

**VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN VARIEDADES RESISTENTES Y  
SUSCEPTIBLES DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*) ELICITADAS CON  
AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* CON DISTINTOS  
NIVELES DE PATOGENICIDAD**



**María Cristina Verano Rojas**

**Código: 0501158**

**Universidad Militar Nueva Granada**

**Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas**

**Programa de Biología Aplicada**

**Bogotá D.C. 2025**

**VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN VARIEDADES RESISTENTES Y  
SUSCEPTIBLES DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*) ELICITADAS CON  
AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* CON DISTINTOS NIVELES DE  
PATOGENICIDAD**



**AUTOR**

**María Cristina Verano Rojas**

**Código: 0501158**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

**BIÓLOGO APLICADO**

Director:

**Juan José Filgueira Duarte M.Sc. Ph.D.**

**Universidad Militar Nueva Granada**

**Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas**

**Programa de Biología Aplicada**

**Bogotá D.C. 2025**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a mi familia por creer siempre en mí, por confiar en mis capacidades y brindarme su apoyo constante en cada paso de este camino. Al Dr. Juan José Filgueira Duarte, mi director, por su invaluable guía, por compartir sus conocimientos y enseñarme que la disciplina es un pilar esencial en la vida académica y profesional.

A mis amistades de la universidad, que, aunque fueron pocas, siempre fueron genuinas y significativas, llenándome de amor y alegría en los momentos en que más lo necesité. A Liliana Murcia, por su amistad sincera y su apoyo constante, que marcaron de manera especial mi recorrido por la biología; sin su compañía, esta experiencia no habría sido la misma.

Agradezco también a aquellos docentes que, con sus acciones y decisiones, me enseñaron valiosas lecciones, aunque no siempre de la manera correcta. A través de los obstáculos, los juicios injustos y las situaciones adversas que viví, aprendí a ser más fuerte, a confiar en mi propio esfuerzo y a mantenerme fiel a mis principios. Me enseñaron, de una forma inolvidable, la importancia de la ética, el respeto y el compromiso con la verdad. Gracias a esos momentos difíciles, comprendí que mi valor como persona y profesional no depende de la validación externa, sino de mi capacidad para perseverar, aprender y crecer, incluso en los entornos más hostiles.

Finalmente, me agradezco a mí misma por no rendirme, por confiar en mi potencial a pesar de las adversidades, y por mantenerme firme en el propósito de hacer siempre lo correcto, sin importar los desafíos ni las dificultades de este largo y exigente camino.

## RESUMEN

El clavel (*Dianthus caryophyllus*) es una planta de gran importancia económica en Colombia, siendo el segundo mayor exportador de flores cortadas a nivel mundial. Sin embargo, la producción se ve afectada por enfermedades como la fusariosis, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, que provoca pérdidas significativas en los cultivos. La resistencia de las variedades de clavel a este patógeno es crucial para mitigar estas pérdidas. El objetivo principal de esta investigación fue determinar la variabilidad en la expresión de genes relacionados con la resistencia en diferentes variedades de clavel frente a aislados de *Fusarium oxysporum* que presentan distintos niveles de patogenicidad. Se buscó comparar la respuesta de variedades resistentes y susceptibles al ataque del patógeno. Los resultados mostraron que las variedades de clavel presentaron diferencias significativas en su resistencia a los aislados de *Fusarium*. La variedad 395 se identificó como la más resistente, mientras que la variedad 6515 fue la más susceptible. Se observó que la expresión de genes de defensa, como GLU, PAL y UGT, fue mayor en las variedades resistentes en comparación con las susceptibles. Además, la activación de estos genes varió dependiendo del aislado de *Fusarium*, lo que sugiere que la resistencia es un fenómeno multigénico y multivariado. La investigación concluyó que la resistencia de las variedades de clavel a *Fusarium oxysporum* está relacionada con la expresión diferencial de genes de defensa. Las variedades resistentes mostraron una mayor capacidad para activar estos genes en respuesta a la infección, lo que limita el crecimiento del patógeno. Estos hallazgos son fundamentales para el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético que busquen aumentar la resistencia de las variedades de clavel a enfermedades fúngicas.

**Palabras Clave:** Fusariosis, patógenos, expresión génica, variedades de clavel, resistencia a enfermedades.

## ABSTRACT

Carnation (*Dianthus caryophyllus*) is of great economic importance in Colombia, being the second largest exporter of cut flowers worldwide. However, production is affected by diseases such as fusariosis, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi, leading to significant crop losses. The resistance of carnation varieties to this pathogen is crucial to mitigate these losses. The main objective of this research was to determine the variability in the expression of genes related to resistance in different carnation varieties against *Fusarium oxysporum* isolates with varying levels of pathogenicity. The study aimed to compare the response of resistant and susceptible varieties to pathogen attack. The results showed significant differences in resistance among carnation varieties to the *Fusarium* isolates. The variety 395 was identified as the most resistant, while variety 6515 was the most susceptible. It was observed that the expression of defense genes, such as GLU, PAL, and UGT, was higher in resistant varieties compared to susceptible ones. Additionally, the activation of these genes varied depending on the *Fusarium* isolate, suggesting that resistance is a multigenic and multivariate phenomenon. The research concluded that the resistance of carnation varieties to *Fusarium oxysporum* is related to the differential expression of defense genes. Resistant varieties demonstrated a greater ability to activate these genes in response to infection, limiting pathogen growth. These findings are fundamental for developing genetic improvement strategies aimed at increasing the resistance of carnation varieties to fungal diseases.

**Keywords:** Fusariosis, pathogens, gene expression, carnation varieties, disease resistance.

## TABLA CONTENIDO

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCION.....                                                                                             | 14 |
| 1.1. Clavel ( <i>Dianthus caryophyllus</i> ).....                                                                | 14 |
| 1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> .....                                                                             | 15 |
| 1.3. Respuesta de la planta.....                                                                                 | 18 |
| 2. MATERIALES Y METODOS .....                                                                                    | 26 |
| 2.1. Lugar de estudio y obtención del material biológico .....                                                   | 28 |
| 2.2. Obtención y propagación de células indiferenciadas y microplantas de clavel ...                             | 29 |
| 2.3. Mantenimiento y re-cultivo de aislados patogénicos de <i>Fusarium oxysporum</i> ....                        | 29 |
| 2.4. Obtención de cultivos monospórico de <i>Fusarium oxysporum</i> .....                                        | 30 |
| 2.5. Verificación taxonómica e identificación de estructuras reproductivas .....                                 | 30 |
| 2.6. Evaluación de la resistencia de micro-plantulas a FOX por cultivo dual.....                                 | 31 |
| 2.7. Ensayo de elicitation de células indiferenciadas en cultivo dual .....                                      | 32 |
| 2.8. Extracción de ADN de microplantas <i>in vitro</i> .....                                                     | 32 |
| 2.9. PCR de ADN genómico de las variedades de clavel para identificar la presencia de los genes a estudiar. .... | 33 |
| 2.10. Genes de clavel evaluados.....                                                                             | 34 |
| 2.11. Extracción y cuantificación de ARN total de micro-plantas. ....                                            | 35 |
| 2.12. qPCR de ADN genómico y RT-PCR de mRNA.....                                                                 | 36 |
| 2.13. RT-qPCR de mRNA de células elicidadas.....                                                                 | 36 |
| 2.14. Análisis de resultados de expresión y análisis estadístico .....                                           | 37 |
| 3. RESULTADOS Y ANALISIS .....                                                                                   | 38 |
| 3.1. Propagación de células indiferenciadas y micro-plantas de clavel.....                                       | 38 |
| 3.2. Mantenimiento y re-cultivo de aislados patogénicos de <i>Fusarium oxysporum</i> ....                        | 41 |

|        |                                                                                                                                          |                               |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 3.3.   | Obtención de cultivos monospóricos de <i>Fusarium oxysporum</i> y ensayo de reinfeksi3n .....                                            | 43                            |
| 3.4.   | Verificaci3n taxon3mica e Identificaci3n de estructuras reproductivas .....                                                              | 44                            |
| 3.5.   | Evaluaci3n de la resistencia de micro-plantas de las variedades de clavel en cultivo dual                                                | 46                            |
| 3.6.   | Pruebas de patogenicidad de los aislados de FOX en c3lulas de las diferentes variedades de clavel .....                                  | 49                            |
| 3.6.1. | Prueba de patogenicidad de FOX con la variedad de clavel 395(R) .....                                                                    | 49                            |
| 3.7.   | Prueba de patogenicidad de FOX con c3lulas de la variedad de clavel F1B2(MR)                                                             | 50                            |
| 3.8.   | Prueba de patogenicidad de FOX con la variedad SH2(S) de clavel .....                                                                    | 52                            |
| 3.9.   | Prueba de patogenicidad de FOX con la variedad de clavel 6515 .....                                                                      | 54                            |
| 3.10.  | Análisis estadístico .....                                                                                                               | 58                            |
| 3.11.  | Obtenci3n de ADN de C3lulas de Clavel .....                                                                                              | 65                            |
| 3.12.  | Amplificaci3n por PCR de genes involucrados en la respuesta a FOX en el DNA de c3lulas de clavel .....                                   | 65                            |
| 3.13.  | Obtenci3n de RNAtotal, mRNA y RT-qPCR .....                                                                                              | 68                            |
| 4.     | DISCUSI3N .....                                                                                                                          | 85                            |
| 4.1.   | Resistencia y susceptibilidad de las variedades de clavel y niveles de patogenicidad de los aislados de FOX .....                        | 85                            |
| 4.2.   | Variaci3n de la expresi3n de genes de resistencia en clavel dependiente de la variaci3n de la patogenicidad de aislamientos de FOX ..... | 91                            |
| 5.     | CONCLUSIONES .....                                                                                                                       | 97                            |
| 6.     | RECOMENDACIONES .....                                                                                                                    | 98                            |
| 7.     | BIBLIOGRAFIA .....                                                                                                                       | 99                            |
|        | ANEXOS .....                                                                                                                             | ¡Error! Marcador no definido. |



## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Protocolo para PCR utilizando MyTaq™ DNA Polymerase. ....                                                                                            | 34 |
| <b>Tabla 2.</b> Programa utilizado en amplificación por PCR de ADN (*Tm annealing primers).<br>.....                                                                 | 34 |
| <b>Tabla 3.</b> Genes de Clavel relacionados con la defensa contra <i>Fusarium</i> utilizados en este estudio.....                                                   | 35 |
| <b>Tabla 4.</b> Protocolo Kit SYBR® Green Quantitative RT-qPCR. ....                                                                                                 | 37 |
| <b>Tabla 5.</b> Programa utilizando RT-qPCR en termociclador Line-Gene 9600 Plus termociclador (* Tm annealing primers). ....                                        | 37 |
| <b>Tabla 6.</b> Resultados de tres repeticiones de cultivo dual con microplantas de clavel.....                                                                      | 48 |
| <b>Tabla 7.</b> Comparación de los valores del crecimiento de los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en las distintas variedades de clavel ..... | 56 |
| <b>Tabla 8.</b> Comparación de los valores de la variable GP (grado de patogenicidad) entre los ensayos en microplantas y los ensayos en células.....                | 58 |

## LISTA DE GRAFICAS

|                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Grafica 1.</b> Crecimiento de cada uno de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en el ensayo dual con células de la variedad 395 (resistente). .....                                                                                   | 50 |
| <b>Grafica 2.</b> Ensayo de patogenicidad de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en la variedad de clavel F1B2 con los cinco aislados de FOX (2019, 2011, 2021, UNAL, Uchuva) .....                                                     | 52 |
| <b>Grafica 3.</b> Ensayo de patogenicidad de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en la variedad de clavel SH2 (susceptible) con los cinco aislados de FOX (2019, 2011, 2021, UNAL, Uchuva).....                                                         | 54 |
| <b>Grafica 4.</b> Ensayo de patogenicidad de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en la variedad de clavel 6515, parcialmente susceptible, con los cinco aislados de FOX (2019, 2011, 2021, UNAL y Uchuva) .....                                         | 56 |
| <b>Grafica 5.</b> Diagrama de cajas (Boxplot) que muestra la distribución del crecimiento del patógeno en centímetros para las cuatro variedades de <i>Dianthus caryophyllus</i> . .....                                                            | 59 |
| <b>Grafica 6.</b> Diferencias en el crecimiento de los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en los ensayos de resistencia con las variedades de clavel. Diagrama de cajas (Boxplot).....                                          | 60 |
| <b>Grafica 7.</b> Histograma de la distribución de los datos y Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. ....                                                                                                                                       | 61 |
| <b>Grafica 8.</b> Representación visual de las comparaciones múltiples de Tukey HSD entre los resultados del crecimiento de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX). ....                                                                   | 63 |
| <b>Grafica 9.</b> Representación visual de las comparaciones múltiples de Tukey HSD entre los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).....                                                                                                      | 64 |
| <b>Grafica 10.</b> Valores de expresión basal de los genes GLU (A), CTS (B), PAL (C) y UGT (D) en las variedades en estudio SH2, 6515, 395 y F2H2, utilizando RT-qPCR sin elicitación con los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX). .... | 74 |
| <b>Grafica 11.</b> Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen alcohol deshidrogenasa (ADH) en las variedades 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).....                             | 75 |
| <b>Grafica 12.</b> Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen Arginina Descarboxilasa (ADC) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).....                  | 76 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Grafica 13.</b> Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen Fenilalanina Amonioliasa (PAL) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).....                                       | 77 |
| <b>Grafica 14.</b> Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen Antocianina 5-O-glucosiltransferasa (UGT) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).. .....                         | 78 |
| <b>Grafica 15.</b> Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen Beta-1,3-glucanasa (GLU) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).. .....                                          | 79 |
| <b>Grafica 16.</b> Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen relacionado con la vía de señalización del ácido salicílico (RDC) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).. ..... | 80 |
| <b>Grafica 17.</b> Suma de los valores de expresión de todos los genes en estudio en las variedades 395 y SH2 elicidadas con todos los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).....                                                                        | 81 |
| <b>Grafica 18.</b> Valores de expresión de los genes CTS, PER y RLK en las variedades SH2 elicitada con los aislamientos 2019, 2011, 2021, Uchuva y UNAL.....                                                                                                             | 82 |
| <b>Grafica 19.</b> Valores de expresión de los genes CTS, PER y RLK en las variedades 395 elicitada con los aislamientos 2019, 2011, 2021, Uchuva y UNAL.....                                                                                                             | 83 |
| <b>Grafica 20.</b> valores de expresión de todos los genes analizados en este estudio para las dos variedades 395 (R) y SH2 (S).....                                                                                                                                      | 84 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Células indiferenciadas de clavel en cultivo in vitro..                                                                                                                               | 39 |
| <b>Figura 2.</b> Microplantas en cultivo in vitro.                                                                                                                                                     | 40 |
| <b>Figura 3.</b> Desarrollo radicular de las variedades de clavel..                                                                                                                                    | 41 |
| <b>Figura 4.</b> Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. dianthi en medio PDA, identificados como a (2011), b (2019), c (2021), d (UNAL) y e (Uchuva)..                                        | 41 |
| <b>Figura 5.</b> Crecimiento monospórico de los cinco aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX)                                                                                                      | 43 |
| <b>Figura 6.</b> Microfotografías de las estructuras reproductivas de los cinco aislados de FOX.                                                                                                       | 46 |
| <b>Figura 7.</b> Cultivo dual con plantas de clavel de las variedades 395 (resistente) y SH2 (susceptible).                                                                                            | 47 |
| <b>Figura 8.</b> Ensayo de patogenicidad de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en las células de clavel de la variedad 395.                                                               | 49 |
| <b>Figura 9.</b> Ensayo de patogenicidad de los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en las células de la variedad F1B2..                                                            | 51 |
| <b>Figura 10.</b> Ensayo de patogenicidad de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en la variedad SH2.                                                                                                       | 53 |
| <b>Figura 11.</b> Ensayo de patogenicidad de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) en la variedad de clavel 6515                                                                                             | 55 |
| <b>Figura 12.</b> Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.                                                                                                                                                | 62 |
| <b>Figura 13.</b> Electroforesis en agarosa al 1% de ADN                                                                                                                                               | 65 |
| <b>Figura 14.</b> Producto de la amplificación por PCR de los genes alcohol deshidrogenasa (ADH).                                                                                                      | 66 |
| <b>Figura 15.</b> Productos de amplificación por PCR de los genes: proteína ribosomal                                                                                                                  | 67 |
| <b>Figura 16.</b> Productos de amplificación por PCR de los genes arginina descarboxilasa (ADC).                                                                                                       | 67 |
| <b>Figura 17.</b> Productos de amplificación por PCR de los genes: $\beta$ 1-3 Glucanase (GLU), Salicylic Acid Mediated Signaling Pathway (RDC), Peroxidase (PER) y Phenylalanine Ammonio-Liase (PAL). | 68 |
| <b>Figura 18.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de RNA total obtenido de células de las variedades resistente y susceptible de clavel..                                                       | 69 |

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19.</b> Electroforesis de RNA total de la variedad 395 (resistente) elicitada con los cinco aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX): ..... | 69 |
| <b>Figura 20.</b> RT-PCR con RNA total extraído de las células de la variedad 395. ....                                                                      | 70 |
| <b>Figura 21.</b> Resultado de la RT-PCR de las variedades 395 y SH2 elicitadas con los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX).....                 | 71 |
| <b>Figura 22</b> RT-PCR de las variedades 395 y SH2 elicitadas con el aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOX) 2019. ....                              | 72 |
| <b>Figura 23.</b> RT-PCR del gen PAL en la variedad 395: .....                                                                                               | 73 |

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Clavel (*Dianthus caryophyllus*)

*Dianthus caryophyllus*, comúnmente conocido como clavel, es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia Caryophyllaceae, originaria de la región mediterránea (Encyclopedia Britannica, 2023). Con tallos leñosos que alcanzan hasta un metro de altura y hojas lineales de 8 a 15 cm, esta especie se distingue por sus flores bisexuales de simetría radial, caracterizadas por colores vibrantes y un aroma distintivo a clavo (Whealy, 1992; Ríos y Filgueira, 2019). Su importancia ornamental ha consolidado al clavel como uno de los cultivos más valiosos en la floricultura global, especialmente en Colombia, país que lidera su exportación con ventas de US\$149 millones en 2022 (26.900 toneladas) y genera 90.000 empleos rurales (ICA, 2023; Castellanos et al., 2010). Sin embargo, este éxito enfrenta un desafío crítico: la fusariosis, enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod), responsable de pérdidas económicas de US\$18 millones en 2019 y una reducción del 2.7% en las exportaciones (Ministerio de Agricultura, 2019; ICA, 2022).

La fusariosis, que obstruye el sistema vascular de la planta y provoca marchitamiento, se ha complicado con la detección de infecciones mixtas con *Fusarium verticillioides* en cultivos colombianos, evidenciando una etiología compleja que dificulta su manejo (Filgueira et al., 2022). Estudios en otras especies, como el melón, sugieren que la resistencia a *Fusarium* podría ser poligénica, involucrando entre 4 y 14 genes (Perchepied y Pitrat, 2004), un modelo que ha guiado investigaciones en clavel para identificar mecanismos similares. En este contexto, el mejoramiento genético ha sido fundamental. Por ejemplo, el silenciamiento del gen F3H (flavanona 3-hidroxilasa) permitió alterar la biosíntesis de antocianinas, creando variedades con colores únicos (Zuker et al., 2001), mientras que la inserción del gen rolC de *Agrobacterium rhizogenes* incrementó la producción de esquejes y el tamaño de las plantas (Boase et al., 2004).

A nivel molecular, cultivares resistentes como ‘Golem’ activan respuestas defensivas tempranas (48–96 horas post-infección), acumulando flavonoides como kaempferol-3-O-glucósidos y dianthalexinas en raíces (Santos-Rodríguez et al., 2021). Estos compuestos, sintetizados por enzimas como CHS (chalcona sintasa) y CHI (chalcona isomerasa), inhiben el crecimiento micelial de Fod y neutralizan especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas

durante la infección (Ardila et al., 2021). La regulación de estos genes depende de factores de transcripción como MYB11 y bHLH (ej. Dca38761), que se unen a promotores de la vía fenilpropanoide, coordinando una respuesta integrada contra el patógeno (Yagi et al., 2023). Además, transportadores como GST (glutación S-transferasas) y MATE (multidroga y toxina extruida) desempeñan roles clave: DcGSTF2 transporta flavonoides a la vacuola para su almacenamiento, mientras que TT12 (MATE) acumula proantocianidinas en raíces, reforzando la pared celular (Ardila et al., 2021; Yagi et al., 2023).

Las estrategias futuras se centran en integrar herramientas modernas. La edición génica con CRISPR permitirá modular factores como MYB11 para potenciar la síntesis de flavonoides, mientras que el uso de elicitors bióticos, como extractos de micelio de *Fusarium* (eFod), induce respuestas defensivas y reduce la severidad de la enfermedad en un 30% (Santos-Rodríguez et al., 2021). Paralelamente, la selección asistida por marcadores moleculares, enfocada en genes como TT12, optimizará el desarrollo de variedades resistentes (Yagi et al., 2023). Estos avances, combinados con técnicas de metabolómica para identificar perfiles fenólicos asociados a resistencia, representan un enfoque multidisciplinario para mitigar el impacto económico de la fusariosis.

## **1.2. *Fusarium oxysporum***

*Fusarium oxysporum* (FOX) es un hongo filamentoso ampliamente distribuido en los suelos del mundo, capaz de sobrevivir por largos períodos en diversas condiciones ambientales (Filgueira, 2011). Aunque inicialmente se consideraba un organismo saprofito, se ha reconocido como un patógeno oportunista que afecta tanto a plantas como a algunos animales inmunocomprometidos (Singleton, 1992). En el ámbito agrícola, infecta cultivos de gran importancia económica, como el banano (*Musa paradisiaca*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), el pepino (*Cucumis sativus*) y la patilla (*Citrullus lanatus*). En 2019, se habían identificado 70 formas especiales de *Fusarium oxysporum*, incluyendo variantes parasíticas y no parasíticas (Edel y Leconte, 2019). Desde el punto de vista taxonómico, *Fusarium oxysporum* pertenece al filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Nectriaceae, y género *Fusarium*. Se considera un complejo de especies debido a las dificultades para diferenciar morfológica y fisiológicamente sus variantes, lo que ha generado

complicaciones en su clasificación y estudio. Este complejo ha sido responsable de enfermedades devastadoras en cultivos de alto valor económico, como el tomate, la papa (*Solanum tuberosum*) y el banano (Achari et al., 2020). Su capacidad para infectar diversos hospederos lo convierte en un microorganismo de gran interés en estudios de patogenicidad. A pesar de su impacto en la agricultura, su taxonomía sigue siendo un reto debido al desconocimiento de sus etapas teleomórficas (Zemánková y Lebeda, 2001). Los criterios morfológicos, como la presencia de hifas septadas y fiálides, incluyendo el tamaño y la forma de las macroconidias, microconidias y clamidosporas, han sido fundamentales para su clasificación taxonómica (Forero-Reyes et al., 2018). Las microconidias son unicelulares y tienen forma ovalada, mientras que las macroconidias presentan divisiones o septos que separan sus estructuras multicelulares. Además, la célula basal de los macroconidios muestra una característica distintiva en forma de “pie” propia de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2011). Esta riqueza morfológica es relevante para la identificación y clasificación precisa de *F. oxysporum*, y su estudio contribuye a comprender mejor la biología y patogenicidad de este hongo en diversos contextos agrícolas y fitopatológicos (Retana et al., 2018).

Al habitar en el suelo, *Fusarium oxysporum* tiene como principal vía de infección las raíces de las plantas; sin embargo, en presencia de heridas, también puede invadir la planta a través de las partes aéreas (Pizano, 2000). Los síntomas varían según el grado de patogenicidad del hongo y la susceptibilidad de la planta. Algunos de los síntomas observados incluyen enanismo en los brotes y amarillamiento de las hojas, y en casos de ataques muy agresivos, se produce la muerte vascular (Pizano, 2000). Estudios recientes en uchuva (*Physalis peruviana*) han identificado 21 accesiones resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *physalis*, asociando polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes como WD-40 repeats (vinculados a la respuesta hipersensible) y legumbre lectina beta (inductores de lipoxigenasas), lo que sugiere mecanismos de resistencia conservados en Solanáceas (Pabón et al., 2022). Además, en banano (*Musa spp.*), se ha demostrado que genotipos diploides AA (*M. acuminata ssp. malaccensis*) restringen la colonización del hongo mediante barreras físicas en rizomas y activación de genes como GPCRs (señalización celular) y lipasas (respuesta a estrés oxidativo) (Pabón et al., 2022).

El ciclo de la enfermedad causada por FOX inicia con la germinación de las microconidias, macroconidias o clamidosporas presentes en el suelo contaminado. La penetración del hongo ocurre a través de las hifas, que invaden diferentes tejidos de la planta. Estas hifas buscan llegar al tejido vascular, donde comienzan su propagación de forma ascendente, colonizando el xilema (Baayen, 1987; Agros, 1996). Desde hace un tiempo, se considera que FOX es un complejo de especies que comparten rasgos morfológicos y presentan filogenia polifilética, como si fuesen un conjunto de líneas clónales que pueden intercambiar material genético de forma horizontal (Singh, 2006). Algunas de esas especies son patógenas de diferentes plantas, lo que les permite ser multi hospedero sin presentar cambios aparentes en su morfología (Van Baarlen et al., 2007). A las especies con esta capacidad dentro de FOX se les da el nombre de formas especiales (f.sp.) (Baayen, 2000). En este estudio utilizamos aislados de FOX obtenidos de uchuva (*Physalis peruviana*) clasificado inicialmente como *Fusarium oxysporum* f.sp. *physalis*, agente patogénico que produce pudrición vascular en la uchuva. Se han encontrado híbridos de esta fruta que son resistentes a FOX, lo que permite pensar que están presentes genes de resistencia (Pabón et al., 2022). En este caso, los estudios se limitan a la selección de genotipos resistentes que mantienen las condiciones fisicoquímicas de la fruta. Por ejemplo, en *Physalis peruviana*, se han identificado 74 genes de inmunidad, incluyendo TIR-NBS-LRR y CC-NBS-LRR, que reconocen efectores del patógeno, y un SNP en el dominio LRR de PpIRG-63 asociado a resistencia (Pabón et al., 2022).

El genoma de FOX presenta alta plasticidad al estar expuesto a condiciones de estrés, como la presencia de hospederos resistentes o la renovación de las defensas de su hospedero (Vlaardingerbroek et al., 2016). Se ha descrito la presencia de cromosomas accesorios (AC's), supernumerarios o de linaje específico (LS's) (Vlaardingerbroek et al., 2016), que colaboran con la plasticidad genética. Estos AC's presentan diferencias frente a los cromosomas centrales (CC's); los AC's tienen mayor cantidad de elementos transponibles y una menor cantidad de genes constitutivos. Este porcentaje de genes es más bajo en relación con los CC's debido a la baja presión de selección soportada con un alto polimorfismo (Bertazzoni et al., 2018). Estudios en *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* han demostrado que los cromosomas accesorios son ricos en regiones repetitivas relacionadas con la metilación de histonas y la patogenicidad (Wang et al., 2024), así como en elementos transponibles, que representan más del 5% de su composición genómica (Hao et al., 2023).

(Ma et al., 2013) separan dos clases de genes asociados a la patogenicidad: genes de patogenicidad básica y genes de patogenicidad especializada. El primero es compartido por los miembros del género *Fusarium* y codifica los componentes involucrados en las primeras señales de reconocimiento del hospedero del hongo (MAPK, RAS, Proteínas G). El segundo grupo es específico de algunas especies del género *Fusarium* debido a la relación específica que tienen con algunos hospederos, y se localizan en los cromosomas móviles (Rampersad, 2020). Entre estos últimos se encuentran los genes SIX de FOX (secreted in xylem), responsables de la virulencia del patógeno y a su vez involucrados en la respuesta de resistencia del hospedero, debido a su interacción con los genes de resistencia reportados en tomate (I-1 o Immunity-1) (Zuriegat et al., 2021). Recientemente se sugiere que más de 55 genes en el genoma de FOX estarían relacionados con su patogenicidad, de estos 13 genes están involucrados en la producción de conidios y 43 en el metabolismo de crecimiento de sus hifas (Jackson et al., 2024). Estrategias innovadoras, como el silenciamiento génico mediante RNAi dirigido a genes fúngicos velvet (reguladores de virulencia) y *ftfl* (factor de transcripción), han reducido la severidad de la enfermedad en banano en un 32%, demostrando el potencial de enfoques biotecnológicos para el control de FOX (Pabón et al., 2022). Adicionalmente, el uso de agentes de control biológico como *Trichoderma virens* ha mostrado eficacia en uchuva, reduciendo el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) en un 27% y mejorando parámetros fisiológicos como la conductancia estomática (Pabón et al., 2022).

### **1.3. Respuesta de la planta**

En la actualidad, pocos trabajos están dirigidos a identificar los genes responsables de la resistencia del clavel contra el ataque del parásito. A pesar de lo anterior, se han identificado diferentes sustancias. Entre estas, se encuentran las suberinas y ligninas (Cuervo et al., 2009), las peroxidasas (Matté et al., 2010) y las fitoanticipinas, importantes en la respuesta a *Fusarium* (Curir et al., 2005). Estudios recientes revelan que las plantas resistentes acumulan flavonoides como el kaempferol y quercetín glucósidos en raíces, inhibiendo la germinación de esporas fúngicas y dañando membranas celulares de *Fusarium oxysporum* (Galeotti et al., 2008; Romero-Rincón et al., 2021).

Como respuesta a la invasión, la planta genera geles y estructuras gomosas como una de las primeras barreras de defensa. Estas sustancias producen una obstrucción del xilema, resultando en un desabastecimiento de agua y nutrientes en la planta. Este proceso tiene consecuencias significativas para la salud de la planta, afectando su crecimiento, desarrollo y, en última instancia, su supervivencia (Okunbowa y Shittu, 2012). Paralelamente, se activan mecanismos moleculares como la regulación de miRNAs (ej. miR482/2118), que silencian genes de virulencia fúngica relacionados con la degradación de la pared celular (Mathur et al., 2020).

El manejo tradicional de enfermedades se basa en varios métodos: control por exclusión, control físico, químico y biológico. El control por exclusión consiste en evitar la siembra en suelos contaminados y garantizar que el material vegetal utilizado para la siembra esté libre de la enfermedad. Sin embargo, este enfoque no siempre es suficiente debido a la alta propagación del patógeno tanto en suelos como en plantas sanas (García et al., 1995). Alternativas biotecnológicas, como el uso de agentes de biocontrol (*Bacillus* spp.), han demostrado inducir un estado de "priming" en plantas, potenciando la expresión de genes defensivos como quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas antes de la infección (Kaushal et al., 2021).

En cuanto al control físico, cuando la incidencia de la enfermedad es relativamente baja, se recurre a tratamientos de vapor del suelo. Aunque esta opción resulta poco económica para los cultivadores, también se implementa la esterilización de herramientas y la desinfección del personal como medidas adicionales para prevenir la propagación de la enfermedad (García et al., 1995). El control químico ha sido el más utilizado. Sin embargo, no es una buena opción debido al aumento de costos de los insumos y al daño irremediable al medio ambiente, la flora y la fauna (Fernández-Larrea, 2001). Finalmente, el control biológico es el más común, ya que existen microorganismos capaces de reducir la enfermedad al competir por espacio o nutrientes con el patógeno, produciendo una interacción de antibiosis (Borda et al., 1993).

Desde hace años, se ha implementado un manejo biotecnológico de la enfermedad, buscando mejorar el clavel mediante la obtención de cultivares y variedades resistentes a los patógenos (Filgueira, 2011). Se han realizado diferentes estudios para comprender mejor los fenómenos bioquímicos e histopatológicos de la respuesta del clavel cuando es atacado por el patógeno

FOX (Filgueira, 2011). Por ejemplo, en variedades resistentes, la activación temprana de la ruta fenilpropanoide (48–96 h post-infección) incrementa la producción de flavonoides y fenoles, neutralizando especies reactivas de oxígeno (ROS) y reforzando la pared celular mediante lignificación (Romero-Rincón et al., 2021).

Las plantas, al estar en constante interacción con diversos patógenos, han desarrollado mecanismos químicos de defensa para mitigar los efectos negativos que estos causan. Según Kumar et al. (2018), la interacción planta-patógeno se basa en una relación gen por gen. Esto significa que, por cada gen de virulencia del patógeno, existe un gen o enzima correspondiente en la planta que puede responder a esa virulencia. En el momento en que la planta detecta la presencia del patógeno, se desencadena una cascada de señales que activa su sistema de defensa (Jabeen et al., 2015). Esta respuesta incluye la generación de ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ), que actúan como señales para activar la muerte celular localizada (HR) y la resistencia sistémica adquirida (SAR), además de promover la lignificación de la pared celular (Lehmann et al., 2014).

Se ha demostrado que compuestos como el ácido abscísico (AB), el etileno (ET) y el ácido jasmónico (AJ), entre otros, están involucrados en la inducción de diferentes genes de defensa de la planta (Monroy-Mena et al., 2019). También se sabe que cuando la planta es infectada por hongos, los elicitores fúngicos originan cambios en el potencial de la membrana y el transporte de protones mediados por ATPasa en la membrana plasmática de la planta (Tameling et al., 2002).

El ácido salicílico (AS) es un actor importante en la inmunidad de la planta en la respuesta al estrés biótico, como parte de los mecanismos de señalización y fitohormona, donde están involucrados el ácido jasmónico, el etileno, el ácido abscísico con la interacción de factores de transcripción y reguladores genéticos (Mishra et al., 2024). La señalización en el caso del AS en la respuesta inmune a través de la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR), resistencia sistémica inducida (ISR) y una cascada de señalización que activan PRs y fitoalexinas modulados por efectores del parásito (Mishra et al., 2024).

Jones y Dangl (2006) propusieron el modelo de zigzag para describir los pasos en la interacción entre la planta y el patógeno. Según este modelo, la respuesta de la planta depende inicialmente de su capacidad para reconocer moléculas del patógeno (Boller y He, 2009;

Vázquez et al., 2018). En la interacción entre una planta y un patógeno, se desencadenan varios mecanismos de defensa. Primero, las PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) o patrones moleculares asociados a patógenos son reconocidas por los PRRs (*pathogen recognition receptors*) o receptores de reconocimiento de patrones. Lo anterior activa la PTI (*pattern-triggered immunity*) o inmunidad innata basada en patrones, que ayuda a contrarrestar la colonización del patógeno (Jones y Dangl, 2006). En clavel, este reconocimiento implica la sobreexpresión de genes como *RLK* (*receptor-like kinase*), crucial para identificar efectores fúngicos y modular respuestas defensivas (Thapa et al., 2018).

Sin embargo, algunos patógenos no son reconocidos y logran invadir los tejidos de la planta. Esto da lugar a una ETS (*effector-triggered susceptibility*) o susceptibilidad desencadenada por efectores. En este punto, los receptores NB-LRR (*nucleotide-binding site-leucine-rich repeat*), proteínas con regiones de repeticiones de leucina de unión a nucleótidos, reconocen proteínas específicas del patógeno y se activa la ETI (*effector triggered immunity*) o inmunidad producida por efectores (Jones y Dangl, 2006). La ETI es una respuesta más rápida y fuerte que la PTI, y puede resultar en una respuesta efectiva contra la enfermedad o incluso en apoptosis celular (Jones y Dangl, 2006). No obstante, algunos hongos pueden evitar que se active la ETI al suprimir el gen responsable de su activación (Meng y Zhang, 2013).

A pesar de que el clavel posee una capacidad natural para resistir a los agentes fitopatógenos como FOX, el microorganismo ha logrado superar este mecanismo de defensa (Burbano-Figueroa, 2020). El hongo secreta proteínas que interfieren con el metabolismo del hospedero, desactivando sustancias tóxicas producidas por la planta. Esto favorece la propagación del hongo y, como consecuencia, la planta debe invertir una gran cantidad de energía en combatirlo (Burbano-Figueroa, 2020). Estudios transcriptómicos revelan que las plantas resistentes activan rutas de señalización hormonal (JA y SA) y genes de metabolismo secundario, como *PAL* y *CHS*, para contrarrestar esta supresión (Kaushal et al., 2021).

Ardila et al. (2014) estudiaron enzimas de la ruta fenilpropanoide en clavel comercial, reportaron proteasas y especies reactivas de oxígeno ROS en variedades comerciales de clavel. Se han identificado algunos flavonoides que participarían en la respuesta del clavel (Ardila et al., 2018). En variedades resistentes, estos flavonoides no solo actúan como

antioxidantes, sino que también inhiben la actividad de enzimas fúngicas clave, como las poligalacturonasas, limitando la degradación de la pared celular (Galeotti et al., 2008).

Soto et al. (2012) estimaron que la resistencia a *Fusarium* en clavel híbrido puede estar gobernada por dos o más genes con acción aditiva. En trabajos más recientes, se ha intentado la transformación de la planta con genes de la jasmonato metil transferasa, pero las plantas transgénicas solo son parcialmente resistentes (Norman et al., 2017). Alternativas como la sobreexpresión de  $\beta$ -1,3-glucanasa (GLU) han demostrado éxito en otras especies, como *Panax notoginseng*, confiriendo resistencia a *F. solani* al degradar componentes de la pared fúngica (Taif et al., 2020). GLU es un gen miembro de las PRs (pathogenesis related proteins), la proteína se le encuentra en la pared celular en *P. notoginseng* y es un gen inducido por el aumento del ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno, también presenta altos niveles de expresión cuando la planta es infectada con *F. solani*, en condiciones in vitro GLU presenta altos niveles de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* (Taif et al., 2020).

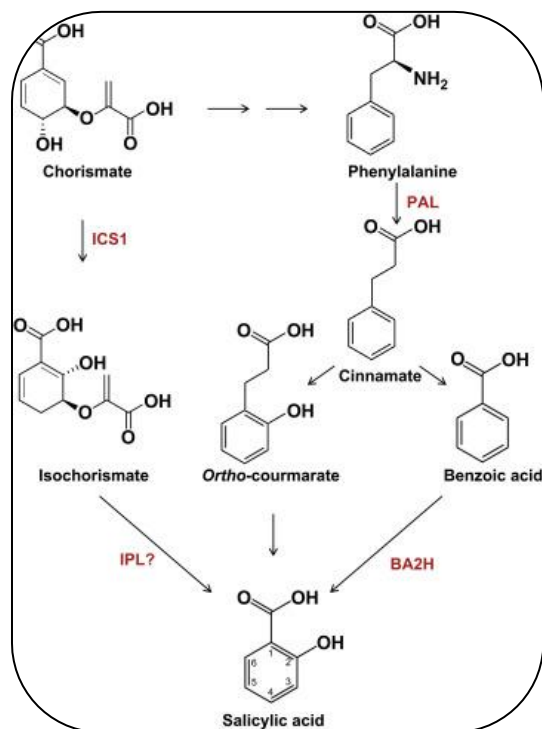
Por otro lado, genes de resistencia a *Fusarium* se han identificado en diferentes plantas y especies, como los genes *I* e *I-2* de *Solanum pimpinellifolium*, que confieren resistencia contra las razas 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol), o el gen *I-3* de *Solanum pennellii*, que codifica una proteína NB-LRR (*nucleotide-binding site-leucine-rich repeat*) y confiere resistencia contra la raza 3 de Fol (Catanzariti et al., 2015). Estos mecanismos están mediados por interacciones gen-por-gen, donde proteínas NB-LRR reconocen efectores fúngicos específicos, desencadenando respuestas de hipersensibilidad (HR) y apoptosis celular. Estudios en *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* han demostrado que la infección induce cambios en la lignificación, la producción de fitoalexinas y la síntesis de etileno en plantas de garbanzo, mecanismos conservados en otras especies como el clavel (*Dianthus caryophyllus*) (Kumar et al., 2018). En este último, el transcriptoma ha sido ampliamente estudiado bajo estrés por *Fusarium*, revelando variaciones en la expresión de genes asociados a la síntesis de lignina y la respuesta hormonal (Tanase et al., 2012; Zhou et al., 2017). Recientemente, el grupo de investigación Fitopatología Molecular de la Universidad Militar Nueva Granada identificó 27 genes implicados en la respuesta a *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (FOX) mediante técnicas de RNAseq y qPCR en células indiferenciadas de clavel. Entre estos genes se incluyen genes de metabolismo basal

(*housekeeping*), genes de respuesta a patógenos (ej. PAL, GLU) y proteínas relacionadas con patogenicidad (PRs), confirmando que la resistencia en clavel es un fenómeno multigénico y multivariado, donde combinaciones específicas de genes y niveles de activación determinan la susceptibilidad o resistencia según la variedad (Filgueira et al., 2024).

La inducción de resistencia en clavel mediante tiamina (vitamina B1) ha surgido como una estrategia innovadora. Pérez-Mora et al. (2024) demostraron que este compuesto activa la producción de 77 proteínas vinculadas al metabolismo del ácido shikímico, precursor clave de la ruta fenilpropanoide, esencial para la síntesis de compuestos defensivos como flavonoides y ácido salicílico. Este hallazgo se alinea con estudios en *Arabidopsis*, donde la tiamina modula la biosíntesis de fitoalexinas y proteínas PR (Romero-Rincón et al., 2021). Entre los genes clave identificados en clavel, la alcohol cinamílico deshidrogenasa I (ADH) cataliza la biosíntesis de monolignoles para la lignificación de la pared celular, un mecanismo observado en *Quercus* durante infecciones por *Phytophthora* (Coelho et al., 2006; Zhang et al., 2024). ADH hace parte del mecanismo de fermentación en plantas y es importante bajo condiciones anoxicas, condiciones que se pueden observar durante interacciones con parásitos como lo demuestra la respuesta de plantas infectadas con *p. brassicay* y *A. tumefaciens* (Ventura et al., 2020). Por su parte, la arginina descarboxilasa (ADC) sintetiza poliaminas (putrescina, espermidina) que regulan la elongación celular y mitigan el estrés oxidativo durante la infección (Ren et al., 2022). En las plantas la descarboxilación de la arginina produce agmatina un precursor de la putrescina que se procesan en alcaloides de tropano y pyrrolizidina que son utilizados por la planta para atacar una gran variedad de parásitos (Thomas, 2016).

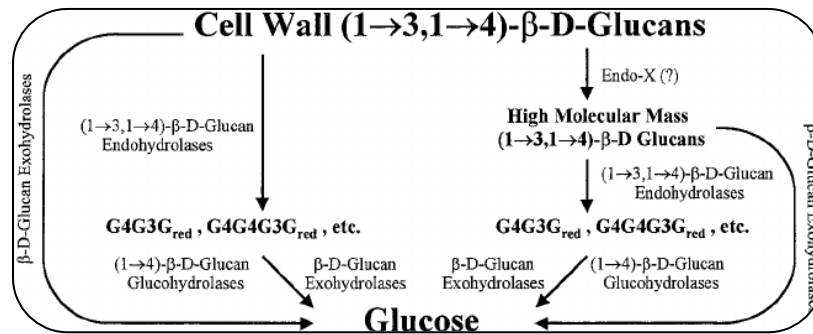
El gen fenilalanina amonio liasa (PAL), central en la ruta fenilpropanoide, convierte L-fenilalanina en ácido trans-cinámico, precursor de lignina y flavonoides [Diagrama 1]. En variedades resistentes de clavel, la expresión de PAL se incrementa a las 48–96 horas post-infección, coordinando la acumulación de flavonoides (ej. kaempferol y quercetín glucósidos) que inhiben la germinación de esporas de *Fusarium* (Galeotti et al., 2008; Cass et al., 2015). PAL es un gen inducible durante el crecimiento de las plantas y durante las infecciones de parásitos, alterando la síntesis de ligninas y por ende en el grosor de las paredes de las células en las raíces, utilizando técnicas de knock-out del gen LjPAL1 en Lotus

se incremento las infecciones por *M. loti*; en estas plantas se redujo el ácido salicílico endógeno tanto en su expresión como en su acumulación por modificación de sus vías de señalización (Chen et al., 2017).



**Diagrama 1.** Fenilalanina amoniaco liasa y su participación en el metabolismo fenilpropanoide, (Jin, Cai, & Zhou, 2017).

Otro gen crítico es la  $\beta$ -1,3-glucanasa (GLU), que degrada  $\beta$ -glucanos de la pared fúngica y remodela la pared celular vegetal [Diagrama 2]. En *Panax notoginseng*, la sobreexpresión de *GLU* reduce la severidad de *F. solani* en un 70%, un mecanismo extrapolable a clavel, donde *GLU* se induce diferencialmente durante la infección por FOX (Taif et al., 2020; Ardila e Higuera, 2005).



**Diagrama 2.** Participación de la Beta-1,3-glucanasa en la modificación de los monosacáridos de la pared celular, (Hrmova & Fincher, 2001).

La hidrolasa glicosídica similar a quitinasa 4 (CTS) ataca la quitina de la pared fúngica este gen es parte de las PRs (pathogenesis related proteins) con actividad de glicosil hidrolasa es fuertemente expresada jugando un papel importante en el control de los hongos patógenos, aunque también esta expresada bajo estrés abiótico como intoxicación con metales o sales, su actividad produce quito-oligosacaridos (Vaghela et al., 2022). Mientras que las peroxidasas (PER) mantienen la homeostasis redox y promueven la lignificación durante el estrés biótico (Kfoury et al., 2024; Simin et al., 2024), responsables de mantener el metabolismo ROS que tiene aspectos negativos y positivos para la planta, hacen parte de una familia de proteínas antioxidantes, interviene en procesos como el crecimiento de tejidos, modificación de las paredes de las células y biosíntesis de lignina, hacen parte también de la respuesta a estrés abiótico, se localiza en el apoplasto, pared celular y citoplasma (Li et al., 2024). Finalmente, la vía del ácido salicílico (RDC) y la quinasa similar a receptor (RLK) son esenciales para reconocer patrones moleculares del patógeno (PAMPs/MAMPs) y activar respuestas defensivas. En cereales, la isoforma *RLK-7* se sobre expresa durante infecciones por *Fusarium verticillioides*, sugiriendo un papel conservado en clavel (Yan et al., 2023; Thapa et al., 2018). RLK es una proteína transmembranal con un dominio celular quinasa, como los receptores tirosina kinasa de los animales, como los factores epidermales de crecimiento, controla una serie de procesos que incluyen crecimiento, desarrollo, respuesta a parásitos, percepción de hormonas, una serie de multifunciones incluye respuesta a hormonas esteroidales (Shiu and Bleecker, 2021).

Debido a la alta demanda internacional de clavel y la adaptabilidad de *Fusarium*, el desarrollo de variedades resistentes es prioritario (Thakur, 2002). La combinación de enfoques

transcriptómicos (Filgueira et al., 2024), la inducción de resistencia con tiamina (Pérez-Mora et al., 2024) y la edición génica de blancos como PAL o GLU ofrece herramientas promisorias para reducir el uso de fungicidas y mitigar impactos ambientales, consolidando al clavel como un modelo clave en el estudio de interacciones planta-patógeno en cultivos ornamentales.

Por esta razón, el estudio de los genes asociados a la resistencia contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (FOX) en diferentes variedades de clavel constituye un elemento clave para el desarrollo de nuevas variedades que contribuyan al control de esta enfermedad. En este contexto, se plantea la pregunta de investigación: ¿Cómo influyen los diferentes niveles de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en la expresión de genes relacionados con la resistencia en *Dianthus caryophyllus*?

El objetivo general de este trabajo es determinar la variabilidad en la expresión de genes de *Dianthus caryophyllus* relacionados con la resistencia frente a *Fusarium oxysporum*, en plantas y células elicidadas con aislados de FOX que presentan distintas variaciones en su patogenicidad. De manera específica, el estudio busca comparar la variación en la patogenicidad de distintos aislados de FOX al interactuar con híbridos de clavel con características de resistencia o susceptibilidad a este patógeno y demostrar la variación en la expresión de genes de resistencia en diferentes híbridos de clavel, tanto resistentes como susceptibles.

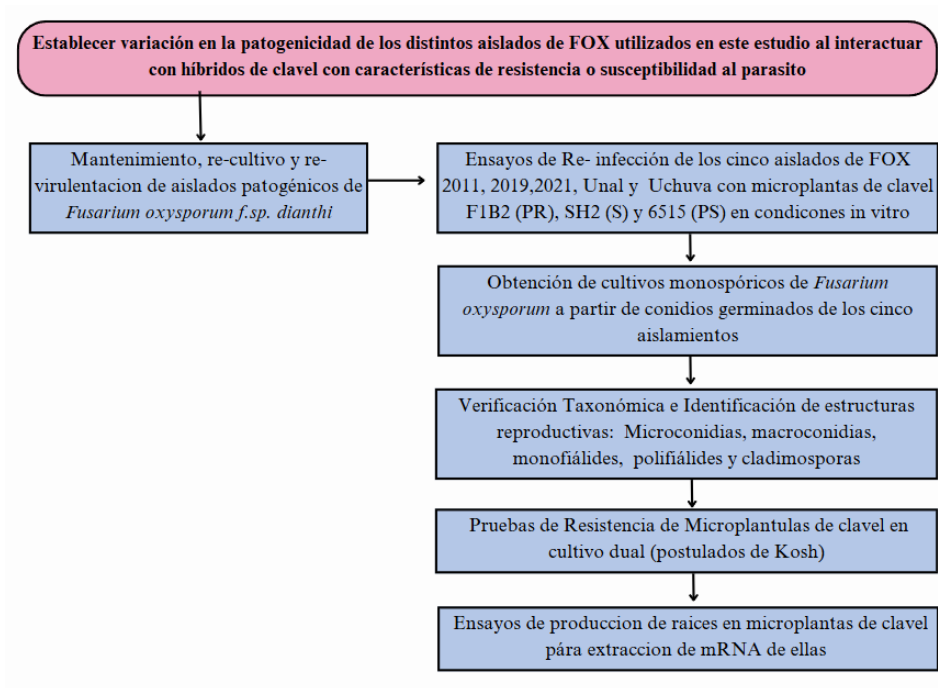
## **2. MATERIALES Y METODOS**

Para evaluar la variabilidad en la patogenicidad de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (FOX) y su interacción con híbridos de clavel resistentes y susceptibles, se implementó un enfoque metodológico estructurado en dos fases principales.

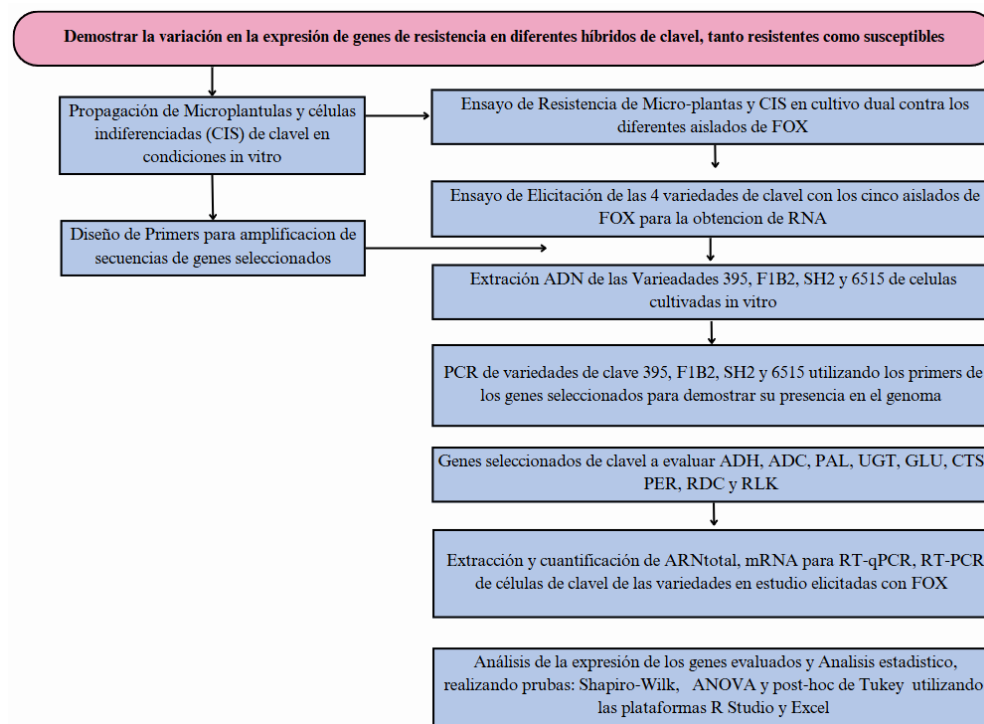
En la primera fase, se llevó a cabo el mantenimiento y caracterización de los aislados patogénicos de FOX, seguido de su reinfección en microplantas de clavel bajo condiciones in vitro. Se obtuvieron cultivos monospóricos, se realizó una identificación taxonómica detallada y se ejecutaron pruebas de resistencia en cultivo dual para evaluar la virulencia de los aislados en distintas variedades de clavel.

La segunda fase se centró en el análisis de la expresión génica en híbridos de clavel con diferentes niveles de resistencia. Se realizaron ensayos de elicitación con los aislados de FOX, extracción de ADN y ARN, amplificación de genes específicos mediante PCR y RT-qPCR, y análisis estadísticos para detectar diferencias significativas en la expresión de genes asociados a la resistencia.

Los Diagramas 3 y 4 presentan, de manera esquemática, los procedimientos metodológicos aplicados en este estudio.



**Diagrama 3.** Metodología para evaluar la variación en la patogenicidad de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*



**Diagrama 4.** Metodología para evaluar la variación en la expresión de genes de resistencia en híbridos de clavel.

### 2.1. Lugar de estudio y obtención del material biológico

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Biotecnología Vegetal, Microscopía y Cultivo de Tejidos de la Universidad Militar Nueva Granada, ubicada en el kilómetro 1.5 de la variante Cajicá-Zipacquirá en Cundinamarca, Colombia. Para este estudio se utilizaron cuatro variedades de clavel: una resistente (395 R), una parcialmente resistente (F1B2 PR), una susceptible (SH2 S) y una parcialmente susceptible (6515 PS) a *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi (FOX). Estas variedades se obtuvieron a partir de microplantas de clavel cultivadas *in vitro*, que provienen de la germinación de semillas producto de cruces híbridos F1 y F2 entre variedades silvestres resistentes y susceptibles.

Se trabajó también con cinco aislados de FOX: 2011, 2019 y 2021, aislados de plantas infectadas en los invernaderos de la UMNG en los años correspondientes; UNAL, aislamiento aportado por el grupo de *Fusarium* de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia; y el aislado UCHUVA, aportado por el Laboratorio de Fitopatología de la UMNG y obtenido de un cultivo de uchuva. Las células y los aislados fueron

suministrados por el grupo de investigación de Fitopatología Molecular de la Universidad Militar Nueva Granada, todos cultivados en condiciones *in vitro*.

## **2.2. Obtención y propagación de células indiferenciadas y microplantas de clavel**

La propagación de microplantas de cada una de las variedades se realizó siguiendo el protocolo establecido por el grupo de investigación (Filgueira, 2011). Este proceso se repitió cada cuatro semanas durante 12 meses, siempre en condiciones *in vitro*. Se realizaron cortes en los entrenudos de los tallos, los cuales se plantaron en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS), complementado con sacarosa (30 g/L) y Phytigel (Sigma) (2.5 g/L), ajustado a un pH de 5.8. Posteriormente, los explantes se colocaron en una sala de cultivo de tejidos, donde se mantuvieron a una temperatura constante de 26°C y un fotoperiodo de 16 horas luz diarias.

Las células indiferenciadas se obtuvieron colocando fragmentos de 5 mm de lado, de hojas de las microplantas cultivadas *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Filgueira, 2011), enriquecido con 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) (1 mg/L). El cultivo se mantuvo por 15 días a 26°C y se expuso a un fotoperiodo consistente en 16 horas de luz seguidas por 8 horas de oscuridad, hasta la aparición de las células indiferenciadas.

El grupo de investigación implementó un protocolo estandarizado para la propagación de células indiferenciadas (Filgueira, 2011). Este proceso se llevó a cabo en recipientes de vidrio, cada uno con 30 mL del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962). El medio fue enriquecido con 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) a una concentración de 1 mg/L como hormona sintética para mantener la indiferenciación de las células. Las células se mantuvieron en incubación a una temperatura constante de 26°C durante cuatro semanas. Durante este periodo, se expusieron a un fotoperiodo consistente en 16 horas de luz seguidas por 8 horas de oscuridad.

## **2.3. Mantenimiento y re-cultivo de aislados patogénicos de *Fusarium oxysporum***

Los aislados proporcionados por el grupo de investigación fueron sometidos a un proceso de re-cultivo. Este proceso se realizó en cajas de Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar

(PDA), manteniéndose a 26°C durante siete días. Posteriormente, los aislados se transfirieron a frascos Erlenmeyer, conteniendo 150 mL de medio líquido Czapek, y se incubaron bajo agitación constante a 26°C por otros siete días. Finalmente, los cultivos obtenidos, tanto en medio PDA como en medio líquido Czapek, se almacenaron en refrigeración a 4°C.

#### **2.4. Obtención de cultivos monospórico de *Fusarium oxysporum***

Se extrajo un fragmento del medio PDA que contenía micelio de cada aislamiento de FOX y se transfirió a un Erlenmeyer con 150 mL de medio líquido Czapek-Dox broth®. Los Erlenmeyer se mantuvieron bajo agitación a 70 r.p.m. y una temperatura de 26°C durante tres días. Transcurrido este período, se procedió a realizar diluciones seriadas de las microconidias producidas. Se tomó una alícuota de 1 mL del medio líquido con esporas y se introdujo en un tubo de ensayo con 9 mL de medio Czapek estéril. Este procedimiento se repitió con cada aislado y se llevó a cabo cuatro veces, hasta alcanzar una dilución de  $1 \times 10^{-4}$ , momento en el cual la concentración de conidios se redujo significativamente.

Finalmente, se tomó una alícuota de 100 µL de la última dilución y se esparció uniformemente con un rastrillo de vidrio sobre la superficie de una caja de Petri que contenía medio PDA, y se incubó a 26°C por 24 horas, según (Duarte et al., 2016). Al concluir este período, se observaron los aislados bajo un microscopio invertido Olympus® CK40 con contraste de fases. Se identificaron conidios germinados, los cuales se trasladaron a cajas de Petri individuales con medio PDA y se incubaron a 26°C durante siete días.

#### **2.5. Verificación taxonómica e identificación de estructuras reproductivas**

Se realizaron dos ensayos para la identificación taxonómica de los aislados. El primero consistió en una identificación morfológica macroscópica de los aislados previamente obtenidos. Para esto, se cultivó cada uno de los aislados en medio PDA por más de 15 días. Posteriormente, se registró la forma de la colonia (hábito de crecimiento), la coloración de la colonia por el frente y reverso de la caja de Petri, y la velocidad de crecimiento (cubrimiento de la caja).

El segundo ensayo implicó la identificación microscópica de estructuras reproductivas. Para la identificación microscópica, se utilizaron cultivos monospóricos en PDA, raspando el micelio aéreo con un asa estéril y depositándolo en un portaobjetos con una gota de agua estéril. Estas muestras se examinaron bajo un microscopio de campo claro con contraste de fases diferencial, buscando estructuras como microconidias, macroconidias, monofíalides, polifíalides y clamidoporas. Este análisis permitió identificar y observar diferencias morfológicas entre los distintos aislados de FOX, utilizando como referencia el libro (Rossman et al., 1987). Los aislados 2011, 2019 y 2021 fueron caracterizados molecularmente usando regiones de ITSs, b-tubulina, a-actina, EFs en trabajos anteriores del grupo de investigaciones (Gómez, 2021).

## **2.6. Evaluación de la resistencia de micro-plantulas a FOX por cultivo dual**

Se utilizó un recipiente de vidrio (frasco de compota) que contenía el medio de cultivo MS con sacarosa (30 g/L) y Phytigel™ (2.5 g/L), con un pH de 5.8 en condiciones estériles (*in vitro*). Las plántulas fueron sometidas a un fotoperiodo de 16 horas de luz a una temperatura de 26°C. Se colocaron cuatro plántulas micropropagadas por frasco, las cuales crecieron hasta desarrollar raíces en las microplantas.

Posteriormente, se sembraron 20 µL de una suspensión de esporas con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL de cada aislado de FOX en medio Czapek (líquido). Para ello, se utilizó un círculo de papel filtro de 0.7 cm de diámetro, que se colocó en el centro de las cuatro micro-plantas. El hongo creció e invadió las raíces de las micro-plantas durante siete días, tras los cuales se realizó el análisis del resultado.

Pasados los siete días, a las plantas infectadas se les retiraron las hojas y raíces. Los tallos se lavaron en hipoclorito de sodio al 5% durante dos minutos, en etanol al 96% durante un minuto y en agua destilada estéril durante dos minutos. Cada tallo se dividió en cuatro partes y se sembraron de forma horizontal en PDA, manteniendo la orientación basal-apical. Se dejaron en una incubadora a 26°C durante siete días. Finalmente, se determinó el grado de crecimiento del hongo dentro del tallo de la planta, anotando la aparición del hongo en cada extremo cortado (ocho extremos), lo que resultó en una variación cuantitativa de la resistencia completa de 0/8 hasta la susceptibilidad completa de 8/8.

Cada experimento de variedad de clavel contra aislamiento de *Fusarium oxysporum* fue repetido tres veces, los valores que se presentan son el promedio de los tres experimentos, los análisis estadísticos como la varianza de los datos y la dispersión de estos se muestran al final del trabajo en los anexos.

### **2.7. Ensayo de elicitación de células indiferenciadas en cultivo dual**

El cultivo dual consistió en colocar 2 g de células en un extremo de una caja de Petri, con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa (30 g/L), pH 5.8, Phytigel™ (2.5 g/L), suplementado con 1 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Luego de 7 días, se inocularon 20 µL de una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas/mL del hongo sobre cuatro círculos de papel filtro estéril de 0.7 cm de diámetro, los cuales se ubicaron en el lado opuesto al callo. El cultivo se dejó durante 7 días, bajo condiciones de luz permanente y a una temperatura de 26°C.

Se registró el crecimiento del hongo en centímetros (cm) diariamente durante 7 días, acompañado de un registro fotográfico (Soto et al., 2009). Este procedimiento se realizó con las 4 variedades y los cinco aislados. Cada experimento de células de clavel contra aislamiento de *Fusarium* fue repetido tres veces, los valores que se presentan son el promedio de los tres experimentos, los análisis estadísticos como la varianza de los datos y la dispersión de estos se muestran al final del trabajo en los anexos. Finalmente, las plantas elicitadas fueron retiradas y congeladas a -70°C para la extracción de ADN y ARN total.

### **2.8. Extracción de ADN de microplantas *in vitro***

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por (Soto et al., 2009). Inicialmente, se pesaron 100 mg de los tallos obtenidos de la micropropagación de cada variedad, los cuales se maceraron con nitrógeno líquido en un mortero. Posteriormente, se añadieron 8 mL de buffer de extracción precalentado [2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 0.2% 2-mercaptoetanol, pH 8.0] y se incubó a 60°C durante 30 minutos con agitación.

Transcurrido este tiempo, se agregaron 7 mL de cloroformo isoamil-alcohol (24:1, p/v), mezclándose por inversión hasta obtener una emulsión. Se procedió a centrifugar a 6500 r.p.m. a temperatura ambiente durante 10 minutos. La fase acuosa se recuperó en nuevos tubos y se añadió 2/3 del volumen de isopropanol frío, dejándose a 4°C durante 24 horas.

Posteriormente, se centrifugó a 6500 r.p.m. Inmediatamente después, se eliminó el sobrenadante y se agregó el buffer de lavado [etanol 76%, acetato de amonio 10 mM]. Tras 20 minutos, se volvió a centrifugar a 6500 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Una vez que el pellet se secó, se añadió 1 mL de TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0] y se incubó a 37°C con ribonucleasa A de páncreas bovino [10 µg/mL] durante 30 minutos para eliminar el ARN.

Para precipitar el ADN, se añadieron dos volúmenes de acetato de amonio (con una concentración final de 2.5 M) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente, se centrifugó a 10000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en TE. Para medir la concentración de ADN, se utilizó el kit Qubit™ dsDNA HS (Qubit Fluorometer Thermo Fisher Scientific).

Para evaluar la calidad del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se corrió en buffer TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) en cámara de electroforesis horizontal y fuente de poder BioRad® durante 1 hora a 50 V. Para observar el ADN, este se tiñó con bromuro de etidio (Sigma) a una concentración final de 0.5 mg/mL. Finalmente, se visualizó en un transiluminador UV, según lo descrito por Filgueira (2011).

## **2.9. PCR de ADN genómico de las variedades de clavel para identificar la presencia de los genes a estudiar.**

La amplificación por PCR se realizó utilizando ADN genómico que se había obtenido previamente. Para este proceso, se utilizó el kit de PCR MyTaq™ DNA Polymerase de Bioline®, a un volumen de 20 µL (según se indica en la Tabla 1). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf® 035735 Mastercycler Nexus Gradient, siguiendo el protocolo de amplificación que también se detalla en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Protocolo para PCR utilizando MyTaq™ DNA Polymerase.

| Reactivo                 | Volumen     |
|--------------------------|-------------|
| 5x Mytaq Reaction Buffer | 4uL         |
| Primer Forware           | 0.4uL       |
| Primer Reverse           | 0.4uL       |
| Muestra DNA              | 1uL         |
| My taq DNA Polymerase    | 0.4uL       |
| Agua Tratada con DEPC    | 13.8uL      |
| <b>Volumen Final</b>     | <b>20uL</b> |

**Tabla 2.** Programa utilizado en amplificación por PCR de ADN (\*Tm annealing primers).

| Paso                      | Temperatura | Tiempo |
|---------------------------|-------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95°C        | 1 min  |
| <b>40 ciclos</b>          |             |        |
| Desnaturalización         | 95°C        | 15 seg |
| Anneling                  | 60-65°C     | 20 seg |
| Extensión                 | 72°C        | 20 seg |
| <b>Final</b>              |             |        |
| Hold                      | 4°C         | ∞      |

Para evaluar la calidad de los amplicones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se corrió en buffer TBE 1X (89mM de Tris base, 89mM de ácido bórico, 2mM de EDTA pH 6.8) en una cámara de electroforesis horizontal y fuente de poder BioRad® durante 1 hora a 50 V. Para observar el ADN, se tiñó con bromuro de etidio (Sigma) a una concentración final de 0.5mg/ml. Finalmente, se visualizó en un transiluminador UV.

## 2.10. Genes de clavel evaluados

Los genes seleccionados para este proyecto fueron identificados en trabajos anteriores realizados por el grupo de investigación de Fitopatología Molecular de la Universidad Militar Nueva Granada (Filgueira et al., 2024). Estos estudios utilizaron análisis de transcriptoma de variedades de clavel, tanto elicitadas como no elicitadas con FOX.

A partir de las secuencias obtenidas en los transcriptomas, se diseñaron primers utilizando la herramienta "Primer Designing Tool" del NCBI (Tabla 3). Se realizó un análisis BLAST a las secuencias "Forward" y "Reverse complement" para buscar la homología en las bases de

datos. Como resultado, se obtuvieron secuencias génicas anotadas en *Dianthus caryophyllus*, con un porcentaje de identidad del 100% y un E-value < 0,005 para los genes seleccionados (Tabla 3).

Cada una de las secuencias de la base de datos fue confirmada mediante un análisis de dominios en la plataforma del NCBI utilizando el software Conserved Domain Analysis Tool. Se seleccionó únicamente una secuencia basándose en el criterio de la menor cantidad de gaps presentes en los dominios conservados. Finalmente, se confirmó la presencia de esta secuencia en el genoma de clavel construido por (Yagi et al., 2014) y (Gómez-Corredor en 2021), en la base de datos del Kazusa DNA Research Institute (<https://www.kazusa.or.jp/genome/>).

**Tabla 3.** Genes de Clavel relacionados con la defensa contra *Fusarium* utilizados en este estudio.

| Genes                                            | Símbolo | Forward Primer            | Reverse Primer            | Expected fragment (pb) |
|--------------------------------------------------|---------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Alcohol deshidrogenasa                           | ADH     | AAGGAATGCGCTCACTGCAAATCC  | ATGTCGATTTCAAGCGTCCATGCG  | 852                    |
| Arginina descarboxilasa                          | ADC     | AATTCGCGCTCGTTTGCTTCTTC   | TATCGGTCCTGGTTGCACITTCACA | 764                    |
| Fenilalanina amoniaco liasa                      | PAL     | CTTGCTTCTCTGCGCGGA        | ATGGGGACTCAATTTGGCGGC     | 165                    |
| Antocianina 5-O-glucosiltransferasa              | UGT     | GAAAATCGCTCCGTCGAGGGTTGAG | CCATAGCGGCCTTCTCAGCTCATG  | 227                    |
| Beta-1,3-glucanasa                               | GLU     | GGCTTGTTACTGAAGGCTGGA     | GCTACAACACCTGAACTGCC      | 282                    |
| Hidrolasa glicosídica similar a quitinasa 4      | CTS     | TCGGTACTGGCAGCAATGTC      | GTAACACCGAATTTGGCGCA      | 455                    |
| Homólogo a peroxidasas                           | PER     | TCGCAGACGTGGGTTTAACA      | CGGCATCAGACTGGAAGAGG      | 291                    |
| Vía de señalización mediada por ácido salicílico | RDC     | TCCCTCGTAGGTCGTGATT       | TGCTGGCAAAAGAGTCAGCC      | 836                    |
| Quinasa similar a receptor                       | RLK     | TGGACCCAGATGGAGGAGTT      | ATCTCCTACTCATAACGCGGC     | 240                    |

## 2.11. Extracción y cuantificación de ARN total de micro-plantas.

El ensayo de elicitación, propuesto por Filgueira (2011), se utilizó como guía para la activación de mecanismos de respuesta en clavel. En este proceso, se emplearon micro-plantas elicidadas de las variedades resistentes y susceptibles. Antes de la extracción, se esterilizaron los morteros, pistilos y pinzas mediante un lavado previo con Pirocarbonato de dietilo (DEPC) para eliminar las RNAsas. El tejido, 0.1 g, se maceró en un mortero con nitrógeno líquido. La extracción de ARN total se llevó a cabo siguiendo el protocolo del Kit RNA isolation NucleoSpin® de MACHEREY-NAGEL. Posteriormente, se cuantificó el RNA utilizando el Kit Qubit™ RNA HS Assay Kit High Sensitivity de Thermo Fisher Scientific. Finalmente, se evaluó la calidad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, de la misma manera que se hizo en la extracción de ADN descrita anteriormente.

### **2.12. qPCR de ADN genómico y RT-PCR de mRNA**

Para confirmar la presencia de los genes en las células indiferenciadas de las variedades a utilizar y evaluar la cantidad de cada gen para analizar los niveles de expresión desde la perspectiva de la dotación génica, se utilizó PCR convencional para visualizar la presencia de los genes (ver 2.9) y qPCR de ADN genómico para estudiar la dotación génica. Para esto último, se empleó el kit Applied Biosystems real-time PCR master mix de Thermo Fisher®. Los productos de qPCR se analizaron mediante gráficos y por electroforesis en agarosa (ver 2.8).

Para identificar la expresión de los genes seleccionados en las células elicidadas con FOX, se utilizó la técnica de RT-PCR. La extracción y obtención del mRNA se realizó como se describe en 2.11. Se utilizó el kit One Step RT-PCR Master Mix Kit de Sigma® para amplificar el cDNA. El resultado de la técnica se visualizó por electroforesis en gel de agarosa, como en 2.8. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf® 035735 Mastercycler Nexus Gradient.

### **2.13. RT-qPCR de mRNA de células elicidadas**

El mRNA de las células de las variedades susceptibles y resistentes elicidadas se obtuvo como se describe en la sección 2.11. Para la RT-qPCR, se utilizó el Kit One step SYBR Green® RT-qPCR with MMLV & hot-start Taq DNA Polymerase de Sigma-Aldrich® (ver Tabla 4). La amplificación de secuencias se llevó a cabo mediante el método no específico de RT-qPCR en el termociclador Line-Gene 9600 Plus de BIOER Technology® (ver Tabla 5). El análisis de las gráficas se realizó utilizando el software 9600 Plus. Se siguió el protocolo del Kit SYBR® Green Quantitative RT-qPCR, ajustando el volumen del primer y del RNA utilizado.

**Tabla 4.** Protocolo Kit SYBR® Green Quantitative RT-qPCR.

| Reativo                                           | Volumen     |
|---------------------------------------------------|-------------|
| 2xSYBR Green Taq Readymix For Quantitative RT-PCR | 10uL        |
| Primer Foreware                                   | 0,4uL       |
| Primer Reverse                                    | 0,4uL       |
| Muestra RNA                                       | 1uL         |
| M-MLV RT                                          | 0,1uL       |
| Agua Tratada con DEPC                             | 8,1uL       |
| <b>Volumen Final</b>                              | <b>20uL</b> |

**Tabla 5.** Programa utilizando RT-qPCR en termociclador Line-Gene 9600 Plus termociclador (\* Tm annealing primers).

| Paso                      | Temperatura | Tiempo |
|---------------------------|-------------|--------|
| Retrotranscripción        | 43°C        | 30min  |
| Desnaturalización inicial | 95°C        | 15 seg |
| <b>40 ciclos</b>          |             |        |
| Desnaturalización         | 95°C        | 15 seg |
| Anneling                  | 60-65°C     | 20 seg |
| Extensión                 | 72°C        | 20 seg |
| <b>Final</b>              |             |        |
| Hold                      | 4°C         | ∞      |

#### 2.14. Análisis de resultados de expresión y análisis estadístico

Durante el análisis de las curvas de fluorescencia de RT-qPCR, se empleó el Software 9600Plus, integrado en el termociclador LineGene 9600 Plus Fluorescent Quantitative Detection System de BioER®. Posteriormente, se seleccionaron y exportaron los datos brutos (Quantitative Raw Data, Quantitative Result y Quantitation Amplification Results) en formato XLSX. Finalmente, estos datos fueron procesados utilizando el software Excel de Microsoft donde se hicieron los análisis estadísticos. Los experimentos de RT-qPCR se repitieron dos veces, los datos se compararon mediante el coeficiente de correlación, se compararon las distancias de la variación de los datos con un margen de error de 0.5%, los datos en todos los casos se mantuvieron en este rango, aquí en este trabajo se presenta la curva más representativa de los dos experimentos.

Los datos denominados "Quantitative Raw Data" se organizaron de acuerdo con su ubicación en la bandeja de muestras y el resultado de fluorescencia correspondiente en cada ciclo. Para todas las muestras procesadas, se generó un gráfico que representaba la fluorescencia en función del número de ciclo. Al construir la curva de fluorescencia, se derivó la línea de tendencia y la ecuación lineal ( $Y=mx+b$ ).

La línea de tendencia se representó gráficamente para analizar el comportamiento lineal de un gen en las cuatro variedades, tanto elicitadas como no elicitadas. La pendiente de la recta ( $m$ ) se consideró como una medida diferencial de la expresión. Esta es la tangente del ángulo que la recta forma con la dirección positiva del eje de las abscisas, y establece una relación entre el cambio vertical y horizontal de la recta, actuando como la razón de cambio en la ecuación.

Las gráficas que muestran el comportamiento de la recta y la comparación entre las pendientes se dispusieron en relación con los oligos presentados en la Tabla 3. Se mostró la comparación entre las variedades resistentes y susceptibles, así como entre las elicitadas y no elicitadas para cada gen, con el fin de analizar la expresión. Por otro lado, el análisis estadístico de este trabajo se llevó a cabo utilizando las plataformas R Studio y Excel.

En este procedimiento, se aplicaron diversas pruebas estadísticas para garantizar la validez y fiabilidad de los resultados. En primer lugar, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos estudiados. Finalmente, se aplicó la prueba post-hoc de Tukey para identificar qué grupos específicos mostraban diferencias significativas.

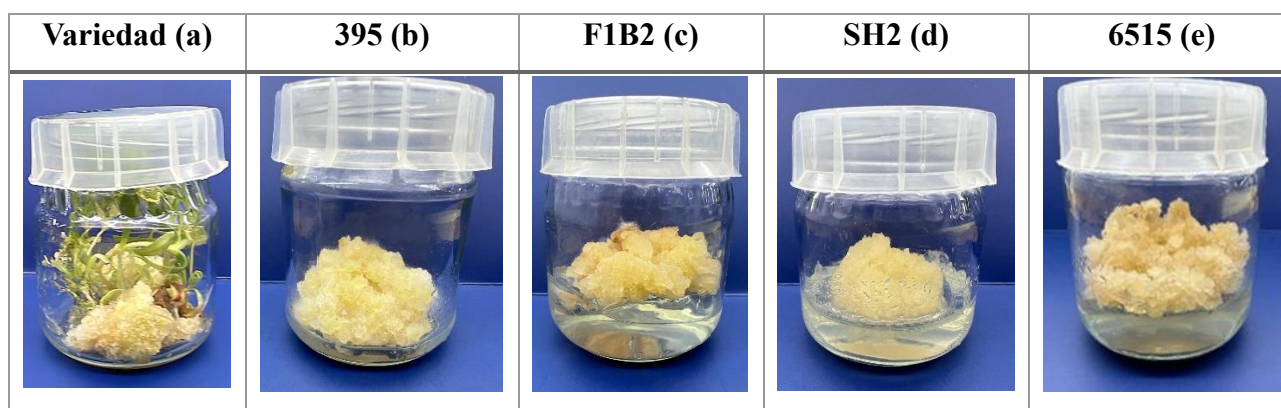
### **3. RESULTADOS Y ANALISIS**

#### **3.1. Propagación de células indiferenciadas y micro-plantas de clavel**

Para propagar células indiferenciadas derivadas de plantas de clavel, se utilizó un regulador de crecimiento (2,4-D), una hormona sintética a bajas concentraciones (ppm) y usada como herbicida a concentraciones medias y altas, que promueve una alta tasa de división celular y, por ende, una proliferación efectiva de las células, de acuerdo con el método desarrollado por Filgueira (2011). Las células se extrajeron de micro-plantas cultivadas *in vitro* que

presentaban crecimiento de células indiferenciadas en su base (ver Figura 1.a.). Se separaron las células y se cultivaron en medio MS con la hormona (2,4-D) para estimular el crecimiento celular y generar clones celulares.

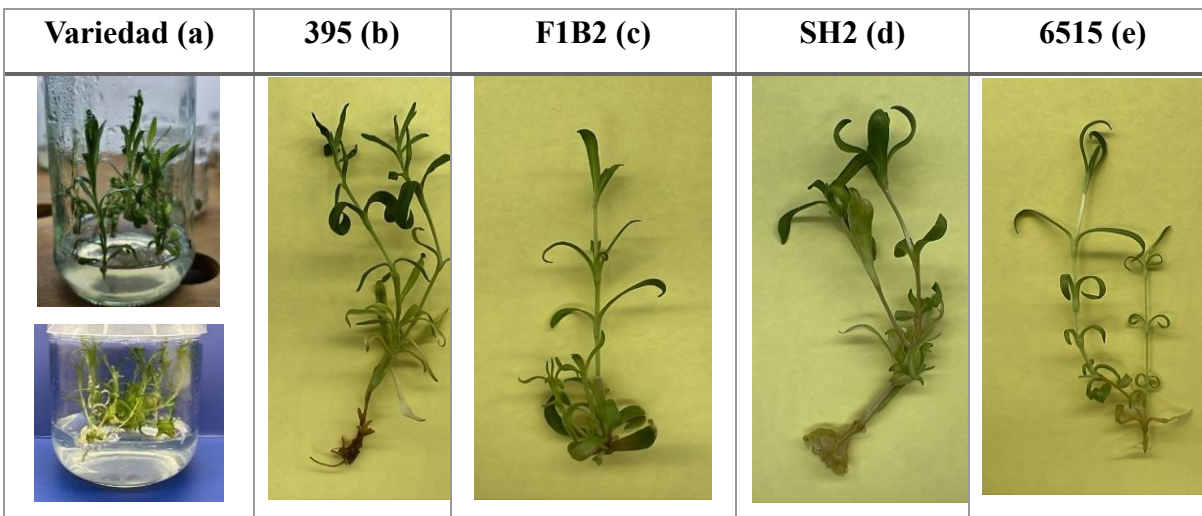
El proceso de dediferenciación celular tomó de tres a cuatro semanas para alcanzar un crecimiento óptimo de los clones. Posteriormente, se transfirieron a un medio fresco por otras cuatro semanas, repitiendo este proceso cada cuatro semanas para asegurar los nutrientes y condiciones adecuadas para su desarrollo (ver Figura 1). El nivel de dediferenciación de las células se determinó por la presencia de células con coloración verde (células fotosintéticas). Solo se utilizaron para el trabajo clones de células sin coloración verde y con apariencia hialina, lo que evidencia una dediferenciación completa (Filgueira, 2011).



**Figura 1.** Células indiferenciadas de clavel en cultivo *in vitro*. En **a**, se observa el crecimiento celular en la parte basal de las micro-plántulas, producto de la activación de la producción de células con la hormona 2-4-D. En **b**, se observan células blancas correspondientes a la variedad 395. En **c**, se ven células amarillentas de la variedad F1B2. En **d**, se observan células pequeñas de color amarillento correspondientes a la variedad SH2. En **e**, se observan células con pigmentos café claro, que son fenoles oxidados al ambiente, y células hialinas.

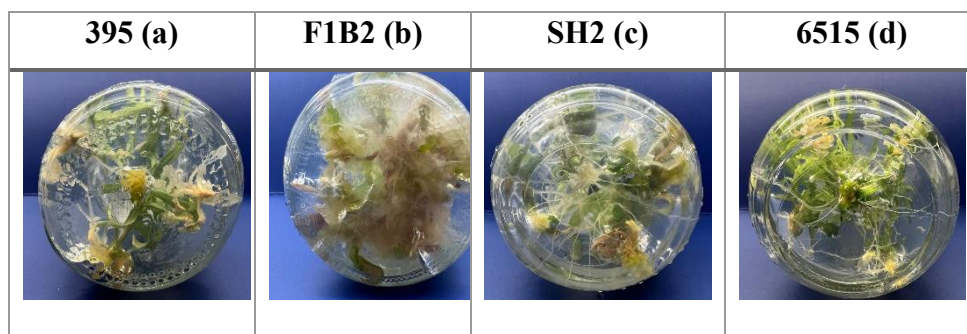
En la propagación de las micro-plántulas de clavel, se seleccionaron características fenotípicas de interés, tales como tallos gruesos, rápido crecimiento de raíces y la presencia de al menos tres nudos. Estas características permiten obtener micro-plántulas óptimas para responder adecuadamente a la presencia del patógeno o para los ensayos de extracción de ARN total. Cada variedad presenta características fenotípicas propias, derivadas de su

expresión génica diferencial, siendo la aparición de raíces la más importante para este estudio. Esto se debe a que la infección *in vitro* con FOX se realiza principalmente a través de las raíces, de manera similar a como ocurre en plantas cultivadas en campo abierto o en invernadero (Filgueira, 2011). Por lo tanto, se evaluó tanto la velocidad de desarrollo de las raíces como el volumen radicular.



**Figura 2.** Microplantas en cultivo *in vitro*. En **a**, se observan microplantas cultivadas *in vitro* en contenedores de diferentes dimensiones que permiten el desarrollo y crecimiento de las plantas en condiciones controladas. En **b**, se observan microplantas de la variedad 395. En **c**, se observan microplantas de la variedad SH2. En **d**, se observan microplantas de la variedad F1B2. En **e**, se observan microplantas de la variedad 6515.

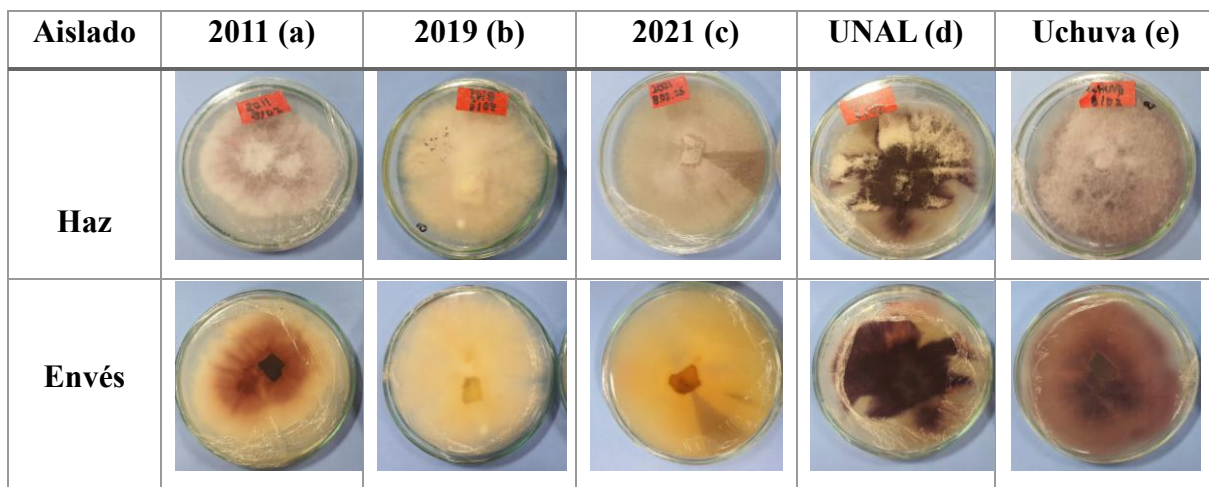
La variedad 6515, clasificada como parcialmente susceptible, presenta la mayor masa radicular, iniciando su desarrollo más rápidamente, entre la tercera y cuarta semana. Le sigue la variedad SH2, susceptible, con la aparición de raíces entre la cuarta y quinta semana. Por otro lado, las variedades resistentes y parcialmente resistentes, 395 y F1B2, mostraron un desarrollo radicular más lento, con raíces formándose entre la sexta y octava semana de cultivo, y con una masa radicular menor en comparación con las variedades mencionadas previamente (Figura 2.b y c).



**Figura 1.** Desarrollo radicular de las variedades de clavel. Se muestran las diferencias en el desarrollo radicular de las diferentes variedades utilizadas en este estudio: en **a** se observa la variedad 395 (R), en **b** la variedad F1B2 (PR), en **c** la variedad SH2 (S), y en **d** la variedad 6515 (PS), todas sin inducción hormonal.

### 3.2. Mantenimiento y re-cultivo de aislados patogénicos de *Fusarium oxysporum*

A partir de los aislamientos suministrados por el grupo de investigación de fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granada, se re-cultivaron los cinco aislamientos de FOX (2011, 2019, 2021, UNAL y Uchuva) en medio PDA durante 7 días cada 2 meses por un año como se observa en la Figura 4.



**Figura 2.** Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi en medio PDA, identificados como a (2011), b (2019), c (2021), d (UNAL) y e (Uchuva). Las figuras revelan diferencias macroscópicas notables en el desarrollo del hongo, tanto en la vista frontal (Haz) como en el reverso (Envés) de la caja de Petri, tales como el color y la forma de la colonia y la velocidad de crecimiento. Se observan coloraciones que varían desde blanco hasta morado oscuro,

dependiendo del aislado. Es importante destacar que el aislado de 2019 es el único que no presenta pigmentaciones moradas en el micelio.

En cuanto a sus características macroscópicas, se observa en la Figura 4 que el aislado 2011 (Figura 4a) presenta un micelio denso de color blanco con una textura esponjosa y áreas de pigmentación rosa a púrpura concentradas hacia el centro. En el aislado 2019 (Figura 4b), el hongo exhibe un micelio menos denso con una apariencia filamentosa y pigmentación blanca con tonos rosa en algunas partes de la colonia. Por su parte, el aislado 2021 (Figura 4c) muestra un crecimiento micelial muy disperso, con una coloración blanca pálida y una pigmentación púrpura distintiva.

En la Figura 4d (UNAL), se observa una pigmentación morada oscura concentrada en el centro, rodeada de un crecimiento micelial blanco y denso; este aislado presenta un patrón de crecimiento más radial. Finalmente, en el aislado Uchuva (Figura 4e), se observa una coloración mayormente uniforme de color púrpura en el fondo, mientras que superficialmente presenta un micelio claro y filamentoso. Estas diferencias morfológicas se mantienen consistentes en el re-cultivo de cada uno de los aislamientos.

Por otro lado, en el envés del hongo se observan en la Figura 4a, el micelio presenta una pigmentación morada oscura en el centro, que se torna blanca hacia los extremos. En la Figura 4b, se aprecian pigmentos amarillos en el centro que gradualmente cambian a blanco conforme crece el hongo. En la Figura 4c, predomina una coloración amarilla en el micelio, con mayor intensidad en la zona central.

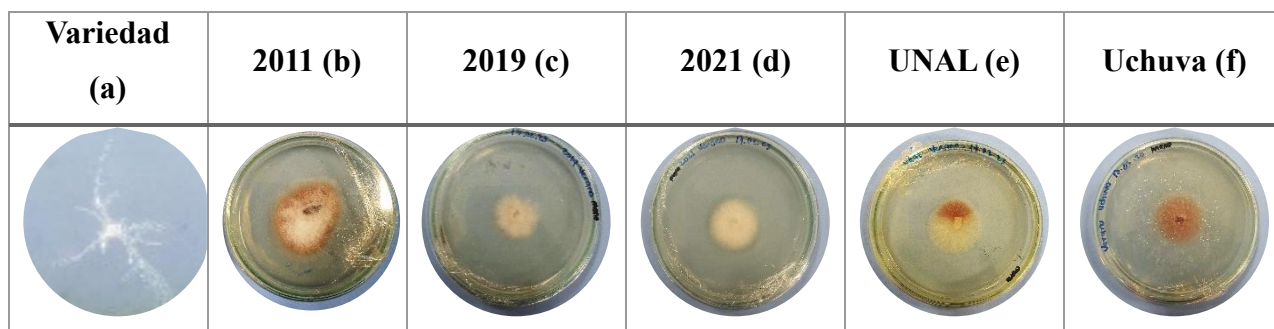
En el caso de la Figura 4d, la pigmentación es similar a la observada en el haz, mostrando un color morado oscuro con pigmentos blanquecinos en los extremos. Finalmente, en la Figura 4e, se observa un tono morado más claro, con tonalidades oscuras en el centro, presentando solo pequeñas diferencias en comparación con el haz del hongo.

### 3.3. Obtención de cultivos monospóricos de *Fusarium oxysporum* y ensayo de reinfección

El cultivo monospórico de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX) es fundamental para garantizar que se trabaja con una cepa pura del hongo, evitando la contaminación con otros aislamientos que puedan generar resultados ambiguos o difíciles de interpretar.

Para ello, se seleccionó una única espora germinada a partir de la dilución  $10^{-4}$  de esporas cultivadas en medio líquido Czapek. Posteriormente, las esporas se cultivaron mediante el método de dispersión en medio sólido PDA, utilizando un microscopio invertido (Figura 5a). La espora germinada seleccionada fue transferida a una caja de Petri con medio PDA.

Tras tres semanas, el cultivo monospórico mostró un desarrollo característico con un patrón concéntrico de micelio algodonoso de color salmón pálido y una pigmentación localizada en el centro de la caja (Figura 5). Este procedimiento permitió confirmar con éxito la pureza de los aislamientos monospóricos de *Fusarium oxysporum*.



**Figura 3.** Crecimiento monospórico de los cinco aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) utilizados en este trabajo (2011, 2019, 2021, UNAL, Uchuva). En la mayoría de los aislados, el crecimiento fue uniforme. Los aislados de 2011 (b) y Uchuva (f) mostraron tonalidades moradas más intensas, mientras que en UNAL se detectó una pequeña zona con micelio de color morado. En contraste, los aislados de 2019 (c) y 2021 (d) mantuvieron una coloración blanca, siendo la del 2021 la más uniforme. En a, se presenta una vista microscópica (100X) de la germinación de una espora.

En el caso del aislado 2011 (Figura 5b), se observa un crecimiento denso y esponjoso, con una periferia de color morado rojizo y una región central de color blanco. Por otro lado, el aislado 2019 (Figura 5c) presenta un micelio más uniforme, de color blanco, con menos hifas aéreas y sin pigmentaciones moradas, en contraste con el aislado 2011.

El aislado 2021 (Figura 5d) exhibe un crecimiento simétrico, con una textura filamentosa y coloración blanca. En el caso del aislado UNAL (Figura 5e), se observa una textura superficial muy filamentosa, con micelio blanco y pigmentaciones moradas. Finalmente, el aislado Uchuva (Figura 5f) muestra un micelio blanco esponjoso con una pigmentación centralizada de color morado.

Estos resultados evidencian que los aislamientos mantienen características morfológicas específicas a nivel macroscópico en el cultivo. Sin embargo, también reflejan un polimorfismo genético, ya que se presentan variaciones macroscópicas en los cultivos que son independientes de las esporas.

### **3.4. Verificación taxonómica e Identificación de estructuras reproductivas**

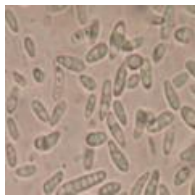
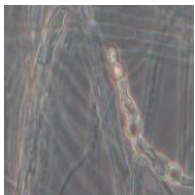
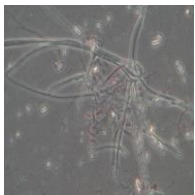
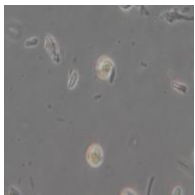
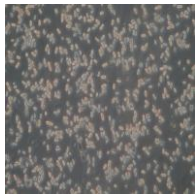
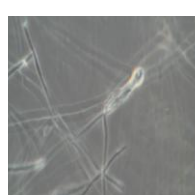
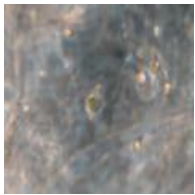
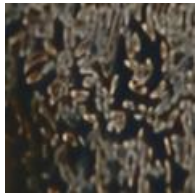
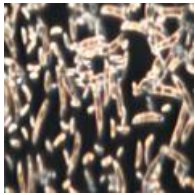
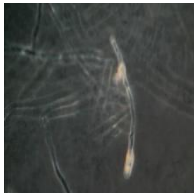
Desde un punto de vista microscópico, FOX se distingue por la producción de tres tipos de esporas asexuales, descritas por Leslie y Summerell (2011) como fundamentales para la caracterización taxonómica del género *Fusarium*. Estas incluyen los microconidios (Figura 6a), que son esporas formadas por una o dos células. Aunque la mayoría de las especies de *Fusarium* producen microconidios y su utilidad en la diferenciación taxonómica es limitada, se observó que ciertos aislados de FOX, dependiendo de las condiciones o el medio de cultivo, producen una mayor o menor cantidad de ellos. Esto evidencia una variación significativa en la expresión génica del parásito relacionada con este carácter taxonómico.

De manera similar, las macroconidias (Figura 6b), esporas con forma de banana compuestas por tres a cinco células y caracterizadas por presentar una base en forma de "pie", mostraron variaciones en su producción dependiendo del medio de cultivo utilizado y del aislamiento de FOX, como lo reportaron (Harish et al., 2023) en su estudio sobre aislados de *Fusarium* spp. Aunque las macroconidias son el carácter morfológico más relevante para diferenciar

entre las especies del género *Fusarium* debido a su amplia variación morfológica, este rasgo no es útil para distinguir entre los distintos aislados dentro del complejo de FOX.

Finalmente, las clamidosporas, estructuras de resistencia en el suelo con paredes gruesas que las protegen (Figura 6e), han sido descritas por (Rentería-Martínez et al., 2019) como habitantes típicos de suelos infectados.

Otro carácter microscópico útil para la clasificación taxonómica de FOX son las fiálides, descritas por Leslie y Summerell (2011) y López-Bautista et al. (2020). Estas son estructuras abultadas en los extremos de las hifas donde se forman las esporas. En el caso de FOX, se encuentran generalmente formando ramilletes de tres a cinco fiálides o como Polifiálides, aunque también pueden presentarse de forma unitaria. Además, en algunos aislados de FOX, las Polifiálides son escasas o incluso únicamente se observan Monofiálides, lo que constituye otra característica distintiva de estos aislados.

| Variedad | Microconidias                                                                       | Macroconidias                                                                       | Monofiálides                                                                         | Polifiálides                                                                          | Clamidosporas                                                                         |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|          | a                                                                                   | b                                                                                   | c                                                                                    | d                                                                                     | e                                                                                     |
| 2011     |  |  |  |  |  |
| 2019     |  |  |  |  |  |
| 2021     |  |  |  |  |  |

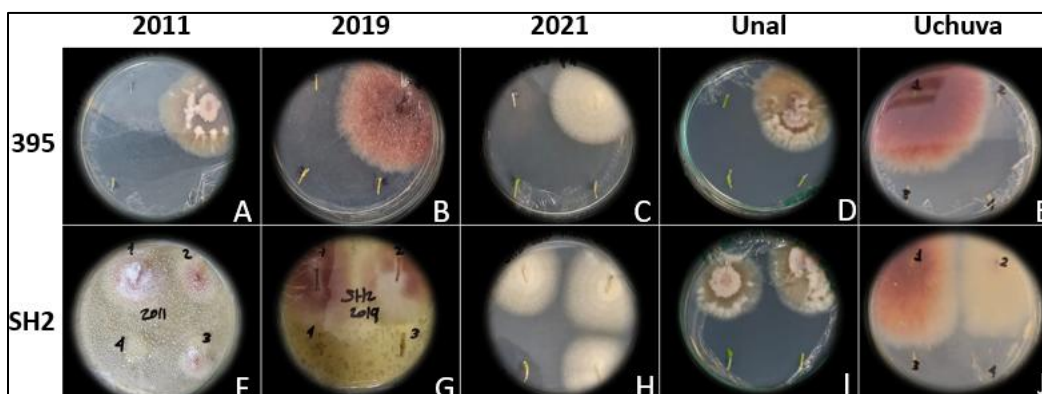


**Figura 4.** Microfotografías de las estructuras reproductivas de los cinco aislados de FOX (2011, 2019, 2021, UNAL, Uchuva). En **a**, se observan microconidias. En **b**, se observan macroconidias. En **c**, se observan Monofialides. En **d**, se observan Polifialides. En **e**, se observan clamidosporas.

### 3.5. Evaluación de la resistencia de micro-plantas de las variedades de clavel en cultivo dual

Como se describe en la metodología (sección 2.6), las microplantas de las diferentes variedades de clavel fueron infectadas con cinco aislados de *Fusarium oxysporum*, cada uno presentando distintos niveles de patogenicidad. Siete días después de la infección, se realizaron cortes transversales en las plantas infectadas para evaluar la progresión del hongo en el tejido vegetal. En cada caso, se obtuvieron cuatro fragmentos de los entrenudos, permitiendo analizar el recorrido de FOX desde la raíz hasta el ápice de la planta.

Se examinó el inicio del crecimiento de las colonias de FOX en cada uno de los cortes, los cuales fueron organizados sistemáticamente desde la base hasta el ápice de la planta, facilitando así la evaluación detallada de la infección en diferentes segmentos del tejido.



**Figura 5.** Cultivo dual con plantas de clavel de las variedades 395 (resistente) y SH2 (susceptible). Para todos los ensayos de patogenicidad *in vitro* con cada uno de los aislados evaluados de FOX: 2011, 2021, 2019, UNAL y Uchuva. Las microfotografías A, B, C, D y E corresponden a los ensayos de microplantas de la variedad 395 (resistente) infectadas con los aislados de FOX durante 7 días. Las microfotografías F, G, H, I y J corresponden a los cortes transversales de las microplantas infectadas de la variedad SH2 (susceptible) con los diferentes aislados de FOX.

Según los resultados obtenidos, las infecciones se clasificaron de la siguiente manera: aquellas con valores de 0/8, donde no se detectó infección en el tallo, se consideraron completamente resistentes; infecciones entre 1/8 y 3/8 se clasificaron como parcialmente resistentes; infecciones entre 4/8 y 5/8 se consideraron parcialmente susceptibles; y valores entre 6/8 y 8/8 se categorizaron como completamente susceptibles. Estos resultados redefinieron la caracterización de la resistencia en las variedades de clavel evaluadas en el ensayo dual, superando las definiciones previas a este estudio.

Como se ilustra en la Figura 7, en todos los casos se observó infección de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en las variedades de clavel SH2 (S) y 395 (R) para todos los aislados probados. La variedad 395 mostró un valor de 1/8, lo que permitió clasificarla como parcialmente resistente y por lo tanto no se realizó una tabla de los resultados del cultivo dual. En contraste, la variedad SH2 presentó infecciones superiores a 4/8 (parcialmente susceptible) para el aislado UNAL y valores de 7/8 (completamente susceptible) para el aislado 2011 de FOX.

Estos resultados demuestran que, al considerar la variedad SH2 como susceptible, los diferentes niveles de infección observados con los aislados de FOX reflejan variaciones en los niveles de patogenicidad entre los aislamientos probados.

**Tabla 6.** Resultados de tres repeticiones de cultivo dual con microplantas de clavel SH2 (susceptible) con los diferentes aislados de FOX (Experimentos 1, 2, 3). En la columna  $\bar{X}$  se presenta el promedio de los tres experimentos. GP1 indica los grados de patogenicidad como una escala arbitraria para términos de comparación con otros ensayos, donde 5 significa que el hongo avanzó entre 8/8 y 6/8 dentro de la planta, lo que indica que el aislamiento es el más patogénico de la comparación; y el valor de 1 indica un avance del hongo entre 1/8 y 3/8, donde el aislamiento será el menos patogénico.

| <b>Aislado</b> | <b>Exp. 1</b> | <b>Exp. 2</b> | <b>Exp. 3</b> | <b><math>\bar{X}</math></b> | <b>GP1</b> |
|----------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------|------------|
| <b>2011</b>    | 7/8           | 4/8           | 5/8           | 0.66                        | 4          |
| <b>2019</b>    | 4/8           | 3/8           | 3/8           | 0.41                        | 1          |
| <b>2021</b>    | 5/8           | 5/8           | 3/8           | 0.5                         | 2          |
| <b>UNAL</b>    | 4/8           | 4/8           | 5/8           | 0.54                        | 3          |
| <b>Uchuva</b>  | 4/8           | 7/8           | 6/8           | 0.7                         | 5          |

Según los datos presentados en la Tabla 6, que muestran los resultados obtenidos de los cultivos duales con la variedad de clavel SH2, susceptible, se observan diferentes niveles de crecimiento de los aislados de FOX en el interior de los tallos de las plantas. Estos resultados permiten establecer una relación entre la velocidad de desarrollo del parásito dentro del tallo y su nivel de patogenicidad.

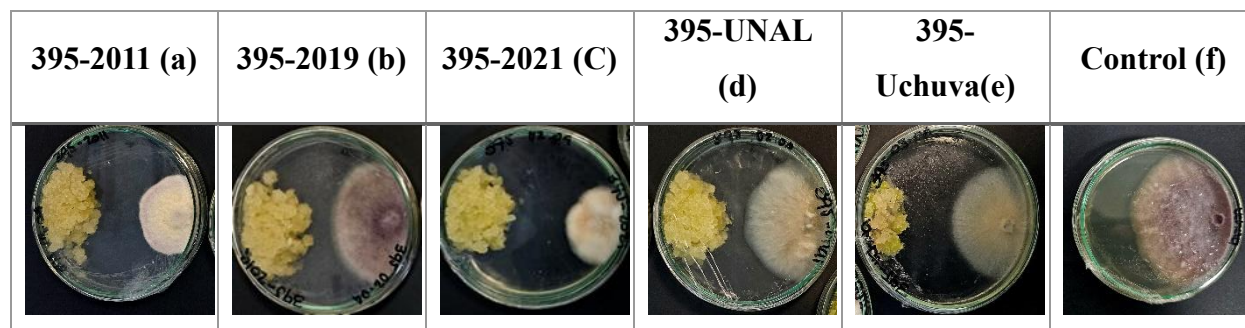
Con base en estos hallazgos, el aislamiento más patogénico fue Uchuva, seguido por 2011. Por otro lado, los aislados menos patogénicos, en orden de menor a mayor, fueron 2019, que mostró el valor más bajo de crecimiento, seguido por 2021 y UNAL.

### 3.6. Pruebas de patogenicidad de los aislados de FOX en células de las diferentes variedades de clavel

#### 3.6.1. Prueba de patogenicidad de FOX con la variedad de clavel 395(R)

Las pruebas de cultivo dual con microplantas, presentadas en el numeral anterior, se llevaron a cabo para comparar la respuesta de las microplantas con la de las células en el ensayo dual frente a los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX). Este enfoque busca demostrar que las células responden de manera similar a las plantas cultivadas *in vitro*.

La Figura 8 muestra los resultados del cultivo dual de las células de la variedad 395 (resistente) en interacción con los distintos aislados de FOX.

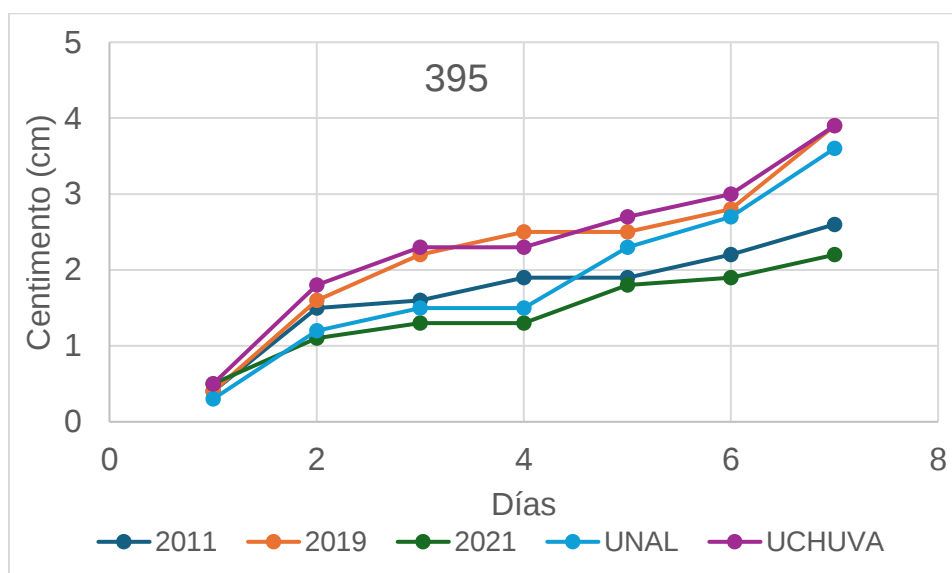


**Figura 6.** Ensayo de patogenicidad de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en las células de clavel de la variedad 395 (resistente) en cultivo dual, enfrentadas con los cinco aislados durante 7 días. En **a**, corresponde al aislado 2011; en **b**, al aislado 2019; en **c**, al aislado 2021; en **d**, al aislado UNAL; y en **e**, al aislado Uchuva. En las fotos se observan las diferencias en el crecimiento de los diferentes aislados de FOX enfrentados a la variedad resistente 395. **f** muestra el control de crecimiento de FOX (2019) sin la presencia de células de clavel.

En el ensayo presentado en la Figura 8, se midió el crecimiento del hongo hacia las células en el ensayo dual, como se describe en el apartado 2.7, durante un período de siete días. En la Gráfica 1, se observa un crecimiento máximo de 3.9 cm en los aislados de Uchuva y 2019, mientras que el aislado de 2021 mostró un crecimiento significativamente menor, de 2.2 cm.

Estos resultados sugieren que la variedad 395 presenta una mayor sensibilidad a los aislados de Uchuva y 2019, y una mayor resistencia al aislado de 2021.

Por otro lado, los aislados de 2011 y UNAL mostraron un comportamiento similar durante los primeros tres días. Sin embargo, a partir de ese momento, se evidenció un cambio en la patogenicidad del aislado UNAL, que alcanzó un crecimiento de 3.6 cm, superando significativamente al aislado de 2011, cuyo crecimiento fue de 2.6 cm.

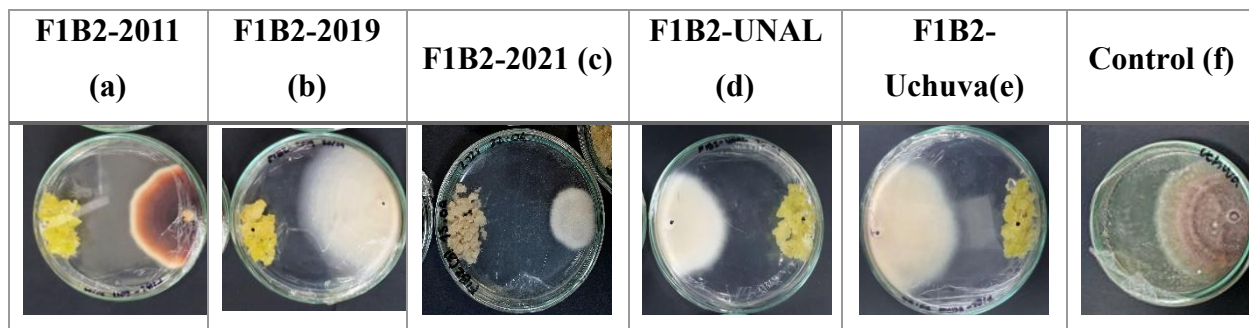


**Grafica 1.** Crecimiento de cada uno de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en el ensayo dual con células de la variedad 395 (resistente). Se observa una velocidad de crecimiento que varía dependiendo del aislado de FOX: 2011, 2019, 2021, UNAL y Uchuva. El mayor crecimiento se registra para Uchuva y 2019, mientras que el menor se observa para 2021. Esta diferencia en el crecimiento se relaciona con variaciones en la patogenicidad o capacidad patogénica de los aislados.

### 3.7. Prueba de patogenicidad de FOX con células de la variedad de clavel F1B2(MR)

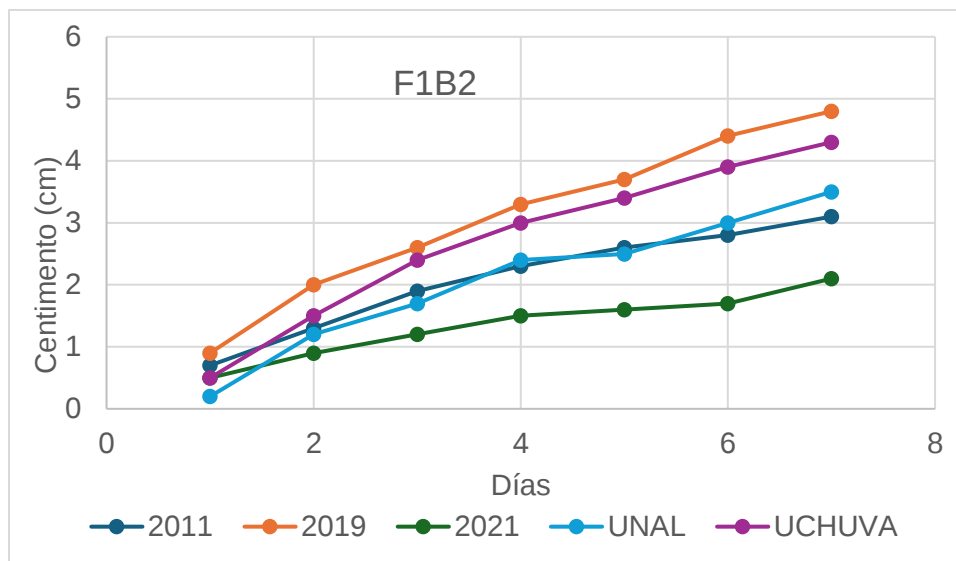
La variedad F1B2, caracterizada como parcialmente resistente a *Fusarium oxysporum* (FOX), mostró en este ensayo un crecimiento uniforme de la mayoría de los aislados, como se observa en la Figura 9. Se destaca una mayor resistencia al aislado 2021, evidenciada por

un menor crecimiento del hongo hacia las células. En contraste, los aislados 2019 y Uchuva presentaron un mayor crecimiento, lo que indica una mayor agresividad de estos aislados.



**Figura 7.** Ensayo de patogenicidad de los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en las células de la variedad F1B2, con los cinco aislados: 2019, 2011, 2021, UNAL, y Uchuva, que crecieron durante 7 días. Se puede observar el menor crecimiento del hongo en el aislado 2021 (c), lo cual se interpreta como una menor virulencia del aislado o una mayor resistencia de la variedad de las células de clavel al crecimiento del hongo. Por otro lado, el mayor crecimiento del hongo se presenta en el aislado 2019. La figura 9 (f) corresponde al control de crecimiento de FOX (Uchuva) sin la presencia de células de clavel.

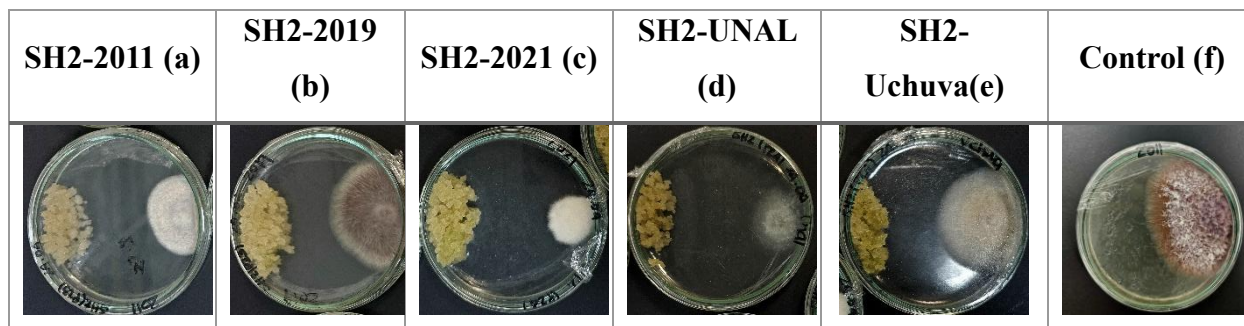
Al ser F1B2 una variedad de clavel parcialmente resistente, en la Gráfica 2 se observa el crecimiento de los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX), donde el aislado 2019 muestra un mayor crecimiento y el aislado 2021 un menor crecimiento en el cultivo dual. Este mismo comportamiento se observó en el caso anterior con respecto a estos dos aislados, lo que sugiere que el crecimiento del hongo está determinado por su patogenicidad, más que por la respuesta de la variedad de células de la planta de clavel.



**Grafica 2.** Ensayo de patogenicidad de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en la variedad de clavel F1B2 con los cinco aislados de FOX (2019, 2011, 2021, UNAL, Uchuva) durante los 7 días que dura el experimento. Los aislados de FOX presentaron un crecimiento uniforme y lineal durante el tiempo del experimento. F1B2 presenta mayor resistencia al aislado 2021 que al aislado de 2019. De otra forma, el aislado 2019 en este caso es el más patogénico y el aislado 2021 es el menos patogénico

### 3.8. Prueba de patogenicidad de FOX con la variedad SH2(S) de clavel

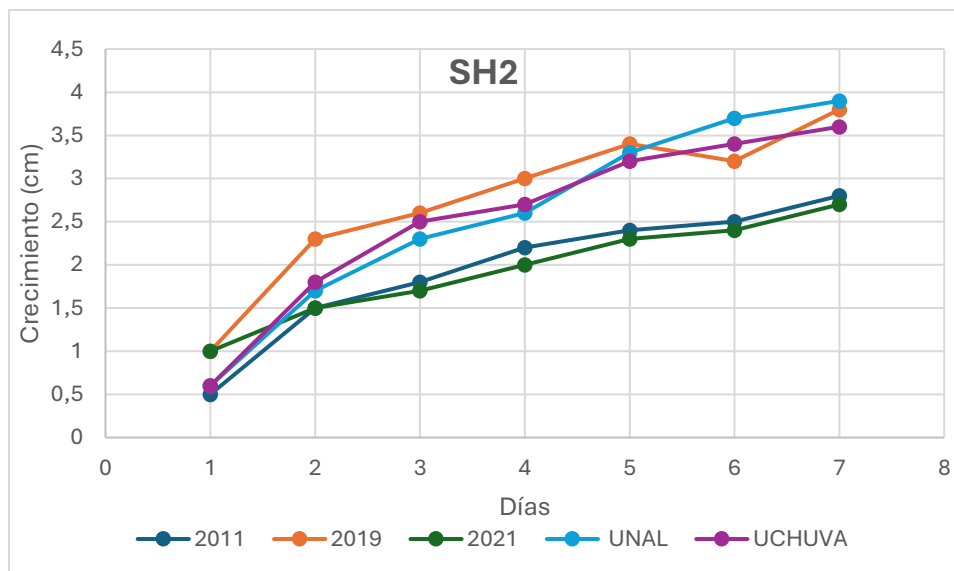
La Figura 10, muestra el comportamiento de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en la variedad SH2 de clavel, caracterizada como susceptible, se observa un crecimiento notable de los aislados 2019 y Uchuva en comparación con el crecimiento más reducido del aislado 2021 al séptimo día del experimento.



**Figura 8.** Ensayo de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* (FOX) en la variedad SH2 (susceptible) de clavel con los cinco aislados de FOX (2019, 2011, 2021, UNAL, Uchuva) durante los 7 días del experimento. Se observa un menor crecimiento del hongo en el aislado 2021 y un mayor crecimiento en los aislados Uchuva y 2019. Es notable observar las variaciones de color de las colonias de un mismo aislado cuando se enfrentan a diferentes variedades de células de clavel. Por ejemplo, comparar las figuras 7, 8 y 9 para el aislado 2019. Nuevamente, en f, se presenta el control del aislado Uchuva en crecimiento sin la presencia de células.

Durante los 7 días del experimento, los resultados revelan que la variedad SH2 de clavel presenta una mayor resistencia a los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) 2011 y 2021, con valores de crecimiento de 2.8 cm y 2.7 cm, respectivamente. En contraste, muestra una mayor susceptibilidad al aislado UNAL, que alcanzó un crecimiento final de 3.9 cm.

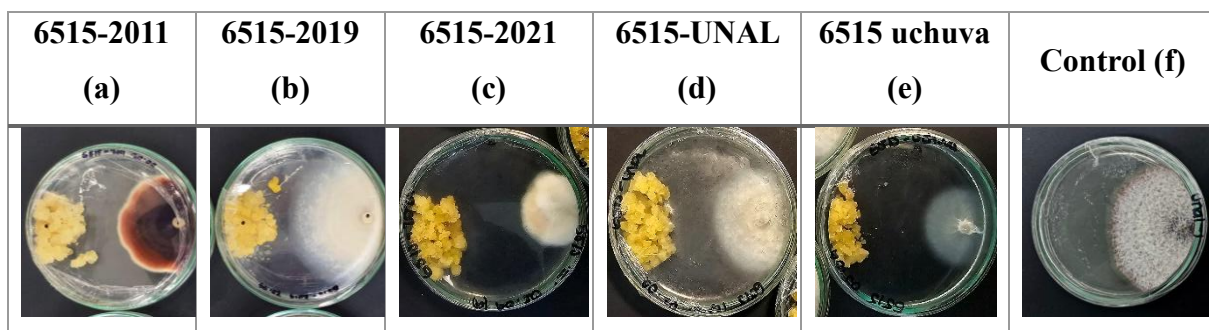
Se observa una diferencia inicial en el crecimiento entre los aislados de 2019 y UNAL, siendo el aislado 2019 más patogénico durante los primeros días. Sin embargo, al finalizar el período experimental, ambos aislados presentaron un comportamiento similar, con valores de crecimiento de 3.8 cm y 3.9 cm, respectivamente.



**Grafica 3.** Ensayo de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* (FOX) en la variedad de clavel SH2 (susceptible) con los cinco aislados de FOX (2019, 2011, 2021, UNAL, Uchuva) durante los 7 días que dura el experimento. Los diferentes aislados de FOX presentaron un crecimiento uniforme y lineal a lo largo del experimento. Se evidenció un crecimiento reducido en los aislados 2011 y 2021, mientras que los aislados 2019 y UNAL mostraron una mayor patogenicidad debido a su rápido crecimiento.

### 3.9. Prueba de patogenicidad de FOX con la variedad de clavel 6515

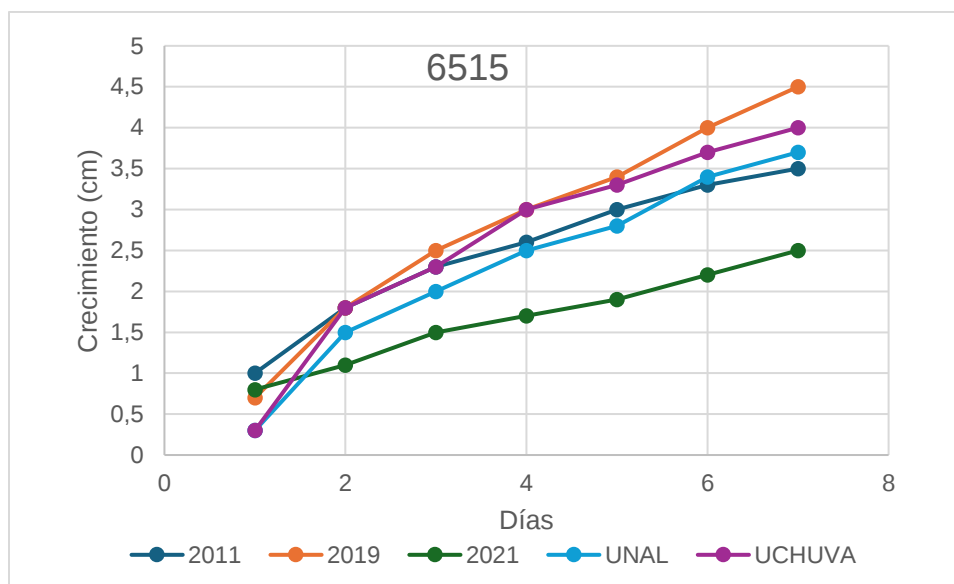
La variedad de clavel 6515 es conocida por su susceptibilidad parcial o medianamente susceptible a *Fusarium oxysporum* (FOX). En la Figura 11, se muestra el ensayo de resistencia de esta variedad de clavel con los cinco aislados de FOX. En este caso, los aislados de 2019, 2021, UNAL y Uchuva exhiben una coloración micelial exclusivamente blanca. Sin embargo, el aislado de 2011 se distingue por ser el único con una coloración morada. En este ensayo, el mayor crecimiento del hongo se registró en el aislado 2019 y el menor en el aislado 2021.



**Figura 9.** Ensayo de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* (FOX) en la variedad de clavel 6515 (MS) con los cinco aislados de FOX (2019, 2011, 2021, UNAL y Uchuva) durante 7 días. Se observa un menor crecimiento de los aislados 2021 y Uchuva, y un mayor crecimiento en los aislados 2019 y UNAL, en comparación con el control.

La variedad de clavel 6515 mostró una mayor sensibilidad al aislado 2019, alcanzando un crecimiento de 4.5 cm. No obstante, el comportamiento del aislado UNAL fue relativamente similar, con una diferencia de solo 0.4 cm. En contraste, 6515 presentó una mayor resistencia al aislado 2021, registrando un crecimiento de 2.5 cm en siete días.

Por su parte, los aislados 2011 y UNAL mostraron comportamientos similares, con crecimientos de 3.5 cm y 3.7 cm, respectivamente, como también se observó en la variedad F1B2. Sin embargo, 6515 mostró una mayor susceptibilidad en comparación con F1B2, ya que los valores de crecimiento de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) fueron, en general, más altos.



**Grafica 4.** Ensayo de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* (FOX) en la variedad de clavel 6515, parcialmente susceptible, con los cinco aislados de FOX (2019, 2011, 2021, UNAL y Uchuva) durante los 7 días del ensayo. Se observó un mayor crecimiento en el aislado 2019 en comparación con el aislado 2021.

**Tabla 7.** Comparación de los valores del crecimiento de los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en las distintas variedades de clavel utilizadas en este estudio.  $\bar{X}_a$  es el promedio del crecimiento de cada uno de los aislados en todas las variedades de clavel utilizadas, y  $\bar{X}_v$  es el promedio del crecimiento de todos los aislados en cada variedad. **GP2** indica el valor de la escala de patogenicidad, cuya explicación se encuentra en la Tabla 1. Los valores más bajos de crecimiento de los diferentes aislados de FOX para el ensayo con cada variedad de clavel se presentan en azul, mientras que los valores más altos se destacan en rojo.

| Variedad | 2011 | 2019 | 2021 | UNAL | Uchuva | $\bar{X}_v$ |
|----------|------|------|------|------|--------|-------------|
| 395(R)   | 2.6  | 3.9  | 2.2  | 3.6  | 3.9    | 3.2         |
| F1B2(MR) | 3.1  | 4.8  | 2.1  | 3.5  | 4.3    | 3.5         |
| SH2(S)   | 2.8  | 3.8  | 2.7  | 3.9  | 3.6    | 3.3         |
| 6515(MS) | 3.5  | 4.5  | 2.5  | 3.7  | 4      | 3.6         |

|             |     |     |     |     |     |     |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| $\bar{X}_a$ | 3.0 | 4.2 | 2.3 | 3.6 | 3.9 | 3.4 |
| <b>GP2</b>  | 2   | 5   | 1   | 3   | 4   |     |

Los resultados obtenidos en los ensayos de patogenicidad de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) frente a las variedades de clavel con diferentes niveles de resistencia o susceptibilidad a FOX presentan diferentes interpretaciones, dependiendo del análisis de las células de la planta y su respuesta, o del análisis del aislado de FOX y su patogenicidad.

En la Tabla 7, se presentan los valores más bajos de crecimiento de los aislados en azul, enfrentados a cada variedad de clavel. En este caso, el menor crecimiento se registró en el aislado 2021 contra la variedad F1B2 (PR). En general, el aislado 2021 presentó los valores más bajos de crecimiento en todos los enfrentamientos contra las variedades de clavel. En contraste, el aislado 2019 presentó el mayor crecimiento (en rojo) en todos los ensayos, especialmente en la variedad F1B2 (PR) de clavel.

En resumen, los mayores crecimientos promedio (GP2 con un valor de 5) se produjeron en el aislado 2019, seguido por el aislado Uchuva con un GP2 de 4. Los aislamientos UNAL y 2011 mostraron GP2s de 3 y 2, respectivamente. Finalmente, el aislado 2021, con un GP2 de 1, registró en todos los casos los menores crecimientos, lo que lo clasifica como el menos patogénico.

La variable  $\bar{X}_v$  permite identificar el comportamiento de las diferentes variedades de clavel frente a los aislados de FOX. El crecimiento promedio de todos los aislamientos fue de 3.4 cm. En todos los casos, el menor crecimiento se registró en la variedad 395, considerada resistente. Por otro lado, la variedad 6515, considerada parcialmente susceptible, presentó el mayor crecimiento de los aislados de FOX. Estos resultados corroboran la capacidad del ensayo dual de células vs hongo para determinar la capacidad de respuesta de la planta y la virulencia del parásito.

El hecho de que el mayor crecimiento de un aislado ocurra en la misma variedad en la que el menor crecimiento de otro aislado se presenta, demuestra la capacidad de crecimiento diferencial entre los aislados. Dado que estos aislamientos son monospóricos, esta

observación es una evidencia importante para considerar que la variación en la patogenicidad del aislado produce una respuesta diferencial de resistencia en la planta.

**Tabla 8.** Comparación de los valores de la variable GP (grado de patogenicidad) entre los ensayos en microplantas y los ensayos en células. Un valor de 5 indica el mayor grado de patogenicidad del aislado de *Fusarium oxysporum* (FOX), mientras que un valor de 1, según una escala arbitraria de valores de patogenicidad calificados de 1 a 5, indica el menor grado de patogenicidad del aislado de FOX.

|                           | 2011 | 2019 | 2021 | UNAL | Uchuva |
|---------------------------|------|------|------|------|--------|
| <b>GP1 (Microplantas)</b> | 4    | 1    | 2    | 3    | 5      |
| <b>GP2 (Células)</b>      | 2    | 5    | 1    | 3    | 4      |

En la Tabla 8 se presentan los valores de la variable GP comparativamente en los ensayos de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX) en cultivo dual con microplantas (GP1) y con células (GP2). El aislamiento Uchuva mostró ser uno de los más patogénicos en ambos casos. Sin embargo, para el aislado 2019, que se mostró altamente patogénico en el ensayo dual con células, no se observó el mismo comportamiento en las microplantas.

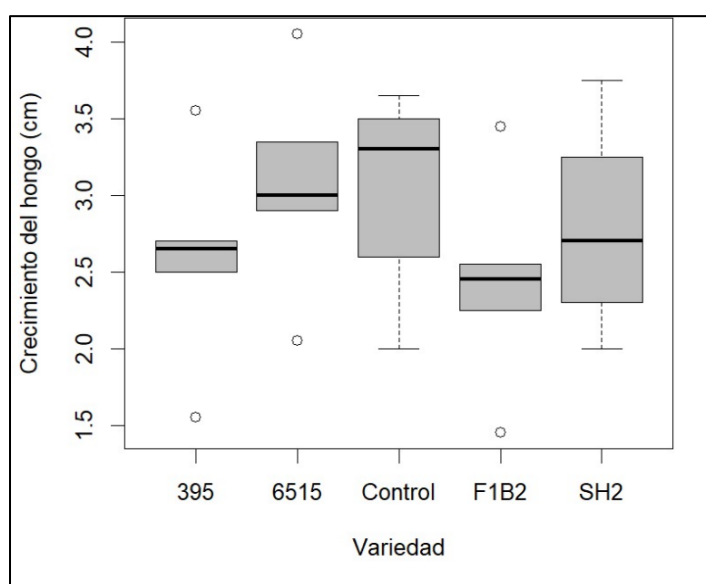
El aislamiento UNAL mostró un comportamiento similar tanto en microplantas como en células, al igual que el aislado 2021. Por el contrario, el aislamiento 2011 se presentó como más patogénico en el ensayo con microplantas.

### 3.10. Análisis estadístico

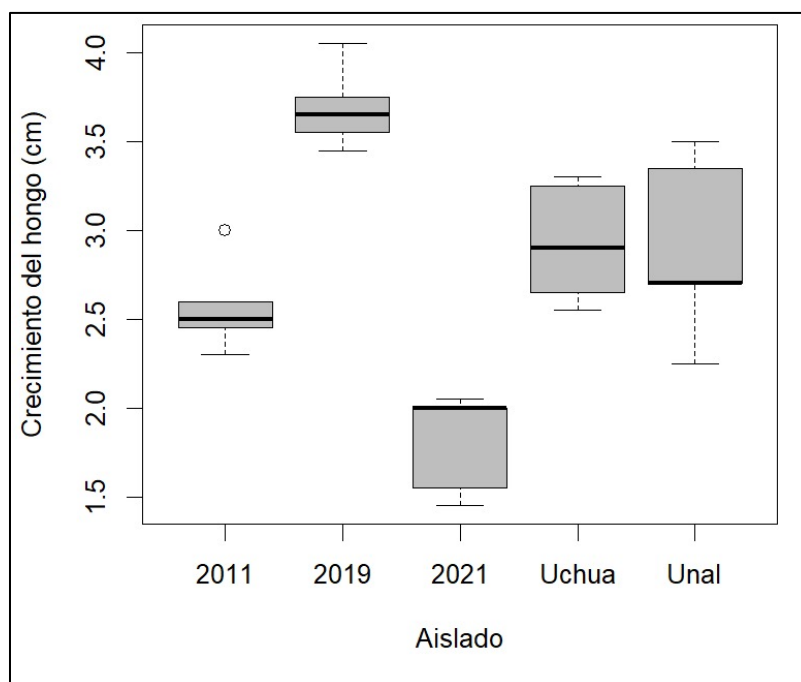
En la Gráfica 5 se presenta la distribución de los crecimientos de los cinco aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en las diferentes variedades de clavel. Se observa que la variedad 395 presenta un crecimiento del hongo relativamente bajo, con una mediana de 2.65 cm, lo cual sugiere que esta variedad presenta una resistencia frente al crecimiento de los

diferentes aislados de FOX en comparación con el control y las variedades susceptibles. Similarmente, la variedad F1B2 muestra un crecimiento promedio del hongo con una mediana de 2.55 cm, lo que indica una resistencia a FOX.

Por otro lado, la variedad 6515 tiene una mediana alta, alrededor de 3.0 cm, lo que indica que esta variedad es susceptible al crecimiento de FOX. Este comportamiento se observa igualmente en la variedad SH2, que tiene una mediana alrededor de 3.25 cm, cercana al valor máximo del control, lo que indica que esta variedad también es susceptible al patógeno en los ensayos duales en la caja de Petri.



**Grafica 5.** Crecimiento de *Fusarium oxysporum* (FOX) en las diferentes variedades de clavel. Diagrama de cajas (Boxplot) que muestra la distribución del crecimiento del patógeno en centímetros para las cuatro variedades de *Dianthus caryophyllus*: 395 (resistente), F1B2 (parcialmente resistente), SH2 (susceptible) y 6515 (parcialmente susceptible), más el control (crecimiento del hongo en el medio sin la presencia de las células de clavel). Se observa un menor crecimiento del patógeno en las variedades resistentes y un mayor crecimiento en las variedades susceptibles, en comparación con el control, que representa el crecimiento del hongo sin las células de clavel presentes.

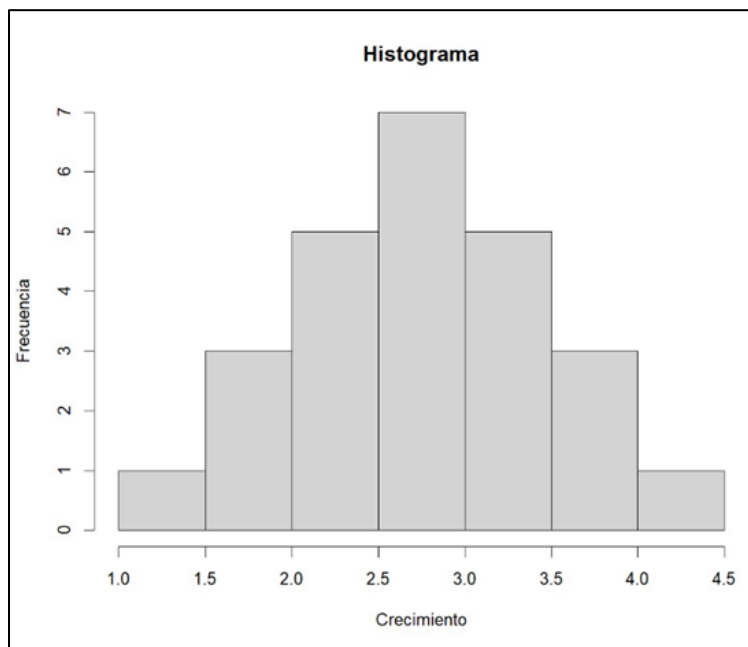


**Grafica 6.** Diferencias en el crecimiento de los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en los ensayos de resistencia con las variedades de clavel. Diagrama de cajas (Boxplot) que muestra el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* en centímetros, para los diferentes aislados 2011, 2019, 2021, Uchuva y UNAL. Se observa que el aislado con mayor crecimiento fue 2019, mientras que el de menor crecimiento fue 2021. Las diferencias en el crecimiento de los diferentes aislados son muy marcadas, como se puede apreciar en el diagrama.

De acuerdo con la Gráfica 6, se observa que los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) que tuvieron un comportamiento menos agresivo según el máximo de crecimiento fueron 2011 y 2021, ya que presentan las medianas más bajas, de 2.5 cm y 2.0 cm respectivamente, lo que indica un menor crecimiento del hongo y sugiere una menor patogenicidad. Además, se evidencia poca variabilidad en los datos de estos aislados.

Por el contrario, los aislados que presentaron una mayor patogenicidad o agresividad en el crecimiento fueron 2019, Uchuva y UNAL, debido a que tienen valores máximos más altos de 3.65 cm, 2.9 cm y 2.7 cm respectivamente, lo que indica un mayor crecimiento del hongo

y sugiere una mayor patogenicidad. Además, se observa una mayor variabilidad, especialmente en los aislados 2019 y UNAL.



**Grafica 7.** Histograma de la distribución de los datos y Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Los datos presentados en la Figura 12 parecen estar distribuidos de forma normal. La gráfica muestra una forma de campana simétrica (Campana de Gauss), con la mayor frecuencia de los datos ubicados en el centro, y una disminución gradual hacia los extremos.

El histograma de la Gráfica 7 muestra una distribución de frecuencias que se asemeja a una distribución normal. La distribución se observa simétrica en torno al intervalo central (2.5 a 3.0), lo que indica una distribución normal. Los valores de crecimiento en el histograma van desde 1.0 hasta 4.5, abarcando un rango moderado de variabilidad.

En cuanto al Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías representado en la Figura 11, se observa que el factor "variedad" tiene un efecto significativo en la variable de respuesta al nivel de 0.01, con un valor de  $p\text{-valor} = 0.002073$ . Por otro lado, el factor "Aislado" tiene un efecto altamente significativo en la variable de respuesta al nivel de 0.001 ( $p\text{-valor} = 2.379\text{e-}$

08). Esto indica que tanto la "Variedad" como el "Aislado" afectan significativamente la variable de respuesta medida en el análisis.

```
> shapiro.test(aov_resi)

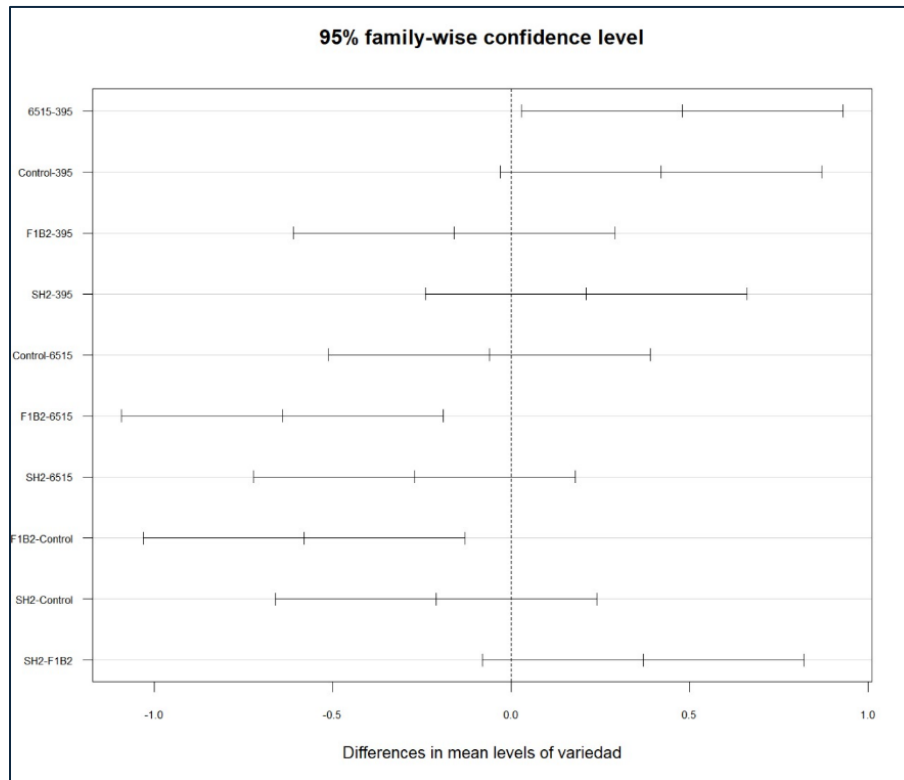
      Shapiro-Wilk normality test

data:  aov_resi
W = 0.9652, p-value = 0.5274
```

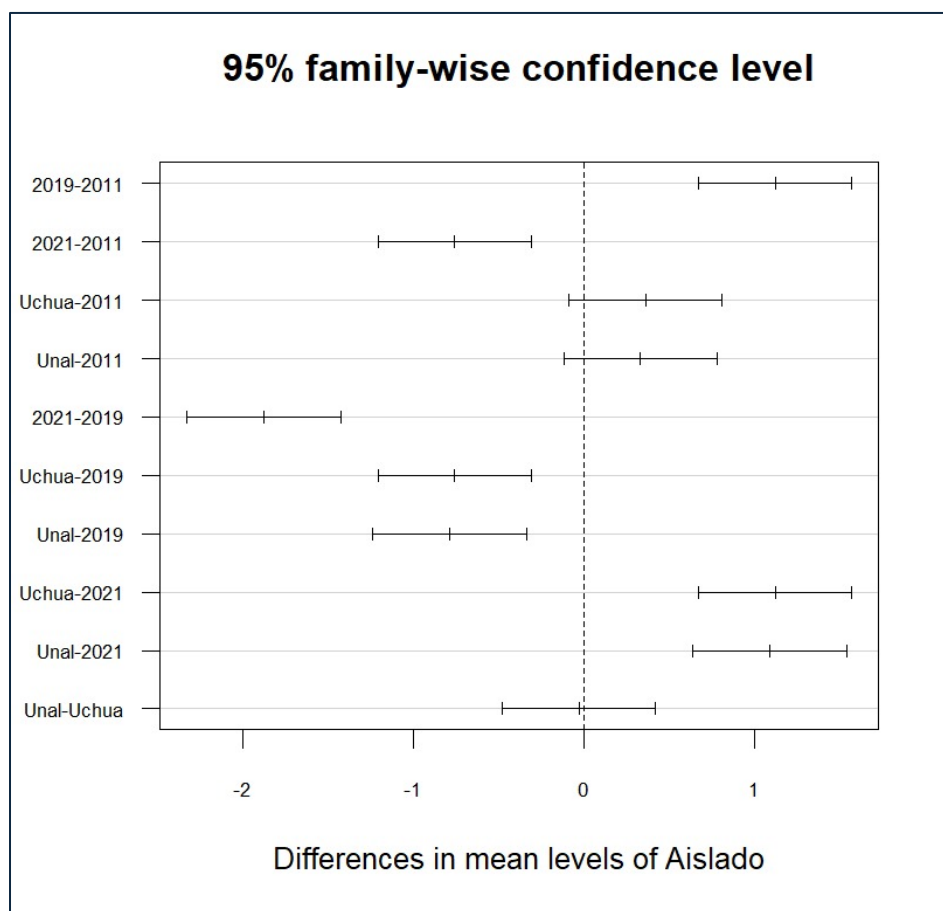
**Figura 10.** Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, utilizada para verificar que los residuos del modelo de ANOVA siguen una distribución normal. El valor de **W** se encuentra entre 0 y 1, lo que indica que los datos se distribuyen normalmente. El p-valor es 0.5274, lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula.

El resultado observado en la Figura 12 de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk sugiere que los residuos del ANOVA no presentan desviaciones significativas de la normalidad. Esto es crucial, ya que uno de los supuestos del ANOVA es que los residuos deben seguir una distribución normal. Dado que este supuesto parece cumplirse, basándonos en el valor de p de 0.5274, se puede confiar en los resultados del ANOVA realizado.

Igualmente, el gráfico de los residuos estandarizados representado en la Figura (*Anexos*) muestra que los puntos siguen de cerca la línea de referencia diagonal. Esto respalda la conclusión obtenida de la prueba de Shapiro-Wilk: los residuos del modelo ANOVA pueden ser considerados como provenientes de una distribución normal.



**Grafica 8.** Representación visual de las comparaciones múltiples de Tukey HSD entre los resultados del crecimiento de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) en las diferentes variedades. Se observan diferencias significativas entre las variedades 6515 - 395 y F1B2 - 6515. El resto de las comparaciones no muestran diferencias significativas, ya que sus intervalos de confianza cruzan la línea de cero.



**Grafica 9.** Representación visual de las comparaciones múltiples de Tukey HSD entre los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX). Se observan diferencias significativas para los aislados 2019 y 2011, 2021 y 2011, 2021 y 2019, UNAL y 2019, y UNAL y 2011. Algunas comparaciones no muestran diferencias significativas, ya que sus intervalos de confianza cruzan la línea de cero.

Según la prueba de Tukey observada en la Figura (Anexos), podemos observar la comparación entre las variedades 6515 / 395 de clavel, donde se muestra una diferencia de medias de 0.48 con un intervalo de confianza de 0.02947338 a 0.9305266 y un valor p ajustado de 0.0339800. Esto sugiere que hay una diferencia significativa entre estas dos variedades a un nivel de confianza del 95%.

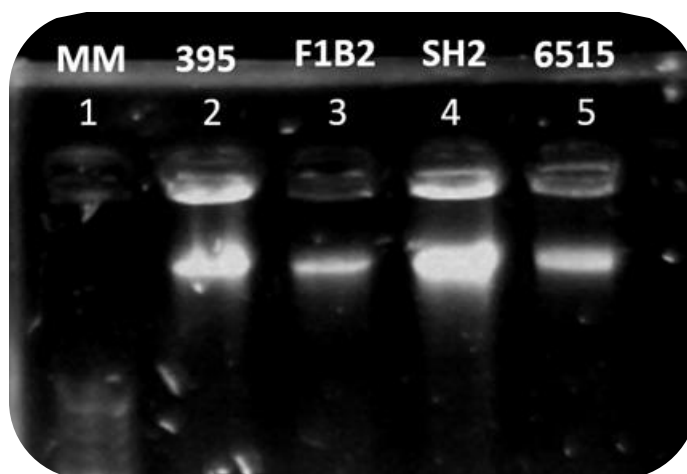
Por otro lado, la comparación entre los aislados 2019 / 2011 de *Fusarium oxysporum* (FOX) muestra una diferencia de medias de 1.12 con un intervalo de confianza de 0.66947338 a

1.5705266 y un valor p ajustado de 0.0000091. Esto indica una diferencia significativa entre estos dos aislados.

Por lo tanto, las comparaciones con valores p ajustados significativos indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre esas combinaciones específicas.

### 3.11. Obtención de ADN de Células de Clavel

En la figura 13 se presenta la visualización del ADN de las variedades de clavel utilizadas en este estudio que se usó para corroborar la presencia de los diferentes genes que se utilizaron en este trabajo, obtenido con el método descrito en metodología bajo el título “Extracción de ADN de microplantas *in vitro*”.

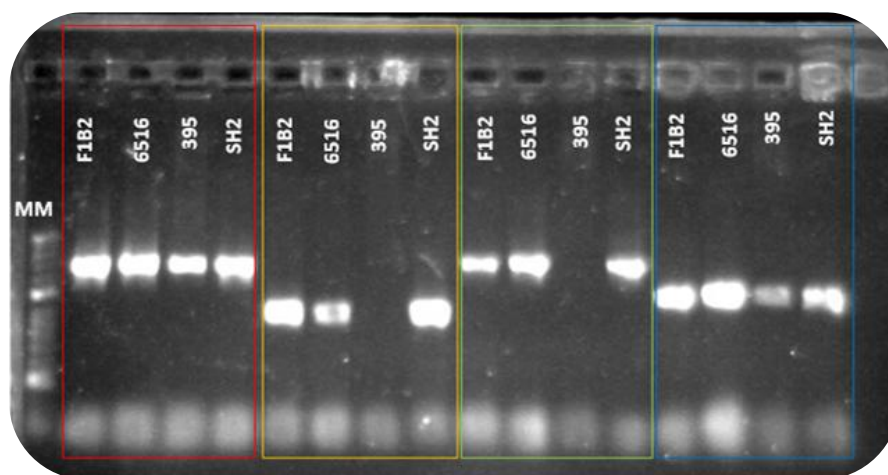


**Figura 11.** Electroforesis en agarosa al 1% de ADN genómico visualizado con bromuro de etidio al 0.001%, obtenido de células de las variedades de clavel 395, F1B2, SH2 y 6515. MM representa el patrón de pesos moleculares.

### 3.12. Amplificación por PCR de genes involucrados en la respuesta a FOX en el DNA de células de clavel

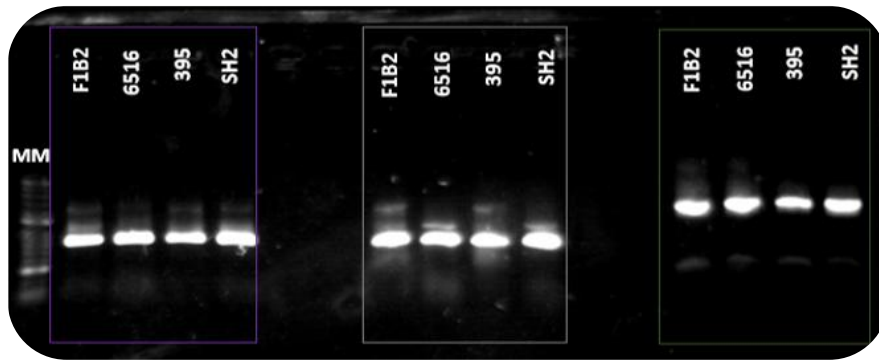
Se probaron los genes alcohol deshidrogenasa (ADH), arginina descarboxilasa (ADC), antocianina 5-O-glucosiltransferasa (UGT) y chitin 4-like glicosil hidrolasa (CTS) (Figura

14) entre los genes seleccionados en este estudio, con el fin de evaluar su presencia en el genoma de las cuatro variedades de clavel estudiadas (Tabla 3).

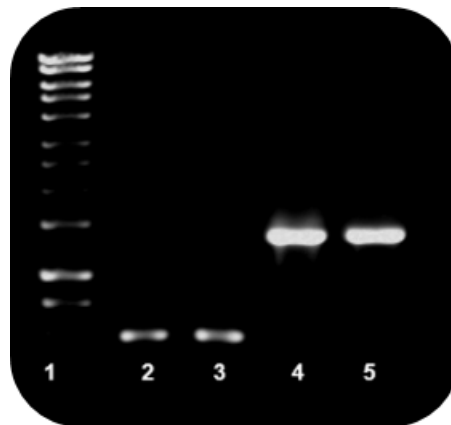


**Figura 12.** Producto de la amplificación por PCR de los genes alcohol deshidrogenasa (ADH) en los primeros cuatro carriles (de izquierda a derecha), arginina descarboxilasa (ADC) en los carriles cinco al ocho, antocianina 5-O-glucosiltransferasa (UGT) en los carriles nueve al doce, y chitin 4-like glicosil hidrolasa (CTS) en los últimos cuatro carriles. MM representa el patrón de peso molecular Hyperladder II Bioline. Se observó una baja amplificación de los genes ADC y UGT en el ADN de la variedad 395.

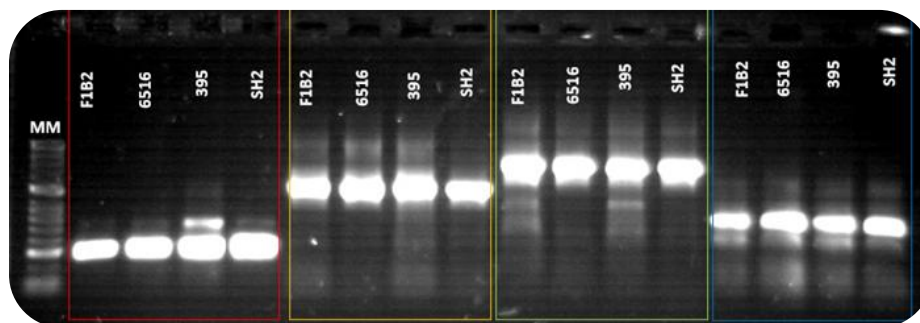
Para los genes arginina descarboxilasa (ADC) y antocianina 5-O-glucosiltransferasa (UGT) en el ADN de la variedad 395, se presentó una baja amplificación. Por ello, se decidió amplificar otros genes presentes en el genoma de clavel, como se muestra en la Figura 15: proteína ribosomal, fructoquinasa y factor de iniciación 5 A, para probar el ADN de esta variedad. La baja amplificación de ADC y UGT puede deberse a una baja presencia en el número de copias en el genoma de la variedad 395. Al utilizar cantidades muy altas de ADN para la PCR, se logró amplificar los genes ADC y UGT (Figura 16), confirmando lo anteriormente analizado.



**Figura 13.** Productos de amplificación por PCR de los genes: proteína ribosomal en los primeros cuatro carriles (de izquierda a derecha), fructoquinasa en los siguientes cuatro carriles y factor de iniciación 5A en los últimos cuatro carriles. MM representa el patrón de peso molecular Hyperladder II.



**Figura 14.** Productos de amplificación por PCR de los genes arginina descarboxilasa (ADC) en los carriles 2 y 3, y antocianina 5-O-glucosiltransferasa (UGT) en los carriles 4 y 5. El patrón de peso molecular en este caso es Hyperladder I de Bioline, ubicado en el carril 1.



**Figura 15.** Productos de amplificación por PCR de los genes (de derecha a izquierda): Beta-1,3-glucanasa (GLU), Vía de señalización mediada por ácido salicílico (RDC), Homólogo a peroxidasas (PER) y Fenilalanina amoniaco liasa (PAL). MM representa el patrón de peso molecular Hyperladder II.

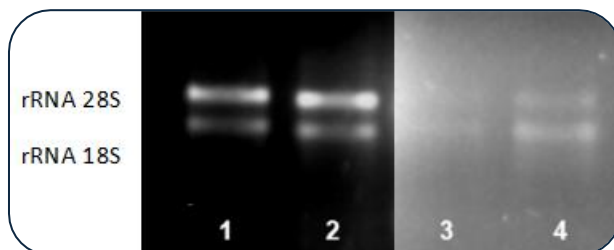
### 3.13. Obtención de RNAtotal, mRNA y RT-qPCR

El modelo de trabajo que enfrenta las células indiferenciadas con los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) ha sido ampliamente utilizado por el grupo de investigaciones en múltiples estudios. En estos trabajos, se ha demostrado que las células reconocen la presencia del parásito antes del contacto físico (elicitación) y responden químicamente activando los mecanismos de resistencia. Como parte de la elaboración de un modelo más robusto de la respuesta del clavel a la presencia del parásito, en este estudio se propuso trabajar con la elicitación de microplantas *in vitro*, lo cual permitiría la obtención de mRNA de estas microplantas elicitadas con los diferentes aislamientos de FOX.

El primer paso consistió en obtener microplantas con un sistema radicular bien definido, como se observa en las Figuras 2 y 3. Posteriormente, se procedió a elicitar las plantas infectándolas con FOX de los diferentes aislados, de acuerdo con el método descrito en la metodología y los resultados presentados en la Tabla 6.

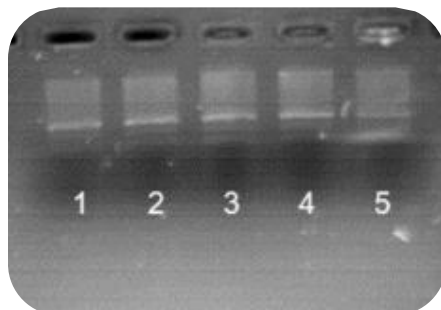
Debido a que la cantidad de raíces de las diferentes variedades de clavel usadas variaba significativamente entre las variedades, y la masa radicular requería mucho tiempo para formar una cantidad útil de raíces para la extracción y obtención de RNA, se tomó la decisión de realizar el análisis de la variación de la actividad de la expresión de los genes de resistencia seleccionados para este estudio utilizando los diferentes aislados de FOX en cultivo dual con

células indiferenciadas. Estas células se obtienen y cultivan de una forma más sencilla y se producen en cantidades suficientes para realizar los ensayos.



**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de RNA total obtenido de células de las variedades resistente y susceptible de clavel. Carriles 1 y 2 contienen RNA total de la variedad SH2 (susceptible, S). Carriles 3 y 4 contienen RNA total de la variedad 395 (resistente, R). Se observa una variación en la cantidad de RNA obtenido entre las diferentes variedades.

En la Figura 18 se presenta un ensayo de calidad del RNA total obtenido de las variedades SH2 (susceptible) y 395 (resistente). Se observa una diferencia importante en la concentración de RNA total entre la variedad susceptible, donde las bandas son más prominentes, y la variedad resistente, donde las bandas están menos marcadas. Este resultado está directamente relacionado con la respuesta a la presencia del parásito.

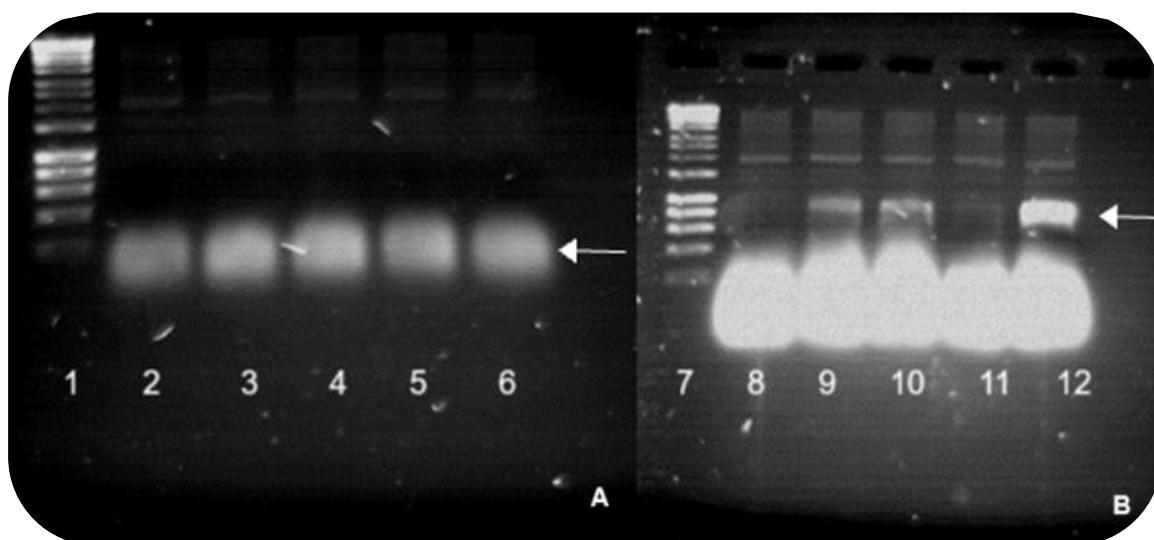


**Figura 17.** Electroforesis de RNA total de la variedad 395 (resistente) eliciteda con los cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX): 1. 2019, 2. 2011, 3. 2021, 4. UNAL y 5.

Uchuva. Se observa de forma preponderante la banda 28S rRNA, y debajo de esta, dos bandas que corresponden al 18S rRNA y 5S rRNA.

De acuerdo con los resultados observados en la Figura 19, se puede deducir que existen variaciones significativas en la producción de RNA en una misma variedad de clavel elicitada con diferentes aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX), los cuales presentan variación en la patogenicidad. Esto es similar a lo que ocurre en diferentes variedades de clavel con respuesta diferencial a la presencia del hongo, como se muestra en la Figura 17.

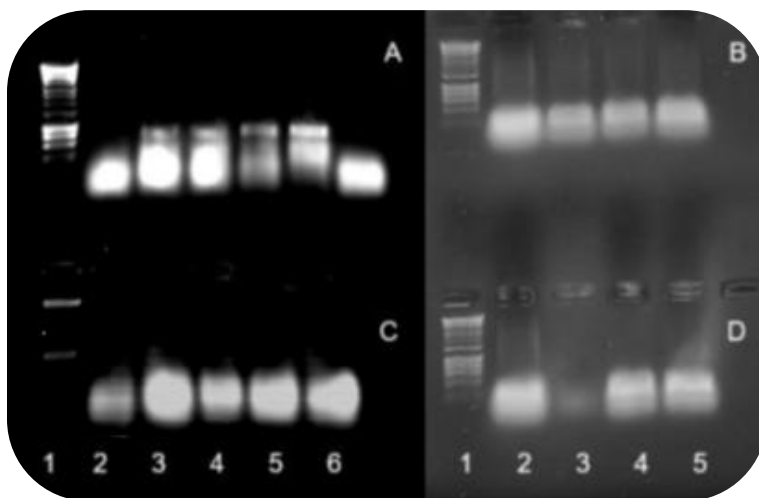
Este RNA total se utilizó para realizar los ensayos de qPCR. Para ello, como se mencionó en la metodología, se realizaron inicialmente pruebas de RT-PCR para establecer la presencia de los mRNA de los genes seleccionados para este estudio en el RNA total de las células de las variedades de clavel elicidadas.



**Figura 18.** RT-PCR con RNA total extraído de las células de la variedad 395 para los genes: A)  $\beta$ -glucanasa (282pb) (indicada con flecha) y B) Alcohol deshidrogenasa (housekeeping) (764pb) (indicada con flecha). Carriles 1 y 7 contienen el patrón de pesos moleculares Hyperladder I. Carriles 2 y 8, células elicidadas con el aislado 2011. Carriles 3 y 9, elicitación con el aislado 2019. Carriles 4 y 10, elicitación con el aislado 2021. Carriles 5 y 11, elicitación con UNAL. Carriles 6 y 12, elicitación con Uchuva.

Los resultados presentados como producto de la RT-PCR de los diferentes genes permiten no solo determinar la presencia del mRNA del gen en cuestión, sino que también permiten estimar de manera indirecta la cantidad de mRNA de ese gen según el grosor de la banda en la electroforesis del producto de amplificación PCR.

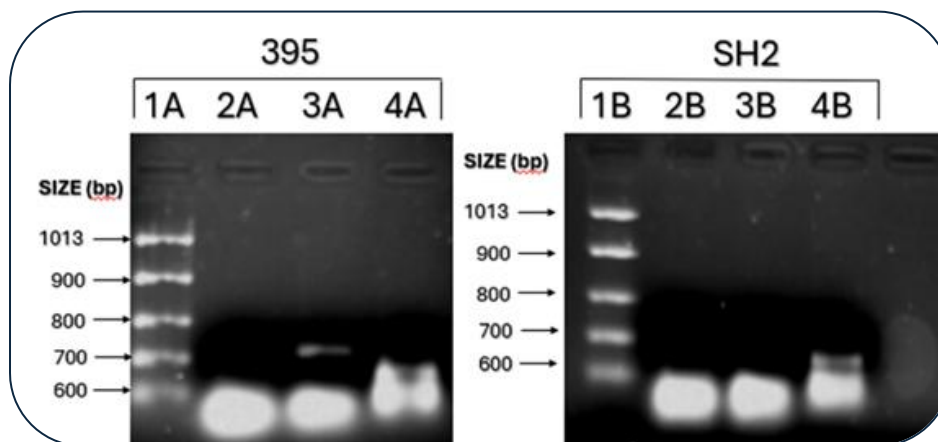
Como se observa en las Figuras 20 y 21, se presentan dos ejemplos ilustrativos de lo anterior. En el primer caso (Figura 20), en la electroforesis en A, todos los ensayos de la misma variedad (395) elicitada con los cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX) muestran una cantidad similar de amplificado en todos los casos, a pesar de que el gen GLU no es un gen housekeeping. Por el contrario, en la electroforesis en B del gen ADH, se observa una variación significativa en la amplificación del mRNA del gen, a pesar de que este gen es un housekeeping.



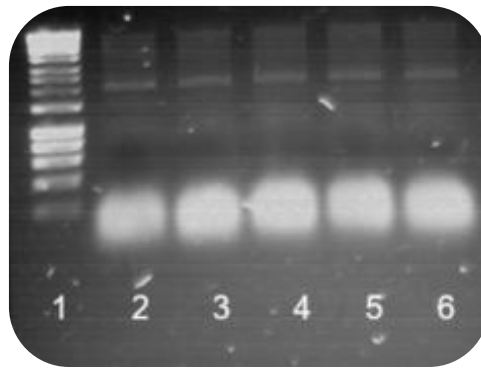
**Figura 19.** Resultado de la RT-PCR de las variedades 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicitadas con los aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX). Los carriles A y B muestran la amplificación del gen RDC (gen mediador de la vía del ácido salicílico), mientras que los carriles C y D muestran la amplificación de los genes PAL (Fenilalanina Amonioliasa) y UGT (Antocianina Glucosiltransferasa). El marcador Hyperladder I de Invitrogen se encuentra en los carriles 1 de A, C y D y el marcador Easyladder I en el carril 1 en B.

Los resultados de RT-PCR con los genes evaluados mostraron que todos los genes en evaluación están presentes en forma de mRNA en las dos variedades de clavel, SH2 y 395. Esto indica que los genes seleccionados se están expresando en ambas variedades, tanto en las células elicidadas como en las no elicidadas.

Por otro lado, para una misma variedad, se observan diferencias en la densidad de las bandas dependiendo del aislamiento de *Fusarium oxysporum* (FOX) utilizado para la elicitación. Estas diferencias son más marcadas en la variedad SH2 (S) en comparación con la variedad 395 (R).



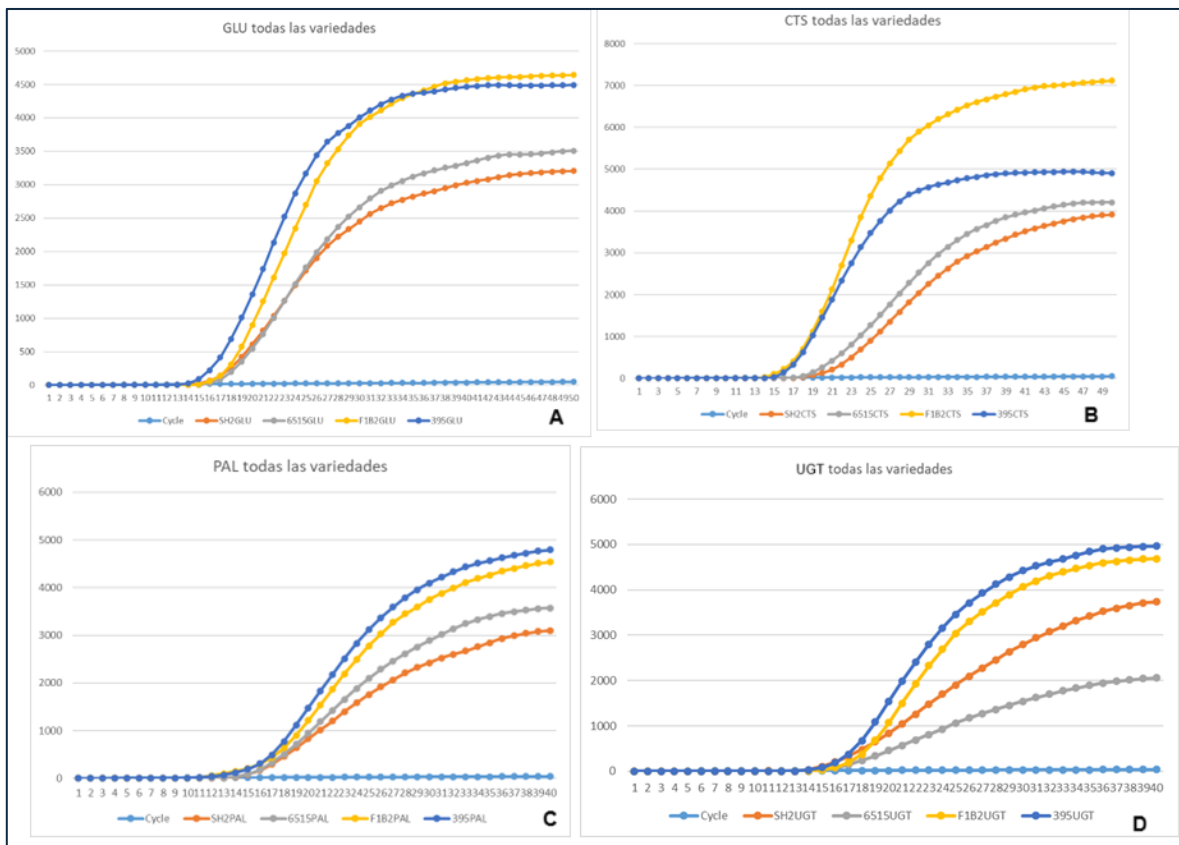
**Figura 20** RT-PCR de las variedades 395 y SH2 elicidadas con el aislamiento de *Fusarium oxysporum* (FOX) 2019. Los genes CTS se muestran en los carriles 2A y 2B, los genes PER en los carriles 3A y 3B, y el gen RLK en los carriles 4A y 4B (Las electroforesis fueron realizadas por Katheryn Buitrago, estudiante del programa de Biología, como parte de su PEC con el mRNA obtenido en el presente trabajo).



**Figura 21.** RT-PCR del gen PAL en la variedad 395: Carril 1 contiene el aislado 2019, carril 2 el aislado 2011, carril 3 el aislado 2021, carril 4 UNAL y carril 5 Uchuva.

#### **3.14. Evaluación de los valores de expresión de genes involucrados en la resistencia del clavel por la elicitación con diferentes aislados de FOX por RT-qPCR**

Se realizó una evaluación inicial de los genes GLU y CTS en las cuatro variedades en estudio, sin elicitar con los aislamientos de FOX. En la Gráfica 10 se muestra el comportamiento de los genes por RT-qPCR, donde se observa que para las variedades 395 y F2H2 (resistentes), estas tienen una expresión basal más alta para este gen, mientras que las variedades SH2 y 6515 (susceptibles) presentan una expresión basal claramente más baja. Para el caso del gen CTS, la expresión basal de este gen se repite de la misma forma que en el caso anterior: mayor expresión para 395 y F2H2, y menores valores de expresión para SH2 y 6515. Para otros genes (PAL y UGT), el comportamiento fue similar, con una mayor expresión en las variedades resistentes y menor en las variedades susceptibles.

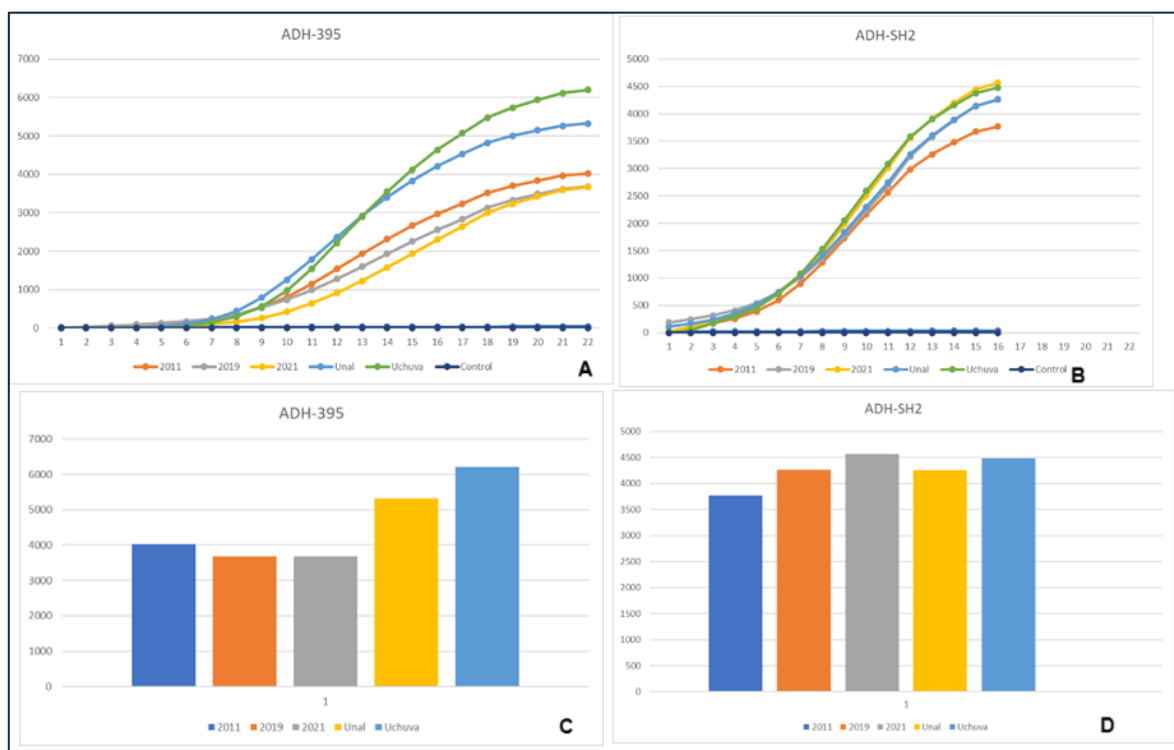


**Grafica 10.** Valores de expresión basal de los genes GLU (A), CTS (B), PAL (C) y UGT (D) en las variedades en estudio SH2, 6515, 395 y F2H2, utilizando RT-qPCR sin elicitación con los aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX).

La Gráfica 11 se muestra el perfil de expresión del gen ADH en las variedades SH2 y 395, elicidadas con diferentes aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX), utilizando la técnica de RT-qPCR. Las curvas de expresión son más prominentes en la variedad SH2 que en 395. La expresión del gen varía en cada variedad y se muestra con diferentes valores al ser expuestas a los distintos aislados.

El aislamiento 2011 tuvo un bajo efecto en la activación de la transcripción de este gen en ambas variedades. En contraste, el aislamiento 2021 produjo la mayor activación de la transcripción en SH2, mientras que mostró el menor valor de activación en la variedad 395. El aislamiento Uchuva presentó los valores más altos de activación de la transcripción en ambas variedades de clavel. Los aislados UNAL y 2019 mostraron un comportamiento

similar en las dos variedades, con valores intermedios en la activación de la transcripción del gen ADH.

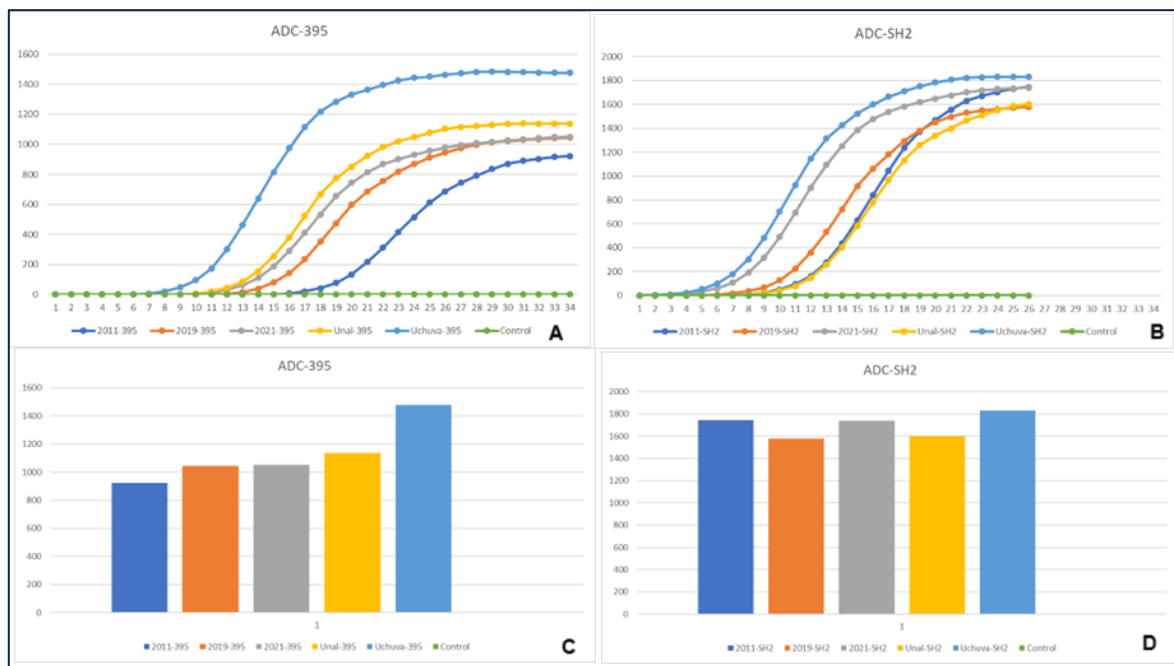


**Grafica 11.** Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen alcohol deshidrogenasa (ADH) en las variedades 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX). Las gráficas A y B muestran las curvas de los ciclos de qPCR, mientras que las gráficas C y D representan las barras de los valores acumulados durante la amplificación.

En la gráfica 12 se observa el comportamiento en los valores de transcripción del gen ADC. Al igual que en casos anteriores, el aislamiento de *Fusarium oxysporum* (FOX) Uchuva mostró el mayor valor de activación de la transcripción en las variedades 395 y SH2 de clavel.

El aislamiento de FOX 2011 produjo el menor valor de transcripción en la variedad 395 y el segundo mayor valor en la variedad SH2. En esta última, se observó que los valores de activación de la transcripción fueron muy cercanos entre todos los aislamientos. Por el contrario, en la variedad 395, los valores de activación de la transcripción entre los aislados

Uchuva y 2011 fueron muy diferentes. Los aislamientos UNAL y 2021 presentaron valores intermedios.

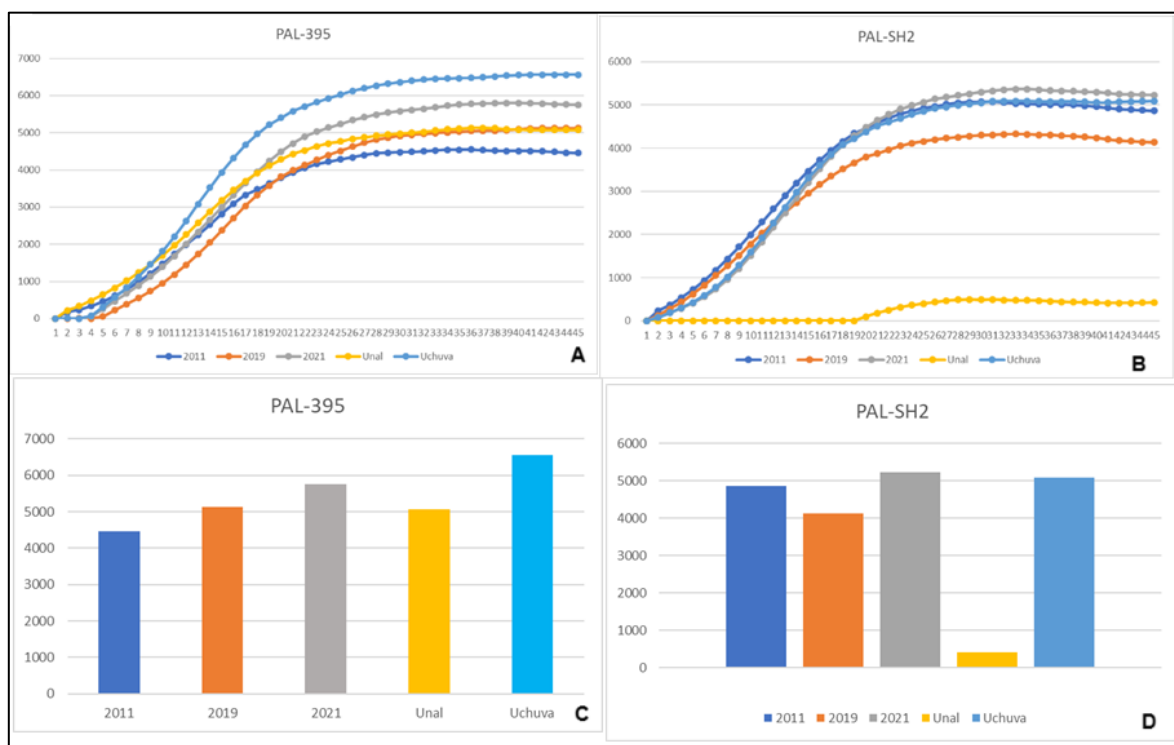


**Grafica 12.** Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen Arginina Descarboxilasa (ADC) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX). Las gráficas A y B muestran las curvas de los ciclos de qPCR, mientras que las gráficas C y D representan las barras de los valores acumulados durante la amplificación.

El gen de la Fenilalanina Amonioliasa (PAL) presentó los niveles más altos de amplificación en la variedad 395 de clavel cuando fue elicitada con el aislamiento Uchuva de *Fusarium oxysporum* (FOX). En la variedad SH2, los niveles más altos de expresión de PAL se observaron en las elicitaciones con los aislados 2021 y Uchuva.

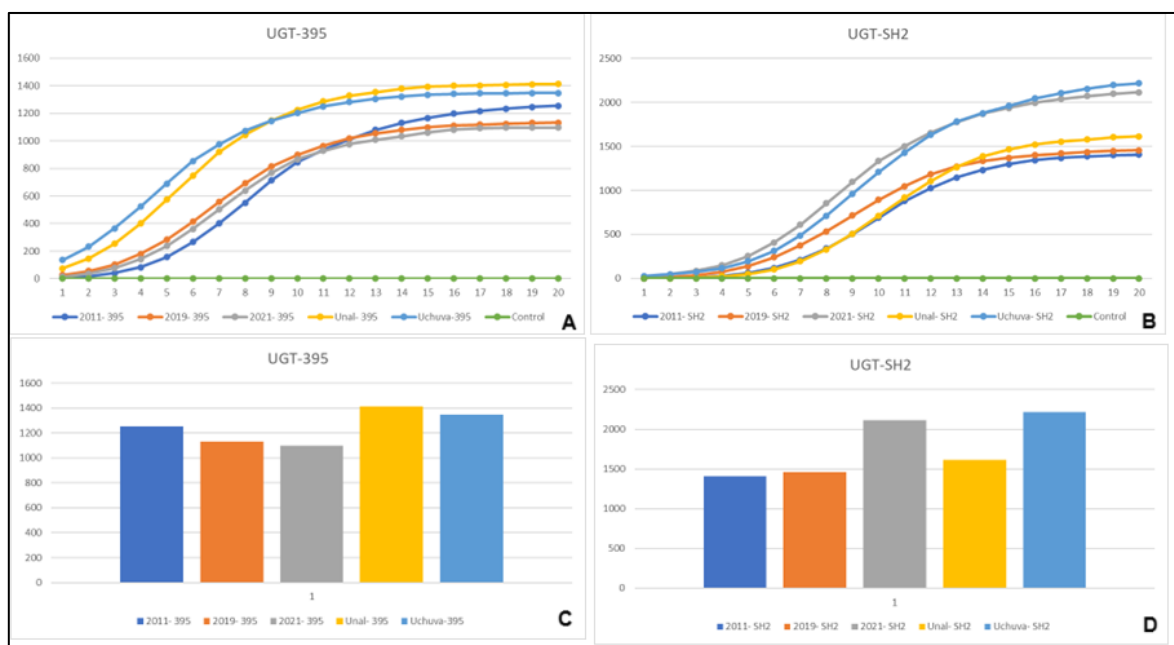
Los valores más bajos de expresión de PAL se registraron en la elicitación de SH2 con el aislado UNAL y en la elicitación de 395 con el aislado 2011. En la variedad 395, el gen PAL

presentó valores promedio cuando fue elicitada con los aislados UNAL y 2019. El aislamiento 2019 se comportó de manera similar al anterior en la variedad SH2.



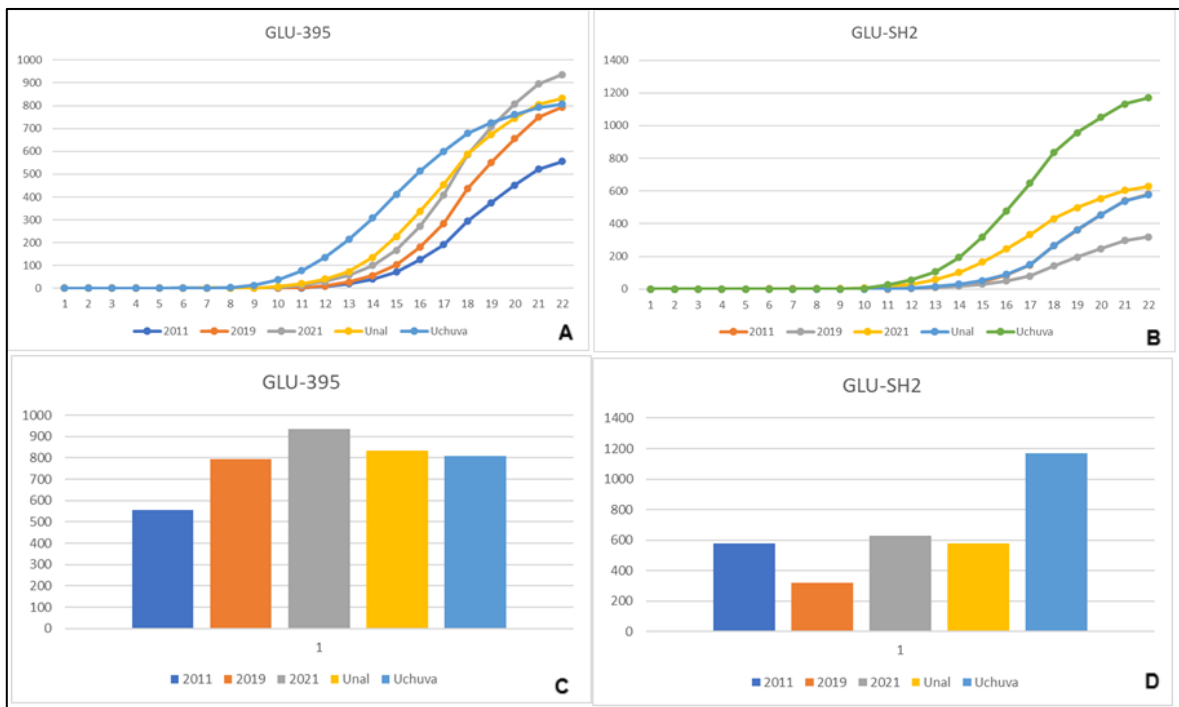
**Grafica 13.** Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen Fenilalanina Amonioliasa (PAL) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX). Las gráficas A y B muestran las curvas de los ciclos de qPCR, mientras que las gráficas C y D representan las barras de los valores acumulados durante la amplificación.

Para el gen Antocianina 5-O-glucosiltransferasa (UGT), se observa en la Gráfica 14 que en la variedad 395 la mayor expresión del gen se encontró cuando esta fue elicitada con el aislamiento UNAL, y el menor valor de expresión se obtuvo con el aislamiento 2021. Por el contrario, en la variedad SH2, el gen UGT presentó una mayor expresión cuando fue elicitada con el aislamiento Uchuva y el menor valor de expresión se observó con el aislamiento 2011.



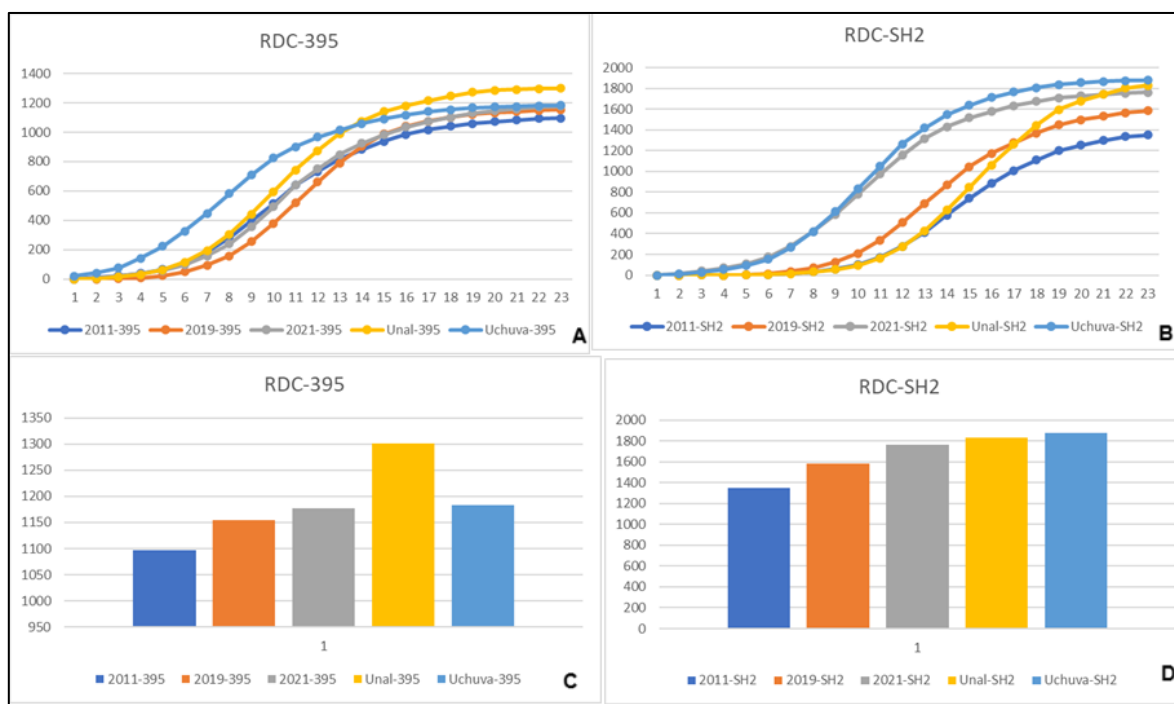
**Grafica 14.** Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen Antocianina 5-O-glucosiltransferasa (UGT) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicitadas con los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX). Las gráficas A y B muestran las curvas de los ciclos de qPCR, mientras que las gráficas C y D representan las barras de los valores acumulados durante la amplificación.

Para el gen Beta-1,3-glucanasa (GLU), se observa en la Gráfica 15 que en la variedad 395 la mayor expresión del gen se encontró cuando fue elicitada con el aislamiento 2021, y el menor valor de expresión se obtuvo con el aislamiento 2011. Por el contrario, en la variedad SH2, el gen UGT presentó una mayor expresión cuando fue elicitada con el aislamiento Uchuva, y el menor valor de expresión se observó con el aislamiento 2019.



**Gráfica 15.** Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen Beta-1,3-glucanasa (GLU) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX). Las gráficas A y B muestran las curvas de los ciclos de qPCR, mientras que las gráficas C y D representan las barras de los valores acumulados durante la amplificación.

Para el gen relacionado con la vía de señalización del ácido salicílico (RDC), se observa en la Gráfica 16 que las diferencias no son muy marcadas entre las expresiones de la variedad 395 elicitada con los diferentes aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX). Los valores más altos de expresión en 395 se presentaron con los aislados UNAL y Uchuva, mientras que los menores valores de expresión se observaron con los aislados 2019 y 2011. En cuanto a la variedad SH2, los valores más altos de expresión se registraron con el aislado Uchuva y los valores más bajos con el aislado 2011.

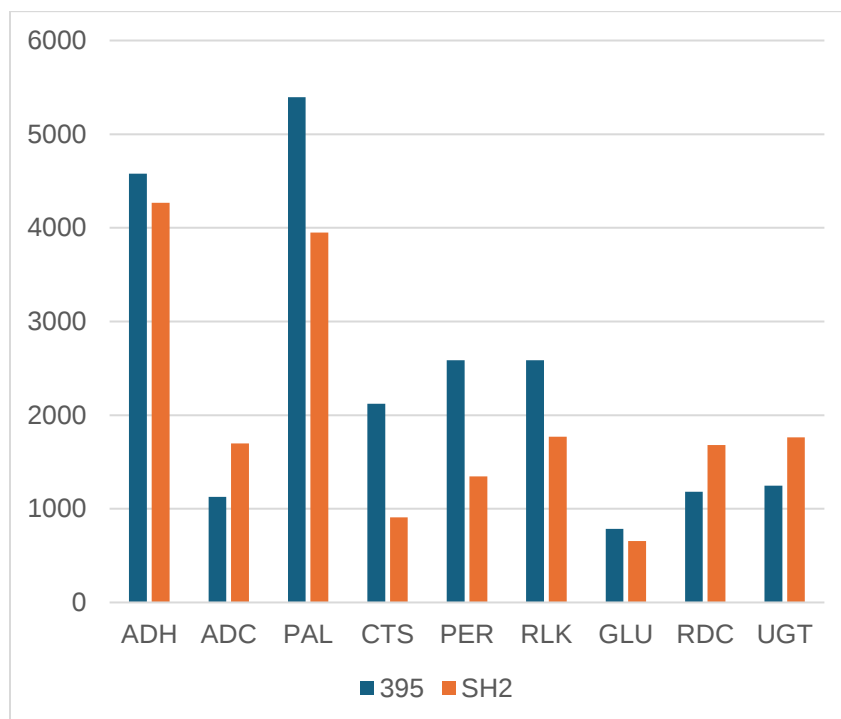


**Grafica 16.** Resultados de la técnica RT-qPCR para el gen relacionado con la vía de señalización del ácido salicílico (RDC) en las variedades de clavel 395 (A y C) y SH2 (B y D) elicidadas con los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX). Las gráficas A y B muestran las curvas de los ciclos de qPCR, mientras que las gráficas C y D representan las barras de los valores acumulados durante la amplificación.

Las evaluaciones de los valores de expresión de los genes Peroxidasa (PER), Receptor de quinasas (RLK) y Quitina glicosil hidrolasa (CTS) se realizaron en las variedades 395 y SH2 de clavel con los cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX). En este caso, se utilizó la técnica de RT-PCR con cuantificación por fluorometría del producto de la RT-PCR, debido al daño del equipo de qPCR. La RT-PCR se detiene cada 10 ciclos y se mide la concentración de ADN amplificado utilizando el método Qubit por fluorometría, luego se continúa con la PCR hasta completar 30 ciclos. Esta técnica se conoce como qPCR manual.

En la Gráfica 17 se muestran los resultados de la expresión de todos los genes en las variedades 395 y SH2 elicidadas con todos los aislamientos de FOX utilizados en este estudio. Se observa en la gráfica que los niveles de expresión de los diferentes genes son distintos en las dos variedades, correspondiendo a los niveles de resistencia de cada variedad. Es decir,

se observaron mayores niveles de expresión en la variedad resistente y menores en la susceptible en todos los casos.

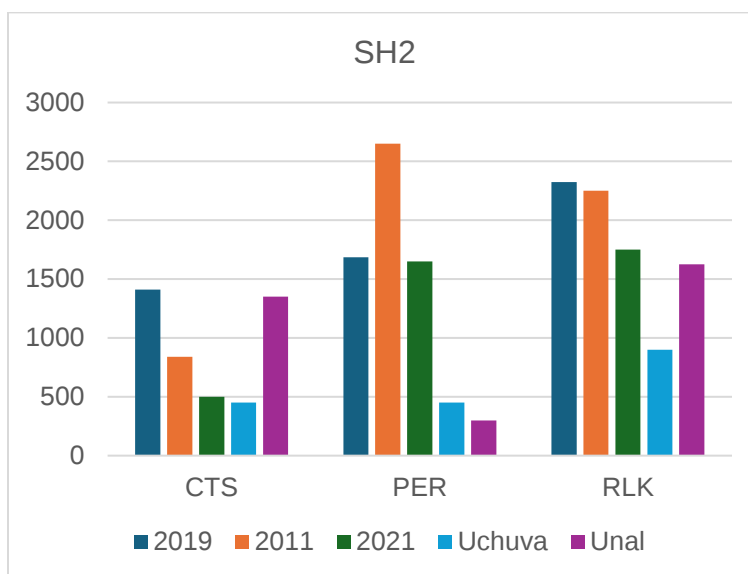


**Grafica 17.** Suma de los valores de expresión de todos los genes en estudio en las variedades 395 y SH2 elicidadas con todos los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX) utilizados en este estudio.

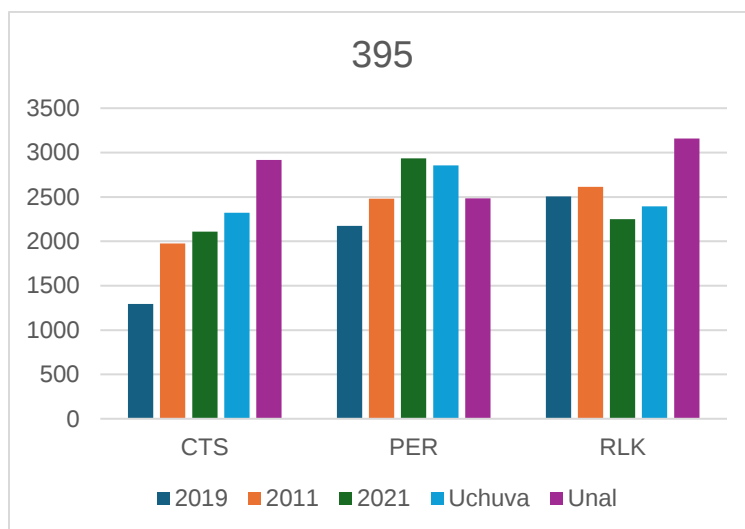
Comparando independientemente la expresión de cada uno de los genes en evaluación (CTS, PER y RLK) durante la elicitación con cada uno de los aislados de *Fusarium oxysporum* (FOX), se observa una variación altamente significativa en la expresión en la variedad SH2. Los valores más altos de expresión se consiguieron en el gen RLK, mientras que los menores se observaron en CTS.

Los cambios más importantes se presentaron en el gen PER, donde la elicitación de SH2 con el aislado 2011 mostró el valor más alto de expresión del gen, y el valor más bajo se presentó en la elicitación con UNAL. En este sentido, los datos son coherentes.

Para CTS, la mayor expresión se obtuvo con el aislamiento 2019 y la menor con Uchuva. En el caso del gen RLK, la mayor expresión se dio con el aislamiento 2019 y la menor con Uchuva.



**Grafica 18.** Valores de expresión de los genes CTS, PER y RLK en las variedades SH2 elicitada con los aislamientos 2019, 2011, 2021, Uchuva y UNAL.



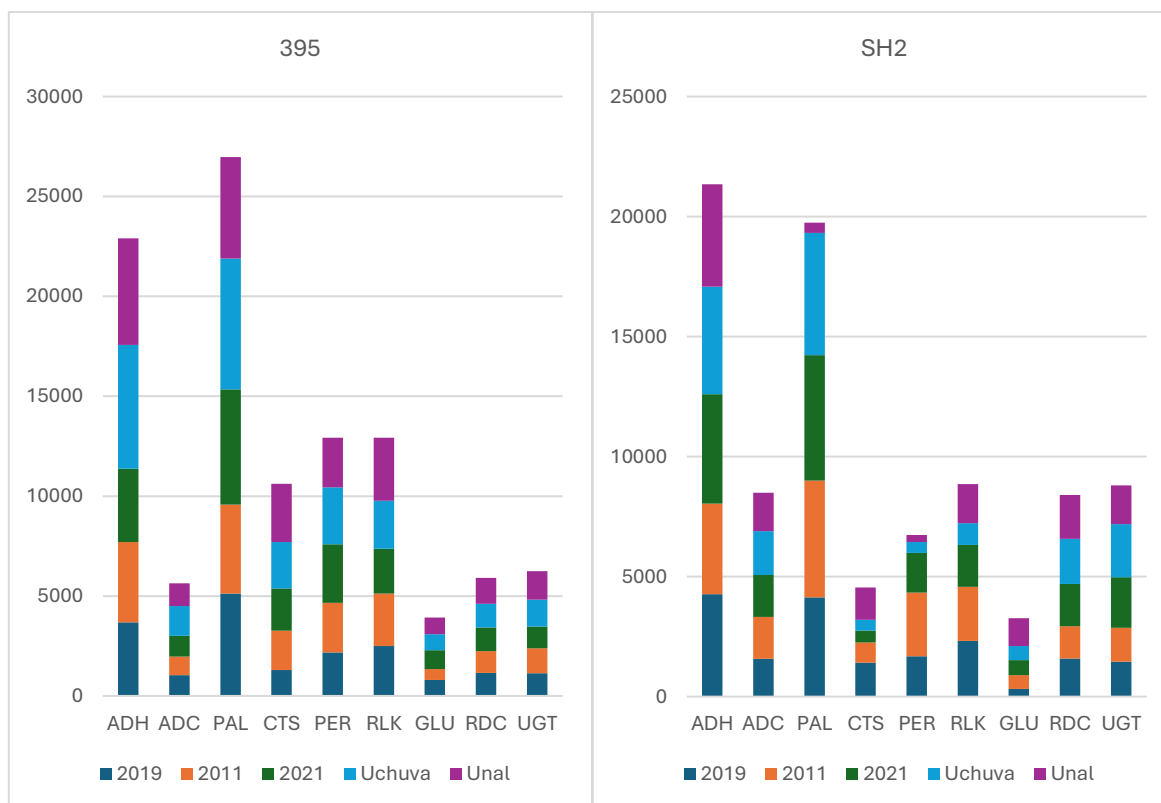
**Grafica 19.** Valores de expresión de los genes CTS, PER y RLK en las variedades 395 elicitada con los aislamientos 2019, 2011, 2021, Uchuva y UNAL.

Para la variedad 395, en conjunto, los valores más altos de expresión se encontraron en el gen RLK en todos los casos, mientras que los menores se observaron en CTS. Para cada gen, al igual que en el caso anterior, hay variaciones significativas en la expresión dependiendo del aislamiento que elicitó su expresión, y ningún caso es igual al otro.

Al comparar SH2 con 395, se observa que PER es el gen que presenta la mayor expresión en la variedad resistente (395), mientras que RLK muestra la mayor expresión en la variedad susceptible (SH2).



**Grafica 20.** valores de expresión de todos los genes analizados en este estudio para las dos variedades 395 (R) y SH2 (S). En la parte **A**, se observan los valores de expresión de todos los genes en ambas variedades, sin considerar el aislamiento utilizado para elicitarlas. En la parte **B**, se muestran los valores de la expresión total de los genes estudiados en relación con el aislamiento utilizado. Estos resultados permiten comprender cómo cada variedad de clavel responde genéticamente a diferentes aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOX), ofreciendo una visión integral de la activación y regulación de los genes de resistencia en clavel.



**Gráfica 21.** Compilación de los valores de expresión de los diferentes genes utilizados en este estudio.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Resistencia y susceptibilidad de las variedades de clavel y niveles de patogenicidad de los aislados de FOX

El modelo de interacción hospedero/parásito, representado por el clavel y *Fusarium oxysporum* (FOX), ha demostrado ser un enfoque valioso para investigar las relaciones entre dos genomas en una relación parasitaria, utilizando evaluaciones *in vitro* con células de variedades de clavel obtenidas mediante inducción hormonal y el hongo aislado y purificado de plantas infectadas (Filgueira et al., 2024). Este modelo es particularmente útil, ya que elimina numerosas variables que pueden influir en los experimentos *ex vitro*, al mantener constantes las condiciones de temperatura, humedad y luminosidad. Además, el uso de un medio de cultivo estandarizado asegura que las concentraciones, el pH y la osmolaridad se

mantengan constantes a lo largo de los diferentes experimentos. De este modo, se logra aislar metodológicamente los resultados del comportamiento de los genomas de las células de las variedades evaluadas frente a los aislamientos de FOX, minimizando la influencia de variables externas distintas a la interacción biológica entre los dos organismos (Filgueira, 2011).

Un aspecto fundamental para la micropropagación adecuada de células o microplantas es no solo proporcionar los nutrientes necesarios, sino también prevenir la oxidación de los tejidos, un fenómeno causado por compuestos fenólicos producidos por la planta. Estos compuestos son catalizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO), que induce la producción de quinonas, lo que puede resultar en daño celular y, potencialmente, en la muerte de las células. Este fenómeno es una de las causas más comunes de pérdida de material vegetal *in vitro* (Jukanti y Jukanti, 2017).

En este estudio, se llevaron a cabo experimentos para evaluar la respuesta biológica del clavel a la presencia de diferentes aislados del parásito, utilizando microplantas desarrolladas *in vitro* en lugar del modelo celular tradicionalmente empleado por el grupo de investigación en Fitopatología Molecular de la Universidad Militar Nueva Granada. Los ensayos enfrentaron la dificultad del desarrollo radicular de las microplantas de clavel en condiciones *in vitro*, lo cual coincide con los reportes de empresas dedicadas a la propagación *in vitro* de claveles (Ali et al., 2008), donde el enraizamiento de las plántulas se identifica como el principal desafío. Como se presentó en los resultados, diferentes variedades de clavel mostraron variaciones significativas en los valores de enraizamiento, medidos como la cantidad de raíces por planta. Dado que la infección por parte de FOX se produce a través de las raíces, las variaciones en los tiempos de aparición y la lentitud en la formación de raíces representaron un obstáculo para la realización de los ensayos de elicitación, lo que llevó a la decisión de realizar todos los ensayos utilizando células de las variedades.

Las Figuras 1, 2 y 3 evidencian diferencias significativas en el crecimiento, tanto de las células como de las microplantas, lo cual es crucial, ya que los ensayos de cultivo dual dependen de la cantidad de células presentes y de su respuesta a la presencia del parásito. Esta es la razón principal para llevar a cabo los ensayos duales con células, dado que la

variación en el tamaño de las plántulas entre las diferentes variedades es notable, medida en términos del tiempo de desarrollo de la microplanta.

Este trabajo demuestra que diferentes aislados de *Fusarium oxysporum*, separados en tiempo y espacio (muestras recolectadas en diversas localidades de la sabana de Bogotá), presentan diferencias en el comportamiento observado en el cultivo monospórico en cajas de Petri. Un aspecto de interés es cómo los distintos aislados exhiben variaciones significativas en el hábito de crecimiento en las cajas de Petri, así como en los colores y formas (Figuras 4 y 5), tal como se ha documentado en estudios previos (López-Zapata y Castaño-Zapata, 2019). Estas diferencias también se reflejaron en la presencia, ausencia y cantidad de las estructuras reproductivas de los diferentes aislados de FOX (Figura 6), lo que representa un ejemplo del polimorfismo genético que caracteriza a estos aislados.

Asimismo, se observaron diferencias en la patogenicidad entre los distintos aislados, entendida como variaciones en el crecimiento en el cultivo dual de los diferentes aislados en ensayos realizados con la misma variedad de clavel. Estos resultados corroboran los obtenidos por Hernández (2023) en ensayos realizados por el grupo de investigación en plantas *ex vitro* en invernadero.

La variación en la pigmentación puede estar relacionada con la virulencia del patógeno, como se ha estudiado por (Solano-Báez et al., 2011), quienes encontraron que los micelios de *Fusarium verticillioides* con tonalidades moradas eran más virulentos que los micelios de tonalidades blancas. La inclusión en este estudio de una forma especial de *Fusarium oxysporum* diferente a dianthi, específicamente la forma especial peruviana proveniente de la Uchuva (*Physalis peruviana* L) (Díaz et al., 2012), tuvo un doble propósito. Primero, contar con un aislamiento de FOX que estuviera taxonómicamente alejado de los aislados dianthi. Segundo, intentar demostrar que la diversidad genética de FOX es tan amplia que las formas especiales no constituyen una clasificación cerrada para representar la taxonomía de un grupo heterogéneo, desde el punto de vista genético, que se relaciona patogénicamente con múltiples especies vegetales.

Se reconoce actualmente que *Fusarium oxysporum* constituye un grupo con especies patogénicas y no patogénicas mostrando la plasticidad genética de este grupo de hongos, en el 2019 se reconocían 106 formas espaciales bien caracterizadas (Edel-Hermann and C.

Lecomte, 2019). Algunos autores en la actualidad están poniendo en duda la validez de las f.sp. de FOX, más allá de la variabilidad genética producto de la heterogeneidad del genoma de este grupo en términos de las barreras biológicas que separarían diferentes formas especial (Jackson et al., 2024), como claramente se muestra en este trabajo.

El cultivo dual, que implica el crecimiento simultáneo de la planta y el parásito en condiciones *in vitro* como método para evaluar la respuesta de las células o microplantas a la presencia del parásito, ha demostrado ser un método eficaz para establecer diferentes niveles de resistencia o susceptibilidad de la planta frente al parásito (Filgueira, 2011). Este ensayo no es simple desde la perspectiva de la interacción entre estos dos organismos. Se ha demostrado que la interacción es de tipo bioquímico: los elicitores del parásito activan los mecanismos de respuesta de la planta, lo que se refleja en el cultivo dual mediante la disminución de la velocidad de crecimiento del parásito, debido a los metabolitos que restringen su desarrollo (Gómez-Corredor, 2021).

Los diferentes niveles de patogenicidad de los aislados de FOX se relacionan de manera distinta con las diversas variedades de clavel, que presentan diferentes grados de resistencia o susceptibilidad al parásito. Esto implica que las variaciones en la velocidad de crecimiento del parásito en el cultivo dual son el resultado de la interacción entre los dos genomas enfrentados (Gómez-Corredor, 2021). Las variaciones observadas en los cultivos *in vitro* de los diferentes aislados de FOX se reflejaron en la patogenicidad observada en los cultivos duales con microplantas. En la Figura 6, se presentan los resultados de los ensayos duales en microplantas, donde los promedios de los experimentos (3 repeticiones) indican que el aislamiento Uchuva mostró el mayor avance del parásito dentro de la planta, utilizando la variedad SH2 (S) como comparación. El aislamiento 2019, por otro lado, mostró el menor avance dentro de la planta. Entre estos dos aislados, los resultados de avance en el interior de las plantas fueron, en orden: 2011, UNAL y 2021.

La Tabla 7 presenta los datos de los cultivos duales con células de las variedades de clavel enfrentadas a los diferentes aislados de FOX. Al igual que en el caso anterior, se realizaron tres repeticiones y en la tabla se muestran los valores de crecimiento de las cuatro variedades analizadas. El menor crecimiento del hongo en general se observó en la variedad 395, que se ha catalogado como la más resistente. En contraste, el mayor crecimiento de todos los

aislados se presentó en la variedad 6515, clasificada como medianamente susceptible. Esto indica que el aislamiento más patogénico es 2019, seguido por Uchuva y UNAL, mientras que los menos patogénicos fueron 2021 y 2011. Es relevante destacar que el aislamiento Uchuva mostró una alta patogenicidad en el ensayo, superando a otros aislados de FOX. Además, el aislamiento Uchuva mostró un comportamiento consistente en los ensayos con microplantas y con células, evidenciando ser uno de los más patogénicos para el clavel. Por el contrario, el aislamiento 2019 mostró un comportamiento variable al enfrentarse al clavel, como se ha observado en otros estudios realizados por el grupo de investigación.

Es importante resaltar que estos organismos presentan una amplia variabilidad genética, lo que los hace susceptibles a mostrar diferentes comportamientos (Mohd-Hafifi et al., 2024). Un mismo aislamiento puede manifestar más o menos agresividad dependiendo del comportamiento de la variedad de clavel, ya sea en células o en microplantas. Esto subraya el hecho de que se trata de un enfrentamiento entre dos genomas con altos niveles de polimorfismo, un fenómeno que se puede observar claramente en la Tabla 8.

La interacción entre *Fusarium oxysporum* (FOX) y las variedades de clavel analizadas, como se presenta en la Gráfica 5, revela patrones significativos en la resistencia y susceptibilidad de las plantas frente a este patógeno. La variedad 395, identificada como la más resistente, presenta un crecimiento del hongo notablemente bajo, con una mediana de 2.65 cm, lo que sugiere que posee mecanismos de defensa eficaces que limitan la colonización por parte de FOX. Este hallazgo es consistente con la literatura que destaca la importancia de la resistencia varietal en el manejo de enfermedades en cultivos (Hernández, 2024). Por otro lado, la variedad 6515, con un crecimiento del hongo más elevado (alrededor de 3.0 cm), plantea interrogantes sobre su clasificación previa como "medianamente susceptible". Este término puede resultar confuso y sugiere la necesidad de adoptar un enfoque más cuantitativo en la evaluación de la resistencia, utilizando métricas precisas que reflejen la capacidad de las variedades para limitar el crecimiento del patógeno.

El análisis de los diferentes aislados de FOX, como se observa en la Gráfica 6, proporciona información valiosa sobre la variabilidad en la patogenicidad de estos. El aislamiento 2019, que mostró el mayor crecimiento (3.65 cm), sugiere una adaptación o virulencia superior en comparación con los demás aislados. Este hallazgo es coherente con estudios previos que

han demostrado que la variabilidad genética entre aislados de patógenos puede influir en su capacidad para infectar y colonizar diferentes hospedadores (Smith et al., 2021). La identificación de Uchuva y UNAL como aislados de alta patogenicidad también resalta la importancia de considerar la diversidad genética de los patógenos en el manejo de enfermedades en cultivos, ya que como hemos demostrado en estudios anteriores diferentes aislados responden de forma diferente a los agentes químicos y biológicos de control.

El análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, representados en la Gráfica 7 y la Figura 12, respectivamente, confirmaron la adecuación de los datos para el análisis estadístico, reforzando la validez de los resultados obtenidos. La significancia estadística de los factores "variedad" y "aislado" en el crecimiento del hongo indica que tanto la genética de la planta como la del patógeno juegan un papel crucial en la dinámica de la enfermedad. Estos resultados son coherentes con estudios anteriores que han demostrado que la interacción entre el hospedador y el patógeno es multifacética y depende de múltiples factores, incluyendo la genética de ambos (Jones y Dangl, 2006).

Las comparaciones múltiples de Tukey HSD, ilustradas en la Gráfica 8 y la Gráfica 9, revelaron diferencias significativas entre ciertas variedades y aislados, subrayando la necesidad de un enfoque selectivo en la elección de variedades para el cultivo. La diferencia significativa entre las variedades 6515 y 395, así como entre los aislados 2019 y 2011, sugiere que la selección de variedades resistentes y el monitoreo de la virulencia de los aislados son estrategias clave para el manejo de *Fusarium oxysporum* en claveles. Este enfoque es fundamental para desarrollar prácticas de manejo integrado de plagas que minimicen el impacto de este patógeno en la producción agrícola.

En resumen, los resultados obtenidos en esta sección de la discusión resaltan la complejidad de la interacción entre las variedades de clavel y los aislados de *Fusarium oxysporum*, evidenciando la variabilidad en la resistencia y susceptibilidad de las plantas frente a diferentes patógenos. La utilización de un modelo *in vitro* ha permitido un análisis más controlado y preciso de estas interacciones, eliminando variables externas que podrían influir en los resultados. Las diferencias observadas en el crecimiento del hongo y la respuesta de las microplantas subrayan la importancia de considerar tanto la diversidad genética de los aislados de FOX como las características específicas de cada variedad de clavel.

#### **4.2. Variación de la expresión de genes de resistencia en clavel dependiente de la variación de la patogenicidad de aislamientos de FOX**

Es fundamental resaltar que los genes seleccionados para este estudio han sido objeto de análisis en investigaciones previas (Gómez-Corredor, 2021; Londoño, 2023). En el primer estudio, se identificaron estos genes debido a su variación en la expresión en diferentes variedades de clavel, evaluadas con un único aislamiento de *Fusarium oxysporum* (FOX) mediante técnicas de secuenciación de ARN mensajero (mRNA-seq) por NGS. En el segundo estudio, se analizó la expresión de los mismos genes en variedades elicítadas con un solo aislamiento de FOX, utilizando técnicas de RT-qPCR. En el presente trabajo, se evalúan los mismos genes en las mismas variedades, pero con diferentes aislamientos de FOX que presentan distintos niveles de patogenicidad, con el objetivo de establecer variaciones en la expresión de los genes en función de la variabilidad patogénica.

La selección previa de genes que mostraron variaciones significativas en la expresión entre variedades resistentes y susceptibles al ser elicítadas con un único aislamiento patogénico de FOX sugiere que la resistencia en claveles contra *Fusarium* es un fenómeno multigénico y multivariado. Esto implica la participación de varios genes, cada uno con diferentes niveles de expresión que lo pueden hacer de diferente forma o en diferentes momentos, variando sus niveles de expresión para establecer un frente de respuesta que en conjunto produce un fenotipo determinado que permite la resistencia o susceptibilidad de la planta (Filgueira et al., 2024).

En primer lugar, se corroboró la presencia de los genes seleccionados en el genoma de las variedades 395 (R), F1B2 (PR), SH2 (S) y 6515 (PS) mediante amplificación por PCR con cebadores específicos para estas secuencias génicas (Figuras 14, 15 y 16). La calidad del ADN se evaluó utilizando genes de referencia (housekeeping), como se muestra en la Figura 15. Posteriormente, se realizó la extracción de RNA total de las variedades en estudio y se evaluó la calidad de las extracciones mediante electroforesis en gel de agarosa, corroborando la presencia de las bandas de rRNA 28S y 18S (Figura 18). Se evaluó el RNA total de las variedades, tanto resistentes como susceptibles, elicítadas con los diferentes aislamientos

(Figura 19). Como se ha demostrado en otros trabajos del grupo de investigación, las variedades susceptibles producen, en algunos casos, mayor cantidad de mRNA que las variedades resistentes. Además, en este estudio se detectaron diferentes concentraciones de RNA total en una misma variedad de clavel elicitada con diferentes aislamientos de FOX con distinta patogenicidad (Figura 19). Este resultado es relevante porque refuerza la teoría de que cada variedad de clavel responde de manera diferente ante la presencia de aislamientos de FOX con diversos niveles de patogenicidad.

Las variaciones en los niveles de mRNA en una variedad elicitada con diferentes aislamientos de FOX se reflejaron en los resultados obtenidos por la amplificación de los genes en estudio mediante la técnica de RT-PCR. Algunos genes que no son de referencia, pero que participan en la defensa de la planta, como la  $\beta$ -glucanasa, no mostraron una variación significativa en su expresión en una misma variedad cuando fue elicitada con diferentes aislamientos, como se observa en la Figura 20A. En contraposición, se observaron variaciones en la expresión de genes de referencia involucrados en la respuesta a parásitos, como es el caso de la arginina descarboxilasa (Figura 20B). En estudios previos, Londoño (2023) identificó que estas variaciones podrían estar relacionadas con un aumento en la respiración celular en las variedades susceptibles. En contraste, en las variedades resistentes, la exposición al parásito no provoca un incremento significativo en la respiración celular, lo que se determina mediante la variación en la expresión de enzimas respiratorias a nivel de mRNA. Según Perrot et al. (2022), esta enzima presenta variaciones en su expresión de forma adaptativa, ya que participa en la construcción y remodelación de la pared celular, movilizandocompuestos clave como la callosa. Además, su función incluye la hidrólisis de  $\beta$ -glucanos presentes en las paredes de los parásitos, lo que genera señales que desencadenan la respuesta secundaria de las plantas.

Estas variaciones en la expresión génica de las variedades son altamente significativas, ya que muestran un amplio polimorfismo de expresión a pesar de que la fuente vegetal es un clon y no está expresando su potencial de variación génica mediada por mecanismos de recombinación en los eventos sexuales (fusión de gametos) (Conrath, 2006). El polimorfismo en la expresión de los genes de resistencia en las variedades resistentes y susceptibles de clavel elicitadas con diferentes aislados de FOX se evidenció de manera más clara en los

resultados de las RT-qPCR de los diferentes genes en estudio. Este resultado contrasta con el análisis de la expresión de algunos de los genes en estudio en las variedades no elicítadas, donde se observaron variaciones en la producción de mRNA de diferentes genes (Figuras 21 y 22). Esto demuestra que las variaciones en la expresión de los genes de resistencia son constitutivas e independientes de la presencia del parásito. En otras palabras, este tipo de variación depende de la variedad o híbrido de clavel y no debe confundirse con la variación en la expresión en presencia del parásito, ya que podrían tener diferentes mecanismos de activación (Benavides et al., 2019).

Al analizar la respuesta a diferentes aislados de FOX, las Figuras 17 a 21 y las Gráficas 11 a 16 demuestran la complejidad y especificidad de las interacciones planta-patógeno. La Gráfica 21 ilustra cómo la variedad resistente 395 presenta una respuesta transcriptómica más homogénea a los diferentes aislados, mientras que la variedad susceptible SH2 muestra una mayor variabilidad en su patrón de expresión génica. Este hallazgo sugiere que la resistencia en la variedad 395 podría estar mediada por mecanismos de defensa más generales o constitutivos, capaces de contrarrestar un amplio espectro de aislados de FOX. Por otro lado, la susceptibilidad de la variedad SH2 podría depender de una interacción específica con cada aislado, lo que podría explicar la mayor variabilidad en su respuesta.

La Gráfica 10 revela un patrón fundamental en la resistencia a FOX: las variedades de clavel resistentes (395 y F2H2) exhiben una mayor expresión basal de genes de defensa clave, como GLU, CTS, PAL y UGT, en comparación con las variedades susceptibles (SH2 y 6515). Esta preparación constitutiva, similar a la observada en la isoforma ADC2 de *Arabidopsis thaliana* (Wojtasik et al., 2015), sugiere una capacidad innata de las variedades resistentes para reconocer y responder de manera rápida y eficiente al patógeno. Esta mayor expresión basal podría ser crucial para la activación temprana de las vías de defensa, limitando el crecimiento del patógeno en las etapas iniciales de la infección (Kim y Hwang, 2014). La adaptación de sistema inmune de las plantas a las variaciones y la diversidad genética de los parásitos activa múltiples patrones moleculares asociados a los parásitos (MAMPs) y efectores mediadores de la inmunidad de la planta (ETIs), puede ser la diferencia entre la respuesta resistente y susceptible.

La inducción diferencial de ADC por el aislado Uchuva (Gráfica 12) resalta la importancia de la biosíntesis de poliaminas en la defensa del clavel. Este resultado se alinea con estudios que demuestran la acumulación de putrescina en *A. thaliana* en respuesta a la infección por *Pseudomonas viridiflava* (Rossi et al., 2015). Las poliaminas pueden actuar como antimicrobianos directos, modular la señalización de defensa y contribuir a la resistencia a estreses abióticos, como se ha demostrado en diversos estudios. Profundizar en el estudio de la biosíntesis y función de las poliaminas en la interacción clavel-FOX podría abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias de control.

La inducción de RDC por FOX en clavel (Gráfica 16) confirma la participación de la vía del ácido salicílico (SA) en la respuesta de defensa. Esta observación es consistente con estudios en otras especies vegetales, como *A. thaliana*, donde la vía del SA juega un papel crucial en la resistencia a *Fusarium graminearum* (Jogaiah et al., 2018; Thapa et al., 2018). Investigar la acumulación de SA y la expresión de otros genes relacionados con esta vía en clavel permitiría comprender mejor su rol en la resistencia a FOX.

La mayor expresión de RLK en la variedad susceptible SH2 (Figuras 20, 21, Gráficas 17 a 20) plantea interrogantes sobre su función en la interacción clavel-FOX. Podría indicar una mayor sensibilidad a los PAMPs del patógeno, lo que podría conducir a una activación excesiva de la respuesta inmune y, paradójicamente, a una mayor susceptibilidad. También podría reflejar una desregulación en la señalización de defensa, que impediría una respuesta eficaz contra el patógeno. Se requieren estudios adicionales para esclarecer el papel preciso de RLK en la interacción entre el clavel y *Fusarium oxysporum* (FOX). Según los estudios de Yan et al., (2023), la expresión de los receptores RLK aumenta en respuesta al estrés biótico y abiótico. Además, la presencia de ciertos alelos y la poliploidía del gen desempeñan un papel crucial en su expresión frente a *Fusarium*. Este gen ha sido identificado como un factor clave en la respuesta de diversas variedades de plantas de importancia comercial.

La inducción de UGT (Gráfica 14) sugiere su participación en la detoxificación de toxinas fúngicas, un mecanismo crucial para la resistencia en diversas especies vegetales. Identificar las moléculas específicas que son modificadas por UGT en clavel brindaría información valiosa sobre las estrategias de detoxificación empleadas por la planta. Este aspecto le permitiría al gen UGT participar como gen de transformación de plantas para mejoramiento

genético ya que participa en la modificación de metabolitos secundarios celulares y externos a la planta (Ghadably et al., 2023)

La inducción de GLU por FOX (Gráfica 15) refuerza su función en la degradación de la pared celular del patógeno. Evaluar la actividad enzimática de GLU en clavel, en respuesta a FOX, podría confirmar su rol directo en la resistencia y proporcionar información sobre la eficacia de este mecanismo de defensa. Es clara la participación de este gen tanto en el desarrollo de la planta durante la elongación como en la respuesta adaptativa al ataque de los parásitos gracias a su actividad en la hidrólisis de enlaces 1-4 glicosídicos, que le permite la degradación de polímeros de paredes de parásitos que son glucanos no propios de la planta (Parrot et al., 2022).

Otro aspecto relevante de esta expresión constitutiva es que, en los casos estudiados, la expresión de PAL es mayor en las variedades resistentes que en las susceptibles (Figura 23). Este resultado se repitió en los cuatro genes analizados. Estudios previos (Londoño, 2023) reportaron que las variedades no elicidadas presentan solo pequeñas variaciones en la producción de mRNA entre las variedades resistentes y susceptibles, lo cual se confirma en los resultados de la Gráfica 10.

La importancia de PAL en la defensa es innegable, como se ha mencionado anteriormente. Al tratarse de una familia de genes con altos niveles de diversidad genética en distintas especies, su papel en la regulación de la respuesta biótica es fundamental. Participa en la vía biosintética de los flavonoides y las ligninas, así como en la activación de especies reactivas de oxígeno (ROS), procesos esenciales en la respuesta de defensa de las plantas (Yin et al., 2024).

Sorprendentemente, este estudio evidenció el problema sobre el comportamiento de las formas specialis (f.sp.) de FOX, ya que internacionalmente se acepta que la f.sp. es una forma adaptada específicamente a un hospedero (McNeill et al., 2012). En este estudio, se introdujo un aislado de FOX f.sp. *Physalis*, aislado de Uchuva, para utilizarlo como grupo externo en los análisis taxonómicos de estudios anteriores. Se esperaba que su comportamiento con el hospedero no fuera más patogénico que los aislamientos obtenidos de clavel. Sin embargo, como se observa en la mayoría de los resultados presentados aquí, este aislamiento produjo valores de expresión más altos en los diferentes genes en comparación con los aislamientos

de clavel (Gráfica 11). Este comportamiento ya se había observado en otros trabajos, donde se utilizó FOX f.sp. lycopersici, que infecta al tomate y también infectó al clavel sin inconvenientes (Debbi et al., 2018; Srinivas et al., 2019).

El gen ADH es crucial en la respuesta a parásitos, ya que es responsable de la lignificación de las paredes del hospedero, uno de los mecanismos más importantes en la resistencia de la planta (Sibout et al., 2005). En la Gráfica 11 se observa que ADH se expresa más en 395 (R) que en SH2 (S), y en ambas variedades, la expresión es significativamente elicitada por el aislamiento Uchuva. En contraste, el aislamiento 2021 provocó una mayor expresión de ADH en la variedad SH2 (S), mientras que en la variedad 395 (R) mostró el menor grado de elicitación en la expresión de este gen. En los diferentes genes analizados, se observó una amplia variación en el comportamiento de los aislamientos en cuanto a la elicitación de la expresión de los genes de resistencia. Recientemente, Wang et al. (2024) han utilizado ADH para realizar transformaciones génicas en plantas de tabaco, debido a su papel fundamental en la conversión de etanol en aldehídos. Además, esta enzima participa en el metabolismo energético durante el estrés biótico, en la regulación del metabolismo lipídico y en el desarrollo de la planta.

En la Gráfica 20A se muestra el efecto acumulado de la expresión génica en cada variedad. Se observa un comportamiento estable en la mayoría de los genes, con variaciones significativas en algunos casos, favoreciendo tanto a la variedad 395 como a SH2. Es importante destacar que ciertos genes clave, como GLU, involucrados en la degradación de las paredes celulares del hongo, la regulación del crecimiento celular, la transmisión de señales hormonales, la defensa contra herbívoros y la producción de compuestos volátiles (Gupta et al., 2013; Dong et al., 2019; Xu et al., 2024), presentan una sobreexpresión en la variedad resistente 395. No obstante, no está claro por qué un gen como ADC, involucrado en la extensión de las paredes en respuesta a parásitos (Fortes et al., 2011), está sobreexpresado en la variedad susceptible sin tener el mismo efecto que en 395. El hecho de que todos los genes relacionados con la respuesta a FOX en clavel se expresen en la variedad susceptible sugiere que esta condición no depende únicamente de la expresión de uno o varios genes, sino más bien de la dosis de expresión y la combinación de los genes involucrados. En otras palabras, no es un problema conmutativo (el orden de los sumandos no altera el

producto), sino que el orden y la importancia de cada gen en la defensa de la planta tienen relevancia.

En la Gráfica 20B se muestra cómo el aislamiento Uchuva elicó de manera más efectiva la expresión de genes de resistencia en la variedad 395, mientras que el aislamiento 2019 fue el que menos estimuló la expresión de estos genes en la misma variedad. En el híbrido SH2, el aislamiento 2021 fue el que más elicó la expresión de los genes de resistencia, mientras que el aislamiento UNAL fue el que menos estimuló la expresión de dichos genes en SH2. Estos resultados subrayan la complejidad de la interacción entre los aislamientos de *Fusarium oxysporum* y las variedades de clavel, sugiriendo que la respuesta de las plantas a diferentes patógenos no solo depende de la presencia de este, sino también de la especificidad del aislamiento y la genética del hospedador.

La variabilidad en la expresión de los genes de resistencia observada en este estudio resalta la necesidad de considerar múltiples factores en el desarrollo de estrategias de manejo y mejora genética. La identificación de patrones de expresión y la comprensión de los mecanismos subyacentes a la resistencia pueden facilitar el diseño de variedades de clavel que no solo sean resistentes a *Fusarium oxysporum*, sino que también mantengan características ornamentales deseables. Esto podría tener implicaciones significativas en la sostenibilidad de la producción agrícola y en la salud de los cultivos, promoviendo un enfoque más integrado en la lucha contra enfermedades fúngicas en plantas ornamentales y agrícolas.

## 5. CONCLUSIONES

- El uso de microplantas de clavel en un modelo in vitro ha permitido un análisis controlado de la interacción entre el hospedador y *Fusarium oxysporum*, eliminando variables externas que podrían influir en los resultados.
- Los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* presentan variaciones significativas en su comportamiento patogénico, lo que sugiere que la virulencia del patógeno está relacionada con su diversidad genética.

- Las variedades de clavel muestran diferentes grados de resistencia, siendo la variedad 395 la más resistente y la 6515 la más susceptible, lo que indica la necesidad de clasificaciones precisas basadas en la capacidad de limitar el crecimiento del patógeno.
- Aunque algunos aislados elicitán una expresión similar de ciertos genes en variedades resistentes y susceptibles, los niveles de expresión son significativamente más altos en la variedad resistente, lo que sugiere que la magnitud de la respuesta es crucial para la resistencia.
- La activación de los genes de resistencia no es lineal, lo que indica la existencia de mecanismos específicos que regulan la respuesta adaptativa de las plantas frente a diferentes aislados de *Fusarium*.

## 6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda llevar a cabo estudios adicionales que analicen los niveles de expresión de diferentes sistemas génicos en diversas variedades de clavel. Esto permitirá identificar combinaciones óptimas de expresión que favorezcan la manifestación del carácter de resistencia frente a *Fusarium oxysporum*.
- Es prioritario profundizar en la investigación del papel y la función de los microARNs (miARNs) y pequeños ARN (sARNs) en la regulación de la expresión génica. Comprender cómo estos reguladores post-transcripcionales influyen en la resistencia o susceptibilidad de las plantas puede proporcionar información valiosa para el desarrollo de variedades más resistentes.
- A partir de los datos obtenidos en este y otros estudios, se sugiere avanzar en la formulación de un modelo funcional que explique los mecanismos de resistencia del clavel a *Fusarium oxysporum*. Este modelo debería integrar la información sobre la expresión génica, la interacción entre genes y la influencia de factores ambientales.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Achari, S. R., Kaur, J., Dinh, Q., & et al. (2020). Phylogenetic relationship between Australian *Fusarium oxysporum* isolates and resolving the species complex using the multispecies coalescent model. *BMC Genomics*, 21, 248. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6640-y>
2. Ali, A., Afrasiab, H., Naz, S., Rauf, M., & Iqbal, J. (2008). An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Pakistan Journal of Botany*, 40(1), 111-121. [https://pakbs.org/pjbot/PDFs/40\(1\)/PJB40\(1\)111.pdf](https://pakbs.org/pjbot/PDFs/40(1)/PJB40(1)111.pdf)
3. Ardila, H. D., Torres, A. M., Martínez, S. T., & Higuera, B. L. (2014). Biochemical and molecular evidence for the role of class III peroxidases in the resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) to *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 85, 42–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.01.003>
4. Baayen, R. P. (2000). Diagnosis and detection of host-specific forms of *Fusarium oxysporum*. *EPPO Bulletin*, 30(3-4), 489-491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2000.tb00935>.
5. Baayen, R. P., & De Maat, A. L. (1987). Passive transport of microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi in carnation after root inoculation. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 93, 3-13. <https://doi.org/10.1007/BF01998130>
6. Benavides Mendoza, A., Ramírez, H., & Villanueva, L. (2019). Selección de genes de referencia para análisis transcripcionales en clavel (*Dianthus caryophyllus*) infectado con *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 75-88. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.78788>
7. Bertazzoni, S., Williams, A. H., Jones, D. A., Syme, R. A., Tan, K. C., & Hane, J. K. (2018). Accessories make the outfit: Accessory chromosomes and other dispensable DNA regions in plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(8), 779–788. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0135-FI>
8. Boller T, y He SY (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*; 324:742-744. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1171647>

9. Borda, F., & Arbeláez, G. (1993). Determinación del antagonismo del aislamiento T 95 de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. cucumerinum en plantas de pepino cohombro. *Agronomía Colombiana*, 10(1), 45-51. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21238>
10. Burbano-Figueroa, Ó. (2020). Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 245-255. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.11.003>
11. Castellanos, O. F. (2010). *Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de flores y follajes en Colombia con énfasis en clavel*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/34390>.
12. Catanzariti, A. M., Lim, G. T. T., & Jones, D. A. (2015). The tomato I-3 gene: a novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. *The New phytologist*, 207(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/nph.13348>
13. Chaves-Gómez, J. L., Chavez-Arias, C. C., Cotes Prado, A. M., Gómez-Caro, S., & Restrepo-Díaz, H. (2020). Physiological response of cape gooseberry seedlings to three biological control agents under fusarium oxysporum f. Sp. Physali Infection. *Plant Disease*, 104(2). <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0466-RE>
14. Chen, A., Sun, J., Matthews, A., Armas-Egas, L., Chen, N., Hamill, S., Minto, S., Tran-Nguyen, L. T. T., Batley, J., & Aitken, E. A. B. (2019). Assessing Variations in Host Resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. Cubense Race 4 in Musa Species, with a Focus on the Subtropical Race 4. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01062>
15. Chen, Y., Li, F., Tian, L., Huang, M., Deng, R., Li, X., Chen, W., Wu, P., Li, M., Jiang, H., & Wu, G. (2017). The phenylalanine ammonia lyase gene LjPAL1 is involved in plant defense responses to pathogens and plays diverse roles in Lotus japonicus-Rhizobium symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(9), 739-753. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-17-0080-R>
16. Coelho, A., Horta Jung, M., Neves, D., & Cravador, A. (2006). Involvement of a cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Quercus suber* in the defence response to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(1-2), 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.01.001>

17. Conrath U. (2006). Systemic acquired resistance. *Plant signaling & behavior*, 1(4), 179–184. <https://doi.org/10.4161/psb.1.4.3221>
18. Cuervo, Diana C., Martinez, Sixta T., Ardila, Harold D., & Higuera, Bianca L. (2009). Inducción diferencial de la enzima peroxidasa y su relación con lignificación en los mecanismos de defensa del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Revista Colombiana de Química*, 38(3), 379-393. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-28042009000300004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042009000300004&lng=en&tlng=es).
19. Curir P, Dolci M, Galeotti F (2005) A phytoalexin-like flavonol involved in the carnation (*Dianthus caryophyllus*)-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* pathosystem. *Journal of Phytopathology* 153:65–67. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00916.x>
20. Debbi, A., Bouregghda, H., Monte, E., & 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00282>
21. Díaz, A.; Smith, A.; Zapata, J.; Mesa, P. (2012). Avances en el manejo y control de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*). En Bogotá: Corpoica (p. 24p). <http://hdl.handle.net/20.500.12324/2348>.
22. Dong, X., Jiang, Y., & Hur, Y. (2019). Genome-Wide Analysis of Glycoside Hydrolase Family 1  $\beta$ -glucosidase Genes in *Brassica rapa* and Their Potential Role in Pollen Development. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1663. <https://doi.org/10.3390/ijms20071663>
23. Dong, Z., & Wang, Z. (2015). Isolation and heterologous expression of a polygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and 4. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4). <https://doi.org/10.3390/ijms16047595>
24. Edel-Hermann, V., & Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109(4), 512-530. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0257-RVW>

25. Enciso-Rodríguez, F. E., González, C., Rodríguez, E. A., López, C. E., Landsman, D., Barrero, L. S., & Mariño-Ramírez, L. (2013). Identification of Immunity Related Genes to Study the *Physalis peruviana* - *Fusarium oxysporum* Pathosystem. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068500>
26. Fernández-Larrea, O. (2001). *Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas*, 62, 96-100. CATIE. <http://hdl.handle.net/11554/6578>
27. Filgueira Duarte, J. J., Rincón-Sandoval, C. M., Quinche, C. Y., Soto, J. C., & Monroy, Í. E. (2022). Basal rot in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) is caused by *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Agronomía Colombiana*, 40(1), 29-40. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v40n1.99009>
28. Filgueira, J. J. (2009). *Estudio y manejo de la pudrición basal producida por hongos del complejo Fusarium en clavel comercial en la Sabana de Bogotá*. Asocolflores, 72, 53-54.
29. Filgueira, J. J. (2011). *Experiencias en mejoramiento del clavel (Dianthus caryophyllus)* (1ª ed.). Universidad Militar Nueva Granada.
30. Filgueira, J., Quinche, C. y Soto, J. (2007). ¿Es el *Fusarium verticillioides* responsable del decaimiento de la variedad Nelson en la Sabana de Bogotá? *Asocolflores*. 69: 51-54.
31. Filgueira-Duarte, J.J., Gómez-Corredor, W.A. & Londoño-Serna, D. The resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* is a multigene-multivariate phenomenon. *Trop. plant pathol.* 49, 489–501 (2024). <https://doi.org/10.1007/s40858-024-00641-9>
32. Fortes, A. M., Costa, J., Santos, F., Seguí-Simarro, J. M., Palme, K., Altabella, T., Tiburcio, A. F., & Pais, M. S. (2011). Arginine Decarboxylase expression, polyamines biosynthesis and reactive oxygen species during organogenic nodule formation in hop. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 258–269. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14503>
33. Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M., & Lanzotti, V. (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their anti-fungal activity. *Phytochemistry Letters*, 1(1). <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2007.10.001>

34. García, D., Arbeláez, M., & Arbeláez, G. (1995). Tratamiento físico y químico del suelo para el control del marchitamiento vascular del clavel causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Agronomía Colombiana*, 12(1), 08-20. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/28033>
35. Ghag, S. B., Shekhawat, U. K. S., & Ganapathi, T. R. (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against Fusarium wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal*, 12(5). <https://doi.org/10.1111/pbi.12158>
36. Gharabli, H., Della Gala, V., & Welner, D. H. (2023). The function of UDP-glycosyltransferases in plants and their possible use in crop protection. *Biotechnology Advances*, 67, 108182. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108182>
37. Gómez-Corredor, W. (2021). Estudio de la variación de la expresión de genes ortólogos en variedades resistentes y susceptibles de *Dianthus caryophyllus* elicidadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi en condiciones in vitro. <http://hdl.handle.net/10654/41286>
38. Gupta, P., Ravi, I., & Sharma, V. (2013). Induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of Eruca sativa plants against the fungal pathogen Alternaria brassicicola. *Journal of Plant Interactions*, 8(2), 155–161. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.679705>
39. Hao, Y., Li, Y., Ping, X., Yang, Q., Mao, Z., Zhao, J., Lu, X., Xie, B., Yang, Y., & Ling, J. (2023). The genome of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli provides insight into the evolution of genomes and effectors of *Fusarium oxysporum* species. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 963. <https://doi.org/10.3390/ijms24020963>
40. Harish, J., Jambhulkar, P. P., Bajpai, R., Arya, M., Babel, P. K., Chaturvedi, S. K., Kumar, A., & Lakshman, D. K. (2023). Morphological characterization, pathogenicity screening, and molecular identification of *Fusarium* spp. isolates causing post-flowering stalk rot in maize. *Frontiers in microbiology*, 14, 1121781. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1121781>

41. Hernández, A. V. (2023-08-01). Variación de la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en relación con la resistencia o susceptibilidad de híbridos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) Recovered from: <http://hdl.handle.net/10654/45962>
42. Hrmova, M., & Fincher, G. B. (2001). Structure-function relationships of  $\beta$ -D-glucan endo- and exohydrolases from higher plants. *Plant Molecular Biology*, 47(1), 73–91. <https://doi.org/10.1023/A:1010619128894>
43. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2022). Impacto de la fusariosis en cultivos de clavel en Colombia. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/28034>
44. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2023). El aroma, color y belleza de los claveles colombianos conquistan el mercado de Costa Rica. <https://www.ica.gov.co/noticias/claveles-colombianos-conquistan-costa-rica>
45. Jabeen, N., Chaudhary, Z., Gulfraz, M., Rashid, H., & Mirza, B. (2015). Expression of Rice Chitinase Gene in Genetically Engineered Tomato Confers Enhanced Resistance to *Fusarium* Wilt and Early Blight. *The plant pathology journal*, 31(3), 252–258. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0026>
46. Jackson, E., Li, J., Weerasinghe, T., & Li, X. (2024). The ubiquitous wilt-inducing pathogen *Fusarium oxysporum*—A review of genes studied with mutant analysis. *Pathogens*, 13, 823. <https://doi.org/10.3390/pathogens13100823>
47. Jin, J. B., Cai, B., & Zhou, J. M. (2017). Salicylic acid. En J. Li, C. Li, & S. M. Smith (Eds.), *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (pp. 273-289). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00008-7>
48. Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L. S. P., & Ito, S. I. (2018). Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 870–882. <https://doi.org/10.1111/mpp.12571>
49. Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
50. Jukanti, A. (2017). Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. In *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5747-2>

51. Kaushal, M., Mahuku, G., & Swennen, R. (2021). Comparative transcriptome and expression profiling of resistant and susceptible banana cultivars during infection by *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22063002>
52. Kfoury, B., Costa Rodrigues, W. F., Kim, J., Brandizzi, F., & Del-Bem, E. (2024). Multiple horizontal gene transfer events have shaped plant glycosyl hydrolase diversity and function. *New Phytologist*, 242(2), 809-824. <https://doi.org/10.1111/nph.19595>
53. Kim, D. S., & Hwang, B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2295–2306. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru109>
54. Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2018). Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. *Agriculture*, 8(7), 88. <https://doi.org/10.3390/agriculture8070088>
55. Leslie, J.F. and Summerell, B.A. (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>.
56. Li, S., Zheng, H., Sui, N., & Zhang, F. (2024). Class III peroxidase: An essential enzyme for enhancing plant physiological and developmental processes by maintaining the ROS level—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 283(Part 3), 137331. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137331>
57. Liu, Z., Xie, J., Wang, H., Zhong, X., Li, H., Yu, J., & Kang, J. (2019). Identification and expression profiling analysis of NBS–LRR genes involved in *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* resistance in cabbage. In *3 Biotech* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1714-8>
58. Londoño Serna, D., & Filgueira, J. J. (2022). Estudio de la variación de la expresión génica en variedades susceptibles y resistentes de *Dianthus caryophyllus* elicidadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en condiciones in vitro [Trabajo de grado, Universidad Militar Nueva Granada]. Repositorio Institucional de la Universidad Militar Nueva Granada.

59. López-Zapata, S. P., & Castaño-Zapata, J. (2019). Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. cubense (E.F. SM.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1240>
60. M. R. Boase, C. S. Winefield, T. A. Lill, & M. J. Bendall. (2004). Transgenic Regal Pelargoniums That Express the rolC Gene from *Agrobacterium rhizogenes* Exhibit a Dwarf Floral and Vegetative Phenotype. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 40(1), 46–50. <http://www.jstor.org/stable/4293692>
61. Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
62. Martínez-González, A. P., Ardila, H. D., Martínez-Peralta, S. T., Melgarejo-Muñoz, L. M., Castillejo-Sánchez, M. A., & Jorrín-Novó, J. V. (2018). What proteomic analysis of the apoplast tells us about plant–pathogen interactions. *Plant Pathology*, 67(7), 1647–1668. <https://doi.org/10.1111/ppa.12893>
63. Mathé, C., Barre, A., Jourda, C., & Dunand, C. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 58–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.007>
64. Mathur, M., Nair, A., & Kadoo, N. (2020). Plant-pathogen interactions: MicroRNA-mediated trans-kingdom gene regulation in fungi and their host plants. *Genomics*, 112(5). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.05.021>
65. McNeill, J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme Van Reine, W. F., Smith, G. F., Wiersema, J. H., & Turland, N. J. (2012). *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011* (Vol. Regnum Vegetabile, 154). A.R.G. Gantner Verlag KG. ISBN 978-3-87429-425-6.
66. Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51, 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>

67. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). Cadena de Flores. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Flores/Documentos/2020-12-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
68. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). El sector floricultor en Colombia: impacto económico y liderazgo mundial en la exportación de flores cortadas y claveles. <https://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v24n2/0122-8706-ccta-24-02-e2920.pdf>
69. Mishra, S., Roychowdhury, R., Ray, S., Hada, A., Kumar, A., Sarker, U., Aftab, T., & Das, R. (2024). Salicylic acid (SA)-mediated plant immunity against biotic stresses: An insight on molecular components and signaling mechanism. *Plant Stress*, 11, 100427. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100427>
70. Mohd-Hafifi, A.B., Mohamed Nor, N.M.I., Zakaria, L. et al. Molecular phylogeny and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* from various hosts in Malaysia. *Scientific Reports*, 14, 29708 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-78195-8>
71. Monroy-Mena, S., Chacón-Parra, A. L., Farfán-Angarita, J. P., Martínez-Peralta, S. T., & Ardila-Barrantes, H. (2019). Selección de genes de referencia para análisis transcripcionales en el modelo clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) - *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Revista Colombiana de Química*, 48(2), 5-14. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.72771>
72. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
73. Noman, A., Aqeel, M., Deng, J., Khalid, N., Sanaullah, T., & Shuilin, H. (2017). Biotechnological Advancements for Improving Floral Attributes in Ornamental Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 530. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00530>
74. Osorio-Guarín, J. A., Enciso-Rodríguez, F. E., González, C., Fernández-Pozo, N., Mueller, L. A., & Barrero, L. S. (2016). Association analysis for disease resistance to *Fusarium oxysporum* in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L). *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2568-7>
75. Pabón-Villalobos, J., Lagos-Burbano, T. C., Mejía-España, D. F., & Duarte-Alvarado, D. (2022). Response of *Physalis peruviana* L. genotypes to *Fusarium oxysporum* f.

- sp. physali under greenhouse conditions. *Revista Ciencia Agraria*, 39(2), 89-107.  
<https://doi.org/10.22267/rcia.223902.185>
76. Pérez Mora, W. H., Castillejo, M. Á., Jorrín Novo, J., Melgarejo, L. M., & Ardila, H. D. (2024). Thiamine-induced resistance in carnation against *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi and mode of action studies based on the proteomics analysis of root tissue. *Scientia Horticulturae*, 323, 112549. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112549>
  77. Pérez-Mora, W., Coy-Barrera, E., Melgarejo, L. M., & Ardila, H. D. (2025). Metabolite profiling-based analysis reveals up-regulated shikimate derivatives in carnation roots associated with the thiamine-induced resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 136, 102535. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102535>
  78. Perrot, T., Pauly, M., & Ramírez, V. (2022). Emerging roles of  $\beta$ -glucanases in plant development and adaptive responses. *Plants*, 11(9), 1119. <https://doi.org/10.3390/plants11091119>
  79. Pizano de Márquez, M. (2000). Clavel *Dianthus caryophyllus*. Bogotá, Hortitecnia Ltda
  80. Rampersad S. N. (2020). Pathogenomics and Management of *Fusarium* Diseases in Plants. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(5), 340. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050340>
  81. Redagícola Colombia. (2020). Las cifras de la industria mundial de las flores. *Redagícola: Especial Flores Colombianas*, 6(1), 6-8. <https://www.redagricola.com/co/assets/uploads/2020/11/racol06.pdf>
  82. Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Meza-Moller, A. del C., & Guzmán-Ortíz, J. M. (2019). Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 16-34. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1808>
  83. Retana, K., Ramírez-Coche, J. A., Castro, O., & Blanco-Meneses, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115-126. <https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32199>

84. Ríos, D. M., & Filgueira, J. J. (2019). Estudio de las características reproductivas de híbridos de clavel (*Dianthus caryophyllus*). *Temas Agrarios*, 24(1), 27-33. <https://doi.org/10.21897/rta.v24i1.1775>
85. Romero-Rincón, A., Martínez, S. T., Higuera, B. L., Coy-Barrera, E., & Ardila, H. D. (2021). Flavonoid biosynthesis in *Dianthus caryophyllus* L. is early regulated during interaction with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytochemistry*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112933>
86. Rose, L. E., Overdijk, E. J. R., & van Damme, M. (2019). Small RNA molecules and their role in plant disease. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 153, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01614-w>
87. Rossi, F. R., Marina, M., & Pieckenstein, F. L. (2015). Role of Arginine decarboxylase (ADC) in *Arabidopsis thaliana* defence against the pathogenic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Biology*, 17(4), 831–839. <https://doi.org/10.1111/plb.12289>
88. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
89. Santos-Rodríguez, J., Coy-Barrera, E., & 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). <https://doi.org/10.3390/plants10071447>
90. Saur, I. M. L., & Hüchelhoven, R. (2021). Recognition and defence of plant-infecting fungal pathogens. In *Journal of Plant Physiology* (Vol. 256). <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153324>
91. Shin-Han Shiu, Anthony B. Bleecker ,Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling.Sci. STKE2001,re22-re22(2001).DOI:10.1126/stke.2001.113.re2
92. Shiu, S.-H., & Bleecker, A. B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: Diversity, function, and signaling. *Science's STKE*, 2001(113), re22-re22. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.113.re22>
93. Sibout, R., Eudes, A., Mouille, G., Pollet, B., Lapierre, C., Jouanin, L., & Séguin, A. (2005). CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary

- genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 17(7), 2059–2076. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.030767>
94. Simbaqueba, J., Rodríguez, E. A., Burbano-David, D., González, C., & Caro-Quintero, A. (2021). Putative Novel Effector Genes Revealed by the Genomic Analysis of the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (Foph) That Infects Cape Gooseberry Plants. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593915>
  95. Singh, B., Saikia, R., Yadav, M., Singh, R., & Arora, V. S. C. (2006). Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing wilt of chickpea. *African Journal of Biotechnology* (ISSN: 1684-5315) Vol 5 Num 6, 5. <https://doi.org/10.5897/AJB05.450>
  96. Singleton, L. L., Mihail, J. D., & Rush, C. M. (Eds.). (1992). Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press.
  97. Solano-Báez, A. R., De Alba, D. L. G., Valdovinos-Ponce, G., Silva-Rojas, H. V., & Soto-Rojas, L. (2011). La pigmentación de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 297-307.
  98. Soto Sedano, J. C., & López Carrascal, C. E. (2012). RNA-seq as a useful transcriptome tool for the study of plant-pathogen interactions. *Fitosanidad*, 16(2), 101-113.
  99. Srinivas, C., Devi, D. N., Murthy, K. N., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B., & Srivastava, R. K. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal de la enfermedad del marchitamiento vascular del tomate: Desde la biología hasta la diversidad—Una revisión. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315-1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.07.004>
  100. Summerell, B.A., Leslie, J.F. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity* 50, 135–144 (2011). <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0132-y>
  101. Taif, S., Zhao, Q., Pu, L., Li, X., Liu, D., & Cui, X. (2020). A  $\beta$ -1,3-glucanase gene from *Panax notoginseng* confers resistance in tobacco to *Fusarium solani*.

- Industrial Crops and Products, 143, 111947.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111947>
102. Tameling, W. I., Elzinga, S. D., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Tekken, F. L., Haring, M. A., & Cornelissen, B. J. (2002). The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *The Plant Cell*, 14(11), 2929-2939. <https://doi.org/10.1105/tpc.005793>
  103. Tanase, K., Nishitani, C., Hirakawa, H., Isobe, S., Tabata, S., Ohmiya, A., & Onozaki, T. (2012). Transcriptome analysis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) based on next-generation sequencing technology. *BMC genomics*, 13, 292. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-292>
  104. Thakur, M., Sharma, D., & Sharma, S. (2002). In vitro selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Plant Cell Reports*, 20(9), 825-828. <https://doi.org/10.1007/s00299-001-0425-5>
  105. Thapa, G., Gunupuru, L. R., Hehir, J. G., Kahla, A., Mullins, E., & Doohan, F. M. (2018). A pathogen-responsive leucine rich receptor like kinase contributes to *Fusarium* resistance in cereals. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00867>
  106. The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2023, November 21). *Carnation*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/plant/carnation>
  107. Thomas, B. (Ed.). (2016). *Encyclopedia of applied plant sciences* (2nd ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-03385-1>
  108. Tyagi, S., Kumar, R., Kumar, V., Won, S. Y., & Shukla, P. (2021). Engineering disease resistant plants through CRISPR-Cas9 technology. In *GM Crops and Food* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1831729>
  109. Vaghela, B., Vashi, R., Rajput, K., & Joshi, R. (2022). Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme and Microbial Technology*, 159, 110055. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110055>
  110. Van Baarlen, P., van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., & Thomma, B. P. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: How do pathogenic

- microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiology Reviews*, 31(3), 239–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x>
111. van der Does, H. C., Constantin, M. E., Houterman, P. M., Takken, F. L. W., Cornelissen, B. J. C., Haring, M. A., van den Burg, H. A., & Rep, M. (2019). *Fusarium oxysporum* colonizes the stem of resistant tomato plants, the extent varying with the R-gene present. *European Journal of Plant Pathology*, 154(1). <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1596-3>
  112. Vásquez, A., Soto, J., & López, C. (2018). Unraveling the molecules hidden in the gray shadows of quantitative disease resistance. *Acta Biológica Colombiana*, 23, 5-16. <https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.66487>
  113. Ventura, I., Brunello, L., Iacopino, S. et al. Arabidopsis phenotyping reveals the importance of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase for aerobic plant growth. *Sci Rep* 10, 16669 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73704-x>
  114. Vlaardingerbroek, I., Beerens, B., Rose, L., Fokkens, L., Cornelissen, B. J., & Rep, M. (2016). Exchange of core chromosomes and horizontal transfer of lineage-specific chromosomes in *Fusarium oxysporum*. *Environmental microbiology*, 18(11), 3702–3713. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13281>
  115. Wang, H., Yao, G., Chen, W., & et al. (2024). A gap-free genome assembly of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, a vascular wilt pathogen. *Scientific Data*, 11, 925. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03763-6>
  116. Wojtasik, W., Kulma, A., Namysł, K., Preisner, M., & Szopa, J. (2015). Polyamine metabolism in flax in response to treatment with pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* strains. *Frontiers in Plant Science*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00291>
  117. Xu, M., Li, H., Luo, H., Liu, J., Li, K., Li, Q., Yang, N., & Xu, D. (2024). Unveiling the role of  $\beta$ -glucosidase genes in *Bletilla striata*'s secondary metabolism: A genome-wide analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 13191. <https://doi.org/10.3390/ijms252313191>
  118. Yagi, M., Kosugi, S., Hirakawa, H., Ohmiya, A., Tanase, K., Harada, T., Kishimoto, K., Nakayama, M., Ichimura, K., Onozaki, T., Yamaguchi, H., Sasaki, N.,

- Miyahara, T., Nishizaki, Y., Ozeki, Y., Nakamura, N., Suzuki, T., Tanaka, Y., Sato, S., ... Tabata, S. (2014). Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *DNA Research*, 21(3). <https://doi.org/10.1093/dnares/dst053>
119. Yan, J., Su, P., Meng, X., & et al. (2023). Phylogeny of the plant receptor-like kinase (RLK) gene family and expression analysis of wheat RLK genes in response to biotic and abiotic stresses. *BMC Genomics*, 24, 224. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09303-7>
120. Yin, T., Xu, R., Zhu, L., & et al. (2024). Comparative analysis of the PAL gene family in nine citrus provides new insights into the stress resistance mechanism of *Citrus species*. *BMC Genomics*, 25, 1020. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10938-3>
121. Zemánková, M., & Lebeda, A. (2001). *Fusarium* species, their taxonomy, variability, and significance in plant pathology: A review. *Plant Protection Science*, 37(1), 25-42. <https://doi.org/10.17221/8364-PPS>
122. Zhang, H., Wang, S., Li, O., [siguiente autor/es], & [último autor]. (2024). Genome-wide identification of alcohol dehydrogenase (ADH) gene family in oilseed rape (*Brassica napus* L.) and BnADH36 functional verification under salt stress. *BMC Plant Biology*, 24, 1013. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05716>
123. Zhang, Q., & Xiao, S. (2015). Lipids in salicylic acid-mediated defense in plants: Focusing on the roles of phosphatidic acid and phosphatidylinositol 4-phosphate. *Frontiers in Plant Science*, 6, 387. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00387>
124. Zhou, A., Ma, H., Liu, E., Jiang, T., Feng, S., Gong, S., & Wang, J. (2017). Transcriptome Sequencing of *Dianthus spiculifolius* and Analysis of the Genes Involved in Responses to Combined Cold and Drought Stress. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 849. <https://doi.org/10.3390/ijms18040849>
125. Zhu, F., Fang, Y., Wang, Z., Wang, P., Yang, K., Xiao, L., & Wang, R. (2022). Salicylic acid remodeling of the rhizosphere microbiome induces watermelon root resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* infection. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1015038>

126. Zuker, A., Tzfira, T., Scovel, G., Ovadis, M., Shklarman, E., Itzhaki, H., & Vainstein, A. (2001). RolC-transgenic carnation with improved horticultural traits: Quantitative and qualitative analyses of greenhouse-grown plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(1), 13-18. <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.1.13>
127. Zuriegat, Q., Zheng, Y., Liu, H., Wang, Z., & Yun, Y. (2021). Current progress on pathogenicity-related transcription factors in *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 22(7), 882–895. <https://doi.org/10.1111/mpp.13068>