



RESPUESTAS TEMPRANAS EN SIMPLASTO DE TALLO ASOCIADAS A LA RUTA DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA INTERACCIÓN CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*, caryophyllaceae)- Fod (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*)

Early responses at symplastic stem level associated with the salicylic acid pathway in the interaction carnation (*Dianthus caryophyllus*, caryophyllaceae)- Fod (*Fusarium oxysporum* f. Sp. *dianthi*)

Leidy Johana VANEGAS CANO¹, Sixta Tulia MARTÍNEZ PERALTA¹, Ericsson COY BARRERA², Harold Duban ARDILA BARRANTES¹

1. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Cra. 30 No 45-03, Bogotá-DC, Colombia.

2. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada, Cajicá, Colombia.

* **For correspondence:** hdardilab@unal.edu.co

Received: 19th March 2020. **Returned for revision:** 16th March 2021. **Accepted:** 20th May 2021.

Associate Editor: Enrique Martinez Bustamante

Citation/ citar este artículo como: Vanegas-Cano L. J., Martínez Peralta S. T., Coy Barrera E., y Ardila Barantes H. D. (2022) Respuestas tempranas en simplasto de tallo asociadas a la ruta del ácido salicílico en la interacción clavel (*Dianthus caryophyllus*, caryophyllaceae)- Fod (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*). *Acta Biológica Colombiana*. 27(2),153-163. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v27n2.85778>

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 permitirá el futuro desarrollo de nuevas alternativas de control de la enfermedad. Es por ello que se busca tener evidencia experimental que permita entender el papel de la ruta de señalización del ácido salicílico (SA) y enzimas asociadas con la resistencia de la planta como son fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenoloxidasas (PFO), guayacol peroxidasa (GPX) y fosfolipasa D (PLD), a nivel del simplasto del tallo durante la interacción con el patógeno. Se estableció un ensayo *in vivo* utilizando dos variedades de clavel con diferentes niveles de resistencia a la enfermedad y se determinaron en simplasto de tallo los niveles de SA, MeSA (salicilato de metilo) y las enzimas objeto de estudio. Se presentó inducción de las enzimas estudiadas, evidenciando en el caso de la enzima GPX un aumento a nivel transcripcional. Así mismo, se presentó un incremento de MeSA en los 1 y 14 dpi, mientras que SA se acumuló en tiempos tardíos. La correlación de Pearson determinó que a este nivel existe una acumulación de la hormona MeSA al 1 dpi con los niveles de las enzimas GPX y PLD. Se propone que la respuesta en este órgano de clavel puede estar activada por la ruta de señalización que involucra SA, afectando el metabolismo secundario y la regulación de especies reactivas de oxígeno.

Palabras clave: Marchitamiento vascular, clavel, respuesta de defensa, actividad enzimática, hormonas.

ABSTRACT

The vascular wilting caused by the *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) is the most important disease affecting carnation crops. Understanding the nature of the interaction between the plant and the pathogen will allow the development of new alternatives for disease control. That is why on this study, we want to know the role of the salicylic acid's (SA) signaling pathway and of some enzymes associated to the plant's resistance such as phenylalanine amino lyase (PAL), polyphenol oxidase (PFO), guaiacol peroxidase (GPX) and phospholipase D (PLD), at the stem's symplastic level during the interaction with the pathogen. An *in vivo* assay was established using two carnation cultivars presenting contrasting levels of resistance to the disease, and the levels of SA, MeSA (Methyl salicylate)

and the named enzymes were determined. Induction of the studied enzymes occurred, showing an increase at the transcriptional level in the case of the GPX enzyme. Likewise, an increase of MeSA was presented at 1 and 14 dpi, while SA was accumulated at later times. The Pearson correlation determined that on this level there is an accumulation of the MeSA hormone on 1 dpi with the levels of the enzymes GPX and PLD. We proposed that the response on the stem symplast can be activated by the signaling pathway that involves SA, affecting the secondary metabolism and the regulation of reactive species of oxygen.

Keywords: Vascular wilting, carnation, defense response, enzymatic activity, hormones.

INTRODUCCIÓN

La floricultura en Colombia es una de las actividades económicas que más genera 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 et al., 2014). El clavel representa el 11,7 % del total de la producción generada (Asocolflores, 2018), es por ello que gran parte del clavel que comercializan en los mercados internacionales provienen de Colombia, posicionándolo como el segundo productor a nivel mundial (Asocolflores, 2015).

A pesar de su importancia, la producción de esta flor y las ganancias que genera al sector floricultor han disminuido debido al marchitamiento vascular causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*) (Castellanos et al., 2010; Soto-sedano et al., 2012). Actualmente, para el control de *Fod* se emplean estrategias de tipo químico y físico, las cuales son costosas y generan un control apenas aceptable de la enfermedad. Por esta razón, el desarrollo de alternativas más eficaces de control, compatibles con los sistemas de producción actuales e inofensivos para el medio ambiente, se convierte en una necesidad para el fortalecimiento de cultivo de esta flor. Sin embargo, para tales fines se requiere conocer la interacción entre el patógeno y el clavel, así como estudios básicos sobre los procesos en los que se fundamenta la resistencia de la enfermedad en las variedades resistentes.

Se ha determinado que la respuesta de defensa en plantas infectadas con *formas especialis* de *Fusarium oxysporum* puede estar regulada, dependiendo de la especie vegetal, por las vías de señalización que involucran a las hormonas ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés Salicylic acid) en algunos casos, o el ácido jasmónico (JA, por su sigla en inglés Jamonic acid) y el etileno (ET), en otros (Berrocal-lobo y Molina 2007; Qi et al., 2012; Di et al., 2016). El SA es predominantemente asociado con resistencia a patógenos biótrofos y hemibiótrofos (Makandar et al., 2012; Dinolfo et al., 2016) y, aunque no se conocen de manera detallada los procesos bioquímicos en los que se encuentra involucrada esta hormona, su rol en resistencia para varias enfermedades ha sido ampliamente reportado. Algunos estudios han permitido determinar que la respuesta de defensa asociada a esta hormona puede incluir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROS), la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis y la activación de enzimas relacionadas a defensa. Entre estas últimas se encuentra

la fenilalanina amonio liasa (PAL, por su sigla en inglés Phenylalanine ammonia-lyase), enzima regulatoria de la ruta fenilpropanoide y para la que se ha propuesto un papel importante en la biosíntesis de SA. Así mismo, se destacan la Guayacol Peroxidasa (GPX) y la Polifenoloxidasas (PFO), que participan en procesos oxidativos involucrados en el reforzamiento de la pared celular y la Fosfolipasa D (PLD, por su sigla en inglés Phospholipase D), la cual está relacionada con procesos tempranos durante el incremento de EROS en la respuesta de defensa vegetal (Yamaguchi et al., 2004; Ardila y Higuera, 2005; Cuervo et al., 2009; Zhao, 2015).

Si bien una buena parte de los mecanismos bioquímicos mencionados previamente han sido involucrados en la resistencia a diferentes patógenos del género *Fusarium* sp. (Makandar et al., 2012; Li y Wang, 2018), a la fecha no se conocen, para varios de los casos, cuáles son las rutas de señalización involucradas en su activación. Entre las razones para tal limitación, se encuentra que no existe una relación directa entre las respuestas y las rutas de señalización; algunas de las respuestas asociadas al SA, también se han encontrado para el ácido jasmónico. En nuestro modelo clavel-*Fod*, en donde se ha determinado que la actividad de PAL, GPX y PFO aumentan en variedades resistentes infectadas con el patógeno (Ardila y Higuera, 2005; Cuervo et al., 2009; Ardila et al., 2011), es poco lo que se conoce sobre las rutas de señalización involucradas que determinan dicha activación. De hecho, a la fecha no se tienen estudios que determinen la acumulación de hormonas asociadas a la resistencia durante la interacción clavel-*Fod*. Es por ello que, en el presente trabajo de investigación, se estableció si la hormona ácido salicílico aumenta sus niveles a nivel de simplasto y si estos cambios, se relacionan estadísticamente con la activación de mecanismos de defensa durante la infección con *Fod*. Para ello, se evaluó la respuesta de algunas enzimas que han sido ampliamente asociadas con resistencia al marchitamiento vascular, como son la PAL, GPX, PFO y PLD, y se correlacionó estadísticamente con el aumento en los niveles de la hormona SA, a nivel de simplasto, de tallos de clavel infectados con el patógeno. Al ser el simplasto vegetal, la fracción citoplasmática en donde se presentan los eventos más tempranos de transducción de señales y acumulación de hormonas en diferentes tipos de estrés biótico, era de esperarse que esta evaluación permitiera obtener los mayores niveles de sensibilidad en la determinación.

Por otro lado, esta evaluación nos permitirá conocer si la activación se presenta en fases tempranas, donde se presume se activan los mecanismos de defensa más importantes relacionados con resistencia (1 a 2 dpi), o si se presentaban de manera tardía, en donde se presume, se activa la fase necrotrófica de este patógeno (7 y 14 dpi) (Ardila et al., 2014; Martínez et al., 2017; Vanegas Cano, 2019). Los resultados presentados se constituyen en el primer estudio que se realiza para el modelo clavel-*Fod* sobre rutas de señalización y acumulación de hormonas de defensa. Por lo tanto, esta información es fundamental para futuros estudios en esta interacción planta-patógeno

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron esquejes de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) con tres semanas de enraizamiento y un tamaño promedio de 15 cm. Se emplearon dos variedades de clavel con diferentes niveles de resistencia al marchitamiento vascular: Golem (Resistente) y Solex (Susceptible). Dichas variedades fueron seleccionadas en estudios previos, teniendo en cuenta el índice de incidencia y severidad a la enfermedad del marchitamiento vascular, los cuales fueron consistentes y reproducibles en las réplicas durante el ensayo *in vivo* (Cuerdo Plata, 2017). Los esquejes fueron suministrados por la empresa floricultura Florval S.A.S. sede QFC (Gachancipá-Sabana de Bogotá).

Se utilizó un aislamiento del hongo *Fod*, obtenido de plantas de clavel de la Sabana de Bogotá que presentaban síntomas típicos del marchitamiento vascular, estas fueron donadas por la empresa América Flor S.A. El aislamiento fúngico se propagó en placas de medio Agar Papa Dextrosa (PDA) a 20 °C en oscuridad hasta la saturación superficial. Antes del ensayo *in vivo*, el patógeno fue revirulentado usando una variedad susceptible a la enfermedad para confirmar la sintomatología de marchitamiento vascular. Para este aislamiento se confirmó el género y la raza con herramientas moleculares, por medio de PCR convencional (PCR, por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction), de acuerdo a las condiciones de amplificación reportadas y con cebadores específicos tanto para género (5'-CAACTC CCAAACCCCTGTGA-3' y 5'-GCGACGATTACCAGTAACGA-3') y raza (5'-CTTGTCTCGATTCTGTCTCACG-3') (Chiocchetti et al., 1999; Abd-elsalam et al., 2003). Los resultados de esta verificación para el aislamiento usado en esta investigación pueden ser consultados en estudios previos del grupo (León Rodríguez, 2012).

Ensayo *in vivo* y mantenimiento del material vegetal

Para el ensayo *in vivo* se usó un diseño experimental completamente aleatorizado con un total de 1260 esquejes

de clavel. El ensayo *in vivo* consistió en cuatro tratamientos: Resistente control, Resistente inoculado, Susceptible control y Susceptible inoculado. La inoculación de dichos esquejes se hizo de acuerdo con lo reportado previamente en nuestro grupo de investigación (Higuera, 2001). Durante los 14 días del ensayo *in vivo*, se realizaron muestreos correspondientes a tiempos tempranos 1, 2 días post-inoculación (dpi), y tiempos tardíos 7 y 14 dpi, de acuerdo a los criterios anteriormente descritos en la introducción. Las determinaciones enzimáticas (GPX, PFO, PAL, PLD) y la acumulación de las hormonas (SA y MeSA), se realizaron por triplicado biológico y duplicado técnico; cada replica biológica estaba constituida por 15 individuos. Los tratamientos se mantuvieron con riego de agua por aspersión, bajo condiciones promedio de temperatura de 20 °C, radiación fotosintéticamente activa de 5 μmol de foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 65,8 %. Los datos se determinaron con una estación meteorológica portable (COLTEIN Ltda, Bogotá, Colombia), para el registro de temperatura (THR 102 sensors, USA) y la radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés, Photosynthetic active Radiation,) (LI 190 B sensors, LI-COR Inc. Lincoln, NE, USA).

Obtención de la fracción enriquecida con simplasto a partir de tallos de clavel (*D. caryophyllus*)

Para la obtención del simplasto fue necesario remover la fracción apoplástica. Para ello, se seccionaron tallos completos de clavel, los cuales fueron sometidos a presión al vacío y a un proceso de infiltración, finalmente el material vegetal fue centrifugado para extraer la fracción apoplástica (Martínez et al., 2017). Del material vegetal enriquecido en simplasto, se maceraron 0,2 g de tallo de clavel con nitrógeno líquido. Se adicionó 1 mL de acetona fría (-20 °C) al tejido vegetal macerado 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 disolvente en cada centrifugación. La extracción se llevó a cabo durante 1 h con el buffer Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 6,5 100 mM a 4 °C. Después de centrifugar a 12 000 g por 30 minutos, los extractos se guardaron a -20 °C para la posterior determinación de las actividades enzimáticas.

Cuantificación de ácido salicílico y salicilato de metilo en simplasto de tallo de clavel inoculados con *Fod*

La extracción de las hormonas objeto de estudio se realizó utilizando metanol al 80 % (Ardila, 2013). Posteriormente, el extracto metanólico se concentró al vacío y, el pellet resultante, se disolvió en una disolución de acetonitrilo/metanol/agua (1:1:12 v/v/v) (Floerl et al., 2012). Los niveles de las fitohormonas se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS), usando una cuantificación basada en las respectivas curvas de calibración de los patrones certificados (i.e., ácido salicílico (SA, por su

sigla en inglés) y salicilato de metilo (MeSA, por su sigla en inglés Sigma-Aldrich). Para ello, después de filtrada la disolución resultante, se inyectaron 10 μL del extracto obtenido a una columna RP-18 (Synergi® (Phenomenex), 250 mm x 4,60 mm, 5 μm) y se eluyeron a un flujo de 1 mL/min. La separación se realizó usando el siguiente programa de separación: 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, 66-70 min B 0 %. Ambos analitos se detectaron a 270 nm; la identificación completa se logró por espectrometría de masas y comparando su tiempo de retención con el de los patrones estándar certificados mencionados. La cantidad de SA y MeSA en las muestras se calculó a partir de la curva de calibración realizada con concentración conocida (área bajo la señal versus concentración). Los valores calculados de los analitos se expresaron en μg del metabolito * mg^{-1} de material vegetal fresco.

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

La cuantificación de la actividad GPX, se realizó de acuerdo a lo reportado previamente por Ardila (2013), midiendo por métodos espectrofotométricos la oxidación de guayacol a tetraguayacol. La mezcla de reacción consistió en 300 μL de buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM pH 5,0, 100 μL de guayacol 40 mM, 100 μL de peróxido de hidrogeno 40 mM y 10 μL del extracto simplástico. La formación de tetraguayacol se siguió a una longitud de 470 nm durante 2 minutos con lecturas espectrofotométricas cada 10 s, empleando un espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV. Los resultados se expresaron como μmol de tetraguayacol producido min^{-1} mg^{-1} proteína.

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 Lopes de Almeida et al. (2019) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en mezclar 50 μL del extracto simplástico y 400 μL 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 *o*-diquinona a una longitud de onda de 475 nm durante 2 minutos, usando el espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV. Los resultados se expresaron como μmol de quinona min^{-1} mg^{-1} proteína.

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

La actividad PAL se determinó con algunas modificaciones para el material vegetal evaluado (González-Mendoza et al., 2018). 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 (espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV). Como blanco de reacción se emplearon las mismas condiciones, pero con el extracto enzimático previamente inactivado por calentamiento (15 min a 92 °C). La actividad de la enzima se expresó como nmol de ácido cinámico min^{-1} mg^{-1} de proteína.

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 et al. (1994), con modificaciones para esta especie vegetal implementadas en el presente trabajo de investigación. La mezcla de reacción consistió en 200 μL de extracto simplástico, 200 μL buffer Tris-HCl 50 mM pH 7, CaCl_2 12 mM y 150 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^{-1} mg^{-1} de proteína.

Cuantificación de proteína

El contenido de proteína total se determinó según el método Bradford linealizado por Zor y Selinger (1996). Se empleó una curva de calibración con una disolución patrón 1mg/1mL de BSA en un rango de 1-15 μg de proteína. Para la reacción se tomaron 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.

RESULTADOS

Cuantificación de salicilato de metilo y ácido salicílico en simplasto de tallo de clavel inoculados con *Fod*

Los resultados obtenidos indicaron que existe un aumento en los niveles de MeSA y SA, en simplasto de tallo de clavel por efecto de la inoculación en la variedad resistente y susceptible. Se encontró que los niveles de MeSA aumentaron a tiempos tempranos y tardíos en la variedad resistente ($p < 0,05$), mientras que, en la variedad susceptible, se presentó un incremento sólo a 2 dpi (Fig. 1a). En cuanto al SA, en tiempos tempranos, al parecer no se presenta su acumulación en el simplasto de este órgano de la planta; sus niveles siempre se encontraron por debajo de los límites

de cuantificación de la técnica empleada. No obstante, a tiempos tardíos, para esta hormona existe una acumulación en la variedad resistente desde los 7 dpi que se mantiene hasta los 14 dpi, mientras que el aumento en la susceptible sólo se presentó a los 14 dpi (Fig. 1b) ($p < 0,05$).

Evaluación de la actividad enzimática en simplasto de tallos de clavel inoculados con *Fod*

Los niveles simplásticos de las enzimas PAL y PFO en tallo se presentan en la Fig. 2. Se evidenció que, por efecto de la inoculación en la variedad resistente, la enzima PAL presentó un aumento significativo a 1 dpi, mientras que, a los 2 y 7 dpi, la inoculación generó una disminución de la actividad en ambas variedades (Fig. 2a). En lo que respecta a la enzima PFO, se presentó un incremento de la actividad a 1 dpi en la

variedad resistente, mientras que, en la variedad susceptible, esta enzima incrementó su actividad a 1 y 7 dpi (Fig. 2b).

Por su parte, se evidenció que, para la GPX se presentaron diferencias significativas a 1 dpi en la variedad resistente, mientras que una disminución en la actividad de GPX se presentó en los días 2 y 7 post-inoculación ($p < 0,05$). En cuanto a la variedad susceptible no se evidenció inducción de esta enzima para ninguno de los tiempos evaluados; de hecho, la actividad disminuye significativamente en el tratamiento inoculado a 1, 2 y 7 dpi, respecto a los tratamientos control (Fig. 3a). 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 incremento a los 2 dpi, menos dramático que el registrado en la variedad susceptible (Fig. 3b). En todos los demás tiempos, no se presentaron cambios significativos para ninguna de las variedades.

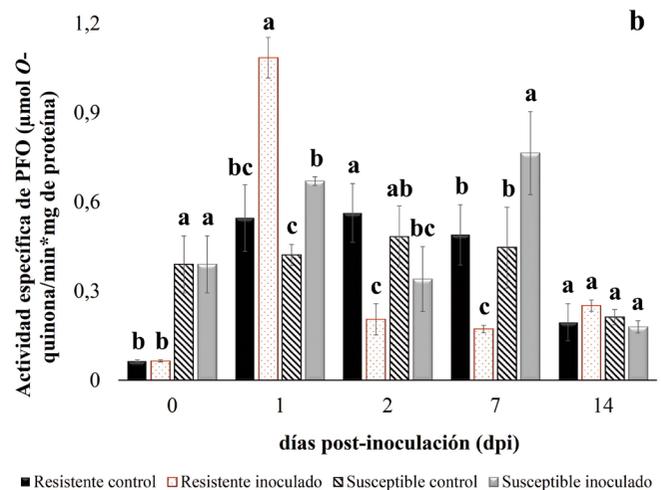
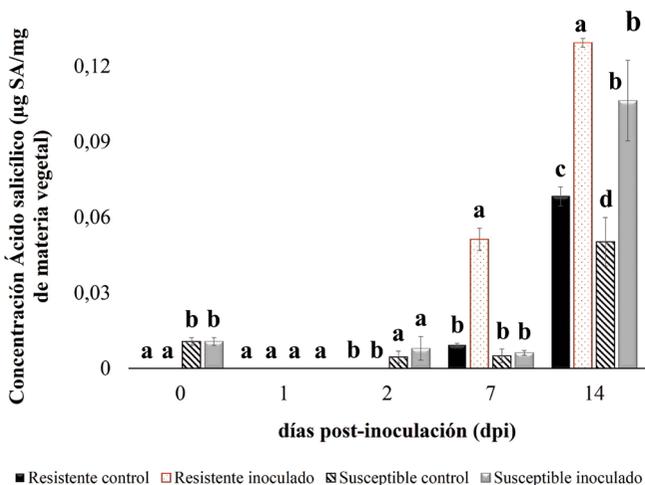
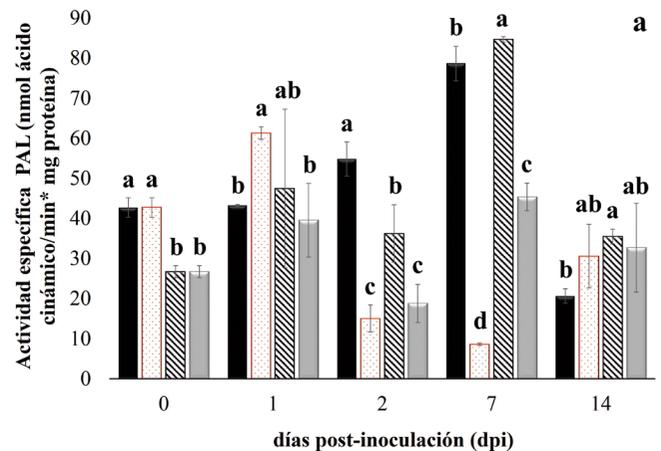
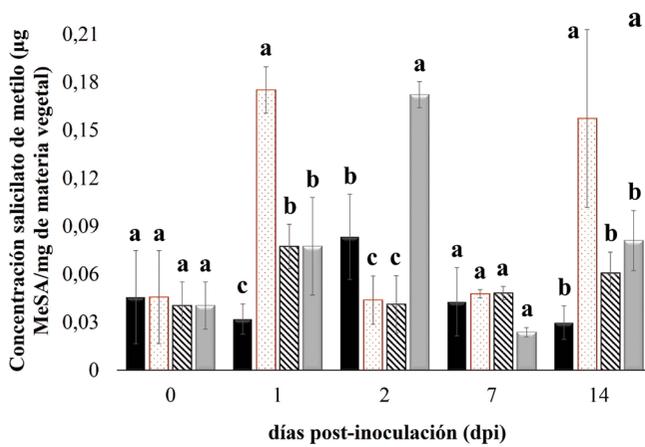


Figura 1. Concentración de salicilato de metilo (a) y ácido salicílico (b) en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción con *Fod* en variedades Resistente y Susceptible. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar de cada promedio (n = 3). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 2. Niveles de actividad enzimática PAL (a) y PFO (b) en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar de cada promedio (n = 3). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En relación a las correlaciones de Pearson entre los parámetros bioquímicos evaluados en la interacción clavel-*Fod*, se tuvieron sólo en cuenta las correlaciones significativamente positivas ($p < 0,05$) que existieran entre los parámetros. De acuerdo con los resultados obtenidos, en la variedad resistente se presentó una relación positiva entre la acumulación de MeSA y el incremento en la actividad de las enzimas GPX y PLD ($p < 0,05$) (Tabla 1), así mismo, se presentaron correlaciones positivas entre algunas de las enzimas objeto de estudio, como es el caso de la PLD con las enzimas PAL (0,937) y GPX (0,937). Por su parte, la variedad susceptible no presentó una relación significativa entre la acumulación de las hormonas SA y MeSA, y la actividad enzimática PAL, PFO, GPX y PLD.

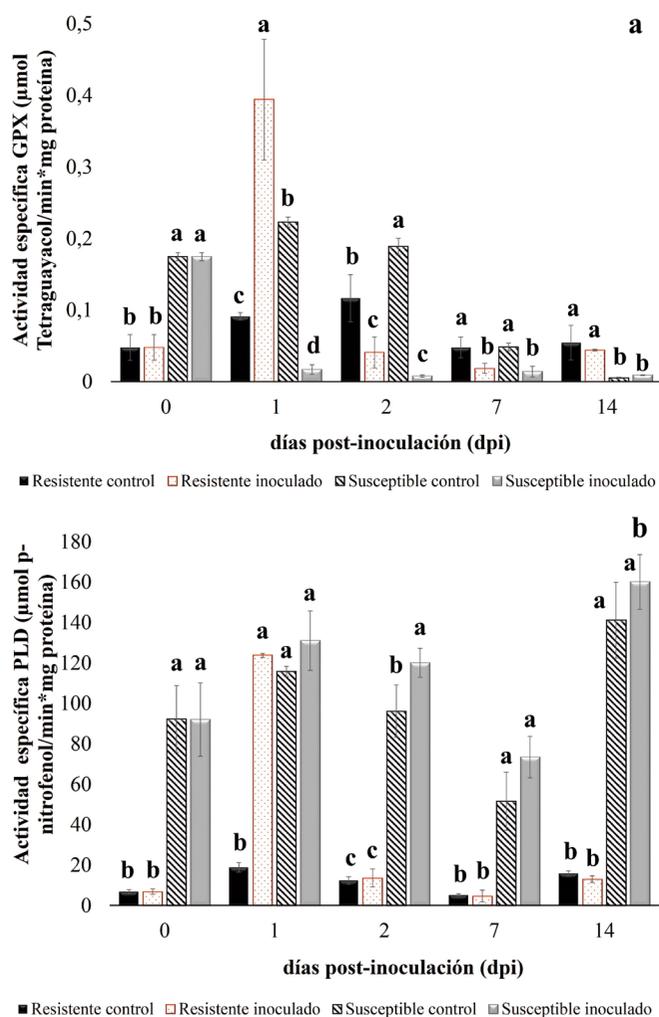


Figura 3. Niveles de actividad enzimática GPX (a) y PLD (b) en simplasto de tallo de clavel, durante la interacción de *Fod* en las variedades Resistente y Susceptible. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar de cada promedio ($n = 3$). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

La ruta de señalización que involucra a la fitohormona ácido salicílico (SA, Salicylic acid), es bien conocida por participar en la regulación de la respuesta de defensa a patógenos y en otros procesos fisiológicos asociados con el estrés vegetal (Makandar et al., 2012; Jing et al., 2017). En el presente estudio se evidenció que el éster metílico del ácido salicílico, conocido como salicilato de metilo (MeSA, Methyl salicylate), se acumula en mayor cantidad y más temprano en tallos de clavel de una variedad resistente a la enfermedad durante la interacción con el patógeno (Fig. 1a). Estas diferencias en la acumulación de este compuesto entre las dos variedades objeto de estudio, evidencian el papel potencial de esta vía de señalización en la resistencia al marchitamiento vascular, tal y como ha sido reportado para otros modelos que involucran patógenos de la especie *F. oxysporum* (Makandar et al., 2010; Di et al., 2016).

Fue evidente que la acumulación de MeSA no se presentó de manera simultánea con la hormona libre; de hecho, la acumulación del éster metílico se presenta de manera más temprana (1 dpi) si se compara con el SA, que aumenta sus niveles a los 7 y 14 dpi. Esta diferencia en los tiempos de acumulación para estas dos hormonas en el tallo, puede estar relacionado a distintos escenarios entre los que se destacan: a) la conversión inmediata del SA generando MeSA por medio de la enzima ácido salicílico metiltransferasa (SA methyl transferase, SAMT), haciendo los niveles del SA indetectables en este órgano, y por tanto elevados los niveles de MeSA a 1 dpi o b) que la acumulación detectada del MeSA sea debida a una respuesta sistémica que involucra la traslocación de esta hormona desde la raíz, primer punto de contacto con el patógeno. Esta última propuesta estaría sustentada en evidencia experimental en otros modelos, que proponen que, algunos procesos asociados con el transporte de hormonas de este tipo, se pueden presentar durante la interacción con patógenos (Dempsey y Klessig 2012; Gao et al., 2015) y a resultados del grupo de investigación que evidencian un aumento significativo de SA y MeSA en raíces infectadas con el patógeno a tiempos tempranos (Resultados no mostrados).

No obstante, con la presente investigación se evidencia que, en cualquiera de estos posibles escenarios planteados, la activación de esta ruta de señalización puede estar asociada con la resistencia a la enfermedad del marchitamiento vascular, lo cual es acorde con lo reportado para este tipo de patógenos del género *Fusarium* sp., a los que se les ha propuesto una posible fase biotrófica inicial y en donde el papel de MeSA y su posible conversión al ácido salicílico ha sido ya documentado (Makandar et al., 2012; Di et al., 2016).

Es evidente que la respuesta simplástica en los tallos de clavel implica la acumulación de diferentes enzimas con actividades metabólicas diversas (Figs. 2 y 3). De acuerdo a los resultados descritos, el aumento diferencial en la actividad PAL a 1 dpi debido a la presencia del

patógeno en el tallo, evidencia la estimulación de la ruta fenilpropanoide; esta es una de las principales rutas de biosíntesis de compuestos fenólicos a nivel de simplasto, los cuales pueden tener un papel central en resistencia, debido a su actividad antimicrobiana y a su papel como precursores para el reforzamiento de la pared celular (Ardila et al., 2011; Cho y Lee 2015).

Considerando que la biosíntesis de estos compuestos Fenólicos conlleva a la acumulación importante de estos metabolitos, era de esperarse que otras enzimas, como las PFO, aumentarán sus niveles como parte de la respuesta al patógeno. El papel de esta enzima a nivel de simplasto puede relacionarse con la diversificación estructural de compuestos fenólicos, lo cual ha sido ampliamente documentado para estas enzimas ubicadas principalmente en formas latentes a nivel del cloroplasto (Fuerst et al., 2014; Boeckx et al., 2015). El aumento de la PFO se ha asociado a la activación transcripcional de los genes codificantes para esta enzima o por la liberación de formas latentes (Taranto et al., 2017), con el fin de estimular la oxidación de los compuestos fenólicos que pueden convertirse en estructuras lignificadas una vez son transportadas al apoplasto (Raj Niranjan et al., 2006; Fuerst et al., 2014; Taranto et al., 2017). Este tipo de respuestas de defensa ha sido reportado previamente en clavel, en donde la lignificación de la pared celular y la formación de tilosas, tiene un rol importante para evitar la movilidad de *Fod* a distintas partes de la planta a través del xilema (Baayen et al., 1996; Higuera y Ebrahim-Nesbat, 1999).

Otra de las enzimas que tradicionalmente ha sido asociada a las respuestas bioquímicas de las plantas, son las peroxidases de clase III, ubicadas principalmente a nivel apoplástico (Daudi et al., 2012; Sabater-jara et al., 2014). Sin embargo, la presencia de peroxidases a nivel citosólico ha sido ampliamente documentado en el reino vegetal, teniendo un papel central en la regulación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en organelos como los peroxisomas y vacuolas (Foyer 2018; Huang et al., 2019; Choudhary et al., 2020). Al parecer, en el caso del clavel, la acumulación de esta enzima a nivel del simplasto en el primer día post-inoculación (Fig. 3a), debe tener un papel central en la regulación de especies oxidantes, como el peróxido de hidrógeno. Este compuesto se acumula de manera importante en tejidos infectados por este patógeno (Cuervo et al., 2009; Ardila et al., 2014), siendo necesario la activación de mecanismos citoplasmáticos de regulación antioxidante. Los resultados son acordes con diferentes estudios en apoplasto y en tejido completo en tallo de clavel, en donde se ha propuesto que la inducción diferencial de la actividad GPX busca contrarrestar la acumulación significativa de H_2O_2 , que puede favorecer la fase necrotrófica del patógeno *Fod*. Estos resultados también están de acuerdo con la inducción temprana de GPX durante la interacción con patógenos del género *Fusarium* sp., en genotipos resistentes de otras especies (Madadkhan et al., 2012; Thakker et al., 2013).

La respuesta simplástica temprana en la variedad resistente descrita en el presente estudio, esta corroborada con la inducción diferencial de la enzima PLD (1 dpi), la cual se encuentra exclusivamente a nivel citosólico y está involucrada con la generación del ácido fosfatídico (PA, Phosphatidic acid), cuya molécula señal es central en la activación de respuestas a estrés biótico o abiótico (Kalachova et al., 2012; Singh et al., 2012; Li et al., 2017). Se ha demostrado que la PLD y la formación de PA son señales requeridas para la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Yamaguchi et al., 2004; Singh et al., 2012) esto debido a que puede interactuar directamente con homólogos de oxidases (RBOH) en la membrana plasmática y regular la producción de H_2O_2 (Zhao, 2015; Li y Wang, 2018). Al considerar la intensidad de la respuesta de PLD para la variedad susceptible, la cual fue de menor magnitud y más tardía, es de considerar que esta respuesta bioquímica es mucho más rápida e intensa en el genotipo resistente. De acuerdo a los análisis de correlación realizados (Tabla 1), es posible que la actividad PLD puede estar involucrada en la activación temprana de enzimas como GPX y PFO, las cuales como se discutió anteriormente, están relacionados a procesos de eliminación de EROS y fortalecimiento de la pared celular; esto estaría de acuerdo con la ya descrita respuesta coordinada en contra del patógeno determinada por la resistencia multigénica del hospedero (Ben-Yepphet et al., 1992; Soto-sedano et al., 2012).

En general, la inducción diferencial de las enzimas objeto de estudio, a excepción de la PLD, había sido previamente reportada en nuestro modelo planta-patógeno, y es probable que estén relacionada con la resistencia del clavel a la enfermedad (Ardila y Higuera, 2005; Ardila et al., 2011; Ardila et al., 2014). Así mismo, un aumento en la actividad de estas enzimas ha sido previamente asociado a la activación de la vía de señalización del ácido salicílico en otros modelos vegetales (Taşgin et al., 2006; Kalachova et al., 2012; Wani et al., 2016). Sin embargo, la comparación simultánea en el mismo tejido de los niveles de hormonas relacionadas y de estas enzimas determinarán por primera vez las correlaciones estadísticas entre los fenómenos bioquímicos objeto de estudio. Así mismo considerando estos resultados y la información reportada para otros modelos en la presente investigación se puedan proponer algunas relaciones preliminares de causa y efecto entre ellas. Esta alternativa ha sido usada para tal fin en diferentes estudios bioquímicos relacionados (Taşgin et al., 2006; Makandar et al., 2012; Ardila 2013). Con esta aproximación se encontró que, un aumento en la concentración de MeSA en tallo, puede estar relacionada con un incremento en los niveles de actividad enzimática PAL, GPX y PLD (Tabla 1). Considerando que estas relaciones solo se presentan para el genotipo resistente, es probable que la activación de dichas rutas esté asociada directamente con la resistencia al patógeno *Fod* (Fig. 2 y 3).

Se evidenció que, en el caso de la variedad susceptible, existe una respuesta bioquímica de menor intensidad y más tardía que la encontrada en el genotipo resistente; solo presentó actividad de la enzima PFO al 1 y 7 dpi, y la PLD a 7 dpi (inducción apenas significativa), sin estar correlacionada con la acumulación de MeSA (Tabla 1). Sin embargo, la acumulación de algunas de estas enzimas, sobre todo a tiempos tardíos, podría estar asociada a la activación de la fase necrotrófica del patógeno, que generaría descompartimentación de los organelos y aumento de la actividad y/o secreción de enzimas por parte del patógeno (Kubicek et al., 2014; Lyu et al., 2015; Chowdhury et al., 2017). La propuesta que sea parte de los mecanismos de defensa tardíos puede estar sustentada en el hecho que la actividad de PLD estuvo relacionada estadísticamente con el incremento en la concentración de MeSA (Fig. 1a). En general la disminución de la actividad para algunos de los tiempos, se ajusta al conocido comportamiento modular de estas respuestas, que se activan con el fin de mantener la eficiencia energética de la planta evitando sacrificar crecimiento y sus funciones normales.

Tabla 1. Correlaciones de Pearson entre los parámetros bioquímicos evaluados en la interacción clavel-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. N variable definido por la matriz de datos* valores significativos con un $p < 0,05$

Parámetros	Variedad Resistente					
	PAL	PFO	GPX	PLD	SA	MeSA
PAL	1,000					
PFO	0,649*	1,000				
GPX	0,430	0,7455*	1,000			
PLD	0,312	0,6655*	0,937*	1,000		
SA	-0,366	-0,398	-0,27	-0,22	1,000	
MeSA	0,2488	0,3826	0,629*	0,641*	0,355	1,000

Parámetros	Variedad Susceptible					
	PAL	PFO	GPX	PLD	SA	MeSA
PAL	1,000					
PFO	0,233	1,000				
GPX	-0,030	0,012	1,000			
PLD	-0,460	-0,430	-0,257	1,000		
SA	-0,180	-0,590	-0,392	0,657	1,000	
MeSA	-0,330	-0,300	-0,311	0,415	0,121	1,000

PAL: Phenylalanine ammonio lyase; **PFO:** Polifenoloxidasas; **GPX:** Guaiacol peroxidasa; **PLD:** Fosfolipasa D; **SA:** Salicylic acid; **MeSA:** Methyl salicilate.

La evidencia experimental presentada en esta investigación es fundamental para profundizar en la regulación y posible potencialización de los fenómenos bioquímicos relacionados con resistencia. Se hace necesarios estudios

adicionales que permitan confirmar las relaciones causa efecto preliminarmente propuestas en esta investigación, con el uso de mutantes de clavel afectados en las rutas de señalización del ácido salicílico.

CONCLUSIONES

De manera general, en este estudio se presentan mecanismos de defensa asociados a la acumulación de hormonas y enzimas a nivel de simplasto, y que posiblemente están involucrados con la resistencia de clavel ante el marchitamiento vascular causado por *Fod*. La evidencia acá presentada permite correlacionar estadísticamente la acumulación de hormonas y enzimas durante la interacción, indicando posibles relaciones causa y efecto basadas en lo reportado para otras especies vegetales. Sin embargo, es importante mencionar que se deben realizar estudios adicionales donde se comprueben las propuestas realizadas, así como la participación de otras posibles hormonas y su relación con otras respuestas asociadas de defensa. Un conocimiento básico y detallado de estos procesos bioquímicos es el sustento para la generación de nuevas herramientas de control de la enfermedad causada por este patógeno en el clavel.

AGRADECIMIENTOS

A la DIEB de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto con código No 41753 y Minciencias con los proyectos 110165842786 y 110180864094. A la empresa Florval SAS por el suministro del material vegetal.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Abd-elsalam, K. A., Aly, I. N., Abdel-satar, M. A., Khalil, M. S., Verreet, J. A., y Albrechts, C. (2003). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*, 2(4), 82–85.
- 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 de doctorado, Universidad Nacional de Colombia]. <http://bdigital.unal.edu.co/57986/>.
- Ardila, H. D., Martínez, S. T., y Higuera, B. L. (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., Torres, A., Martínez, S., y Higuera, B. (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.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.01.003>
- Ardila, H., y Higuera, B. L. (2005). Inducción diferencial de polifenoloxidasas y beta-1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biológica Colombiana*, 10(2), 61–74.
- Asocolflores: Dirección Económica y Logística. (2015). *Boletín Estadístico*.
- Asocolflores. (2018). Boletín estadístico. In *Asociación Colombiana de exportaciones de Flores*.
- Baayen, R. P., Ouellette, G. B., y Rioux, D. (1996). Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Cytology and Histology*, 86(10), 1018–1031.
- Basit, A., Hemlata, W., Abdul, C., Wani, H., Singh, S., y Upadhyay, N. (2016). Salicylic acid to decrease plant stress. *Environmental Chemistry Letters*, 27(9), 1–23.
<https://doi.org/10.1007/s10311-016-0584-0>
- Ben-Yephet, Y., Reuven, M., y Shtienberg, D. (1992). Complete Resistance by Carnation Cultivars to *Fusarium Wilt* Induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Race 2. *Plant Disease*, 81(7), 777–780.
- Berrocal-lobo, M., y Molina, A. (2007). Arabidopsis defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science*, 13(3), 145–150.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.12.004>
- Boeckx, T., Winters, A. L., Webb, K. J., y Kingston-smith, A. H. (2015). Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3571–3579.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv141>
- Castellanos, O. F., Fonseca Rodríguez, S. L., y Buriticá Ospina, S. (2010). *Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de flores y follajes en Colombia con énfasis en clavel* (Giro Ltda (ed.)).
<https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/34390>
- Cha, J., Lee, J., Koh, E.-H., y Chol, M.-U. (1994). Enzymatic Hydrolysis of p-Nitrophenyl phosphoryl Derivatives by Phospholipase D. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 15(11), 1001–1003.
- Chiocchetti, A., Bernardo, I., Daboussi, M., Garibaldi, A., Gullino, M. L., Langin, T., y Migheli, Q. (1999). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Carnation Tissue by PCR Amplification of Transposon Insertions. *Phytopathology*, 89(12), 1169–1175.
- Cho, M. y Lee, S. (2015). Phenolic Phytoalexins in Rice: Biological Functions and Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 29120–29133.
<https://doi.org/10.3390/ijms161226152>
- Choudhary, A., Kumar, A., y Kaur, N. (2020). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Diversity*, 42(1), 33–43.
<https://doi.org/10.1016/j.pld.2019.10.002>
- Chowdhury, S., Basu, A., y Kundu, S. (2017). Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. *Scientific Reports*, 7(17251), 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17248-7>
- Cuervo, D. C., Martínez, S. T., Ardila, H. D., y Higuera, B. L. (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.
- Cuervo Plata, 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 de maestría, Universidad Nacional].
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J. A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F. M., y Paul Bolwell, G. (2012). The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell*, 24(1), 275–287.
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.093039>
- Dempsey, D. A. y Klessig, D. F. (2012). SOS—too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, 17(9), 538–545.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.011>
- Di, X., Takken, F. L. W., y Tintor, N. (2016). How Phytohormones Shape Interactions between Plants and the Soil-Borne Fungus *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 7(170), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00170>
- Dinolfo, M. I., Castañares, E., y Stenglein, S. A. (2016). *Fusarium – Plant Interaction : State of the Art – a Review*. *Plant Protect. Sci.*, 52(4), 1–10.
<https://doi.org/10.17221/182/2015-PPS>
- Floerl, S., Majcherczyk, A., Possienke, M., Feussner, K., Tappe, H., y Polle, A. (2012). *Verticillium longisporum* Infection Affects the Leaf Apoplastic Proteome, Metabolome, and Cell Wall Properties in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 7(2), e31435.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031435>
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 154, 134–142.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
- Fuerst, E. P., Okubara, P. A., Anderson, J. V., y Morris, C. F. (2014). Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Frontiers in Plant Science*, 5(12), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00689>
- Gao, Q. M., Zhu, S., Kachroo, P., y Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6(4), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- González-Mendoza, D., Troncoso-Rojas, R., Gonzales-Soto, T., Grimaldo-Juarez, O., Ceceña-Duran, C., Duran-Hernandez, D., y Gutierrez-Miceli, F. (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.
- 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 doctoral, Universidad Nacional de Colombia].
- Higuera, B. L. y Ebrahim-Nesbat, F. (1999). Study of vascular root responses as defense mechanisms in carnation resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* by transmission electron microscopy. *Acta Hort.*, 482, 101–106.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., y Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10(6), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Jing, J. B., Cai, B., y Zhou, J. (2017). Salicylic acid. In J. Li, C. Li, y S. M. Smith (Eds.), *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (pp. 273–289). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00008-6>
- Kalachova, T. A., Iakovenko, O. M., Kretinin, S. V., y Kravets, V. S. (2012). Effects of Salicylic and Jasmonic Acid on Phospholipase D Activity and the Level of Active Oxygen Species in Soybean Seedlings. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 6(3), 243–248. <https://doi.org/10.1134/S1990747812030099>
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., y Glass, N. L. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- León Rodríguez, K. (2012). *Identificación, purificación parcial y caracterización bioquímica de tres proteasas secretadas por Fusarium oxysporum f. sp. dianthi raza 2 Invitro*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].
- Li, J. y Wang, X. (2018). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity. *Plant Science*, 279, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.021>
- 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., y Zhou, Z. (2017). Responses of Phospholipase D and Antioxidant System to Mechanical Wounding in Postharvest Banana Fruits. *Journal of Food Quality*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/8347306>
- Lopes de Almeida, S., Dos Santos Morais, M. A., Tavares de Alubquerque, J. R., Simoes, A., y Silva Fonseca, K. (2019). Polyphenol oxidase and peroxidase enzyme assays in sweet potato cultivars harvested at different times. *Revista Caatinga*, 32(2), 537–542. <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n226rc>
- Lyu, X., Shen, C., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., y Cheng, J. (2015). Comparative genomic and transcriptional analyses of the carbohydrate-active enzymes and secretomes of phytopathogenic fungi reveal their significant roles during infection and development. *Scientific Reports*, 5(11), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep15565>
- Madadkhah, E., Lotfi, M., Nabipour, A., Rahmanpour, S., Banihashemi, Z., y Shoorooei, M. (2012). Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1. *Scientia Horticulturae*, 135, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.020>
- Makandar, R., Nalam, V., Chaturvedi, R., Jeannotte, R., Sparks, A., y Shah, J. (2010). Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis interaction with *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7), 861–870. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0861>
- Makandar, R., Nalam, V. J., Lee, H., Trick, H. N., Dong, Y., y Shah, J. (2012). Salicylic acid regulates basal resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(3), 431–439. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0232>
- Manrique, L. N., Zuleta, D., Agudelo, A. F., Burgos, S. A., Jerez, D., Mejia, J. D., Pereira, M. P., y Palacio, V. (2014). Floricultura colombiana en contexto: experiencias y oportunidades en Asia pacífico. *Revista Mundo Asia Pacífico*, 3(5), 52–79.
- Martínez, A. P., Martínez, S. T., y Ardila, H. D. (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. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.62958>
- Qi, P. F., Johnston, A., Balcerzak, M., Rocheleau, H., Harris, L. J., Long, X. Y., Wei, Y. M., Zheng, Y. L., y Ouellet, T. (2012). Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of fusarium head blight in wheat. *Fungal Biology*, 116(3), 413–426. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.01.001>
- Raj Niranjana, S., Sarosh, B. R., y Shetty, H. S. (2006). Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. *Functional Plant Biology*, 33, 563–571.
- Sabater-jara, A. B., Almagro, L., y Pedreño, M. A. (2014). Plant Physiology and Biochemistry Induction of extracellular defense-related proteins in suspension cultured-cells of *Daucus carota* elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 77, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.006>
- Singh, A., Pandey, A., y Pandey, G. K. (2012). Phospholipase D in Stress Activated Lipid Signaling in Plants. *Plant Stress*, 6(1), 10–17.
- Soto-sedano, J. C., Clavijo-ortiz, M. J., y Filgueira-Duarte, J. J. (2012). Phenotypic evaluation of the resistance in F1 carnation populations to vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana*, 30(2), 172–178.

- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S., y Montemurro, C. (2017). Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(377), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms18020377>
- Taşgin, E., Atici, Ö., Nalbantoğlu, B., y Popova, L. P. (2006). Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, 67(7), 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.022>
- Thakker, J. N., Patel, S., y Dhandhukia, P. C. (2012). Induction of Defense-Related Enzymes in Banana Plants: Effect of Live and Dead Pathogenic Strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2013/601303>
- Vanegas Cano, L. J. (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*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional].
- Yamaguchi, T., Tanabe, S., Minami, E., y Shibuya, N. (2004). Activation of Phospholipase D Induced by Hydrogen Peroxide in Suspension-cultured Rice Cells. *Plant Cell Physiol*, 45(9), 1261–1270.
- 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru540>
- Zor, T. y Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its sensitivity. *Analytical Biochemistry*, 236, 302–308.