

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*

DIFFERENTIAL INDUCTION OF PEROXIDASE ENZYME AND ITS RELATIONSHIP WITH LIGNIFICATION IN CARNATION DEFENSE (*Dianthus caryophyllus* L.) MECHANISM AGAINST *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*

INDUCAO DIFERENCIAL DA ENZIMA PEROXIDASE E A SUA RELACAO COM A LENHIFICACAO NOS MECANISMOS DE DEFESA DE CRAVO (*Dianthus caryophyllus* L.) DURANTE A SUA INTERACCAO COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*

Diana C. Cuervo¹, Sixta T. Martínez^{1, 2}, Harold D. Ardila¹, Blanca L. Higuera¹

Recibido: 14/07/09 – Aceptado: 15/12/09

RESUMEN

Se evaluó la actividad enzimática peroxidasa (POD) y el contenido de lignina en tallos de esquejes de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) inoculados con el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod) raza 2, con el fin de determinar su posible participación en la respuesta de defensa y en la resistencia de la planta al marchitamiento vascular. Inicialmente se seleccionaron las condiciones para la extracción y determinación de la actividad enzimática. Se encontró que el tratamiento con buffer citrato 100 mM pH 5,0 con 3% de PVPP presentó los mejores resultados de actividad peroxidasa para la extracción de la

enzima a partir de tallos de clavel. Se determinaron las mejores condiciones para la medida de actividad enzimática POD a través de la reacción de oxidación de *o*-dianisidina con H₂O₂ seguida a 460 nm. Una mezcla de reacción con una concentración 0,6 mM de *o*-dianisidina y 2,0 mM de H₂O₂ en buffer citrato 100 mM a pH 5,5 y 45°C, presentó los mejores resultados para la cuantificación de la enzima. Una vez establecidas las condiciones, esquejes de clavel de una variedad tolerante y una susceptible al marchitamiento vascular fueron inoculados con el patógeno y se evaluaron los niveles de actividad de POD y de acumulación de lig-

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá, Colombia.

² smartinezp@unal.edu.co

nina a diferentes tiempos pos-inoculación. La variedad tolerante (Bárbara), presentó inducción de dicha enzima a las 8 y 48 h pos-inoculación y aumento en el contenido de lignina a 48 y 72 h. A su vez, en la variedad susceptible (Delphi) no se encontraron cambios significativos en los niveles de POD ni en el contenido de lignina. Se estableció, por tanto, que la inducción de la actividad POD está asociada a la lignificación, que a nivel del tallo, hace parte de los mecanismos asociados a defensa en el modelo clavel-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Palabras clave: clavel, *Fusarium oxysporum*, defensa vegetal, peroxidasa, lignina.

ABSTRACT

Peroxidase (POD) enzymatic activity and lignin content in carnation stems (*Dianthus cayophyllus* L.) infected with the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* race 2 were evaluated with the purpose of determining the possible enzyme participation in the plant defense response and in the resistance to the vascular wilting. Initially, the conditions for extraction and determination of enzymatic activity were selected. It was found that when citrate buffer 100 mM pH 5.0 with 3% PVPP was employed, the results of POD activity in enzyme extract obtained from carnation stems were higher. Best conditions were set for POD activity measure through oxidation reaction of *o*-dianisidine and H₂O₂ at 460 nm. A reaction mixture with a concentration of *o*-dianisidine 0,6mM and H₂O₂ 2.0 mM in citrate buffer 100 mM pH 5.5 at 45 °C displayed the best results for enzyme quantification. Once conditions were established, tole-

rant and susceptible vascular wilting carnation cuttings were inoculated with the pathogen. In each treatment at stem level, different postinoculation times were evaluated for enzyme activity levels and lignin accumulation. Tolerant variety (Barbara) showed a POD induction at 8 and 48 h pos-inoculation and an increase in lignin content at 48 and 72 h. At the same time, in susceptible variety (Delphi) there were no significant changes in POD levels or lignin contents. Therefore, it was established that POD activity induction is associated to lignification which, at stem level, is part of the mechanisms associated to defense in carnation (*Dianthus cayophyllus* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Key words: carnation, *Fusarium oxysporum*, plant defense, peroxidase, lignin.

RESUMO

Foram avaliadas a actividade enzimática peroxidasa (POD) e o conteúdo de lignina em talos de estacas de cravo (*Dianthus cayophyllus* L.) inoculados com o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raça 2, com o propósito de determinar a sua possível participação na resposta de defesa e à resistência da planta ao murchamento vascular. Inicialmente foram seleccionadas as condiciones para a extracção e determinação da actividade enzimática. Foi encontrado que o tratamento com buffer citrato 100 mM pH 5,0 com 3% de PVPP, apresentou os melhores resultados de actividade peroxidasa na extracção da enzima a partir de talos de cravo. Foram determinadas as melhores condições para medir a actividade enzimática POD a través da reacção de oxidação de *o*-dianisidi-

na com H₂O₂ e com seguimento a 460 nm. Uma mistura de reacção com uma concentração 0,6 mM de *o*-dianisidina e 2,0 mM de H₂O₂ em buffer citrato 100 mM a pH 5,5 e 45 °C, apresentou os melhores resultados para a quantificação da enzima. Uma vez estabelecidas as condições, estacas de cravo de uma variedade tolerante e uma susceptível ao murchamento vascular foram inoculadas com o fungo patogénico, e se avaliaram a diferentes tempos pos-inoculação os níveis de actividade desta enzima e de acumulação de lignina. A variedade tolerante (Bárbara), apresentou uma indução de POD às 8 e 48 h pos-inoculação e um aumento no conteúdo de lignina às 48 y 72 h. Por outro lado, na variedade susceptível (Delphi) não se encontraram mudanças significativas nos níveis de POD nem no conteúdo de lignina. Se estabeleceu, por tanto, que a indução da actividade POD está associada à lignificação que a nível de talo faz parte dos mecanismos associados à defesa no modelo cravo-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raça 2.

Palavras-chave: cravo, *Fusarium oxysporum*, defesa vegetal, peroxidasa.

INTRODUCCIÓN

El marchitamiento vascular causado por el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) es la enfermedad de mayor impacto para el cultivo del clavel en el mundo. Colombia es el segundo productor mundial de esta flor, y la presencia de la enfermedad genera pérdidas a nivel económico y una disminución significativa en su producción. Para el control del marchitamiento vascular, el sector floricultor ha implementado un plan integrado de manejo basado principalmente en evi-

tar la entrada y diseminación del patógeno en los cultivos (1). Sin embargo, dicho plan, además de aumentar los costos en la producción, genera apenas un control aceptable de la enfermedad, siendo frecuente la aparición de la misma en los cultivos. El desarrollo de nuevas alternativas de control más eficaces, compatibles con los sistemas de producción actuales e inocuos para el medio ambiente, se convierten en una necesidad para el fortalecimiento del cultivo de esta flor en nuestro país. Alternativas de control como el cultivo de variedades tolerantes, el control biológico y el uso de elicitores, han llamado la atención de la comunidad científica en este aspecto. Para el desarrollo de dichas alternativas se requiere un conocimiento detallado de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la interacción planta-patógeno, mecanismos que finalmente van a determinar la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. Se ha encontrado que la infección activa un proceso de defensa multicomponente y compartimentalizado, que tiene como objetivo localizar el patógeno en los tejidos vasculares xilemáticos infectados (2-4). En este proceso, inicialmente se presenta la formación de geles, compuestos principalmente de polisacáridos y compuestos fenólicos en los vasos, ambos exudados de las células parenquimáticas adyacentes al punto de infección. Una vez los fenólicos se fusionan a la pared y a las gomas, estos pueden estar sujetos a reacciones de polimerización y oxidación, con el fin de formar una barrera durable en la interfase de la infección y los tejidos sanos. Este proceso conocido como lignificación, es central en la respuesta de defensa del clavel a este patógeno (5, 6). La enzima peroxidasa desem-

peña un papel determinante en diversos procesos fisiológicos necesarios para el funcionamiento de la plantas, incluida la lignificación (7-9). La participación de esta enzima en los mecanismos de defensa ha sido ampliamente documentada para diversas especies (8-10), y a pesar de que un incremento en la actividad de esta enzima es frecuente en las condiciones de estrés biótico, para muchos modelos planta-patógeno, incluido el estudiado en esta investigación, dicho aumento en la actividad no se ha relacionado simultáneamente con otros procesos de defensa como la lignificación. La evaluación simultánea de los fenómenos bioquímicos que se presentan durante la interacción *in vivo* entre la planta y el patógeno son un primer paso en la búsqueda de aquellos procesos que al regular la respuesta de defensa vegetal, pueden ser finalmente determinantes en la resistencia a la enfermedad (10). Con el fin de aportar en el conocimiento de estos fenómenos bioquímicos relacionados con defensa en la interacción clavel-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, en el presente trabajo se evaluaron de manera simultánea los niveles de la enzima peroxidasa y los niveles de lignina, en variedades con diferentes niveles de tolerancia a la enfermedad durante el proceso mismo de la interacción entre estos dos organismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de la enzima POD

La primera etapa del presente estudio consistió en la selección de las condiciones para realizar la extracción de la enzima peroxidasa a partir de tallos de clavel. Con tal fin se realizaron ensayos de extracción usando metodologías previamente reportadas para otras enzimas presentes en esta matriz vegetal (11) (Tabla 1). Se pesaron aproximadamente 0,4 g de tallos y se maceraron vigorosamente con nitrógeno líquido. Se adicionó la solución extractora por evaluar y se agitó durante 1 h a 4 °C. Se centrifugó a 12000xg por 30 minutos y el sobrenadante fue separado del precipitado para la determinación de actividad y cuantificación de proteína. El mismo procedimiento se siguió con cada uno de los sistemas de extracción denominados (E1, E2, E3 y E4), usando diferentes aditivos como la PVPP (Polivinil polipirrolidona). La selección se realizó bajo un diseño experimental completamente aleatorio con 4 tratamientos, realizando triplicado de extracción y duplicado de cuantificación de la actividad.

Determinación de actividad enzimática

La medida de la actividad peroxidasa se hizo a través del seguimiento espectrofotométrico a 460 nm cada 10 s por 1 min, de los productos de la reacción de oxidación

Tabla 1. Soluciones reguladoras usadas para la extracción de la enzima peroxidasa

E1	E2	E3	E4
Solución NaH ₂ PO ₄ ⁻ Na ₂ HPO ₄ 100 mM pH 6,5	Solución NaH ₂ PO ₄ ⁻ Na ₂ HPO ₄ 100 mM pH 6,5 + 3% PVPP	Solución ácido cítrico-citrato de sodio 100 mM pH 5,0	Solución ácido cítrico-citrato de sodio 100 mM pH 5,0 + 3% PVPP

de la *o*-dianisidina en presencia de H₂O₂ y del extracto enzimático (4). La velocidad de la reacción se calculó a partir de la pendiente de la zona lineal de la gráfica A460nm vs. tiempo y la actividad específica se definió como el cambio de la absorbancia a 460 nm por minuto por mg de proteína ($\Delta\text{Abs}_{460\text{nm}}/\text{min} \cdot \text{mg proteína}$).

Determinación de los mejores parámetros de actividad enzimática

Se empleó un diseño experimental escalonado con el fin de seleccionar las mejores condiciones para la medida de actividad POD. En primer lugar, se evaluó el pH de la reacción en un intervalo de 3 a 10 utilizando las soluciones reguladoras descritas a continuación para cada uno de los pH evaluados: ácido acético: acetato de sodio 100 mM para pH 3 y 4; ácido cítrico-citrato de sodio 100 mM para pH 4,5, 5 y 5,5; fosfato ácido de sodio-fosfato diácido de sodio 100 mM para pH 6, 6,5, 7, 7,5, 8; y finalmente borato de sodio-ácido bórico 100 mM para pH 9 y 10. El efecto de la temperatura fue analizado en un rango de 5 a 60 °C, y se evaluó la concentración del sustrato *o*-dianisidina en el intervalo de 0,1 a 1,5mM y de H₂O₂ de 0,5 a 15 mM.

Cuantificación de proteína

Se determinó según el método de Bradford modificado por Zor y Selinger, 1996 (12), empleando como patrón albúmina de suero bovino.

Material biológico

Para realizar el ensayo *in vivo* se utilizaron esquejes de clavel con 4 semanas de enraizamiento de las variedades Delphi (susceptible) y Bárbara (tolerante). Se

utilizó un aislamiento del patógeno obtenido de plantas susceptibles con síntomas evidentes de marchitamiento, el cual se mantuvo en el medio comercial PDA (Papa-Dextrosa-Agar) con repiques cada 20 días. El inóculo se preparó por transferencia del medio sólido a medio líquido Czapeck Dox-Broth por 10 días a 25 °C con agitación de 90 rpm. El micelio se filtró en gasa estéril y se preparó una suspensión de $1,5 \times 10^6$ conidias/mL (por conteo en el hemocitómetro). Esta suspensión fue utilizada para la inoculación de los esquejes. Todo el material biológico fue suministrado por la empresa Flormérica.

Ensayo *in vivo* para determinar la inducción de POD

Para evaluar la dinámica de la actividad POD en respuesta a la infección con el patógeno se llevó a cabo un ensayo *in vivo* con un diseño experimental de bloques al azar para 4 tratamientos: variedad susceptible control, variedad susceptible inoculada, variedad tolerante control y variedad tolerante inoculada. Para ello, esquejes de clavel de cada una de las variedades (Delphi y Bárbara) fueron inoculados por inmersión de sus raíces durante 30 s en la suspensión de conidias ($1,5 \times 10^6$ conidias/mL) (13). Los esquejes fueron sembrados en recipientes con sustrato estéril (tierra + cascarilla de arroz) que contenían 300 mL de solución nutritiva. Para asegurar la infección de las plantas con el patógeno, la solución nutritiva tenía una concentración de 1×10^3 conidias/mL (11). Esta solución fue utilizada únicamente para la siembra de los esquejes sometidos a inoculación. Se prepararon de igual modo los respectivos controles, los cuales se sumergieron en agua

estéril y se sembraron en un sustrato con solución nutritiva. Los esquejes inoculados y los controles se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales. El muestro se realizó a 0, 8, 24, 48 y 72 h pos-inoculación por triplicado para cada uno de los tratamientos y con duplicado en cada uno de los ensayos de cuantificación de la actividad.

Determinación del contenido de lignina

En los esquejes provenientes del ensayo *in vivo* se determinó el contenido de lignina aplicando el método del ácido tioglicólico (14), con algunas modificaciones. Los precipitados obtenidos luego de la extracción de la peroxidasa fueron resuspendidos en etanol (1:2) y centrifugados a 5000xg. Los precipitados se secaron a 60 °C durante 24 h. Se pesaron aproximadamente 10 mg de material vegetal seco y se resuspendió en 1 mL de HCl 2N y 100 μ L de ácido tioglicólico. La mezcla fue calentada durante 4 h a 92 °C con agitación constante. Una vez enfriada la mezcla, se centrifugó a 16000xg por 15 minutos. Los precipitados se lavaron con agua desionizada, se les adicionó 1 mL de NaOH 0,5N y se dejaron en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. El residuo insoluble fue removido por centrifugación y el tioglicolato de lignina se precipitó por la adición de 1 mL de HCl concentrado (3 h, 4 °C). Después de centrifugación a 16000xg por 20 min, el residuo fue resuspendido en 1,5 mL de NaOH 0,5N. Se hizo la lectura a 280 nm y el contenido de lignina fue expresado en unidades de absorbancia por mg de material vegetal seco. La determinación en cada uno de los tiempos de muestreo se lleva a cabo reali-

zando triplicado en la extracción y duplicado de cuantificación.

Análisis estadístico

Para este estudio se optó por un diseño experimental completamente aleatorizado, realizando en cada uno de los muestreos triplicado de tratamiento y duplicado de cuantificación. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza sencillo ANOVA ($p = 0,05$) y se asignaron grupos estadísticamente diferentes mediante la prueba de Tuckey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del sistema de extracción para la enzima POD

La literatura reporta diferentes sistemas de extracción para peroxidasa vegetal que van desde la utilización de soluciones reguladoras de tris-HCl, fosfato o citrato hasta el uso de estas mismas soluciones con aditivos como PVPP, tritón o EDTA. La variedad de soluciones extractantes concuerda con la composición variable de las diferentes partes que constituyen la planta, y es la razón que motiva a encontrar la mejor solución para extraer la enzima de acuerdo con el sistema que se va estudiar (9, 15). En este trabajo se utilizaron 4 soluciones extractantes con las que se evaluó tanto el efecto del pH como del uso de PVPP. De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 1), el mejor nivel de actividad se obtuvo con el sistema E4, constituido por buffer citrato 100 mM pH 5,0 y 3% de PVPP. Teniendo en cuenta que los compuestos fenólicos pueden reaccionar con las enzimas, inactivarlas o disminuir su actividad (15), es necesario el uso de

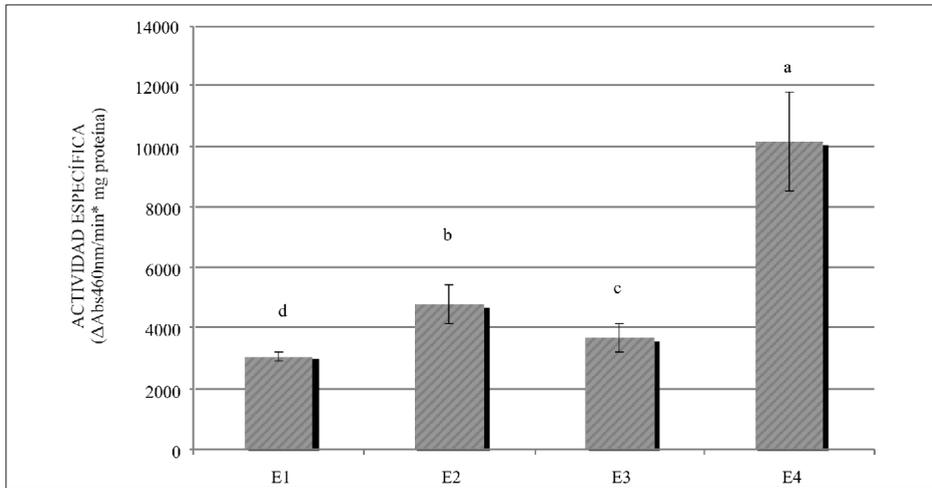


Figura 1. Selección de condiciones de extracción de POD a partir de tallos de clavel. Se realizaron triplicados de extracción y duplicado de la actividad para cada extracto. Los tratamientos que presentan diferencias significativas aparecen con diferentes letras.

aditivo PVPP, ya que en cualquiera de los sistemas evaluados mejora los niveles de actividad, dada su capacidad para retener dichos compuestos reactivos, potenciales interferentes en la determinación de actividad enzimática debido a su reactividad química y a su abundancia en esta especie vegetal (13).

Establecimiento de las condiciones para la medida de actividad enzimática

Se determinó que existe variación de la actividad específica en los diferentes pH evaluados y que el pH con el que se presentan los mayores niveles de actividad es de 5,5 (Figura 2). Este coincide con el utilizado en la mejor solución extractora,

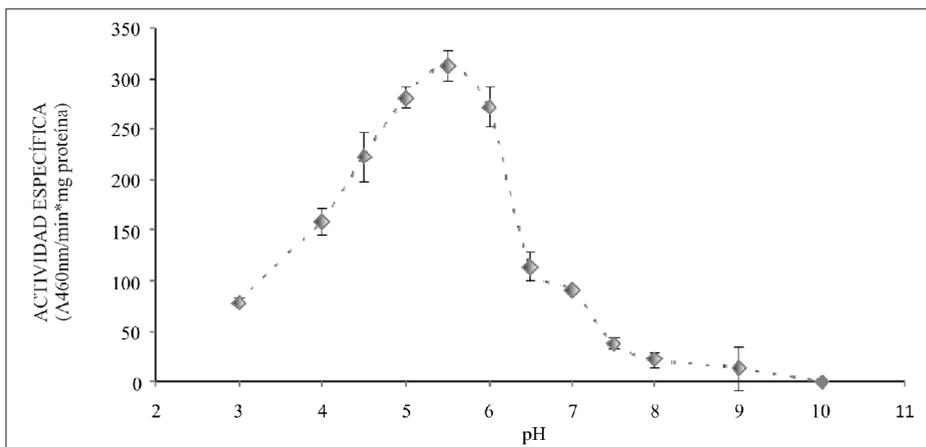


Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad POD en tallos de clavel.

indicando que en dichas condiciones de pH, la enzima, además de presentar una alta solubilidad, tiene un ambiente químico conveniente para que en su sitio activo se transforme el sustrato. A condiciones de pH extremo se observa una disminución en la actividad de la enzima, lo cual demuestra el conocido efecto que puede llegar a tener la concentración de iones hidronios sobre la estructura de las proteínas, alterándolas y, en algunos casos, inactivándolas. Este resultado es similar al encontrado para una peroxidasa aislada de hojas de palma real con un pH 5,2 (16). Los valores de pH reportados para la máxima actividad de POD se encuentran entre 5 y 7 (17-22) aunque se reportan valores de pH más ácidos (23).

Se encontró que entre las temperaturas evaluadas, la de 45 °C presenta la mayor actividad de la enzima POD. (Figura 3). Algunas enzimas incluso peroxidadas aisladas de otras fuentes vegetales (24) a estas condiciones, pueden estar inactivas porque se han desnaturalizado; sin embargo, es conocido que, en general, las

POD son bastante estables al calor y no es raro encontrar buena actividad de ellas aun a altas temperaturas (25, 26). Peroxidasa aislada de uvas malvasia presentó un pH y una temperatura óptima de 5,5 y 40 °C, respectivamente, valores similares a los encontrados en tallos de clavel (27).

La Figura 4 se realizó manteniendo constante la concentración de H_2O_2 a niveles de saturación; la Figura 5, manteniendo constante la concentración de *o*-dianisidina a niveles de saturación. En las dos gráficas se observa claramente el comportamiento típico de una enzima que sigue la cinética de Michaelis-Menten, resultado que concuerda con el reportado para 6 isoperoxidasas purificadas de raíces de rábano originarias de Corea, las cuales también siguen esta cinética en ensayos realizados usando como sustrato *o*-dianisidina o guaiacol (22). Los valores de K_m aparente obtenidos para cada uno de los sustratos utilizados en el presente ensayo, *o*-dianisidina y H_2O_2 a las condiciones descritas, fueron 1,49 mM y 0,56 mM, respectivamente.

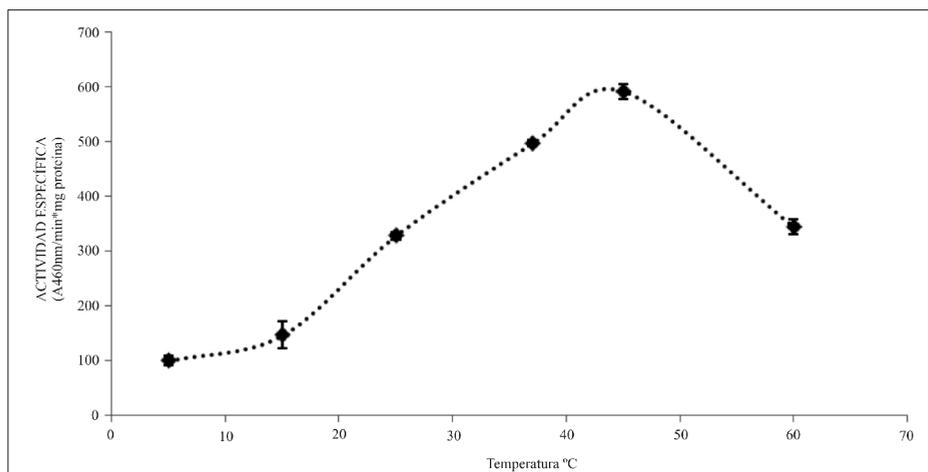


Figura 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad POD en tallos de clavel.

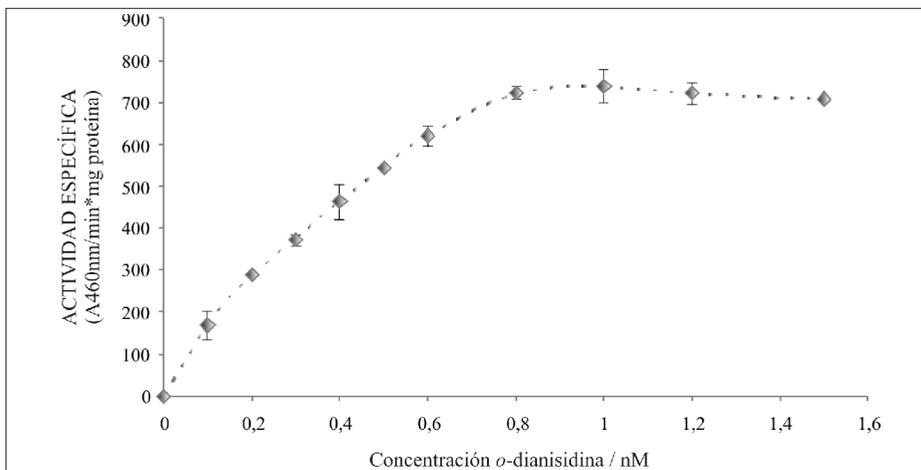


Figura 4. Selección de concentración de *o*-dianisidina para la determinación de la actividad POD en tallos de clavel.

Determinación de la actividad POD en el ensayo *in vivo*

La peroxidasa es una enzima involucrada en diferentes procesos fisiológicos de las plantas, algunos de ellos propios del desarrollo, otros inducidos por estrés biótico o abiótico. Entre los procesos que involucran la enzima están: regulación hormonal, mecanismos de defensa, control de

elongación celular, polimerización de extensina, entrecruzamiento de los polisacáridos de la pared celular, biosíntesis de lignina y procesos de suberización (28). Estudios previos realizados por investigadores holandeses concluyen que esta enzima se induce en clavel de manera no diferencial en interacciones compatibles e incompatibles (29). Sin embargo, di-

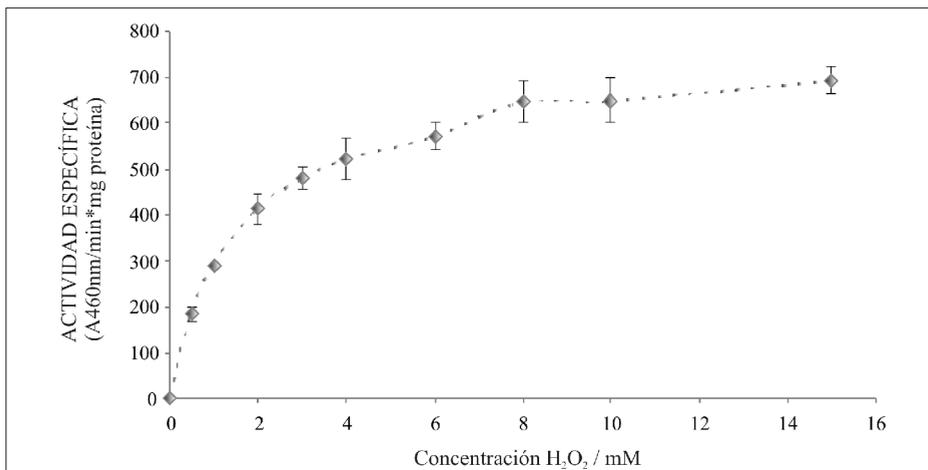


Figura 5. Selección de concentración de peróxido de hidrógeno para la determinación de la actividad POD en tallos de clavel.

chos estudios se llevaron a cabo usando razas del patógeno con alta prevalencia en Holanda y en condiciones de inoculación muy diferentes a las usadas por el patógeno para entrar en la planta en las condiciones de cultivo. Por otro lado, la actividad de esta enzima no se relaciona con otras respuestas bioquímicas asociadas, punto central en la búsqueda de probables mecanismos de regulación de la respuesta de defensa vegetal. El ensayo *in vivo* del presente estudio, además de realizarse usando condiciones de inoculación semejantes a las usadas por el patógeno en los cultivos de clavel, permite relacionar la actividad de la enzima con un proceso bioquímico reportado como determinante en la respuesta de defensa del clavel. Los resultados obtenidos del ensayo *in vivo* se muestran en la Figura 6, y en esta se puede observar que a las 8 y 48 h pos-inoculación se presentó una inducción significa-

tiva de la enzima POD en la variedad tolerante (Bárbara). En la variedad susceptible (Delphi), hacia el último día de muestreo, se observaron diferencias que, aunque significativas ($p = 0,5$) con respecto al control, son mucho menores que los valores inducidos presentados por la variedad tolerante. Es interesante observar que, en general, los niveles de actividad de la enzima son mayores en la variedad tolerante a lo largo de todo el ensayo y, en adición a la inducción pronunciada observada a las 48 h pos-inoculación, estos resultados son un indicio de la relación de la actividad POD con la respuesta de defensa de la planta y con la resistencia a la enfermedad. Resultados similares, de inducción temprana (72 h), se encontraron en estudios del modelo Lupine amarillo (*Lupinus luteus* L.)-*Fusarium oxysporum*, que indican la posible participación de la enzima POD en mecanismos de de-

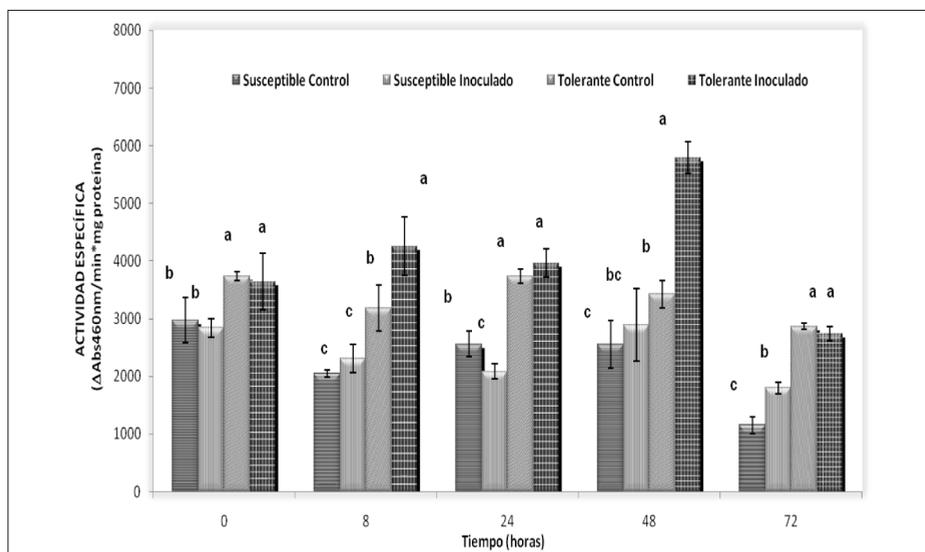


Figura 6. Evolución de la actividad POD en tallos durante el ensayo *in vivo* desarrollado con esquejes de variedades tolerantes y susceptibles al marchitamiento vascular. Se realizaron triplicados de extracción para cada tratamiento en cada uno de los tiempos y duplicado de la actividad para cada extracto. Los tratamientos que presentan diferencias significativas se presentan con letras diferentes.

fensa por parte de la planta debido al evidente aumento de la actividad de la enzima junto con niveles altos de sacarosa endógena que limitan la infección y el desarrollo del patógeno (9). Yamunarani y cols., 2004 (30), reportan aumento de actividad peroxidasa en tomate, un día después de inducir resistencia en la planta, con extracto de agallas de *Quercus infectoria*. En otro modelo planta-patógeno, algunas isoenzimas de POD se indujeron en raíces y hojas de pimienta luego de inoculación con esporas de *Paenibacillus illinoisensis* (31). Por otro lado, Luhová y cols., 2006 (32), realizaron un análisis de actividades enzimáticas, entre ellas la de peroxidasa, en raíces de 2 genotipos de *Pisum sativum* con diferente susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, y encontraron un aumento de actividad para esta enzima en raíces infectadas a partir del día 2 y hasta el 28 pos-inoculación. Según dichas consideraciones, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los encontrados en otros modelos planta-patógeno y permiten proponer que la enzima POD está relacionada con los mecanismos de defensa del clavel y por ende con resistencia al marchitamiento vascular.

Determinación del contenido de lignina en muestras obtenidas a partir del ensayo *in vivo* y relación con la actividad peroxidasa

Se ha postulado que la actividad peroxidasa podría ser importante en resistencia a la penetración de patógenos en plantas por estar involucrada en el depósito de extensina en la pared celular, mediar en el entrecruzamiento de ésta en presencia de H_2O_2 (33) y participar en la polimerización oxidativa de alcohol hidroxicinamili-

co para formar lignina (34), procesos que conducen a dar rigidez a la pared celular y colocar barreras a la infección del patógeno (35). Teniendo en cuenta la importancia que tienen las peroxidases en la biosíntesis de lignina, es de esperar que la inducción de POD esté relacionada con un aumento en el contenido de lignina. Esta correlación se observa en el modelo Lupine amarillo (*Lupinus luteus* L.)-*Fusarium oxysporum*, en el que la síntesis de lignina aumenta a tiempos tempranos de infección (24 h) (9). Se han reportado isoenzimas específicas de peroxidases de pared celular que se creen son responsables de la etapa final de la lignificación (36-38) la cual está asociada a mecanismos de defensa.

La Figura 7 presenta los resultados del contenido de lignina obtenido de los tallos de clavel del ensayo *in vivo*. Se observa que para la variedad tolerante, hay un aumento de lignina a partir de las 48 h pos-inoculación que se mantiene hasta las 72 h. La inducción de la enzima POD concuerda con el aumento en el contenido de lignina a 48 h, lo cual confirma el papel que esta enzima desempeña en la defensa del clavel al patógeno causal del marchitamiento vascular. Es importante tener en cuenta que no es solamente esta enzima la que está involucrada en la biosíntesis de lignina, ya que enzimas como las polifenoloxidasas cumplen también este papel, que en este modelo planta-patógeno también han sido correlacionadas con defensa a nivel del tallo (4).

Estudios realizados por Dalisay y Kuc (39), reportan aumento de actividad peroxidasa y del proceso de lignificación, lo mismo que la depositación de extensina, procesos que se asocian con resistencia

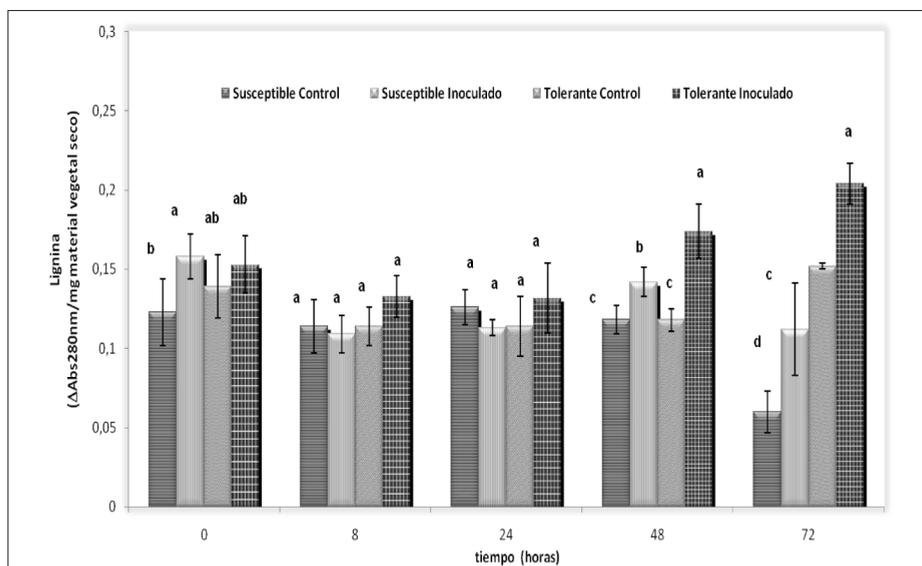


Figura 7. Evolución de los niveles de lignina en tallos durante el ensayo *in vivo* desarrollado con esquejes de variedades tolerantes y susceptibles al marchitamiento vascular. Se realizaron triplicados de extracción para cada tratamiento en cada uno de los tiempos y duplicado de la actividad para cada extracto. Los tratamientos que presentan diferencias significativas se presentan con letras diferentes.

sistémica inducida en la interacción cohombro-*Colletotrichum lagenarium*. La acumulación de lignina y compuestos fenólicos se ha correlacionado con resistencia a la enfermedad en varias interacciones planta patógeno como son los modelos Arroz-*Xanthomonas oryzae* y Cohombro-*Trichoderma harzianum* (40). Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten proponer que una inducción diferencial de la enzima peroxidasa en la variedad tolerante de clavel con respecto a la susceptible en tiempos tempranos pos-inoculación, está relacionada con la acumulación de lignina durante la activación de los mecanismos de defensa asociados con la resistencia del clavel al patógeno causal del marchitamiento vascular.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, dependencia DIB, y a Colciencias, por la financiación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pizano, M. Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). 2000. Bogotá, D.C., Ediciones Hortitecnia Ltda.
2. Niemann, G. J. A. Carnation's defence against fungal invasion: A combined effort. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*. 1990. **54** (2a): 435-438.
3. Baayen, R. P.; Ouellette, G. B.; Rioux, D. Compartmentalization of Decay in Carnations Resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

- Phytopathology*. 1996. **86**: 1018-1031.
4. Cerón, L. E. Evaluación de algunas respuestas bioquímicas en la interacción plantas de ñame (*dioscorea spp*) resistentes y susceptibles al ataque de *colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae*. 2005. Tesis de Magíster en Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
 5. Baayen, R. P.; Elgersma, D. M.; Demmink, J. F.; Spaarnaaij, L. D. Differences in pathogenesis observed among susceptible interaction of carnation with four races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Neth. J. Plant Pathol.* 1988. **94**: 81-94.
 6. Trillas, M. I.; Cotxarrera, L.; Casanova, E.; Cortadellas, N. Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. *Physiol Mol. Plant P.* 2000. **56**: 107-116.
 7. Esteban-Carrasco, A.; López-Serrano, M.; Zapata, J. M.; Sabater, B.; Martín, M. Oxidation of phenolic compounds from *Aloe barbadensis* by peroxidase activity: Possible involvement in defence reactions. *Plant Physiol. Bioch.* 2001. **39**: 521-527.
 8. Ray, H.; Douches, D. S.; Hammerschmidt, R. Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. *Physiol. Mol. Plant P.* 1998. **53**: 93-103.
 9. Morkunas, I.; Gmerek, J. The possible involvement of peroxidase in defence of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *J. Plant Physiol.* 2007. **164** (2): 185-194.
 10. Loren-Kukula, K.; Wrobel-Kwiatkowska, M.; Starzycki, M.; Szopa, J. Engineering flax with increased flavonoid content and thus *Fusarium* resistance. *Physiol. Mol. Plant P.* 2007. **70**: 38-48.
 11. Ardila, H. D.; Higuera, B. L. Inducción diferencial de Polifenol oxidasa y β -1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biol. Col.* 2005. **10**: 65-78.
 12. Zor, T.; Selinger, Z.; Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* 1996. **236**: 302-308.
 13. Higuera B. L.; Montes de G. V. Contribution of HPLC to the study of the defence mechanisms acting in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) roots on infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *J. High Res. Chromatog.* 1996. **19**: 706-708.
 14. Bruce, R. J.; West, C. A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.* 1989. **91**: 889-897.
 15. Deutscher, M. P. Guide to protein purification, Methods in enzymology. San Diego, California, Academic Press, 1990.

- mic Press, Inc. 1990. **182**: 153, 161, 267, 296-298.
16. Sakharov, I. Yu.; Vesga, M. K.; Galaev, I. Yu.; Sakharov, I. V.; Pletjushkina, O. Yu. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Sci.* 2001. **161**: 853-860.
17. Esteban-Carrasco, A.; Zapata, J. M.; López-Serrano, M.; Sabater, B.; Martín, M. Purification of two peroxidases isoenzymes of *Aloe barbadensis* which oxidize p-coumaric acid. *Plant Physiol. Biochem.* 2002. **40**: 127-132.
18. Castillo León, J.; Alpeeva, I. S.; Chubar, T. A.; Galaev, I. Yu.; Cso-regi, E.; Sakharov, I. Yu. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci.* 2002. **163**: 1011-1019.
19. Deepa, S. S.; Arumugan, C. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry.* 2002. **61**: 503-511.
20. Onsa, G. H.; Saari, N. B.; Selamat, J.; Bakar, J. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chem.* 2004. **85**: 365-376.
21. Mdululi, K. M. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). *Food Chem.* 2005. **92**: 311-323.
22. Soung, S. K.; Dong, L. Purification and characterization of a cationic peroxidase C_s in *Raphanus sativus*. *J. Plant Physiol.* 2005. **162**: 609-617.
23. Dogan, S.; Turan, P.; Dogan, M.; Aíslan, O.; Alkan, M. Variations of peroxidase activity among *Salvia* species. *J. Food Eng.* 2007. **79**: 375-382.
24. Suzuki, T.; Honda, Y.; Mukasa, Y.; Kim, S. J. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry.* 2006. **67**: 219-224.
25. Duarte-Vásquez, M. A.; García-Almendárez, B.; Regalado, C.; Whitaker, J. R. Purification and partial characterization of three turpin (*Brassica napus* L. var. esculenta D.C.) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* 2000. **48**: 1574-1579.
26. Dogan, S.; Turan, P.; Dogan, M.; Aíslan, O.; Alkan, M. Variations of peroxidase activity among *Salvia* species. *J. Food Eng.* 2007. **79**: 375-382.
27. Sciancalepore, V.; Longone, V.; Alvitti, F. S. Partial purification and some properties of peroxidase from malvasia grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 1985. **342**: 105-110.
28. Ayyappan, R.; Showalter, N.; Showalter, A. Purification and characterization of wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 1996. **226**: 254-260.
29. Van Pelt-Heerschap, H.; Smit-Bakker, O. Analysis of defence-related proteins in stem tissue of carnation inoculated with a virulent and avirulent race of *Fusarium oxysporum* f.

- sp. *dianthi*. *Eur. J. Plant Pathol.* 1999. **105**: 681-691.
30. Yamunarani, K.; Jaganathan, R.; Bhaskaran, R.; Govindaraju, P.; Velazhahan, R. Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes. *Acta Physiol. Plant.* 2004. **26** (3): 281-290.
 31. Jung, W.-J.; Jin, Y.-I.; Kim, Y.-CH.; Kim, K.-Y.; Park, R.-D.; Kim, T.-H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici* *Biol. Control.* 2004. **30**: 645-652.
 32. Luhová, L.; Lebeda, A.; Kutrová, E.; Hedererová, D.; Pec, P. Peroxidase, catalase, amine oxidase, and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Biol. Plantarum.* 2006. **50** (4): 675-682.
 33. Brownleader, M. D.; Ahmed, N.; Trevan, M.; Chaplin, M. F.; Dey, P. M. Purification and partial characterization of tomato extension peroxidase. *Plant Physiol.* 1995. **109**: 1115-1123.
 34. Conn, E. E. (ed.). 1981. The Biochemistry of Plants. Vol. 7. Secondary plants products. New York, Academic Press.
 35. Vera-Estrella, R.; Higgins, V. J.; Blumwald, E. Plant Defense Response to Fungal Pathogens. *Plant Physiol.* 1994. **106**: 97-102.
 36. Ketsa, S.; Atantee, S. Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Post-harvest Biol. Tech.* 1998. **14**: 117-124.
 37. Davin, L. B.; Lewis, N. G. Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr. Opin. Biotech.* 2005. **16**: 407-415.
 38. Quiroga, M.; Guerrero, C.; Botella, M. A.; Barceló, A.; Amaya, I.; Medina, M.; Alonso, F. J.; Milrad, S.; Tigier, H.; Valpuesta, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 2000. **122**: 1119-1127.
 39. Dalisay, R. F.; Kuc, J. A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Physiol. Mol. Plant P.* 1995. **47**: 315-327.
 40. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Kapulnink, Y.; Chet, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of rootm colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Bioch.* 2000. **38**: 863-873.