

**Reconocimiento de miRNAs y su relación con la expresión de genes de clavel
(*Dianthus caryophyllus*) involucrados en la respuesta al patógeno *Fusarium
oxysporum* f. sp. dianthi.**

Por:

Carlos Alberto Morales Villanueva

Director de trabajo de grado

Juan José Filgueira. M.Sc Dr. Sc.

Trabajo de grado propuesto como cumplimiento
parcial de los requisitos para el pregrado en

Biología aplicada

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

CAJICÁ, 2022

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras	5
Lista de tablas	6
Agradecimientos	7
Capítulo I: Revisión bibliográfica	8
<i>Fusarium oxysporum</i>	8
<i>Dianthus caryophyllus</i>	9
Interacción planta-patógeno.....	10
miRNA	11
Transcripción de los genes MIR.....	12
Procesamiento.....	13
Relación entre miRNAs y mRNAs	14
siRNAs.....	16
Librerías genómicas.....	16
NGS	17
Objetivos del trabajo.....	18
Capítulo II: Trabajo de grado.....	19
Resumen.....	19
Abstract	20
Introducción	21
Métodos.....	22
Resultados y análisis	35
Discusión.....	48

Conclusiones.....	54
Literatura citada.....	55
Anexos	64

LISTA DE FIGURAS

Número	Página
1. Células indiferenciadas de clavel.....	23
2. Procedimiento para cultivo monospórico	25
3. Reconocimiento de estructuras de Fod.....	26
4. Ensayos duales clavel-Fod.....	27
5. Salida del software miRDeep2.....	31
6. Crecimiento de Fod en presencia de callos de clavel.....	36
7. “novel miRNA” conservados e híbridos	39
8. Expresión diferencial de miRNAs conservados.....	40
9. Composición de genes “target” entre variedades y tratamientos	41
10. Perfil de control postranscripcional de genes por categoría.....	41
11. Expresión de miRNAs de mRNAs en común entre tratamientos (395)..	43
12. Expresión de miRNAs de mRNAs en común entre tratamientos (SH2)	45
13. Mapa ilustrativo del mecanismo de control postranscripcional (395)	46
14. Mapa ilustrativo del mecanismo de control postranscripcional (SH2)	47
 Figuras anexas	
1. Validación de híbridos (SH2)	64
2. Validación de híbridos (395)	66

LISTA DE TABLAS

1. Información general de los genes usados en el presente estudio33
2. Estadísticas generales de las librerías usadas en este estudio36

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, sin ellos no sería posible estudiar y tener la oportunidad de cumplir mis sueños. A todos los profesores que participaron en mi formación. En especial a la profesora Carolina Isaza y a el profesor Pedro Jiménez. Ellos me enseñaron a no conformarme con mis pensamientos, a dar un paso más allá y cuestionar hasta lo que yo considero real.

Quiero agradecer a mi director de tesis el doctor Juan José Filgueira, porque a pesar de todo confió en mí y puso en mis manos responsabilidades grandes. Me brindo todo el apoyo para el desarrollo de este trabajo y más allá de eso, me dio la oportunidad para experimentar la investigación científica desde el hacer. El me vio convertirme en científico y me empujó a no conformarme con lo básico, sino buscar respuestas más allá de lo obvio. Por eso le estaré por siempre agradecido.

Por último, quiero agradecerle a la ciencia. Mi más grande pasión desde que tengo memoria. Espero poder tener la fortuna de seguir creciendo como científico y poder seguir disfrutando de la ciencia durante toda mi vida.

CAPITULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

FUSARIUM OXYSPORUM

El género *Fusarium* es un género de hongos que es conocido principalmente por tener una amplia variedad de especies patógenas (Summerell, 2019). Los daños a diferentes cultivos causados por estas especies son graves a nivel mundial (Villa *et al.*, 2015).

Gracias a que las especies patógenas de este género tienen una amplia variedad de plantas hospedadoras y estrategias de infección (Di Pietro *et al.*, 2003; Goswami y Kistler, 2004), se ha extendido fácilmente por todos los rincones del mundo. Dentro del género *Fusarium* se destaca la especie *Fusarium oxysporum* (Fox). Esta especie se caracteriza por su gran variabilidad genética (O'Donnell *et al.*, 1998; Debbi *et al.*, 2018). Una evidencia de esta variabilidad es la gran cantidad de especies y razas que posee, incluidas especies no patogénicas, patógenas de plantas, etc (Edel-Hermann y Lecomte, 2019).

Dentro de las cepas patógenas de plantas se encuentran aquellas que infectan plantas de gran importancia a nivel comercial (Joshi, 2018). Entre estas se encuentran plantas de interés comercial como el banano, las orquídeas y el clavel y cultivos de jardín (Edel-Hermann y Lecomte, 2019).

Tradicionalmente, dependiendo del hospedero se clasifican diferentes cepas en diferentes formas especiales dentro de la especie *Fusarium oxysporum* (Edel-Hermann y Lecomte, 2019). En el caso particular de este trabajo la forma especial que es patógena para el clavel es la forma especial *Dianthi* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod)).

A pesar de su gran variabilidad genética y estudio a nivel mundial, solo se conoce su reproducción asexual (Lombard *et al.*, 2019). Por lo que se cree que, la variabilidad de esta especie viene de mecanismos de recombinación asexual (McTaggart *et al.*, 2021).

En PDA, el crecimiento de Fox es rápido, el micelio aéreo blanco que caracteriza a esta especie es visible, y en ocasiones el medio se puede teñir en colores que van desde el púrpura o el azul hasta el naranja (Nelson *et al.*, 1983).

Microscópicamente Fox se caracteriza por tener abundantes microconidios y macroconidios (Nelson et al., 1983). Los microconidios se caracterizan por tener una forma ovalada, y ser unicelulares, en general son estructuras simples (Nelson et al., 1983). Por otro lado, los macroconidios son estructuras más complejas que se caracterizan por la presencia de divisiones o tabiques que separan diferentes células (estructuras multicelulares) (Nelson et al., 1983).

La célula apical tiene una forma atenuada o en punta y la célula basal tiene forma de "pie", esta es una característica que generalmente se atribuyen a *Fox* (Nelson et al., 1983).

DIANTHUS CARYOPHYLLUS

Dianthus caryophyllus, el clavel, es una de las flores más apetecidas en el comercio nacional e internacional. Su principal atractivo proviene de su presencia, y variada coloración. sin embargo, uno de sus aspectos más característicos es su perfume similar al clavo (Filgueira, 2011).

Esta planta se puede encontrar en cualquier época del año, los precios de un ramo de estas flores pueden variar desde el más barato para las variedades estándar, hasta el más caro para las variedades llamativas (Filgueira, 2011).

El clavel es una planta perenne, su base es leñosa y sus tallos pueden alcanzar los 100 cm de altura (Whealy, 1992). Sus hojas son lineales que van desde 0.8 cm a 1.5 cm de largo, son planas, acuminadas y glaucas (Bailey, 1942).

Las inflorescencias pueden tener hasta 5 flores, son bisexuales con simetría radial, tienen de 4 a 10 estambres, su inflorescencia es terminal, colorida y con olor intenso (Bailey, 1942).

El clavel pertenece al género *Dianthus* de la familia Caryophyllaceae, que incluye una gran variedad de flores con usos ornamentales y de perfumería, que son el grupo de las fragantes o “rosas”, a este grupo pertenecen más de trescientas especies (Holley y Baker, 1963). Es probable que el clavel fue introducido en España por el Imperio Romano y esto eventualmente conduciría a su llegada al Nuevo Mundo (McGeorge y Hammet, 2002).

Los floricultores han tenido interés en realizar procesos de mejoramiento al clavel. Esto siguiendo la tendencia de la modernización de la agricultura. La cual trajo consigo una serie de

conceptos nuevos y metodologías de propagación, cultivo y mejoramiento genético. El éxito del mejoramiento Depende fundamentalmente del mecanismo de reproducción de la especie, si es silvestre o cultivada y cuál es el carácter que se desea mejorar (Holley y Baker, 1963).

INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

En la literatura se encuentra información que describe el desarrollo de síntomas en clavel causados por Fox. También cambios histológicos y bioquímicos en variedades resistentes y susceptibles al momento de la elicitación química con Fox (Benavides *et al.*, 1995; Ben Yephet *et al.*, 1997).

Se han realizado estudios de algunos de los cambios bioquímicos involucrados en la respuesta de plantas de clavel resistente a la marchitez vascular (Curir *et al.*, 2005).

La característica más evidente de la relación entre *Fod* y el clavel es el síntoma que se evidencia principalmente por el marchitamiento vascular, las hojas de las plantas infectadas o partes de ellas pierden turgencia produciendo secado en verde (Pizano, 2000).

Si el ataque del hongo es lo suficientemente agresivo o la variedad de clavel infectado es susceptible, eventualmente el individuo muere (Agrios 1997).

Fox habita el suelo, por lo que su principal vía de infección es a través de las raíces. Sin embargo, el hongo puede infectar directamente a través de heridas (Husaini *et al.*, 2018). Cuando el hongo ya está dentro de la planta, el micelio se extiende por los vasos del xilema, y el resultado de esta actividad fúngica es la generación de gomas y geles por parte de la planta que eventualmente producen obstrucción de los vasos, evitando el transporte de agua y nutrientes (Agrios 1997).

En general, la teoría general de la fitopatología se basa en que la relación genética entre un patógeno y cualquier planta es una relación gen por gen, en la que para cada gen de virulencia existe un gen "antagonista" de resistencia de la planta (Kumar *et al.*, 2017).

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa químicos que están diseñados para prevenir la invasión o reducir los efectos causados por microorganismos que las atacan (Berger *et al.*, 2007.).

Estos mecanismos de defensa tienen sus fundamentos biológicos en su genoma, en donde se puede destacar la expresión de genes de resistencia y los genes reguladores de la respuesta de resistencia (Andersen *et al.*, 2018).

Algunos productos de estos genes son los RNAs de control postranscripcional de genes (miRNAs y siRNAs), estos reguladores juegan un papel importante en la activación de las respuestas primarias y secundarias que incluyen la activación de MAPKs (mitogen-activated protein kinase por sus siglas en inglés), las proteínas G, ubiquitina entre otros (Meng *et al.*, 2013).

También participan diferentes rutas mediadas por hormonas como el ácido jasmónico y el ácido salicílico de las cuales depende la producción de sustancias químicas que son tóxicas para los patógenos como las fitoalexinas o las antocianinas (Vlot *et al.*, 2009).

Como antecedentes del estudio de RNAs de control postranscripcional se destaca el estudio realizado por (Yagi., 2014) en donde se publicó una parte del genoma del clavel (1050 genes), sin embargo, estos genes pertenecen a un grupo de alrededor de 40 mil secuencias que posiblemente codifican para proteínas, por lo que realmente menos del 10% de los genes codificantes han sido secuenciados. Por otra parte, en este mismo trabajo se identificaron alrededor de 200 secuencias entre tRNAs, miRNAs, rRNAs y siRNAs génicos.

Con respecto a la construcción de librerías genómicas, en el estudio que realizó Tanase y colaboradores en 2012 se construyó una librería de cDNA de clavel en donde se obtuvo alrededor de un millón de secuencias de alta calidad para su lectura, de estas secuencias se armaron 750 unigenes de los cuales se enfocaron en el descubrimiento de unigenes relacionados con el color de las flores y la biosíntesis de etileno.

MIRNA

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante. Estas moléculas se encuentran en plantas, animales y otros grupos. (Bartel, 2004).

Hasta ahora la función que se le atribuye es la de regulación negativa de la expresión de genes a nivel post-transcripcional (Bartel, 2004). Los miRNAs tienen tamaños entre 21-24

nucleótidos (Gao et al., 2020). Sin embargo, no son las moléculas de ácidos nucleicos más pequeños que se conocen.

En plantas, la biogénesis de los miRNAs es reconocida y entendida al menos a niveles generales (Gao et al, 2020). La biogénesis de miRNAs puede ser dividida en tres partes principales: 1) Transcripción de los genes MIR; 2) Procesamiento y 3) Mecanismo de regulación de la transcripción. En esta sección se cubrirán las primeras dos partes de la biogénesis de miRNAs en plantas (Gao et al, 2020).

Transcripción de los genes MIR

Para que los miRNAs puedan ser transcritos, se requiere la mayoría de los componentes de la maquinaria transcripcional que ya se observa en la transcripción de cualquier otro gen (Narjala et al, 2020). Por lo tanto, la maquinaria gira en torno al reclutamiento y activación de la RNA polimerasa II (RNA pol II), (Gao et al., 2020).

Elementos moleculares como el mediador tienen un papel crítico en la correcta transcripción de los genes MIR (Zhang et al., 2022). Ya que es la proteína encargada de reclutar y anclar la RNA pol II a la región promotora (Zhang et al., 2022).

Después del reclutamiento de la RNA pol II por el mediador, la fosforilación del dominio c-terminal (CTD) de la pol II es fundamental para la liberación su liberación y por lo tanto para la síntesis de pri-miRNAs (Zhang et al., 2022).

Este proceso de fosforilación puede ser llevado a cabo por kinasas dependientes de ciclina (CDK), que además de activar la RNA pol II también regulan la poliadenilación del extremo 3' y el “capping” del extremo 5' los cuales son importantes en la protección de los pri-miRNAs (Hajheidari et al., 2012). A parte de estas proteínas comunes en cualquier transcripción, también hay elementos propios en transcripción de miRNAs (Zhang et al., 2022). los factores de transcripción CCR4-NOT (Represión de catabolito de carbono: negativa en TATA-less); ELP2 y ELP5, MYB-R2R3; DOF; el complejo Proteína fosfatasa 4 entre otros (Wang et al., 2013, 2019; Zhang et al., 2013; Fang et al., 2015; Sun et al., 2015; Cai et al., 2018)., regulan

globalmente la transcripción de los genes MIR. Esta regulación tiene que ver con el reclutamiento de proteínas de procesamiento del pri-miRNA como las proteínas DCL (dicer like proteins), (Rojas et al, 2020). Por lo tanto, la transcripción y procesamiento se pueden considerar como fenómenos simultáneos que están estrechamente relacionados (Wang et al., 2019).

procesamiento

Los principales componentes de la maquinaria de procesamiento de los pri-miRNAs son los genes DCL1, HYL1 y SE (Li & Yu, 2021). La proteína central de la maquinaria de procesamiento es DCL1. Esta es una endorribonucleasa que se encarga de cortar el pri-miRNA para dejar como resultado una molécula de miRNA de doble cadena (Li & Yu, 2021).

Por lo tanto, un correcto anclaje y movimiento de DCL1 a la secuencia pri-miRNA es fundamental para un correcto procesamiento (Li & Yu, 2021). HYL1 muestra un rol importante en el posicionamiento y anclaje del pri-miRNA a DCL1 (Li & Yu, 2021). Por lo que el reclutamiento de DCL1 mediado por HYL1 es el primer paso para el procesamiento (Li & Yu, 2021).

En el estudio de Pyo y colaboradores en 2020, se demostró una correlación directa entre la acumulación de HYL1 y la acumulación de miRNAs maduros en presencia de estrés. Los resultados sugieren que en estados de estrés en *Arabidopsis*, la acumulación de HYL1 aumenta sustancialmente y a su vez la concentración de miRNAs también aumenta (Pyo et al, 2020).

Otra proteína importante en la maquinaria de procesamiento es que la proteína SE con dominio “zinc finger” se une al pri-miRNA (Li y Yu, 2021). Además, interactúa con HYL1 y DCL1 por lo que actúa como un estabilizador del complejo de procesamiento (Stepien et al, 2017).

En el estudio de Prigge y Wagner en 2001 se muestra como los mutantes de SE muestran efectos fenotípicos graves. Uno de estos es el bajo desarrollo de los meristemos apicales y problemas en la formación de inflorescencias. Además, algunos mutantes de SE mostraron letalidad de los embriones mostrando la importancia de SE en el desarrollo vegetal en *Arabidopsis* (Prigge y Wagner, 2001). Una vez HYL1, SE y DCL1 están unidos al pri-miRNA,

DCL1 realiza el corte de uno de los extremos del pri-miRNA dando como resultado el pre-miRNA o secuencia precursora (Prigge y Wagner, 2001).

RELACIÓN ENTRE MIRNAS Y MRNAS

Los miRNAs regulan negativamente diferentes genes objetivo a nivel postranscripcional (Cheng et al, 2018). Esto se da por la unión del miRNA a alguna región del mRNA llamada sitio de unión, causando la degradación del mRNA o la inhibición de la traducción (Yu et al, 2019).

En animales los miRNAs generalmente se unen a la región UTR 3' (untranslated region por sus siglas en inglés) de los mRNAs, en donde se produce la degradación del mRNA o inhibición de la traducción (Gebert y MacRae, 2019). Primero, el pre-miRNA es exportado al citosol por la proteína Exportin 5, En donde es procesada por la endonucleasa DICER (Gebert y MacRae, 2019). Esto da como resultado un complejo de miRNA de doble cadena, luego la proteína AGO separa la doble cadena de miRNA y une la secuencia madura al UTR'3 del mRNA "target" (Gebert y MacRae, 2019). La inhibición de la traducción se da por la liberación del factor de iniciación eucarióticos eIF4A mediado por el miRNA maduro, esto evita la unión del ribosoma al mRNA (Gebert y MacRae, 2019). Por otro lado, los miRNAs también reclutan proteínas de desadenilación GW182 que media la desadenilación de la cola poly-a y la decapitación del cap (caperuza o casquete) del extremo 5' del mRNA por la enzima DCP1, esto conduce a la degradación del mRNA (Gebert y MacRae, 2019)..

En el caso de las plantas, el mecanismo de degradación es similar excepto que, en plantas, el sitio de unión de los miRNAs se encuentra en el ORF (open reading frame por sus siglas en inglés), (Zhang et al, 2018). Por lo que para que ocurra degradación de mRNA es necesario una alta complementariedad entre el miRNA y el sitio de unión en el mRNA (Zhang et al, 2018).

Al tratarse de un caso de regulación negativa, se estima que la correlación entre los miRNAs y mRNAs es negativa (Jebessa et al, 2018). Es decir, la alta expresión de un miRNA significa una alta degradación de mRNA, por lo que los niveles de expresión miRNA/mRNA deben tener una correlación negativa en la mayoría de los casos (Jebessa et al, 2018).

Cuando se quiere entender como es la interacción entre miRNAs y mRNAs en cualquier fenómeno, lo primero que es necesario tener en cuenta es la metodología que se va a usar para predecir los objetivos de los miRNAs.

Existen varios puntos para tener en cuenta al momento de escoger alguna aproximación en la predicción. A continuación, se mencionan los puntos principales.

- 1) el apareamiento entre el miRNA/mRNA, la complementariedad entre estas secuencias es necesaria al momento de predecir un mRNA “target” (Fahlgren y Carrington, 2010).
- 2) La estabilidad termodinámica, El híbrido debe tener un valor de energía libre de Gibbs con valores negativos para, en primer lugar, ver si es una reacción que pueda ocurrir espontáneamente y en segundo lugar para ver si es estable termodinámicamente (Riolo et al, 2020). Esto permite descartar falsos positivos que son termodinámicamente inviables.
- 3) accesibilidad al mRNA “target”, los mRNAs forman estructuras secundarias (Wayment-Steele et al, 2021). Estas estructuras pueden prevenir la unión de algún miRNA por lo que son poco o nada regulados por impedimento estérico (Riolo et al, 2020; Pandey et al, 2019).

Dado que el mecanismo de reconocimiento y control mediado por miRNAs es ampliamente entendido, se han diseñado diferentes algoritmos que tienen en cuenta todas las variables anteriormente descritas.

Existen una gran variedad de algoritmos que permiten la predicción de objetivos en animales. Sin embargo, los algoritmos que están disponibles para plantas son más escasos.

Otro problema frecuente es la alta tasa de falsos positivos (híbridos miRNA/mRNA que no existen en la naturaleza, pero se estiman reales por algún algoritmo) que pueden darse por la pobre implementación de parámetros de un algoritmo y la no validación por medio de experimentos in vivo como RT-qPCR o RNA-seq que permitan confirmar su validez (Riolo et al, 2020).

Por lo que implementar el algoritmo de predicción correcto es fundamental para aumentar las probabilidades de encontrar relaciones reales en el control postranscripcional de genes de interés.

Srivastava y colaboradores realizaron un estudio en la eficiencia de diferentes herramientas de predicción de mRNA “target” en 2014. Sus resultados sugieren que las herramientas psRNATarget, Targetfinder y Tapirhybrid son las que producen los resultados más confiables. Y que pueden ser combinadas con otros algoritmos para mejorar su precisión.

SIRNA

Los siRNAs son moléculas encargadas de la regulación de algunos procesos en las plantas. Esta regulación puede darse por medio de la escisión del mRNA, inhibición de la traducción o modificación de las cromátidas (Baulcombe, 2005).

Sin embargo, la función de la mayoría de estas moléculas pequeñas de RNA sigue siendo un misterio (Wu et al, 2020). Borsani y colaboradores en 2005 descubrieron algunas secuencias de siRNA, estas secuencias regulan la respuesta al estrés salino en *Arabidopsis*.

Existen más de 1000 secuencias de siRNA en *Arabidopsis* (Wang et al., 2005). Katiyar-Agarwal y colaboradores en 2006 estudiaron el comportamiento de algunas moléculas de siRNA en inmunidad de plantas, este estudio ha revelado que, en muchos casos, una transcripción de un siRNA se induce específicamente en determinadas condiciones bióticas.

LIBRERÍAS GENÓMICAS

La construcción de una librería de cDNA representa una inversión importante en tiempo y esfuerzo. Sin embargo, a largo plazo puede convertirse en una inversión y recurso de investigación importante (Head et al, 2014).

La mayoría de los kits para la fabricación de librerías que se consiguen en el mercado utilizan alguna modificación del método de Gubler y Hoffman del año 1983 (Silverstein et al., 2002).

A continuación, se describe de manera breve cómo se lleva a cabo el proceso en la mayoría de kits comerciales para la fabricación de librerías: Primero un primer o adaptador/primer se une al extremo poly(A)+ del RNA y se lleva a cabo la síntesis de la primera hebra con una transcriptasa reversa. En este punto se obtiene un híbrido cDNA/RNA ya que solo se ha sintetizado una hebra de cDNA (Silverstein et al., 2002).

La síntesis de la segunda hebra se lleva a cabo usando una mezcla de RNasa H y DNA polimerasa I. La RNasa H se encarga de cortar el RNA en la primera hebra del híbrido cDNA/RNA (Silverstein et al., 2002).

Los fragmentos de RNA sirven luego como cebadores o primers para la DNA polimerasa, la cual sintetiza la segunda hebra. El cDNA de doble cadena resultante se trata luego con T4 DNA polimerasa para producir extremos romos sobre los cuales se pueden ligar adaptadores (Silverstein et al., 2002).

Los adaptadores son diseñados para tener extremos “pegajosos” y un tener un sitio específico para la unión de una enzima de restricción (Silverstein et al., 2002).

Las moléculas de cDNA de doble hebra que se obtienen son fraccionadas de acuerdo con su tamaño y se unen a un vector de clonación basado en el fago lambda, luego la librería se mantiene dentro de una cepa hospedera apropiada de *E. coli* (Silverstein et al., 2002).

Las librerías de cDNA de clavel se han empleado para la identificación de genes relacionados con la senescencia y la regulación de su expresión (Charng et al., 1998; Lawton et al., 1990; 1989), así como para la identificación de genes que se expresan diferencialmente durante el desarrollo de la flor, utilizando la técnica de hibridación sustractiva (Ok Sung Han, et al., 2003).

NGS

Las NGS (Next Generation sequencing) pueden ser una herramienta útil para la recolección de datos de mRNA, miRNAs y otros ácidos nucleicos que pueden estar participando en la regulación de la expresión génica durante diferentes fenómenos biológicos (Taheri et al, 2018).

una serie de enfoques basados en NGS para la identificación de patógenos han emergido durante la última década (Kreuze, 2014). En principio, las NGS podrían permitir diagnósticos

universales, permitiendo la identificación de cualquier patógeno en una muestra en función de su secuencia (Kreuze, 2014).

Otra función para las NGS es el desarrollo de experimentos que permitan cuantificar y conocer las secuencias específicas de diferentes tipos de ácidos nucleicos. Estos experimentos se conocen como RNA-seq (Marguerat y Bähler, 2010). Las plataformas de NGS más populares del mercado son: FLX de Roche, la plataforma de Illumina, y el sistema AB SOLiD (Marguerat y Bähler, 2010).

El resultado en común de estas 3 plataformas es la medida de lo que se conoce como “Reads” o lecturas los cuales son fragmentos de ácidos nucleicos secuenciados en paralelo (Marguerat y Bähler, 2010).

RNA-seq permite una alta confiabilidad en datos expresión cuantitativa (Conesa et al, 2016). Esto permite la comparación cuantitativa entre la expresión de diferentes genes y la aplicación de pruebas estadísticas (cuantitativas) que permitan entender su relación (Conesa et al, 2016).. La mayor ventaja de este ensayo viene de la mezcla entre el descubrimiento de nuevas secuencias y su cuantificación. Esto hace que este ensayo sea muy popular entre la comunidad científica (Conesa et al, 2016).

OBJETIVOS DEL TRABAJO

General: Encontrar relaciones entre el control postranscripcional de genes mediado por miRNAs y el mecanismo de respuesta a estrés biótico causado por el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. entre variedades resistente y susceptible de clavel (*Dianthus caryophyllus*).

Específico 1: Detectar secuencias miRNAs. Esto se realiza por medio de la construcción de librerías de miRNAs de células indiferenciadas de clavel. para ser relacionadas con genes de clavel involucrados en la respuesta a Fod.

Específico 2: Encontrar genes “target” provenientes de librerías previas de mRNA que sean complementarios con las secuencias de miRNAs anteriormente seleccionadas.

Específico 3: Validar los híbridos miRNA/mRNA anteriormente seleccionados. Esto se realiza mediante una comparación en los niveles de expresión del miRNA con su respectivo mRNA “target” con datos de expresión obtenidos a partir de los experimentos de RNA-seq (mRNA-seq y miRNA-seq).

CAPITULO 2: *TRABAJO DE GRADO*

RESUMEN

La producción de clavel a nivel mundial sufre grandes pérdidas por el marchitamiento vascular causado por el patógeno Fod (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*). Por lo que Los trabajos relacionados con el mecanismo de respuesta de variedades naturalmente resistentes, podría ser el primer paso para la producción de variedades comerciales resistentes a Fod. En este estudio se fabricaron librerías de miRNA de dos variedades. 395 resistente y SH2 susceptible a Fod, en dos tratamientos: antes de la elicitación y después de la elicitación. Se encontraron miRNAs putativos que regulan la expresión de alguno de los 35 genes muestra. Estos genes muestran variaciones importantes en sus niveles de expresión al contacto químico con Fod. Esto se determinó en trabajos anteriores en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Militar Nueva Granada. Estos miRNAs fueron validados y su perfil de control postranscripcional fue relacionado con el mecanismo de respuesta de ambas variedades. Se encontró que ambas variedades responden mediante el mismo perfil de control postranscripcional y tienen un mecanismo de respuesta similar. Sin embargo, 395 controla postranscripcionalmente los genes adecuados en el momento oportuno para responder de manera efectiva. Mientras que SH2 no tiene esa misma eficiencia, lo que no le permite ser oportuno en la respuesta ante Fod. Se proponen 84 miRNAs putativos en total que están controlando los mecanismos de expresión de 26 de los 35 genes al momento de la elicitación. Realizar experimentos de “Knock out” o “Knock down” sobre estos 84 miRNAs podría mostrar pérdida o ganancia de resistencia a Fod, lo que permitiría concluir que estos miRNAs son claves para el mecanismo de respuesta de variedades resistentes de clavel ante Fod.

ABSTRACT

Carnation production worldwide suffers great losses due to vascular wilt caused by the pathogen Fod (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*). Therefore, the work related to the response mechanism of naturally resistant varieties could be the first step to produce commercial varieties naturally resistant to Fod. In this study, miRNA libraries of two varieties were fabricated. 395 resistant and SH2 susceptible, in two treatments: before elicitation and after elicitation. Putative miRNAs that regulate the expression of some of the 35 sample genes were found. These genes show important variations in their expression levels upon chemical contact with Fod. This was determined in previous works in the phytopathology laboratory of the Universidad Militar Nueva Granada. These miRNAs were validated, and their post-transcriptional control profile was related to the response mechanism of both varieties. Both strains were found to respond through the same post-transcriptional control profile and have a similar response mechanism. However, 395 is more efficient in its post-transcriptional control effort, controlling the appropriate genes to respond effectively. While SH2 does not have the same efficiency, which does not allow it to be timely in response to Fod. A total of 84 putative miRNAs are proposed that are controlling the expression mechanisms of 26 of the 35 genes at the time of elicitation. Performing "Knock out" or "Knock down" experiments on these 84 miRNAs can show loss or gain of resistance to Fod, which would allow us to conclude that these miRNAs are key to the response mechanism of carnation resistant varieties to Fod.

INTRODUCCIÓN

En Colombia la producción de clavel es alta, llegando a ser el primer exportador a nivel mundial (Cifras de Floricultura Colombiana - Ceniflores, s.f), no obstante Colombia, al igual que el resto de las potencias mundiales en producción de clavel sufre grandes pérdidas por el marchitamiento vascular causado por el patógeno Fod (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*), a pesar de todos los métodos de control que se han implementado desde hace 40 años (Yadeta y Thomma, 2013).

Por lo tanto, conocer los mecanismos de resistencia de las plantas de uso comercial, se vuelve una herramienta importante para implementar en el futuro estrategias económicamente viables, las cuales radican en la resistencia natural de algunas variedades (Gasco et al., 2005). Para ello es necesario comprender cómo es la dinámica de expresión y represión de los genes involucrados en la resistencia (Yadeta y Thomma, 2013).

Sin embargo, Los estudios que se han realizado en biología molecular en clavel se enfocan principalmente en el estudio de los procesos asociados a la biosíntesis de pigmentos y senescencia y más recientemente en el estudio genómico y transcriptómico de la planta, usando técnicas de secuenciación de última generación (Martínez, 2019).

Sin embargo, los estudios enfocados en la detección y regulación de genes relacionados con la resistencia no han mostrado los resultados esperados (Martínez, 2019). Por lo que, el uso de herramientas de biología molecular para entender el mecanismo de respuesta del clavel sigue siendo un campo inexplorado. Los trabajos relacionados con la elaboración de librerías genómicas de diferentes especies de RNAs que participan en el control postranscripcional de genes en el clavel, podría ayudarnos a comprender mejor el fenómeno de la resistencia.

Los miRNAs son una clase de RNAs pequeños de alrededor de 25 nucleótidos, cuyo rol principal es regular negativamente mRNA por medio de su degradación o por medio de la inhibición de la transcripción (Wang et al, 2016).

En plantas el estudio del rol del control postranscripcional mediado por miRNAs se limita principalmente a desarrollo, floración y senescencia, por lo que hay un vacío de conocimiento en la función de los miRNAs en fenómenos de interacción planta-patógeno. En el estudio de

Villacorta-Martín y colaboradores en 2015 se encontraron diferentes miRNAs que están involucrados en la formación de raíces adventicias en clavel. Por otro lado, Paul y colaboradores (2015) analizaron el rol de los miRNAs en la homeostasis nutritiva en plantas.

Estudios relacionados con Fod se han realizado en diferentes especies. Xu y colaboradores en 2021 encontraron miRNAs putativos que están involucrados en la respuesta del pepino a Fod. Sin embargo, no hay información del rol de los miRNAs de clavel en la respuesta a Fod.

En este trabajo se presenta el perfil de control postranscripcional de algunos genes que se expresan diferencialmente ante la elicitación por Fod. Este perfil de control postranscripcional se relaciona con el mecanismo de respuesta de cada variedad y se aportan conclusiones importantes acerca de las diferencias varietales (susceptible y resistente) cuando se exponen a Fod.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Las células indiferenciadas de las variedades 395 (resistente) y SH2 (susceptible) fueron obtenidos a partir de microplantas brindadas por el laboratorio de Biotecnología vegetal de la universidad militar nueva granada.

Para inducir la producción de células indiferenciadas, se cortaron secciones de cinco mm de tejido foliar de microplantas. Posteriormente, se realizó una desinfección superficial, sumergiendo estas secciones en alcohol al 96% v/v por 30 segundos, hipoclorito de sodio 2% v/v por 30 segundos y por último se realizó un lavado con abundante agua estéril.

Posteriormente se dispusieron cinco secciones de este tejido foliar en frascos de compota que contenían 30 mL de medio MS suplementado con la hormona 2,4-D en una concentración de 1mg/L. Los frascos fueron incubados a 26°C por 4 semanas con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (figura 1).



Figura 1: Células indiferenciadas de clavel después de 4 semanas de incubación. A la izquierda la variedad SH2 y a la derecha la variedad 395.

Mantenimiento y multiplicación de la cepa patogénica de *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. (Fod)

La cepa patogénica se obtuvo de la colecta de material vegetal (tallos de clavel) con síntoma de marchitez vascular por Fod recolectados en el invernadero del grupo de fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granada. Estas muestras fueron llevadas al laboratorio donde se sumergieron en hipoclorito de sodio 5% durante dos minutos, etanol al 70% durante dos minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril. Luego se realizaron cuatro cortes del tejido vascular de la planta y se colocaron en cajas de Petri con 30 mL de medio PDA y se incubó a 26 °C durante 7 días (figura 2B).

Una vez terminado el tiempo de incubación se verificó que no existiera contaminación aparente por hongos ambientales. Se tomó un trozo de medio con micelio para pasarlo a una nueva caja de Petri con medio PDA y se incubó a 26° C durante 7 días. Esto se hizo con el fin de purificar el cultivo y asegurar que solo se cultive Fod (figura 2C).

Obtención de cultivos monospóricos de *Fusarium oxysporum*

De los aislamientos obtenidos anteriormente, se tomó un trozo de un cm^2 de medio PDA con micelio. Este se pasó a Erlenmeyer individuales con 50 mL de medio líquido Czapek y se dejó en agitación a 26°C durante tres días.

Pasado este tiempo se realizaron diluciones tomando una alícuota de un mL de medio con hongo y vertiéndola en un tubo de ensayo con nueve mililitros de medio Czapek estéril. Este proceso se repitió 4 veces hasta llegar a una dilución 1×10^{-4} , donde la concentración de conidios es baja.

Posteriormente se tomó una alícuota de 100 μ l de esta última dilución y se dispersó con un rastrillo de vidrio estéril sobre toda la superficie de una caja de Petri con medio PDA. Se incubó a 26°C durante 24 horas, tiempo suficiente para la germinación de las esporas (figura 2D).

Con un microscopio invertido se localizaron estas esporas germinadas y se marcaron con un marcador en la superficie de la tapa de la caja de Petri y se continuó con la incubación a 24°C por otras 24 horas (figura 2E).

En este punto, el micelio de una sola espora es reconocible a simple vista. Con la ayuda de un asa estéril, se recortó un cuadrado de un centímetro cuadrado que contiene el micelio de cada conidio individual. Este cuadrado se sembró en otra caja de Petri con medio PDA fresco y se incubaron a 24°C durante 7 días.

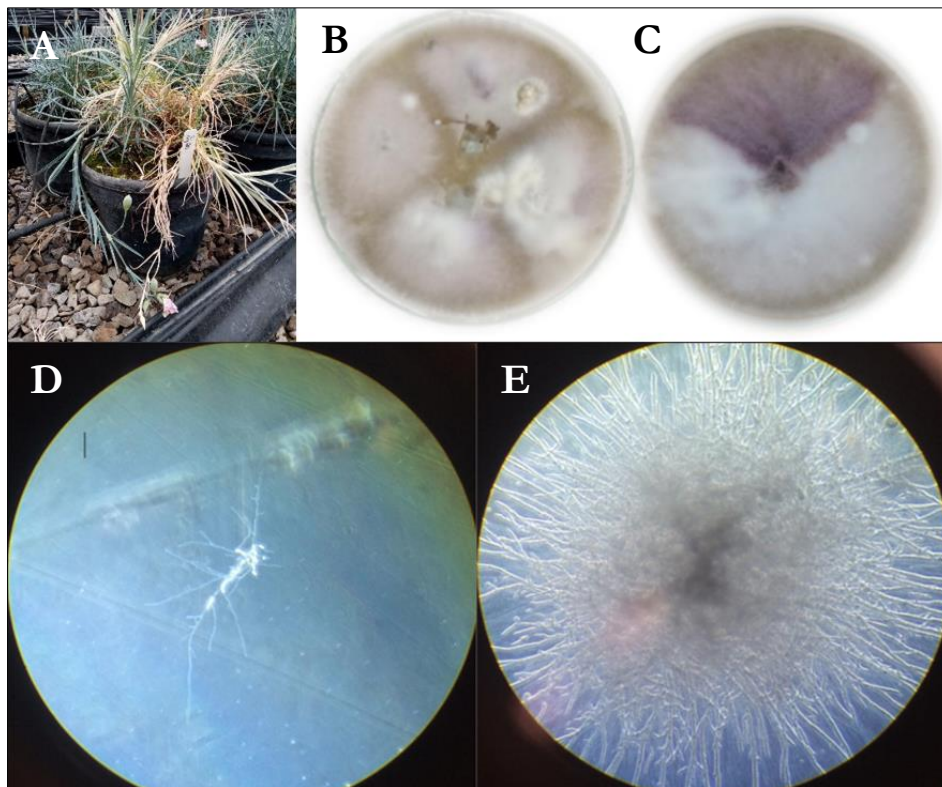


Figura 2: Procedimiento para la obtención del cultivo monospórico de *Fusarium oxysporum*. A) Planta de clavel con síntomas de marchitamiento vascular. B) Micelio de Fod que crece a partir de muestras de tallo de plantas infectadas. C) Primer aislamiento de Fod. D) Espora germinada después de 24 horas. E) Espora germinada a las 48 horas.

Verificación taxonómica de los cultivos monospóricos

La identificación taxonómica de los aislados fue realizada bajo dos criterios. El primer criterio es su morfología macroscópica. El segundo criterio es la morfología de sus macroconidios y microconidios. Para esto se dispuso en una caja de Petri estéril 30 ml de medio agar-agar.

Aparte se tomaron hojas de clavel del invernadero del laboratorio de fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granada. Estas hojas se cortan en trozos y se esterilizan en autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente se dispusieron 4 de estos trozos en las cajas de Petri con el medio agar-agar.

Lo anterior se realizó para estimular la esporulación de macroconidios y la producción de los pigmentos característicos de esta especie. El medio fue inoculado con 20 µL de un medio Czapek con esporas de Fod, vertiendo estos 20 µL sobre discos estériles de papel filtro de cinco

mm de diámetro. Estos discos fueron colocados en el medio de la caja de Petri. En la figura 3A se muestra el micelio aéreo blanco característico de esta especie junto con una pigmentación púrpura también característica.

Para la identificación microscópica se realizó un raspado del micelio aéreo con un asa estéril y se agitó sobre una gota de agua en una lámina para microscopio. Se colocó la laminilla en la parte superior y se observó en el microscopio óptico del laboratorio de microscopía de la Universidad Militar Nueva Granada. Se tomaron fotografías utilizando microscopía de contraste de fases diferencial. En la figura 3B y C se observan respectivamente microconidios unicelulares ovalados y un macroconidio en forma de “banano”.

La macroconidia cuenta con cuatro septos, una célula apical atenuada y una célula basal en forma de “pie” característica única de esta especie. Adicionalmente esta cepa ya ha sido caracterizada molecularmente por trabajos anteriores del grupo de fitopatología molecular de Universidad Militar Nueva Granada.

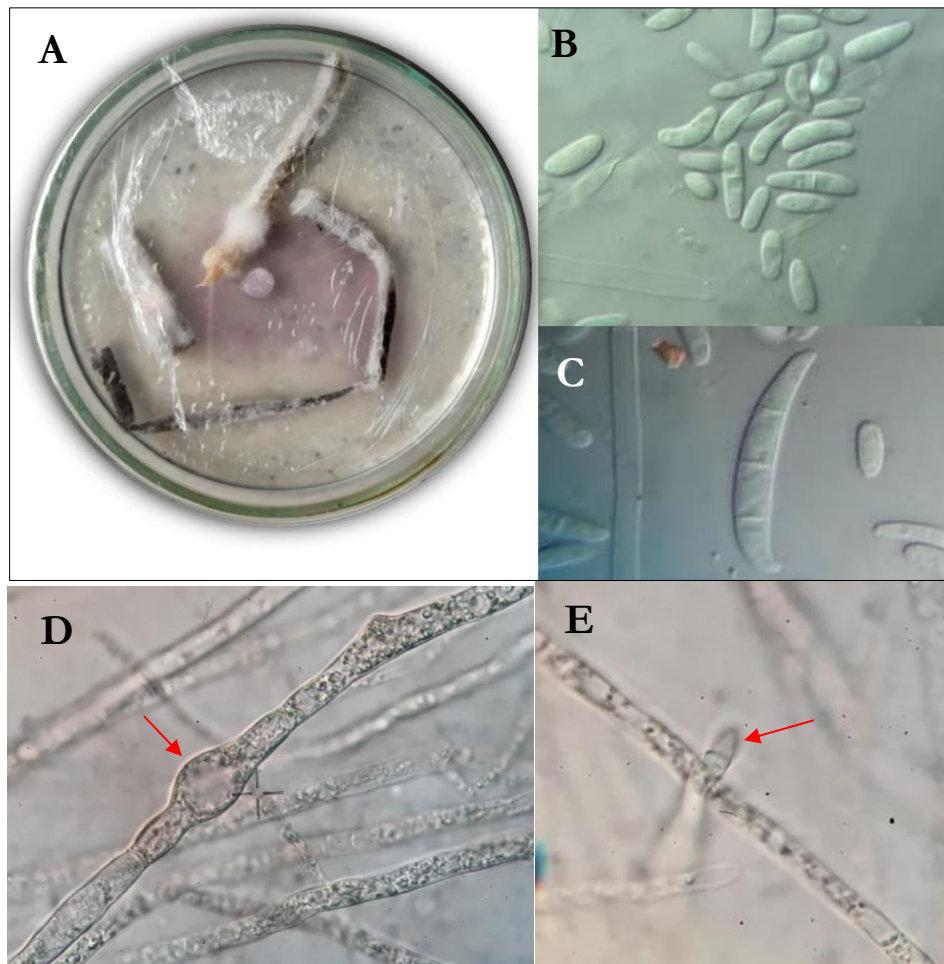


Figura 3: Fotografías de estructuras macroscópicas y microscópicas para el reconocimiento de Fox. A) Características macroscópicas del hongo. B): microconidios unicelulares con formas ovaladas en microscopía de contraste de fases diferencial. C): un Macroconidia multicelular (4 septos) con una célula apical atenuada y una célula basal en forma de “pie” en microscopía de contraste de fases diferencial. D) clamidospora en microscopia de luz. E) Fíalide con un microconidio naciente en microscopia de luz.

Ensayos de elicitación

Se colocaron 2 gramos de células de clavel indiferenciadas por caja de Petri, una caja diferente por cada variedad. Las células fueron dispuestas en el borde de las cajas de Petri con 30 ml de medio MS con Phytigel® como agente gelificante y suplementadas con hormona 2,4-D. Las células se incubaron a 26°C durante 7 días. Pasado este tiempo se inocularon discos de papel filtro de cinco milímetros de diámetro con una alícuota de 20 µL de suspensión de conidios.

Estos discos inoculados se colocaron en las placas Petri correspondientes en el borde opuesto de las células (Figura 4).

Los ensayos duales fueron cultivados a 26°C durante 7 días. Pasado este tiempo se tomó una muestra de las células para realizar la extracción de los miRNA. Se tomaron medidas diarias del crecimiento radial del hongo durante 20 dpi (“days post inoculation”)

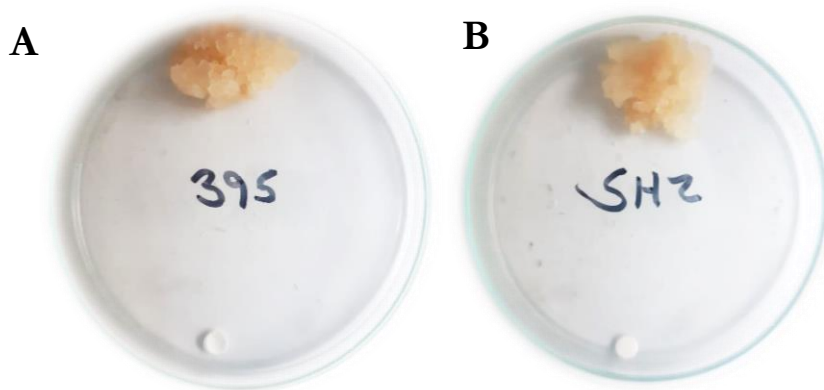


Figura 4: Montaje final de los ensayos duales de elicitación. A) células indiferenciadas de 395 y B) células indiferenciadas de SH2.

Extracción de mRNAs

El mRNA de las células elicidadas y no elicidadas de cada variedad se extrajo y purificó mediante el kit NucleoSpin® RNA desarrollado por MACHEREY-NAGEL, siguiendo el manual de usuario propuesto por la empresa. Se realizó una electroforesis para evidenciar la integridad del RNA aislado y una cuantificación con el sistema Qbit® para confirmar la cantidad del RNA obtenido.

Extracción de miRNAs

El miRNA de las células elicidadas y no elicidadas de cada variedad se extrajo mediante el kit High Pure miRNA Isolation kit desarrollado por Roche, siguiendo el protocolo de dos columnas propuesto en el manual del usuario del kit. La calidad de las extracciones se estableció mediante el bioanalyzer RNA Small RNA chip 2100 llevado a cabo en la empresa Macrogen Inc en Corea del Sur.

Librerías de mRNA y miRNA

Librerías de mRNA:

Para los análisis correspondientes en este estudio, se utilizaron las librerías y datos de mRNA-seq producidos en el año 2019 por el grupo de fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granada. El mRNA extraído de SH2 elicitado y 395 no elicitado fue enviado a la empresa MacroGen Inc. en Seúl Corea, para la elaboración de las librerías transcriptómicas. Por medio del TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit y el secuenciamiento por medio de la plataforma de illumina NovaSeq 6000 utilizando el kit NovaSeq 6000 S4 Reagent. El protocolo para la elaboración de las librerías y secuenciamiento provisto por MacroGen Inc. se resume de la siguiente manera:

- 1) Se aísla el RNA total de la muestra de interés (células).
- 2) Se elimina la contaminación del DNA utilizando DNAsa.
- 3) Se elige el kit adecuado para el proceso de preparación de bibliotecas en función de los tipos de RNA.
- 4) De los pasos anteriores se obtiene el mRNA purificado para secuenciación de lectura corta.
- 5) Se realiza la Transcripción inversa de los fragmentos de mRNA lo que produce secuencias de cDNA.
- 6) Se Ligan los adaptadores en ambos extremos de los fragmentos del cDNA.
- 7) Después de amplificar los fragmentos mediante PCR, se seleccionan los fragmentos con tamaños entre 200 y 400 pb para la secuenciación.

Librerías de miRNA:

Para la construcción de las librerías de miRNA, se enviaron muestras de miRNA de las variedades 395 y SH2 elicitadas y no elicitadas (para un total de cuatro librerías) a MacroGen Inc. en Seúl Corea para la fabricación de las librerías y su secuenciamiento.

El identificador de cada muestra fue 395NE y SH2NE para las muestras no elicitadas o control y 395E y SH2E para las muestras elicitadas. Las librerías fueron preparadas utilizando el kit TruSeq Small RNA Library Prep Kit de Illumina. Se realizó la secuenciación en la plataforma HiSeq 2500 de Illumina. El protocolo para la elaboración de las librerías y secuenciamiento provisto por MacroGen Inc. se resume de la siguiente manera:

- 1) Se aísla el miRNA de una muestra de interés usando un kit apropiado para sRNAs
- 2) Se ponen adaptadores en los extremos 5' y 3' de las moléculas de RNA. El adaptador se liga a los RNA pequeños usando una enzima de ligadura como la ligasa 2 de RNA T4. Los adaptadores también están diseñados para capturar pequeños RNA con grupos fosfato 5' los cuales son característicos de los miRNAs.
- 3) los fragmentos de miRNA con adaptadores ligados se convierten en fragmentos de cDNA por medio de una transcriptasa reversa. Luego estas secuencias se usan en la reacción de secuenciación. A continuación, se realiza la PCR para amplificar el grupo de secuencias de cDNA.
- 4) Los fragmentos de cDNA amplificados se pasan por electroforesis en gel de agarosa. La banda que contiene las moléculas correspondientes a los fragmentos de miRNA con adaptadores ligados, se cortan para la secuenciación posterior. (el tamaño de la biblioteca varía de 145 pb a 160 pb por lo que el tamaño de la librería tiene que estar dentro de este rango de tamaño.

Detección de miRNAs

Los miRNA fueron determinados por el software miRDeep2. Este software tiene en cuenta la expresión y la biogénesis de las posibles secuencias de miRNA obtenidas a partir de las librerías. miRDeep 2 presenta como posibles miRNA secuencias que cumplan los siguientes criterios

- 1 Alineación de las lecturas con el genoma del clavel (la secuencia tiene que estar en el genoma).
- 2 Número de lecturas de miRNA maduro mayor a 10.

- 3 RNAfold de “yes”. (este argumento indica si la secuencia precursora del miRNA tiene una complementariedad mayor al 90%. Esto indica que es posible que esta secuencia pre-miRNA pueda plegarse.)
- 4 Reportes de la posible secuencia de miRNA en la base de datos miRBase (<https://www.mirbase.org/>). Esto solo es necesario para la validación de miRNAs conocidos. Sin embargo, si la secuencia no está en ninguna base de datos, esta se considera como un “novel-miRNA”.
- 5 Al final se asignan valores de puntaje para cada parámetro. El puntaje total o “total score” se determina realizando una suma de todos los puntajes. Se suelen preferir los miRNAs con un puntaje total alto, aunque no existe un parámetro que permita establecer un umbral de confiabilidad.

A continuación, se muestra un ejemplo de un novel-miRNA determinado por el algoritmo miRDeep2:



Figura 5: Resultados del algoritmo de detección de un novel-miRNA. **Caja roja:** cuadro de información del algoritmo de puntuación en miRDeep2. ID provisional: un nombre de miRNA provisional asignado por miRDeep2. Puntaje total: Suma de los puntajes siguientes. Puntaje para lectura(s) de star: (secuencia complementaria al miRNA maduro): los puntajes para las lecturas de star potenciales que se alinean en el genoma como se espera después del procesamiento por la proteína Dicer (verdadero: 3, falso: -1.3). Puntaje para conteos de lecturas: El puntaje se da de acuerdo con el número de lecturas que se encuentran en el genoma. Puntuación para mfe: puntuaciones para la energía libre mínima del precursor potencial. Puntaje para randfold: Puntajes para la prueba de pliegue del precursor en Randfold (verdadero: 1.6, falso: -2.2). Recuento total de lecturas: la suma de los recuentos de lecturas de los miRNA maduros, los loops y las secuencias star. Recuento de lecturas de miRNA maduros: la cantidad de lecturas de miARN maduro en consenso. Recuento de lecturas del loop: la cantidad de

lecturas de las secuencias “loop” en consenso. Recuento de lecturas de star: la cantidad de lecturas de la secuencia star del pre-miRNA. **Caja azul:** estructura secundaria del pre-miRNA. En rojo: región madura de miARN. En morado: región complementaria a la secuencia madura (star). En amarillo: región del loop. **Caja amarilla:** secuencia esperada y observada del pre-miRNA. línea "exp": región madura, loop y star esperada por el algoritmo miRDeep2 a partir del genoma de clavel. Línea "obs": región madura, loop y star observada por resultado de la alineación de las lecturas. **Cuadro morado:** Numero de lecturas por secuencia.

Predicción de los “targets”

Para poder entender como los miRNAs posiblemente están afectando postranscripcionalmente mRNAs de interés, primero es necesario determinar si alguna secuencia de miRNA tiene sitio de unión con algún mRNA. A esto se le conoce como predicción de “targets”. Para la predicción de los mRNA “target” se utilizaron los softwares psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>) por su precisión en la predicción (Srivastava et al, 2014) y RNAhybrid (https://bibiserv.cebitec.unibielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission). Por su uso de la estabilidad termodinámica en la predicción de los targets. Una vez determinados los mRNA “target” se obtiene un híbrido putativo miRNA/mRNA. En este estudio se utiliza el término “híbrido” para referirse a esta unión.

Para realizar la búsqueda de mRNA targets es necesario tener a disposición las secuencias de los mRNA y miRNAs en forma de cDNA en formato FASTA. Estas secuencias se suben a las plataformas de predicción y por medio de diferentes parámetros se obtiene el resultado de las hibridaciones validas determinadas por el software.

Las librerías de mRNA producidas no tienen las secuencias cDNA expresadas en formato FASTA. Sin embargo, en los datos de mRNA-seq de estas librerías están los códigos en Kazusa para cada gen expresado según los datos de mRNA-seq. Por lo que se utilizaron directamente las secuencias de cDNA en formato FASTA de la base de datos Kazusa (<https://carnation.kazusa.or.jp/>). Los mRNAs seleccionados corresponden a 35 genes que han demostrado una variación en su expresión importante ante la elicitación con *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Esto se demostró en trabajos previos realizados en el laboratorio de

fitopatología molecular, de la Universidad Militar Nueva Granada. Estos genes fueron clasificados según su función principal durante la respuesta a Fod. Las categorías son 4: Housekeeping (HK), PRPI (Genes relacionados con proteínas de membrana de uso general); PRPII (Genes relacionados con proteínas de membrana con labores específicas en la respuesta a estrés por patógenos) y relacionados con patógenos (RP) (enzimas y proteínas con labores específicas en la respuesta a estrés por patógenos). En la siguiente tabla se muestra la información de estos genes.

mRNA Kza ID (Dca)	Nombre del gén
18671	alcohol deshidrogenasa
38063	Arginina descarboxilasa
56048	Flavonol 3-O-glucosiltransferasa
54626	Insensible al etileno 3
4247	Antranilato N-benzoiltransferasa
2767	Gen del receptor de etileno
4234	glicosiltransferasa
13751	Fenilalanina amoníaco liasa
11039	Antocianina 5-O-glucosytransferase
10925	Beta-1,3-glucanasa
25028	Glicosil hidrolasa similar a la quitinasa 4
6768	β -glucosidasa glucósido hidrolasa
28123	Aldosa 1-epimerasa
3959	Proteína similar a la taumatina
105	Amilasa α y β
2878	Homólogo a las peroxidasas
31671	Catalasa
18362	Malato deshidrogenasa
4214	Proteína quinasa relacionada con NPK1
31653	Proteína inhibidora de la poligalacturonasa
13044	Proteína fijadora de ácido salicílico
9311	Quinasa similar a un receptor
33327	Similar al factor de iniciación eucariota 5A3
3850	Proteasa de cisteína similar a la papaína
48496	Ribulosa bisfosfato carboxilasa
55984	fructoquinasa
22284	Proteína ribosómica L7
17615	Xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa
8698	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
45609	Proteína putativa no caracterizada
50626	Tonoplast proteína intrínseca gamma
20787	Proteína putativa no caracterizada
62420	Isocitrato deshidrogenasa
52260	lacasa

29035	Proteína putativa no caracterizada
-------	------------------------------------

Tabla 1: Información de los genes estudiados. En la columna 1 (Mrna Kza ID (Dca)) se encuentra el ID de estos genes en la base de datos de Kazusa <https://carnation.kazusa.or.jp/>. En la columna 2 se encuentran los nombres en inglés de estos genes.

Por otro lado, se utilizaron la totalidad de las secuencias de “novel-miRNA” encontradas en las cuatro librerías de miRNA en formato FASTA.

Tanto las secuencias de mRNA como miRNA se subieron a las plataformas de hibridación anteriormente mencionadas. “psRNATarget” que arroja resultados con las hibridaciones teóricamente posibles (híbrido miRNA/mRNA “target”) teniendo en cuenta la accesibilidad del “target” (mRNA objetivo) y la complementariedad de las secuencias miRNA/mRNA.

En el software RNAhybrid se obtienen los gráficos de los híbridos con su valor de estabilidad termodinámica en términos de energía libre MFE= minimal free energy.

En este estudio se considerarán los híbridos con valor de mfe de -10 kcal/mol o menores. Ya que entre más negativo sea el valor de energía libre, más probable es su existencia en la célula.

Cuantificación de la expresión de mRNAs vs miRNAs

Las librerías de mRNA y miRNA producidas proveen datos de expresión en términos de número de lecturas (RNA-seq). Para estandarizar las medidas de expresión se calcularon los TPM (transcripts per million) que permiten la comparación de la expresión. El cálculo de los TPM se realiza aplicando el siguiente cálculo:

$$RC/L(Kb) = RPK$$

$$\sum RPK / 1000000 = SF$$

$$RPK / SF = TPM$$

(RC=read count; L=length; RPK=reads per kilobase; SF= scaling factor)

Solo se obtuvieron datos de expresión de librerías de mRNA de los tratamientos SH2E y 395 NE. Ya que las librerías complementarias (SH2NE y 395NE) no están a disposición.

Validación de los híbridos

Para poder utilizar los híbridos determinados por los softwares psRNATarget y RNAhybrid en análisis posteriores, es necesario aplicar algún criterio de validación. La validación de los híbridos se llevó a cabo comparando la relación entre la expresión de los miRNA con sus mRNA “target”. La relación de la expresión del miRNA con su “target” es negativa en casi la totalidad de casos (Kuhn et al, 2008). Por lo que las parejas de mRNA/miRNA deben mostrar esta relación al comparar su expresión para ser consideradas válidas (Ritchie et al, 2009; Ritchie et al, 2013).

Esta validación fue posible de realizar únicamente para las hibridaciones de 395 NE (no elicitado) y en SH2E (elicitado) ya que no estaban a disposición las librerías de mRNA de los experimentos complementarios (395E y SH2NE).

Análisis estadístico

Parte del análisis estadístico y generación de graficas se llevó a cabo en el software R. De aquí se calculó los z Scores para algunos análisis de expresión diferencial y se realizó el mapa de calor de los híbridos totales. el z score es una medida estadística que permite comparar el valor de alguna variable con el valor promedio de esa variable en una población. Si un coeficiente de expresión (en este caso número de lecturas) es más alto que el promedio de expresión en todas las muestras, este se considera como expresión positiva (en relación con el promedio de expresión para ese gen entre muestras), y se le asigna un número positivo. Por otro lado, si el coeficiente de expresión de un gen es menor al promedio de todas las muestras, este se considera como expresión negativa (en relación con el promedio de expresión para ese gen entre muestras) y se le asigna un número negativo. La ecuación matemática para el cálculo del z score es la siguiente:

$$\frac{(VEI) - (VEP)}{DE}$$

VEI= valor de expresión individual de un gen de cada muestra;
VEP= valor de expresión promedio de ese gen entre muestras;
DE= desviación estándar poblacional.

El resto de las gráficas de expresión de TPM se realizaron en Excel. Las figuras 15 y 16 se realizaron en la página web de Lucidchart (<https://www.lucidchart.com/>).

RESULTADOS Y ANALISIS

Comprobación del fenotipo resistente

Los ensayos duales de la variedad 395 mostraron una reducción importante en el crecimiento del hongo. En la figura 6B se muestra que, en 20 dpi (days post inoculation), las células de la variedad 395 evitan el crecimiento del hongo en el medio. Por otro lado, las células de la variedad SH2 están completamente invadidas por Fod en este punto de la elicitación. Antes del día 6 la tasa de crecimiento del hongo es similar en ambas variedades (figura 6A y B 3dpi). Sin embargo, a 7 dpi el crecimiento del hongo varía aumentando de forma constante en presencia de las células de SH2 y disminuyendo la velocidad de su crecimiento de forma constante en presencia de las células de 395 (figura 6A).

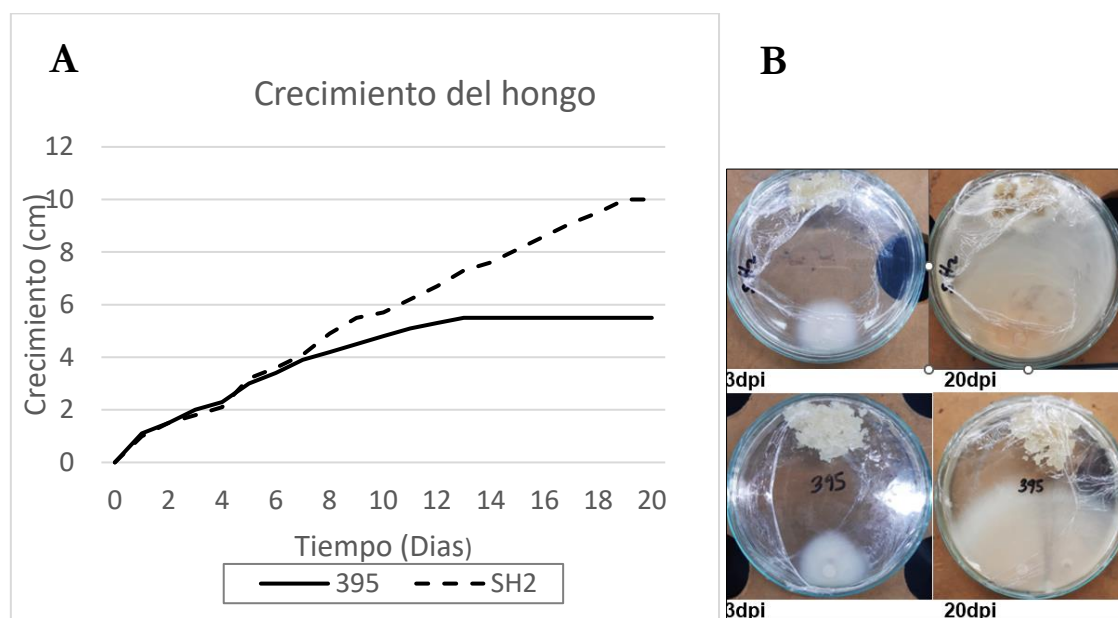


Figura 6: Ensayos de elicitación. A) Gráfico del crecimiento del hongo en cm. B) Fotografías del progreso del crecimiento en ambas variedades 3dpi y 20dpi.

Librerías

<i>ID de la muestra</i>	<i>Lecturas totales</i>	<i>GC %</i>	<i>Q20%</i>	<i>Q30%</i>
<i>395 NE</i>	126,079,428	54.03	97.81	95.23
<i>395 E</i>	145,082,234	54.75	97.43	94.45
<i>SH2 NE</i>	92,037,946	56.47	97.77	95.03
<i>SH2 E</i>	143,375,243	53.45	97.45	94.57

Tabla 2: Estadísticas generales del número de lecturas totales, contenido de GC y calidad de las secuencias Q20 y Q30. El índice Q hace referencia a la probabilidad de error en el secuenciamiento. Q20 es el umbral de error de 1 error cada 100 pb. Q30 es el umbral de error de 1 error cada 1000 pb)

Se obtuvieron lecturas totales de sRNAs más de 90 millones en todas las librerías. En general, las células que estuvieron elicitadas generaron un mayor número de lecturas que las librerías que no están elicitadas (Tabla 2).

De las librerías no elicitadas, 395 muestra el mayor número de lecturas totales frente a SH2. El porcentaje GC en todas las librerías es similar y se encuentra alrededor del 55%. Se obtuvo una calidad Q30 de alrededor del 95% en todas las librerías. Los datos en general muestran homogeneidad en la calidad y diferencias significativas en el número de lecturas totales que corresponden al nivel de expresión total de cada una.

En cuanto a la composición del sRNA total secuenciado de las librerías, el mayor porcentaje es de sRNA genómico (SH2 NE= 55,27%; SH2 E= 77,7%; 395 NE= 87,65%; 395 E= 81,03%). El sRNA desconocido corresponde a secuencias que no tienen correspondencia en el genoma de clavel de Kazusa. En todas las librerías, el sRNA desconocido es el segundo en porcentaje (SH2 NE= 44,24%; SH2 E= 21,48%; 395 NE= 12,09%; 395 E= 18,39%).

Los “novel”-miRNA son las secuencias de interés en este estudio. Estas secuencias corresponden a miRNAs que fueron encontradas en el genoma de clavel de Kazusa, pero no han sido anotadas en bases de datos de miRNAs como miRNABase, con alguna función reportada en clavel u otras plantas modelo. Estas secuencias son las más escasas en las librerías (SH2 NE= 0,49%; SH2 E= 0,81%; 395 NE= 0,26%; 395 E= 0,58%). Así como en el número

total de lecturas el porcentaje de “novel miRNA” es mayor en las librerías producidas a partir de las células elicidadas.

Búsqueda de “novel”-miRNAs

Los resultados del software miRDeep2 muestran 424 secuencias de “novel”-miRNA en total entre las cuatro librerías. La variedad resistente 395 produjo un número similar de miRNAs antes y durante de la elicitación, 35 y 39 secuencias respectivamente. Por otro lado, el número de miRNAs producido por la variedad susceptible SH2 es más alto que el número producido por 395 (85,45% más alto antes de la elicitación y 68,80% más alto durante de la elicitación. 225 y 125 secuencias respectivamente). Sin embargo, el número de miRNAs disminuye en SH2 después del contacto con el patógeno (disminución del 44,45%) a diferencia de 395 que el número de secuencias permanece similar entre tratamientos.

miRNAs en común entre SH2 y 395

Como análisis adicional de lo producido por las librerías de miRNA, se buscaron secuencias que estuvieran repetidas entre las librerías de cada variedad con sus respectivos tratamientos. Se encontraron cuatro miRNAs que se encuentran en las 4 librerías (figura 7A). Esto permite obtener secuencias conservadas que tienen una validación extra frente a otras secuencias menos conservadas.

Para comprobar si estos miRNAs responden al estrés biótico por Fod, se comparó la expresión diferencial de estos miRNAs entre variedades y tratamientos (figura 8). Los Z scores muestran una alta expresión diferencial de estos miRNAs. Por un lado, antes de la elicitación estos miRNAs están positivamente expresados en 395 y negativamente expresados en SH2. No obstante, durante la elicitación esta observación se invierte.

Tres de estos novel miRNAs no obtuvieron un gen “target” dentro de los 35 genes evaluados por el software psRNATarget, por lo que la identidad de los genes que hibridan no se conoce. Los ID provisionales dados por miRDeep2 de estas 3 secuencias son: DF341055.1, DF341951.1 y DF347843.1. La única secuencia de miRNA que tuvo un “target” es DF340870.1. Este novel miRNA se hibrida al gen “target” EIN3 (ethylene insensitive 3). Para facilitar el reconocimiento de estos miRNAs se cambiaron los ID de estas secuencias. En la

figura 7A se muestran las secuencias pre-miRNA con los códigos MIRcla-1, MIRcla-2, MIRcla-3, MIRcla-4 respectivamente.

Búsqueda de mRNA “target”

Las hibridaciones obtenidas a partir de los softwares de predicción de “targets” están resumidas en la figura 7B. En total se predijeron 26 mRNAs de los 35 analizados como posibles “targets” de 113 miRNAs de los 424 generados por las librerías. La figura 7B muestra que el control postranscripcional en SH2 es fuerte en ambos tratamientos. Con una proporción de 2,7 miRNA/mRNA en el tratamiento NE y de 2,2 en el tratamiento E. Por otro lado, 395 tiene menos control postranscripcional. Con una proporción de 1,4 miRNA/mRNA en el tratamiento NE y de 2,3 en el tratamiento E. Esto genera 2 grupos según el tratamiento. El primer grupo es SH2NE y SH2E y el segundo es 395NE y 395E. Mostrando un comportamiento en el control postranscripcional diferencial entre variedades.

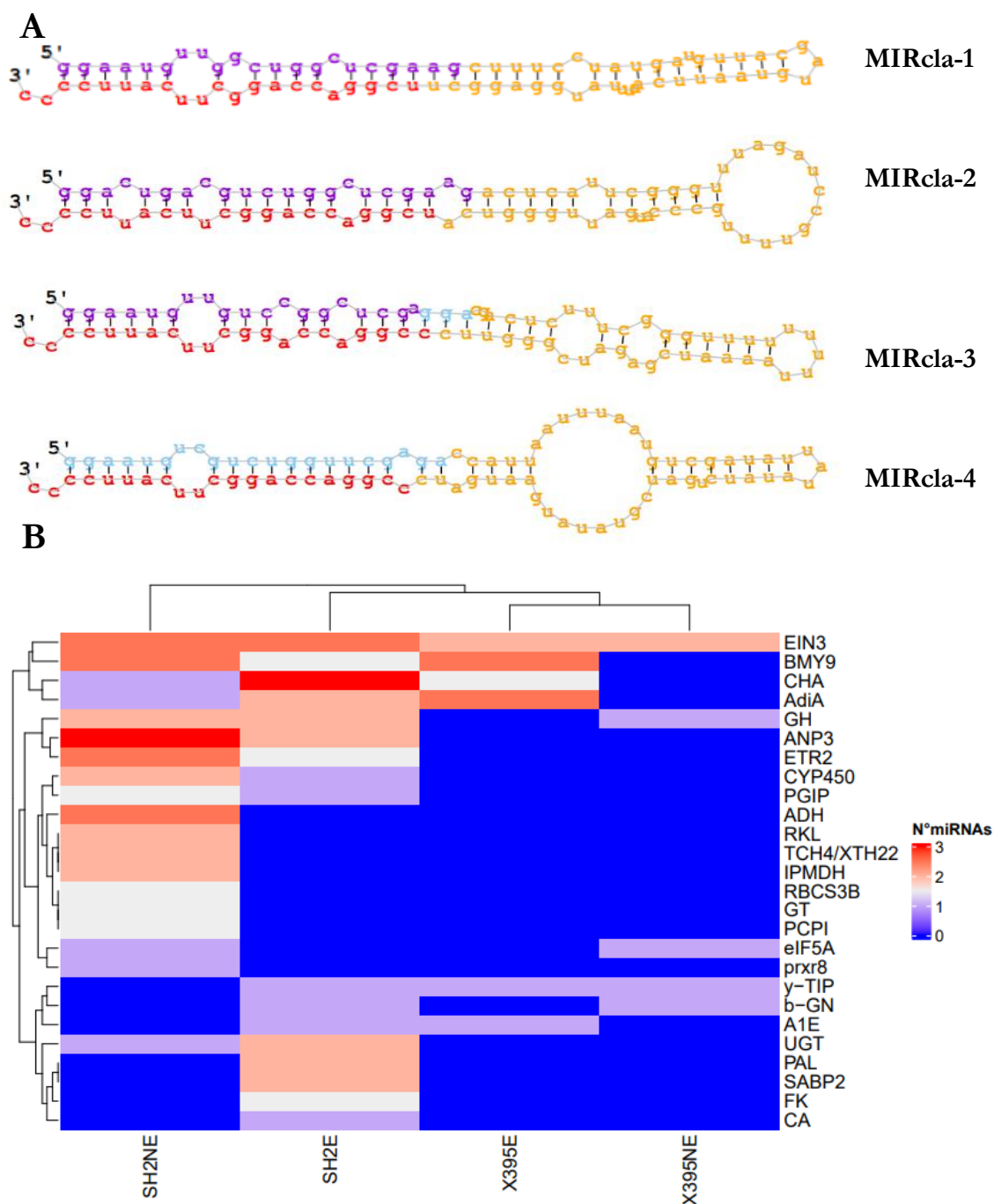


Figura 7: A) secuencias precursoras (pre-miRNA) de “novel miRNA” conservados en las cuatro librerías. B) Mapa de calor de todas Las hibridaciones obtenidas por el software psRNATarget para cada uno de los tratamientos. Eje y derecha nombre de los mRNA “target”. Eje x inferior nombre de la variedad con su respectivo tratamiento.

Validación de los mRNA “target”

Se compararon los niveles de expresión miRNAs/mRNA de los híbridos (Figura anexa 1 y 2). Se encontró que el 88,24% de los híbridos producidos en SH2E muestran una relación negativa, entre la expresión del mRNA “target” y los miRNAs que lo controlan.

Sin embargo, dos de estos genes no parecen ser sensibles a la expresión de los miRNAs. Estos genes son: FK (fructokinase) y A1E (Aldose 1-epimerase). La expresión (miRNAs/mRNA) es similar en estos dos casos (figura anexa 1).

Los híbridos producidos en 395 NE, muestran en un 100% la relación negativa en la expresión miRNAs/mRNA. Por lo que la expresión de todos los mRNA “target”, es sensible a la expresión de los miRNAs asociados por el software psRNATarget (figura anexa 2)

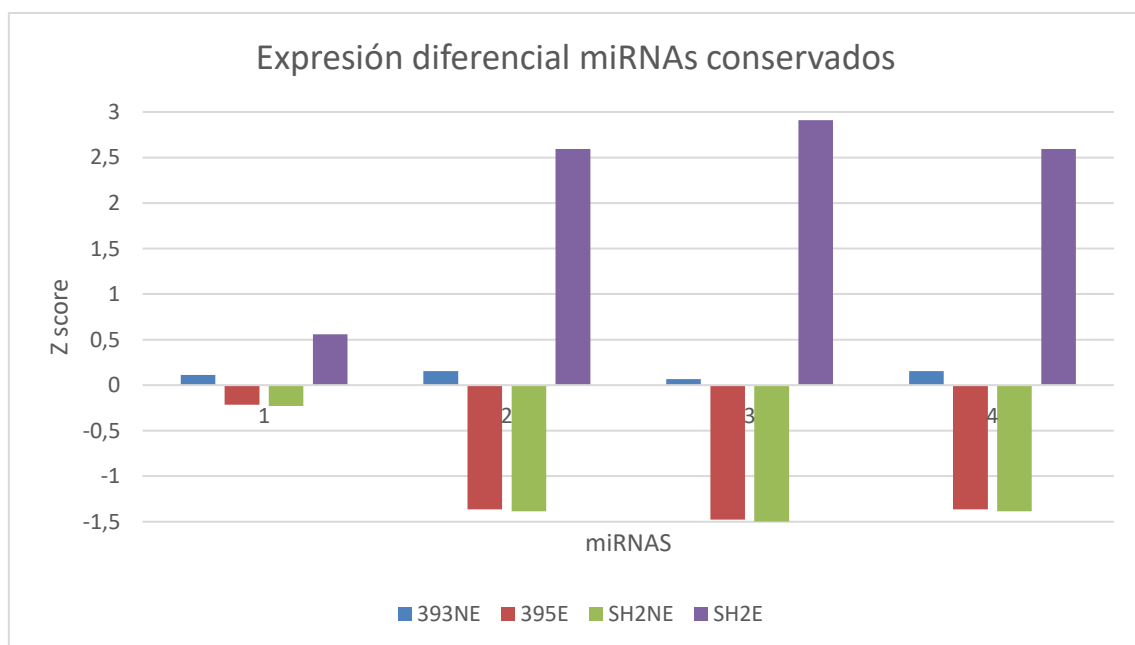


Figura 8: Expresión diferencial de los miRNAs encontrados en común entre tratamientos en términos de Z score. Los números 1, 2, 3 y 4 hacen referencia a los miRNA MIRcla-1, MIRcla-2, MIRcla-3 y MIRcla-4 respectivamente.

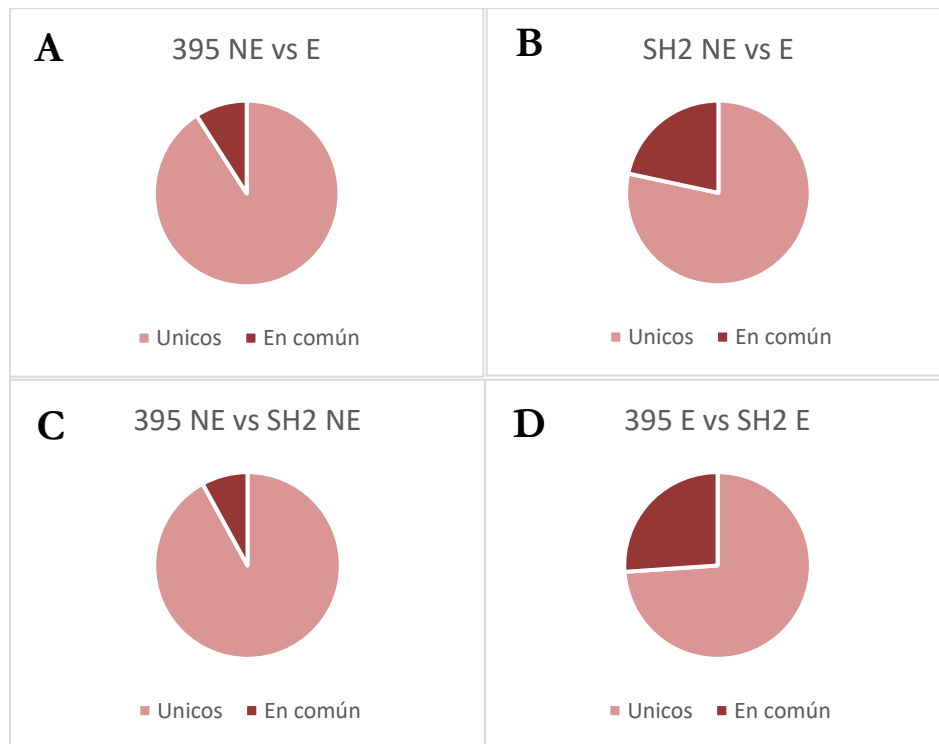


Figura 9: Composición de genes “target” organizados por únicos de cada librería y en común entre librerías. A y B) comparación de composición de genes “target” entre tratamientos. C y D) Comparación de genes target entre variedades.

Una vez validados los híbridos, es necesario observar los cambios en la composición de los mRNA “target” hibridados en diferentes casos. Esto permite conocer el perfil de genes regulados postranscripcionalmente en cada caso y como esto puede afectar la respuesta ante la elicitación. Para hacer esta comparación, se organizaron los mRNA “target” en dos grupos. El primer grupo es misma variedad con diferente tratamiento (figura 9 A y B) y el segundo grupo es diferente variedad con mismo tratamiento (figura 9 C y D). Posteriormente se calcula el porcentaje de mRNA “targets” que son únicos entre los elementos de cada comparación. También se calcula el porcentaje de mRNA “targets” que se comparten. La composición de los mRNA “target” cambia ampliamente entre grupos. En la figura 9 A y B se ve que tanto en 395 (NE y E) como en SH2 (NE y E) la mayoría de los mRNA “target” son únicos de cada elemento (91% en 395 y 77% en SH2).

Por lo que la composición de genes que están siendo controlados postranscripcionalmente, cambia en el momento de la elicitación en ambas variedades. Por otro lado, en la figura 9 C se

muestra que los genes que están siendo controlados postranscripcionalmente entre mismo tratamiento (NE), también son significativamente diferentes antes de la elicitación (91% de genes únicos de cada variedad y solamente 9% de genes compartidos entre variedades).

No obstante, durante la elicitación se aumenta considerablemente el porcentaje de genes que se comparten entre variedades (figura 9D, aumento del 9% al 26%). Aunque aún son mayoría los genes únicos de cada variedad en la elicitación (74%).

Relación del control postranscripcional con el mecanismo de respuesta

Como existe una variación importante en la composición de los genes regulados postranscripcionalmente en diferentes casos, es conveniente observar cuales son los genes que conforman estas variaciones. Para esto se clasificaron los 26 mRNA “Target” en 4 categorías funcionales. Una vez categorizados de acuerdo con su función, se pueden observar los patrones en el cambio del porcentaje del control postranscripcional de cada categoría antes y después de la elicitación. SH2 NE muestra que, el 60% de los genes controlados postranscripcionalmente son de las categorías PRPI, PRPII y HK (20% de cada categoría). Mientras que, el 40% de los genes controlados son de RP (figura 10 B).

Por otro lado, el perfil del control postranscripcional de 395 NE es diferente. En esta variedad, si bien el 20% de los genes controlados son de PRPI al igual que en SH2 NE. No hay control para genes PRPII y el porcentaje de genes controlados de la categoría HK, son el doble que en SH2 NE (40%) (figura 10 A).

Sin embargo, en el momento de la elicitación, el patrón del perfil del control postranscripcional de ambas variedades es similar (figura 10 C y D). Se aumenta el porcentaje de genes controlados de la categoría PRPII (de 20% a 27% en SH2 E y de 0% a 34% en 395 E). A su vez se mantiene un alto porcentaje de genes controlados provenientes de la categoría RP. Con un ligero aumento en ambas variedades. En cuanto a los genes controlados de las categorías PRPI y HK, el porcentaje disminuye considerablemente en ambas variedades durante la elicitación (figura 11C y D). También vale mencionar que el patrón de SH2 NE es muy similar al patrón de ambas variedades elicidadas (figura 10 B vs C y D).

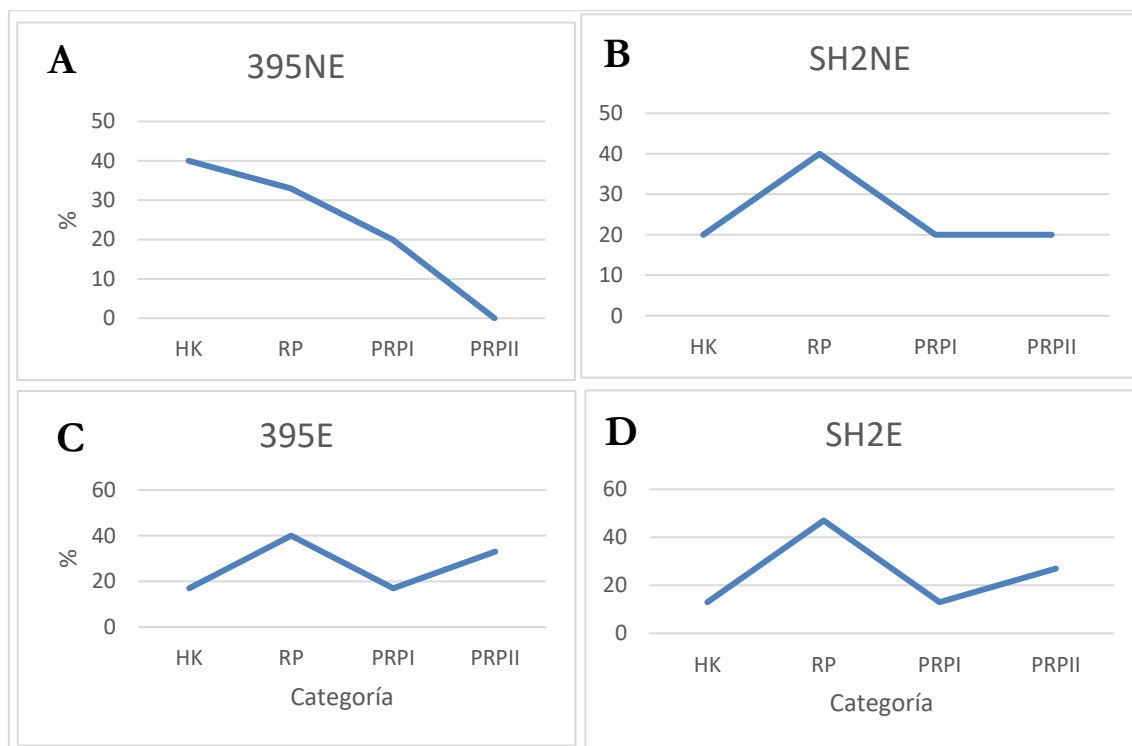


Figura 10: patrón de cambio en el porcentaje de genes controlados postranscripcionalmente por categoría funcional de cada variedad con su respectivo tratamiento. A y B) variedades no elicítadas. C y D) variedades elicítadas.

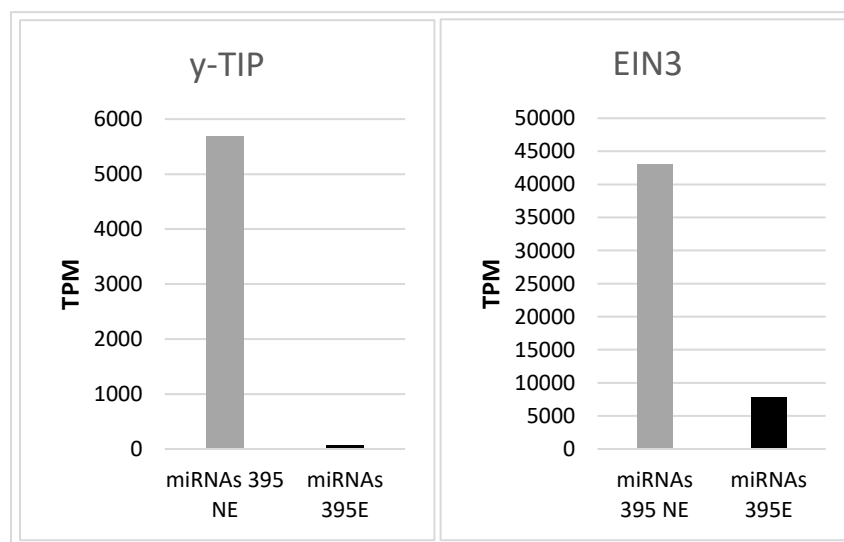


Figura 11: Expresión de miRNAs que controlan genes "target" en común entre tratamientos (antes (NE) y después de la elicitación (E)) de la variedad 395.

A pesar de que la mayoría de los genes “target” son únicos de cada variedad y tratamiento (figura 9). Hay algunos que están siendo controlados en común antes y después de la elicitación de ambas variedades. Por lo que es importante observar si existe una regulación postranscripcional diferencial entre estos genes también.

En el caso de la variedad 395 los genes controlados postranscripcionalmente en común son EIN3 y γ -TIP. Los miRNAs que controlan estos genes muestran una alta expresión antes de la elicitación (figura 11). No obstante, después de la elicitación su expresión disminuye considerablemente.

Por otro lado, la variedad SH2 comparte un mayor número de genes “target” por tratamiento. Estos genes son: GH, CH, ANP3, AdiA, EIN3, UGT, BMY9 y CYP450.

En este caso, también se observa una expresión negativa entre tratamientos de los miRNAs asociados a estos genes. Todos los genes “target” a excepción de CH y EIN3 tienen expresión de sus miRNAs altos antes de la elicitación y disminuyen considerablemente después de la elicitación (figura 12).

Mapas de control postranscripcional

A pesar de que se compartan genes controlados postranscripcionalmente entre variedades, los miRNAs que los controlan son diferentes tanto en número como en secuencia. Por lo que no solamente hay un cambio en la expresión de los miRNAs, sino que hay un cambio en la naturaleza del control postranscripcional de estos genes.

En las figuras 13 y 14 se ilustra este cambio. En el caso de 395, EIN3 está siendo controlado por tres miRNAs antes de la elicitación, mientras que después de la elicitación solo está siendo controlado por dos miRNAs. Esto ocurre en el resto de mRNA “target”.

Por otro lado, la figura 13 muestra la simplicidad del mecanismo de regulación génica en la variedad 395. De la misma manera la figura 14 muestra la complejidad del mecanismo de control postranscripcional de la variedad SH2.

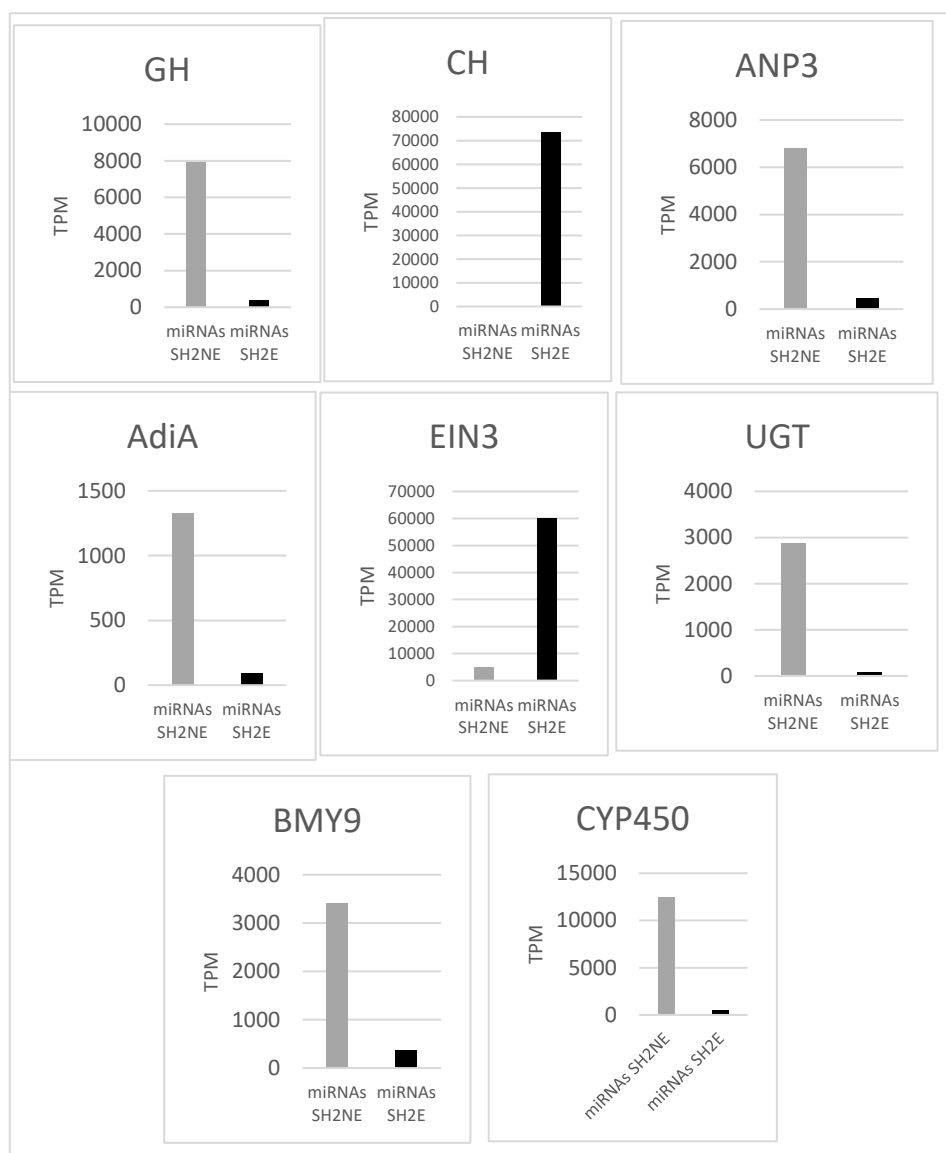


Figura 12: Expresión de miRNAs que controlan genes “target” en común entre tratamientos (antes (NE) y después de la licitación (E)) de la variedad SH2.

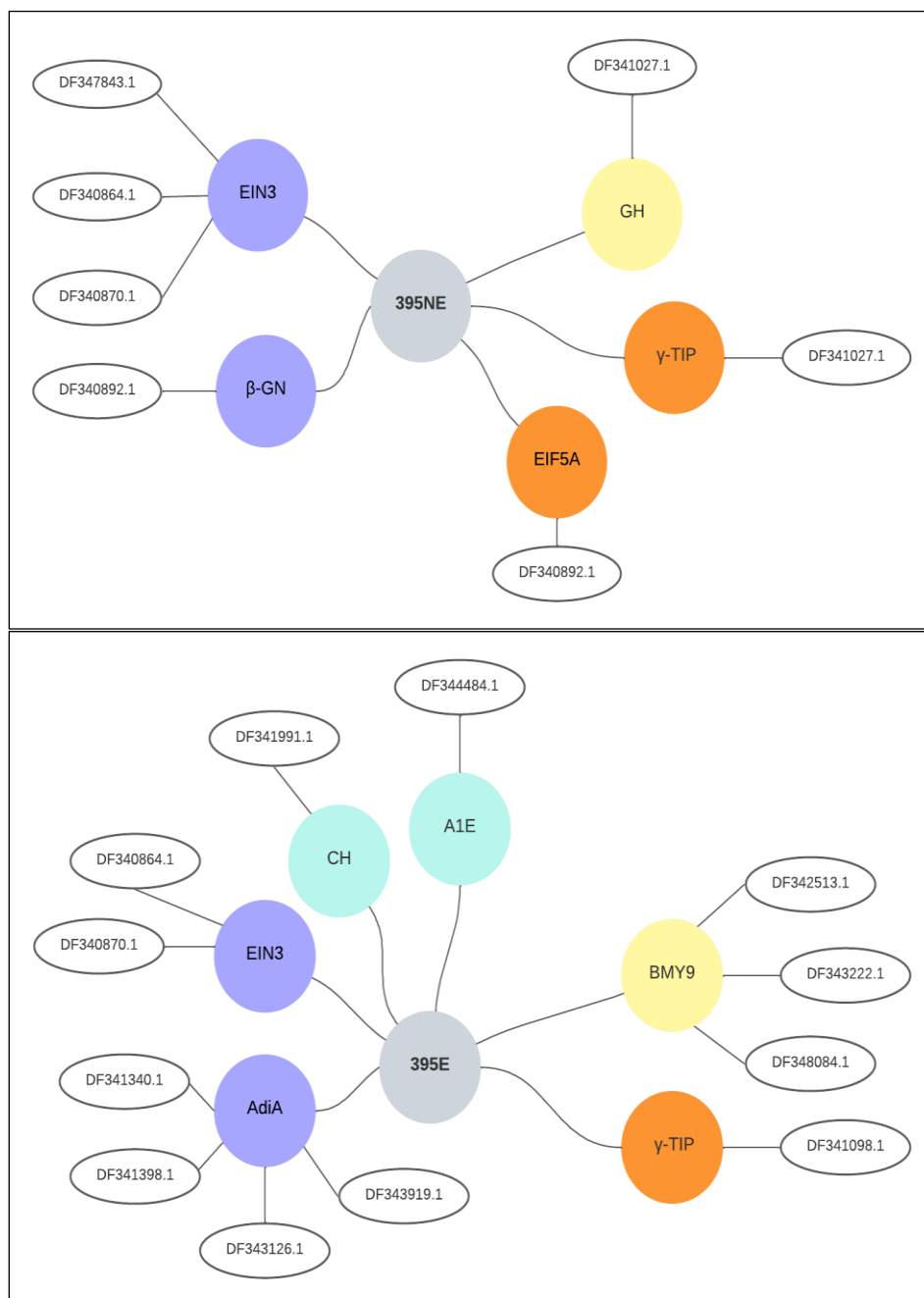


Figura 13: Mapa ilustrativo del mecanismo del control postranscripcional de la variedad 395. A) Antes de la elicitación (NE). B) Después de la elicitación (E).

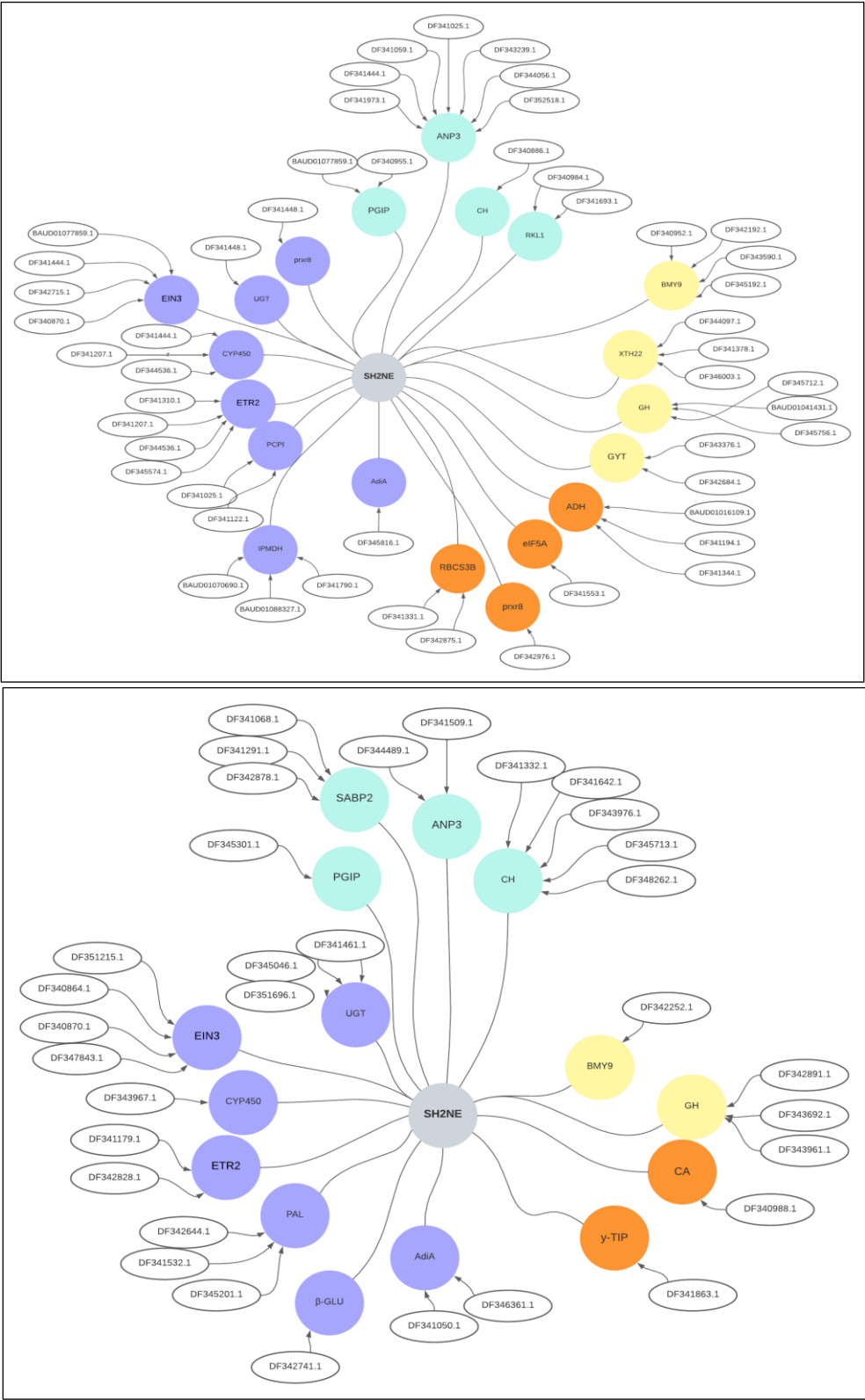


Figura 14: Mapa ilustrativo del mecanismo del control postranscripcional de la variedad 395. A) Antes de la elicitación (NE). B) Después de la elicitación (E).

DISCUSIÓN

Comprobación del fenotipo resistente

La interacción química entre Fod y las células de clavel de las dos variedades muestra el resultado esperado. 395 es capaz de detener el crecimiento del hongo sin tener un efecto visible en el estado general de las células. Por otro lado, SH2 es incapaz de controlar el avance de Fod y su color cambia ligeramente a un amarillo más oscuro, mostrando fenolización de las paredes celulares.

Esto es semejante a lo observado en el estudio de Arai y Takeguchi en 1993 y por Buiatti et al en 1985, en donde al momento del contacto con elicitores de Fod (principalmente ácido fusárico) las células susceptibles cambian de color y su crecimiento se ve afectado. Mientras que, las células resistentes no parecen tener un efecto importante ante el elicitor.

Más recientemente, en el estudio de Santos-Rodríguez et al en 2021 se muestra que, en plantas resistentes de clavel no hay una diferencia significativa en el índice de severidad entre las plantas elicidadas y no elicidadas. mientras que, en las plantas susceptibles se presentan diferencias en el índice de severidad al momento de la elicitación. Esto confirma el fenotipo resistente y susceptible de nuestras variedades de estudio.

Librerías

Nuestras librerías obtuvieron lecturas totales superiores a los 90 millones en todos los casos. El índice Q30 es mayor al 94% en todas las librerías. A pesar de que no existen librerías de miRNA en clavel que permitan una comparación más precisa. En el estudio de Hao y colaboradores en 2017 se ve que la calidad de sus librerías de miRNA de *Paeonia lactiflora* es cercano al 95%. Lo cual es una calidad similar a la que tienen nuestras librerías. Sin embargo, hay una diferencia en el número total de lecturas. Si bien en nuestras librerías la cantidad mínima de lecturas es de 90 millones, en el trabajo de Hao y colaboradores este número es cercano a los 20 millones. Lo que indica una mayor expresión en nuestras librerías.

Hay una diferencia del 27% en el número total de lecturas entre las librerías de las variedades no elicítadas. Siendo SH2 la variedad con el menor número de lecturas. Esto muestra que hay una mayor expresión de sRNAs por parte de 395.

Sin embargo, la figura 7B muestra que SH2 presenta mayor número de secuencias de miRNA. Esto significa que 395 tiene menor diversidad de miRNAs que produce. Mientras que, SH2 es más diverso en miRNAs que 395 pero su expresión en general de sRNAs es menor.

Sin embargo, en el momento de la elicitación el número total de lecturas entre variedades es significativamente similar (Tabla 2). Esto muestra que el esfuerzo en la expresión de sRNAs se aumenta en SH2 y llega al mismo nivel que la expresión de 395. Aunque las diferencias en diversidad de miRNAs se mantienen.

En general, los “Novel-miRNA” representan menos del 1% del sRNA total encontrado en las muestras. Esto corresponde a 250 secuencias en SH2 NE; 35 secuencias en 395 NE; 125 secuencias en SH2 E y 39 secuencias en 395 E.

En comparación, en el estudio de Hao y colaboradores en 2017 solo se obtuvieron 4 secuencias de “novel-miRNA”. Esto muestra que nuestros experimentos de secuenciación fueron más exitosos en la búsqueda de estos “novel-miRNA”. Aunque esto puede ser por falta de librerías de miRNA de referencia en clavel.

Búsqueda

La alta variedad de miRNAs expresados por SH2 indica un mayor control postranscripcional mediado por miRNAs en esta variedad (figura 7B). Mientras que, en promedio 395 expresa 70% menos tipos de miRNA. Estas observaciones son difíciles de comparar. Ya que los estudios comparativos en la producción de miRNAs entre variedades resistentes y susceptibles a algún estrés, son escasos o no se centran en esta diferencia.

Sin embargo, de acuerdo con el estudio de Paul y colaboradores en 2018 existen cambios en la acumulación de miRNAs entre variedades de *Arabidopsis* con diferentes tolerancias al estrés salino. Por lo tanto, es posible encontrar las mismas diferencias en variedades con diferentes tolerancias a Fod.

Una posible hipótesis que da explicación al alto número de miRNAs de SH2, es que posiblemente esta variedad carece de mecanismos de control postranscripcional especializados. Esto hace que la planta tenga que controlar un mayor rango de genes para poder estabilizar su ambiente químico de manera general y ante el estrés biótico causado por Fod. Mientras que, 395 tiene mecanismos de control postranscripcional especializados. Esto le permite ser más eficiente y simple en el momento de controlar genes ante diferentes estímulos. Sin embargo, es necesario realizar más trabajos sobre este tema, para comprobar esta hipótesis.

La proporción miRNA/mRNA de los híbridos es en promedio de 2,2 miRNA/mRNA. Esto es consistente con lo encontrado en el estudio Chen y colaboradores en 2012, en donde se muestra una proporción de 2-4 miRNAs/mRNA de la especie *P. beijingensis* en novel-miRNA hibridados con genes de respuesta a estrés por patógenos.

Antes de la elicitación, 395 tiene una expresión positiva en miRNAs en común con SH2, mientras que SH2 tiene una expresión negativa (figura 8). No obstante, en el momento de la elicitación, este comportamiento cambia. Siendo SH2 ahora el que tiene una expresión positiva y 395 una expresión negativa en estos miRNAs en común. Esto mismo fue observado por Kulcheski y colaboradores en 2011, en donde las variedades menos tolerantes a la sequía expresaban en mayor cantidad miRNA en común que las variedades más tolerantes. Según el autor, estos miRNAs controlan genes fundamentales para la respuesta ante este estrés abiótico. Por lo que el alto control postranscripcional de estos genes mediado por miRNAs de las variedades menos tolerantes, podría reprimir la producción de proteínas importantes. Esto puede ser la causa principal a su sensibilidad a la sequía. Esto mismo parece estar ocurriendo con el estrés biótico por Fod.

A pesar de que no se encontraron los mRNA “target” para los miRNAs: MIRcla-1, MIRcla-2 y MIRcla-3, si se tiene la identidad del gen “target” del miRNA MIRcla-4 el cual es el gen EIN3.

EIN3 funciona como un promotor del factor de transcripción ERF1. Que promueve la transcripción de genes PR (“pathogen related”) en la ruta del jasmonato-Etileno (JA/ET). Ruta la cual se activa como respuesta al estrés por patógenos en *Arabidopsis* (Huang et al, 2016).

Esto significa que, en el momento de la elicitación hay mayor expresión de EIN3 en 395. Mientras que, en SH2 la expresión de EIN3 se reduce. Afectando negativamente la expresión de genes PR en la variedad susceptible.

Encontrando la identidad de los otros genes “target”, se podría dar una visión más completa de como la inhibición de la transcripción de estos genes, afecta la relación con Fod.

Validación

Según Riolo y colaboradores en 2020 tres criterios tienen que ser cumplidos para considerar 100% valido un híbrido miRNA/mRNA. El primer criterio es que se tiene que demostrar la co-expresión del miRNA con su respectivo mRNA.

Esto se suele llevar a cabo por medio de experimentos de RNA-seq como los realizados en este estudio, en donde se comprobó la co-expresión de todos los miRNAs con sus respectivos mRNA “target”.

El segundo criterio es que se tiene que demostrar la relación física entre un miRNA y su mRNA “target”. Esto se suele llevar a cabo por medio de experimentos como los Northern blot. En este estudio solo se comprobó su relación mediante la estabilidad termodinámica del híbrido dado por el software RNAhybrid. Por lo que, para satisfacer por completo este criterio, es necesario realizar experimentos accesorios.

El tercer criterio es demostrar el efecto del miRNA en la expresión del mRNA o producción de la proteína que está controlando. En este estudio se demuestra que una alta expresión de un miRNA está correspondida con una baja expresión de su gen “target” y viceversa (Figuras anexas 1 y 2).

Esto es consistente en todos los casos con dos excepciones (figura anexa 1 graficas en tonalidad naranja). En estos dos casos el mRNA target no parece ser sensible a la expresión de sus miRNAs.

Sin embargo, una posible causa de esto es que según el software psRNATarget estos miRNAs no cortan su “target” (cleavage), sino que, su represión se produce por la inhibición de la traducción de la proteína. Por lo que, en el momento de la extracción es posible tener mRNA

de estos genes y que la reducción se presente en la producción de su proteína asociada. Esto explica los resultados observados. Por lo tanto, la comparación ideal para comprobar la relación entre un miRNA y su mRNA “target” es comparando la producción de miRNA con producción de la proteína del mRNA “target” (Huang et al, 2010).

Relación del control postranscripcional con el mecanismo de respuesta

La composición de genes “target” controlados entre NE y E de la misma variedad, es diferente. Esto quiere decir que, los mRNA controlados postranscripcionalmente de ambas variedades cambia en el momento del estrés biótico producido por Fod (figura 9).

Para poder entender estas diferencias, se construyó la gráfica 10. La grafica 10 C y D muestra que el perfil de control postranscripcional durante la respuesta es similar en ambas variedades. Esto es, reducir el control sobre genes PRPI y HK y aumentar el control sobre genes PRPII y RP al momento de la elicitación.

A simple vista esto parece contradictorio. Ya que se estaría hablando de mayor represión en la transcripción de genes de respuesta, cuando se exponen las células a Fod. Sin embargo, nuestros hallazgos son similares a los encontrados por Barciszewska-Pacak y colaboradores en 2015. En donde al momento de un alto estrés (salinidad, sequia, calor etc.) la producción de miRNAs aumenta el doble o más. Lo cual también aumentó el número de híbridos con genes “target” involucrados en la respuesta a estos estreses.

Este fenómeno sugiere que, el control postranscripcional mediado por miRNAs no se basa únicamente en la represión postranscripcional de un gen, sino también en el ajuste de la proporción de expresión de genes en respuesta a un estímulo. En la revisión de Michlewski y Cáceres en 2019 sobre este tema, este fenómeno se describe como “un ajuste fino de la expresión génica” durante procesos como el desarrollo y funciones celulares en general. Este término también se menciona en el trabajo de Nair y Manickavelu del 2020. Esto significa que el control postranscripcional mediado por miRNAs de estos genes es un ajuste multigenico y da como resultado una expresión diferencial de diferentes genes según cada variedad. Este mecanismo resulta en una mezcla de compuestos químicos y proteínas con diferentes niveles de expresión de acuerdo con la variedad y al estímulo en el que se encuentra.

Por otro lado, los miRNAs que controlan postranscripcionalmente genes “target” en común, también muestran expresión diferencial entre tratamientos (figura 11 y 12). Estos resultados indican que el nivel de expresión de estos miRNAs es sensible a la elicitación.

En la mayoría de los casos los niveles de expresión de estos miRNA bajan al momento de estrés por Fod. Esto es contrario a lo observado por Liu y colaboradores en 2020, en donde al inducir estrés por cadmio, los miRNAs asociados a genes de respuesta fueron expresados positivamente con respecto al control, esto tanto en variedades sensibles como tolerantes.

Sin embargo, en el estudio de Cao y colaboradores en 2018 se muestra que los miRNAs asociados con genes de respuesta a ambientes alcalinos, están positivamente expresados en el momento del estrés. Mientras que, los miRNAs asociados con genes de respuesta al estrés salino están negativamente expresados en el momento del estrés. Esto indica que dependiendo del tipo de estrés la expresión de los miRNAs asociados puede ser positiva o negativa.

En el estudio de Tomkowiak y colaboradores del 2020 se muestra que los miRNAs asociados al gen de resistencia Lr46 al patógeno *Puccinia triticina* en tomate, están negativamente expresados ante el contacto con el patógeno. El autor sugiere que esta disminución de la expresión del miRNA permite una mayor expresión del gen Lr46 en variedades resistentes de tomate. Por lo que el estrés por patógenos es un fenómeno que depende de la expresión negativa de miRNAs al momento del contacto con el patógeno.

En la variedad SH2 E los miRNAs que controlan los genes CH y EIN3 tienen una expresión positiva en comparación a SH2 NE, sugiriendo una represión de estas proteínas. El rol de EIN3 en la resistencia ya fue mencionado anteriormente en la discusión. Por otro lado, CH (quitinasa) es un gen de la categoría PRPII. por lo que la producción de esta proteína tiene un rol importante en la defensa. Este rol es el de degradar la quitina de las paredes celulares de diferentes hongos patógenos como Fod. Una baja expresión de este gen puede conducir a una pobre detención del crecimiento fúngico (Jain y Khurana, 2018). Lo anterior demuestra que, a pesar de que el patrón de control postranscripcional sea similar en ambas variedades en la elicitación (figura 10 C y D), los genes que se están controlando y la intensidad con la que se controlan es diferente. Sugiriendo que la clave de la resistencia de 395 no es su mecanismo de respuesta. Sino que este está en la especificidad de los genes que controla y en el momento

oportuno para controlarlos. Esto mismo fue encontrado por Salcedo y colaboradores en 2021 en donde las variedades resistentes de maíz producen bajos niveles de genes relacionados con la resistencia a *Fusarium graminearum* antes de ser atacadas. Al momento del ataque con el patógeno, los niveles de estos genes se aumentan. Mientras que, las variedades susceptibles mantenían una alta expresión de estos genes antes y después del ataque con el patógeno. Los autores de este artículo llaman a este fenómeno como “la modulación temporal de la expresión génica”. Esto se da tanto en genes directamente relacionados con la defensa a patógenos como en genes no directamente relacionados, pero muestran una expresión diferencial al contacto con el patógeno.

CONCLUSIONES

En conclusión, se generaron librerías de miRNAs con calidad suficiente para realizar búsqueda de híbridos miRNA/mRNA de 35 genes sensibles a la elicitación por Fod. Fue posible validar completamente estos híbridos por dos de los 3 criterios de validación. Es necesario realizar experimentos de Northern blot para comprobar el criterio número dos que corresponde a la relación física de los híbridos miRNA/mRNA. Se encontró la relación entre el control postranscripcional mediado por estos miRNAs con el mecanismo de respuesta de ambas variedades. Los resultados apuntan a que el fenotipo resistente de 395 se da por un mejor direccionamiento del control postranscripcional de genes apropiados. Y en la temporalidad del control postranscripcional. Se generaron gráficos ilustrativos del control postranscripcional de ambas variedades (figura 13 y 14). Que muestran la diferencia en complejidad entre ambas variedades. Se proponen un total de 84 “novel-miRNA” que están controlando putativamente 26 de los 35 genes durante la elicitación. El efecto fenotípico de estos miRNAs debe ser probado mediante experimentos de “Knock out” y “Knock down” que permitan conocer si hay una pérdida o ganancia de resistencia frente a Fod al noquear estos miRNAs.

LITERATURA CITADA

1. Agrios, G. N. (1997). Control of plant diseases. San Diego, Academic Press.
2. Arai, M., and Takeuchi, M. (1993). Influence of Fusarium wilt toxin (s) on carnation cells. Plant cell, tissue and organ culture, 34(3), 287-293.
3. Bailey, L. H. (1942). The Standard Cyclopedia of Horticulture. New York, Macmillan Company.
4. Barciszewska-Pacak, M., Milanowska, K., Knop, K., Bielewicz, D., Nuc, P., Plewka, P., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2015). Arabidopsis microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. Frontiers in plant science, 6, 410.
5. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116(2), 281–297.
6. Baulcombe, D. (2005). RNA silencing. Trends in biochemical sciences, 30(6), 290-293.
7. Ben yephet, Y., Reuven, M. and Shtienberg, D. (1997). Complete resistance by carnation cultivars to Fusarium wilt induced by Fusarium oxysporum f.sp. dianthi race 2. Plant Disease 81(7), 777-780.
8. Benavides, J.L., Garcés, E., Arbeláez, G. y Dukuara, F. (1995). Determinación de razas fisiológicas de Fusarium oxysporum f. sp. dianthi en suelos cultivados y en variedades de clavel en la finca “Flores las Palmas”. Agronomía colombiana. 12(1), 21-26.
9. Berger, S., Benediktyová, Z., Matouš, K., Bonfig, K., Mueller, J. M., Nedbal, L., and Roitsch, T. (2007). Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent. Journal of Experimental Botany, 58(4), 797-806.
10. Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., and Zhu, J. K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. Cell, 123(7), 1279-1291.
11. Buiatti, M., Scala, A., Bettini, P., Nascari, G., Morpurgo, R., Bogani, P., and Ventura, R. (1985). Correlations between in vivo resistance to Fusarium and in vitro response to fungal elicitors and toxic substances in carnation. Theoretical and Applied Genetics, 70(1), 42-47.

12. Cai, Q., Liang, C., Wang, S. K., Hou, Y. N., Gao, L., Liu, L., et al. (2018). The disease resistance protein SNC1 represses the biogenesis of microRNAs and phased siRNAs. *Nat. Commun.* 9, 5080.
13. Cao, C., Long, R., Zhang, T., Kang, J., Wang, Z., Wang, P., and Yang, Q. (2018). Genome-wide identification of microRNAs in response to salt/alkali stress in *Medicago truncatula* through high-throughput sequencing. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4076.
14. Charng, Y.-Y., Sun, C.-W., Yan, S.-L., Chou, S.-J., Chen, Y.-R., and Yang, S.F. (1998). cADN sequence of a putative ethylene receptor from carnation petals. *Plant Physiology*. 115, 863.
15. Chen, L., Ren, Y., Zhang, Y., Xu, J., Zhang, Z., and Wang, Y. (2012). Genome-wide profiling of novel and conserved *Populus* microRNAs involved in pathogen stress response by deep sequencing. *Planta*, 235(5), 873-883.
16. Cheng, J., Zhuo, H., Xu, M., Wang, L., Xu, H., Peng, J., and Cai, J. (2018). Regulatory network of circRNA-miRNA-mRNA contributes to the histological classification and disease progression in gastric cancer. *Journal of translational medicine*, 16(1), 1-14.
17. Cifras de floricultura Colombiana - Ceniflores. (n.d.). Retrieved November 19, 2020, from <https://ceniflores.org/cifras-de-floricultura-colombiana/>
18. Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., and Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, 17(1), 1-19.
19. Curir, P., Dolci, M. and Galeotti, F. (2005). A phytoalexin-like flavonol involved in the carnation (*Dianthus caryophyllus*) - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* pathosystem. *J. Phytopathology* 153, 65-67.
20. Debbi, A., Bouregghda, H., Monte, E., and Hermosa, R. (2018). Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* associated with tomato diseases in Algeria and a biocontrol strategy with indigenous *Trichoderma* spp. *Frontiers in microbiology*, 9, 282.
21. Di pietro, A., Madrid, M. P., Caracul, Z., Delgado, J. and Roncero, M. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 4(5), 315-325.

22. Edel-Hermann, V., and Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109(4), 512–530.
23. Fahlgren, N., and Carrington, J.C. (2010). miRNA Target Prediction in Plants. In: Meyers, B., Green, P. (eds) *Plant MicroRNAs. Methods in Molecular Biology*, vol 592. Humana Press.
24. Fang, X. F., Cui, Y. W., Li, Y. X., and Qi, Y. J. (2015). Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in *Arabidopsis*. *Nat. Plants*, 1, 15075.
25. Filgueira, J. 2011. Experiencias en mejoramiento del clavel (*Dianthus caryophyllus*). Bogota, Universidad Militar Nueva Granada.
26. Gao, Z., Nie, J., and Wang, H. (2020). MicroRNA biogenesis in plant. *Plant Growth Regulation* 2020, 93(1), 1–12.
27. Gasco, M. J., Cortés, J. N., y Díaz, R. J. (2005). Evolución de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogénicas y patotipos. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 31(1), 59-70.
28. Gebert, L. F., and MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(1), 21-37.
29. Goswami, R. S., and Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular plant pathology*, 5(6), 515-525.
30. Gubler, U., and Hoffman, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25(2-3), 263-269.
31. Hajheidari, M., Farrona, S., Huettel, B., Koncz, Z., and Koncz, C. (2012). CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of *Arabidopsis* RNA polymerase II. *Plant Cell*, 24, 1626–1642.
32. Hao, Z., Liu, D., Gong, S., Zhao, D., and Tao, J. (2017). High throughput sequencing of herbaceous peony small RNAs to screen thermos-tolerance-related microRNAs. *Genes and Genomics*, 39(4), 397-408.
33. Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., and Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques*, 56(2), 61-77.

34. Holley, W. D., and Baker, R. (1963). *Carnation Production*. Carnation Production. London, Grower Publications Ltd.
35. Huang, P. Y., Catnot, J., and Zimmerli, L. (2016). Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *Journal of experimental botany*, *67*(5), 1231-1241.
36. Huang, Y., Zou, Q., Song, H., Song, F., Wang, L., Zhang, G., and Shen, X. (2010). A study of miRNAs targets prediction and experimental validation. *Protein & cell*, *1*(11), 979-986.
37. Husaini, A. M., Sakina, A., and Cambay, S. R. (2018). Host–pathogen interaction in *Fusarium oxysporum* infections: where do we stand?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(9), 889-898.
38. Jain, D., and Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In *Molecular aspects of plant-pathogen interaction* (pp. 265-281). Singapore, Springer.
39. Jebessa, E., Ouyang, H., Abdalla, B. A., Li, Z., Abdullahi, A. Y., Liu, Q., and Zhang, X. (2018). Characterization of miRNA and their target gene during chicken embryo skeletal muscle development. *Oncotarget*, *9*(25), 17309.
40. Joshi, R. (2018). A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. *J. Med. Plants Stud*, *6*(3), 112-115.
41. Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J. K., and Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(47), 18002-18007.
42. Kreuze, J. (2014). siRNA deep sequencing and assembly: piecing together viral infections. In *Detection and diagnostics of plant pathogens* (pp. 21-38). Dordrecht, Springer.
43. Kuhn, D. E., Martin, M. M., Feldman, D. S., Terry Jr, A. V., Nuovo, G. J., and Elton, T. S. (2008). Experimental validation of miRNA targets. *Methods*, *44*(1), 47-54.
44. Kulcheski, F. R., de Oliveira, L. F., Molina, L. G., Almerão, M. P., Rodrigues, F. A., Marcolino, J., and Margis, R. (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC genomics*, *12*(1), 1-17.

- 100 Kumar, I. S., Cheah, B. H., and Nadarajah, K. (2017). In silico identification and classification of disease resistance genes and defense-related genes against sheath blight from QTL qSBR11-1 in rice (*Oryza sativa* L.). Undergrad. Res. J. Integ. Biol, *1*(8).
45. Lawton, K., Huang, B., Goldsbrough, P. and Woodson, W. (1989). Molecular cloning and characterization of senescence related-genes from carnation flower petals. Plant Physiology, *90*, 690-696.
46. Lawton, K., Raghotama, K., Goldsbrough, P. and Woodson, W. (1990). Regulation of senescence-related gene expression in carnation flower petals by ethylene. Plant Physiology, *93*, 1370-1375.
47. Li, M., and Yu, B. (2021). Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis. RNA biology, *18*(12), 2087-2096.
48. Liu, X., Tan, C., Cheng, X., Zhao, X., Li, T., and Jiang, J. (2020). miR168 targets Argonaute1A mediated miRNAs regulation pathways in response to potassium deficiency stress in tomato. BMC plant biology, *20*(1), 1-17.
49. Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Lamprecht, S. C., and Crous, P. W. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum* - clearing the taxonomic chaos. Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, *43*, 1-47.
50. Marguerat, S., and Bähler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. Cellular and molecular life sciences, *67*(4), 569-579.
51. Martinez Gonzalez, A. P. (2019). Contribución al estudio de los fenómenos bioquímicos y moleculares del apoplasto de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Tesis doctoral. Universidad nacional de colombia.
52. McGeorge, P., and Hammett, K. (2002). Carnations and Pinks. Willowdale, Ont, Firefly Books.
53. McTaggart, A. R., James, T. Y., Shivas, R. G., Drenth, A., Wingfield, B. D., Summerell, B. A., and Duong, T. A. (2021). Population genomics reveals historical and ongoing recombination in the *Fusarium oxysporum* species complex. Studies in mycology, *99*, 100132.
54. Meng, X. and Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. Annu Rev Phytopathol, *51*, 245-66.

55. Michlewski, G., and Cáceres, J. F. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *Rna*, 25(1), 1-16.
56. Nair, M. M., and Manickavelu, A. (2020). MicroRNAs as fine-tuners of gene regulation in plant–microbe interactions. *Current Science*, 8, 1282.
57. Narjala, A., Nair, A., Tirumalai, V., Hari Sundar, G. V., and Shivaprasad, P. V. (2020). A conserved sequence signature is essential for robust plant miRNA biogenesis. *Nucleic acids research*, 48(6), 3103-3118.
58. Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. University Park, PA, Penn State University.
59. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad*, 95, 2044–2049.
60. Ok, S. H., Park, H. M., Kim, J. Y., Bahn, S. C., Bae, J. M., Suh, M. C., and Shin, J. S. (2003). Identification of differentially expressed genes during flower development in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Science*, 165(2), 291-297.
61. Pandey, P., Srivastava, P. K., and Pandey, S. P. (2019). Prediction of plant miRNA targets. In *Plant MicroRNAs* (pp. 99-107). New York, NY, Humana Press.
62. Paul, S., Datta, S. K., and Datta, K. (2015). miRNA regulation of nutrient homeostasis in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 232.
63. Pegler, J. L., Grof, C. P., and Eamens, A. L. (2018). Profiling of the differential abundance of drought and salt stress-responsive microRNAs across grass crop and genetic model plant species. *Agronomy*, 8(7), 118.
64. Pizano de Márquez, M. (2000). Clavel *Dianthus caryophyllus*. Bogotá, Hortitecna Ltda.
65. Prigge, M. J., and Wagner, D. R. (2001). The Arabidopsis SERRATE Gene Encodes a Zinc-Finger Protein Required for Normal Shoot Development. *The Plant Cell*, 13(6), 1263–1280.
66. Pyo, Y., Kim, G. M., Choi, S. W., Song, C. Y., Yang, S. W., and Jung, I. L. (2020). Strontium stress disrupts miRNA biogenesis by reducing HYL1 protein levels in Arabidopsis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 204, 111056.

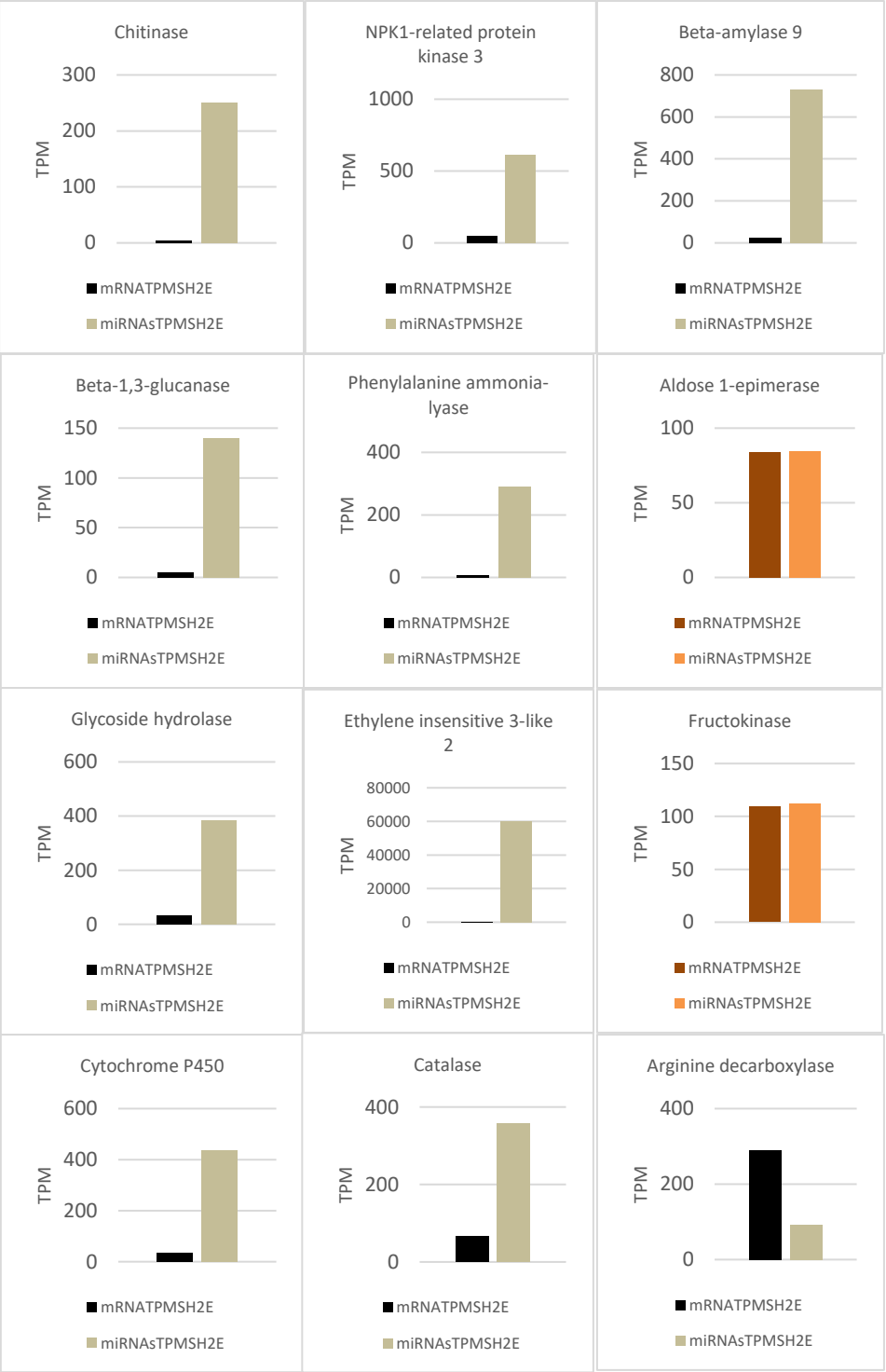
67. Riolo, G., Cantara, S., Marzocchi, C., and Ricci, C. (2020). miRNA targets: from prediction tools to experimental validation. *Methods and protocols*, 4(1), 1.
68. Ritchie, W., Rajasekhar, M., Flamant, S., and Rasko, J. E. (2009). Conserved expression patterns predict microRNA targets. *PLoS computational biology*, 5(9), e1000513.
69. Ritchie, W., Rasko, J. E., and Flamant, S. (2013). MicroRNA target prediction and validation. In *MicroRNA cancer regulation*, (pp39-53). Dordrecht, Springer.
70. Rojas, A. M., Drusin, S. I., Chorostecki, U., Mateos, J. L., Moro, B., Bologna, N. G., ... and Palatnik, J. F. (2020). Identification of key sequence features required for microRNA biogenesis in plants. *Nature communications*, 11(1), 1-11.
71. Salcedo, A., Al-Haddad, J., Buell, C. R., Trail, F., Góngora-Castillo, E., and Quesada-Ocampo, L. (2021). Comparative Transcriptome Analysis of Two Contrasting Maize Inbred Lines Provides Insights on Molecular Mechanisms of Stalk Rot Resistance. *PhytoFrontiers™*, 1(4), 314-329.
72. Santos-Rodríguez, J., Coy-Barrera, E., and Ardila, H. D. (2021). Mycelium Dispersion from *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi Elicits a Reduction of Wilt Severity and Influences Phenolic Profiles of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Roots. *Plants*, 10(7), 1447.
73. Scovel, G., Men-Meir, H. and Ovadis, M. (1998). rapd and rflp markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. *Theor. Appl. Genet*, 96, 117-122.
74. Scovel, G., Ovadis, M., Vainstein, A. Reuven, M. and Ben-Yephet, Y. (2001). Marker assisted selection for resistance to *Fusarium oxysporum* in the greenhouse carnation. *Acta Horticulturae*, 552, 151-156
75. Silverstein, P. S., Buch, S. J., and Curtis Bird, R. (2002). Strategies for cDNA Cloning and Mapping RNA Transcripts. In *Genetic Library Construction and Screening* (pp. 3-19). Berlin, Heidelberg, Springer.
76. Srivastava, P. K., Moturu, T. R., Pandey, P., Baldwin, I. T., and Pandey, S. P. (2014). A comparison of performance of plant miRNA target prediction tools and the characterization of features for genome-wide target prediction. *BMC genomics*, 15(1), 1-15.

77. Stepień, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2017). Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *RNA*, 8(3), e1403.
78. Summerell, B. A. (2019). Resolving *Fusarium*: current status of the genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 323-339.
79. Sun, Z. F., Guo, T. T., Liu, Y., Liu, Q., and Fang, Y. D. (2015). The Roles of *Arabidopsis* CDF2 in transcriptional and posttranscriptional regulation of primary MicroRNAs. *PLoS Genet.* 11, e1005598.
80. Taheri, S., Lee Abdullah, T., Yusop, M. R., Hanafi, M. M., Sahebi, M., Azizi, P., and Shamshiri, R. R. (2018). Mining and development of novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) data in plants. *Molecules*, 23(2), 399.
81. Tanase, K., Nishitani, C., Hirakawa, H., Isobe, S., Tabata, S., Ohmiya, A., and Onozaki, T. (2012). Transcriptome analysis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) based on next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*, 13(1), 1–11.
82. Tomkowiak, A., Jędrzejewski, T., Spychala, J., Kuczyński, J., Kwiatek, M. T., Tyczewska, A., and Twardowski, T. (2020). Analysis of miRNA expression associated with the Lr46 gene responsible for APR resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics*, 61(4), 503-511.
83. Vannozzi, A., Dry, I. B., Fasoli, M., Zenoni, S., and Lucchin, M. (2012). Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC plant biology*, 12(1), 1-22.
84. Villa, M A., Pérez, L. R., Morales M, H. A., Basurto S, M., Soto P, J. M., y Martínez E, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
85. Villacorta-Martín, C., Sánchez-García, A. B., Villanova, J., Cano, A., van de Rhee, M., de Haan, J., and Pérez-Pérez, J. M. (2015). Gene expression profiling during adventitious root formation in carnation stem cuttings. *BMC genomics*, 16(1), 1-18.
86. Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., and Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
87. Wang, J., Chen, J., and Sen, S. (2016). MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *Journal of cellular physiology*, 231(1), 25-30.

88. Wang, J., Mei, J., and Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 360.
89. Wang, L. L., Song, X. W., Gu, L. F., Li, X., Cao, S. Y., Chu, C. C., et al. (2013). NOT2 Proteins Promote Polymerase II-Dependent Transcription and Interact with Multiple MicroRNA Biogenesis Factors in Arabidopsis. *Plant Cell*, *25*, 715–727.
90. Wang, S., Quan, L., Li, S., You, C., Zhang, Y., Gao, L., and Chen, X. (2019). The PROTEIN PHOSPHATASE4 complex promotes transcription and processing of primary microRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *31*(2), 486-501.
91. Wang, X. J., Gaasterland, T., and Chua, N. H. (2005). Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome biology*, *6*(4), 1-11.
92. Wayment-Steele, H. K., Kladwang, W., Strom, A. I., Lee, J., Treuille, A., Participants, E., and Das, R. (2021). RNA secondary structure packages evaluated and improved by high-throughput experiments. *BioRxiv*, *20*, 5-20.
93. Whealy, C. A. (1992). Carnations. In *Introduction to floriculture*. Academic Press, 43-65
94. Wu, H., Li, B., Iwakawa, H. O., Pan, Y., Tang, X., Ling-Hu, Q., and Guo, H. (2020). Plant 22-nt siRNAs mediate translational repression and stress adaptation. *Nature*, *581*(7806), 89-93.
95. Xu, J., Xian, Q., Zhang, N., Wang, K., Zhou, X., Li, Y., and Chen, X. (2021). Identification of miRNA-Target Gene Pairs Responsive to Fusarium Wilt of Cucumber via an Integrated Analysis of miRNA and Transcriptome Profiles. *Biomolecules*, *11*(11), 1620.
96. Yadeta, K. A., and J. Thomma, B. P. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in plant science*, *4*, 97.
- 101 Yagi, M., Kosugi, S., Hirakawa, H., Ohmiya, A., Tanase, K., Harada, T., and Tabata, S. (2014). Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *DNA Research*, *21*(3), 231-241.
- 102 Yagi, M., Onozaki, T., Taneya, M., Watanabe, H., Yoshimura, T., Yoshinari, T., Ochiai, Y. and Shibata, M. (2006). Construction of a Genetic Linkage Map for the Carnation by Using RAPD and SSR Markers and Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) for

- Resistance to Bacterial Wilt Caused by *Burkholderia caryophylli*. J. Japan. Soc. Hort. Sci, 75(2), 166–172.
- 103 Yu, N., Yong, S., Kim, H. K., Choi, Y. L., Jung, Y., Kim, D., and Lee, S. (2019). Identification of tumor suppressor miRNAs by integrative miRNA and mRNA sequencing of matched tumor–normal samples in lung adenocarcinoma. *Molecular oncology*, 13(6), 1356-1368.
- 104 Zhang, L., Xiang, Y., Chen, S., Shi, M., Jiang, X., He, Z., and Gao, S. (2022). Mechanisms of MicroRNA Biogenesis and Stability Control in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 844149.
- 105 Zhang, S. X., Xie, M., Ren, G. D., and Yu, B. (2013). CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 17588–17593.
- 106 Zhang, Y., Yun, Z., Gong, L., Qu, H., Duan, X., Jiang, Y., and Zhu, H. (2018). Comparison of miRNA evolution and function in plants and animals. *Microna*, 7(1), 4-10.

ANEXOS



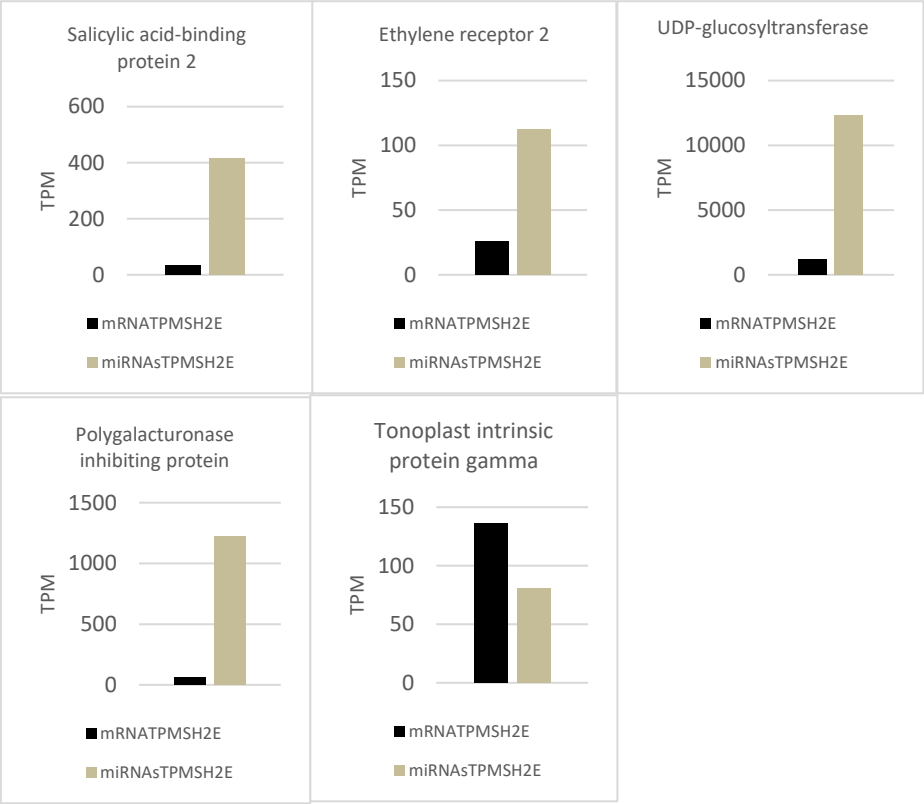


Figura 8: Gráficas de expresión entre mRNAs “target” y los miRNAs putativos que los controlan de SH2E. En tonos naranja están los genes que no tienen sensibilidad a la expresión de sus miRNA putativos.

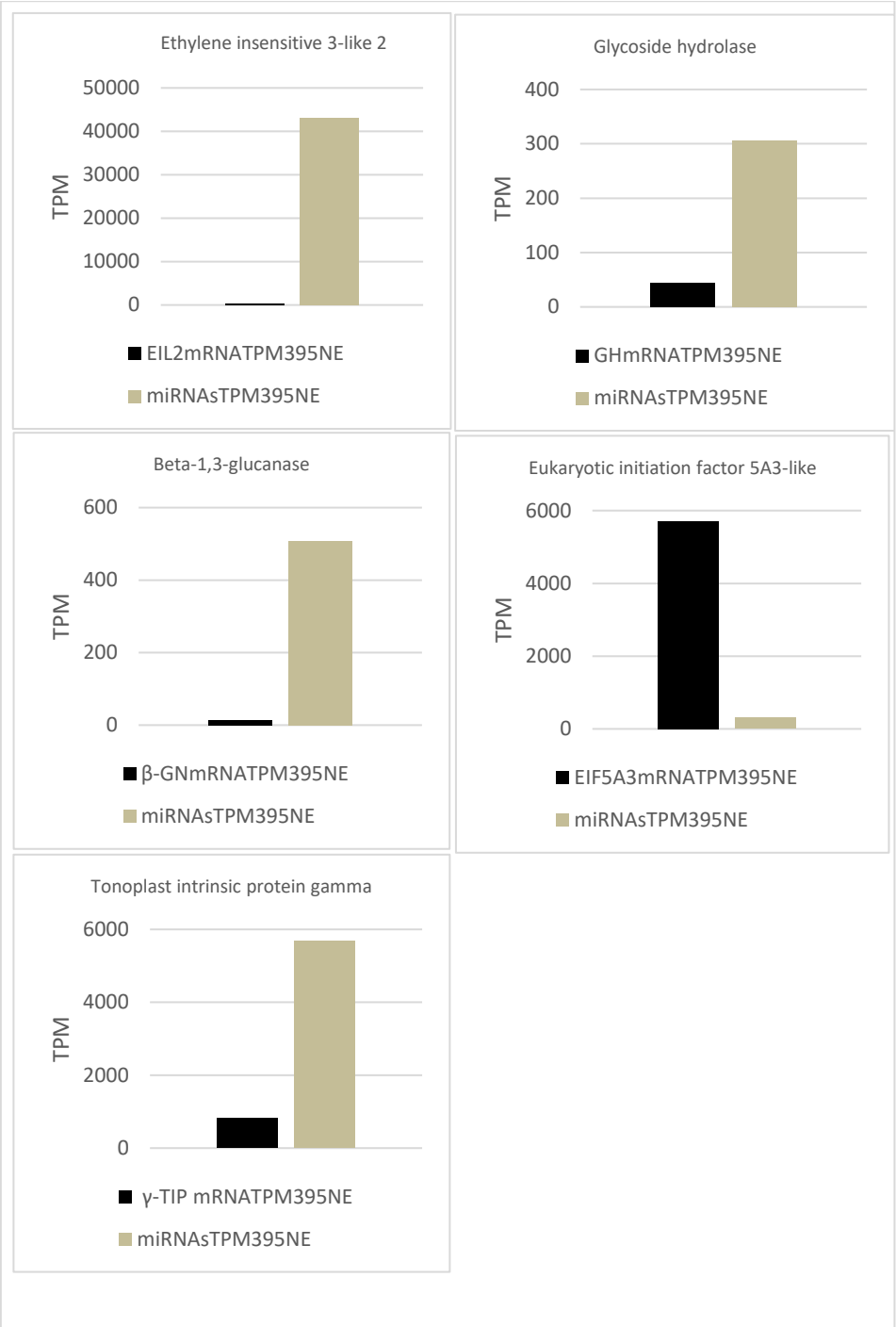


Figura 9: Gráficas de expresión entre mRNAs “target” y los miRNAs putativos que los controlan de 395 NE.

