. De acuerdo con la gráfica 45, los niveles de MeSA aumentan a tiempos tempranos y tardíos en la variedad resistente (días 1 y 14 dpi), mientras que en la variedad susceptible, se presenta un aumento solo en el 2 dpi. A su vez para el ácido salicílico (Gráfica No. 46), al parecer en tiempos tempranos evaluados, no se presenta su acumulación en simplasto de este órgano de la planta; sus niveles siempre se encontraron por debajo de los límites de cuantificación de la técnica empleada. A tiempos tardíos, para esta hormona existe una acumulación más temprana en la variedad resistente desde los 7 dpi que se mantiene hasta los 14 dpi; el aumento en la susceptible solo se presentó a los 14 dpi. Esto indica que la acumulación de esta hormona a este nivel, es un proceso asociado con la resistencia de la planta en tiempos tardíos.

Al comparar los valores obtenidos a nivel del tallo para MeSA (Gráfica No. 45) con respecto a los presentados a nivel de la raíz (Gráfica 41), es interesante comentar que se presenta un comportamiento similar en ambos tejidos; una mayor y más temprana acumulación en el genotipo resistente. Sin embargo, es interesante comentar que existe una acumulación más temprana de la hormona MeSA a nivel del tallo (1 dpi), mientras que a dicho tiempo no sucede nada en raíz, de hecho su acumulación se presenta a los 2 dpi. Al parecer, a pesar de que se presenta un primer contacto con el patógeno a nivel de raíz, la respuesta es mucho más temprana en tallo; no se puede descartar que en dicho tiempo (1 dpi) se presente la movilización de esta hormona desde la raíz hacia tallo. Se ha reportado que el ácido salicílico (SA) puede ser convertido en su mayoría a MeSA de manera temprana; este es una molécula altamente volátil que puede desplazarse rápidamente entre órganos (Shulaev et al. 1997; Park, Kaimoyo, Kumar, Mosher & Klessig, 2007; Liu, von Dahl & Klessig, 2011). Esto también explicaría la ausencia de SA en los primeros días post-inoculación en tallo de la variedad resistente y la presencia de MeSA en este mismo tejido a dichos tiempos (Gráfica 46 y 45 respectivamente). Una biosíntesis disminuida del ácido salicílico a nivel del tallo debe ser comprobada usando otras herramientas moleculares que permitan profundizar sobre las enzimas involucradas.



Gráfica 45. Concentración de salicilato de metilo en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

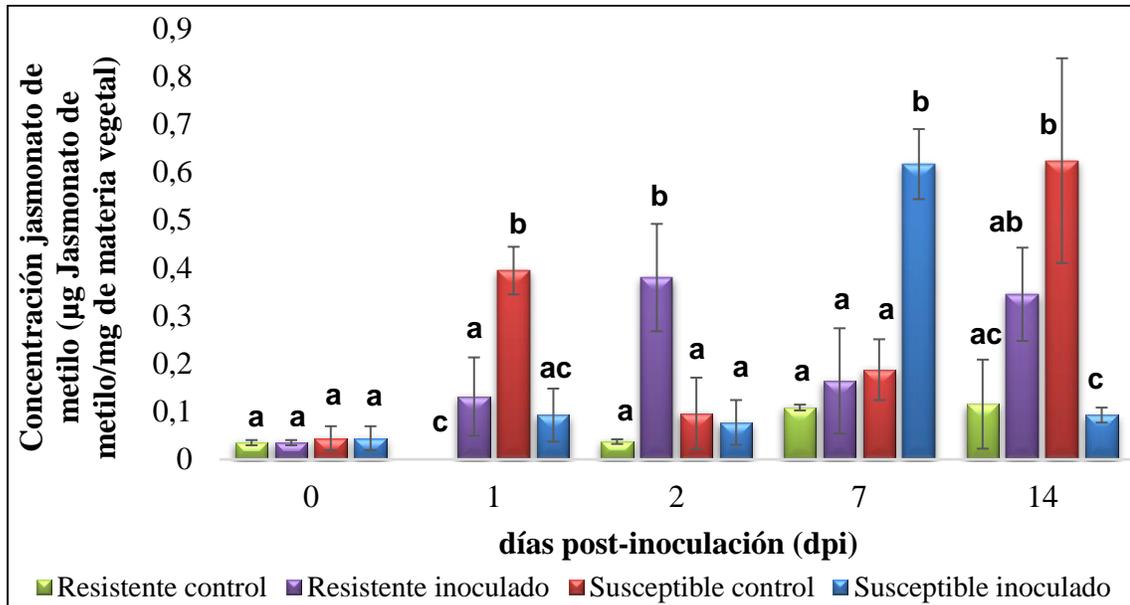


Gráfica 46. Concentración de ácido salicílico en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

No se puede descartar que, una razón que puede explicar esa biosíntesis disminuida del SA en el tallo a los 1 y 2 dpi en simplasto de la variedad resistente (Gráfica 45), sea la presencia de MeJA en este tejido a dichos tiempos. Como ha sido reportado previamente JA puede actuar como un mecanismo inhibidor de las respuestas de señalización del ácido salicílico, explicando así la ausencia de SA en los días donde MeJA aumentó (dpi 1 y 2)

(Gráfica 47). El papel del MeJA en las interacciones planta-patógeno, es ampliamente discutido actualmente, teniendo reportes también con respecto a su papel antagonico al SA (Niki, Mitsuhashi, Seo, Ohtsubo & Ohashi, 1998; Schenk et al. 2000; Sasaki et al. 2001).

A pesar de ello, es evidente que en tiempos tempranos (1 y 2 dpi), la inoculación con el patógeno en el genotipo resistente genera un aumento significativo de los niveles de la hormona MeJA, mientras que en la susceptible el aumento se presenta solamente en etapas tardías de la interacción donde se asume, ya ha iniciado la fase necrotrófica del patógeno (Gráfica 47). Es claro que se requieren estudios adicionales que permitan profundizar sobre estos procesos durante la interacción; ya que al parecer el MeJA puede estar jugando un papel importante en la interacción, permitiendo la activación temprana de los mecanismos de defensa en este órgano. No se puede descartar tampoco que existan respuestas sistémicas que permitan la translocación desde la raíz al tallo, de estos compuestos en la planta; esto significaría también que la biosíntesis del MeJA se presente principalmente en la raíz y lo encontrado en tallo sea debido a una acumulación sistémica. Esta propuesta estaría respaldada al comparar los niveles de esta hormona entre los dos órganos objeto de estudio, en donde se evidencia que, en la raíz, primer punto de contacto con el patógeno, los niveles de esta hormona son 10 veces mayores que los encontrados en tallo; algunos reportes en otras especies vegetales han reportado procesos similares (Thatcher, Manners & Kazan, 2009; Cole, Yoon, Faull & Diener, 2014).



Gráfica 47. Concentración de jasmonato de metilo en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Los resultados son el promedio de 3 réplicas biológicas y duplicado técnico. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Los resultados presentados en esta parte de la investigación permitieron describir por primera vez, que la acumulación de hormonas relacionadas con las principales rutas de defensa vegetal, es una respuesta compleja en el caso de la interacción clavel-*Fod*. Es probable que la naturaleza hemibiotrofa del patógeno, genere una respuesta temprana asociada a la fase biotrófica del patógeno (1 y 2 dpi), que incluye la acumulación conjunta de las hormonas objeto de estudio en la presente investigación. Se requieren de estudios funcionales con mutantes de clavel, que permitan profundizar sobre este proceso y su papel en la resistencia al marchitamiento vascular.

4.6 DISCUSIÓN GENERAL DEL PAPEL DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA DEL CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) AL PATÓGENO *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Los resultados del presente estudio muestran la complejidad de los mecanismos de defensa involucrados en la interacción entre el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Los procesos bioquímicos y moleculares asociados a la resistencia que se activan a nivel de simplasto, involucran distintos componentes, lo cual está de acuerdo con la resistencia multigénica reportada previamente para clavel (Soto, Clavijo & Figueira, 2012). Así mismo vale la pena comentar que estos mecanismos, están regulados para cada órgano de la planta de manera independiente y evidencian que su activación depende del genotipo evaluado, lo cual está de acuerdo también con estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (Cuervo et al. 2009; Ardila et al. 2011; Ardila et al. 2014) y a lo reportado en otros modelos (He et al. 2007; Swarupa et al. 2014; Chen et al. 2014).

El desempeño de las vías de señalización objeto de estudio, varía dependiendo de la interacción planta-patógeno; en interacción con otras *formas especialis* de *Fusarium oxysporum* se ha visto que, la señalización por SA es determinante en la resistencia de las plantas (Saikia et al. 2003; Mandal et al. 2008). Sin embargo, se ha reportado también que la señalización de JA desempeña un papel clave en la defensa a este tipo de patógenos, en otras especies vegetales (Jaiti, Dihazi, El Hadrami, El Hassni & El Hadrami, 2004; Jaiti et al. 2009; Ávila, Ochoa, Proaño & Martínez, 2019). En otros casos se ha reportado que se puede presentar acumulación de las dos hormonas en la misma interacción, con una regulación espacio temporal definida (Berrocal-lobo & Molina 2008); esta interacción conjunta de las hormonas se ha reportado también en tomate, donde el tratamiento con la hormona MeJA puede ser determinante en la activación de otras rutas de señalización como la del SA (Król et al. 2015). Considerando la alta complejidad de estos procesos, es claro que las rutas de señalización asociadas a defensa son propias de cada interacción planta-patógeno, por lo cual se hace necesario indagar su papel específico en resistencia o susceptibilidad en cada caso.

La comparación de los niveles de estas hormonas con las enzimas en los dos órganos evaluados en el presente estudio, permitió determinar que la inducción de la actividad para las enzimas evaluadas, es un proceso complejo y no depende necesariamente de una ruta de señalización en particular, si no contrario a ello, puede estar influenciado por distintas vías de señalización. A pesar de ello, al realizar análisis de correlación de Pearson (Resultados no mostrados), entre las diferentes variables evaluadas, se encontró que existen algunas relaciones positivas que son significativas estadísticamente. Bajo estas consideraciones, se presenta a continuación una propuesta de modelo en cada órgano, que permite resumir algunos de los procesos mas importantes encontrados a nivel del simplasto en la presente investigación (Figuras 9 y 10)

En tiempos tempranos a nivel de la raíz del clavel, primer punto de contacto entre la planta y el patógeno, en la variedad resistente inoculada (Figura 9A) se observó que el ácido salicílico (SA) simplástico se acumuló a 1 dpi y su ester metílico MeSA a los 2 dpi (Gráfica 42), lo que coincide con la fase inicial biotrófica del patógeno y está de acuerdo con lo reportado para este tipo de patógenos. De manera simultanea, se presentó un incremento en la concentración de MeJA a tiempos tempranos (1dpi) (Gráfica 43); se ha reportado en Tomate (*Lycopersicon esculentum*) que esta hormona puede estimular la biosíntesis de SA (Król et al. 2015), efecto que no se puede descartar en raíces de clavel. En la variedad susceptible, por el contrario, en dichos tiempos tempranos, solo se presentó el aumento para el MeJA a 1 dpi, en menor proporción, sin una acumulación de SA (Figura 9B).

Es probable que, como parte de la resistencia al marchitamiento vascular, se requiera de la presencia del MeJA para la activación de la biosíntesis del SA en este órgano del clavel. Si bien es cierto que diferentes estudios sobre proteínas receptoras del MeJA se han realizado y se ha demostrado que presentan alta diversidad funcional y estructural asociada a la degradación de represores de genes sensibles a JA (Katsir, L., Chung, H. S., Koo, A. J. & G. A. Howe. 2008; Thatcher et al. 2009), es claro que todavía no se conoce a detalle todos los procesos en los que puede participar. Esta hipótesis permitiría explicar porque se presenta una acumulación similar del MeJA en simplasto de los dos genotipos estudiados a pesar de sus diferencias en la resistencia a la enfermedad (Gráfica 43); al final la activación de los procesos de reconocimiento de esta hormona son los que tendrían un papel asociado a la resistencia al patógeno. Es claro que se requieren de estudios

adicionales que permitan profundizar sobre la acción de la hormona MeJA en la biosíntesis del SA y corroborar esta hipótesis; no podemos olvidar que el JA ha sido también encontrado conjugado a diferentes aminoácidos y la complejidad de los procesos puede ser mayor.

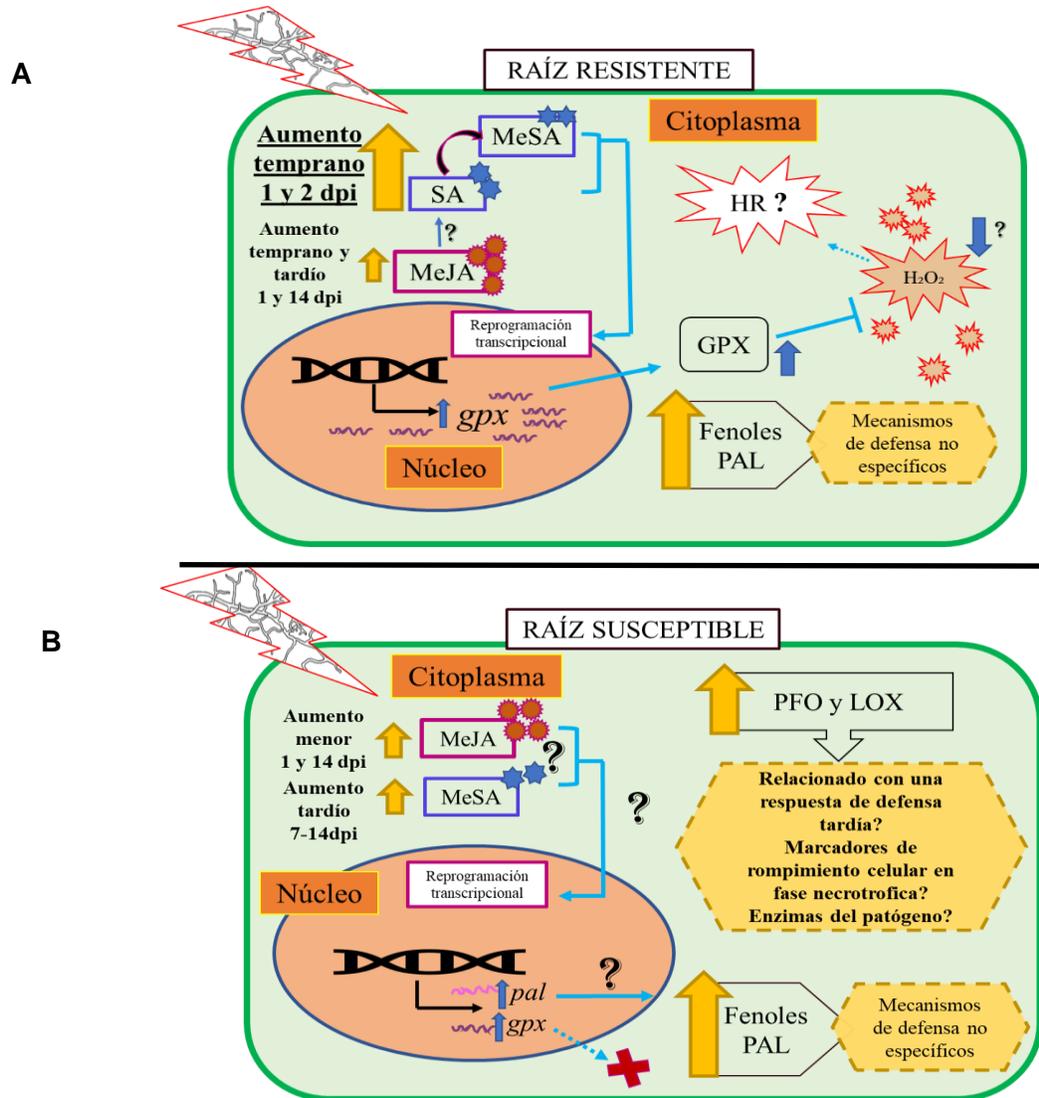


Figura 9. Modelo de señalización que involucra las hormonas MeJA, MeSA, SA y las enzimas GPX, PFO, PAL y LOX en simplasto, propuesto para raíces de la variedad resistente (A) y susceptible (B) durante su interacción con *Fod*.

En el periodo donde se espera que ya se haya presentado la respuesta principal a la fase biotrofa del patógeno (7 y 14 dpi), la respuesta es menos dramática, presentando una acumulación de las hormonas MeSA y MeJA en las dos variedades estudiadas a los 14 dpi y un aumento apenas significativo de MeSA a las 7 dpi (Gráficas 41 y 43) (Figura 9B).

Esto demuestra que la respuesta determinante asociada con las hormonas, efectivamente se presenta en el tiempo temprano relacionada con la presencia de la fase biotrofa del patógeno (1 y 2 dpi). Al comparar con los resultados obtenidos para las enzimas evaluadas (actividad enzimática y mRNA), se evidencia en dichos tiempos tempranos, las hormonas MeJA y SA, están relacionadas con la actividad de GPX y los niveles transcripcionales de dicha enzima (1 dpi) (Gráficas 21 y 33). En general estos resultados sugieren que la acumulación de esta enzima a nivel del simplasto por efecto de las hormonas MeJA y SA, juega un papel en la respuesta asociada a la resistencia de la planta. Es probable que su papel este asociado a la regulación de los niveles del H₂O₂ intracelular, cuya acumulación se da por la percepción de patógeno, pero debe ser altamente regulada en estas etapas tempranas (Dixon & Paiva, 1995; Beckman, 2000; Heller & Tudzynski, 2011). El papel de estos procesos antioxidantes a nivel simplástico deben ser objeto, por tanto, de estudios que permitan profundizar sobre su importancia en la resistencia del clavel al patógeno objeto de estudio. No se debe descartar tampoco la posible presencia de una respuesta hipersensible (HR) en algunas de las células parenquimáticas de los tejidos vasculares que no activen estos procesos antioxidantes; esta respuesta se presume fundamental para evitar la propagación de este tipo de patógenos en tejidos vasculares (Beckman, 2000)

A su vez la enzima PAL (Gráfica 24) y el contenido de fenoles (Gráfica 40) en simplasto de raíz, presentaron cambios significativos en las dos variedades objeto de estudio, indicando que se presentan como parte de una respuesta propia al reconocimiento de MAMPs o DAMPs por receptores conservados en ambas variedades, siendo consistente con estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (Ardila 2013). El aumento temprano en el contenido de fenoles simplásticos en ambas variedades (Figura 9 A y B), es consistente con la acción de esta enzima; es bien sabido que buena parte de los compuestos fenólicos citosólicos provienen de la ruta fenil propanoide. Estos resultados están de acuerdo con el modelo descrito para la respuesta multicomponente propia de la resistencia multigenica, la cual indica que algunas respuestas se pueden presentar tanto en genotipos resistentes como susceptibles, pero con diferencias en el tiempo de expresión.

En el genotipo susceptible inoculado también se presentó un aumento de las enzimas PFO y LOX a tiempos tardíos 7 y 14 (Gráficas 22 y 23), lo cual puede estar asociado con diferentes procesos que pueden incluir no solo la respuesta de la planta al patógeno, si no

a la secreción de enzimas propias del patógeno; es probable que en este tiempo el patógeno ya se encuentra en la fase necrotrofica en este genotipo susceptible. No se puede descartar que, en este tiempo, el patógeno este activando de manera tardía algunas de sus respuestas de defensa; esto puede estar respaldado por los niveles de las hormonas MeJA y MeSA que aumentaron a dichos tiempos. Se requieren estudios funcionales con mutantes en estas enzimas, que permitan profundizar sobre estos fenómenos bioquímicos en el simplasto de raíces del clavel.

Los resultados mas relevantes encontrados a nivel del simplasto del tallo en la presente investigación, se presentan en la Figura No. 10. Al igual que en raíz, se evidenció que MeJA se acumula de manera significativa en los tejidos infectados con el patógeno para ambas variedades (Gráfica 47). Sin embargo, en el caso de la variedad resistente este aumento se presenta a tiempos más tempranos 1 y 2 dpi, mientras que en el caso de la susceptible se presenta apenas a los 7 dpi. Esto corrobora que en este tejido esta hormona juega un papel en la activación de la respuesta asociada a la resistencia de la planta. Es interesante comentar que, al comparar los niveles entre órganos, los valores de raíz son 10 veces mayores que los encontrados en tallo, esto puede indicar la posibilidad de una respuesta sistémica que permitan la translocación desde la raíz hacia el tallo para esta hormona (Gráfica 45-47); esto no se puede descartar teniendo en cuenta la conocida volatilidad de la hormona (Farmer & Ryan, 1990; Cheong & Choi, 2003).

El papel que tiene la ruta del ácido salicílico SA en simplasto de este órgano no es claro; al parecer la síntesis de esta hormona se presenta solamente a tiempos tardíos 7 y 14 dpi (Gráfica 46), mientras que la hormona MeSA se acumula de manera temprana, en las dos variedades objeto de estudio en la presente investigación; es claro que en la variedad resistente dicha acumulación es mayor y se presenta en tiempos mas tempranos 1 dpi (Gráfica 45). La presencia de MeSA con niveles indetectables de SA en los tejidos del tallo en tiempos tempranos, genera algunas preguntas sobre los fenómenos que ocurren en este órgano. Es probable se presenten dos escenarios: a) la posible translocación de esta hormona desde la raíz sin síntesis de SA en el tallo o b) la conversión inmediata del SA generado en MeSA, haciendo los niveles del SA indetectables. En cualquiera de los dos escenarios, es evidente que la acumulación de estas hormonas en la variedad resistentes

es mucho mayor y probablemente asociada con resistencia a la enfermedad. Se requieren de estudios específicos que permitan profundizar sobre este proceso en tallos de clavel.

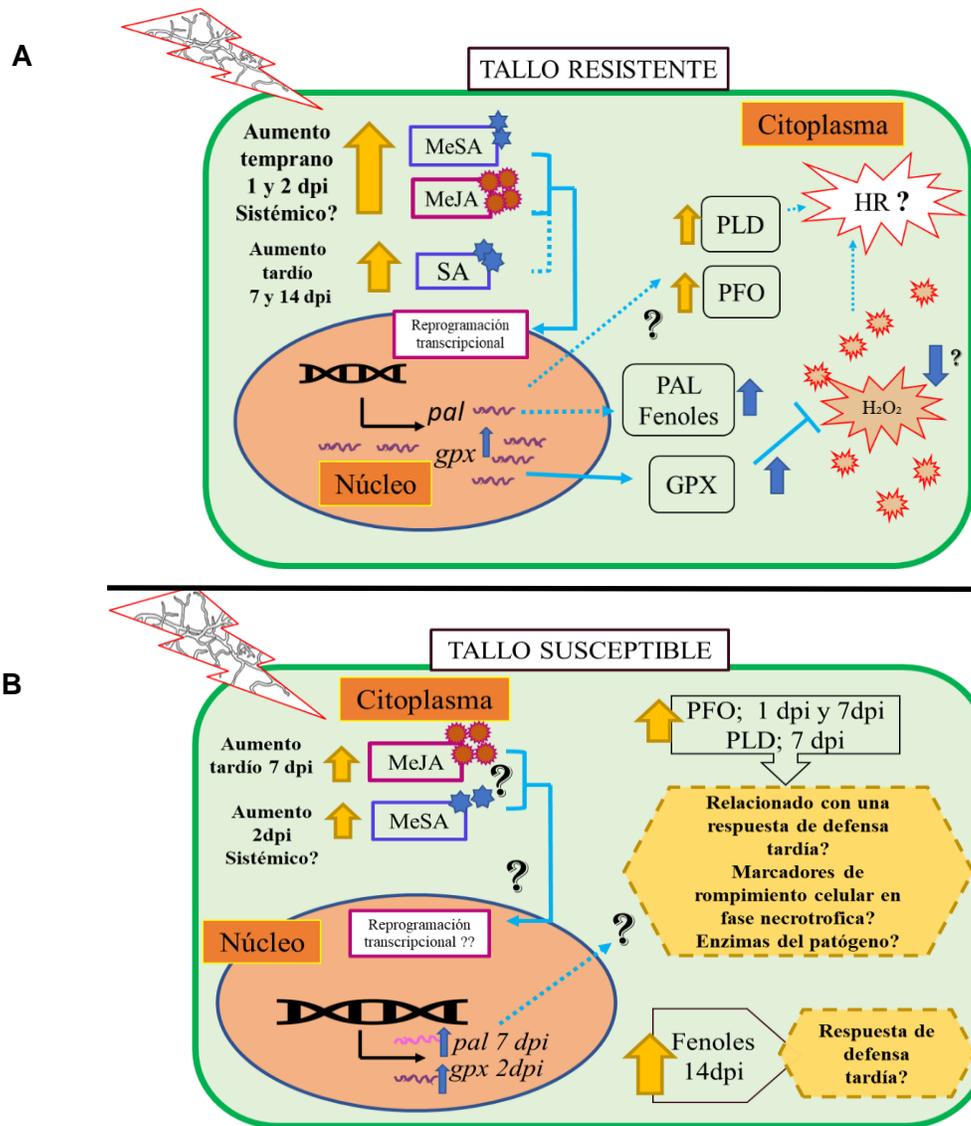


Figura 10. Modelo de señalización que involucra las hormonas MeJA, MeSA, SA y las enzimas GPX, PFO, PAL y PLD en simplasto, propuesto en para tallo de la variedad resistente y susceptible durante su interacción con *Fod*.

Por otra parte, la actividad enzimática simplástica de GPX, PAL, PLD y PFO aumentó de manera significativa a tiempos tempranos para el genotipo resistente, lo que es muestra de una respuesta asociada a la resistencia al patógeno *Fod* (Gráfica 26, 27, 29 y 30). A pesar de que no existe información sobre como se lleva a cabo la regulación de esta respuesta, teniendo en cuenta los resultados obtenidos a nivel transcripcional para los genes *gpx* y *pal*, es claro que la regulación se puede llevar a cabo en alguna medida a nivel transcripcional. Sin embargo, no se debe olvidar que son varios los estudios que han

demostrado que solo un porcentaje bajo de las proteínas, se regulan a dicho nivel. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en este tejido y evidencia la complejidad de la respuesta en esta interacción planta-patógeno. Teniendo en cuenta la relación que se ha presentado entre la enzima PLD y la expresión de la respuesta hipersensible, este fenómeno no se puede descartar a 1 dpi en este tejido (Beckman, 2000; Yamaguchi et al. 2004).

En cuanto a la variedad susceptible, solo la enzima PFO aumentó su actividad enzimática a nivel del simplasto a 1 y 7 pdi, y la PLD a 7dpi (inducción apenas significativa). Esto demuestra que tal y como se esperaba, la respuesta de la planta susceptible tiende a ser más tardía que la presentada en el genotipo resistente. Así mismo, al igual que lo encontrado en raíz, no se puede descartar que el aumento encontrado, sea debido a la activación de la fase necrotrofica del patógeno, que generaría descompartimentalización de los organelos y aumento de la actividad y/o secreción de enzimas por parte del patógeno. La propuesta que sea parte de los mecanismos de defensa tardíos, puede estar sustentada en que la actividad de PLD estuvo relacionada estadísticamente con el incremento en la concentración de MeSA (Figura 10).

En la presente investigación se presenta una aproximación bioquímica de las hormonas y enzimas que se inducen a nivel de simplasto y que está involucrada con la resistencia de clavel ante el marchitamiento vascular causado por *Fod*. Así mismos se evidenció que la acumulación de SA y MeSA a tiempos tempranos es diferencial en las etapas tempranas de la interacción, siendo superior en la variedad resistente; lo cual coincide con la fase biotrófica del patógeno. Sin embargo, queda por elucidar si su señalización está relacionada con la acumulación de MeJA presentada en esos mismos tratamientos. Por otra parte, algunas de las enzimas evaluadas en este estudio no se inducen por la acumulación de las hormonas objeto de estudio, lo cual indica que existen otros mecanismos que juegan un papel en la activación de sus formas activas. La aplicación de otras herramientas de análisis que permitan el estudio conjunto de las respuestas (Ejemplo, proteómica y transcriptómica), así como estudios funcionales con mutantes, permitirán tener mayor evidencia experimental sobre las hipótesis planteadas en la presente investigación. Sin embargo, estos resultados complementan los estudios desarrollados a la fecha en el

modelo clavel-*Fod*, que buscan definir las bases bioquímicas de la resistencia del clavel al marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2.

Conclusiones

El proceso de extracción seleccionado para la obtención de extractos enzimáticos de simplasto de raíz y tallo de clavel consistió en lavados previos con acetona fría y extracción con buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5 100 mM y para la enzima fosfolipasa D lavados con acetona fría y extracción con Tris-HCl pH 7,0 50 mM.

Las condiciones seleccionadas para la determinación de la actividad enzimática simplástica guayacol peroxidasa presente en raíz y tallo de clavel, consistió en una mezcla de reacción de pH 5,0 a 20°C y con una concentración de guayacol 40 mM y H_2O_2 40 mM.

Las condiciones seleccionadas para la determinación de la actividad enzimática simplástica polifenoloxidasa presente en raíz y tallo de clavel, consistió en una mezcla de reacción de pH 6,5 a 5°C y con una concentración de catecol 100 mM.

Las condiciones seleccionadas para la determinación de la actividad enzimática simplástica lipoxigenasa presente en raíz y tallo de clavel, consistió en una mezcla de reacción de pH 9,0 a 25°C y con una concentración de ácido linoleico 50 mM.

Las condiciones seleccionadas para la determinación de la actividad enzimática simplástica fenilalanina amonio liasa presente en raíz y tallo de clavel, consistió en una mezcla de reacción de pH 8,5 a 30°C y con una concentración de L-fenilalanina 20 mM.

Las condiciones seleccionadas para la determinación de la actividad enzimática simplástica fosfolipasa D presente en raíz y tallo de clavel, consistió en una mezcla de reacción de pH 6,0 a 37°C y con una concentración de *p*-nitrofenilfosforilcolina 15 mM, CaCl_2 12 mM.

En el genotipo resistente, la interacción con el patógeno *Fod* a nivel de la raíz generó cambios de la actividad enzimática y niveles transcripcionales de la enzima guayacol peroxidasa, lo que sugiere su participación en los fenómenos asociados en la resistencia a la enfermedad.

La inducción de la enzima fenilalanina amonio liasa en los dos genotipos objeto de estudio a nivel del simplasto de raíz indica que esta enzima participa en mecanismos de la defensa basal de la planta, siendo no específicos.

En simplasto de raíz de la variedad resistente Golem, se presentó un incremento temprano de las hormonas ácido salicílico y salicilato de metilo, indicando su posible papel en la activación de los mecanismos asociados a la resistencia al patógeno.

La acumulación de la hormona jasmonato de metilo por efecto de la inoculación, se presentó a nivel de simplasto de raíces y tallos de manera similar en los dos genotipos evaluados, indicando que puede cumplir con procesos propios de señalización en la interacción.

A nivel de tallo, la variedad resistente presentó la inducción de actividad enzimática simplástica guayacol peroxidasa, polifenoloxidasa, fenilalanina amonio liasa, y fosfolipasa D a tiempos tempranos, lo que evidencia su participación en los mecanismos de defensa asociados a la expresión de resistencia a la enfermedad.

Los niveles en raíz y tallo de mRNA codificante para la enzima fenilalanina amonio liasa, sugieren que la regulación de la actividad de esta enzima puede ser de tipo transcripcional, pero dependiendo del tejido, también pueden presentarse otros mecanismos de regulación diferentes.

Recomendaciones

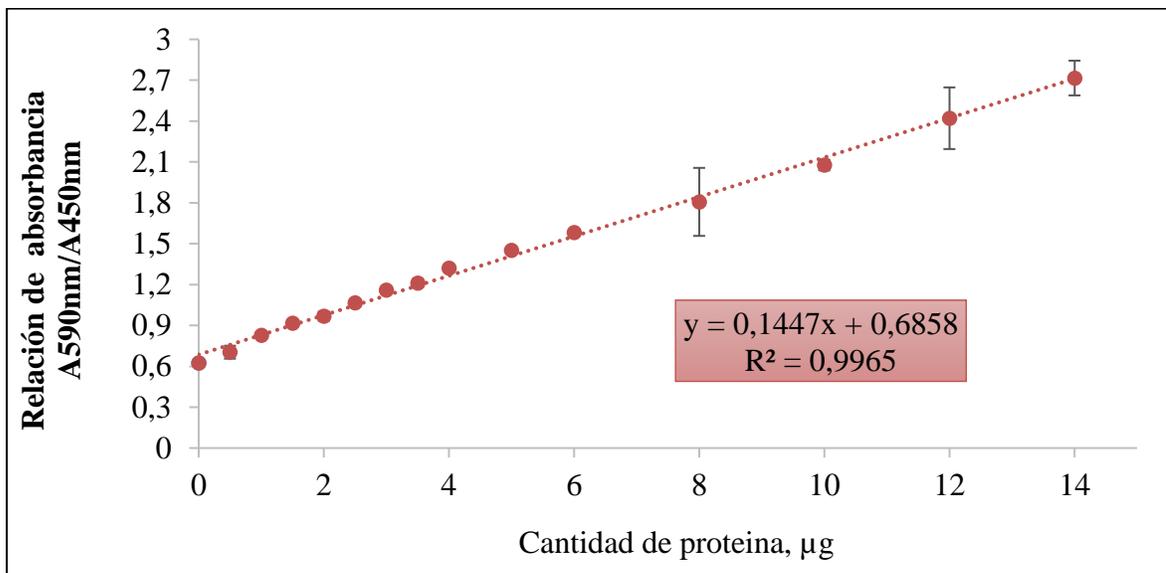
Realizar la determinación de otras enzimas que estén involucradas en la biosíntesis de las hormonas objeto de estudio.

Profundizar sobre las rutas de señalización para determinar el papel de la hormona MeJA en la resistencia del clavel

Realizar determinación del contenido de peróxido de hidrogeno a nivel de simplasto, con el fin de verificar que la actividad de GPX esté asociada a la eliminación de EROs o la producción de este.

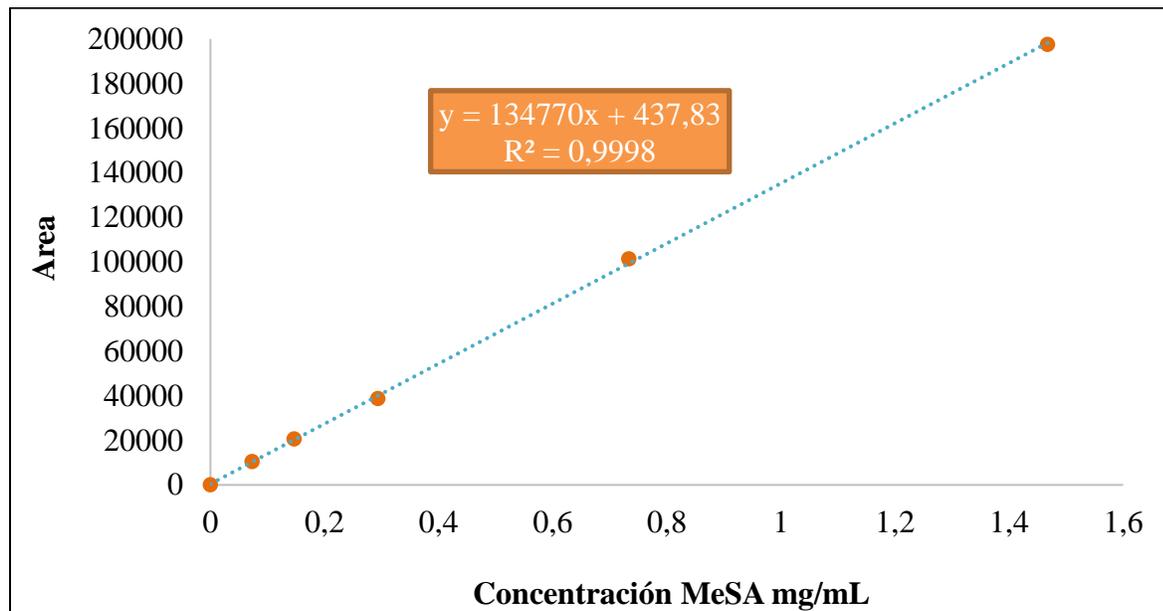
A. Anexo: Curva de calibración para la determinación de proteína por el método de Bradford linealizado por Zor y Sellinger

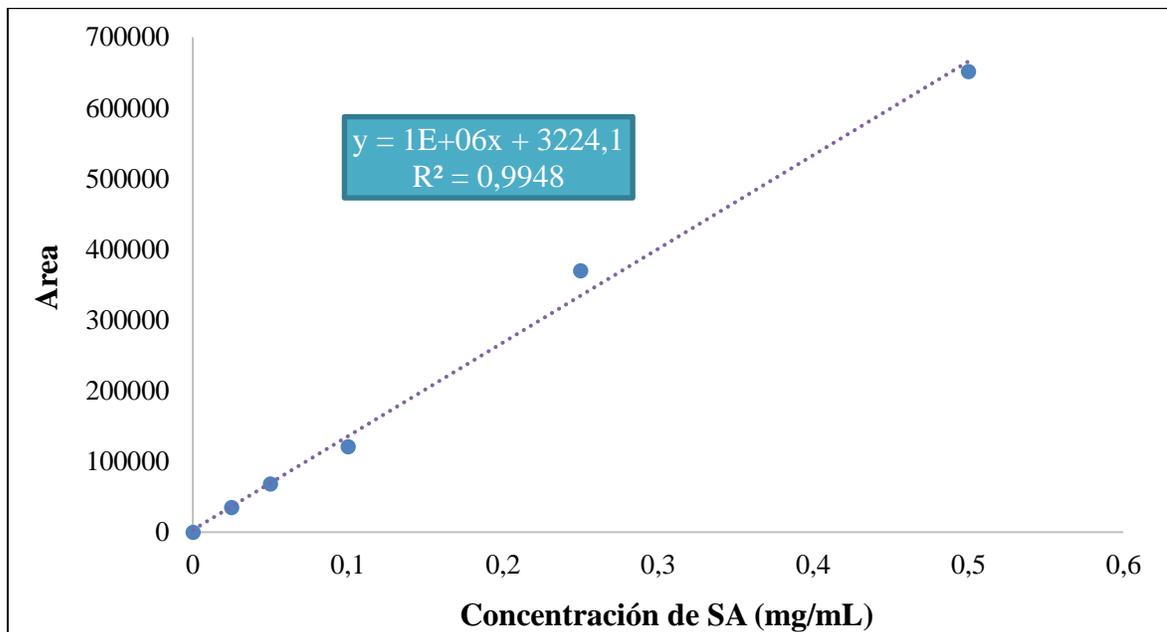
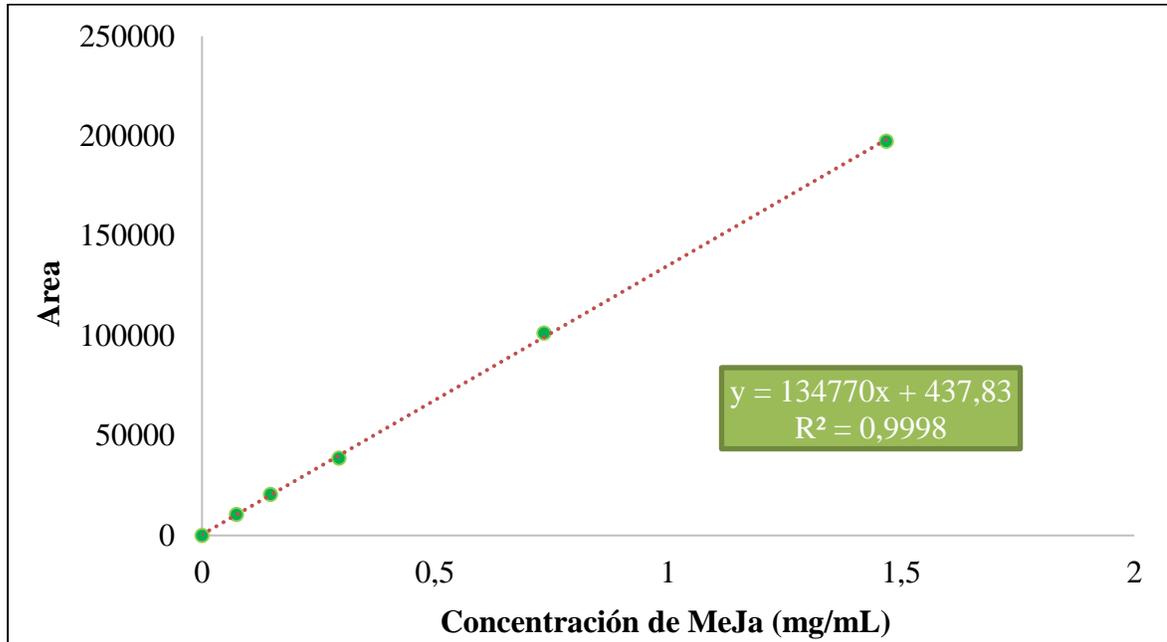
Se realizó la cuantificación de proteína presente en simplasto de acuerdo a la metodología desarrollada por Bradford (1976) y linealizado por Zor y Sellinger (1996). Se empleó albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Se preparó una solución stock de 1mg/mL, a partir de la cual se construyó una curva de calibración en un rango de 0 a 10 μg de proteína y se completó a 20 μL con el buffer en el cual estaba disuelta la muestra problema. Posteriormente se adicionó 500 μL del reactivo de Bradford, se agitó en vórtex durante 30 segundos y se dejó en reposo por 15 minutos. Después de este tiempo, se realizaron lecturas de absorbancia a 450 y 590 nm. La curva de calibración se presenta a continuación:



B. Anexo: Curva de calibración de MeSA, MeJA y SA

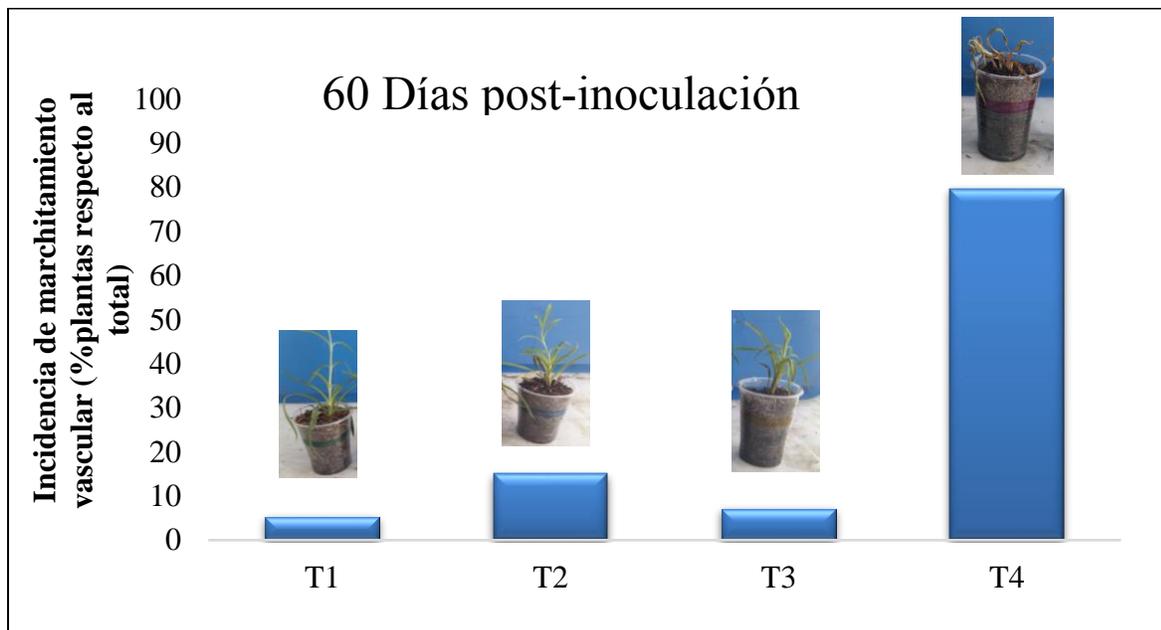
Se realizaron curvas de calibración con patrones estándar comerciales para determinar la concentración y el tiempo de retención de los metabolitos de interés en los extractos obtenidos a partir de los tejidos de interés. Los patrones utilizados fueron salicilato de metilo (MeSA), jasmonato de metilo (MeJA), ácido salicílico (SA).





D. Anexo: Incidencia del ensayo *in vivo*

Incidencia al marchitamiento vascular evaluado a los 60 días pos-inoculación. En la gráfica se observa una mayor incidencia en la variedad susceptible inoculada, llegando a los 60 días a un 80% de las plantas. Por otra parte, este trabajo fue realizado en conjunto con otro trabajo de investigación del grupo de investigación.



T1: Resistente control, T2; Resistente inoculado, T3: Susceptible control, T4: Susceptible inoculado

Bibliografía

Abascal, J. M. (2017). Plantas con flores cultivadas y comercializadas en tres mercados del altiplano central de México. Tesis de pregrado en ingeniería agronómica en floricultura. Universidad autónoma del Estado de México.

Abd-elsalam, K. A., Aly, I. N., Abdel-satar, M. A., Khalil, M. S. & J. A. Verreet. (2003). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNS sequence data. *African journal of Biotechnology*, 2(4), 82-85.

Adie, B. A., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M. M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J. J., Schmetz, E. A. & R. Solano. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19(1), 1665–1681.

Agrios, N. (1995). *Fitopatología*. México: Editorial Limusa.

Alazem, M. & N. S. Lin. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host–virus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 16(5), 529-540.

Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A. & M. A. Pedreno. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 377-390.

Andersson M. X., Kourtchenko, O., Dangl. J.L., Mackey, D. & M. Ellerstrom. (2006) Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1-and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. *The plant*, 47(6), 947–959.

Anthony, R. G., Khan, S., Costa, J., Pais, M. S. & L. Bogre. (2006) The *Arabidopsis* protein kinase PTI1-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OX11. *Journal Biological Chemistry*, 281(49), 37536–37546.

Anthony, K. K., George, D. S., Baldev Singh, H. K., Fung, S. M., Santhirasegaram, V., Razali, Z., & C. Somasundram. (2017). Reactive oxygen species activity and antioxidant properties of *Fusarium* infected bananas. *Journal of Phytopathology*, 165(4), 213-222.

Allgyer, T. & M. Wells. (1979). Phospholipase D from Savoy Cabbage: Purification and Preliminary Kinetic Characterization. *American Chemical Society*, 18(24), 5348-5353.

Andreou, A. & I. Feussner. (2009). Lipoxygenases—structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1504-1510.

Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T. & Y. Ichinose. (2001). Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology*, 42(4), 446-449.

Arbeláez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17, 11-22.

Ardila, H. D. (2006). Evaluación de algunas respuestas bioquímicas y moleculares relacionadas con el metabolismo de los fenoles en el modelo (*Dianthus caryophyllus* L.) - *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2. Tesis de Maestría en Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

Ardila, H. & B. Higuera. (2005). Inducción diferencial de polifenoloxidasas y β -1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Revista colombiana de química*, 10(2), 61-74.

Ardila, H. D., Baquero, B. & S. T. Martínez. (2007). Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Revista Colombiana de Química*, 36(2), 151-167.

Ardila, H. D., Martínez, S. T., & B. L. Higuera. (2011). Regulación espacio-temporal de fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Revista Colombiana de Química*, 40(1), 7-24.

Ardila, H. D. (2013). Contribución al estudio de algunos componentes bioquímicos y moleculares de la resistencia del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Tesis doctoral en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D. C.

Ardila, H. D., Torres, A. M., Martínez, S. T., & B. L. Higuera. (2014). Biochemical and molecular evidence for the role of class III peroxidases in the resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Physiological and molecular plant pathology*, 85, 42-52.

Arrieta-Guevara, M. A., Higuera-Mancipe, B. L. & S. T. Martínez-Peralta. (2010). Inducción de fenilalanina amonio liasa y variación en el contenido de compuestos fenólicos en frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam) infectados con *Colletotrichum acutatum*. *Acta Biológica Colombiana*, 15(1), 129-144.

Asocolflores-Asociación Colombiana de Exportadores de Flores. (2018). Boletín estadístico. Recuperado de <http://www.asocolflores.org/>

Assis, J. S., Maldonado, R., Muñoz, T., Merodio, C., & M. I. Escribano. (2001). Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 23(1), 33-39.

Attaran, E., Zeier, T. E., Griebel, T. & J. Zeier. (2009). Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(3), 954-971.

Australian Government (Department of health and ageing office of the gene technology regulator) (2015). The biology and ecology of *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). Recuperado de <http://www.oqtr.gov.au/>

Ávila, A. C., Ochoa, J., Proaño, K. & M. C. Martínez. (2019). Jasmonic acid and nitric oxide protects naranjilla (*Solanum quitoense*) against infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* by eliciting plant defense responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106, 129-136.

Axelrod, B., Cheesbrough, T. & S. Laakso. (1981). [53] Lipoxygenase from Soybeans. *Methods in Enzymology*, 7, 441-451

Baayen, R. P., Elgersma, D. M., Demminsk, J. F. & L.D. Sparnaaij. (1988) Differences in pathogenesis observed among susceptible interactions of carnation with four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 94, 81–94.

Baayen, R. P., Ouellette, G. B., & D. Rioux. (1996). Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology*, 86, 1018–1031.

Babitha, M. P., Prakash, H. S. & H. S. Shetty. (2006). Induction of lipoxygenase in downy mildew resistant seedlings of pearl millet in response to inoculation with *Sclerospora graminicola*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8(4), 560-564.

Baker, B., Zambryski, P., Staskwicz, B. & S. P. Dinesh-Kumar. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276(5313), 726-733.

Bari, R. & J. Jones. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(1), 473-488.

Battistuzzi, G., D'Onofrio, M., Loschi, L. & M. Sola. (2001). Isolation and characterization of two peroxidases from *Cucumis sativus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388(1), 100-112.

Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101-110

Bent, A. F. (1996). Plant Disease Resistance Genes: Function meets structure. *The plant Cell*, 8(10), 1757-1771.

Bent, A. F., & Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 399–436.

Ben-Yephet, Y., Reuven, M. & D. Shtienberg. (1997). Complete resistance by carnation cultivars to *Fusarium* wilt induced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2. *Plant Disease*, 81(7), 777-780

Bell, E., Creelman, R. & J. Mullet. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8675–8679.

Bernards, M.A. & N. G. Lewls. (1992). Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochemistry*, 31(10), 3409-3412.

Bernards, M.A., Fleming, W.D., Llewellyn, D.B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A. and Plourde, G.L. (1999) Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiology*, 121, 135-146.

Berrocal-Lobo, M. & A. Molina. (2008). *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science*, 13(3), 145-150.

Berry, H., Debat, H. & V. Larreta-Garde. (1997). excess substrate inhibition of soybean lipoxygenase-1 is mainly oxygen-dependent. *FEBS*, 408, 324-326.

Bindschedler, L. V., Dewney, J., Blee, K. A., Stone, J. M, Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish C, Davies, D., Sudubrl, F. & P. Bolwell. (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, 47(6), 851-863.

Bino, R., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., Nikolau, B. J., Mendes, P., Roessner-Tunali, U., Baele, M. H., Trethewey, R. N., Lange, B, M., Wurtele, E. S. & L. W. Summer. (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science*, 9(9), 418-425.

Bisswanger, H. (2013). *Practical enzymology*. John Wiley & Sons.

Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Mueller, M. J., Xia, Z. Q. & M. H. Zenk. (1995). The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4099–4105.

Biglari, F., AlKarkhi, A. F. M. & A. M. Easa. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107(4), 1636–1641.

Bradford, M.A. (1976) A Rapid and Sensitivity Method for Detection of Binding-DyeProteins. *Anal Biochem*. 72, 248-254

Brown, J., Paliyath, B. & J. Thompson. (1990). Influence of acyl chain composition on the degradation of phosphatidylcholine by phospholipase D in Carnation microsomal membranas. *Journal of Experimental Botany*, 41(229), 979-986.

Buonaurio, R. & M. Servili. (1999). Involvement of lipoxygenase, lipoxygenase pathway volatiles, and lipid peroxidation during the hypersensitive reaction of pepper leaves to

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54(5-6), 155-169.

Burgs, S. P. (2004). *Postharvest physiology and hypobaric storage of fresh produce*. Miami, Estados Unidos: CABI Publishing.

Butovich, I. A. & S. M. Lukyanova. (2008). Inhibition of lipoxygenase and cyclooxygenases by linoleyl hydroxamic acid: comparative in vitro studies. *Journal of Lipid Research*, 49, 1284-1294.

Cakmak, T., Cakmak, Z. E., Dumlupinar, R. & T. Tekinay. (2012). Analysis of apoplastic and symplastic antioxidant system in shallot leaves: impacts of weak static electric and magnetic field. *Journal of Plant Physiology*, 169(11), 1066-1073.

Camacho, J. J., Anzelloti, D. & A. González-Fontes. (2002). Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(12), 997-1002.

Castilla, Y., González, M. & R. Lara. (2014). Determinación de estabilidad genética in vitro de plantas de clavel español (*Dianthus carioophyllus* L.), micropropagadas con Biobras-16. *Cultivos Trop.* 35:67-74.

Cevallos, J. F., González, D. & G. Arbeláez. (1990) Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en clavel en la Sabana de Bogotá. *Agronomía Colombiana*, 7, 40-46,

Cha, J. Y., Lee, J. E., Koh, E. H. & M. U. Choi. (1994). Enzymatic Hydrolysis of p-Nitrophenyl Phosphoryl Derivatives by Phospholipase D. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 15(11), 1001-1003.

Chaturvedi, R. & J. Shah. (2007). Salicylic in plant disease resistance. En: S. Hayat & A. Ahmad (eds.), *Salicylic Acid-A Plant Hormone* (pp. 335-370). Dordrecht: Springer.

Chedea, V. S., & M. Jisaka. (2011). Inhibition of soybean lipoxygenases—Structural and activity models for the lipoxygenase isoenzymes family. In *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. InTech.

Chen, J., Zou, X., Liu, Q., Wang, F., Feng, W. & N. Wan. (2014). Combination effect of chitosan and methyl jasmonate on controlling *Alternaria alternata* and enhancing activity of cherry tomato fruit defense mechanisms. *Crop Protection*, 56, 31-36.

Chen, Y. C., Wong, C. L., Muzzi, F., Vlaardingerbroek, I., Kidd, B. N. & P. M. Schenk. (2014). Root defense analysis against *Fusarium oxysporum* reveals new regulators to confer resistance. *Scientific Reports*, 4(5584), 1-10.

Cheong, J. J. & Y. Do Choi. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *TRENDS in Genetics*, 19(7), 409-413.

Chiocchetti, A., Bernardo, I., Daboussi, M. J., Garibaldi, A., Gullino, L., Langin, T. & Q. Migheli. (2009). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. *Phytopathology*, 89(12), 1169-1175.

Cho, Y. K., & H. K. Ahn. (1998). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 593–605.

Cochrane, F. C., Davin, L. B. & N. G. Lewis. (2004). The Arabidopsis phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry*, 65(11), 1557-1564.

Chowdhury, S., Basu, A. & S. Kundu. (2017). Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. *Scientific Reports*, 7(1), 1-17.

Chunhua, S., Ya, D., Bingle, X., Xiaolong, X., Yongshu, X. & L. Qingliang. (2001). The Purification and Spectral Properties of Polyphenol Oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4), 381a–381h.

Coaker, G. & D. Baker. (2013). Signal transduction pathways activated by R protein. En G. Sessa (Ed.), *Molecular Plant Immunity* (pp. 41-54). United state: Wiley-blackwell.

Cole, S. J., Yoon, A. J., Faull, K. F. & A. C. Diener. (2014). Host perception of jasmonates promotes infection by *Fusarium oxysporum* formae speciales that produce isoleucine- and leucine-conjugated jasmonates. *Molecular Plant Pathology*, 15(6), 589-600.

Constabel, C. P., Lynn, Y., Patton, J.J. & M. E. Christopher. (2000). Polyphenol Oxidase from Hybrid Poplar. Cloning and expression in Response to Wounding and Herbivory. *Plant Physiology*, 124(1), 285-295.

Curir, P., Danieli, B., Dolci, M., Pasini, C., Guglieri, L. & M. Sacco. (2000) Reductive detoxification of the acetophenone skeleton of the carnation phytoanticipin by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Plant Pathology*. 49, 742–747.

Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V. & O. Tagliatela. (2001). Kaempferide triglycoside: a possible factor of resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus*) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytochemistry*, 56(1), 717-721.

Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V. & L. De Cooman. (2003). Fungitoxic phenols from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) effective against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytochemical Analysis*, 14(1), 8-12.

Curir, P., Dolci, M. & F. Galeotti. (2005). A phytoalexin-like flavonol involved in the carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* pathosystem. *Journal of Phytopathology*, 153, 65–67.

Cuervo, D. C. (2017). Estudio bioquímico y molecular de algunas enzimas asociadas al estrés oxidativo en apoplasto de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción

con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Tesis doctoral en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D. C.

Cuervo, D., Martínez, S., Ardila, H. & B. Higuera. (2009). Inducción diferencial de la enzima peroxidasa y su relación con lignificación en los mecanismos de defensa del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Revista colombiana de química*, 38(3), 379-393.

Cutler, P. (Ed.). (2004). Protein purification protocols (Vol. 244). Springer Science & Business Media.

D'Arrigo, P., Piergianni, V., Scarcelli, D. & S. Servi. (1995). A spectrophotometric assay for phospholipase D. *Analytica Chimica Acta*, 304(2), 249-254.

DANE. (2018) información para todos. Boletín técnico exportaciones (EXPO). Recuperado de <http://www.dane.gov.co/>

De Gara, L., de Pinto, D. C. & F. Tommasi. (2003). The antioxidant systems vis-s-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant physiology and biochemistry*, 41(10), 863-870.

Dempsey, D. M. A., Shah, J. & D. F. Klessig. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(4), 547-575.

Desmond, O. J., Edgar, C. I., Manners, J. M., Maclean, D. J., Schenk, P. M. & K. Kazan. (2006). Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the Crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(1), 171-179.

Di pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado, J. & M. Roncero. (2003) *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4(5), 315-325

Díaz-Puentes, L. N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico, *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 257-267.

Ding, L. N., Yang, G. X., Yang, R. Y., Cao, J. & Y. Zhou. (2016). Investigating interactions of salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways in monocots wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 93, 67-74.

Ding, C. K., Chachin, K. & Y. Ueda. (1998). Purification and properties of polyphenoloxidase from loquat fruit. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4144-4149.

Dixon, R. A. & N. L. Paiva. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1085-1097.

Dodds, P. N. & C. Schwechheimer. (2002). A Breakdown in Defence signalling. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S5-S8.

Dogan, S. & M. Dogan. (2004). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*, 88, 69–77.

Esteban-Carrasco, A., Zapata, J. M., López-Serrano, M., Sabater, B. & M. Martin. (2002). Purification of two peroxidases isoenzymes of Aloe barbadensis which oxidize p-coumaric acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(2), 127-132.

Feussner, I. & C. Wasternack. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 275-297.

Feys, B. J. & J. E. Parker. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genetic*, 16(10), 449–55.

Farmer, E. E. & C. A. Ryan. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7713-7716.

Farmer, E. E., Alméras, E. & V. Krishnamurthy. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 372-378.

Floerl, S., Majcherczyk, A., Possienke, M., Feussner, K., Tappe, H., Gatz, C., Feussner, I., Kues, U. & A. Polle. (2012). *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 7(2), e31435.

Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D. & L. Tong. (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *PNAS*, 102(5), 1773-1778.

Gabaldón, C., Gómez-Ros, L. V., Núñez-Flores, M. J. L., Esteban-Carrasco, A. & A. R. Barceló. (2007). Post-translational modifications of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology*, 65(1-2), 43-61.

Gandia-Herrero, F., Escribano, J. & F. García-Carmona. (2005). Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyraminebetaxanthin/dopaminebetaxanthin pair. *Planta*, 222(2), 307–316.

Gárces, E., Orozco, M., Bautista, G. & H. Valencia. (2001) *Fusarium oxysporum* El hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7-25

Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U. & B. Baraniak. (2007). Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food chemistry*, 105(3), 1047-1053.

Gegenheimer, P. (1990). [14] Preparation of Extracts from Plants. In *Methods in enzymology* (Vol. 182, pp. 174-193). Academic Press.

Gençer, N.; Sinan, S. & O. Arslan. (2012). Kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from various olives (*Olea europea* L.). *Asian J. Chem.* 24, 2159–2161.

Galliard, T. & D. R. Phillips. (1971). Lipoxygenase from potato tubers. Partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position of linoleic acid. *Biochemical Journal*, 124(2), 431-438.

Giraldo, M. C. & B. Valent. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 800-814.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205-227.

Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M. & S. Rosahl. (2002). Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1584(1), 55-64.

Gökmen, V., Serpen, A., Atli, A., & H. Köksel. (2007). A practical spectrophotometric approach for the determination of lipoxygenase activity of durum wheat. *Cereal Chemistry*, 84(3), 290-293.

Gómez-Gómez, L. (2004). Plant perception for pathogen recognition and defense. *Molecular Immunology*, 41, 1055-1062.

Gonugunta, V. K., Srivastava, N., & A. S. Raghavendra. (2009). Cytosolic alkalinization is a common and early messenger preceding the production of ROS and NO during stomatal closure by variable signals, including abscisic acid, methyl jasmonate and chitosan. *Plant Signaling & Behavior*, 4(6), 561-564.

González-Mendoza, D., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T., Grimaldo-Juarez, O., Ceceña-Duran, C., Duran-Hernandez, D. & F. Gutierrez-Miceli. (2018). Changes in the phenylalanine ammonia lyase activity, total phenolic compounds, and flavonoids in *Prosopis glandulosa* treated with cadmium and copper. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2), 1465-1472.

Gupta, M. & F. Wold. (1980). A convenient spectrophotometric assay for phospholipase D using *p*-nitrophenyl-phosphocholine as substrate, *Lipids*, 15(8), 594-596.

Gupta, D., Palma, J. M. & F. J. Corpas. (Eds.). (2016). *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Suiza: Springer.

Ghamsari, L. Keyhani, E. & S. Golkhoo. (2006). Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. Corm during rooting. *Iranian Biomedical Journal*, 11(3), 137-146.

Hao, Z., Wang, L., Huang, F. & R. Tao. (2012) Expression of defense genes and antioxidant defense responses in rice resistance to neck blast at the preliminary heading stage and full heading stage. *Physiology and Biochemistry*, 57, 222-230.

Halim, V. A., Vess, A., Scheel, D. & S. Rosahl. (2006). The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant biology*, 8(3), 307-313.

Hanson, K.R. & E. A. Havir. (1981). Phenylalanine ammonia-lyase. En: P. K. Stumpf & E. E. Conn (eds.), *Biochemistry of Plants: a Comprehensive Treatise* (pp. 577-625). New York: Academic Press.

Hammond-kosack, K. & J. Jones. (2015). Response to plant pathogens. En B. B Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. (Ed.), *Biochemistry & molecular biology of plants* (pp. 984-1049). Estados unidos: John Wiley & Sons, Ltd.

He, P. Shan, L. & J. Sheen. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microbiology*, 9(6), 1385-1396.

Heller, J. & P. Tudzynski. (2011). Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 369-390.

Herman, E. M. & M. J. Chrispeels. (1980). Characteristics and subcellular localization of phospholipase D and phosphatidic acid phosphatase in mung bean cotyledons. *Plant Physiology*, 66(5), 1001-1007.

Herder, J. D., Lievens, S., Rombauts, S., Holsters, M. & S. Goormachtig. (2007). A symbiotic plant peroxidase involved in Bacterial invasion of the tropical legume sesbania rostrata. *Plant Physiology*, 144(2), 717-727.

Higuera, B. L. (2001). Contribución al estudio de la participación de los compuestos fenólicos en los mecanismos de la interacción Clavel *Dianthus caryophyllus* L. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Tesis de Doctorado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Higuera, B. L. & F. Ebrahim-Nesbat. (1997). Study of vascular root responses as defense mechanisms in carnation resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* by Transmission Electron Microscopy. In *International Symposium on Cut Flowers in the Tropics 482* (pp. 101-108).

Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Nagamura, Y., Sasaki, T. & Y. Ohashi. (2000) Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Letters*. 471(2-3), 245-250.

Hyun, M. W., Yun, Y. H., Kim, J. Y. & S. H. Kim. (2011). Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology*, 39(4), 257-265.

Huang, L. & D. Backhouse. (2005). Induction of Defence Responses in Roots and Mesocotyls of Sorghum Seedlings by Inoculation with *Fusarium thapsinum* and *F. proliferatum*, Wounding and Light. *Journal Phytopathology*, 153, 522–529.

Huckelhoven, R. H. (2007). Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review Phytopathology*, 45,101–27.

Hudak, K. & J. Thompson. (1997). Subcellular localization of secondary lipid metabolites including fragrance volátiles in Carnation petals. *Plant Physiology*, 114, 705-713.

Hsieh, L. S., Ma, G. J., Yang, C. C. & P. D. Lee. (2010). Cloning, expression, site-directed mutagenesis and immunolocalization of phenylalanine ammonia-lyase in *Bambusa oldhamii*. *Phytochemistry*, 71(17), 1999-2009

Iris, J. E., Stulemeijer, I. J. & M. H. Joosten. (2008). Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 545-560.

Jonathan, D., Jones, G. & J. L. Dangl. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(16), 323-329.

Jaiti, F., Dihazi, A., El Hadrami, A., El Hassni, M. & I. El Hadrami. (2004). Effect of exogenous application of jasmonic acid on date palm defense reaction against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(3), 325-331.

Jaiti, F. Verdeil, J. & I. Hadrami. (2009). Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 84-90.

Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F.C., Goupy, P. M. & J. J. Nicolas. (1990). Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*, 38, 1437-1441.

Jharna, R., Santhoor, G., & R. Lalitha. (1997). Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the new Cultivar of Indian Pineapple fruit. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 45(6), 2031-2035.

Jianwu, L. & W. Xuemin. (2018). Phospholipase D and Phosphatidic Acid in Plant Immunity. *Plant Science*.

Kader, M. A. & S. Lindberg. (2010). Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signaling & Behavior*, 5(3), 233-238.

Kalachova, T., Lakovenko, O., Kretinin, S. & V. Kravets. (2013). Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66(1), 127-133.

Kappan, K & X. Wang. (1999). Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1439, 151-166.

Katsir, L., Chung, H. S., Koo, A. J. & G. A. Howe. (2008). Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 428-435.

Kermasha, S., Dioum, N. & B. Bisakowski. (2001). Biocatalysis of lipoxygenase in selected organic solvent media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 909-919.

Kinke, O., Flemr, M., Vergnolle, C., Collin, S., Renou, J., Taconnat, L., Yu., A., Burketová, L., Valentová, O., Zachowski, A. & E. Ruelland. (2009). Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in Arabidopsis cell suspension. *Plant Physiology*, 150(1), 424-436

Kolomiets, M., Chen, H., Gladon, R. J., Braun, E. J. & D. J. Hannapel. (2000). A lead lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiology*, 124, 1121-1130.

Król, P., Igielski, R., Pollmann, S. & E. Kępczyńska. (2015). Priming of seeds with methyl jasmonate induced resistance to hemi-biotroph *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato via 12-oxo-phytodienoic acid, salicylic acid, and flavonol accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 179, 122-132.

Lamber, H., Stuart-Chapin III, F. & T. Pons. (2008) *Plant Physiological Ecology*. New York, Estados Unidos: Springer.

Lanubile, A., Bernardi, J., Marocco, A., Logrieco, A. & C. Paciolla. (2012). Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides*. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 39-46.

Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. & A. Cardinali. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, 661(2), 23-67.

Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F. & A. Sánchez-Ferrer. (2001). Proteolytic activation of latent paraguaya peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49(2), 1003-1008.

Lee, P. (1991). Biochemical studies of Cocoa Bean Polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric.* 55, 251-260.

Li, L., & J. C. Steffens. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215(2), 239-247.

Li, G. & Y. Yen. (2008). Jasmonate and ethylene signaling pathway may mediate *Fusarium* head blight resistance in Wheat. *Crop Science*, 48(1), 1888-1896.

Li, J. & X. Wang. (2018). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity. *Plant Science*.

Li, L., He, X., Sun, J., Li, C., Ling, D., Sheng, J., Zheng, F., Liu, G., Li, J., Tang, Y., Yi, P., Xin, M., Li, Z. & Z. Zhou. (2017). Responses of Phospholipase D and Antioxidant System to Mechanical Wounding in Postharvest Banana Fruits. *Journal of Food Quality*.

Liu, P. P., von Dahl, C. C. & D. F. Klessig. (2011). The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after infection. *Plant Physiology*, 157(4), 2216-2226.

Ludwig, P., Holzhütter, H.G., Colosimo, A., Silvestrini, M.C., Schewe, T. & S. M. Rapoport. (1987). A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. *Eur. J. Biochem.* 168, 325-337.

Lyons, R., Stiller, J., Powell, J., Rusu, A., Manners, J. M. & K. Kazan. (2015). *Fusarium oxysporum* triggers tissue-specific transcriptional reprogramming in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 10(4), 1-23.

Madadkhah, E., Lotfi, M., Nabipour, A., Rahmanpour, S., Banihashemi, Z. & M. Shoorooei. (2012). Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1. *Scientia Horticulturae*, 135, 171–176.

Makandar, R., Nalam, V., Chaturvedi, R., Jeannotte, R., Sparks, A. A. & J. Shah. (2010). Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis interaction with *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7), 861-870.

Mandal, S. & A. Mitra. (2007). Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4-6), 201-209.

Mandal, S., Mitra, A. & N. Mallick. (2008). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), 56-61.

Manrique, L. (2014). Floricultura colombiana en contexto: experiencias y oportunidades en Asia pacífico. *Revista Digital Mundo Asia Pacífico*, 3(5), 52-79.

Marqués, L., Fleuriet, A. & J. Macheix. (1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 33(2), 193-200.

Martínez, A. P., Martínez, S. T. & H. D. Ardila. (2017). Condiciones para el análisis electrofóretico de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudios proteómicos. *Revista Colombiana de Química*, 46(2), 5-16.

Martínez-González, A. P., Ardila, H. D., Martínez-Peralta, S. T., Melgarejo-Muñoz, L. M., Castillejo-Sánchez, M. A. & J. V. Jorrín-Novo. (2018). What proteomic analysis of the apoplast tells us about plant-pathogen interactions. *Plant Pathology*, 67(8), 1647-1668.

Marusek, C. M., Trobaugh, N. M., Flurkey, W. H. & J. K. Inlow. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(1), 108-123.

- Mathé, C., Barrel, A., Jourda, C. & C. Dunand. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. *Arch Biochem Biophys.* 500, 58-65
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in Plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331.
- Meyers, B. C., Kozik, A. Griego, A., Kuang, H. & R. Michelmore. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15(4), 809–34.
- Mika, A. & S. Lüthje. (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology*, 132(3), 1489-98.
- Mohammadi, M. & H. Kazemi. (2002). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162(4), 491-498.
- Monaghan, J. & C. Zipfel. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Plant Biology*, 15(4), 1-9.
- Monroy, S., Chacón, L., Farfán, P., Peralta, S. T. & H. D. Ardila. (2018). Selección de genes de referencia para análisis transcripcionales en el modelo clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Artículo sometido
- Morkunas, I. & J. Gmerek. (2007). The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant physiology*, 164(2), 185-194.
- Munnik, T., Arisz, S.A., De Vrije, T. & A. G. Musgrave. (1995). Protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants. *Plant Cell*, 7(12), 2197–2210.
- Nagai, N., Kojima, Y., Shimosaka, M. & M. Okazaki. (1988) Effects of kinetin on L-phenylalanine ammonia-lyase activity in tobacco cell culture. *Agric Biol Chem*, 52, 2617-2619.
- Nie, L., Wu, G. & W. Zhang. (2006) Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify of variations. *Biochem Biophys Res Commun*, 339, 603–610.
- Niemann, G. J., Van Der Kerk, A., Niessen, W. M. & K. Versluis. (1991). Free and wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus infected carnation *Dianthus caryophyllus* L stems. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38, 417–432.
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N. & Y. Ohashi. (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39(5), 500-507.

Ohashi, Y., Oka, A., Rodrigues-Pousada, R., Possenti, M., Ruberti, I., Morelli, G. & T. Aoyama. (2003). Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science*, 300, 1427-1430.

Okamura, S. I. & S. Yamashita. (1994). Purification and characterization of phosphatidylcholine phospholipase D from pig lung. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 31207-31213.

Oliw, E. H. (2002). Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68, 313-323.

Otha, H., Shida, K., Peng, Y., Furusawa, I., Shishiyama, K., Aibara, S. & Y. Morita. (1991). A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiology*, 97(1), 94-98.

Pallas, J. A., Paiva, N. L., Lamb, C., & R. A. Dixon. (1996). Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant*, 10(2), 281–293.

Palmer, J. K. (1963). Banana polyphenoloxidase. Preparation and properties, *Plant Physiol.* 38. 508–513.

Pappan, K. & X. Wang. (1999). Plant phospholipase D α is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca²⁺ concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368(2), 347-353.

Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. & D. F. Klessig. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), 113-116.

Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C. & C. Dunand. (2006) Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta*, 223 (5), 965-974

Pérez-Gilbert, M. & F. G. Carmona. (2000). Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *Journal agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 695-700.

Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Metraux, J. P., Manners, J. M. & W. F. Broekaert. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell*, 8(12), 2309–2323.

Peña-cortes, H., Barrios, P., Dortam F., Polanco, V., Sánchez, C., Sánchez, E. & I. Ramírez. (2005). Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(3), 246-260.

Pise, M. & A. Upadhyay. (2015). Medium alkalization and induction of phenylalanine ammonia lyase are involved in the early responses of UV-B mediated hyperproduction of shatavarin. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 3(5),153-160.

Pizano, M. (2000). Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Bogotá, Colombia: Ediciones Hortitecnia Ltda.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Polkowska-Kowalczyk, I., Wielgat, B. & U. Maciejewska. (2007). Changes in the antioxidant status in leaves of *Solanum* species in response to elicitor from *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, 164(10), 1268-77.

Porta, H. & M. Rocha-Sosa. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130(1), 15-21.

Prasad, P., Reddy, N. P. E., Anandam, R. J. & G. L. Reddy. (2003). Isozymes variability among *Fusarium udum* resistant cultivars of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) (Millsp)*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25(3), 221–228.

Qi, P. F., Johnston, A., Balcerzak, M., Rocheleau, H., Harris, L. J., Long, W. Y., Wei, Y. M., Zheng, Y. L. & T. Ouellet. (2012). Effect of salicylic on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of fusarium head blight in wheat. *Fungal Biology*, 116(1),413-426.

Qualliotine-Mann, D., Agwu, D. E., Ellenburg, M. D., McCall, C. E. & L. C. McPhail. (1993). Phosphatidic acid and diacylglycerol synergize in a cell-free system for activation of NADPH oxidase from human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 23843–23849.

Quintero, M. F., Guzmán, J. M. & J. L. Valenzuela. (2012). Evaluación de sustratos alternativos para el cultivo de miniclavel (*Dianthus caryophyllus* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(1), 76-87.

Rainteau, D., Humbert, L., Delage, E., Vergnolle, C., Cantrel, C., Maubert, M. A., Lanfranchi, S., Maldiney, R., Collin, S. Wolf, C., Zachowski, A. & E. Ruelland. (2012). Acyl chains of phospholipase D transphosphatidylation products in *Arabidopsis* cells: a study using multiple reaction monitoring mass spectrometry, *Plos One*, 7(7), e41985.

Rancé, I., Fournier, J. & M. Esquerré-Tugayé. (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6554-6559.

Rangel, G., Castro, E., Beltrán, E., Reyes, H. & E. García. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 12(2), 90-95.

Reddy, J. T., Korth, K. L., Wesley, S. V., Howles, P. A., Rasmussen, S., Lamb, C. & R. A. Dixon. (2000). Post-transcriptional regulation of phenylalanine ammonia-lyase expression in tobacco following recovery from gene silencing. *Biological Chemistry*, 381(8), 655-665.

Repka, V., Fischerova, I. & K. Šilhárová. (2004). Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum*, 48(2), 273-283.

Riviere, M. P., Marais, A. & E. Galiana. (2008). Silencing of acidic pathogenesis-related PR-1 genes increases extracellular beta-(1->3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *Journal Experimental Botany*, 59(6), 1225-1239.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. & J. D. Jones. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 317-343.

Rouet-Mayer, M. A., Bureau, J. M. & C. Laurière. (1992). Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing Carnation petals. *Plant Physiology*, 98, 971-978.

Rustérucci, C., Montillet, J. L., Agnel, J.P., Battesti, C., Alonso, B., Bessoule, J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J. P. & C. Triantaphylidès. (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein in tobacco leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 36446–36455.

Saikia, R., Singh, T., Kumar, R., Srivastava, J., Srivastava, A. K., Singh, K. & D. K. Arora. (2003). Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiological Research*, 158(3), 203-213.

Sandoval, G. (Ed.). (2012). Lipases and phospholipases: methods and protocols. New York: Humana Press.

Santiago, R., De Armas, R., Legaz, M. E. & C. Vicente. (2009). Changes in phenolic acids content, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in sugarcane leaves induced by elicitors isolated from *Xanthomonas albilineans*. *Australasian Plant Pathology*, 38(4), 357-365.

Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masusa, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H. & H. Shimada. (2001). Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *Dna Research*, 8(4), 153-161.

Segal, L. M. & R. A. Wilson. (2018). Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 110, 1-9.

Seskar, M, Shulaev, V. & I. Raskin. (1998) Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiology*, 116, 387–92.

Sevilem, I., Miyashima, S. & Y. Helariutta. (2013). Cell-to-cell communication via plasmodesmata in vascular plants. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 27-32.

Schaller, F. (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoids-derived signaling molecules. *Journal Experimental Botany*, 52(354), 11-23.

Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C. & J. M. Manners. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11655-11660.

Shirsat, S. G., & P. M. Nair. (1986). The mode of inhibition of the biosynthesis of phenylalanine ammonia lyase by its product cinnamic acid in aging potato parenchyma tissue. *Journal of Biosciences*, 10(3), 393-402.

Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G. & R. Mittler. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 199-208.

Shulaev, V., Silverman, P. & I. Raskin. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385(6618), 718.

Singleton, V. & J. A. Rossi Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphothungstic acid reagents. *American Journal of Enology & Viticulture*, 16, 144–158.

Skrzypczak-Jankun, E., Chorostowska-Wynimko, J., Selman, S.H. & J. Jankun. (2007). Lipoxygenases – A challenging problem in enzyme inhibition and drug development. *Current Enzyme Inhibition*, 3, 119-132.

Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E. J., Midland, S. L., Sims, J. J., & N. T. Keen. (1998). Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiology*, 116(1), 231–238.

Soto, J. Pabón, F. & J. Filguera. (2009). Relación entre el color de la flor del clavel (*Dianthus caryophyllus*) y la tolerancia a patógenos del género *Fusarium*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 5(1), 116-129.

Soto, J. C., Clavijo, M. J. & J. J. Filgueira. (2012) Evaluación fenotípica de la Resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en poblaciones F1 de clavel. *Agronomía Colombiana*. 30 (2), 172-178

Suzuki, T., Honda, Y., Mukasa, Y. & S. Kim. (2006). Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry*, 67, 219-224.

Swarupa, V., Ravishankar, K. V. & A. Rekha. (2014). Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta*, 239(4), 735-751.

- Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A. & A. Samadi. (2011). Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 751-763.
- Tamaoki, D., Seo, S., Yamada, S., Kano, A., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Shiduku, T. Akimitsu, K. & K. Gomi. (2013). Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 8(6), e24260.
- Tameling, W. I. & H. A. J. Matthieu. (2007). The diverse roles of NB-LRR proteins in plants. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 71(4), 126-134.
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S. & C. Montemurro (2017). Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 377.
- Tejeda-Sartorius, M., Martínez-Gallardo, N. A., Olalde-Portugal, V. & J. P. Délano-Frier. (2007). Jasmonic acid accelerates the expression of a pathogen-specific lipoxygenase (POTLX-3) and delays foliar late blight development in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 18-25.
- Testerink, C. & T. Munnik. (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants, *Trend in plant science*, 10(8), 368-375.
- Thatcher, L. F., Manners, J. M. & K. Kazan. (2009). *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 58(6), 927-939.
- Thatcher, L., Gao, L. L. & K. Singh. (2016). Jasmonate signalling and defence responses in the model legume medicago truncatula—a focus on responses to Fusarium wilt disease. *Plants*, 5(1), 11.
- Thipyapong, P., Hunt, M. D. & J. C. Steffens. (2004). Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta*, 220(2), 105-107.
- Thipyapong, P., Joel, D. M. & J. C. Steffens. (1997). Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant physiology*, 113, 707-718.
- Tian, Q., Stepaniants, S.B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M.C., Doyle, M. J., Yi, E. C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J. P., Gunterm, B., Linseley, P. S., Stoughton, R., Aebersold, R., Collins, S. J., Hanlon, W. A. & L. E. Hood. (2004) Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics*, 3, 960–969.
- Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V. & P. Vera. (1997). Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *MPMI*, 10(5), 624-634.

- Ünal, M.Ü., Taş, C. & A. Şener. (2011). Determination of biochemical properties of polyphenol oxidase from domat olives. *GIDA*, 36, 185–192.
- Valero, E. & F. García-Carmona. (1998). pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2447-2451.
- Van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H. & H. J. Wichers. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45(7), 1309- 1323.
- Van Loon, L. C., Rep, M. & C. M. Pieterse. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review Phytopathology* 44,135-62.
- Vargas, W. A., Sanz-Martín, J. M., Rech, G. E., Rivera, L. P., Benito, E. P., Díaz-Mínguez, J. M., Thon, M. & S. A. Sukno. (2012). Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotricum graminicola* in maize. *Plant Physiology*, 158, 1342-1358.
- Vaughn, C. & S. Duke. (1984). Function of polyphenoloxidase in higher plants. *Physiol. Plant*, 60, 106-112.
- Vaughn, K. C. & S. O. Duke. (1981) Tissue localization of polyphenol oxidase in sorghum. *Protoplasma*, 108, 319-327.
- Vaughn, S. F. & E. C. Lulai. (1992). Further evidence that lipoxygenase activity is required for arachidonic acid-elicited hypersensitivity in potato callus cultures. *Plant Science*, 84(1), 91-98.
- Vera-Estrella, R., Higgins, V. J. & E. Blumwald. (1994). Plant Defense Response to Fungal Pathogens. *Plant Physiology*, 106(1), 97-102.
- Vega, M., Ismail, A., Sedman, J. & S. Kermasha. (2006). Fourier transform infrared study of lipoxygenase conformation in organic solvent media. *Applied Spectroscopy*, 60(2), 168-173.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A. & D. F. Klessig. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review Phytopathology*, 47(1), 177-206.
- Vlot, A. C., Klessig, D. F. & S. W. Park. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 436-442.
- Vogel, C. & E. M. Marcotte. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*, 13:227–232
- Vrije, T. & T. Munnik. (1997). Activation of phospholipase D by calmodulin antagonist and mastoparan in Carnation petals. *Journal of Experimental Botany*, 48(314), 1631-1637.
- Wang, X. (2001). Plant phospholipase. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 52, 211-231.

- Wang, X. (1999). The role of phospholipase D in signaling cascades. *Plant Physiology*, 120, 645-651.
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J. & F. Van Breusegem. (2015). Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2923-2934.
- Whitaker, J. R. (1993). *Principles of enzymology for the food sciences* (Vol. 61). CRC Press.
- Yamaguchi, T., Minami, E. & N. Shibuya. (2003). Activation of phospholipases by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells mediates reactive oxygen generation. *Physiologia Plantarum*, 118(3), 361-370.
- Yamaguchi, T., Tanabe, S., Minami, E. & N. Shibuya. (2004). Activation of phospholipase D induced by hydrogen peroxide in suspension-cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology*, 45(9), 1261-1270.
- Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N. & N. Hayashi. (2000). Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2732–2735.
- Young, S. A., Wang, X. & J. E. Leach. (1996). Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Cell*, 8, 1079–1090
- Yoruk, R. & M. Marschall. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.
- Zhang, X. & C. J. Liu. (2015). Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Molecular Plant*, 8(1), 17-27.
- Zhang, X., Gou, M. & C. J. Liu. (2013). Arabidopsis Kelch repeat F-box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase. *The Plant Cell*, 25(12), 4994-5010.
- Zhao, J. (2015). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein–protein and lipid–protein interactions to hormone signalling. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1721-1736.
- Zhou, P., Smith, N. L. & Ch, Y. Lee. (1993). Potential purification and some properties of monroe apple peel polyphenol oxidase. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 41(4), 532–536.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Plant Biology*, 12(4), 414-420.
- Zor, T. & Z. Sellinger. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302-308.