

**ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ORTÓLOGOS EN
VARIEDADES RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES DE *Dianthus caryophyllus*
ELICITADAS CON *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* EN CONDICIONES *in vitro***



William Andrés Gómez Corredor

Universidad Militar Nueva Granada

Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas

Biología Aplicada

Bogotá D.C. 2021

**ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ORTÓLOGOS EN
VARIEDADES RESISTENTES Y SUSCEPTIBLE DE *Dianthus caryophyllus*
ELICITADAS CON *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* EN CONDICIONES *in vitro***



AUTOR

William Andrés Gómez Corredor

Trabajo de grado presentado para optar por el título de:

BIÓLOGO APLICADO

Director:

Dr. Juan José Filgueira Duarte M.Sc. PhD.

Universidad Militar Nueva Granada

Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas

Biología Aplicada

Bogotá D.C. 2021

Este trabajo está dedicado a mis abuelos, Alicia y Eliseo.

Los amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi madre Ana Mary Corredor Rodríguez por su apoyo incondicional y el esfuerzo inmenso que ha hecho durante toda su vida por mi bienestar y a mi padre William Gómez Pacheco por darme la oportunidad de estudiar.

A mi director el Dr. Juan José Filgueira Duarte, por su disposición acompañándome en el desarrollo de este proyecto, desde sus conocimientos y experiencia profesional, hasta el apoyo personal, motivándome en el trabajo, haciendo énfasis en el orden y responsabilidad que tuve que tomar en el laboratorio.

A la Universidad Militar Nueva Granada, desde que entre el primer día, hasta el último me hizo sentir como en mi segunda casa. Con los profesores y auxiliares de laboratorio, permitieron aprender sin fin de herramientas, que abrieron mi mente al mundo de la ciencia.

A los docentes en mi proceso de formación, porque de cada uno aprendí un punto de vista nuevo, de las múltiples ramas de la Biología, especialmente al profesor Jaime Mauricio González Medina (Q.E.P.D) que me motivo para seguir adelante desde el momento que lo conocí hasta su partida. Y al Dr. Pedro Jiménez, que, en cada clase, práctica, parcial, sentí un reto a superar.

A la Vicerrectoría de investigaciones, con el apoyo financiero desde el proyecto CIAS 3138 del grupo de investigación Fitopatología Molecular tuve todos los medios y recursos para desarrollar mis actividades de tesis.

Por último, a cada una de las personas que conocí y forme amistades, viviendo experiencias que recordaré durante toda mi vida. En especial a Gabriela Usaquén, que fue fundamental para seguir adelante día a día.

Muchas Gracias

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
1. Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.).....	17
1.1. Importancia económica del clavel	¡Error! Marcador no definido.
1.2. Mejoramiento genético del clavel.....	¡Error! Marcador no definido.
2. <i>Fusarium oxysporum</i>	20
2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> (Fod).....	¡Error! Marcador no definido.
2.2. Problemática causada por <i>Fusarium oxysporum</i> ..	¡Error! Marcador no definido.
2.3. Enfermedad causada por <i>Fusarium oxysporum</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.4. Implicaciones en el cultivo de clavel	¡Error! Marcador no definido.
3. Manejo Enfermedad	26
3.1. Manejo tradicional de la enfermedad	¡Error! Marcador no definido.
3.2. Manejo biotecnológico de la enfermedad.....	¡Error! Marcador no definido.
4. Mecanismos de defensa Planta – Patógeno	28
4.1. Resistencia genética a <i>Fusarium oxysporum</i>	¡Error! Marcador no definido.
4.2. Mecanismos de regulación de la defensa vegetal contra factores de estrés	¡Error! Marcador no definido.
4.3. Algunas rutas de defensa en plantas, asociadas a metabolitos secundarios y dirigidas contra fitopatógenos.....	¡Error! Marcador no definido.
5. Uso de herramientas moleculares	36
CAPÍTULO II. ESCRITO TRABAJO DE GRADO	38
1. RESUMEN - ABSTRACT.....	38
2. INTRODUCCIÓN.....	39
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo general	¡Error! Marcador no definido.
3.2. Objetivos Específicos	¡Error! Marcador no definido.
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42

4.1.	Obtención del Material Biológico.....	¡Error! Marcador no definido.
4.2.	Propagación in vitro de células indiferenciadas (CIS) de variedades Resistentes y Susceptibles.....	¡Error! Marcador no definido.
4.3.	Obtención de Fusarium oxysporum a partir de muestras de plantas infectadas.	¡Error! Marcador no definido.
4.4.	Obtención de cultivos monospóricos de Fusarium oxysporum...	¡Error! Marcador no definido.
4.5.	Ensayo de reinfeksi3n y aislamiento de Fusarium oxysporum f.sp. dianthi (Fod)	¡Error! Marcador no definido.
4.6.	Pruebas de Elicitaci3n	¡Error! Marcador no definido.
4.7.	Extracci3n y cuantificaci3n de ADN de CIS.....	¡Error! Marcador no definido.
4.8.	Extracci3n y cuantificaci3n de ARN total de CIS...	¡Error! Marcador no definido.
4.9.	Amplificaci3n por PCR.....	¡Error! Marcador no definido.
4.10.	RT-qPCR	¡Error! Marcador no definido.
4.10.1.	Genes evaluados.....	¡Error! Marcador no definido.
4.11.	Análisis de resultados de expresi3n	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSI3N.....		51
1.	Obtenci3n material biol3gico.....	51
1.1.	Propagaci3n in vitro de células indiferenciadas (CIS) de variedades resistentes y susceptibles	¡Error! Marcador no definido.
1.2.	Obtenci3n de Fusarium oxysporum a partir de muestras de plantas infectadas.	¡Error! Marcador no definido.
1.3.	Caracterizaci3n morfol3gica	¡Error! Marcador no definido.
1.4.	Obtenci3n de cultivos monospóricos de Fusarium oxysporum...	¡Error! Marcador no definido.
1.5.	Ensayo de reinfeksi3n y aislamiento de Fusarium oxysporum f.sp. dianthi (Fod)	¡Error! Marcador no definido.
1.6.	Ensayo de Elicitaci3n.....	¡Error! Marcador no definido.
2.	Evaluaci3n material genético	58

2.1.	Extracción y Cuantificación de ADN de CIS.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.	Amplificación por PCR de secuencias génicas	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1.	PCR de genes “Housekeeping”	59
2.2.2.	PCR de genes asociados a la resistencia a parásitos.....	61
2.2.3.	PCR de genes asociados con proteínas relacionadas con patogenicidad ..	62
2.3.	Extracción y cuantificación de ARN total de CIS...	¡Error! Marcador no definido.
3.	Análisis de expresión	68
3.1.	Genes “Housekeeping”	68
3.1.1.	Alcohol deshidrogenasa	69
3.1.2.	Arginina descarboxilasa.....	71
3.1.3.	Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa	72
3.1.4.	“Ethylene Insensitive 3-like 2”	74
3.2.	Genes relacionados con la resistencia a parásitos	¡Error! Marcador no definido.
3.2.1.	Antranilato N-hidroxicinamoil / Benzoiltransferasa	77
3.2.2.	Gen receptor de etileno	78
3.2.3.	Flavonol 3-Glucosiltransferasa	79
3.2.4.	Fenilalanina amonio liasa	81
3.2.5.	Antocianidin sintasa.....	83
3.3.	Genes relacionados con proteínas de patogenicidad.....	¡Error! Marcador no definido.
3.3.1.	β -(1 3)-D-Glucanasa.....	86
3.3.2.	Quitinasa	88
3.3.3.	Hidrolasas de glucósido de β -glicosidasa	90
3.3.4.	Aldosa 1-epimerasa.....	91
3.3.5.	“Thaumatococcus Like Protein”	93
3.3.6.	β -amilasa.....	95
3.3.7.	Homólogo a peroxidasas	97

3.3.8.	Catalasa	100
3.3.9.	Malato deshidrogenasa	102
3.3.10.	Vía de señalización mediada por ácido jasmonico.....	104
3.3.11.	Proteína inhibidora de poligalacturonasas	106
3.3.12.	Vía de señalización mediada por ácido salicílico	108
3.3.13.	“Receptor- like Kinase”	111
4.	CONCLUSIONES	114
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	115
6.	ANEXOS.....	142
6.1.	Gráficas análisis de expresión RT-qPCR.....	142
6.1.1.	Gráficas RT-qPCR genes “Housekeeping”	142
6.1.2.	Gráficas de RT-qPCR de Genes relacionados con resistencia a parásitos.....	148
6.1.3.	Genes relacionados con proteínas de patogenicidad.....	154
6.1.4.	Gráficas ecuación lineal genes	165

ÍNDICE DE FIGURAS

•	
Figura 1: Árbol genealógico de variedades de clavel.....	42
•	
Figura 2. Inducción in vitro de células de clavel.....	51
•	
Figura 3. Planta de clavel en condiciones de invernadero	52
•	
Figura 4. <i>Fusarium oxysporum</i> en PDA (Monospórico).	54
•	
Figura 5. <i>Fusarium oxysporum</i> en PDA aislado de ensayo de reinfección	55
•	
Figura 6. Evaluación de resistencia por Cultivo dual.	55
•	
Figura 7. Electroforesis ADN de variedades de clavel.	59
•	
Figura 8. Electroforesis amplificación de genes “Housekeeping”	60
•	
Figura 9. Electroforesis amplificación de genes relacionados con la resistencia a parásitos	62
•	
Figura 10. Electroforesis amplificación de genes relacionados con patogenicidad... ..	64

•	Figura 11. Electroforesis amplificación de genes relacionados con patogenicidad..	 66
•	Figura 12. Electroforesis en gel de ARN variedades de clavel no elicadas (NoE).	 67
•	Figura 13. Electroforesis en gel ARN 4 variedades de clavel elicadas (E)	67
•	Figura 14. Análisis de Expresión génica (M) de “Housekeeping”	69
•	Figura 15. Análisis de Expresión génica (M) de genes relacionados con la resistencia a parásitos.....	76
•	Figura 16. Análisis de Expresión génica (M) genes de proteínas relacionadas con patogenicidad (PRPs).	85
•	Figura 17. Análisis de Expresión génica (M) genes de proteínas relacionadas con patogenicidad (PRPs)	100

ÍNDICE DE TABLAS

•	
Tabla 1. Protocolo PCR utilizando MyTaq™ DNA Polymerase.....	46
•	
Tabla 2. Programa utilizado en amplificación por PCR de ADN.....	47
•	
Tabla 3. Protocolo Kit SYBR® Green Quantitative RT-qPCR	47
•	
Tabla 4. Programa utilizando RT-qPCR.	48
•	
Tabla 5. Oligos de Housekeeping.....	49
•	
Tabla 6. Oligos de genes relacionados con la resistencia a parásitos.	49
•	
Tabla 7. Oligos de genes putativos de proteínas relacionadas con patogenicidad.	49
•	
Tabla 8. Descripción morfológica microscópica y macroscópica de Fod.	52
•	
Tabla 9. Resultado prueba de normalidad Shapiro – Wilk y prueba estadística de Tukey.	57

•	Tabla 10. Cuantificación de la concentración de ADN.	58
•	Tabla 11. Cuantificación de la concentración de ARN de variedades de clavel elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).	67

ÍNDICE DE GRÁFICAS

•	Gráfica 1. Crecimiento de Fod enfrentando células de clavel y control.....	56
•	Gráfica 2. Representación estadística del crecimiento de Fod sin células y con células de variedades.....	57
•	Gráfica 3. Curva de detección por fluorescencia - ciclo de PCR de genes Housekeeping. En el ensayo no elicitado de la variedad FIB2.	142
•	Gráfica 4. Curva de detección por fluorescencia - ciclo de PCR de genes Housekeeping. En el ensayo elicitado de la variedad FIB2.	143
•	Gráfica 5. Curva de detección por fluorescencia - ciclo de PCR de genes Housekeeping. En el ensayo no elicitado de la variedad 6515.	144
•	Gráfica 6. Curva de detección por fluorescencia ciclo de PCR de genes Housekeeping. En el ensayo elicitado de la variedad 6515.	144
•	Gráfica 7. Curva de detección por fluorescencia - ciclo de PCR de genes Housekeeping. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.	145

•	Gráfica 8. Curva de detección por fluorescencia - ciclo de PCR de genes Housekeeping. En el ensayo elicitado de la variedad 395.....	146
•	Gráfica 9 Curva de detección por fluorescencia - ciclo de PCR de genes Housekeeping. En el ensayo no elicitado de la variedad SH2.	147
•	Gráfica 10. Curva de detección por fluorescencia - de ciclo de PCR de genes Housekeeping. En el ensayo elicitado de la variedad SH2.	147
•	Gráfica 11. Curva de detección por fluorescencia - de ciclo de PCR de genes patogenicidad. En el ensayo no elicitado de la variedad F1B2.	148
•	Gráfica 12. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes patogenicidad. En el ensayo elicitado de la variedad F1B2.	148
•	Gráfica 13. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes patogenicidad. En el ensayo no elicitado de la variedad 6515.....	149
•	Gráfica 14. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes patogenicidad. En el ensayo elicitado de la variedad 6515.....	150
•	Gráfica 15. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes patogenicidad. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.....	150
•	Gráfica 16. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes patogenicidad. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.....	151
•	Gráfica 17. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes patogenicidad. En el ensayo no elicitado de la variedad SH2.....	152
•	Gráfica 18. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes patogenicidad. En el ensayo elicitado de la variedad SH2.....	152

•	Gráfica 19. Curva de detección por fluorescencia - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo no elicitado de la variedad F1B2.	154
•	Gráfica 20. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo elicitado de la variedad F1B2.	155
•	Gráfica 21. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo no elicitado de la variedad F1B2.	155
•	Gráfica 22. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo elicitado de la variedad F1B2.	156
•	Gráfica 23. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo no elicitado de la variedad 6515.	157
•	Gráfica 24. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo elicitado de la variedad 6515.	157
•	Gráfica 25. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo no elicitado de la variedad 6515.	158
•	Gráfica 26. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo elicitado de la variedad 6515.	159
•	Gráfica 27. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.	159
•	Gráfica 28. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo elicitado de la variedad 395.	160
•	Gráfica 29. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.	161

•	Gráfica 30. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo elicitado de la variedad 395.	161
•	Gráfica 31. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo no elicitado de la variedad SH2.....	162
•	Gráfica 32. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo elicitado de la variedad SH2.	163
•	Gráfica 33. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR. En el ensayo no elicitado de la variedad SH2.....	163
•	Gráfica 34. Curva de detección por fluorescencia y - de ciclo de PCR de genes PR . En el ensayo elicitado de la variedad SH2.....	164
•	Gráfica 35. Regresión lineal del correspondiente gen alcohol deshidrogenasa. .	165
•	Gráfica 36. Regresión lineal del correspondiente gen arginina descarboxilasa ..	165
•	Gráfica 37. Regresión lineal del correspondiente gen Tetrahidroxichalcona 2- glucosiltransferasa	166
•	Gráfica 38. Regresión lineal del correspondiente gen "Ethylene Insensitive 3-like 2	166
•	Gráfica 39. Regresión lineal del correspondiente gen Antranilato N-hidroxicinamoil / Benzoiltransferasa.....	167
•	Gráfica 40. Regresión del correspondiente gen receptor de etileno	168
•	Gráfica 41. Regresión lineal del correspondiente gen Flavonol 3 - Glucosiltransferasa.....	168

•	Gráfica 42. Regresión lineal del correspondiente gen fenilalanina amonio liasa. 169
•	Gráfica 43. Regresión lineal del correspondiente gen Antocianidin sintasa de las variedades 169
•	Gráfica 44. Regresión lineal a del correspondiente gen β -1,3-Glucanasa 170
•	Gráfica 45. Regresión lineal del correspondiente gen "Chitinase 4-like" de las variedades 170
•	Gráfica 46. Regresión lineal del correspondiente gen Hidrolasas de glucósido de β -glicosidasa 171
•	Gráfica 47. Regresión lineal del correspondiente gen aldosa 1-epimerasa 171
•	Gráfica 48. Regresión lineal del correspondiente gen "Thaumatococcus" .. 172
•	Gráfica 49. Regresión lineal del correspondiente gen β - Amilasa de las variedades resistentes..... 172
•	Gráfica 50. Regresión lineal del correspondiente gen homologo a peroxidasas . 173
•	Gráfica 51. Regresión lineal del correspondiente gen catalasa 173
•	Gráfica 52. Regresión lineal del correspondiente gen malato deshidrogenasa... 174
•	Gráfica 53. Regresión lineal del correspondiente gen "Jasmonic acid signal pathway" 174
•	Gráfica 54. Regresión lineal del correspondiente gen relacionado con "proteína inhibidora de poligalacturonasas" 175

•	Gráfica 55. Regresión lineal del correspondiente gen relacionado con Vía de señalización mediada por ácido salicílico	175
•	Gráfica 56. Regresión lineal del correspondiente gen "Receptor-Like Kinase" ...	176

CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1. Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

El clavel es una planta ornamental perteneciente al género *Dianthus* de la familia Caryophyllaceae. Originaria del mediterráneo, descrita por primera vez en la antigua Grecia por Theophrastus (300 a.C.) quien la nombró con el prefijo Di (dios) y Anthus (flor), la flor de dios (Greenberg, 2013). Carl Linnaeus describió el clavel en 1753, dándole el nombre de *Dianthus caryophyllus* (Linneo, 1753).

Es una planta alógama debido a la protandria definida que exhibe, es decir, el desarrollo de los gametos masculinos se da primero que el de los femeninos y por tal razón la autofecundación no es un proceso natural (Bilbao y Castro, 1996). La flor es descrita como perfecta, por la hipógina y la disposición de las estructuras longistila, la cantidad de óvulos y granos de polen puede ser diferente dependiendo de la variedad estudiada, incluso algunas pueden presentar andro-esterilidad (Ríos y Filgueira, 2019).

Las flores hermafroditas tienen una simetría radial. Las cuatro a seis hojas que rodean el cáliz, en forma de huevo, y escamas puntiagudas, son solo $\frac{1}{4}$ tan largas como el tubo del cáliz (Huxley, 1992). Posee base leñosa, los tallos son a menudo hinchados y frágiles en los nudos, crecen entre 60- 80 cm, las plantas jóvenes que crecen al aire libre pueden tener de uno a cinco tallos, los cuales pueden producir en promedio seis flores en una cima, miden alrededor de 3 a 5 cm de diámetro y tienen un aroma dulce (Lamborn, 1901).

Generalmente, son plantas diploides $2n=30$, pero se han logrado identificar tetraploides $4n=60$ y hexaploides $6n=90$ (Mac George y Hammet, 2002 Citado en Filgueira, 2011). Principalmente, los claveles tetraploides han sido utilizados con un interés comercial, no obstante el cambio del número cromosómico trajo consigo enfermedades genéticas (DHA, 2006).

Existen 3 poblaciones genéticamente diferenciadas que están restringidas por un hábitat específico (ecotipos), el Mediterráneo producido entre 1955 y 1980, que crece en la mayor parte de Italia y algunas zonas de Francia, el ecotipo Sim, derivado de la variedad William Sim y el ecotipo miniatura o spray, desarrollado en Estados Unidos (Bilbao y Castro, 1996; Filgueira, 2011).

1.1. Importancia económica del clavel

El mercado de flores de corte ornamental en Europa Occidental supera los 12 mil millones de dólares en ventas, seguido por Estados Unidos con 6.9 mil millones y Japón con 7.8 mil millones de dólares. En los últimos 5 años Países Bajos han contribuido con casi el 60% de las exportaciones de flores a nivel mundial, seguido por Colombia, Italia e Israel como los principales exportadores (Moran, 2018).

En el 2020 Colombia fue el primer productor y exportador de claveles a nivel mundial (ICA, 2021). La floricultura colombiana cuenta con un área cultivada de 7.200 Ha, de las cuales el 79% se encuentran en la Sabana de Bogotá, el 17% en el departamento de Antioquia y el 4% en otros departamentos del país; siendo el 18% clavel. Genera exportaciones anualmente que ascienden a 1.050 millones de dólares, siendo los principales mercados América del Norte y Europa, además este sector genera más de 200 mil empleos directos e indirectos (Redagricola Colombiana, 2020).

El 74% de las flores importadas por Estados Unidos para San Valentín son originarias de Colombia (se estima que se exportaron cerca de 700 millones de tallos), entre enero y noviembre del 2020, aportando 1.306 millones de dólares representados en 228.326 toneladas de flores. Los principales productores de flores con destino a la exportación se concentran en los departamentos de Cundinamarca con el 66%, Antioquia 32%, el 1% restante está distribuido en pequeñas áreas en Boyacá y Valle del Cauca, eje cafetero y Nariño, que exportan sus productos a Estados Unidos, Reino Unido y Japón (Minagricultura, 2020).

1.2. Mejoramiento genetico del clavel

El mejoramiento genético nació de la necesidad de suplir las demandas de un mercado floricultor creciente, donde el comercio y los consumidores demandan rangos de colores y formas más amplias, fragancias agradables y duraderas, aumentar la vida de florero, disminuir costos de producción, resistencia a plagas, patógenos, almacenamiento, transporte y a cambios en el medio (DHA, 2006; Filgueira 2011).

El clavel ha sido una planta de gran interés por los investigadores, desde Theophrastus y Linneo que, por sus colores llamativos, forma de los pétalos y característico olor a clavo, la describieron y posteriormente la clasificaron (Lamborn, 1901; DHA, 2006). Al ser una planta con características llamativas llevó a Thomas Fairchild un cultivador del año 1717, a crear un híbrido del cruzamiento entre *D. barbatus* y *D. caryophyllus*, el cual es el primer híbrido interespecífico controlado del que se tiene conocimiento; el segundo híbrido conocido “Mr. Brunett”, desarrollado en 1903 donde cruzo la variedad “Lawson” con una variedad antigua “Pride of the Market”, el cual se popularizó en todo el mercado de flores, de esta manera comenzó el desarrollo intenso de nuevas variedades de clavel (Cocking, 1984 citado en Filgueira 2011; Gabally y Gabally, 1997 citados en Filgueira 2011).

Debido al interés comercial, a la fecha se han realizado cruces interespecíficos de variedades de clavel. William Sim en 1938, desarrollo una variedad superior a las conocidas en esa época, una flor roja escarlata que dio origen a las flores de diferentes colores “Sims”, lo que motivo a investigadores italianos, franceses y estadounidenses a trabajar en el desarrollo de nuevas variedades de clavel, gracias a esto surgieron los ecotipos mediterráneos y mineatura “Spray”, clasificando en 3 ecotipos según Knoren (1990) y Gabally y Gabally (1997) citados en Filgueira 2011.

- Sim: Producida por William Sim en Estados Unidos, en 1938, son plantas de flores rojas que dieron mutaciones a rosado, blanco, amarillo, naranja y otras formas variegadas; se caracteriza por tener tallos rígidos y recios, un cáliz cerrado que da una forma circular a la flor posee una amplia variedad de tonos, producción permanente y regular todo el año (Knoren, 1990; Gabally y Gabally, 1997).

- Mediterráneo: Producido por cultivadores en Francia e Italia entre 1955 y 1980, son plantas con tallos rígidos con entrenudos cortos, hojas onduladas, corolas con formas lisas de colores vivos y desarrollo central de pétalos, cáliz

entero y corto. Posee una alta tolerancia a temperaturas bajas y suelos pobres (Knoren, 1990; Gabally y Gabally, 1997).

- Spray: Producida por Thomson en Estados Unidos en 1956, son plantas con varias flores pequeñas en cada tallo, de colores intensos y profundos, que presentan tallos cortos y delgados. (Knoren, 1990; Gabally y Gabally, 1997).

Empresas como Florigene (Australia y Europa) desde 1985 ha dedicado años de investigación en el desarrollo variedades de clavel por medio de la transformación genética mediada por *Agrobacterium* (DHA, 2006). El principal objetivo de las compañías e investigaciones en el mundo, van dirigidos a la producción de nuevos pigmentos, mediante la inserción de genes, que participen en la ruta de las antocianinas (DHA, 2006).

Específicamente estos genes son flavonoide 3'5' hidroxilasa e dihidroflavanol 4-reductasa (DHA, 2006). Zuker y colaboradores (2001) desarrollaron una forma de modificación de color, usando silenciamiento de genes, para bloquear la expresión del gen que codifica para la Flavonona 3- Hidroxilasa, enzima que participa en la ruta biocinética de las antocianinas (DHA, 2006).

Otras investigaciones realizadas para el mejoramiento de las variedades de clavel se han realizado por Zuker y colaboradores (2001) que generó claveles con características agronómicas en las cuales mejoró, el enraizamiento y la producción de este por medio del aumento de tallos florales y esquejes por planta, utilizando la inserción del gen rolC de *Agrobacterium rizogenes*.

Por otro lado, investigadores como Kosugi y colaboradores (2000) e Iwazaki y colaboradores (2004), han generado líneas transgénicas de clavel que tienen alterada la expresión de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) oxidasa o la ACC sintasa, las cuales son enzimas importantes en la síntesis del etileno en la planta, y normalmente se encuentran en la producción masiva del mismo en la planta durante la senescencia.

2. *Fusarium oxysporum*

El patógeno *Fusarium* pertenece al Filum Ascomycota, Subfilum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hipocreomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Nectriaceae, Género *Fusarium*, Especie *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi* (ITIS 2012).

Es un complejo de especies con carácter cosmopolita, habitante natural en el suelo, con especies que presentan actividad patogénica o no y su clasificación taxonómica se da en función de criterios morfológicos fundamentalmente (Filgueira, 2009). Presenta un micelio aéreo, abundante, algodonoso y con una coloración que pueden variar del blanco al rosado, y en algunos casos de púrpura a violeta intenso dependiendo de la edad (Di Pietro *et al.*, 2003).

Su reproducción es predominantemente asexual, con tres tipos de esporas: Las microconidias, estructuras unicelulares de pared delgada y forma redonda o elipsoidal que cumplen una importante función en la diseminación del patógeno en los haces vasculares de la planta; las macroconidias, estructuras de mayor tamaño, con pared delgada y compuestas de tres a seis células, que son un criterio clave para la clasificación taxonómica, y su forma fusiforme que es característica de este género y le da nombre; finalmente, las clamidosporas que son estructuras resistentes a condiciones ambientales adversas y cumplen un papel importante para la supervivencia del hongo en ausencia del hospedero (Leslie y Summerell, 2006).

Es un patógeno facultativo, saprófito, habita, crece y se propaga en el suelo en forma de clamidosporas o micelar, favorecido por la alta humedad del suelo y temperaturas entre 14 – 23 °C, las esporas se diseminan fácilmente por el uso de herramientas contaminadas, el viento, agua o por contacto con plantas enfermas, de esta manera se crea el inóculo primario, que llega a la planta de manera directa o indirecta (Agrios, 1996; Leslie y Summerell, 2006).

2.1. *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod)

El término forma especial (f.sp.) fue acuñado por Snyder y Hansen en 1940; permitiendo organizar las variantes fitopatógenas de *Fusarium oxysporum*. El término describe la capacidad fisiológica particular que exhiben las cepas del hongo para infectar diferentes especies de plantas. Su clasificación taxonómica actual completa es: Organismo celular; Eucariota; Opistoconta; Hongos; Dikarya; Ascomycota; sacaromyceta; Pezizomycotina;

leotiomyceta; sordariomyceta; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hipocreales; hipocreales mitosporicos; Fusarium; Complejo de especies Fusarium oxysporum; Fusarium oxysporum; Fusarium oxysporum f. sp. dianthi (NCBI, Taxonomía ID: 42551) Edel-Hermann y Lecomte, 2019).

2.2 Problemática causada por Fusarium oxysporum.

Fusarium oxysporum se introdujo a Colombia, en los años 60, por material de propagación contaminado, procedente de diversos países, y su incidencia ha aumentado progresivamente, ocasionando pérdidas muy importantes y con un incremento muy significativo de los costos de producción (De Granada *et al.*, 2001).

La alta incidencia de las enfermedades vasculares se debe a su fácil propagación a través de esquejes infectados, a su rápida diseminación en el suelo por las estructuras reproductivas del hongo, la alta persistencia del patógeno en el suelo, deficiente sistema de control de patógenos y la baja eficiencia de las medidas de control utilizadas en campos de producción, además del aumento en costos de producción y pérdidas de material vegetal (Arbeláez, 1987; Villa-Martínez *et al.*, 2014).

Uno de los problemas fitosanitarios de mayor importancia para los floricultores, en especial los cultivadores de clavel en Colombia, es la disminución en áreas cultivadas, debido a la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. Dianthi, siendo el factor limitante más importante en la producción (Cotes *et al.*, 2012).

De las problemáticas más importantes que se ha presentado en los sistemas productivos de flores es la resistencia que han adquirido los patógenos a los fungicidas, obligando al cultivador o floricultor a usar dosis más altas o productos con categoría toxicológica superior, para mitigar el desarrollo del patógeno, de tal forma que aumentan los costos de producción y se genera una problemática ambiental, debido al manejo sin capacitación del uso de agroquímicos (Carmona y Sautua, 2017).

2.3. Enfermedad causada por Fusarium oxysporum

La enfermedad vascular causada por *Fusarium oxysporum* presenta síntomas como: marchitamiento, amarillamiento parcial de hojas y doblamiento de los brotes sobre el lado enfermo de la planta. En los primeros estadios de desarrollo de la enfermedad, se puede

observar en las hojas manchas cloróticas. En algunos casos, dependiendo del estado de desarrollo de la planta, se presenta enanismo de los brotes y disminución en el crecimiento de la planta. Los síntomas afectan la planta en orientación basal – apical, hasta causar un marchitamiento por muerte vascular (Arbeláez, 1987; Baayen y Maat, 1987).

El ciclo de la enfermedad causada por Fod se inicia con la germinación de las clamidosporas en dormancia presentes en el suelo contaminado, estimuladas por los exudados secretados por las raíces de las plantas (Di Pietro *et al.*, 2003). La penetración de las hifas en los tejidos de la planta ocurre a través de heridas o por degradación de las paredes celulares, llegando a atravesar la epidermis, seguido de la corteza y posteriormente la endodermis. En la colonización de la planta, el patógeno llega hasta los tejidos vasculares, donde este se propaga de forma ascendente, ya sea por el crecimiento micelial o por difusión pasiva de microconidias (Baayen, 1988). Una vez dentro de la planta, el hongo se mueve por el tejido vascular por colonización intracelular del xilema y lo invade cuando alcanza la maduración (Baayen y Maat, 1987).

Las plantas que presentan resistencia a FOX tienen la capacidad de regenerar nuevos vasos del xilema, siendo vías alternas de transporte de agua. Por otro lado, en plantas susceptibles, el patógeno coloniza los vasos del tallo y degrada el área invadida, disolviendo las paredes celulares y formando grandes cavidades llenas de aire con residuos de los vasos lignificados, los que interrumpen el flujo del agua a través del tallo ocasionando la muerte de la planta (Baayen *et al.*, 1985).

Se ha descrito también que para *F. oxysporum* las rutas de señalización vía MAPK son necesarias y relacionadas para desarrollar procesos ligados a patogenicidad, teniendo que dentro de estas redes hay factores de transcripción que poseen algún grado de regulación, tanto positiva como negativa, se toma como ejemplo de lo anterior el factor Fmk1, quien es regulado negativamente por el nitrato de amonio (Perez-Nadales *et al.*, 2014).

2.4. Implicaciones en el cultivo de clavel

Entre las actividades económicas más importantes para Colombia, se encuentran presentes todas aquellas relacionadas con la agricultura, ganadería, caza, silvicultura y pesca, las cuales alcanzaron un aumento en el crecimiento del PBI del 2,0% con respecto

al año 2017, teniendo que en el caso de cultivos perenes y transitorios se tiene un incremento en el crecimiento del PBI del 1,6% para el primer trimestre del año 2018 (DANE, 2020).

Para el año 2016, se reportó que el negocio de las flores en Colombia presentó un aumento del ingreso operacional, en los años 2013-2014 el aumento fue del 14,3% mientras que en los años 2015-2016 fue del 30,3%, además se tiene que en el sector hubo un incremento de ganancias netas del 47,3% para el año 2015, aún un 18% de las empresas reportan pérdidas económicas (Martínez, 2018). La estadística mundial de exportación de flores reporta que Colombia es uno de los exportadores más importantes de flores, representa el 17% de las exportaciones totales de flores en el mundo, siendo Holanda es el exportador más importante, teniendo un total del 40% de exportaciones de flores del mundo (Martínez, 2018).

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi*, es uno de los patógenos más importantes en cultivos de clavel (*Dianthus caryophyllus*), ya que es responsable de la enfermedad conocida como marchites o muerte vascular producida tras su colonización en su hospedero (Garibaldi y Gullino, 1987).

En diferentes partes del mundo se presenta una alta variabilidad patogénica por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* causantes de marchitez vascular en cultivos de clavel, clasificadas en razas como estrategia de organización taxonómica por parte de los investigadores. Según esta clasificación, la raza que presenta mayor daño para los cultivos de clavel es la raza 2, que se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial (Arici *et al.*, 2019).

Fod puede atacar plantas de clavel en cualquier estado fenológico, en cualquier época del año, interactuando directamente con las raíces de la planta, ya sea que por heridas o no, posterior a la interacción con la raíz, coloniza el sistema vascular de la planta pasando por el córtex de la raíz. Siendo las clamidosporas las estructuras que le permiten al patógeno sobrevivir largos periodos de tiempo en el suelo, germinando en el momento que el hongo detecta a la planta sembrada, dificulta el control del parasito (Filgueria, 2011).

La propagación de productos agrícolas en sistemas con carencias en la estandarización de condiciones óptimas para el control de Fod en el cultivo de clavel, repercutió en la propagación de este fitopatógeno en suelos colombianos (Soto y Filgueira, 2016). Presentando los hidropónicos como una estrategia para mitigar la propagación de fitopatógenos saprófitos presentes en el suelo, pero no es común encontrar sistemas hidropónicos en Colombia por su alto costo de manutención (Soto y Filgueira, 2016).

Cuando el clavel es infectado por Fod, empieza a tener problemas para la absorción de agua y nutrientes a causa de la colonización del hongo en el sistema vascular de la planta. En la parte externa de la planta esto comienza a evidenciarse mediante clorosis y pudrición, las hojas inferiores se tornan de color pálido y amarillo, los tallos empiezan a marchitarse y tomar tonos grisáceos, los haces del xilema toman coloración parda; la infección se da generalmente desde la zona radicular, que luego tiende a expandirse rápidamente a lo largo de la planta, generando de esta forma la muerte de la planta (Arici *et al.*, 2018).

Una estrategia para el control de la marchitez vascular en clavel es el uso de variedades resistentes al patógeno. Sin embargo, se presentan inconvenientes a la hora de desarrollar nuevos híbridos resistentes, que sean comercialmente aceptables. A pesar de esto, se conocen variedades resistentes, que presentan diferente medida de resistencia mediada por factores genéticos, no todas las variedades resistentes que están en el mercado responden de manera eficiente a diferentes cepas de Fod (Arici *et al.*, 2018).

Aunque actualmente, para la producción de variedades de claveles con características comerciales, se tiene en cuenta que las plantas presenten algún grado de resistencia a fitopatógenos como Fod, se desconocen la totalidad de los mecanismos bioquímicos y moleculares relacionados al patosistema (Ardila *et al.*, 2013). Pero se ha planteado que la resistencia a Fod en clavel, está estrechamente ligada con la capacidad de producción de fitoalexinas (Ardila *et al.*, 2013). En el estudio de Vanegas en 2019, demostró una aproximación bioquímica en el estudio de rutas de señalización del ácido salicílico y ácido jasmonico, involucradas en la resistencia del clavel al patógeno Fod. Así mismo, se evaluaron algunas enzimas asociadas con la activación de dichas rutas; guayacol peroxidasa (GPX), polifenol oxidasa (PFO), lipoxigenasa (LOX), fenilalanina amonio liasa (PAL) y fosfolipasa D (PLD). Se evidenció por primera vez la complejidad de los procesos de señalización en la resistencia al marchitamiento vascular.

Se ha utilizado como mecanismo de control, el uso de fungicidas como pretratamiento en el suelo para evitar la propagación de Fod, siendo el bromuro de metileno un biocida usado en los años 80 (Pérez y Díaz, 2003). Sustancia que se ha prohibido desde la implementación del Protocolo de Montreal a nivel internacional, puesto que resulta tóxica para el clavel al dejar residuos en el sustrato, el cual posteriormente debe ser tratado con grandes cantidades de agua para eliminar el bromuro de metilo, siendo un contaminante ambiental (Yoffe *et al.*, 2013). Esta sustancia se usó en el sur de Italia, presento

inconvenientes como la reinfección del suelo con el fitopatógeno, otros compuestos químicos que presentan el mismo problema son el isocianato de metilo, metham-sodio y dezomet, además del impacto sobre la salud de los floricultores (Pérez y Díaz, 2003). Sin embargo, existen agroquímicos, que han resultados prometedores para el control de Fod en cultivos de clavel, como el 1,3-dicloropropeno y disulfuro de dimetilo (Erazo *et al.*, 2021). Por otra parte, en Europa se ha reportado que, tras el uso de fungicidas relacionados a los benzimidazoles, se han generado nuevas cepas resistentes del género *Fusarium* a estas sustancias (Hawkins y Fraaije, 2015).

La correcta fertilización del suelo ha demostrado que, una elevada concentración de nitrógeno puede ayudar a controlar la dispersión de especies del género *Fusarium* y de otros posibles fitopatógenos, dado que contribuye al aumento del pH en el sustrato en caso de aplicar (NH_4^+) y en suelos ácidos, la aplicación de (NH_4^+) contribuye al aumento de (NH_3) el cual resulta como controlador de hongos en el suelo (Lazarovits *et al.*, 2005)

El uso de biocontroladores se ha utilizado como estrategia para mitigar el daño causado por hongos del género *Fusarium*. Sin embargo, por la plasticidad génica de *Fusarium spp* se han desarrollado cepas que presentan resistencia a biocontroladores. La estrategia que tiene mayor efecto sobre el patógeno, que ha disminuido propagación de cepas resistentes de *F. oxysporum* a los diferentes tratamientos, es el manejo integrado, en el cual se combinan diferentes métodos de control, con el fin de evitar la selección de cepas del hongo resistentes a alguno de los tratamientos (Erazo *et al.*, 2021).

3. Manejo Enfermedad

3.1. Manejo de la enfermedad.

- Control por exclusión: Consiste en no sembrar en suelo donde la enfermedad se haya presentado, sembrar material vegetal libre de la enfermedad, sin embargo, este manejo es ineficiente debido a que el patógeno colonizar las plantas sanas y suelos limpios (García *et al.*, 1995).
- Control físico: Tratamiento con vapor, si la incidencia de la enfermedad es baja es una buena opción y económicamente viable, desinfección de herramientas y personal usando Hipoclorito de sodio y solarización del suelo (García *et al.*, 1995).
- Control químico: En la actualidad no existen productos químicos registrados para el control de la muerte vascular, la mayoría utilizan ingredientes activos en rotación

o en mezcla para controlar la enfermedad cómo: Carbendazim ®, Polietoxi Etanol ®, Carboxin ® y Thiram®. Pero, el uso de estos productos aumenta los costos de producción, daño sobre el medio ambiente y la fauna benéfica (polinizadores) (Fernández- Larrea, 2001).

- Control biológico: El uso de hongos y bacterias frente a fitopatógenos cada vez es más común a nivel mundial, ya que existen microorganismos que disminuyen la actividad de la enfermedad por varios mecanismos; algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, las interacciones con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática). Se debe realizar consensos de antagonistas con diferentes modos de acción para evitar el riesgo a la resistencia (Borda *et al.*, 1993).

3.2. Manejo biotecnológico de la enfermedad

Los programas mejoramiento de clavel, cuyo objetivo principal la obtención de cultivares y variedades con resistencia a patógenos, requiere la aplicación de estrategias eficientes que incrementen la resistencia en las variedades obtenidas, con el fin que sean comerciales y resistentes.

Un estudio realizado por Perchepped y Pitrat (2004) se evaluó la varianza genética, la heredabilidad y se estimó el número de genes involucrados en la resistencia de *F. oxysporum* f.sp. melonis para aportar información sobre la herencia poligénica de la resistencia parcial.

Con respecto a la herencia en clavel, los estudios son pocos, debido a que la relación es bastante compleja, (Sparannaij y Demmink 1977 citado en Filgueira, 2011), determinaron que la resistencia de clavel a Fod era poligénica y aditiva. Arús *et al.*, 1992 citados en Filgueira, 2011), realizaron cruces entre individuos de las variedades Palma y Antares (resistentes) y Manon, Mercury y Ada (susceptibles) y una línea experimental (R10)- Sugiriendo que la resistencia es determinada por varios genes, pero solo es expresada cuando todos estos, al menos, son heterocigotos para el alelo que confiere la resistencia (R) y la susceptibilidad se ve determinada por la ocurrencia de uno o más loci homocigotos recesivos, ninguno de estos estudios tienen en cuenta las variables del ambiente dentro de la respuesta que muestra el clavel con *Fusarium*.

Soto y colaboradores en 2016, realizaron la evaluación floral del androceo y gineceo, estableciendo la capacidad reproductiva útil para la hibridación de 2 variedades comerciales Kaly y Candy y 2 líneas híbridas UM503 y UM226 de clavel en el programa de mejoramiento de la UMNG enfocado a la resistencia a Fod, donde obtuvieron un total de 809 semillas a partir de 9 cruces exitosos.

Se han realizado estudios para entender los fenómenos relevantes de la histopatología y la bioquímica de la respuesta de defensa que presentan los genotipos tolerantes de clavel (Filgueira, 2011; Vanegas, 2019). Una de las primeras barreras defensivas que tiene como objetivo aislar al patógeno en los tejidos vasculares xilemáticos infectados, es la acumulación de geles en los vasos, que contienen principalmente polisacáridos y fenoles, ambos son exudados por las células parenquimáticas adyacentes al punto de infección (Baayen *et al.*, 1985).

Además de la suberización alrededor del punto de infección, tanto en tallo como raíz, se produce un aumento en los compuestos de naturaleza fenólica que son solubles o están parcialmente enlazados a la pared, clasificados como fitoalexinas (Curir *et al.*, 2006; Ardila, 2013).

4. Mecanismos de defensa Planta – Patógeno

Las plantas son organismos sésiles, estas están sujetas al cambio de las condiciones ambientales, incluyendo el ataque de agentes patógenos (Taiz *et al.*, 2015). Se conocen 2 estrategias de respuesta generalizada frente a un patógeno, la respuesta hipersensible en la que la planta necrotiza localmente la zona del tejido infestado, con el objetivo de aislar el patógeno evitando la propagación y otra alternativa consiste en la reacción sistémica en la que la respuesta se produce a lo largo de todos los tejidos de la planta, estén infectados o no (Lamb *et al.*, 1989). En ambos, la estrategia resulta en mecanismos específicos de señalización y transducción de señales entre la planta y el patógeno.

Enzimas hidrolíticas como β -1,3-glucanasa o quitinasa producidas por la planta o el patógeno, actúan como señales inductoras de los mecanismos de defensa (Balasubramanian *et al.*, 2012; Langner y Göhre, 2016).

En el momento que la planta reconoce la presencia del patógeno, se produce una transducción de señales que activa el sistema de defensa (Jabeen *et al.*, 2015). Las

infecciones por hongos y la detección de elicitores fúngicos, origina cambios en el potencial de membrana y transporte de protones, que pueden ser mediados por la actividad de la ATPasa en la membrana plasmática (Tameling *et al.*, 2002).

El ion Ca^{+2} juega un papel importante en la señalización de inductores patogénicos, así como las concentraciones de inositol trifosfato y la acción de enzimas tipo kinasas y desfosforilasas (Dixon y Lamb, 1990). Compuestos como el etileno, ácido abscísico, ácido salicílico o ácido jasmonico, están catalogados como inductores de diferentes genes de defensa de la planta (Dixon y Lamb, 1990; Monroy – Mena *et al.*, 2019).

Las proteínas expresadas en presencia a patógenos y condiciones de estrés, están relacionadas con mecanismos defensivos y adaptativos, mediados por genes que se clasifican en 3 principales grupos (Menéndez *et al.*, 2020).

1. Genes que codifican proteínas de reparación de la pared celular.
2. Genes que codifican proteínas de defensa directa con función antimicrobiana o precursoras de proteínas relacionadas con vías de señalización en la respuesta de defensa, como: Inhibidores de Lectinas o Proteasas, Permeabilizadoras de membranas como, Hidrolasas y Peroxidasas etc.
3. Genes que codifican proteínas de metabolismo secundario, que se expresan en el momento de la elicitación con el patógeno e intervienen en la ruta Fenilpropanoides. Estas proteínas intervienen en la síntesis de Alcaloides, Fitoalexinas, Flavonoides, Lignina y Metabolitos asociados a defensa.

El modelo de Zigzag propuesto por Jones y Dangl en 2006, representa los pasos de la interacción entre planta y patógeno. La capacidad de respuesta depende principalmente en la capacidad de reconocer moléculas propias del patógeno y desconocidas para la planta (Boller y He, 2009; Vázquez *et al.*, 2018).

Se reconoce que el sistema inmune de las plantas está constituido por una unidad innata que trabaja de 2 formas, el reconocimiento de PAMPs (Pathogen -Associated Molecular Pattern), mediante receptores que reconocen los patrones PRRs (Pattern Recognition Receptors) que se encuentran en la superficie de la pared celular, y se denomina PTI (PAMP-Triggered immunity). También existen unos patógenos que inhiben la PTI, los

cuales son reconocidos por receptores adicionales NB-LRR (nucleotide binding leucine-rich repeat), siendo los elicitores los que desencadenan la cascada de señalización de respuesta al patógeno y constituyen la segunda forma de respuesta contra patógenos y se denomina ETI (Effector-Triggered immunity), (Jones y Dangl, 2006).

El mecanismo de acción de respuesta al patógeno comienza cuando los PAMPs son reconocidos por los PRRs, lo que resulta en la activación de la PTI, que pueden detener la colonización del tejido vegetal. Los patógenos que no fueron reconocidos liberan efectores de virulencia, los cuales intervienen con la PTI y resulta en una ETS (Effector-Triggered susceptibility), efectores que son reconocidos por las proteínas NB-LRR, activando la ETI, la cual es la respuesta amplificada y acelerada de PTI, lo que conlleva a la resistencia de la enfermedad o a una respuesta apoptótica del tejido infectado, el patógeno puede evitar la ETI suprimiendo el gen efector, adquiriendo antígenos o efectores adicionales (Meng y Zhang, 2013; Jones *et al.*, 2016).

4.1. Resistencia genética a *Fusarium oxysporum*

A pesar de que el clavel es la flor más importante de la floricultura mundial, el conocimiento de la genética de la especie (secuencias y marcadores moleculares) es muy escaso en la bibliografía, puesto que el interés se había centrado en el seguimiento a los genes de senescencia y aquellos relacionados con los pigmentos en la flor (Yagi *et al.*, 2013). No se han reportado secuencias de genes de resistencia a FOX, sin embargo, sí existen reportes de genes relacionados con la resistencia a este parásito en otras especies vegetales cercanas al clavel, lo que indica que deben estar presentes la secuencias que codifican estos tipos de genes.

Estudios relacionados a la determinación de niveles transcripcionales de enzimas relacionadas con los procesos de defensa contra *F. oxysporum* en plantas se han realizado, demostrando en diferentes modelos que las plantas presentan sobreproducción de enzimas relacionadas a rutas metabólicas que concluyen en la producción de metabolitos secundarios que intervienen en procesos de defensa contra fitopatógenos (Vanegas, 2019).

En *Cicer arietinum* tratadas previamente con bacterias del género *Rhizobium* presentaron un aumento en la producción de enzimas como el complejo PAL (fenilalanina-amino liasa)

y de CHS (Chalcon-sintasa) al ser enfrentadas a *F. oxysporum*, junto con una acumulación de compuestos fenólicos en sus estructuras (Arfaoui *et al.*, 2007).

Durante la interacción de *Citrullus lanatus* con *F. oxysporum*, además de las diferencias histopatológicas en los haces vasculares del xilema de plantas resistentes y susceptibles, se pudo evidenciar que durante el ataque con *F. oxysporum*, en plantas resistentes hubo una mayor expresión del complejo PAL que, en las plantas susceptibles, lo que sugiere que este complejo enzimático puede estar relacionado a procesos de defensa contra *F. oxysporum* (Cheng *et al.*, 2008 citados en Dao *et al* 2011).

En clavel, Ardila y colaboradores (2011), se estudiaron la regulación espacio temporal de la actividad enzimática y los niveles transcripcionales de la PAL, en plantas de clavel inoculadas con Fod, en variedades con diferentes niveles de tolerancia a la enfermedad Kiss (tolerante) – Uconn (susceptible). Se demostró que la variedad tolerante presento inducción de la actividad de PAL en la raíz a las 48 h de inoculación. Esto indico que este órgano de la planta estimula la ruta Fenilpropanoide, responsable de la biosíntesis de metabolitos fenólicos asociados a la resistencia vegetal. En el tallo no hubo aumento en la transcripción de PAL, lo que indica que la regulación de la respuesta de defensa está determinada por el órgano involucrado en la detención de elicitores en la interacción planta-patógeno.

En un sistema planta-patógeno se ven relacionadas diversas interacciones que involucran gran cantidad de señalizadores, genes de expresión constitutiva; o, por el contrario, genes de expresión regulada, elicitores y receptores, entre otros, como diversos factores bióticos y abióticos (Shanmugam, 2005; Li y Smigock, 2016).

Se han formulado hipótesis que proponen que las enzimas relacionadas con el metabolismo del azúcar, además de estar relacionadas con rutas metabólicas de fitohormonas y procesos de respuesta temprana a fitopatógenos como *F. oxysporum* contribuyen mantener el ambiente oxidativo en las células y proporcionan energía para mantener activos los mecanismos de respuesta a patógenos en la planta (Morkunas & Ratajczak, 2014).

En el grupo de factores responsables de la interacción planta-patógeno mencionados anteriormente, encontramos un grupo de proteínas vegetales, ampliamente mencionadas en la literatura científica, que desempeñan un papel importante en el reconocimiento de proteínas fúngicas degradadoras de la pared celular vegetal como lo son las poligalacturonasas, dichas proteínas vegetales son denominadas proteínas inhibidoras de

policagalcturonasa con repeticiones ricas en leucina, PGIP LLR por sus siglas en inglés (Shanmugam, 2005; Li y Smigock, 2018).

Cabe resaltar que el expresoma de una planta al ser atacada por un patógeno va a verse afectado por la interacción que se da entre ambos organismos, al hacer la secuenciación del expresoma de *Lilium regale* (variedad resistente a la infección) después de ser inoculada con *F. oxysporum*, mediante la técnica de hibridación sustractiva, reveló diferencias importantes en la variación de la expresión de genes relacionados a proteínas, entre los cuales se pueden encontrar enzimas relacionadas a la defensa de la invasión contra hongos, tales como quitinasas, catalasas, peroxidasas, entre otras (Rao *et al.*, 2013).

Las LRR se han descrito en diferentes grupos vegetales como proteínas que confieren resistencia contra diferentes fitopatógenos, teniendo claramente el ejemplo de las NBARC-LRR, que confieren resistencia contra *F. oxysporum*, pero que además de cumplir este rol, también desempeñan un papel importante en la muerte celular programada (Du *et al.*, 2012).

Los cambios mencionados anteriormente en el expresoma de plantas con resistencia a la invasión por *F. oxysporum* es comúnmente descrito, ya que, durante la interacción en membrana de las células de las plantas, en el momento en que los elicitores del hongo interactúan con la planta se inicia la transcripción de PAMPs, (triggered immunity) PTIs, ETSS, ETIs (Silva *et al.*, 2018).

4.2. Mecanismos de regulación de la defensa vegetal contra factores de estrés

El complejo HSP90, es un mecanismo de regulación de la expresión en respuesta hipersensible y respuesta inducida, altamente conservado, diseñado para la supervivencia de la planta en diferentes tipos de estrés, que suele ser mediada por fitohormonas y las moléculas relacionadas a la ruta de señalización de estas importantes moléculas, donde participan factores que regulan la expresión como pequeñas moléculas de ARN y factores de transcripción (Kadota y Shirasu, 2013; Kozeko, 2019).

Las proteínas pertenecientes a este conservado e importante grupo, poseen la particularidad de contener en su estructura la presencia de un sitio de unión a nucleótido, donde es común encontrar interacción con ATP, necesario para llevar a cabo procesos metabólicos con gasto energético, como lo puede ser alguna cascada de señalización de respuesta a la interacción con fitopatógenos, entre otros muchos casos de respuesta a

estrés en la planta por parte de su ecosistema o condiciones fisiológicas (Kadota y Shirasu, 2013).

La regulación genética de genes que codifican para proteínas que responden a la invasión de fitopatógenos en la planta se encuentra también ligada a regulación mediante pequeñas moléculas de ARN, se ha demostrado que *slmiR482e-3p* interviene o se relaciona a procesos de síntesis de *FRG3*, la cual es una de las proteínas ricas en repeticiones de leucina que confiere o se relaciona con la resistencia vegetal a *F. oxysporum* (Ji *et al.*, 2018).

LRR-RK MIK2, es un receptor tipo quinasa, encontrado comúnmente en la pared celular de las plantas es uno de los encargados de recibir las señales de daño en las paredes celulares producidos por diversos factores, entre ellos la interacción con *F. oxysporum* (Chakraborty *et al.*, 2019). En el momento en el cual se da el reconocimiento del ataque producido por el hongo en la planta, los niveles de expresión genes que codifican a esta proteína aumentan, teniendo que la cascada de señalización molecular en la que interactúa LRR-RK MIK2 es la ruta del ácido jasmonico y también se relaciona con la producción de lignina, por dando resulta de fundamental importancia en los procesos de defensa contra patógenos, particularmente contra *F. oxysporum*. (Van der Does *et al.*, 2017).

Durante la interacción entre *F. oxysporum* y *Musa paradisiaca*, tras evaluarse el expresoma de la planta, se hace evidente que hay sobre expresión con respecto al control en la producción de proteínas PR, entre las cuales podemos encontrar proteínas y factores de transcripción relacionados con rutas metabólicas que conllevan a la producción de fitohormonas como ácido jasmonico, etileno y a la producción de lignina, dichas proteínas son relacionadas a los grupos CEBiP, BAK1 y proteínas NB-LRR (Bai *et al.*, 2014).

Al evaluar el expresoma obtenido de *Cucumis melo* se observan también cambios sustanciales en los genes transcriptos, lo cual indica que la expresión genética de una planta bajo ataque de *F. oxysporum* cambia en comparación con un estado de ausencia del patógeno (Sestilli *et al.*, 2011; Oumouloud *et al.*, 2013).

Arabidopsis thaliana cuenta también con variedades resistentes y susceptibles de a la infección por *F. oxysporum*, teniendo que al analizar el transcriptoma de ambas variedades durante la interacción con el fitopatógeno se tiene que en la variedad resistente se presenta proteínas transmembranales LLR que contribuyen a la señalización molecular de rutas de defensa como respuesta hipersensible y respuesta sistémica al

ataque por patógenos, estas proteínas son conocidas como FRO1 y RFO2, las cuales interactúan con las proteínas Arv producidas por el hongo durante el ataque (Shen y Diener, 2013).

El análisis genómico de la planta *Vigna unguiculata* revela la presencia de un cluster de genes relacionados a la resistencia a la infección por *F. oxysporum*, los cuales corresponden a secuencias similares a quinasas (Pottorff *et al.*, 2012; Pottorff *et al.*, 2013). En garbanzo se han encontrado los genes foc 0, foc 4 y foc 5, los cuales confieren resistencia a *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Tekelioglu, 2000).

Yagi y colaboradores (2013), realizaron un análisis del genoma del clavel, limitado a una variedad de producción comercial, luego la información genómica es muy limitada. Por otro lado, en clavel se han construido mapas génicos de ligación se han construido para identificar QTLs, en especial el estudio de la resistencia a bacterias (Yagi *et al.*, 2014).

En tomate se describió el gen I-2, responsable de la resistencia a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Ori *et al.*, 1997; Tameling *et al.*, 2002); y el gen Fr-1 y en *Lycopersicon pimpinellifolium* los genes I-2 e I-3 (Grube *et al.*, 2000).

Además, proteínas transmembranales con dominios ricos en leucina, que interactúan como señalizadores durante la interacción con *F. oxysporum*, se han reportado las proteínas I-1, I2 y I3, las cuales ofrecen diferentes grados de protección a la planta portadora de dichos genes contra el mismo patógeno. Aunque dicha proteína se encuentre presente en la planta evaluada, el patógeno es capaz de colonizar el sistema vascular de la planta, pero en forma reducida en comparación con aquellas plantas de tomate que no presentan los genes que codifican para dichas proteínas (Van der Does *et al.*, 2018). Estos genes también han sido encontrados en *Musa paradisiaca*, donde se ha comprobado que también son regulados por ARNm (Wei *et al.*, 2014).

Otros mecanismos de defensa que utilizan las variedades resistentes de *Musa paradisiaca* para la defensa contra la pudrición vascular producida por *F. oxysporum*, es la regulación de genes dependientes de la activación por benzotiadiazol, entre los cuales podemos encontrar un gran número de genes que aumentan su expresión al someter las raíces a concentraciones de este activador de la expresión génica, donde algunos de los genes expresados pueden relacionarse con la defensa vegetal, entre los genes regulados por esta sustancia química podemos encontrar gran número de proteínas tipo quinasa, encargadas de la regulación de rutas metabólicas (LI *et al.*, 2013).

En clavel Monroy – Mena (2020), evaluó el efecto de elicitors de origen biótico en la transcripción de algunos genes involucrados en los mecanismos de defensa de clavel en presencia de Fod. Determinó que la elicitación generó un aumento en los niveles de transcripción de 1551 genes de los cuales, 347 codifican para proteínas relacionadas con funciones de respuesta a estrés. Tales como: β -1-3 endoglucanasas y quitinasas, enzimas involucradas en rutas biosintéticas de metabolitos secundarios, proteínas asociadas con el reconocimiento de PAMPs y MAMPs y factores de transcripción de respuesta al etileno. Y compararon los niveles transcripcionales durante la inoculación con el patógeno, de 4 genes con potencial expresión diferencial. La elicitación aumentó la expresión de la enzima aminociclopropilcarboxilato oxidasa relacionada con la biosíntesis del etileno y de una proteína que actúa como factor de respuesta a esta hormona. La búsqueda de marcadores moleculares para asociar resistencia vegetal hacia fitopatógenos, como *F. oxysporum* tiene gran interés, la búsqueda de SNPs asociados a la presencia de proteínas que promueven la resistencia a la planta contra ataques por plagas, para el caso de *Musa paradisiaca* se han encontrado un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido que pueden asociarse a la resistencia contra *F. oxysporum* en perfiles de expresión genética (Li *et al.*, 2013).

4.3 4.3. Algunas rutas de defensa en plantas, asociadas a metabolitos secundarios y dirigidas contra fitopatógenos

Los Fenilpropanoides derivados del ácido hidroxicinámico han sido descritos principalmente como metabolitos secundarios inducibles en respuesta a la presencia de patógenos en la planta (Sanmartín, 2008; Yogendra *et al.*, 2015).

En *Solanum tuberosum*, se describió que la sobreexpresión del factor de transcripción StWEKY1 en plantas transgénicas incrementa la producción de enzimas relacionadas con la síntesis de HCAAs tales como tiramin hidroxicinamoil transferasa (THT), fenómeno que también ocurría al inducir la infección por *Phytophthora infestans* en plantas resistentes (Yogendra *et al.*, 2015).

La presencia de HCAAs presentan reportes muy detallados en cuanto a su función como metabolitos de defensa que suelen acumularse en las paredes celulares, también los HCAAs presentan relación en diferentes procesos relacionados con el desarrollo vegetal

en cuanto a división celular, reticulación de la pared celular entre otras (Moschou *et al.*, 2012).

En la literatura se reporta que algunas de las alcaloides son sintetizadas con la ayuda de la enzima N-piperoyltransferasa, la cual actúa uniendo piperoyl-CoA a la piperidina, pirrolidina, o a la isobutilamina, lo que contribuye a la formación del grupo amida; se ha descrito que la función particular de las alcaloides en la planta es contribuir en la defensa contra herbívoros y patógenos (Rios y Olivo, 2014).

Los flavonoides en las plantas, dada su capacidad antioxidante desarrollan importantes funciones en las plantas, dado que pueden contrarrestar el efecto de especies reactivas de oxígeno (“ROS”) producidos durante los procesos de respiración celular (Romero – Rincón, 2020). Estas moléculas ofrecen protección extra a la planta contra el estrés oxidativo, el cual es un factor que puede aumentar en las plantas cuando se exponen a radiación excesiva. La glucosilación de los flavonoides ocurre en el citosol, donde la enzima UDP-glicosidasa transfiere el grupo glicósido a los flavonoides sintetizados en diferentes organelos celulares, teniendo que la contribución a la regulación de mecanismos de defensa contra patógenos (Agati *et al.*, 2012).

Las isoflavonas en las plantas se relacionan con la actividad de la enzima isoflavona-sintasa, enzima relacionada por el gen GmIFS2. La inhibición de genes relacionados con la producción de isoflavonas se traduce en la susceptibilidad a patógenos por parte de la planta, lo cual indica que las isoflavonas representan un tipo de resistencia a la infección por diferentes microorganismos (Falcone-Ferreira *et al.*, 2012).

5. Uso de herramientas moleculares

El análisis de transcriptoma es muy importante para interpretar el contenido genético de un organismo, una de las aplicaciones más importante de la tecnología de NGS (Next Generation Sequencing) es la secuenciación de un grupo de mRNA (RNA-seq). RNA-seq proporciona una potente herramienta para construir y caracterizar la transcripción de un organismo, identificando los genes responsables de un fenotipo de interés y realizar la medida de expresión de genes (Garg y Jain, 2013).

Utilizando NGS y análisis a gran escala del transcriptoma (RNA-seq), (Tanase *et al.*, 2012), Yagi y colaboradores (2013) construyeron un mapa de ligamiento usando SSRs derivados del análisis RNA-seq para el caso de la Resistencia a *Burkholderia caryophylli*.

Se evidencia, que el tema de *FOX* no aparece reportado en bibliografía para estudios relacionados con la expresión del clavel durante la interacción con el patógeno.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa de Transcripción inversa (RT-qPCR) es un método desarrollado de la tecnología PCR tradicional, que es específico, sensible y de alto rendimiento para la cuantificación de ácidos nucleicos (Exposito – Rodríguez *et al.*, 2008).

El ARN es la molécula de estudio transcriptoma y expresoma, este se debe retrotranscribir primero a ADN complementario (ADNc) mediante el uso de una transcriptasa inversa del ARN total o mensajero (ARNm). Luego, el ADNc se utiliza como molde para la reacción de la qPCR (Bustin *et al.*, 2005). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en Biología Molecular, Medicina y en otros campos de investigación básica, especialmente en estudios de expresión de genes, identificación de cepas, y la inspección y cuarentena de plagas y enfermedades de origen animal y vegetal (Yuan *et al.*, 2014). Debido a la alta sensibilidad, muchos factores podrían afectar la precisión de la técnica. El muestreo incorrecto, pérdida en la extracción de ARN, cantidad de ARN y la eficiencia en la amplificación por PCR son las posibles causas de errores en el análisis de expresión génica (Svingen *et al.*, 2015).

Utilizando la técnica de RT-qPCR Yu y colaboradores (2021), realizaron una evaluación de la expresión génica de Housekeeping de *Dianthus caryophyllus*, mostrando la estabilidad en de la expresión en diferentes condiciones experimentales, la expresión de los genes varía significativamente dependiendo de la condición en que la planta se encuentre. La expresión de los genes de referencia fueron evaluados bajo tratamiento de hormonas, metales pesados, sal, calor, frío, inundaciones y sequía fueron EF1 α (factor de elongación 1 alfa) / TIF5A (factor de iniciación de la traducción 5A), UBQ10 / 18S (ARN ribosómico 18S), UBQ10 / CYP, TUB (gen de la β -tubulina) / TIP41 (proteína de la familia similar a TIP41), TIF5A / EF1 α , TUB / TIP41 y TIP41 / PP2A (proteína fosfatasa 2A). Siendo este el primer estudio sistemático sobre la estabilidad de Housekeeping de referencia internos en clavel.

Monroy-Mena y colaboradores (2019), seleccionaron y validaron genes de referencia para estudios transcripcionales en el modelo clavel – Fod. Seleccionaron genes asociados a metabolismo basal, utilizados como genes de referencia en otros modelos de interacción planta – patógeno y se determinó el efecto de la inoculación del patógeno sobre la

expresión por elicitación. Diseñaron oligos para determinar si los genes candidatos para verificar la presencia en el genoma de claveles cultivados en Colombia, como su transcripción en diferentes tejidos por medio de RT-PCR. Evaluando los niveles transcripcionales en tallos y raíces de 2 variedades con diferentes niveles de resistencia a la enfermedad, que fueron inoculados con el patógeno. Determinando que los genes codificantes para la histona H3 y el ARN18s no presentan variación en los niveles de expresión, por el efecto de la inoculación, proponiendo estos genes como candidatos de referencia en estudios transcripcionales en el modelo clavel – Fod.

CAPÍTULO II. ESCRITO TRABAJO DE GRADO

Estudio de la variación de la expresión de genes ortólogos de variedades resistentes y susceptibles de *Dianthus caryophyllus* elicidadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi en condiciones *in vitro*.

1. RESUMEN - ABSTRACT

Colombia es el primer productor mundial de clavel y el patógeno, *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi (Fod) causa grandes pérdidas en el cultivo comercial de esta planta. La producción de variedades resistentes al hongo es una de las formas más efectivas para controlar los daños producidos por el parásito. A pesar de que se han realizado trabajos que han descrito el desarrollo de la enfermedad en clavel causadas por Fod, así como estudios sobre los cambios histológicos y bioquímicos en las variedades resistentes y susceptibles, los genes que gobiernan la respuesta de defensa en contra del ataque del patógeno no se han caracterizado aún. Sabemos por trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación, que la resistencia del clavel a Fod esta mediada por tres pares de genes autosómicos con herencia simple y aditiva, pero es necesario reconocer estos genes de tal forma que se pueda utilizar este conocimiento para conducir apropiadamente los programas de mejoramiento del clavel comercial. En el presente trabajo se obtuvo el material biológico, usando células indiferenciadas de clavel y Fod cepa 2019, evaluado los oligos por amplificación por PCR en ADN genómico, posteriormente se evaluaron 22 parejas de oligos identificados en trabajos previos como housekeeping, genes relacionados con resistencia a parásitos y genes que codifican a proteínas relacionadas

con patogenicidad mediante RT-qPCR, relacionados con la respuesta de defensa a Fod en las variedades resistentes UMNG395 y UMNGF1B2 y variedades susceptibles UMNGSH2 y UMNG6515 del programa de mejoramiento del clavel de la UMNG. Demostrando que la expresión unos genes en fenotipos resistentes no está asociado a la resistencia, sino que un conjunto de genes son parte de un metabolismo relacionado con la respuesta de defensa frente al patógeno, que abarca procesos de señalización, regulación, inducción, transcripción de genes.

Palabras clave: Resistencia vegetal, *Dianthus caryophyllus*, Respuesta de defensa, RT-qPCR, Expresión diferencial, Genes ortólogos.

2. INTRODUCCIÓN

En el mercado internacional, el clavel *Dianthus caryophyllus* es una de las flores cortadas más importantes, por su gran variedad de colores, por ser un elemento fundamental en cualquier “bouquet” y por tomar diferentes roles en los arreglos florales (Quirós, 2001).

Colombia es líder mundial en producción de claveles y actualmente participa con el 52% del mercado de la flor que se comercializa en el planeta. El cultivo de claveles en Colombia ocupa el 12% del área cultivable, es decir más de 910 hectáreas, de las cuales cerca del 97% se encuentra en el departamento de Cundinamarca (Redagricola colombiana, 2020).

Según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), las especies sembradas son las rosas con una participación de 37%, clavel con 15%, hortensia representa 14%, crisantemo alcanza 12% y alstroemeria (astromelias) 5% en términos de exportación.

El principal problema para los floricultores es la enfermedad del marchitamiento vascular causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi, ha sido la enfermedad vascular más limitante del cultivo de clavel en Colombia, durante las últimas décadas, a pesar de las medidas de manejo implementadas (Asocolflores, 2018). Para el año 2010 se presentó una disminución en la producción y exportación de claveles pasando del 25% al 15%, se cree que esta reducción se debe a la marchitez vascular, que trajo consigo perdidas de área cultivable y perdida de material vegetal cultivado (Castellanos, 2010).

La producción de variedades de clavel competitivas comercialmente y que presenten resistencia a la marchitez vascular ocasionada por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, en condiciones ambientales de la sabana de Bogotá permitirían reducir los costos de producción que implican las medidas de mitigación y control del patógeno, así como las pérdidas de material vegetal causadas por esta enfermedad.

Siendo el clavel la flor más importante de la floricultura mundial, el conocimiento de la genética de la especie es muy importante, puesto que a nivel molecular se podría dar respuesta a enfermedades causadas por patógenos, sin embargo, en forma de secuencias, y marcadores moleculares es muy escaso en la bibliografía (Yagi *et al.*, 2013). Ya que el interés se ha centrado en el seguimiento a los genes de senescencia y aquellos relacionados con los pigmentos en la flor y muy pocos estudios enfocados a la identificación de genes ligados a la resistencia.

El grupo de investigación Fitopatología Molecular de la UMNG ha venido desarrollando un programa de obtención de nuevas variedades comerciales de clavel y cuenta con variedades y líneas híbridas experimentales susceptibles y resistentes a Fod. Igualmente, se ha trabajado en la identificación de genes de resistencia en clavel mediante el uso de técnicas como SSRs, RFLPs y amplificación de homólogos por PCR, para aportar conocimiento nuevo a nivel molecular del patosistema clavel-Fod.

En este estudio, se quiere generar conocimiento en el área de la genética de la planta, que no existe actualmente, en especial sobre las bases moleculares del mecanismo de respuesta al patógeno, en términos de expresión diferencial de genes candidatos relacionados con respuesta de defensa e identificación de vías de defensa que se activan en las plantas de clavel frente al ataque del hongo. La evaluación de la expresión de los genes implicados en la respuesta de defensa, podrían permitir, en un futuro, el desarrollo de marcadores moleculares de resistencia y estudios de funcionalidad y expresión génica, con la finalidad de obtener variedades comerciales – resistentes, aportando directamente al sector floricultor.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Estudiar la variación en la expresión de genes ortólogos putativos relacionados con la resistencia a *Fusarium oxysporum* en variedades resistentes y susceptibles de *Dianthus caryophyllus*.

3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la respuesta a la interacción de *Fusarium oxysporum* frente a variedades resistentes y susceptibles de *Dianthus caryophyllus* en condiciones *in vitro*.
- Establecer diferencias en la expresión de genes involucrados con la respuesta de variedades resistentes y susceptibles a *Fusarium oxysporum* mediante ensayos de elicitación *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención del Material Biológico.

Se emplearon híbridos de clavel obtenidos por cruce de variedades comerciales (susceptibles) con variedades silvestres (resistentes), (Po) y sus descendientes F1 a F5, obtenidas por autopolinización, dentro del programa de mejoramiento de clavel de la Universidad Militar Nueva Granada, donde los híbridos F1B2 y 395 presentan un carácter de resistencia y los híbridos 6515 y SH2 presentan un carácter de susceptibles. Igualmente, se utilizó una cepa de *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi (2019), evaluada previamente en trabajos anteriores por su virulencia contra el clavel.

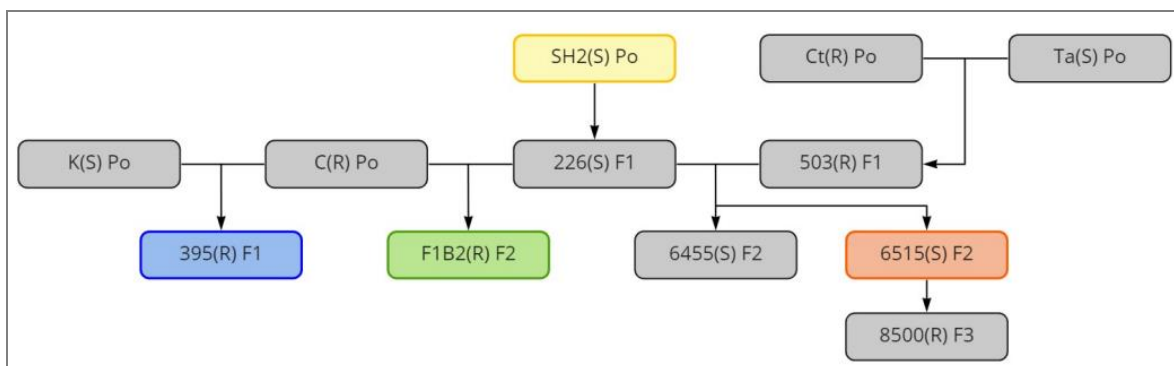


Figura 1: Árbol genealógico de variedades resistentes F1B2 y 395, susceptibles 6515 y SH2 de clavel.

4.2. Propagación *in vitro* de células indiferenciadas (CIS) de variedades Resistentes y Susceptibles

Para la generación *in vitro* de los callos, se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 10µL de hormona 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético 1 ppm), sacarosa (30 g/L), Phytigel™ (3 g/L), pH de 5.8 para la obtención de células indiferenciadas. Se utilizaron hojas cortadas de cada variedad, las cuales fueron colocadas sobre el medio. Las células se mantuvieron en un cuarto aislado a 26 °C, fotoperíodo de 16 horas luz a 6000lx (Soto *et al.*, 2009; Perilla, 2014).

4.3. Obtención de *Fusarium oxysporum* a partir de muestras de plantas infectadas.

Para la obtención del hongo, se recolectó material vegetal (tallos) de clavel con síntomas aparentes causados por *Fusarium oxysporum*. De plantas en el invernadero de Fitopatología Molecular de la Universidad Militar de Nueva Granada en el municipio Cajicá, Cundinamarca.

Las muestras recolectadas fueron llevadas al laboratorio donde se trataron sumergiendo los tallos en Hipoclorito de sodio al 5% (2 minutos), luego 76% de alcohol (1 minuto) y se enjuagaron con agua destilada para desinfectar la corteza de los tallos obtenidos. Luego se realizaron cortes en el tejido por muestra y se colocaron en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 24 °C durante siete días.

Se aisló el hongo nuevamente en PDA tomando un trozo de medio con micelio y se llevó a incubar a 24 °C durante siete días, purificando y asegurando el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Soto *et al.*, 2009; Cappuccino y Welsh, 2017). Se realizó la identificación macroscópica y microscópica del hongo en el microscopio ZEISS® Axioskop 2 Plus, siguiendo el manual ilustrado para la identificación de especie del género (Tousoun *et al.*, 1983).

4.4. Obtención de cultivos monospóricos de *Fusarium oxysporum*

Se tomó un trozo de medio PDA con micelio de cada aislamiento de cada muestra y se pasó a Erlenmeyer individual con 150 mL de medio líquido Czapek y se dejó bajo agitación a 100 r.p.m. a una temperatura de 27 ° C durante tres días. Después de este tiempo, se realiza una dilución 1×10^{-4} , se tomó una alícuota de 100 μ L de esta dilución y se sembró con un rastrillo de vidrio sobre la superficie de la caja de Petri con medio PDA, a 24 ° C durante 24 horas (Duarte *et al.*, 2016).

Se realizó la observación usando un microscopio invertido con contraste de Fases Olympus ® CK40, se localizaron conidios germinados, estos fueron separados en cajas individuales y se dejaron en incubadora a 24 °C durante siete días.

4.5. Ensayo de reinfección y aislamiento de *Fusarium oxysp*

En un frasco con medio de cultivo MS sacarosa (30 g/L), Phytigel™ (3 g/L), pH de 5.8, ubicado en un cuarto aislado a 26 °C y fotoperiodo de 16 horas luz con intensidad lumínica de 6000lx. Se colocaron 4 plantas micropropagadas, permitiendo el crecimiento hasta el desarrollo de raíces. Luego se sembraron 20 μ L de suspensión de esporas en concentración 1×10^{-6} esporas/ml de *Fusarium oxysporum* en medio Czapek, con ayuda de un círculo de papel de 0,7 cm de radio en el centro de las 4 microplantas.

Se le permitió al hongo crecer e invadir las raíces de las microplantas por 7 días. Luego, se tomaron las plantas infectadas, se retiraron las hojas y raíces, se lavaron los tallos completos en hipoclorito de sodio 5% (2 minutos) y etanol 96% (1 minuto) y Agua destilada estéril (2 minutos). El tallo se dividió en 4 partes, se sembró de forma horizontal en PDA sin perder la orientación basal – apical y se dejó en incubadora a 24 °C durante 7

días. Luego se aisló el hongo nuevamente en medio PDA y se obtuvo el cultivo monospórico a partir de este.

4.6. Pruebas de elicitación

El cultivo dual consistió en situar 2g de CIS en uno de los extremos de una caja de Petri, con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), sacarosa 30g/L, pH 5.8, semisólido, Phytigel™ 3 g/L, suplementado con 1 ppm de ácido 2,4- diclorofenoxiacético. Luego de 7 días se inoculó 10 µL de una suspensión de 1×10^6 esporas/mL del hongo sobre un círculo de papel filtro estéril de 0.7 cm de diámetro, el cual se ubica opuesto al callo. El cultivo se mantuvo por 7 días, bajo condiciones de luz permanente y temperatura de 26 °C.

Se tomó registro de la medida de crecimiento del hongo en centímetros (cm) cada 2 días durante 12 días, acompañado de registro fotográfico, que permitió construir la gráfica de crecimiento del hongo, se hicieron 3 repeticiones por variedad más el control del crecimiento del hongo sin células (Soto *et al.*, 2009). Se realizó un Análisis de varianza y una prueba de Tukey para determinar diferencias significativas y subconjuntos entre variedades y control.

4.7. Extracción y cuantificación de ADN de CIS

La extracción de ADN se realizó según la metodología reportada por Soto y colaboradores (2009). Se maceró 2 gr de células indiferenciadas para cada una de las variedades en nitrógeno líquido, mezclando con 8 mL de buffer de extracción precalentado [2% CTAB, 1.4 M de NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 2-mercaptoetanol 0.2%, pH 8.0]. Se incubó a 60 °C durante 30 minutos con agitación. Posteriormente se agregaron 7 mL de cloroformo isoamil-alcohol (24:1, p/V), mezclando por inversión hasta tener una emulsión. Se centrifugó a 6500 r.p.m. a temperatura ambiente durante 10 min, la fase acuosa se recuperó en tubos nuevos y se adicionaron 2/3 del volumen de isopropanol frío y se dejó a 4 °C durante 24 horas.

Se centrifugó a 6500 r.p.m. se eliminó el sobrenadante y se agregó buffer de lavado [etanol 76%, acetato de amonio 10 mM]. Luego de 20 minutos se centrifugó a 6500 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Luego que se secase el pellet, se adicionó 1 mL de TE [Tris-

HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0] se incubó a 37 °C durante 30 min, con Ribonucleasa A de páncreas bovino [10 µg/ml].

Para precipitar el ADN, se adicionaron dos volúmenes acetato de amonio (concentración final 2.5M) y etanol absoluto 2.5 volúmenes. Finalmente se centrifugó a 10000 r.p.m. a 4 °C por 10 min, descartando el sobrenadante y re-suspendiendo el pellet en TE.

Se midió la concentración del ADN genómico utilizando el Kit Qubit™ dsDNA HS. La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel agarosa 1% se corrió utilizando como buffer TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), por 1 hora a 50 V en cámara de electroforesis y fuente de poder BioRad ®. La tinción de ADN se realizó con bromuro de etidio (Sigma) concentración final 0.5 mg/ml y la visualización del gel se realizó en transiluminador UV (Filgueira, 2011).

4.8 Extracción y cuantificación de ARN total de CIS.

Se utilizaron CIS elicadas y no elicadas, resistentes y susceptibles, siguiendo el montaje de ensayo de elicación, para la activación de mecanismos de respuesta en clavel (Filgueira 2011). Previamente se trataron los morteros, pistilos, pinzas con Dietil Pirocarbonato (DEPC). Usando puntas de 10, 200, 1000 filtradas libres de RNAsas.

Las células estuvieron enfrentadas al crecimiento de Fod durante 5 días. La extracción de ARN de CIS elicadas y no elicadas de cada variedad, se realizó siguiendo el protocolo del Kit RNA isolation NucleoSpin® de MACHEREY-NAGEL, cuyo principio de separación de los ARN se hace por filtración en columnas de sílice.

Se cuantificó el RNA empleando el Kit Qubit™ RNA HS Assay Kit High Sensitivity de Thermo Fisher Scientific. Se evaluó calidad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% se corrió utilizando como buffer TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) tratado con DEPC, por 1 hora a 50 V en cámara de electroforesis, La tinción de ARN se realizó con bromuro de etidio (Sigma) concentración final 0.5 mg/ml y la visualización del gel se realizó en transiluminador UV.

4.9. Ampliación por PCR

La amplificación por PCR se llevó a cabo, a partir de ADN genómico, empleando el kit de PCR MyTaq™ DNA Polymerase de Bioline® ajustado a volumen de 20 uL (Tabla 1), en el termociclador Eppendorf ® 035735 Mastercycler Nexus Gradient, siguiendo el protocolo de amplificación (Tabla 1).

Tabla 1. Protocolo PCR utilizando MyTaq™ DNA Polymerase, ajustado volumen oligos y ADN.

Reactivo	Volumen
5x MyTaq Reaction Buffer	4uL
Primer Forware	0,4uL
Primer Reverse	0,4uL
Muestra de ADN	1uL
MyTaq DNA Polymerase	0,4uL
Agua tratada con DEPC	13.8uL
Volumen Final	20uL

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

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalizacion inicial	95°C	1 min
40 ciclos		
Desnaturalizacion	95°C	15 seg
Annealing	*	20 seg
Extension	72°C	20
Final		
Hold	4°C	∞

4.10. RT-qPCR

La RT-qPCR se utilizó el Kit One step SYBR Green® RT-qPCR with MMLV & hot-start Taq DNA Polymerase de Sigma-Aldrich®. Se utilizó la amplificación de secuencias por el método no específico de RT -qPCR en el termociclador Line-Gene 9600 Plus de BIOER Technology® y el análisis de gráficas en el software 9600 plus.

Tabla 3. Protocolo Kit SYBR® Green Quantitative RT-qPCR, ajustado volumen primer y RNA.

Reactivo	Volumen
2xSYBR GreenTaq ReadyMix for Quantitative RT-PCR	10uL
Primer Forware	0,4uL
Primer Reverse	0,4uL
Muestra de RNA	1uL
M-MLV RT	0,1uL
Agua tratada con DEPC	8,1uL
Volumen Final	20uL

Tabla 4. Programa utilizando RT-qPCR en termociclador Line-Gene 9600 Plus termociclador (* Tm annealing primers).

Paso	Temperatura	Tiempo
Retrotranscripcion	43° C	30 mins
Desnaturalizacion inicial	95°C	15 seg
40 ciclos		
Desnaturalizacion	95°C	15 seg
Annealing	*	20 seg
Extension	72°C	20
Final		
Hold	4°C	∞

4.10.1. Genes evaluados

Los genes putativos escogidos para este proyecto fueron identificados en trabajos previos del grupo de investigación Fitopatología Molecular de la Universidad Militar Nueva Granada, utilizando análisis de transcriptoma de las variedades de clavel elicadas y no elicadas con Fod (datos no publicados), relacionando genes que están cumplen un rol en la respuesta al estrés involucrados con la interacción con Fod.

Se diseñaron oligos a partir de las secuencias obtenidas en el transcriptoma y utilizando el programa “Primer designing tool” del NCBI. Se realizó BLAST a las secuencias “Forward”

y “Reverse complement”, para los “Housekeeping” (Tabla 5) y Genes relacionados con la resistencia a patógenos (tabla 6), dando como resultado secuencias génicas anotadas en *Dianthus caryophyllus*, con porcentaje de identidad del 100% y E-value < 0,005.

Con respecto a los oligos de genes putativos de proteínas relacionadas con patogenicidad (Tabla 7), a partir del transcriptoma de clavel, se escogieron secuencias de genes involucrados a mecanismos de defensa contra fitopatógenos reportados ampliamente en literatura, se validó en la base de datos NCBI con las secuencias que correspondían a la expresión de genes putativos, cada una de las secuencias de la base de datos fue confirmada mediante un análisis de dominios en la plataforma NCBI en el software (Conserved Domain Analysis Tool); se seleccionó únicamente una secuencia, tomando como criterio la menor cantidad de gaps presentes en los dominios conservados y se confirmó la presencia en el genoma de clavel construido por (Yagi *et al.*, 2014) en la base de datos Kazusa DNA Research Institute.

Tabla 5. Oligos de Housekeeping.

Housekeeping	Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Expected fragment (pb)
Alcohol deshidrogenasa	CLAbb	AAGGAATGCGCTCACTGCAAAATCC	ATGTCGATTTCAGCGTCCATGCG	852
Arginina Decarboxilasa	CLAdd	AATTCCGCCGTCGTTTGCTTCTTC	TATCGGTCCTGGTTGCACTTCACA	764
Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa	CLAgg	GGGAACCCGATGAAGGCCATAGAG	CCTGTCGAAGGGTGGCCTAGTA	800
"Ethylene Insensitive 3-like 2"	CLAhH	GGATGAGGACTGTA CTGCGATGGG	CTGCAGCTGATCACCGGTTTCC	985

Tabla 6. Oligos de genes relacionados con la resistencia a parásitos.

Genes putativos relacionados a la resistencia a parásitos	Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Expected fragment (pb)
Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa	AMB4	GTGCCCTACTATCCAATGGCGGGTA	AAGGGGTTGCAGGAAAGGTCTCCAA	767
Gen del receptor de etileno	Ers2	TGTTGTCGCAGTTCGGGTCCC	ACGTGTCGCTTGAACCTTTGCATG	1034
Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa	DicGT1	AGACATCGAGCTCTTCATGCTGGCT	ACCGATACACCACTTGGCTTCCACT	922
Fenilalanina amonioliasa	Phe1	CTTGCCCTTCTCTGCGCGGA	ATGGGGACTCAAATTTGGCGGC	165
Antocianidina sintasa	Ant1	GAAAATCGCTCCGTCGAGGGTTGAG	CCATAGCGGCCTTCTTCAGCTCATG	227

Tabla 7. Oligos de genes putativos de proteínas relacionadas con patogenicidad.

Genes putativos de proteínas relacionadas con la patogénesis	Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Expected fragment (pb)
β -1,3-Glucanasa	AtBG pap	GGCTTGTTACTGAAGGCTGGA	GCTACAACACCTGAACTGCC	282
"Chitinasa 4 - like"	ScChil	TCGGTACTGGCAGAAATGTC	GTAACACCGAATTTGGCGCA	455
β -glucosidasa glucósido hidrolasas	GHS	CCGCATTGGCTGATGGATTG	GCGATGGTCCAGGTTTGTA	483
Aldosea1-epimerasa	NbAELP	CCTGCAAGGAGCTGGATCAT	CGTAAACGCAAGTACGACGC	1004
Thaumatococcus protein	TLP	TGCTACAAAATGCCGTGACA	TGGCATCAATCATCGCAACG	276
β Amilasa	BAM	GGCTACTCAAAGAGGCTCAGG	CCAAACAACCGTCCCAAGGAA	449
Homólogo a peroxidasa	AtPrxs	TCGCAGACGTGGGTTTAAACA	CGGCATCAGACTGGAAGAGG	291
Catalasa	CAT	ACCGACACATGATTGGGTCC	CTCAGCTTCAAGAACAGGGT	617
Malato deshidrogenasa	GhmMDH	TCACAACCCGACTTACCGTC	ACCTGTTTGACAGGCACTCC	879
Vía de señalización mediada por ácido jasmónico	AtPEP	AGAGCGACAGTGCTCGTAAT	AAGTCAACAGCTGCAGGAGA	100
Proteína inhibidora de la poligalacturonasa	PGIP	AAAACCGGTCTCACTTGCT	TGCTGGCAAAAGAGTCAGCC	313
Vía de señalización mediada por ácido salicílico	SA	ATCGAATTTGCAGGACGGGT	TCCCCTCGTAGGTCGTGATT	836
"Receptor-Like Kinase"	RLK	TGGACCCAGATGGAGGAGTT	ATCTCCTACTCATAACGCGGC	240

4.11. Análisis de resultados de expresión

En la observación de las curvas de fluorescencia de RT-qPCR, se utilizó el Software 9600Plus propio del termociclador LineGene 9600 Plus Fluorescent Quantitative Detection System de BioER ®, se seleccionaron exportaron los datos crudos (Quantitative Raw Data, Quantitative Result y Quantitation Amplification Results) en formato .XLSX y procesados en el Software Excel de Microsoft ®.

Los datos "Quantitative Raw Data", fueron ordenados según la posición en la bandeja porta muestras y el correspondiente resultado de fluorescencia en cada ciclo. Para cada una de las muestras procesadas, se realizó la gráfica de fluorescencia – número de ciclo.

A partir de la curva de fluorescencia construida, se obtuvo la línea de tendencia y la ecuación lineal ($Y=mx+b$). Se graficó la línea de tendencia para comparar el comportamiento de la recta de un gen en las 4 variedades elicitadas y no elicitadas.

Se tomó la pendiente de la recta (m) como una medida diferencial de la expresión, al ser la tangente del ángulo que forma la recta con dirección positiva del eje de las abscisas, que relaciona entre el cambio vertical y horizontal de una recta, siendo la razón de cambio de la ecuación

Las gráficas de comportamiento de la recta y la comparación entre pendientes se organizaron con respecto a los oligos en las tablas 5, 6 y 7. Se presentó la comparación entre variedades resistentes, susceptibles, elicidadas y no elicidadas por cada gen para el análisis de expresión.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención material biológico

1.1. Propagación in vitro de células indiferenciadas (CIS) de variedades resistentes y susceptible

La propagación de células indiferenciadas a partir de hojas de clavel, utilizando la auxina sintética (2,4-D), que favorece la dediferenciación celular de los tejidos y alta tasa de división celular (Tirado y Perea, 2011).

El proceso de dediferenciación celular tardo aproximadamente 4 semanas en la formación de los primeros callos. Estos fueron llevados a medio fresco, donde se les permitió crecer durante 4 semanas. Se realizaba cambio de medio cada 4 semanas, para garantizar los nutrientes y condiciones necesarias para el correcto desarrollo de callos. En la propagación se mantuvo la asepsia, evitando la contaminación con microorganismos ambientales.

De esta forma se mantuvieron células indiferenciadas, creciendo en una masa amorfa de color amarillo verdoso, evitando la oxidación de los tejidos por compuesto fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidada (PPO) inductor de la producción de quinonas,

las cuales son especies químicas muy reactivas, que pueden llegar a generar daño e incluso muerte celular (Azofeifa, 2009) y siendo causa de pérdida de material vegetal *in vitro* más habitual.

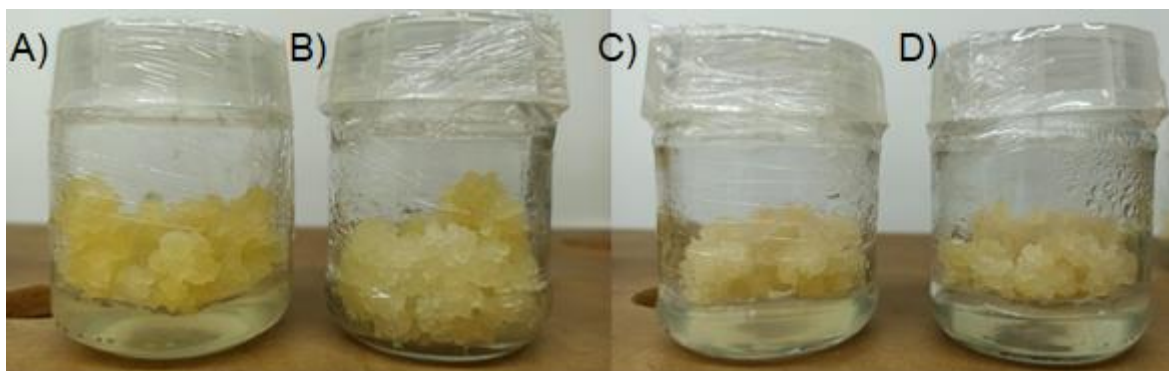


Figura 2. Inducción *in vitro* de células de clavel correspondientes a las variedades F1B2(A), 6515 (B), 395(C) y SH2 (D) en frascos de vidrio con medio MS modificado con 2,4-D para cultivo de tejido vegetal.

1.2 Obtención de *Fusarium oxysporum* a partir de muestras de plantas infectadas

A partir de plantas con síntomas de muerte vascular, en la figura 3 se observa plantas las cuales en condiciones de invernadero presentaron retraso en el crecimiento y clorosis en hojas. El patrón de clorosis fue uniforme en toda la hoja y por el avance de la infección los tallos se marchitaron y los haces vasculares se decoloraron.



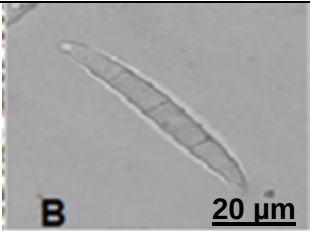
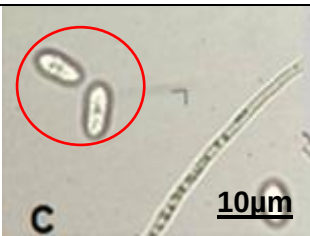
Figura 3. Planta de clavel en condiciones de invernadero con síntomas de muerte vascular.

1.3. Caracterización morfológica

Se presentan las estructuras morfológicas descritas para la identificación de *Fusarium oxysporum*. Como se puede observar en la tabla 8, las estructuras corresponden al tamaño y forma descrita según Leslie y Summerell (2006).

Tabla 8. Descripción morfológica microscópica y macroscópica de Fod.

FIGURA	DESCRIPCIÓN
--------	-------------

 A <u>10µm</u>	Las clamidosporas (A), se originan por la modificación de un segmento de hifas, poseen una pared gruesa y lisa. Cumplen una función de resistencia ambiental que garantiza la propagación y supervivencia del hongo. Observación en 100x
 B <u>20 µm</u>	Las Macroconidias (B), son características del género <i>Fusarium</i> en forma de canoa, hialinas y divididas en 4 septos. Observación en 100x
 C <u>10µm</u>	Las microconidias (C) Son pequeñas, generalmente unicelulares y con forma ovoide con base redondeada. Observación en 100x
 D <u>20 µm</u>	Las Esporodoquia (D) es una masa de conidióforos cortos y estrechamente ramificados que nacen de hifas. Observación en 40x
 F	La estructura Macroscópica (F) en medio PDA, una colonia lisa y algodonosa, de color blanco – salmón pálido, teñida de púrpura en la zona central claramente demostrado en el revés de la caja, este resultado a partir de 20 días de incubación.

1.4. Obtención de cultivos monospóricos de *Fusarium oxysporum*

A partir del crecimiento de la dilución $10e^{-4}$ de esporas sembradas en medio PDA, utilizando el microscopio invertido se permitió seleccionar una única espora germinada, que se llevó a caja de Petri con medio PDA como se observa en la figura 4. Luego de 3 semanas de crecimiento del cultivo monospórico se evidencia desarrollo concéntrico del micelio algodonoso de color salmón pálido, pigmentado en el centro de la caja, confirmando exitosamente la pureza del aislamiento de *Fusarium oxysporum*.



Figura 4. *Fusarium oxysporum* en PDA aislado a partir de una sola espora (Monospórico).

1.5. Ensayo de reinfeksi3n y aislamiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod)

Como se observa en la figura 5, se sembraron 4 cortes del tallo de la variedad SH2 infectada con Fod, que fueron tratados para eliminar posibles microorganismos epifitos, asegurando la pureza del cultivo en medio PDA. Se evidencia que el hongo sale por los extremos del segmento donde se cort3 el tallo, nuevamente la observaci3n macrosc3pica corresponde a las caracter3sticas descritas para *Fusarium oxysporum*, al realizarse el ensayo en microplantas se manifest3 la enfermedad con s3ntomas de p3rdida de turgencia, clorosis asim3trica del tallo y hojas, se consider3 correspondiente a lo descrito como Fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* (Arbel3ez, 1993; Filgueira, 2007).



Figura 5. *Fusarium oxysporum* en PDA aislado a partir de ensayo de reinfección en variedad susceptible SH2.

1.6 Ensayo de Elicitación

El ensayo de elicitación por cultivo dual presentado en la figura 6, permitió validar el comportamiento del modelo CIS – Fod.

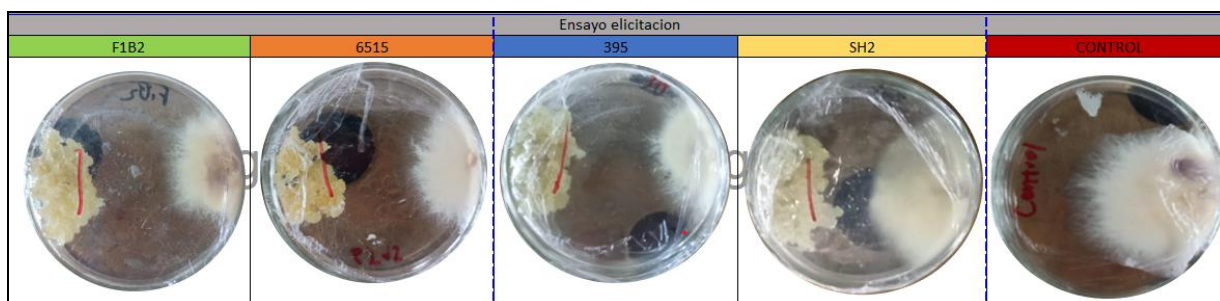
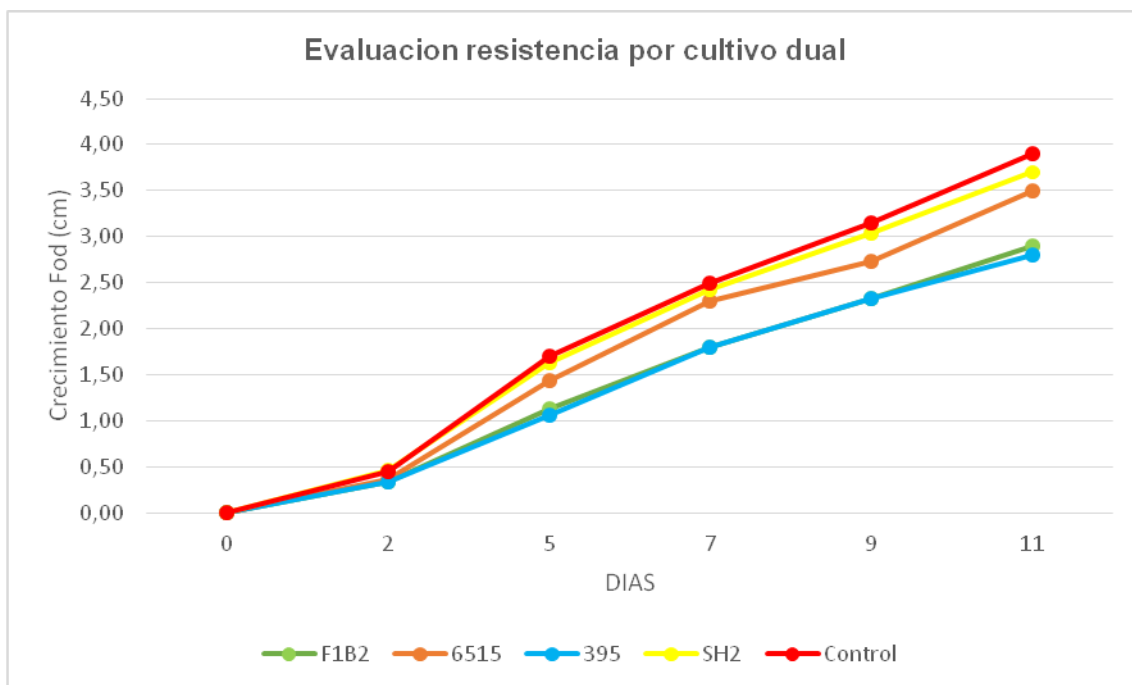


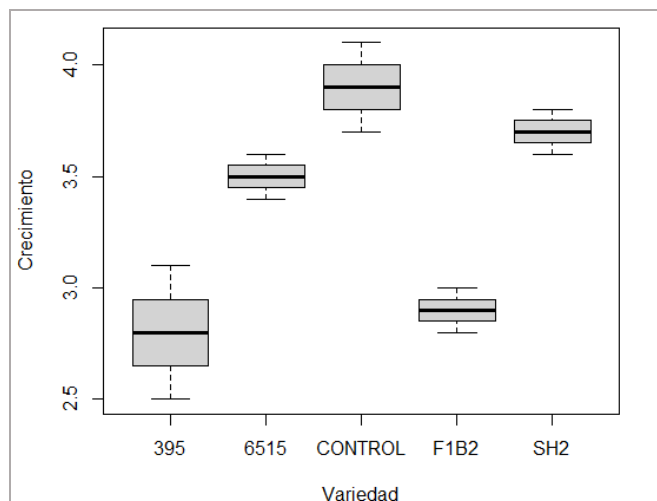
Figura 6. Evaluación de resistencia por Cultivo dual de células indiferenciadas en las variedades resistentes F1B2 (verde) – 395 (Azul) y susceptibles 6515 (naranja) – SH2 (amarillo) de clavel enfrentado a *Fusarium oxysporum* y control de crecimiento del hongo sin células de clavel (rojo) durante 11 días.

Como se observa en la gráfica 1 el desarrollo de Fod a partir del día 5 las células de las variedades F1B2 y 395 inhiben el crecimiento, por el contrario, las variedades 6515 y SH2 no inhiben el crecimiento del patógeno, comparado con el control de crecimiento del hongo sin células. En el día 11 en la gráfica 2, permite evidenciar la diferencia significativa entre medias de variedades y control, en las variedades 6515 y SH2 tienen

una diferencia promedio con el control de 0,2 – 0,4 cm, mientras que las variedades F1B2 y 395 no permitieron el avance del hongo más allá de los 3 cm, diferencia de 1,0 – 1,1 cm comparada con el control sin células.



Gráfica 1. Crecimiento de Fod (eje Y) durante 11 días (eje X) enfrentado células resistentes F1B2 (verde) – 395 (Azul) y susceptibles 6515 (naranja) – SH2 (amarillo) y control sin células (rojo).



Gráfica 2. Simetria de la distribución de datos correspondientes a 3 repeticiones del crecimiento de Fod sin células y con células de variedades resistentes y susceptibles de clavel.

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad del conjunto de datos de crecimiento del halo fúngico, enfrentado las células de las variedades de clavel y el crecimiento de Fod sin células de clavel (control). Dando como resultado un valor de $p > 0.05$ que no rechaza la hipótesis nula, confirmando que los datos tienen una distribución normal del crecimiento del hongo, utilizando el análisis de varianza (ANOVA) dando un valor de $(Pr(>F) < 0,05)$, explica estadísticamente que existen diferencias significativas en el crecimiento de Fod en presencia variedades CIS y el control.

Tabla 9. Resultado prueba de normalidad Shapiro – Wilk y prueba estadística de Tukey.

Shapiro-Wilk normality test		
P- Value		0,4881
ANOVA		
Pr(>F)		5.71E-05
Prueba de Tukey		
Variedad	Crecimiento final	Grupo
F1B2	2.9	B
6515	3.5	A
395	2.8	B
SH2	3.7	A
Control	3.9	A

La prueba estadística de Tukey presentada en la tabla 9, permitió validar si la diferencia de inhibición entre las variedades y el control es significativa. La variedad F1B2 tuvo diferencias significativas $< 0,05$ con el control ($p= 0,0003$), la variedad 6515 ($p= 0,012$), SH2 ($p= 0,002$) y no significativa con 395 ($p= 0,955$). La variedad 395, fue significativa la diferencia con el control ($p=0,0001$), la variedad 6515 ($p= 0,005$) y SH2 ($p= 0,0007$). La variedad 6515 no tuvo diferencias significativas con el control ($p= 0,116$) y la variedad SH2 ($p= 0,658$) y la variedad SH2 no tuvo diferencia significativa con el control ($p= 0,658$). Se formó el grupo (A) de las variedades susceptibles y (B) variedades resistentes.

2. Evaluación material genético

2.1. Extracción y cuantificación de ADN de CIS.

La calidad del ADN se puede observar en la figura 7, en la electroforesis en gel de agarosa al 1%, la migración de la molécula de ADN en una banda gruesa y uniforme. No presenta degradación, ya que aparece como una única banda intacta, sin presencia de “smearing” en ninguno de los pozos.

En la tabla 10 se observa el rendimiento de extracción de 130 a 190 ng/mL, siendo F1B2 la variedad con menor concentración. La variación en la concentración del extracto se asume como la pérdida de material vegetal en el momento de la maceración. Sin embargo, esta variación no afecta el uso del ADN para la PCR

Tabla 10. Cuantificación de la concentración de ADN genómico de variedades de clavel por Kit Qubit™ dsDNA HS.

Variedad	Concentración ADNg (ng/mL)
F1B2	138,0
6515	172,7
395	165,9
SH2	188

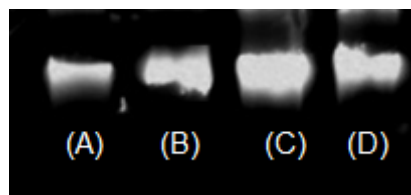


Figura 7. Electroforesis en Agarosa 1% de ADN de variedades de clavel F1B2 (A); 6515 (B); 395 (C); SH2 (D).

2.2. Amplificación por PCR de secuencias génicas

Fueron utilizadas 22 parejas de primers mediante PCR en las variedades F1B2 y 395 resistentes y 6515 y SH2 susceptibles.

2.2.1. PCR de genes “Housekeeping”

La amplificación por PCR de los genes “Housekeeping” observada en la figura 9, no coinciden los pesos moleculares esperados a partir de los oligos diseñados, esto se debe a que, la amplificación por PCR se realizó en ADN genómico y el valor esperado de la amplificación, que es dado en todos los casos por ADN complementario (ADNc). Se explica, con la presencia de intrones en la secuencia génica, estas regiones no codificantes, que en el proceso de transcripción son eliminados por splicing al sintetizar la molécula de ARNm, por ende, el peso molecular es diferente (Alberts *et al.*, 2002).

La pareja de oligos Clabb en la figura 8 carril 1 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 852 pb, reporta en el gel una banda clara y uniforme de peso molecular superior a las 1500 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con un alcohol deshidrogenasa (#AY263389) anotada por Owen y colaboradores (2004), con % de identidad del 100%, E-value = 0,005, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 1522 pb.

La pareja de oligos Cladd en la figura 8, en el carril 2 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 764 pb, reporta en el gel una banda clara y uniforme de peso molecular superior a las 1700 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con Arginina descarboxilasa (#U63832) anotada por Lee y Park en 1998, con % de

identidad del 100%, E-value = 0,005, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 2500 pb.

La pareja de oligos Clagg en la figura 8, en el carril 3 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 800 pb, reporta en el gel una banda clara y uniforme de peso molecular superior a las 1600 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa (#AB191247) anotada por Togami y colaboradores (2011), con % de identidad del 100%, E-value = 0,005, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 1594 pb.

La pareja de oligos Clahh en la figura 8, en el carril 4 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 985 pb, reporta en el gel una banda clara y uniforme de peso molecular superior a las 1000 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con “Ethylene Insensitive 3-like 2” (#AB191247) anotada por Lordachescu y Verlinden (2005), con % de identidad del 100%, E-value = 0,005, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 2758 pb.

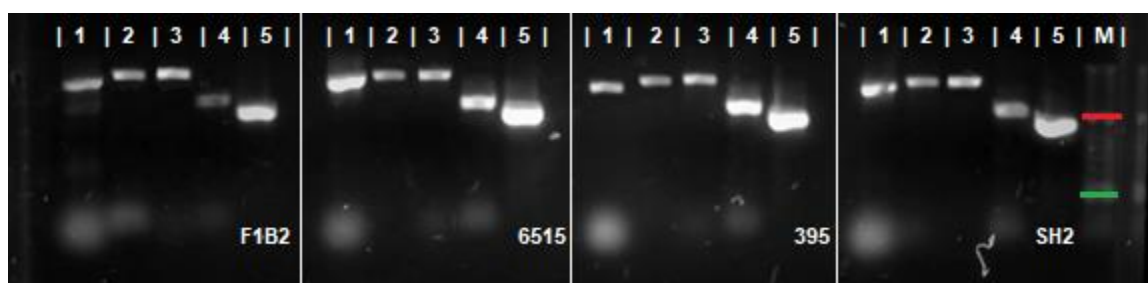


Figura 8. Electroforesis de ADN en agarosa al 1% confirmatoria por la amplificación de genes “Housekeeping”. El carril 1 de cada variedad corresponde la amplificación de Clabb: Alcohol deshidrogenase; El carril 2 en cada variedad corresponde a la amplificación de Cladd: Arginina descarboxilasa; El carril 3 en cada variedad corresponde a la amplificación de Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; El carril 4 en cada variedad corresponde a la amplificación Clahh: “Ethylene Insensitive 3-like 2”: En el carril 5 en cada variedad se utilizó como control de amplificación de PCR la pareja de oligos RPS; M: Marcador de peso molecular “Hyperlader II®”, 1000 pb (Rojo) y 300 pb (verde).

2.2.2 PCR de genes asociados a la resistencia a parásitos

Se amplificaron por PCR los genes asociados con la resistencia a parásitos figura 9 observando la electroforesis, esta coincide con los pesos moleculares a partir de los primeros diseñados.

La pareja de oligos ANB4 en la figura 9, en el carril 1 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 767 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular superior a las entre 700 y 800 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con Antranilato N-hidroxicinamoil / Benzoiltransferasa (#Z84571) anotada por Yang y colaboradores (1997), con % de identidad del 100%, E-value = 0,002, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 1735 pb.

La pareja de oligos Ers2 en la figura 9, en el carril 2 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 1034 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular superior a las 2000 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con gen receptor de etileno (#AF034770.1) anotada por Shibuya (1998), con % de identidad del 100%, E-value = 0,21, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 2353 pb.

La pareja de oligos DicGT en la figura 9, en el carril 3 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 922 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular superior a las 1400 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con una Glucosiltransferasa (#AB294392) anotada por Ogata (2004), con % de identidad del 100%, E-value = 0,002, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 1492 pb.

La pareja de oligos Phe1 en la figura 9, en el carril 4 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 165 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular entre 100 – 200 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con una Fenilalanina amonio liasa (#LC377188.1) anotada por Morimoto y colaboradores (2018), con % de identidad del 100%, E-value = 0,8, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 2281 pb.

La pareja de oligos Ant1 en la figura 9, en el carril 5 en las variedades F1B2, 6515, 395 y SH2, con peso del producto de PCR esperado de 227pb, reporta en el gel una banda de peso molecular entre 200 – 300 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la

base de datos NCBI, relacionando la secuencia de los oligos con Antocianidina sintasa (# U82432.1) anotada por Mato y colaboradores (2001), con % de identidad del 100%, E-value = 0,002, peso molecular de la secuencia de ADN genómico de 1333 pb.

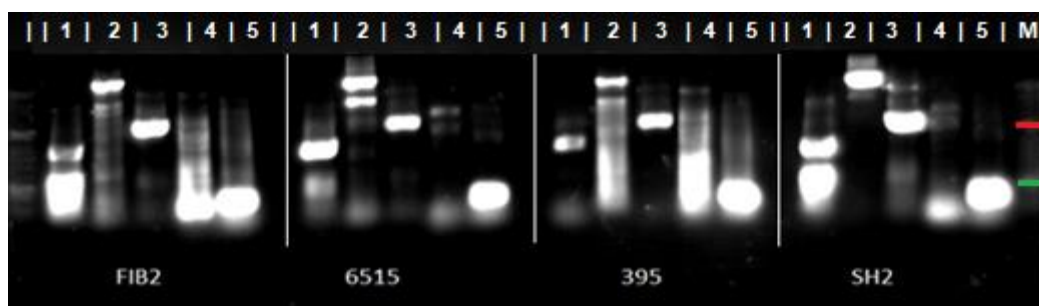


Figura 9. Electroforesis ADN en agarosa al 1% confirmatoria por amplificación de genes relacionados con la resistencia a parásitos. El carril 1 de cada variedad corresponde la amplificación de ANB4: Antranilato N-hidroxicinamoil / Benzoiltransferasa; el carril 2 de cada variedad corresponde a la amplificación Ers2: Gen receptor del etileno; el carril 3 en cada variedad corresponde a la amplificación de DicGT: Flavonol 3-O-Glucosyl Transferasa; el carril 4 en cada variedad corresponde a la amplificación de Phe1: Fenilalanina amonio liasa; en el carril 5 en cada variedad corresponde a la amplificación de Ant1: Antocianidina sintasa. y M: Marcador de peso molecular “Hyperlader II®”, 1000 pb (Rojo) y 300 pb (verde).

2.2.3. PCR de genes asociados con proteínas relacionadas con patogenicidad

Se amplificaron por PCR los genes asociados con proteínas relacionadas con patogenicidad en la figura 10 y 11, de los primeros diseños en trabajos previos del grupo de investigación.

La pareja de oligos AtBG-pap en la figura 10, en el carril 1 en las variedades F1B2 y 6515 con peso del producto de PCR esperado de 282 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular por debajo de 300 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo β -1,3-Glucanasa en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold3518) con % de identidad del 100%, E-value = 0,0006, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos ScChil en la figura 10, en el carril 2 en las variedades F1B2 y 6515 con peso del producto de PCR esperado de 455 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular entre 400 – 600 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos, reporta en la base de datos NCBI (# XM_004309786.2) “Chitinase 4 – like” con % de identidad del 75,66%, E-value de 2e-12 una secuencia con la secuencia de los oligos y un peso molecular de 969 pb. Además, en la base de datos Kazusa (scaffold322) con % identidad del 100%, E-value = 0.002, se reporta la secuencia de los oligos presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos GHs en la figura 10, en el carril 3 en las variedades F1B2 y 6515 con peso del producto de PCR esperado de 483 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular por debajo de 1000 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo hidrolasas de glucósido de β -glicosidasa en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold22) con % de identidad del 100%, E-value = 0,002, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos NbAELP en la figura 10, en el carril 4 en las variedades F1B2 y 6515 con peso del producto de PCR esperado de 483 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular por debajo de 1034 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos, reporta en la base de datos NCBI (#XM_021915156.1) Aldosa 1-epimerasa con % de identidad del 100%, E-value 0,078 una secuencia con la secuencia de los oligos y un peso molecular de 969 pb. Además, en la base de datos Kazusa (scaffold1002) con % identidad del 100%, E-value = 0.002, se reporta la secuencia de los oligos presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos TLP en la figura 10, en el carril 5 en las variedades F1B2 y 6515 con peso del producto de PCR esperado de 276 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular por debajo de 700 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo de “thaumatin like protein” en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold3) con % de identidad del 100%, E-value = 0,002, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos BAM en la figura 10, en el carril 6 en las variedades F1B2 y 6515 con peso del producto de PCR esperado de 449 pb, reporta en el gel una banda de peso

molecular por debajo de 500 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo de β Amilasa en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold1606) con % de identidad del 100%, E-value = 0,002, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos AtPrxs en la figura 10, en el carril 7 en las variedades F1B2 y 6515 con peso del producto de PCR esperado de 291 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular por debajo de 500 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo de Homólogo a peroxidasas en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold1905) con % de identidad del 100%, E-value = 0,002, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

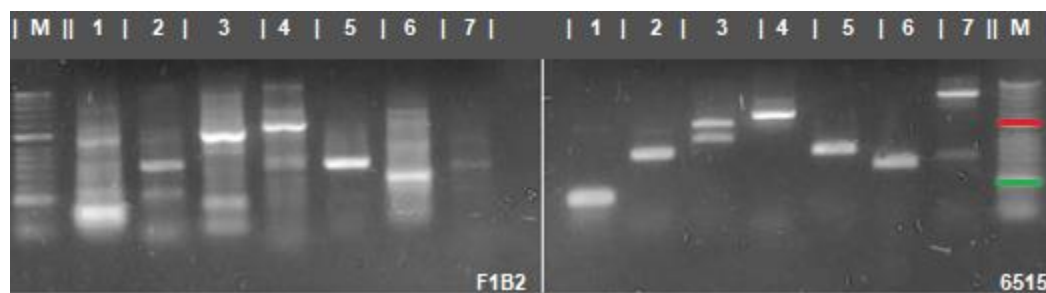


Figura 10. Electroforesis ADN en agarosa al 1% confirmatoria por amplificación de genes relacionados con patogenicidad. El carril 1 de cada variedad corresponde a la amplificación de AtBG-pap: β -1,3-Glucanasa; en el carril 2 de cada variedad corresponde a la amplificación de ScChil: “Chitinase 4-like glycosyl hydrolases”; en el carril 3 de cada variedad correspondiente a la amplificación de GHs: β -glicosidasa; en el carril 4 de cada variedad la amplificación de NbAELP: Aldose 1-epimerasa; en el carril 5 de cada variedad corresponde a amplificación TLP: “Thaumatococcus like Protein”; en el carril 6 de cada variedad corresponde a amplificación BAM: β Amylase; en el carril 7 de cada variedad corresponde a amplificación AtPrxs: Homologo de peroxidasas y M: Marcador de peso molecular “Hyperlader II®”, 1000 pb (Rojo) y 300 pb (verde).

La pareja de oligos CAT en la figura 11, en el carril 1 en las variedades 395 y SH2 con peso del producto de PCR esperado de 617 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular por debajo de 700 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos, reporta

en la base de datos NCBI (#XM_021898771.1) Catalasa – like con % de identidad del 78,74%, E-value 0,02 una secuencia con la secuencia de los oligos y un peso molecular de 2099 pb. Además, en la base de datos Kazusa (scaffold6) con % identidad del 100%, E-value = 0.002, se reporta la secuencia de los oligos presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos GhmMDH en la figura 11, en el carril 2 en las variedades 395 y SH2 con peso del producto de PCR esperado de 879 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular por debajo de 1000 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo de Malato deshidrogenasa en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold521) con 100% de identidad del 100%, E-value = 0,029, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos AtPEP en la figura 11, en el carril 3 en las variedades 395 y SH2 con peso del producto de PCR esperado de 100 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular de 100 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo de “Jasmonic acid signal pathway” en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold100) con % de identidad del 100%, E-value = 0,002, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos PGIP en la figura 11, en el carril 4 en las variedades 395 y SH2 con peso del producto de PCR esperado de 313 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular cercano a 300 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo de Proteína inhibidora de poligalacturonasas en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold3196) % de identidad del 100%, E-value = 0,002, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos SA en la figura 11, en el carril 5 en las variedades 395 y SH2 con peso del producto de PCR esperado de 836 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular menor a 900 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo de Vía de señalización mediada por ácido salicílico, relacionados con el factor de transcripción WRKY en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold45337) % de

identidad del 100%, E-value = 0,002, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

La pareja de oligos RLK en la figura 11, en el carril 6 en las variedades 395 y SH2 con peso del producto de PCR esperado de 240 pb, reporta en el gel una banda de peso molecular menor a 300 pb. Se realizó BLAST sobre la secuencia de oligos en la base de datos NCBI, no se relacionó con la secuencia de los oligos con gen putativo “Receptor-Like Kinase” en clavel. Por otro lado, en la base de datos Kazusa (scaffold1515) % de identidad del 100%, E-value = 0,002, se reporta que la secuencia de los oligos está presente en el genoma del clavel.

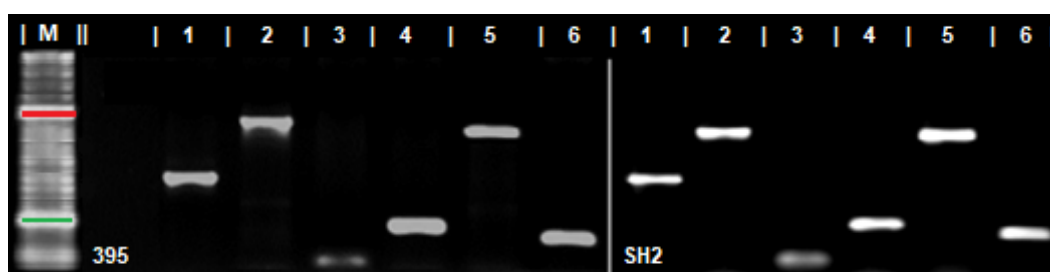


Figura 11. Electroforesis ADN en agarosa al 1% confirmatoria por amplificación de genes relacionados con patogenicidad. El carril 1 de cada variedad corresponde a la amplificación de CAT: Catalase; El carril 2 de cada variedad corresponde a la amplificación de GhmMDH: Malate dehydrogenase; El carril 3 de cada variedad corresponde a la amplificación de AtPEP: Jasmonic acid signal pathway; El carril 4 de cada variedad corresponde a la amplificación de PGIP: Polygalacturonase inhibiting Protein; El carril 5 de cada variedad corresponde a la amplificación de SA: Salicylic acid mediated signaling pathway; El carril 6 de cada variedad corresponde a la amplificación de RLK: Receptor-Like Kinase Y M: Marcador de peso molecular “Hyperlader II®”, 1000 pb (Rojo) y 300 pb (verde). Variedades 395 y SH2.

2.3. Extracción y cuantificación de ARN total de CIS

El ARN extraído y purificado a partir de células indiferenciadas, se observó en electroforesis en gel de agarosa al 1% en la figura 12, se pueden evidencia 2 bandas uniformes e intactas en cada uno de los pozos de cada variedad, correspondientes a los rRNA de las subunidades mayor (28S) y menor (18S) en la extracción del material no

elicitadas con Fod, característico de un ARN óptimo y purificado (Michel-López *et al.*, 2018).



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con 1 μ L de ARN sembrado en los pozos de las 4 variedades de clavel no elicitadas (NoE) clavel F1B2 (A); 6515 (B); 395 (C); SH2 (D).

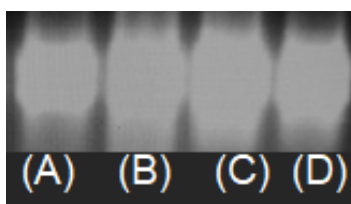


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con 1 μ L de ARN sembrado en los pozos de las 4 variedades de clavel elicitadas (E) clavel F1B2 (A); 6515 (B); 395 (C); SH2 (D).

Tabla 11. Cuantificación de la concentración de 1 μ L ARN de variedades de clavel elicitadas (E) y no elicitadas (NoE) utilizando el Kit Qubit™ RNA HS.

Variedad	Concentración ARN (ng/mL)
F2B2 (E)	291
F1B2 (NoE)	80
6515 (E)	366
6515 (NoE)	60
395 (E)	367
395 (NoE)	90
SH2 (E)	590
SH2 (NoE)	190

En el caso del material elicitado (E), se observa en la electroforesis en la figura 14 no se puede observar las 2 bandas uniformes presentes en el material no elicitado, esto indica cualitativamente, que la concentración del ARN es mayor en las variedades elicitadas que en las que no están elicitadas. Cuantitativamente en la tabla 10, a concentración de la

muestra de ARN para cada una de las muestras es en las variedades elicidadas considerablemente mayor que en las variedades no elicidadas en relación F1B2(4:1), 6515 (6:1), 395 (4:1), SH2 (3:1).

3. Análisis de expresión

A continuación, se presenta el resultado y análisis de expresión génica de los genes evaluados en este proyecto.

3.1. Genes “Housekeeping”

Análisis de expresión génica mediante la técnica de RT-qPCR, en los genes nombrados “Housekeeping”, se presentan curvas de fluorescencia en las gráficas 3 – 10 (anexos) y medida de la expresión entre variedades resistentes, susceptibles, elicidadas y no elicidadas en la figura 14.

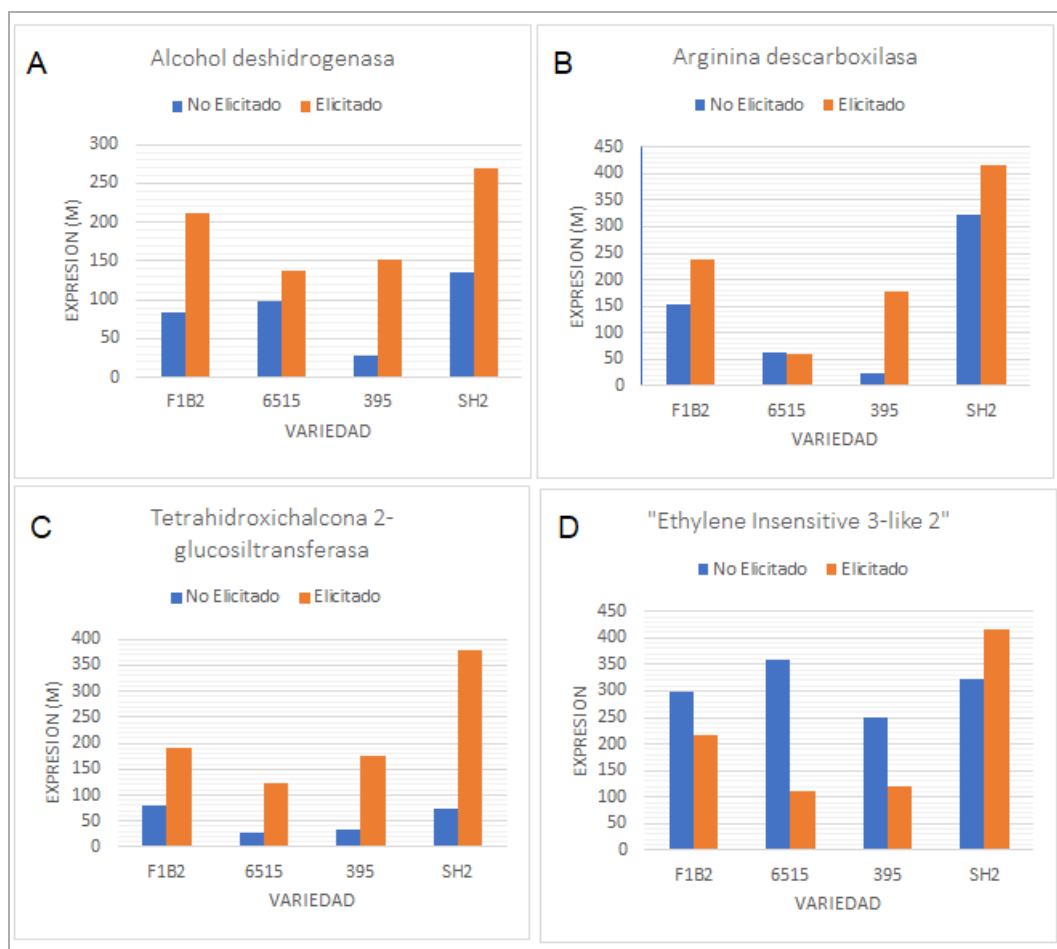


Figura 14. Análisis de Expresión génica (M) de “Housekeeping” A: Clabb, B: Cladd, C: Clagg, D: Clahh en variedades de clavel resistentes F1B2-395 y susceptibles 6515 – SH2, elicitadas (naranja) y no elicitadas (naranja).

3.1.1. Alcohol deshidrogenasa

Las curvas de fluorescencia graficas 3 – 10 y la gráfica 35 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen Clabb en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

Se observa en las variedades elicitadas aumento en la expresión del gen, debido a que en el ensayo de elicitación, se induce la expresión de mayor número de copias de ARNm correspondientes al gen en respuesta al Fod (Watson *et al.*, 2004). Siendo las variedades F1B2, 395 y SH2, las cuales aumentan el número de copias de ARNm en comparación con la expresión de las variedades no elicitadas, mientras que la variedad 6515 la

diferencia del aumento de la expresión es menor en comparación con las otras variedades.

Es bien sabido que la alcohol deshidrogenasa participa en procesos de estrés abiótico como apoxia / hipoxia siendo el metabolismo fermentativo la respuesta adaptativa para compensar la crisis energética, a partir de actividad enzimática secuencial, donde el piruvato se transforma en etanol y la regeneración de NAD (+) para mantener la glucólisis y la producción de ATP (Owen *et al.*, 2004).

La infección por patógenos causa una reducción progresiva de las tasas fotosintéticas, lo que da cabida a una presión de oxígeno reducida, que aumenta el metabolismo fermentativo en la planta (Swarbrick *et al.*, 2006). En la interacción planta – patógeno en *Arabidopsis thaliana* se demostró que el metabolismo fermentativo es fundamental, siendo la glucólisis, respiración y fermentación reguladores en el sitio de infección por *Mildeo polvoroso*, muestra que la fermentación favorece las condiciones celulares en la adquisición de nutrientes por el patógeno (Chandran *et al.*, 2010).

Pathuri y colaboradores en 2011 demostraron que la alcohol deshidrogenasa es un factor de susceptibilidad potencial en el pato-sistema cebada (*Hordeum vulgare* L.) - *Blumeria graminis* f.sp. hordei (BGH), puesto que, la sobreexpresión de esta enzima da como resultado susceptibilidad a BGH y el silenciamiento del gen da como resultado menor susceptibilidad.

En la figura 14a se puede observar la diferencia en la variación de la expresión génica entre variedades resistentes, susceptibles, elicidadas y no elicidadas, demostrando que la actividad de alcohol deshidrogenasa en respuesta al estrés metabólico, aumenta la expresión, ya que, cumple la función en el mantenimiento de la vía glucolítica / fermentativa de las células estresadas por patógenos. En las variedades F1B2,6515 y SH2 la respuesta del material no elicitado es alta, comparada con 395, demostrando que hay diferencias en la expresión del gen sobre el metabolismo basal.

En la elicitación con Fod, es clara la sobreexpresión del gen en todas las variedades, demostrando que la respiración celular es una de las primeras funciones que se ven afectadas cuando las células son atacadas por patógenos, el metabolismo fermentativo es mayor en respuesta al patógeno, debido a la necesidad de energía en la planta, ya que el metabolismo aerobio no puede proporcionar la energía suficiente para la defensa contra el

patógeno, siendo una vía alternativa de producción de energía que las células recurren por las condiciones de estrés.

3.1.2. Arginina descarboxilasa

Las curvas de fluorescencia graficas 3 – 10 y la gráfica 36 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen Cladd en las variedades resistentes, susceptibles elicítadas y no elicítadas.

Se observa en las variedades elicítadas F1B2, 395 y SH2 aumento en la expresión del gen en el ensayo de elicitación, mientras que la variedad 6515 no cambio la expresión del gen a pesar de la interacción con Fod que en las demás variedades indujo el aumento del número de copias de ARNm en comparación con las variedades no elicítadas.

Se reconoce el papel de la Arginina descarboxilasa, como una enzima fundamental, descarboxilando la arginina, produciendo agmatina, y transformándose posteriormente en putrescina, iniciador en el metabolismo de poliaminas (PA) (Chen,2019).

Las PA son metabolitos nitrogenados de bajo peso molecular, por su carácter catiónico, pueden unirse y formar complejos con moléculas aniónicas, proteínas, pectinas, ADN y ARN. Además, están implicadas en procesos fisiológicos tales como: crecimiento, desarrollo, senescencia, respuesta a estrés biótico y abiótico, que participan en la señalización en mecanismos de interacción planta – patógeno (Gonzalez *et al.*, 2021; Luna-Esquivel *et al.*, 2014).

Durante la respuesta al patógeno por parte de la planta, la biosíntesis de PA de formas libres y conjugadas, participa en la respuesta temprana al ataque de patógenos (Singh y Farsodia; 2018; Seifi y Shelp, 2019). Se acepta que la acumulación de PA por estrés biótico es resultado de la regulación transcripcional y traslacional de genes que participan en la biosíntesis de PA. La concentración de putrescina libre y conjugada, aumento en los tejidos vegetales infectados por hongos s (Wojtasik *et al.*, 2015).

Un estudio de *Arabidopsis*, mostro que la sobreexpresión del gen ADC que codifica para la Arginina descarboxilasa, provoco la expresión de genes relacionados con defensa de las plantas que estimula la biosíntesis local de ácido salicílico (Rossi *et al.*, 2015). A pesar de los pocos estudios para definir las funciones de PA en la defensa de plantas, se ha

demostrado que PA libres pueden restringir el crecimiento de algunos patógenos fúngicos *in vitro* como *Fusarium* (Wojtasik *et al.*, 2015).

La espermina (Spm) es una PA, que participa en la señalización que regula la expresión de genes relacionados con la defensa, modulando la biosíntesis de las fitoalexinas, que pueden llegar a inducir una respuesta hipersensible (HR) independientemente de la vía del ácido salicílico (Seifi y Shelp, 2019).

Varios trabajos ha descrito como diferentes PA están involucradas en la biosíntesis de las amidas del ácido hidroxicinámico (HCAA), donde su acumulación en diferentes patosistema lo ha considerado biomarcador a estrés biótico durante la respuesta de la planta a patógenos (Legaz *et al.*, 1998; Cowley y Walters, 2008; Zeiss *et al.*, 2020).

En general, se ha atribuido a las PA un papel fundamental en respuesta a estrés biótico o abiótico, fortaleciendo la pared celular mediante reacciones que confiere a las plantas resistencia a la hidrólisis enzimática de la pared durante el ataque de patógenos (Zeiss *et al.*, 2020).

En la figura 14b, se observa la diferencia en la expresión del gen Cladd en el ensayo no elicitado en las variedades de clavel. Las variedades resistentes F1B2 y 395 presentan diferencia en la expresión del gen en el ensayo no elicitado, al igual que las variedades 6515 y SH2.

Se puede relacionar la elicitación con Fod, al aumento de la expresión del gen en las variedades F1B2, 395 y SH2, resaltando la variedad 395, que en el estado basal la expresión es baja, luego en presencia del patógeno se sobre expresa el gen. Demostrando que la expresión de la arginina descarboxilasa actúa en respuesta al estrés causado por el patógeno. Mientras que la variedad 6515 no cambio la expresión en el estado elicitado, siendo esta una variedad susceptible, el no tener actividad diferencial del gen, podría indicar que no hay reconocimiento de las señales de estrés por la vía de la biosíntesis de PA en el momento de la interacción planta – patógeno.

3.1.3 Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa

Las curvas de fluorescencia graficas 3 – 10 y la gráfica 37 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen Clagg en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

Se observa en las variedades elicidadas aumento en la expresión del gen en el ensayo de elicitación, en comparación con las células no elicidadas con Fod. Es decir que la interacción con el patógeno indujo el aumento del número de copias de ARNm del gen en comparación con las variedades no elicidadas.

Existe poca información sobre esta enzima, sin embargo, en clavel ha sido estudiada debido a su relación con senescencia floral, puesto que la tetrahidroxichalcona imparte el color amarillo pálido, que se isomeriza rápidamente a naringenina incolora mediante la catálisis de la chalcona isomerasa. Sin embargo, el color amarillo en los pétalos se mantiene mediante la actividad de la 2-glicosidasa en Clavel (*Dianthus caryophyllus*), Ciclamen (*Cyclamen persicum*), Catarantus (*Catharanthus roseus*) y Aster de China (*Callistephus chinensis*), (Ono *et al.*, 2006; Togami *et al.*, 2011).

No obstante, siendo un gen relacionado con la senescencia floral, bibliográficamente no se encuentra ligado a resistencia a patógenos. Pero, como se observa en la figura 14c, el cambio en la variación de la expresión del gen en la elicitación con Fod en todas las variedades estudiadas comparadas con la expresión basal del gen.

Al ser una enzima, la glucosiltransferasa tiene el potencial en el control del desarrollo y mantenimiento del metabolismo, participa en la transferencia de glucosa desde un donador a una molécula aceptora, que brinda estabilidad a la molécula (Offen *et al.*, 2006).

Al tratarse de una tetrahidroxichalcona, es rápidamente isomerizada en naringenina chalcona por la catálisis de la chalcona isomerasa, en la biosíntesis de Chalconas. Estas se caracterizan por su gran actividad biológica, como actividad antimicrobiana, antioxidante y antifúngica, que son intermediarios en la biosíntesis de moléculas como flavonoides e isoflavonoides (Dao *et al.*, 2011). Moléculas que desempeñan un papel ecológico importante como moléculas de señalización en la relación planta – patógeno, siendo esenciales para garantizar la supervivencia de las plantas.

Se podría relacionar la actividad en respuesta a Fod, con el aumento en la expresión génica de Clagg en las variedades de clavel, debido a la relación con la biosíntesis de chalconas, ya que la Tetrahidroxichalcona participa en procesos de señalización en la respuesta inducida por el patógeno. En las variedades resistentes F1B2 – 395, la expresión del gen en el ensayo elicitado y no elicitado, se observa en la figura 14 c que la medida de expresión es cercana en ambas variedades en los 2 ensayos. Por otro lado,

las variedades susceptibles 6515 – SH2, presentan diferencias en la medida de expresión del gen, en el ensayo de elicitación la variedad SH2 sobre expresa el gen en comparación con las demás variedades.

En la respuesta al patógeno, el gen Clagg no podría relacionarse a un fenotipo de resistencia o susceptibilidad, puesto que tanto en variedades resistentes y susceptibles aumenta la expresión del gen. A pesar de esto, se puede encontrar relación con la respuesta que tiene en general las células de clavel en la interacción planta-patógeno.

Debido al carente soporte bibliográfico del rol de la Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa, no se puede concluir sobre la actividad de este gen en la respuesta a Fod, se recomienda validar el amplicon por secuenciación y análisis bioinformático, con el fin de reportar la actividad de este gen en respuesta a *Fusarium*.

3.1.4. “Ethylene Insensitive 3-like 2”

Las curvas de fluorescencia graficas 3 – 10 y la gráfica 38 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen Clahh en las variedades resistentes, susceptibles elicidadas y no elicidadas.

La hormona vegetal etileno, regula gran variedad de respuestas al estrés y adaptaciones del desarrollo en las plantas superiores, dependiendo del tipo de tejido o tiempo de desarrollo, afecta procesos que incluyen germinación, desarrollo, crecimiento, maduración y senescencia (Taiz *et al.*, 2015). La biosíntesis del etileno puede ser inducida por factores externos como heridas o estrés ambiental y juega un papel importante en la activación sistémica de genes de defensa inducida por patógenos. El control de los procesos en los que participa esta hormona, implican una regulación compleja en la biosíntesis como en la capacidad de las células para percibir y responder a la hormona de manera apropiada a partir de la cascada de señalización (Wang *et al.*, 2002)

El gen “Ethylene Insensitive 3-like 2”, codifica a la proteína EIL3, factor de transcripción clave que actúa como regulador positivo en la vía de señalización del etileno (Chao *et al.*, 1997), en *Oryza sativa* (Yang *et al.*, 2015). La EIL3 regula la expresión de los factores de transcripción que se unen a la secuencia de ADN 5'-ATGTACCT-3 promotora de algunos genes inducibles por heridas.

En *Arabidopsis* (Lingam *et al.*, 2011) reportó que EIL3 regula la transcripción uniéndose a la secuencia GCC. Proteínas relacionadas con la secuencia actúan como activadores o represores de genes que responden al etileno, como los genes relacionados con la resistencia a patógenos (PR), que contienen GCC “box”, al igual que en *Nicotiana tabacum* (Kosugi y Ohashi, 2000). En un Mutante de *Arabidopsis*, al silenciar el gen que codifica para la EIL3 se redujo la expresión de genes del tipo factores de regulación de etileno y el gen que codifica para quitinasa, por otro lado, la sobreexpresión del gen dio como resultado la expresión del gen que codifica para la quitinasa (Solano *et al.*, 1998). En tabaco, se encontró que la expresión de EIL3 fue regulada por heridas, en relación con el ácido jasmonico, que incremento la expresión génica de genes tipo PR (Hibi *et al.*, 2007).

Se ha reportado en Clavel, que la actividad de EIL3 es esencial en la senescencia, puesto que responde a un aumento de expresión del gen en el momento de aplicación de etileno exógeno, para favorecer el desarrollo floral (Lordachescu y Verlinden, 2005). Causando heridas en las hojas de clavel, en el momento máximo de producción de etileno, hubo una disminución temporal en la acumulación de ARNm de EIL3, que parece estar correlacionado negativamente con la producción de etileno, demostrando que este gen puede desempeñar un papel complejo, pero importante en la vía de señalización del etileno, esta disminución en la expresión de EIL3 dio origen a la señal que da lugar a la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta (Waki *et al.*, 2001).

En la figura 14d se puede observar un claro ejemplo de la regulación de la vía de señalización del etileno por la actividad de la EIL3, puesto que en las variedades elicidadas F1B2, 6515 y 395 hubo una disminución en la expresión de EIL3, que actúa como respuesta a la presencia de Fod, causando una disminución en la producción de etileno, como señal para la activación de genes PR. En la variedad susceptible SH2 se observa el aumento en la expresión del gen, para el momento en el cual se realizó la extracción de ARN es posible que haya ocurrido una respuesta temprana al reconocimiento de Fod y que se haya activado antes la señal de EIL3 y por ende la expresión del gen es mayor. De esa forma, el tiempo de respuesta en la vía de señalización del etileno podría afectar el fenotipo de susceptibilidad, ya que SH2 es parental susceptible de las demás variedades.

3.2. Genes relacionados con la resistencia a parásitos

Se presentan los resultados y análisis de expresión de genes relacionados con resistencia a parásitos, las curvas de fluorescencia en las gráficas 11 – 18 (anexos) así como la medida de la expresión entre variedades resistentes, susceptibles, elicidadas y no elicidadas en figura 15.

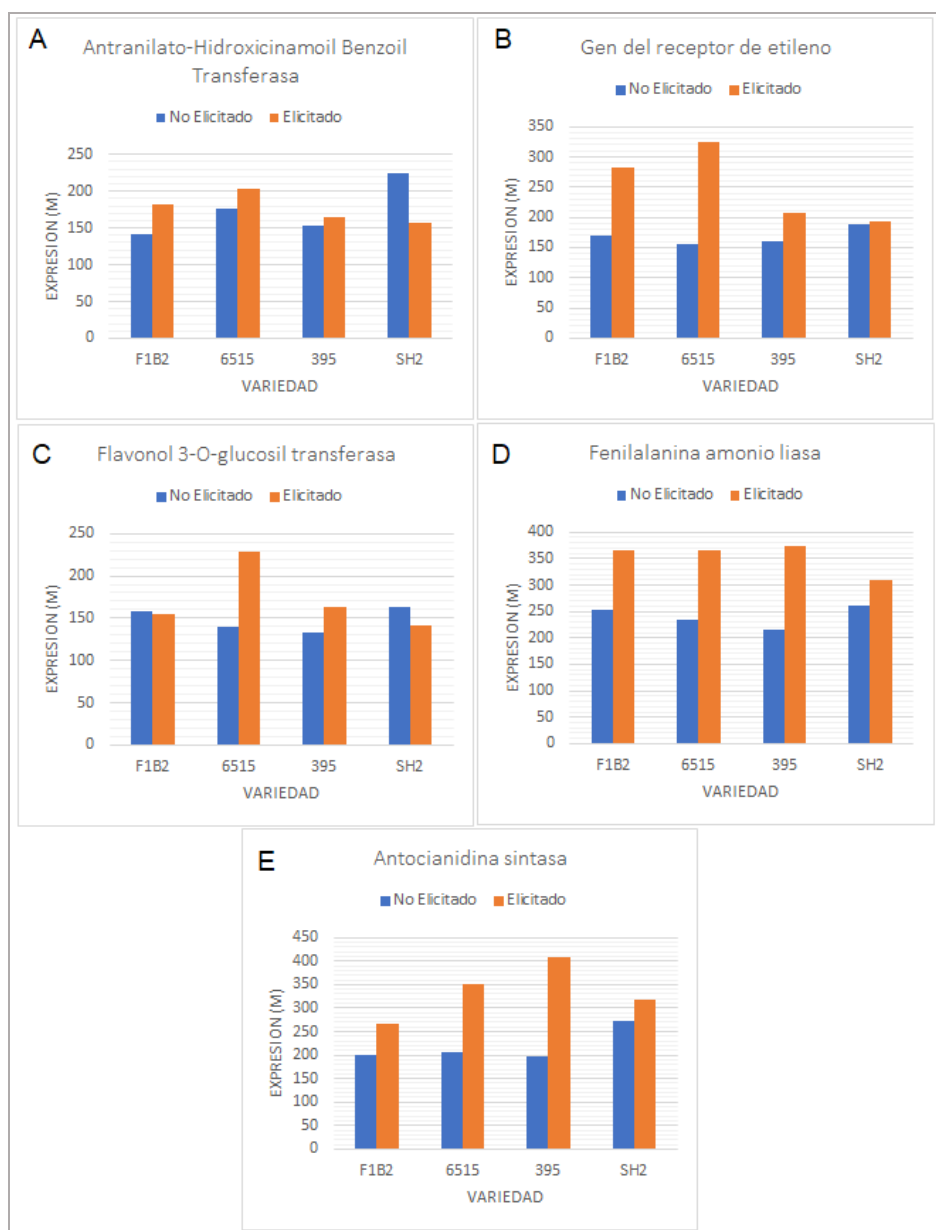


Figura 15. Análisis de Expresión génica (M) de genes relacionados con la resistencia a parásitos A: ANB4, B: Ers2, C: DicGT, D: Phe1, E: Ant1 en variedades de clavel resistentes F1B2-395 y susceptibles 6515 – SH2, elicidadas (naranja) y no elicidadas (naranja).

3.2.1. Antranilato N-hidroxicinamoil / Benzoiltransferasa

Las curvas de fluorescencia graficas 11– 18 y la gráfica 39 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen ANB4 en las variedades resistentes, susceptibles elicítadas y no elicítadas.

El gen ANB4, en las variedades F1B2, 395 y 6515 la expresión del gen un poco mayor en el ensayo de elicitación con Fod, en comparación con las células en el ensayo no elicitado. La variedad SH2, presenta mayor expresión del gen en el ensayo no elicitado, que disminuye en el momento de la interacción con el patógeno.

Esta enzima fue caracterizada por Yang y colaboradores en 1997, a partir de cultivos celulares que habían sido inducidos por un elicitor fúngico, catalizando la primera reacción involucrada en la biosíntesis de fitoalexinas.

Las fitoalexinas, son compuestos de bajo peso molecular, sintetizados en respuesta a estrés, se producen en respuesta a infección causada por parásitos y son esenciales para la expresión de genes asociados a resistencia, estas actúan como toxinas para el atacante, retrasando la maduración, afectando el metabolismo o impidiendo la reproducción del patógeno (Romero - Rincón, 2020). En *Arabidopsis*, Glazebrook y Ausubel en 1994, desarrollaron mutantes los cuales eran incapaces de producir fitoalexinas. Estos mutantes se vieron colonizados rápidamente en comparación a plantas del tipo silvestre. Demostrando la importancia de las fitoalexinas en respuesta a parásitos.

En Clavel responde a infecciones causadas por Fod por la acumulación de fitoalexinas únicas, que comprenden un conjunto de derivados del ácido N Benzoniltranílico (Diantramidas), Antranilato suministrado a partir de corismato por la vía del ácido shikimico, catalizado por la transferasa que cataliza la N-acilación, metabolitos que presentan un potencial antimicótico o fungitoxica que se acumulan rápidamente en los tejidos de la planta (Reinhard y Matern, 1989.; Matern,1994;).

Yang y colaboradores en 1998 demostraron que la inducción de la actividad de la Antranilato N-hidroxicinamoil / Benzoiltransferasa en células de clavel cultivadas en suspensión en respuesta a un inductor fúngico, alcanzo valores máximos de ARNm en 0,5h y completo actividad enzimática 4 - 6h después de aplicar el tratamiento, lo que demuestra la cinética de activación de genes relacionados con ANB4, pertenece al metabolismo secundario, por lo tanto, sigue el orden de activación de expresión de

factores de transcripción relacionados con la biosíntesis de fitoalexinas, demostrando que estas pueden contribuir a la resistencia a enfermedades causadas por patógenos en claveles (Yang *et al.*, 1997).

Según los resultados obtenidos en la figura 15a se observa un aumento mínimo en la expresión de ANB4 en las variedades F1B2, 6515 y 395 y disminución en la variedad SH2. Según lo reportado en literatura, se puede entender que la respuesta de la enzima Antranilato N-hidroxicinamoil / Benzoiltransferasa, es regulada y tiene una cinética de reacción muy corta, ya que es el primer paso en la biosíntesis de fitoalexinas.

En las variedades que la medida de expresión fue baja con respecto a los otros genes evaluados y en el ensayo de elicitación sigue siendo bajo, aunque se evidencia un aumento en la medida de expresión, debido a que la expresión de esta enzima tiene un tiempo de activación muy corto, y en el ensayo de elicitación se mantuvo en interacción el hongo y las células durante 5 días. Por ende, no se logra ver el aumento en la expresión de este gen para el tiempo en el cual se extrajo el ARNm.

El gen ANB4 no puede asociarse a un fenotipo resistente o susceptible de células de clavel, ya que es un gen iniciador de procesos de biosíntesis de fitoalexinas, lo que podría afectar, sería el tiempo de respuesta en cada una de las variedades evaluadas, que permitiría comenzar la cascada de señalización.

3.2.2. Gen receptor de etileno

Las curvas de fluorescencia graficas 11– 18 y la gráfica 40 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen Ers2 en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

El gen Ers2 muestra mayor expresión en las variedades de clavel elicitadas F1B2 – 6515 - 395, y en menor medida la variedad SH2 en comparación con las células en el ensayo no elicitado. Se presenta diferencia de expresión en las variedades elicitadas, mientras que la expresión en las variedades no elicitadas no cambia, salvo en la variedad SH2 susceptible.

Anteriormente, se discutió la importancia del etileno y el rol que juega el factor de transcripción en la vía de señalización del etileno (Clahh), este caso el gen Receptor de etileno Ers2, es uno de los 5 receptores de etileno identificados en *Arabidopsis* (Lingam *et*

al., 2011), todos los receptores comparten una estructura de domino que consta de dominios transmembrana N- terminal, seguido de domino GAF y un dominio de salida de señal C – terminal (Lin *et al.*, 2009).

El aumento en la expresión receptores que participan en la vía de señalización del etileno es directamente proporcional a la cantidad de etileno que se esa produciendo por la planta, y que es reconocido por los receptores de membrana, es bien sabido que esta hormona participa en procesos de crecimiento y desarrollo. Sin embargo, cuando se detecta un patógeno, se sintetiza etileno en los tejidos que están siendo afectados, que permite la activación sistémica de genes defensivos en tejidos que no están siendo atacados (Schaller, 2012). Se demostró en mutantes de tabaco insensibles al etileno plantas susceptibles contra patógenos, en comparación con fenotipos silvestres (Hibi *et al.*, 2007).

En la figura 15b se observa el comportamiento del gen *Ers2*, mostrando en el ensayo no elicitado, hay diferencia en la expresión del gen en todas las variedades, debido a la participación de los receptores de etileno en el metabolismo primario.

En el ensayo con Fod, se observa diferencias en la expresión del gen que codifica a los receptores de membrana. La variedad resistente F1B2 y susceptible 6515, sobre expresan este gen en presencia del patógeno, del mismo modo la variedad resistente 395 aumenta en menor medida la expresión del gen. Por último, la variedad susceptible SH2 no muestra cambio en la expresión del gen asociado al receptor de etileno, lo que podría indicar que esta variedad no aumenta la biosíntesis de etileno en respuesta al patógeno, lo que relaciona la diferencia de expresión de este gen con el fenotipo que presenta mayor susceptibilidad al patógeno demostrado en el ensayo de elicitación, siendo la variedad que permitió el avance de Fod.

3.2.3. Flavonol 3-Glucosiltransferasa

Las curvas de fluorescencia graficas 11– 18 y la gráfica 41 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen *DicGT* en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

El gen *DicGT*, presenta en el ensayo no elicitado una medida de expresión cercana entre las todas las variedades. En presencia de Fod, las variedades F1B2 – 395 – SH2, la

medida de expresión para este gen es semejante. Con respecto a la variedad 6515 elicitada, sobre expresa el gen en respuesta al patógeno.

La glicosilación de flavonoides permite que las moléculas sean más estables y aumenta la solubilidad en agua para la compartimentalización y acumulación de compuestos en la vacuola, lo cual es un paso fundamental en la vía biosintética de flavonoides, que en plantas superiores produce una amplia gama de compuesto de importancia biológica que incluyen, polinización, pigmentación, inhibición del transporte de auxinas, protección contra la luz ultravioleta y demás mecanismos de defensa (Ogata *et al.*, 2004).

La flavonoide 3- O -glucosiltransferasa (UF3GT), es una de las enzimas más comunes que podría catalizar la glicosilación de los aglicones de flavonol y antocinidina, convierte las antocianidinas en antocianinas como parte la ruta fenil-propanoide. En la defensa de las plantas juega un papel muy importante debido a la participación en la biosíntesis de flavonoides y de ácido salicílico (Stich, *et al.*, 1992; Song, 2006).

En clavel, se puede considerar la biosíntesis de flavonoides y su participación en la resistencia del clavel a Fod, si se considera que muchos metabolitos relacionados a esta ruta pueden presentar actividad antioxidante, lo cual está asociado con la resistencia a patógenos, esto se debe a que altos niveles de especies oxidantes, por el producto del metabolismo de la planta, pueden generar apoptosis y favorecer la respuesta del patógeno (Ardila-Barrantes, 2013).

En la Figura 15c, se observa el comportamiento del gen DicGT, demostrando en el ensayo no elicitado, pocas variaciones en la medida de expresión de la flavonol 3 glucosiltransferasa en todas las variedades, esto se debe a la participación en procesos fisiológicos relacionados con la ruta biosintética de los flavonoides.

En presencia a Fod, las variedades F1B2-395-SH2 muestran cambios pequeños con respecto a la expresión de este gen, sin embargo, la variedad 6515 susceptible, se evidencia la sobreexpresión de este gen, se podría considerar que la respuesta es diferencial en la expresión de este gen, ya que en comparación con las otras variedades la diferencia en la medida de expresión es baja.

Se debe considerar que este tipo de enzimas juega un papel importante en la biosíntesis de flavonoides y antocianinas, puede que la expresión del gen inducida por Fod, se vea afectada por el tiempo en el cual la planta reconoce la señal, sobre-expresando el gen en un momento determinado, activando el mecanismo de respuesta antioxidante, luego de la

interacción el aumento en la expresión baja. Por ende, la sobreexpresión del gen en la variedad 6515, podría estar relacionada con la respuesta tardía con respecto a la detección de señales que inducen el metabolismo de biosíntesis de flavonoides, con un estudio futuro, se podría realizar el seguimiento por tiempos de la interacción clavel – Fod, puesto que la actividad de este gen podría asociarse a un fenotipo de susceptibilidad al patógeno.

3.2.4. Fenilalanina amonio liasa

Las curvas de fluorescencia graficas 11– 18 y la gráfica 42 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen Phe1 en las variedades resistentes, susceptibles elicítadas y no elicítadas.

El gen Phe1, presenta en el ensayo no elicitado en todas las variedades, menor expresión en comparación con el ensayo elicitado con Fod, lo que indica que la interacción del patógeno con las células induce al aumento de expresión de este gen en las células de clavel.

La enzima Fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la primera reacción de la ruta del metabolismo fenilpropanoide, participando en la biosíntesis de compuestos fenólicos, como flavonoides, fenilpropanoides y lignina, que consiste en la formación de ácido cinámico a partir de la fenilalanina y se ha propuesto como una enzima clave en la regulación del metabolismo secundario (Jun *et al.*, 2018).

Esta enzima ha sido estudiada debido a su participación en respuesta a varios estímulos bióticos y abióticos, principalmente en mecanismos de defensa PAL, puesto que, participa en 5 rutas metabólicas, metabolismo de tirosina, metabolismo de fenilalanina, metabolismo de nitrógeno, biosíntesis de fenilpropanoides y biosíntesis de alcaloides (Jun *et al.*, 2018).

Estudios realizados en clavel, determinaron que la interacción del patógeno con Fod tiene un efecto en los niveles de concentración de la enzima PAL, se ha propuesto que el proceso de elicitación tiene el potencial de aumentar la defensa en clavel (Ardila *et al.*, 2011). Ya que este aumento en la expresión de PAL está asociado en la respuesta bioquímica y molecular en las plantas elicítadas. Un silenciamiento parcial de la expresión génica de PAL, desarrollado por Shadle y colaboradores (2003), demostró una mayor susceptibilidad a hongos fitopatógenos.

En un ensayo de elicitación espacio temporal, Ardila y colaboradores (2011) demostraron que a las 96 horas post inoculación, las variedades tolerantes a Fod, presentaron un aumento significativo en la actividad enzimática de PAL, mientras que la variedad susceptible, no tuvo cambio en la actividad enzimática. En otras especies, el aumento de la actividad de PAL está completamente relacionado a la resistencia a diferentes patógenos del género *Fusarium*.

El aumento en la expresión de PAL muestra que la inducción de clavel es un fenómeno asociado a elicitores provenientes de patógenos y la activación de estos mecanismos está asociada a la resistencia de la planta, como muestra Ardila y colaboradores (2007) con el aumento de la actividad enzimática luego de exponer la planta a elicitores provenientes de Fod.

En plantas resistentes y susceptibles inoculadas con el patógeno, se observó que los niveles de ARNm en variedades resistentes y susceptibles aumenta, siendo para la variedad susceptible una respuesta temprana (Ardila, 2013), debido a que se generan diferencias en la velocidad con la que la planta detecta los elicitores del patógeno en las variedades resistentes y susceptibles (Ardila *et al.*, 2011).

Como se observa en la figura 15d, el comportamiento del gen Phe1, muestra que con respecto al ensayo con células no elicitadas, el valor de la medida de expresión del gen que codifica para PAL es semejante en todas las variedades, debido a la participación de esta enzima en el metabolismo primario y en las rutas ya mencionadas.

Por otro lado, en el ensayo de elicitación, las variedades F1B2 – 6515 – 395 muestran un aumento en la expresión del gen. Sin embargo, la variedad susceptible SH2 tiene un aumento menor en comparación con las demás para el día 5, lo que se relaciona con otros estudios donde se demostró espacio - temporalmente que las variedades susceptibles tienen un tipo de respuesta diferencial con el tiempo de activación y regulación del metabolismo, luego de la detección de elicitores del patógeno.

En este caso, podría asociarse que el aumento de la medida de expresión con respecto a la respuesta temprana y posterior regulación en la variedad SH2 en comparación a las otras variedades, podría relacionarlo como una característica del fenotipo de susceptibilidad a Fod.

3.2.5. Antocianidin sintasa

Las curvas de fluorescencia graficas 11– 18 y la gráfica 43 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen ANT1 en las variedades resistentes, susceptibles elicítadas y no elicítadas.

El gen ANT1 presenta mayor medida de expresión en el ensayo de elicitación con Fod en comparación con el ensayo de células no elicítadas en todas las variedades. Lo que permite afirmar que el gen que codifica para la Antocianidina sintasa es inducido a un aumento de expresión en la interacción planta – patógeno.

La enzima Antocianidina sintasa (ANS) cataliza el penúltimo paso en la biosíntesis de antocianinas, estas constituyen una gran clase de flavonoides que explican la pigmentación, señalización, dispersión de semillas y protección contra la luz UV (Angulo, 2012). Las antocianidinas son homólogas a las antocianinas, pero sin un azúcar asociado, principalmente conocido por su función de pigmentación hidrosoluble, que otorga colores como rojo, púrpura, azul en hojas, flores y frutos de diferentes especies vegetales.

Las antocianidinas provienen de las rutas del ácido shikimico y del malonil-CoA, la acumulación de antocianinas (3-deoxiantocianidinas) es una respuesta rápida en la presencia de elicitores fúngicos. Actúan como fitoalexinas, compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, relacionado a la respuesta de estrés o infección. Se Lo y Nicholson (1998) demostraron que la acumulación de estas antocianidinas en sorgo, están asociadas al ataque de patógenos.

Cumplen un rol en el metabolismo fenilpropanoide, ya que a partir de enzimas PAL y CHS, los compuestos se forman a partir de la condensación del ácido p cumarico y malonil CoA, formando narigenina chalcona, que se convierte en flavonona de narigenina, de esta se derivan tanto las antocianidinas como las 3 – desoxiantocinidinas, por actividad de la antocianin sintasa (Jun *et al.*, 2018). Los productos de la síntesis de antocianidinas para formar antocianinas, llegan a derivar compuestos químicos que a nivel celular permiten disminuir los niveles de compuestos altamente reactivos como las especies reactivas de oxígeno “ROS”, puesto que pueden reaccionar con estos y disminuir los niveles celulares que causan estrés oxidativo en respuesta a condiciones tanto bióticas como abióticas (Ardila, 2013).

En la figura 15e, el comportamiento del gen ANT1, muestra que con respecto al ensayo no elicitado en todas las variedades, a excepción de SH2, el valor de la medida de

expresión es semejante, lo que muestra que la variedad SH2 está expresando mayor cantidad de ARNm que se traduce en la enzima ANS, en el momento de la elicitación con Fod. Se evidencia en la medida de expresión aumento en todas las variedades, puesto que ANT1 forma parte del metabolismo fenilpropanoide.

Sin embargo, la expresión es diferencial con respecto a las variedades evaluadas, el aumento en la expresión en la variedad resistente F1B2, es menor en relación con las variedades 6515 y 395, siendo la variedad 6515 susceptible y 395 resistente sobre expresan el gen en respuesta a Fod. Lo que indica que puede incurrir en mayor actividad enzimática y en acumulación de antocianidinas, en respuesta al patógeno.

Por otro lado, la variedad SH2 susceptible, en ensayo no elicitado presento mayor medida de expresión en comparación con las demás variedades. El aumento de la expresión en el ensayo de elicitación es mínimo comparando con la diferencia la expresión en otras células. Se demuestra la expresión diferencial de este gen, podría asociarse al fenotipo de susceptibilidad, donde la variedad SH2 no aumenta la expresión del gen en comparación con las otras células, podría afectar la señalización para la biosíntesis de metabolitos asociados a la respuesta a elicitores fúngicos.

3.3. Genes relacionados con proteínas de patogenicidad

Análisis de expresión génica mediante la técnica de RT-qPCR, en de los genes relacionados con proteínas de patogenicidad, se presentan curvas de fluorescencia en las gráficas 18 – 34 (anexos) y medida de la expresión entre variedades resistentes, susceptibles, elicidadas y no elicidadas en la figura 14.

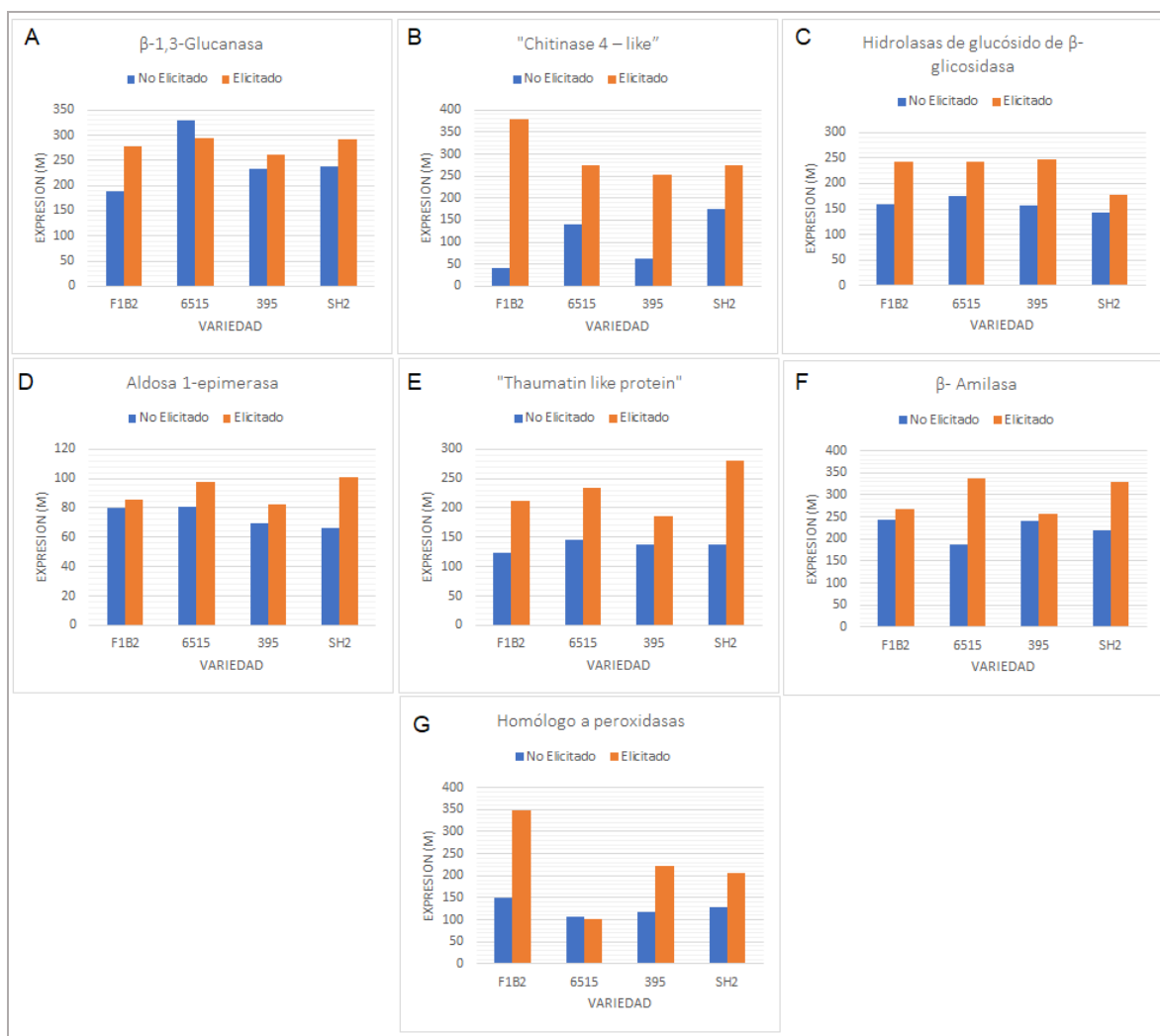


Figura 16. Análisis de Expresión génica (M) genes de proteínas relacionadas con patogenicidad (PRPs), A: AtBG-pap, B: ScChil, C: GHs, D: NbAELP, E: TLP, F: BAM, G: AtPrxs de variedades clavel resistentes F1B2-395 y susceptibles 6515 – SH2, elicidadas (naranja) y no elicidadas (azul).

3.3.1. β -(1 3)-D-Glucanasa

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 44 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen *AtBG-pap* en las variedades resistentes, susceptibles elicítadas y no elicítadas.

El gen *AtBG-pap*, presenta una medida de expresión semejante en el ensayo no elicitado entre las variedades evaluadas, salvo la variedad 6515 que sobre expresa el gen en comparación con las demás. En el ensayo de elicitación la medida de expresión en todas las variedades es cercana y aumenta en comparación al ensayo no elicitado. Por ende, el gen que codifica para la enzima β -(1 3)-D-Glucanasa aumenta la expresión en respuesta a Fod.

Esta enzima, desempeña un papel clave en los procesos de división celular, tráfico de sustancias a través de plasmodesmos, desarrollo vegetal y respuesta a estrés abiótico. Además, el papel principal está directamente relacionado con defensa vegetal (Kam *et al.*, 1991). Se ha categorizado en análisis *in vitro* como proteína PRs, las cuales tienen alta importancia por su actividad antifúngica, está en particular es capaz de hidrolizar las paredes celulares de algunos hongos, en combinación de isoenzimas de quitinasas, así como inducir una respuesta inmunoreguladora con la liberación de elicitores y supresores endógenos (Balasubramanian *et al.*, 2012).

Los β – 1,3 Glucanos, son polisacáridos que constituyen una gran variedad de paredes celulares como la de los hongos filamentosos, la evidencia muestra que *in vivo*, las β – 1,3 glucanasa en combinación con otras PRs como quitinasas, actúan directamente sobre hongos fitopatógenos. Esta enzima actúa inhibiendo el crecimiento de hifas fúngicas invasoras e indirectamente liberando inductores que pueden estimular la síntesis de fitoalexinas (Balasubramanian *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que hay acumulación de esta enzima en diferentes tejidos de tomate que han sido infectados por *F. oxysporum* f. sp *lycoperci* (*Fol*), entre variedades que presentan diferentes niveles de resistencia, mostrando que esta enzima tiene actividad en respuesta en el mecanismo de defensa vegetal a partir de elicitores fúngicos de *Fusarium* (Dmitriev *et al.*, 2018). En un ensayo con *Alternaria solani*, genotipos resistentes y susceptibles de tomate tuvieron respuestas diferenciales en la expresión del gen de la β – 1,3 Glucanasa, en las variedades resistentes la expresión de proteínas antifúngicas fue a las 6h antes, que las variedades susceptibles, con una expresión mayor de otras

proteínas antifúngicas como peroxidasas (PO), polifenol oxidasa (PPO) y fenilalanina Amonio Liasa (PAL) (Salim *et al.*, 2011).

En la figura 16a el comportamiento del gen AtBG-pap muestra con respecto al ensayo de células no elicidadas, se presentan diferencias en la medida de expresión. Se debe tener en cuenta que las células se encuentran sobre medio MS con agente gelificante PhytigelTM que es un tetrasacárido lineal formado por $\rightarrow 4$) -l-ramnopiranosil- (α -1 $\rightarrow$ 3) -d-glucopiranosil- (β -1 $\rightarrow$ 4) -d-glucuronopiranosil- (β -1 $\rightarrow$ 4) -d -glucopiranosil- (β -1 $\rightarrow$ con sustituyentes O (2) 1-glicerilo y O (6) sustituyentes acetilo en la glucosa de 3 enlaces, las células degradan el medio con enzimas glucanasa, explicando la medida de expresión de este gen (Zhang *et al.*, 2014).

Las variedades 395 – SH2 muestran una medida de expresión cercana, la variedad F1B2 la expresión fue baja con respecto a las demás y variedad susceptible 6515 sobre expresa. La diferencia en la expresión podría asociarse al metabolismo basal, donde la enzima que codifica este gen juega un papel clave en procesos del desarrollo vegetal o estrés en las células.

Por otro lado, en el ensayo de elicitación con Fod, se evidencia el aumento en la expresión del gen AtBG-pap, como se reportó en estudios mencionados, en todas las variedades hay respuesta en la expresión, puesto que juega un papel importante como enzima que hidroliza las paredes de las hifas del hongo atacante e inductor de la respuesta inmune de la planta.

En las variedades elicidadas con el hongo hay un aumento en la expresión génica, mayor en la variedad F1B2, en comparación con su estado no elicitado, en la variedad 395 hubo un aumento semejante con el ensayo no elicitado, al igual que la variedad SH2. Mientras que la variedad susceptible 6515, en el estado elicitado, presenta una medida de expresión cercana a las demás variedades. Sin embargo, la expresión disminuye en la variedad 6515 en comparación con el ensayo no elicitado, lo que podría indicar que las células en ausencia del patógeno están expresando el gen en función del desarrollo vegetal.

En la interacción con Fod la expresión es regulada negativamente por 6515, esto podría relacionarse con el tiempo en que la planta detecta la señal enviada por el patógeno, que en las otras variedades aumenta la expresión de este, pero en esta variedad en particular,

al estar ya sobre expresando el gen, al detectarse el hongo, la expresión de este gen disminuye.

Debido a la importancia que tiene este gen, en respuesta a patógenos siendo una de las PRs más estudiada, podría asumirse que con una detección tardía de la señal enviada por Fod, se asociaría a un fenotipo de susceptibilidad.

3.3.2. Quitinasa

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 45 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen ScChil en las variedades resistentes, susceptibles elicadas y no elicadas.

El gen ScChil presenta una medida de expresión en el ensayo no elicado menor en comparación al ensayo de elicación con Fod. Las variedades resistentes F1B2 – 395, en ausencia de Fod presentan menor expresión del gen que las variedades susceptibles 6515 – SH2. En general, la expresión de la quitinasa en todas las variedades aumenta en presencia de Fod.

La enzima Quitinasa, es clasificada como PRs, puesto que es inducida en respuesta a patógenos aumentando la expresión y actividad enzimática, por lo tanto, en plantas la quitinasa actúa principalmente en la defensa contra hongos, y se ha estudiado el papel de esta enzima como agente de control biológico seguro y biodegradable (Taiz *et al.*, 2015). En plantas sanas, algunas quitinasas, se expresan de forma constitutiva, que va aumentando con la edad de la planta, este patrón de expresión está regulado específicamente por el desarrollo de tejidos y órganos (Dzhavakhiya *et al.*, 2007).

La quitina es un polímero, que está formado por amino azúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos β -(1→4), que forman una cadena lineal de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, desempeña un papel importante en su estructura molecular, ya que permite formar tejidos presentes en gran parte organismos como los artrópodos e incluso es la estructura principal de la pared celular de los hongos, que además es un patrón de reconocimiento molecular asociado a patógenos (MAMP/PAMP) para desencadenar respuestas de defensa basal (Langner y Göhre, 2016).

Existen diferentes modelos donde se ha caracterizado esta enzima en respuesta a gran variedad de hongos fitopatógenos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Verticilium*, que

afectan cultivos de papa, pepino, arroz, maní, banano, soya, etc., donde se ha evaluado la actividad que tienen la quitinasa y glucanasa en respuesta a los patógenos (Jabeen *et al.*, 2015).

Sin embargo, en Tomate, el cultivo se ve afecto por una amplia gama de patógenos, entre ellos *Fusarium*, debido a la carencia de genes que codifican las quitinasas, en un estudio se probaron 17 accesiones de genes de arroz relacionados con quitinasas para la respuesta a *Fusarium*, 3 accesiones presentaron respuesta al hongo en relación con el aumento en la expresión de quitinasas como mecanismo de defensa, los resultados demostraron que todas las plantas transgénicas eran altamente resistentes al patógeno por el método de inoculación de raíces y no observaron síntomas de marchitez, concluyendo que el gen que codifica a una quitinasa expresaba su actividad antifúngica (Huang y Lindhout, 1997).

En la Figura 16b el comportamiento del gen ScChil muestra en el ensayo no elicitado, una medida de expresión diferencial entre las variedades resistentes F1B2 - 395, con una expresión baja en comparación a las variedades susceptibles 6515 – SH2. Esta diferencia puede estar relacionada a una mayor actividad metabólica primaria de desarrollo y crecimiento.

En el ensayo de elicitación con Fod, el comportamiento de la expresión en todas las variedades aumenta, debido a que este gen está relacionado principalmente en respuesta a patógenos, siendo de los genes más importantes documentados en interacción con hongos, puesto que al ser la pared de Fod principalmente de quitina, la planta expresa genes que codifican la enzima quitinasa con el fin de hidrolizar las paredes de los hongos y combatir la infección.

La expresión entre variedades es diferencial, puesto que para la variedad resistente F1B2, sobre expresa este gen en comparación con las otras variedades, lo que podría ralentizar el avance de las hifas del patógeno en el ensayo de elicitación, al igual que en la variedad resistente 395.

Por otro lado, las variedades susceptibles 6515 y SH2, en el ensayo no elicitado presentan una expresión diferencial mayor en comparación con las variedades resistentes no elicitadas. Luego de la interacción con el patógeno aumenta la respuesta de expresión del gen, puesto que es un mecanismo de defensa principal. Sin embargo, estas 2

variedades susceptibles son las que permiten el mayor avance del hongo, como se observa en el ensayo de elicitación.

En el ensayo no elicitado al estar expresando el gen de forma constitutiva, podría hacer que se genere una señal de respuesta tardía, ya que el patógeno llega a las células y estas al estar expresando el gen, no reaccionan al ataque, puesto que no se revelan estructuras fúngicas de la planta, hasta que el hongo avanza lo suficiente para activar los mecanismos de defensa contra el patógeno, lo que podría asociar la expresión de este gen, con el fenotipo característico de susceptibilidad.

3.3.3. Hidrolasas de glucósido de β -glicosidasa

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 46 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen GHs en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

El gen GHs, presenta una medida de expresión en el ensayo no elicitado semejante en todas las variedades, menor en comparación con el ensayo de elicitación con Fod. Las variedades F1B2-6515-395 el valor de medida de expresión es cercano entre estas. Sin embargo, la variedad SH2 muestra menor expresión de este gen en comparación con las otras variedades de clavel.

La enzima GH3, pertenece a una familia de proteínas sensibles a las fitohormonas que se encuentran en muchas especies de plantas. En el estudio realizado por Zhang y colaboradores (2018), se demostró la participación en la regulación por adenilación de fitohormonas que contribuyen en la actividad biológica del ácido indol acético (AIA), ácido jasmonico (AJ) y ácido salicílico (AS). Las GH3 catalizan la conjugación de aminoácidos para formar el conjugado ácido jasmonico / isoleucina (JA-ile), que aumenta la respuesta del AJ, fitohormona reconocida por su papel en la defensa, se sintetiza rápidamente y funciona como señalizador en respuesta mediada por AJ.

La fitohormona AIA es responsable del crecimiento y desarrollo de las plantas superiores, influyen en la diferenciación, división y expansión de células, además forma complejos que son también catalizados por conjugación de otros aminoácidos. Y ocurre lo mismo con respecto a la fitohormona SA (Jagadeeswaran *et al.*, 2007; Westfall *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis* Jagadeeswaran y colaboradores (2007) demostraron que mutantes del gen GH3 presentaron defectos en la activación de varias rutas relacionadas con la respuesta de defensas, incluidas la inducción de genes PR y la resistencia contra cepas virulentas y avirulentas del patógeno *Pseudomonas syringae*, evidenciando que la acumulación de SA en respuesta al patógeno se ve comprometida, lo que sugiere que este gen juega un papel importante en la regulación de defensa contra patógenos.

En la figura 16c, se muestra el comportamiento del gen GHs muestra en el ensayo no elicitado, valores de la medida de expresión semejantes en las variedades, con mayor valor en la variedad 6515, la actividad metabólica en el ensayo no elicitado, se presenta puesto que este gen está involucrado con vías de señalización de fitohormonas. Estas controlan aspectos del crecimiento y desarrollo de las células vegetales.

En respuesta a Fod, se evidencia aumento en la medida de expresión de este gen en todas las variedades, ya que al ser parte de las vías de señalización del JA, AIA y SA, fitohormonas que están relacionadas con la respuesta a patógenos, el aumento en la expresión génica de GHs, corresponde a la presencia de elicitores fúngicos que activan las cascadas de señalización correspondientes en las variedades F1B2-6515-395. El valor cercano en la medida de expresión, indica que las vías de señalización están se están siendo activadas en las variedades aumentando el número de copias de ARNm, en respuesta al patógeno. Por otro lado, la variedad SH2, el aumento en la expresión del gen es pequeño en relación con las otras variedades.

Nuevamente, la variedad SH2, muestra una expresión diferencial en comparación con las otras variedades, podría ser el caso de una respuesta tardía, en la detección de elicitores fúngicos, que no permiten que ocurra de manera efectiva el aumento de la expresión génica de GHs y por ende verse involucrada la respuesta de las hormonas vegetales JA, AIA y SA. Como se demostró en *Arabidopsis*, defectos en la expresión de este gen, puede caracterizar el fenotipo asociado con la susceptibilidad, como es demostrado en este caso en presencia de Fod.

3.3.4. Aldosa 1-epimerasa

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 47 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen NbAELP en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

El gen NbAELP presenta en el ensayo no elicitado un valor en la medida de expresión cercano entre las variedades F1B2 – 6515 y 395 – SH2. En el ensayo de elicitación con Fod, se observa un aumento en la expresión del gen en todas las variedades, por ende, la interacción con el patógeno está relacionada con el aumento en el número de copias de ARNm de este gen.

La enzima Aldosa 1- epimerasa (AEP), está involucrada en el metabolismo de carbohidratos, cataliza la Inter conversión de anómeros alfa y beta de azúcares como la glucosa y galactosa (Dorokhov *et al.*, 2018).

Lee y colaboradores (2003) determinaron la participación de un homólogo de AEP, en la infección del virus del mosaico del tabaco (TMV), lo que sugiere que AEP es una proteína que podría estar involucrada en la regulación de la respuesta del huésped y el transporte intercelular, relacionada con la regulación de la pectina metilesterasa (PME), enzima involucrada en la degradación de la pared celular que acompañan a una mayor sensibilidad al TMV y resistencia a otros patógenos, debido a que conduce a emisión de metanol y causa un efecto de señalización de respuesta defensiva en las células que no han sido afectadas por el patógeno.

Sheshukova y colaboradores (2017) demostraron que la AEP está relacionada a el estrés causado por patógenos, por el aumento de niveles de ARNm de AEP en hojas infectadas. Con el silenciamiento de AEP resulto en alta actividad de PME en la pared celular y disminución en la concentración de glucosa, lo que genero condiciones desfavorables para la reproducción de *Agrobacterium tumefaciens* en hojas infectadas. Lo que demuestra que existe un mecanismo subyacente de retroalimentación negativa relacionada con la PME y AEP, mientras más se exprese AEP, se afecta negativamente la expresión de PME que conduce a mayor actividad de la respuesta del patógeno.

Zalepa-King y Citovsky (2013) sugieren que AEP puede afectar el transporte intercelular, ya que durante la modificación postraduccional y la adquisición de N-glicanos, actúa indirectamente con la β -1,6-N-acetilglucosaminil transferasa, enzima fundamental en el transporte por plasmodesmos, que cataliza la unión de las cadenas laterales de oligosacáridos a las glicoproteínas, influyendo en la inmunidad de las plantas, al actuar sobre el tráfico nucleocitoplasmático de macromoléculas involucradas en la respuesta de defensa.

En la figura 16d se presenta el comportamiento del gen NbAELP, en general es el valor de la medida de expresión más bajo del grupo de genes evaluados, en el ensayo no elicitado muestra una medida de expresión diferencial, siendo la variedad SH2 con el valor más bajo, acompañado por la variedad 395 y finalmente 6515 y F1B2 con el valor mayor en la medida de expresión.

En el ensayo de elicitación con Fod, se evidencia el aumento en la expresión del gen que codifica para la aldosa 1-epimerasa, en relación con la respuesta a patógenos, se asocia la actividad de esta enzima en el transporte nucleo-citoplasmático de macromoléculas asociadas con la defensa y regula la expresión de PME evitando la degradación de la pared celular.

Al ser una enzima poco estudiada, participa en la complejidad de la relación hospedero parásito. Lo que se puede observar en los resultados, muestra que el aumento en la expresión del gen que codifica a la enzima AEP, está relacionado con la expresión en las variedades susceptibles. Debido a que las células vegetales que aumentan la expresión del gen, se ven afectadas por la degradación de la pared celular y la acumulación de PME. En las variedades resistentes la expresión aumenta en respuesta al estrés causado por Fod, pero regulado por el tipo de respuesta en el metabolismo de defensa.

En la variedad SH2, muestra una medida de expresión mayor en comparación con las demás variedades. Esta enzima podría estar jugando el papel de contrarrestar la degradación de la pared celular a causa de mayor acumulación de PME. El aumento en la expresión de este gen en respuesta al patógeno se podría asociar a un mecanismo de regulación al estrés causado por el patógeno en un fenotipo susceptible como 6515 – SH2.

3.3.5. “Thaumatococin Like Protein”

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 48 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen TLP en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

El gen TLP en el ensayo no elicitado presenta una medida de expresión semejante en las variedades 6515 – 395 – SH2, y menor en la variedad F1B2. En el ensayo de elicitación con Fod, aumenta la expresión del gen en todas las variedades, siendo la variedad SH2 la que presenta mayor expresión del gen, seguido por 6515, F1B2 y finalmente 395. El gen

que codifica para la “Thaumatococcus Like Protein”, aumenta la expresión en el momento de la elicitación con Fod

Las proteínas de la familia PR5, también conocidas como proteínas altamente complejas similares a la taumatina (TLP), relacionada con procesos de defensa y desarrollo en plantas, se han encontrado proteínas homólogas estrechamente relacionados con *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Avena sativa*, entre otros (Wang *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis*, Abad y colaboradores (1996), demostraron la actividad antifúngica de TLP en gran variedad de hongos patógenos, incluidos *Fusarium oxysporum*. En mutantes de tabaco, trigo, cebada y arroz, se demostró la actividad que tiene esta familia de proteínas en la inhibición del crecimiento de hifas del atacante (de Jesús-Pires *et al.*, 2020). Cuando se induce la sobre expresión en especies que poseen actividad PR5, presentan alta tolerancia y resistencia a patógenos como *Alternaria alternaria*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y otros. La interacción con patógenos induce la expresión de TLP en plantas que desempeñan un papel desde la rigidez de la pared celular hasta la transducción de señales y actividades antimicrobianas (Wang *et al.*, 2010).

Otros estudios también han demostrado que estas proteínas participan en respuesta al estrés osmótico, pH y estrés ambiental, debido a que todos los homólogos de TLP reportados tienen de 10 a 16 residuos de cisteína conservados, que forman enlaces disulfuro, lo que las hace estables a estas condiciones. Algunas TLP se fusionan con proteínas quinasas y forman TLPK, que cuentan con un dominio extracelular TLP que reconoce elicitores del patógeno y desencadena la actividad de señalización mediada por quinasas (Sharma *et al.*, 2020).

Sin embargo, el mecanismo por el cual las TLP ejercen la actividad antifúngica es aún desconocido por completo. Aunque se sugirió que la actividad antifúngica estaría asociada con el aumento de la permeabilidad de las membranas fúngicas por mecanismos de formación de poros, a partir de proteínas asociadas a la TLP (zeamatina y osmotina), hace que las hifas se rompan al formar poros en la membrana plasmática, afectando la disipación del gradiente de pH a través de la membrana (de Jesús-Pires *et al.*, 2020). Todas las proteínas PR5 tienen una hendidura superficial ácida, la superficie polarizada electrostáticamente es el sitio de unión del receptor de en membranas

plasmáticas de los hongos siendo fundamental para la actividad antifúngica de este grupo de proteínas (de Jesús-Pires *et al.*, 2020).

En la figura 16e el comportamiento del gen TLP muestra semejanza en la medida de expresión en el ensayo no elicitado, siendo F1B2 la variedad que presenta menor expresión del gen. La TLP está sujeta a la función del desarrollo de la planta.

En el ensayo de elicitación con Fod, aumenta la expresión del gen, puesto que esta proteína está relacionada estrechamente en el mecanismo de respuesta de defensa, perteneciente a la familia de proteínas PR5 y reconocida en varios modelos vegetales por su actividad antifúngica. Se presenta expresión diferencial del gen que codifica para la TLP en las variedades resistentes y susceptibles.

La variedad F1B2 muestra un aumento en la expresión en comparación con el ensayo no elicitado, que concuerda con lo esperado en la expresión del gen. En la variedad 395, el aumento en la expresión es menor, en comparación al ensayo no elicitado y con variedad F1B2. Con respecto a las variedades susceptibles, 6515 presenta un aumento en la expresión del gen en respuesta al patógeno, superior a las variedades resistentes. La variedad SH2 sobre expresa el gen, siendo la variedad que más aumenta la expresión de TLP.

Al ser la familia PR5 tan compleja, actúa en respuesta al patógeno. Con los datos obtenidos, no se podría relacionar que entre más copias del gen TLP se presente mayor resistencia al patógeno. Puesto que, como se evidenció en el ensayo de elicitación, las variedades que permitieron mayor avance del patógeno fueron las que más están expresando el gen TLP.

Al ser una proteína relacionada con la señalización en respuesta de defensa, la expresión en todas las variedades, no se puede explicar ni asociar esta proteína con el fenotipo diferencial de resistencia o susceptibilidad en las células de clavel, ya que todas las variedades elicidadas presentan aumento en la expresión en presencia del patógeno.

3.3.6. β -amilasa

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 49 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen BAM en las variedades resistentes, susceptibles elicidadas y no elicidadas.

El gen BAM en el ensayo no elicitado presenta diferencia en la expresión entre las variedades, siendo las variedades susceptibles 6515 – SH2 las que menor presentan expresión del gen en comparación con las variedades resistentes F1B2 – 395. En el ensayo de elicitación aumenta el número de copias de ARNm del gen, lo que indica que en presencia de Fod, se induce la expresión de este gen.

En las plantas superiores el almidón es uno de los principales metabolitos que se almacena. Se acumula durante el día en los cloroplastos y se degrada durante la noche, siendo la maltosa el principal producto de la degradación del almidón dentro del cloroplasto. Ya se ha demostrado que la β -amilasa (BAM) juega un papel clave en la degradación del almidón (Stitt y Zeeman, 2012).

En la interacción planta patógeno, BAM participa de forma activa en este proceso. En *Arabidopsis*, se detectó la sobreexpresión de este gen en presencia del patógeno *Plasmodiophora brassicae*, y en mutantes que no acumulaban almidón eran más resistentes al patógeno *Erysiphe cruciferarum* y más susceptibles al *Colletotrichum higginsianum*. A partir de lo anterior surgió la hipótesis que la disponibilidad reducida de carbohidratos influye en la susceptibilidad de manera diferencial en la interacción con hongos patógenos (Dauleux, 2013).

Un estudio por Goicoechea y colaboradores (2000) realizado en hojas de pimiento infectadas con *Verticilium dahliae*, mostro que había una fuerte acumulación de prolina y azúcares totales, mientras que la concentración de almidón era muy baja en comparación con el control. Lo que relaciona la alta actividad de BAM con susceptibilidad al patógeno en plantas superiores.

En el estudio más reciente sobre la actividad de BAM, Gkizi y colaboradores (2016) la catalogaron como un regulador negativo de la resistencia a enfermedades causadas por el hongo *Verticilium dahliae*. Gracias al silenciamiento de BAM en variedades susceptibles, lograron correlacionar con una disminución en la gravedad de los síntomas. Sin embargo, no se ha podido determinar que la susceptibilidad reducida en los mutantes *bam* se debe a la falta de suministro de nutrientes degradados por la β -amilasa para promover el desarrollo del patógeno o si los mecanismos de defensa se activan de manera más eficiente en respuesta a la infección.

En la figura 16f el comportamiento del gen BAM muestra una medida de expresión diferencial entre las variedades resistentes y susceptibles en el ensayo no elicitado, se

observa semejanza en la expresión en variedades F1B2 y 6515, mayor a lo que presentan 395 y SH2. Esta diferencia de expresión se puede entender como la acumulación de maltosa o glucosa en el metabolismo basal de las células.

Por otro lado, en el ensayo de elicitación con Fod, se evidencia aumento en la expresión del gen, en todas las variedades. Sin embargo, en este caso es claro que el conjunto de variedades resistentes F1B2 y 395, presenta menor expresión del gen que codifica la enzima β -amilasa en comparación con el conjunto de variedades susceptibles 6515 – SH2 que sobre expresan este gen.

Con lo reportado en bibliografía, se puede evidenciar la correlación que existe entre fenotipos asociados con la susceptibilidad y mayor expresión del gen, puesto que, al degradarse el almidón, facilita la obtención de nutrientes por parte del patógeno, que promueve el desarrollo de este al interactuar con la planta.

En el conjunto de variedades resistentes ocurre que hay menor expresión del gen β -amilasa, por ende, no se están generando las condiciones para favorecer el desarrollo del hongo, debido a la disponibilidad reducida de carbohidratos. La investigación muestra el papel negativo que tiene la sobreexpresión de BAM en la resistencia parcial de plantas de clavel elicidadas con Fod. Información que ha sido soportada por bibliografía, demostrando y proponiendo que la actividad de la β -amilasa podría ser un marcador en los fenotipos resistentes o susceptibles de clavel a Fod.

3.3.7. Homólogo a peroxidasas

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 50 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen AtPrxs en las variedades resistentes, susceptibles elicidadas y no elicidadas.

El gen AtPrxs, presenta en el ensayo no elicitado mayor medida de expresión del gen en la variedad F1B2, seguido por la variedad SH2 y 395 conjuntamente, por último, la variedad 6515. En el ensayo de elicitación con Fod, aumenta la expresión de este gen principalmente en la variedad F1B2, seguido por el aumento en las variedades SH2 y 395. La variedad 6515 no aumento la expresión del gen. Lo que indica que el gen que codifica para el homólogo de peroxidasa es inducido en presencia de Fod.

Entre las proteínas inducidas durante la respuesta de plantas a patógenos, las peroxidasas clase III, son glicoproteínas monoméricas con tamaño entre 28 – 60 KDa, que se encuentran en vacuolas o pared celular (Jovanović *et al.*, 2018). Estas están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos en el ciclo de vida de la planta, debido a que existe un número elevado de isoformas enzimáticas (isoenzimas), por ende, existen muchas reacciones catalizadas por estas (Shivakumar *et al.*, 2003).

Las Peroxidasas (Prxs) están implicadas en el metabolismo de auxinas, formación de lignina, suberización, reticulación de componentes de la pared celular, síntesis de fitoalexinas, regulación de especies reactivas de oxígeno (“ROS”) y especies reactivas de nitrógeno (“RNS”) (Pandey *et al.*, 2017).

Las peroxidasas implicadas en la interacción planta – patógeno, catalizan la oxidación muchos sustratos para reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxidan compuestos fenólicos que inhiben la actividad enzimática, como las pectinasas y enzimas proteolíticas de patógenos (Almagro *et al.*, 2009). Estas también están involucradas en la respuesta hipersensible (HR), síntesis de lignina, producción de etileno y suberización. Son inducidas en los tejidos elicitados por patógenos, se expresan para limitar la propagación celular, mediante el establecimiento de barreras estructurales o la generación de ambientes celulares altamente tóxicos por la producción de ROS y RNS, que además desencadenan vías de señalización del Ácido salicílico, Ácido jasmonico y etileno (Durrant y Dong, 2004; Seo *et al.*, 2008; Almagro *et al.*, 2009; Mhamdi *et al.*, 2012).

Utilizando plantas de tabaco mutantes deficientes en Prxs, Mittler y colaboradores (1999) demostraron que eran hipersensibles a la exposición de patógenos, debido a la acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) causaba rápidamente muerte celular, siendo H_2O_2 una molécula de señalización generada en condiciones de estrés para desencadenar la expresión génica de genes relacionados con la defensa (Mittler *et al.*, 1999). En *Pennisetum glaucum* elicitado con *Sclerospora graminicola*, se demostró la participación de las Prxs con enzimas relacionadas con la defensa, como la β - 1,3 – glucanasa, fenilalanina amonio liasa (PAL) y ribonucleasas. Además, se propuso la actividad de la peroxidasa en respuesta a patógenos, como un marcador bioquímico de resistencia contra enfermedades causadas por hongos (Mahesha *et al.*, 2017). La actividad de Prxs es un sistema complejo de regulación y señalización, pero desempeña un papel muy importante en la defensa de plantas a patógenos.

En la figura 16g, se presenta comportamiento del gen AtPrxs, en el ensayo no elicitado, la variedad F1B2 la variedad F1B2, la cual presenta una medida de expresión más alta, seguido de SH2 en conjunto con 395 y por último 6515, esto debido a que la enzima Prxs, participa activamente en diferentes procesos del metabolismo basal.

Con respecto al ensayo de elicitación con Fod, la diferencia en la medida de expresión muestra que en las variedades F1B2, 395 y SH2 aumentan la expresión del gen en presencia del patógeno en comparación al ensayo no elicitado, puesto que al detectarse el patógeno se desencadena una respuesta mediada en la oxidación de compuestos fenólicos, síntesis de lignina y suberina, aumento regulado del estrés oxidativo para la activación de rutas de señalización relacionada con ácido salicílico, ácido jasmonico y etileno. Sin embargo, la variedad 6515, no tuvo cambio en la medida de expresión del gen en comparación con el ensayo de elicitación y las otras variedades.

La variedad F1B2 que sobre expresa este gen, se podría asociar a un fenotipo que responde a la presencia del patógeno con el aumento en la expresión de peroxidasas. La sobre expresión del gen, aumenta la biosíntesis de lignina y suberización. Además, aumento en la respuesta química con el estrés oxidativo, que desencadena señales tras el reconocimiento de elicitors provenientes del patógeno, lo que podría asociarse con el éxito que tienen estas células en retrasar el desarrollo de Fod como se evidenció en el ensayo de elicitación.

Las variedades 395 y SH2 aumentaron la expresión del gen en respuesta a Fod, lo que indica que tienen la capacidad de respuesta a la interacción con el patógeno. No obstante, al ser una variedad resistente y susceptible, determina que la vía de las peroxidasas no es la responsable directamente de la resistencia al patógeno. Sin embargo, permite la señalización en respuesta al patógeno en la activación de rutas metabólicas relacionadas con la defensa.

Por otro lado, la variedad 6515 no presento cambios en la expresión del gen, lo que causa que no haya presencia de estrés oxidativo que desencadene la expresión de genes relacionados con a la resistencia a patógenos y que la respuesta de aumento de lignina como barrera física sea deficiente. Por inactividad de AtPrxs en respuesta a Fod esta variedad podría relacionarse con la sensibilidad por acumulación de H₂O₂ que llega a causar problemas en la señalización de respuesta y por último, muerte celular.

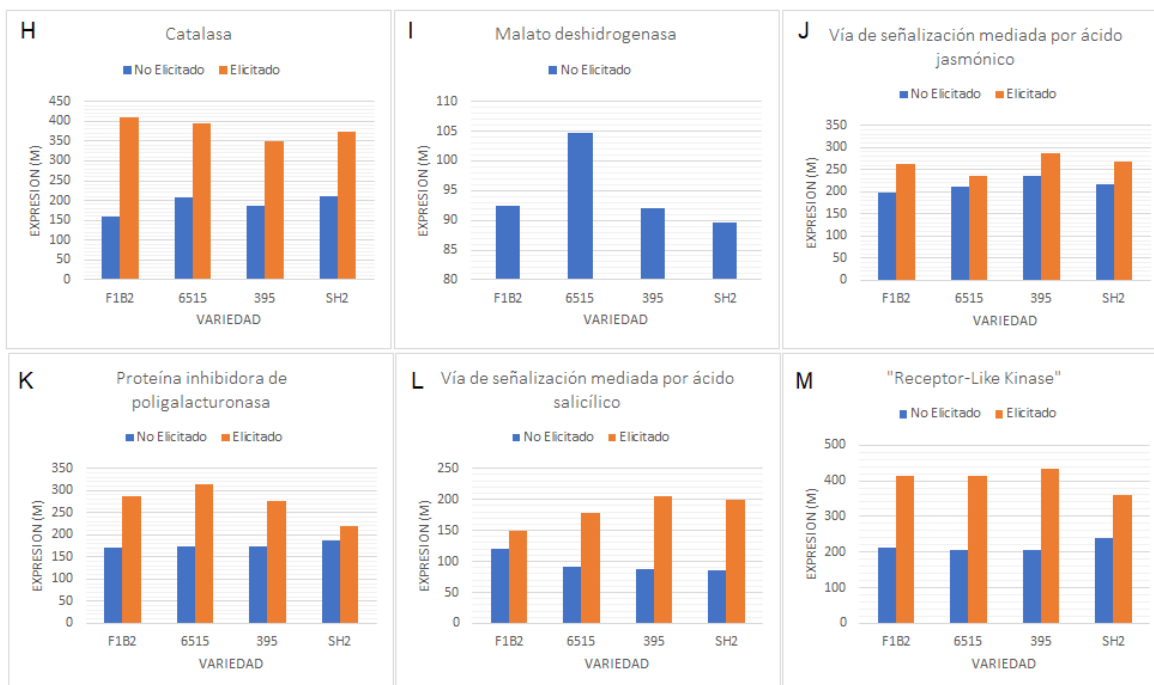


Figura 17. Análisis de Expresión génica (M) genes de proteínas relacionadas con patogenicidad (PRPs), H: CAT, I: GhmMDH, J: AtPEP, K: PGIP, L: SA, M: RLK de variedades clavel resistentes F1B2-395 y susceptibles 6515 – SH2, elicitadas (naranja) y no elicitadas (azul).

3.3.8. Catalasa

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 51 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen CAT en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

El gen CAT, en el ensayo no elicitado la medida de expresión del gen es cercana entre las variedades estudiadas, siendo F1B2 la que presenta menor expresión, seguida de 395 y 6515 y SH2 conjuntamente. En el ensayo de elicitación con Fod, se observa aumento en la medida de expresión del gen en todas las variedades. Indicando que el gen que codifica a la enzima Catalasa es inducido en respuesta al patógeno.

La catalasa es una enzima oxidoreductasa, que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en H_2O y O_2 (Kaur *et al.*, 2009). Esta enzima es fundamental en la ruta metabólica encargada de la protección de células eucariotas y procariotas, al daño oxidativo por especies reactivas de oxígeno ("ROS"), el H_2O_2 es tóxico para la planta, pero

en bajas concentraciones es un importante señalizador intracelular (Sharma y Ahmad, 2014).

Esta es una de las enzimas fundamentales para el desarrollo y respuesta bajo condiciones de estrés relacionada estrechamente con las peroxidasas ayudan a modular la concentración de peróxido de hidrógeno dentro de la célula (Pandey *et al.*, 2017).

La expresión de catalasa es fundamental en respuesta de defensa, debido a que la interacción con patógenos implica aumento del estrés oxidativo apoptótico, que conduce a la célula a la activación de señales relacionadas metabolismo defensa (Mhamdi *et al.*, 2012).

En plantas de *Arabidopsis* mutantes con el gen silenciado (*cat*), Bueso y colaboradores (2007) demostraron un aumento del doble en la acumulación de ROS, con relación a la señalización de fitohormonas. Las plantas con el gen silenciado presentaron diferencias en la detección de eventos tempranos y tardíos en la vía de señalización oxidativa, demostrando que la acumulación de peróxido de hidrógeno afecta la cascada de señalización de fitohormonas involucradas en respuesta al estrés oxidativo, como la modulación de la vía de señalización del etileno y la síntesis de auxinas.

En un estudio de transcriptoma, Mhamdi y colaboradores (2010) compararon la expresión de plantas silvestres de *Arabidopsis* y mutantes con el gen silenciado. Demostrando que la vía de señalización del ácido jasmonico en ambos ensayos fue regulada, inclusive al tener silenciado el gen que codifica para la catalasa. Incluso al perder la actividad enzimática de la catalasa en el mutante, se acumula peróxido de hidrógeno que afecta a la célula bloqueando la ruta de señalización del ácido salicílico.

En general, la actividad de CAT modula el metabolismo primario de la célula, como procesos relacionados con la interacción por patógenos. Demostrando que, en mutantes con el gen silenciado, aumenta la respuesta hipersensible, afectando ruta de señalización de fitohormonas relacionadas con la respuesta de defensa, puesto que sin la actividad de la catalasa se pierde la regulación del estrés oxidativo, lo que lleva a la muerte celular temprana (Mhamdi *et al.*, 2010).

En la figura 17h, se presenta el comportamiento del gen CAT, la medida de expresión en las variedades no elicidadas, con menor expresión en la variedad F1B2, seguida por 395, y 6515 y SH2. En lo que concierne a la actividad de la expresión del gen CAT en presencia del patógeno, se observa el aumento de la medida de expresión en todas las

variedades, lo que indica el gen responde al patógeno, participando en la regulación del estrés oxidativo, que causa un aumento en la concentración de H_2O_2 , que desencadena en el comienzo de una cascada de señalización para la activación de respuesta de defensa, como las fitohormonas ácido salicílico, ácido jasmonico y etileno.

La expresión en todas las variedades elicítadas en relación con el ensayo, sobre expresa el gen CAT, como estrategia de respuesta al estrés oxidativo. Sin embargo, hay diferencias entre la medida de expresión del gen en todas las variedades. Por ende, no se puede relacionar este gen únicamente a fenotipos resistentes o susceptibles, todas las variedades están respondiendo con la sobreexpresión de este gen, regulando el estrés oxidativo causado por Fod.

3.3.9. Malato deshidrogenasa

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 52 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen GhmMDH en las variedades resistentes, susceptibles elicítadas y no elicítadas.

El gen GhmMDH, se evaluó únicamente en el ensayo no elicitado, presentando diferencias en la medida de expresión entre las variedades estudiadas, siendo la variedad 6515 la que más expresa este gen, en comparación con las demás variedades.

La malato deshidrogenasa (MDH) cataliza la conversión reversible de oxalacetato en malato utilizando NAD/H o NADP/H como oxidante/ reductor (Wang *et al.*, 2015). En el ciclo del ácido cítrico, esta enzima es la encargada de catalizar la regeneración de oxalacetato, esta reacción se produce mediante la oxidación del grupo hidroxilo del malato y la reducción de $NAD^{(+)}$. Además, también participa en la gluconeogénesis, la síntesis de glucosa a partir de moléculas de bajo peso molecular (Imran *et al.*, 2016).

La piruvato carboxilasa actúa sobre el piruvato en las mitocondrias para formar el oxalacetato, para retirar el oxalacetato de las mitocondrias, la malato deshidrogenasa lo reduce a malato y atraviesa la membrana mitocondrial interna, en el citosol, el malato se oxida a oxalacetato por la malato deshidrogenasa citosólica y finalmente, la fosfoenol piruvato carboxiquinasa convierte el oxalacetato en fosfoenolpiruvato (PEP) (Journet *et al.*, 1981).

Esta función enzimática del metabolismo primario da vía la activación del metabolismo secundario de la planta, ya que de (PEP) parte la ruta del ácido shikímico, para la biosíntesis de productos secundarios nitrogenados (Alcaloides) y compuestos fenólicos (Taiz *et al.*, 2015).

Diferentes estudios han propuesto funciones complejas para MDH, como la sobreexpresión en plantas de *Medicago sativa* condujo a la acumulación de ácidos orgánicos cuatro veces mayor en comparación con el tipo silvestre (Tesfaye *et al.*, 2001).

Yao y colaboradores (2011) estudiaron sobreexpresión de MDH en *Arabidopsis* en nivel de síntesis de malato, en callos de manzana donde se demostró que la sobreexpresión de MDH, aumentó la degradación y transporte de malato, la gluconeogénesis y la actividad del ciclo de Krebs, en general se sugiere que cambios en las cantidades de isoformas de MDH puede afectar el flujo metabólico de varios ácidos orgánicos, la producción de energía en forma de ATP o GTP, la liberación de grandes cantidades de electrones y protones involucrados en la cadena transportadora de electrones, que llega a causar un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Yao *et al.*, 2011).

En mutantes *mdh* se presenta un crecimiento lento y una tasa de respiración elevada sin pérdida de capacidad fotosintética, lo que indica que hay pérdida en la asimilación neta con CO₂, que afecta el desarrollo de las plantas (Wang *et al.*, 2010).

En la figura 17i se muestra el comportamiento de la expresión del gen que codifica para la malato deshidrogenasa (MDH) en el ensayo no elicitado de la planta. Se puede evidenciar la expresión diferencial que existe entre las variedades evaluadas, es notable que la expresión en general de este gen es baja. Sin embargo, juega un papel fundamental para la vía de desarrollo del metabolismo primario y secundario de la planta.

La variedad 6515, tiene un valor en la medida de expresión mayor en comparación con las otras variedades, en las cuales la medida es cercana. La diferencia en la expresión de este gen podría indicar que esta variedad tiene una actividad metabólica mayor, desde la gluconeogénesis, la producción de ATP o GTP, la síntesis de aminoácidos, la beta oxidación de ácidos grasos, todo por el papel que juega en la vía del ácido cítrico.

Al no compararse con el estado elicitado con Fod, solo queda suponer que la mayor actividad metabólica en esta variedad susceptible juega un papel en contra, en el momento de interacción con el patógeno, debido a que las rutas metabólicas de defensa

que involucran la participación del ciclo de Krebs, como la biosíntesis de alcaloides, la vía del ácido malónico y la vía del ácido mevalónico ya están activas en el metabolismo basal.

En el momento de detección de las señales por el patógeno, tarda en reconocer que está bajo ataque por los elicitores fúngicos, lo que desencadena una respuesta tardía para combatir el patógeno, por esta razón se podría explicar el avance del crecimiento del hongo en el ensayo de elicitación. En conclusión, mayor actividad metabólica basal, no significa tener mejor capacidad de respuesta frente a patógenos.

3.3.10. Vía de señalización mediada por ácido Jasmonico

Las curvas de fluorescencia gráficas 18 – 34 y la gráfica 53 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen AtPEP en las variedades resistentes, susceptibles elicítadas y no elicítadas.

El gen AtPEP en el ensayo no elicitado muestra una medida de expresión cercana en todas las variedades, mayor en la variedad 395, seguido conjuntamente por las variedades 6515 y SH2, por último, la variedad F1B2. Con respecto al ensayo de elicitación con Fod se presenta aumento en la medida de expresión en todas las variedades, siendo la variedad 6515 la que menor aumento presenta en comparación con las demás. Lo que indica que la interacción con Fod induce el aumento en la medida de expresión del gen relacionado con la vía de señalización mediada por ácido jasmonico.

En la vía de señalización mediada por ácido jasmonico, el gen AtPEP, hace referencia a péptidos endógenos identificados en *Arabidopsis*, que inducen la inmunidad activada por patrones (PTI) y aumentan la resistencia a patógenos, al conducir la señal de activación de respuesta inmune innata (Holmes *et al.*, 2018). Debido a la actividad inductora de inmunidad, se han clasificado como patrones moleculares asociados al daño (DAMP), análogos a los inductores exógenos de origen microbiano (MAMP), o también patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Los patrones mencionados se unen a receptores de reconocimiento de patrones localizados en la membrana plasmática (PRR), (Krol *et al.*, 2010).

Una de las primeras repuestas desencadenadas por los MAMPs, PAMPs y DAMPs es la producción de “ROS” apoplástico por NADPH oxidasas, ya que las “ROS” son tóxicas para los patógenos invasores, bloqueando la proliferación del parásito dentro de la planta (Flury *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por Chinchilla y colaboradores (2006) en *Arabidopsis* es el reconocimiento de proteínas bacterianas como flagelina y el factor de elongación, que son reconocidos por las quinasas receptoras FLS2 Y EFR, también en casos donde el propio tejido afectado de la planta, como fragmentos de la pared celular o péptidos pequeños que son liberados por la célula vegetal durante la invasión por patógenos, por ejemplo el receptor quinasa (PEPR1 Y PEPR2) de *Arabidopsis* se unen a péptidos AtPEP endógenos que desencadenan la activación de la respuesta inmune. En general, se demostró que en *Arabidopsis* las AtPEP inducen la expresión diferencial de varios precursores proteicos (PEPR1 Y PEPR2) en la vía de señalización de respuesta de defensa, que respalda el papel de percepción de JA en la señalización mediada por AtPEP.

Se ha observado en varios modelos, el papel antagonista que tiene el ácido salicílico (AS) y el Ácido Jasmonico (AJ) en la defensa contra patógenos, donde la activación de las rutas de señalización de estas fitohormonas es activada por patrones (PTI) (Jones y Dangl., 2006). Demostrado en *Arabidopsis*, la detección de AtPEP provoca un aumento en los genes marcadores de respuesta activados por SA Y JA (PR-1) y Defensinas 1.2 (PDF1.2), siendo la expresión de AtPEP, precursora en la señalización para la activación de genes de defensa inducidos por la detección del patógeno (Chinchilla *et al.*, 2006).

La biosíntesis de JA bajo estrés biótico y abiótico, necesita la percepción de la señal de respuesta mediada por AtPEP junto con las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), para que las MAPK logren desencadenar la cascada de señalización en respuesta al estrés. Esto da lugar a la activación de la ruta de señalización de JA (Holmes *et al.*, 2018).

En la figura 17j se muestra el comportamiento del gen AtPEP, donde se presenta una medida de expresión cercana entre las variedades en el ensayo no elicitado, debido a que la percepción del JA está también relacionada con el crecimiento y desarrollo de las plantas.

La detección de elicitores fúngicos es el primer paso en la interacción planta – patógeno, que lleva a la activación de rutas metabólicas relacionadas a la respuesta de defensa. En el ensayo de elicitación con Fod, se evidencia el aumento de expresión del gen relacionado con las AtPEP. Esto indica que todas las variedades tienen la capacidad de

reconocer el patógeno y activar las rutas de señalización mencionadas. Sin embargo, el aumento en la expresión del gen es pequeño en comparación con otros genes evaluados.

El aumento en la expresión de AtPEP ocurre en el instante en el que la planta logra detectar el patógeno como estrategia de defensa para la señalización, regulación y activación de genes de defensa. Luego de que la señal de defensa fue activada, AtPEP se regula, puesto que ya cumplió la función de perceptor y activador de las señales inducidas por el patógeno.

Puede que en la gráfica se observe que el aumento en la medida de expresión fue poco, pero se debe considerar que la extracción de ARNm del ensayo de elicitación se realizó al día 5 después de colocar a Fod a crecer en presencia de las células. Debido a esto, las células detectaron el patógeno a partir de las AtPEP para activación de las rutas de defensa y luego de esto el gen AtPEP se regula a un valor cercano al ensayo no elicitado al haber cumplido su función.

En conclusión, el aumento en la expresión de AtPEP indica que las plantas detectan los elicitores fúngicos y se desencadena la ruta de señalización de defensa. No se aprecia en las gráficas la sobreexpresión del gen, puesto que el gen se regula después de haber detectado el patógeno. Puede que la respuesta inmune este activa en las variedades resistentes y susceptibles, ya que es la respuesta innata de todas las células, se recomienda estudiar este gen espacio temporalmente para llegar a la conclusión si hay diferencias en los tiempos de expresión con en al patógeno, que podría asociarse a fenotipos de resistencia o susceptibilidad.

3.3.11. Proteína inhibidora de poligalacturonasas

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 54 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen PGIP en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

El gen PGIP, en el ensayo no elicitado presenta una medida de expresión cercana en todas las variedades de clavel. Mientras que en el ensayo de elicitación la medida de expresión en las variedades es diferente, siendo la variedad 6515 la que presenta mayor aumento, seguido de las variedades F1B1 y 395, la variedad SH2 tuvo menor aumento en la expresión de este gen en comparación con el ensayo no elicitado. Lo que indica que el gen que codifica a proteínas inhibidoras de poligalacturonasas, es inducido por Fod.

Los patógenos como *Fod* producen una amplia gama de enzimas degradantes de la pared celular vegetal, entre ellas las endopoligalacturonasas (PG) en etapas tempranas del proceso de infección, las PG rompen los enlaces α - (1-4) entre los residuos de ácido D-galacturónico del homogalacturonano, componente principal de la pectina, que provoca la separación de la pared celular y maceración del tejido del huésped (Ferrari *et al.*, 2012).

Con el fin de contrarrestar la actividad de las PG, las plantas despliegan proteínas inhibitoras de poligalacturonasas (PGIP) son proteínas de pared celular que inhiben la actividad despolimerizante de la pectina de las poligalacturonasas secretadas por patógenos microbianos. Además de la inhibición de PG, la interacción entre PG y PGIP promueve la formación de oligogalacturónidos (OG), que son desencadenantes de una variedad de respuestas de defensa (Li y Smigocki, 2018).

Se han realizado diferentes estudios para determinar la actividad de inhibición de isoformas de PGIP individuales, identificando más de 170 genes involucrados con PGIP aislados de diferentes especies de plantas, *Arabidopsis*, frijol, soja, trigo, entre otros (Ferrari *et al.*, 2003). *In vitro*, la actividad de las PGIP en algunos casos no ha mostrado éxito, ya que no inhibieron PG, en trigo los genes se expresaron con éxito, pero no mostraron actividad de inhibición, lo que llevo a plantear que la actividad de algunas PGIP sea solo activa en ambiente *in planta*, en el caso de *Botrytis cinera* en *Vitis vinífera* (Joubert *et al.*, 2006).

Las limitaciones de datos impiden sacar conclusiones con correlación entre las PGIP de plantas específicas y patógenos específicos, en el caso particular de la PG producida por el patógeno *Fusarium verticillioides*, no hay conocida ninguna PGIP que inhiba la actividad de esa PG. Por otro lado, en un estudio con *Fusarium oxysporum* y *Solanum lycopersicum*, la PGIP de tomate logro inhibir las PG del patógeno con éxito, pero dependiendo del estadio fenológico de la planta (Kalunke *et al.*, 2015; Salehzadeh, 2015).

Las PGIP han sido estudiadas para la protección de cultivos, la búsqueda de PGIP con amplio espectro de muchas PG producidas por fitopatógenos, ha llevado a la construcción de PGIP con actividad inhibitora fuerte y amplia, sin embargo, muchas PG producidas por fitopatógenos, pueden llegar a tener cambios en un solo aminoácido y cambia la especificidad de las proteínas inhibitoras (Rathinam *et al.*, 2020).

En la figura 17k, muestra el comportamiento de la expresión del gen que codifica para proteínas inhibitoras de poligalacturonasas (PGIP), en el ensayo no elicitado expresión

del gen semejante en todas las variedades. Al ser una proteína de defensa ubicada en la pared celular.

Con respecto al ensayo de elicitación con Fod, se evidencia el aumento en la expresión del gen en todas las variedades, lo que indica que las células, están respondiendo a la presencia de PGs producidas por el patógeno.

Las variedades que presentaron un aumento en la expresión de este gen podrían asociarse a un fenotipo de resistencia, pero al estar la variedad 6515 muestra que mayor expresión del gen no significa resistencia. Cómo se observó en el ensayo de elicitación que esta variedad no detuvo el avance del patógeno, lo que indica que 6515 tiene la capacidad de reconocer los PG para expresar PGIP, que en este caso no detienen el desarrollo del patógeno. Por otro lado, la variedad SH2 presento un aumento en la expresión pequeño en comparación a las otras variedades. Por ende, la baja expresión de PGIP en presencia de Fod si pudiese asociarse con el fenotipo de susceptibilidad, ya que la planta no aumenta la expresión de las PGIP en comparación con las otras plantas para el reconocimiento de las PG.

En las variedades F1B2 y 395, se puede considerar que la expresión inducida por Fod, participa en la respuesta de inhibición del crecimiento del hongo, pero no se puede concluir que este gen es el único responsable de la resistencia que presentan estas 2 variedades.

Se podría proponer para estudios futuros, la secuenciación y análisis de la secuencia de aminoácidos del amplicon del gen PGIP en respuesta a las PG producidas por Fod, ya que allí se podría determinar si existe un cambio en la secuencia entre las variedades de clavel que afecte la especificidad de las proteínas inhibidores de las PG, como en el caso de 6515 que sobre expresa el gen, pero no inhibe el crecimiento del hongo.

3.3.12. Vía de señalización mediada por ácido salicílico

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 55 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen SA en las variedades resistentes, susceptibles elicitadas y no elicitadas.

El gen SA, en el ensayo no elicitado muestra una medida de expresión cercana en las variedades 6515, 395 y SH2, mientras que la variedad F1B2 supera la expresión de este

gen en comparación. Con respecto al ensayo de elicitación, en todas las variedades aumenta la medida de expresión del gen en presencia del patógeno. Las variedades 395 y SH2 muestran valor de expresión mayor, seguido de la variedad 6515, por último, la variedad F1B2, que aumenta poco en comparación a las otras variedades. Por ende, el aumento en la expresión del gen involucrado en la vía de señalización mediada por el ácido salicílico es inducido por la presencia de Fod.

En la vía de señalización del ácido salicílico, los factores de transcripción WRKY, son proteínas que se unen al ADN, regulan distintos procesos en plantas como respuesta al estrés biótico y abiótico, senescencia, latencia, germinación de semillas, algunos procesos del desarrollo y contribuyen en parte del metabolismo secundario (Jiang *et al.*, 2014).

El ácido salicílico (SA) es una fitohormona y molécula de señalización en las plantas, sintetizada a partir de cinamato en una reacción catalizada por la PAL. La mayor parte de SA se produce a partir del isocorimato en la planta y participa en funciones fisiológicas como, resistencia a temperatura, sal, sequia, radiación UV, entre otros (Taiz *et al.*, 2015).

Además, SA ha sido estudiado ampliamente en la defensa de las plantas, porque juega un papel fundamental en la señalización para la aparición de la respuesta hipersensible (HR) y la resistencia sistema adquirida (SAR) (Chen *et al.*, 2009). La acumulación de SA inducida por patógenos conduce a un rápido aumento de los niveles de "ROS" a través de la inhibición de la proteína de unión a SA (SABP), que transforma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en H_2O y O_2 . Siendo el cambio en el potencial óxido reductor da como resultado la reducción del oligómero Nonexpressor of PR1 (NPR1) a su forma monomérica activa, que se transloca al núcleo y mejora la unión de los factores de transcripción TGA a los promotores que responden a SA como factor co-transcripcional. Activando genes sensibles a SA, dándolo como gen relacionado con la patogenicidad (PR1) (Loake y Grant, 2007; Chen *et al.*, 2009).

Además, NPR1 regula la expresión mediada por SA de WRKY70 de *Arabidopsis*, que codifican a proteínas inductoras de genes marcadores de defensa dependientes de SA. En mutantes dobles de wrky54wrky70, muestran un nivel alto de SA libre en comparación de mutantes wrky54 y wrky70, lo que demuestra que WRKY70 y WRKY54, juegan un papel como reguladores en la biosíntesis de SA (Wang *et al.*, 2006).

El análisis bioinformático y los estudios de expresión han demostrado que WRKY28 y WRKY46 son activadores transcripcionales de genes ICS1 y PBS3, que están involucrados en la biosíntesis de SA y la acumulación de SA-glucósidos (SAG) (van Verk *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2015).

Las vías de respuesta de SA Y JA son de los ejemplos mejor estudiados de señalización relacionada con defensa en una interacción planta patógeno, muchas isoformas de WRKY participan en la biosíntesis, señalización, regulación, transcripción de genes asociados a la respuesta a patógenos, estas proteínas juegan papeles fundamentales en procesos que involucran gran cantidad de genes asociados con la defensa de plantas, que llevan consigo múltiples respuestas en la expresión de fenotipos asociados a la resistencia de plantas a patógenos (Dzhavakhiya *et al.*, 2007; Negi y Kurana, 2021).

En la figura 17 L, se observa el comportamiento del gen asociado con la vía de señalización mediada por ácido salicílico, reportado como WRKY. En el ensayo no elicitado, la medida de expresión cercana en todas las variedades a excepción de la variedad F1B2. Lo que sugiere que este gen en el metabolismo basal está desempeñando un rol diferencial en el desarrollo y crecimiento de las células, que no están bajo la presión de un patógeno o estrés.

Por otro lado, en todas las variedades se observa un aumento en la expresión del gen SA (WRKY), lo que indica que bajo el reconocimiento de elicitores fúngicos se activa de forma exitosa la sobreexpresión de este gen. Desempeñando tareas en la señalización de la vía de SA, en respuesta de Fod, el aumento en la expresión del gen se relaciona con mayor aumento de niveles de “ROS”, que desencadena sin número de vías que activan y regulan genes de respuesta al patógeno.

La respuesta diferencial en las variedades evaluadas, se puede presentar en fenotipos resistentes y susceptibles conjuntamente, en caso de F1B2 que el aumento en la expresión génica es bajo en comparación con el aumento en las demás variedades, no podría asociarse que menor expresión de este gen lo relacione con un fenotipo susceptible, puesto que en el ensayo de elicitación muestra lo contrario, de la misma forma que las variedades susceptibles sobre expresan el gen, tampoco se podrían asociar con un fenotipo de resistencia. Dejando a 395 como la variedad resistente que presenta mayor actividad en la sobreexpresión del gen, pero comparado con las demás variedades,

no se podría concluir que el gen que participa en la vía de señalización mediada por ácido salicílico (WRKY) sea el responsable de la resistencia al patógeno.

Sin embargo, puede explicarse en la forma en la que cada uno de los fenotipos regula la expresión y los procesos fisiológicos de defensa involucrados a estos tipos de proteínas. El aumento en la expresión no es siempre mayor o menor resistencia, hay muchos procesos involucrados que aún desconocemos y que con proteínas como WRKY con tantas isoformas que regulan procesos en muchas vías de señalización, complica aún más la forma en la que entendemos la relación planta – patógeno.

En las gráficas presentadas, se evidencia aumento en la medida de expresión del gen en presencia de Fod. Sin embargo, se desconoce que isoforma de WRKY se está expresando en clavel, para esto se sugiere para próximos estudios, secuenciar el amplicon y comparar la secuencia de aminoácidos con un BLAST y así definir que isoforma está reportada bajo la secuencia encontrada en clavel. Por el momento se puede concluir que está regulando de forma positiva procesos en una de las rutas más importantes de señalización en la relación planta – patógeno.

3.3.13. “Receptor- like Kinase”

Las curvas de fluorescencia graficas 18 – 34 y la gráfica 56 de regresión lineal, corresponden al comportamiento de expresión del gen SA en las variedades resistentes, susceptibles elicadas y no elicadas.

El gen RLK en el ensayo no elicado, presenta en todas las variedades una medida de expresión cercana, salvo la variedad SH2 que el valor de expresión es mayor. En el ensayo de elicación con Fod, la expresión aumenta en todas las variedades, sin embargo, hay diferencias en la expresión entre las variedades, la variedad 395 muestra el valor más alto, seguido de las variedades F1B2 y 395 y por último la variedad SH2 que el aumento es poco en comparación con el comportamiento del gen en las otras variedades. Al aumentar la expresión del gen indica que el gen RLK es inducido por Fod.

Las quinasas de tipo receptor (RLK) consisten en una gran superfamilia de proteínas son estructuralmente similares, que cuentan con una región extracelular, un dominio transmembranal y un dominio quinasa intracelular.

La gran cantidad de RLK reportadas se caracterizan por el diverso complemento de dominio extracelular, que incluyen repeticiones ricas en leucina (LRR), dominios de autoincompatibilidad (S) y dominios de lectina (Goff y Ramonell, 2007). Esta diversidad de dominios extracelulares refleja la necesidad de adaptación a ligando que están en constante cambio como los relacionados con patógenos (He y Wu, 2016).

Las células deben tener la capacidad de reconocer elicitores generales y específicos para poder desencadenar una respuesta a través de genes relacionados con la defensa y lograr una resistencia frente al atacante. Un ejemplo clásico de estas RLK es el sensor 2 de flagelina en *Arabidopsis* (FLS2), que se une a la flagelina bacteriana (flg22), (Chinchilla *et al.*, 2006). En *Arabidopsis* se ha demostrado que la sobreexpresión de RLK asociadas a FLS2 conduce a mayor acumulación de ácido salicílico (SA) y a la regulación de genes que controlan la muerte celular programada (Kim *et al.*, 2017).

En el caso de hongos, la quitina fúngica es un ligando importante para las RLK. En arroz la quinasa del receptor con motivo lisina (LysM) reconoce la quitina fúngica como inductor, en *Arabidopsis* el receptor quinasa CERK1 se une a la quitina de hongos, luego se produce una fosforilación de CERK1, que lleva a la activación de rutas de defensa temprana (Lee *et al.*, 2014).

Las RLK-LRR pueden actuar conjuntamente en procesos de desarrollo e inmunidad, la quinasa asociada al brasinosteroides (BRI1) la RLK (BAK1) forma un complejo con FLS2 para unirse a las hormonas brasioesteroides que regula en crecimiento de las plantas, pero BAK1 forma complejos con FLS2 para iniciar la inmunidad activada por PAMP (Wu y Zhou, 2013).

En estudios con mutantes silenciados *rlk* en cebada, se demostró que la resistencia al patógeno *Fusarium graminearum*, se vio comprometida y estudios complementarios de expresoma y metaboloma, mostraron el impacto en la acumulación de metabolitos relacionada con la activación de la cascada de señalización por los receptores tipo quinasa (Thapa *et al.*, 2018).

En la figura 17m, se observa el comportamiento del gen que codifica a una RLK, en el ensayo no elicitado, la expresión en todas las variedades cercana, debido a que las RLK se expresan de forma constitutiva en las células, manteniendo receptores en las membranas, como tipo de respuesta preventiva ante un posible PAMPs. Sin embargo, se

evidencia que en la variedad SH2 hay un aumento en la expresión en comparación con las otras variedades.

Por otro lado, en el ensayo elicitado con Fod, es evidente el aumento en la expresión de RLK en todas las variedades, puesto que la función de las RLK es reconocer y activar señales a partir de la quinasa intracelular, al reconocer los elicitores fúngicos, las células activan transcripcionalmente más receptores de membrana, para aumentar el rango de respuesta con la expresión de distintas RLK que desempeñan funciones específicas en reconocimiento de gran diversidad de elicitores.

Con respecto a las variedades F1B2, 6515 Y 395, la expresión es el doble en comparación en el ensayo no elicitado. Además, la expresión es semejante en estas variedades. Al sobre expresarse el gen tanto en las variedades resistentes y susceptibles, no puede considerarse la expresión de este gen como diferencial y que este asociada únicamente a fenotipos resistentes o susceptibles de clavel. En el caso de la variedad SH2, la expresión observada es menor en comparación a las otras variedades, la manera por la cual la variedad regula la expresión podría ser asociada al fenotipo de susceptibilidad. Puesto que, menor expresión, indica que hay problemas en el reconocimiento de los elicitores de Fod.

Por ende, el aumento en la expresión podría ser tardío o no estar regulado a la hora de reconocer el patógeno. Un aspecto interesante, es que en el ensayo no elicitado SH2 es la variedad que presenta mayor expresión de este gen, en cambio en el ensayo elicitado muestra menor expresión. Esto se puede asociar al fenotipo de susceptibilidad, porque la respuesta daría como resultado, menor acumulación de productos en rutas asociadas a la resistencia como el Ácido Salicílico (SA) y Ácido Jasmonico (JA), cambios de regulación en la respuesta de vías de señalización que pueden conducir a muerte celular, las células reciben la señal del patógeno, aumentan la expresión de RLK, que puede no llegar a ser suficiente para desencadenar la respuesta de defensa efectiva.

4. CONCLUSIONES

- El metabolismo basal en las variedades evaluadas es diferente, en variedades susceptibles es mayor en comparación con las variedades resistentes en relación 2:1.
- Las variedades de clavel elicidadas con Fod aumentan el metabolismo basal en respuesta al patógeno, las variedades resistentes en relación 1:6 y las variedades susceptibles en relación 1:7.
- La regulación de la expresión de genes asociados a la resistencia podría verse afectada por los tiempos y capacidad de detección de elicitores fúngicos, que se podrían asociar con la respuesta de defensa temprana.
- La expresión de un gen asociado a la resistencia no garantiza un fenotipo de resistencia, puesto que la expresión debe ser conjunta con varios genes y tipos de regulación.
- Los genes B- amilasas, Inhibidores de Poligalacturonasas, Quitinasa, están relacionados estrechamente en la respuesta del Clavel a Fod
- La capacidad temprana de detección de elicitores fúngicos, es fundamental para desencadenar una respuesta rápida para inhibir el crecimiento de Fod.
- Los fenotipos de resistencia no están asociados a la activación o desactivación de genes, son metabolismos de respuesta que están involucrados en la detección de señales y activación de rutas de señalización que en conjunto actúan en respuesta de defensa contra el patógeno.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad, L., D'Urzo, M., Liu, D., Narasimhan, M., Reuveni, M., Zhu, J. y Bressan, R. (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science*, 118(1), 11-23. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(96\)04420-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(96)04420-2)
2. Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. y Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
3. Agrios, G. (1996). Fitopatología. Enfermedades causadas por Ascomycetes y hongos imperfectos. Editorial Limusa. (2): 441 – 447.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science
5. Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A. y Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defense reactions. *Journal of experimental botany*, 60(2), 377–390. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/ern277>
6. Angulo, L. (2012). Clonación del ADNc que codifica para la enzima Antocianidin Sintasa (ANS) de mango (*Mangifera indica* L.). Universidad de Sonora. Disponible en: <https://1library.co/document/yev7d3rz-clonacion-adnc-codifica-enzima-antocianidin-sintasa-mangifera-indica.html>
7. Arbeláez, G. (1987) Fungal and bacterial diseases carnation in Colombia. *Acta Horticulturae* 216: 151-157. Disponible en: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.216.20>
8. Arbeláez, G. (1993). Avances en el manejo del marchitamiento vascular del clavel, ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Agronomía Colombiana*, 2(2), 188. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21166>
9. Ardila, H. D., Martínez, S. T. y Higuera, B. L. (2011). Spatio-temporal regulation of phenylalanine ammonia lyase enzyme in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) during its interaction with the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Revista Colombiana de Química*, 40(1), 7-24. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042011000100001

10. Ardila, H., Baquero, B. y Martínez, S. (2007). Phenylalanine ammonium liase induction on carnation (*Dianthus caryophyllus* L) by elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi race 2. *Revista Colombiana de Química*, 36(2), 151-167. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042007000200002
11. Ardila-Barrantes, H. (2013). Contribución al estudio de algunos componentes bioquímicos y moleculares de la resistencia del clavel (*Dianthus caryophyllus* L) al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Departamento de Química. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/60056>
12. Arfaoui, A., El Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I. y Chérif, M. (2007). Treatment of chickpea with Rhizobium isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(6–7), 470–479. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.004>
13. Arici, S. E., Erdoğan, O., & Tuncel, Z. N. (2019). Natural, environmental and practical biological control options for fusarium wilt disease of carnation (*Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi). Disponible en: <http://hdl.handle.net/11499/30407>
14. Asocolflores (2018). Producción para San Valentín caería hasta en un 20%. Disponible en: <http://asocolflores.org/comunicaciones/noticias/produccion-para-san-valentin-caeria-hasta-en-un-20/11/1>.
15. Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
16. Baayen, R. P., Elgersma, D. M., Demmink, J. F. y Sparnaaij, L. D. (1988). Differences in pathogenesis observed among susceptible interactions of carnation with four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94(2), 81-94. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF01998398>
17. Baayen, R. y De Maat, A. (1987). Passive transport of microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi in carnation after root inoculation. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 93(1), 3-13. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF01998138>
18. Baayen, R. y Elgersma, D. (1985). Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnation cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi.

- Netherlands Journal of Plant Pathology, 91(3), 119-135. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF01976386>
19. Bai, T. T., Xie, W. B., Zhou, P. P., Wu, Z. L., Xiao, W. C., Zhou, L. y Li, H. P. (2013). Transcriptome and expression profile analysis of highly resistant and susceptible banana roots challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. *Plos one*, 8(9), e73945. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073945>
 20. Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J. y Sakthivel, N. (2012). Plant β -1, 3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology letters*, 34(11), 1983-1990. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6>
 21. Bilbao, O. y Castro, C. (1996). Estudios preliminares para la obtención de semilla híbrida de clavel estándar bajo las condiciones de la sabana de Bogotá. Trabajo de grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). 39-43; 46; 68-70.
 22. 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. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1171647>
 23. Borda, F. y 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. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21238>.
 24. Bueso, E., Alejandro, S., Carbonell, P., Perez-Amador, M. A., Fayos, J., Bellés, J. M., ...y Serrano, R. (2007). The lithium tolerance of the *Arabidopsis* cat2 mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene. *The Plant Journal*, 52(6), 1052-1065. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03305.x>
 25. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. y Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601. Disponible en: <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
 26. Cappuccino, J. G. y Welsh, C. T. (2017). Microbiology: A laboratory manual. Pearson Education. Disponible en: <https://www.pearson.com/us/higher-education/program/Cappuccino-Microbiology-A-Laboratory-Manual-11th-Edition/PGM96372.html>

27. Carmona, M. y Sautua, F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía & Ambiente*, 37(1). Agronomía & Ambiente. Revista de la Facultad de Agronomía (UBA) ISSN 2344-9039
28. Castellanos Domínguez, Ó. F., Fonseca Rodríguez, S. L. y Buriticá Ospina, S. (2010). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de flores y follajes con énfasis en clavel. Biogestión. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/69948>.
29. Chakraborty, S., Nguyen, B., Wasti, S. D., & Xu, G. (2019). Plant leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK): structure, ligand perception, and activation mechanism. *Molecules*, 24(17), 3081. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules24173081>
30. Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C. K. y Wildermuth, M. C. (2010). Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 460-465. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.0912492107>
31. Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W. y Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ethylene-insensitive3 and related proteins. *Cell*, 89(7), 1133-1144. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80300-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80300-1)
32. Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A. y Zheng, B. (2019). Función de las poliaminas en las plantas: metabolismo, regulación del desarrollo y roles en las respuestas al estrés abiótico. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1945. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
33. Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z. y Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling behavior*, 4(6), 493-496. Disponible en: <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8392>
34. Cheng, Z., Yu, X., Li, S. y Wu, Q. (2018). Genome-wide transcriptome analysis and identification of benzothiadiazole-induced genes and pathways potentially associated with defense response in banana. *BMC genomics*, 19(1), 454. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4830-7>
35. Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. y Felix, G. (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of

- flagellin perception. *The Plant Cell*, 18(2), 465-476. Disponible en: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036574>
36. Cotes, A.M., Jiménez, P., Rodríguez, M.X., Díaz, A., Zapata, J., Gómez, M., Grijalba, E., Villamizar, L., González, C., Smith, A., Mejía, C., Mesa, P., Cruz, L.C. (2012) Estrategias de control biológico de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana*). Bogotá: Corpoica. 23-82 p. ISBN: 978-958-740-093-9. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12610>
 37. Cowley, T. y Walters, D. (2008). Polyamine metabolism in an incompatible interaction between barley and the powdery mildew fungus, *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *Journal of Phytopathology*, 150, 581–586. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00816.x>
 38. Curir, P., Dolci, M., Corea, G., Galeotti, F. y Lanzotti, V. (2006). The plant antifungal isoflavone genistein is metabolized by *Armillaria mellea* Vahl to give non-fungitoxic products. *Plant Biosystems*, 140(2), 156-162. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/11263500600756363>
 39. DANE. (2020). Boletín Técnico de Exportaciones. DANE: Información para todos. Consultado: 05/01/2021. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/exportaciones/bol_exp_nov_20.pdf
 40. Dao, T. T. H., Linthorst, H. J. M. y Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 397-412. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9211-7>
 41. Dauleux, M. J. (2013). Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. *Functional e integrative genomics*, 13(2), 191–205. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0312-9>
 42. De Granada, E., De Amézquita, M., Mendoza, G y Zapata, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta biológica colombiana*, 6(1), 7-25. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63462>
 43. de Jesús-Pires, C., Ferreira-Neto, J., Pacifico Bezerra-Neto, J., Kido, E. A., de Oliveira Silva, R. L., Pandolfi, V., Wanderley-Nogueira, A. C., Binneck, E., da Costa, A. F., Pio-Ribeiro, G., Pereira-Andrade, G., Sittolin, I. M., Freire-Filho, F. y Benko-Iseppon, A. M. (2020). Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution

- and Biotechnological Applications. *Current protein ypeptide science*, 21(1), 36–51. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/1389203720666190318164905>
44. Department of health and Ageing (DHA). 2006. The Biology and ecology of *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulator. Disponible en: <http://bch.cbd.int/database/attachment/?id=20040>
 45. Di Pietro, A. and Roncero, M.I. (2003). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* mediates resistance to plant defense compounds. *Molecular Microbiology*. 47(1): 257-66. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03299.x>
 46. Dixon, R. A. y Lamb, C. J. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual review of plant biology*, 41(1), 339-367. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.002011>
 47. Dmitriev, A. A., Krasnov, G. S., Rozhmina, T. A., Novakovskiy, R. O., Snezhkina, A. V., Fedorova, M. S. y Melnikova, N. V. (2017). Differential gene expression in response to *Fusarium oxysporum* infection in resistant and susceptible genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biology*, 17(2), 29-40. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1192-2>
 48. Dorokhov, Y. L., Sheshukova, E. V. y Komarova, T. V. (2018). Methanol in plant life. *Frontiers in plant science*, 9, 1623. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01623>
 49. Du, X., Miao, M., Ma, X., Liu, Y., Kuhl, J. C., Martin, G. B. y Xiao, F. (2012). Plant programmed cell death caused by an autoactive form of Prf is suppressed by co-expression of the Prf LRR domain. *Molecular plant*, 5(5), 1058-1067. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mp/sss014>
 50. Duan, Y., Jiang, Y., Ye, S., Karim, A., Ling, Z., He, Y. y Luo, K. (2015). PtrWRKY73, a salicylic acid-inducible poplar WRKY transcription factor, is involved in disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*, 34(5), 831-841. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1745-5>
 51. Duarte, Y., Echevarría, A. y Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 31(3), 173-183. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttexty http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttexty pid=S1010-27522016000300004

52. Durrant, W. E. y Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 185-209. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
53. Dzhavakhiya, V. Ozeretskovskaya, O. y Zinovyeva, S. (2007). Immune response. In *Comprehensive and Molecular Phytopathology* (pp. 265-314). Elsevier. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-044452132-3/50014-6>
54. Edel-Hermann, V. y Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109(4), 512-530. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
55. Erazo, J., Palacios, S., Pastor, N., Giordano, D., Rovera, M., Reynoso, M. y Torres, M. (2021). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut brown root rot caused by *fusarium solani* RC 386. *Biological Control*, 104774. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104774>
56. Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A. y Pérez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC plant biology*, 8(1), 1-12. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>
57. Falcone-Ferreyra, M. L., Rius, S. y Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 3, 222. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
58. Fernández-Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. CATIE. No. 62 p. 96 - 100. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11554/6578>
59. Ferrari, S., Sella, L., Janni, M., De Lorenzo, G., Favaron, F. y D'ovidio, R. (2012). Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Biology*, 14, 31-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00449.x>
60. Ferrari, S., Vairo, D., Ausubel, F. M., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (2003). Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *The Plant Cell*, 15(1), 93-106. Disponible en: <https://doi.org/10.1105/tpc.005165>

61. 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.
62. 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: p53-54.
63. Filgueira, J.J. (2011). Experiencias en mejoramiento del clavel (*Dianthus caryophyllus*). Ed. Universidad Militar Nueva Granada, 1ª Ed. Bogotá Colombia. ISBN 978-958-8403-41-0.
64. Flury, P., Klauser, D., Schulze, B., Boller, T. y Bartels, S. (2013). The anticipation of danger: microbe-associated molecular pattern perception enhances AtPep-triggered oxidative burst. *Plant Physiology*, 161(4), 2023-2035. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.113.216077>
65. García, D., Arbeláez, M. y 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. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/28033>
66. Garg R. y Jain M. (2013) RNA-Seq for Transcriptome Analysis in Non-model Plants. In: Rose R. (eds) *Legume Genomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1069. Humana Press, Totowa, NJ. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-613-9_4
67. Garibaldi, A. y Gullino, M. (1987, May). Fusarium wilt of carnation: present situation, problems and perspectives (°). In *III International Symposium on Carnation Culture* 216 (pp. 45-54). Disponible en: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.216.6>
68. Gkizi, D., Lehmann, S., L'Haridon, F., Serrano, M., Paplomatas, E. J., Métraux, J. P., & Tjamos, S. E. (2016). The innate immune signaling system as a regulator of disease resistance and induced systemic resistance activity against *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(4), 313-323. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-15-0261-R>
69. Glazebrook, J. y Ausubel, F. M. (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19), 8955-8959. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8955>

70. Goff, K. E. y Ramonell, K. M. (2007). The role and regulation of receptor-like kinases in plant defense. *Gene regulation and systems biology*, 1, Disponible en: <https://doi.org/10.1177%2F117762500700100015>
71. Goicoechea, N., Aguirreolea, J., Cenoz, S. y Garcia-Mina, J. M. (2000). *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. *European Journal of Plant Pathology*, 106(1), 19-25. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1008724816041>
72. Gonzalez, M. E., Jasso-Robles, F. I., Flores-Hernández, E., Rodríguez-Kessler, M. y Pieckenstain, F. L. (2021). Current status and perspectives on the role of polyamines in plant immunity. *Annals of Applied Biology*, 178(2), 244-255. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/aab.12670>
73. Greenberg, A. K. (2013). Phylogenetics, Biogeography, and Rates of Evolution in the Plant Clade Caryophyllaceae. Yale University. Disponible en: <https://doi.org/10.1086/596332>
74. Grube, R. C., Radwanski, E. R. y Jahn, M. (2000). Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. *Genetics*, 155(2), 873-887. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.873>
75. Hawkins, N. y Fraaije, B. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Advances in applied microbiology*, 90, 29-92. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>
76. He, K. y Wu, Y. (2016). Receptor-like kinases and regulation of plant innate immunity. *The Enzymes*, 40, 105-142. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.09.003>
77. Hibi, T., Kosugi, S., Iwai, T., Kawata, M., Seo, S., Mitsuhashi, I. y Ohashi, Y. (2007). Involvement of EIN3 homologues in basic PR gene expression and flower development in tobacco plants. *Journal of experimental botany*, 58(13), 3671-3678. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm216>
78. Holmes, D. R., Grubb, L. E. y Monaghan, J. (2018). The jasmonate receptor COI1 is required for AtPep1-induced immune responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC research notes*, 11(1), 1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3628-7>
79. Huang, C. y Lindhout, P. (1997). Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race

2. *Euphytica*, 93(2), 145-153. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1002943805229>
80. Huxley, A. J. y Griffiths, M. (1992). Dictionary of gardening. Stockton Press. ISBN 0-333-47494-5. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300704289>
81. Imran, M., Tang, K. y Liu, J. Y. (2016). Comparative genome-wide analysis of the malate dehydrogenase gene families in cotton. *PLoS One*, 11(11), e0166341. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166341>
82. Instituto Colombiano Agropecuario (2021). Soporte para la exportación de flores y ornamentales al mundo para San Valentín. Ministerio de agricultura de Colombia. Consultado: 24/03/2021. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/noticias/ica-san-valentin-flores-colombia-llegan-100-paises>.
83. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). <http://www.itis.gov>. Accedida en abril del 2020.
84. Iwazaki, Y., Kosugi, Y., Waki, K., Yoshioka, T., & Satoh, S. (2004). Generation and ethylene production of transgenic carnations harboring ACC synthase cDNA in sense or antisense orientation. *J. Appl. Hort*, 6, 67-71. Disponible en: <https://bit.ly/3nwE68l>
85. Jabeen, N., Chaudhary, Z., Gulfray, M., Rashid, H. y 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. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.5423%2FPPJ.OA.03.2015.0026>
86. Jagadeeswaran, G., Raina, S., Acharya, B., Maqbool, S., Mosher, S., Appel, H. y Raina, R. (2007). *Arabidopsis* GH3-LIKE DEFENSE GENE 1 is required for accumulation of salicylic acid, activation of defense responses and resistance to *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal*, 51(2), 234-246. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03130.x>
87. Ji, H. M., Zhao, M., Gao, Y., Cao, X. X., Mao, H. Y., Zhou, Y. y Liu, P. (2018). FRG3, a target of slmiR482e-3p, provides resistance against the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in tomato. *Frontiers in plant science*, 9, 26. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00026>
88. Jiang, Y., Duan, Y., Yin, J., Ye, S., Zhu, J., Zhang, F., ...y Luo, K. (2014). Genome-wide identification and characterization of the Populus WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic

- stresses. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6629-6644. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru381>
89. Jones J, Vance R, Dangl J. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*. 354:117-125. Disponible en: <https://science.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaf6395>
 90. Jones, J. D. y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature05286>
 91. Joubert, D., Slaughter, R., Kemp, G., Becker, J., Krooshof, G., Bergmann, C., ...y Vivier, M. A. (2006). The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic research*, 15(6), 687-702. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9019-1>
 92. Journet, E. P., Neuburger, M. y Douce, R. (1981). Role of glutamate-oxaloacetate transaminase and malate dehydrogenase in the regeneration of NAD⁺ for glycine oxidation by spinach leaf mitochondria. *Plant physiology*, 67(3), 467-469. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.67.3.467>
 93. Jovanović, S. V., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., & Menckhoff, L. (2018). Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (pp. 269-300). Springer, Cham. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_13
 94. Jun, S., Sattler, S., Cortez, G., Vermerris, W., Sattler, S. y Kang, C. (2018). Biochemical and structural analysis of substrate specificity of a phenylalanine ammonia-lyase. *Plant physiology*, 176(2), 1452-1468. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01608>
 95. Kadota, Y. y Shirasu, K. (2012). The HSP90 complex of plants. *BiocJiica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(3), 689-697. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.016>
 96. Kalunke, R. M., Tundo, S., Benedetti, M., Cervone, F., De Lorenzo, G.y D'Ovidio, R. (2015). An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Frontiers in plant science*, 6, 146. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00146>
 97. Kaur, N., Reumann, S. y Hu, J. (2009). Peroxisome biogenesis and function. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 7. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1199%2Ftab.0123>

98. Kim, S., Shang, Y., Joo, S., Kim, S. y Nam, K. (2017). Overexpression of BAK1 causes salicylic acid accumulation and deregulation of cell death control genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 484(4), 781-786. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.166>
99. Kosugi, S. y Ohashi, Y. (2000). Cloning and DNA-binding properties of a tobacco Ethylene-Insensitive3 (EIN3) homolog. *Nucleic Acids Research*, 28(4), 960-967. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/28.4.960>
100. Kozeko, L. Y. (2019). The role of HSP90 chaperones in stability and plasticity of ontogenesis of plants under normal and stressful conditions (*Arabidopsis thaliana*). *Cytology and Genetics*, 53(2), 143-161. Disponible en: <https://doi.org/10.3103/S0095452719020063>
101. Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., ...y Hedrich, R. (2010). Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13471-13479. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.097394>
102. Lamb, C., Lawton, M., Dron, M. y Dixon, R. (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, 56(2), 215-224. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90894-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90894-5)
103. Lamborn, L. (1901). American Carnation culture. The evolution of *Dianthus caryophyllus* sempler florens. Applewood books. (4) 13 – 30
104. Langner, T.y Göhre, V. (2016). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current genetics*, 62(2), 243-254. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0530-x>
105. Lazarovits, G., Conn, K. L., Abbasi, P. A., & Tenuta, M. (2005). Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. *Acta Horticulturae*, 698, 215. Disponible en: <https://acortar.link/9k1X0b>
106. Lee, J. Yoo, B., Rojas, M, Gomez-Ospina, N., Staehelin, L. y Lucas, W. (2003). Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science*, 299(5605), 392-396. Disponible en: [doi:10.1126/science.1077813](https://doi.org/10.1126/science.1077813).
107. Lee, S. y Park, K. (1998). Characterization and Expression of the Polyamine Biosynthetic Genes from Senescing Carnation Flowers. In *Proceedings of the*

Zoological Society Korea Conference (pp. 15-24). The Korean Society for Integrative Biology. Disponible en: <https://www.koreascience.or.kr/article/CFKO199811921842356.page>

108. Lee, W., Rudd, J., Hammond-Kosack, K. y Kanyuka, K. (2014). *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(3), 236-243. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0201-R>
109. Legaz, M., De Armas, R., Piñón, D. y Vicente, C. (1998). Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *Journal of Experimental Botany*, 49, 1723–1728. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/49.327.1723>
110. Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The fusarium laboratory manual*. Blackwell publishing. ISBN-13:978-0-8138-1919-8. Disponible en: <https://bit.ly/3jBHDRt>
111. Li, C., Shao, J., Wang, Y., Li, W., Guo, D., Yan, B., ... y Peng, M. (2013). Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *BMC genomics*, 14(1), 851. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-851>
112. Li, H. y Smigocki, A. C. (2018). Sugar beet polygalacturonase-inhibiting proteins with 11 LRRs confer *Rhizoctonia*, *Fusarium* and *Botrytis* resistance in *Nicotiana* plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 200-208. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.03.001>
113. Lin, Z., Zhong, S. y Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of experimental botany*, 60(12), 3311-3336. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/erp204>
114. Lingam, S., Mohrbacher, J., Brumbarova, T., Potuschak, T., Fink-Straube, C., Blondet, E., y Bauer, P. (2011). Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(5), 1815-1829. Disponible en: <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084715>
115. Linneo, C. (1753). "Tomus I". *Especie Plantarum* (en latín). Estocolmo: Laurentii Salvii. pag. 410. ISSN 2074-8647

116. Lo, S.y Nicholson, R. (1998). Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls: implications for a compensatory role in the defense response. *Plant Physiology*, 116(3), 979-989. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.979>
117. Loake, G. y Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current opinion in plant biology*, 10(5), 466-472. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.008>
118. Lordachescu, M. y Verlinden, S. (2005). Transcriptional regulation of three EIN3-like genes of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Improved White Sim) during flower development and upon wounding, pollination, and ethylene exposure. *Journal of experimental botany*, 56(418), 2011–2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/eri199>
119. Luna-Esquivel, E. N., Ojeda-Barrios, D. L., Guerrero-Prieto, V. M., Ruíz-Anchondo, T. y Martínez-Téllez, J. J. (2014). Poliaminas como indicadores de estrés en plantas. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 20(3), 283-295. Disponible en: <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.05.019>
120. Mahesh, H. M., Murali, M., Pal, M. A. C., Melvin, P., & Sharada, M. S. (2017). Salicylic acid seed priming instigates defense mechanism by inducing PR-Proteins in *Solanum melongena* L. upon infection with *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Physiology and Biochemistry*, 117, 12-23. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.012>
121. Martínez, J. D. (2018). Análisis del aumento de las actividades informales y su vínculo con las exportaciones del sector floricultor en la Sabana de Bogotá durante los años 2008-2016. Disponible en: https://ciencia.lasalle.edu.co/finanzas_comercio/200
122. Matern, U. (1994). *Dianthus* species (Carnation): in vitro culture and the biosynthesis of dianthalexin and other secondary metabolites. In *Medicinal and aromatic plants VII* (pp. 170-184). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-30369-6_12
123. Mato, M., Onozaki, T., Ozeki, Y., Higeta, D., Itoh, Y., Hisamatsu, T. y Shibata, M. (2001). Flavonoid biosynthesis in pink-flowered cultivars derived from 'William Sim' carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 70(3), 315-319. Disponible en: <https://doi.org/10.2503/jjshs.70.315>

124. Menéndez, E., Navarro, J., López, J. y Dalmau, A. (2020). Mecanismos de defensa en plantas. Proteínas relacionadas con la patogenicidad. *Revista de Investigaciones de la Universidad Le Cordon Bleu*, 7(2), 98-109. Disponible en: <https://doi.org/10.36955/RIULCB.2020v7n2.010>
125. Meng, X. y Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol.* 51:245-266. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>
126. Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L. y Noctor, G. (2010). *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant physiology*, 153(3), 1144-1160. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.110.153767>
127. Mhamdi, A., Noctor, G. y Baker, A. (2012). Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 181-194. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.015>
128. Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. y Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4197-4220. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
129. Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L. y Bermúdez-Guzmán, M. D. J. (2018). Evaluation of three protocols for the rapid extraction of total tissue RNA from *Prosopis juliflora* (SW). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(6), 1259-1267. Disponible en: <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i6.788>
130. Ministerio de agricultura y desarrollo rural (Minagricultura). (2020) Dirección de cadenas Agrícolas y Forestales. Cadena de flores. Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Flores/Documentos/2019-12-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>. Consultado: 05/09/2020.
131. Mittler, R., Herr, E. Orvar, B. L., Van Camp, Willekens, H., Inzé, D. y Ellis, B. (1999). Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 14165-14170. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14165>

132. Monroy - Mena, S. (2020). Efecto de elicitors de origen biótico en la transcripción de algunos genes involucrados en los mecanismos de defensa del clavel *Dianthus caryophyllus* L. al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Departamento de Química. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77930>
133. 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. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.72771>
134. Morán, J. K. (2018). Análisis de la producción de flores y exportaciones hacia los países bajos, período 2012-2016 (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Económicas). Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/28710>
135. Morimoto, H., Narumi-Kawasaki, T., Takamura, T. y Fukai, S. (2018). Analysis of flower color variation in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars derived from continuous bud mutations. *The Horticulture Journal*, UTD-007. Disponible en: <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-007>
136. Morkunas, I. y Ratajczak, L. (2014). The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7), 1607-1619. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1559-z>
137. Moschou, P., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R. y Roubelakis-Angelakis, K. A. (2012). The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of experimental botany*, 63(14), 5003-5015. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers202>
138. Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
139. Negi, N. y Khurana, P. (2021). A salicylic acid inducible mulberry WRKY transcription factor, Mi WRKY53 is involved in plant defence response. *Plant Cell Reports*, 1-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02710-8>
140. Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B. G., Tarling, C. A., y Davies, G. J. (2006). Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *The EMBO journal*, 25(6), 1396-1405. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600970>

141. Ogata, J., Itoh, Y., Ishida, M., Yoshida, H. y Ozeki, Y. (2004). Cloning and heterologous expression of cDNAs encoding flavonoid glucosyltransferases from *Dianthus caryophyllus*. *Plant Biotechnology*, 21(5), 367-375. Disponible en: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.367>
142. Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., y Tanaka, Y. (2006). Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), 11075-11080. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.0604246103>
143. Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S. y Fluhr, R. (1997). The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *The Plant Cell*, 9(4), 521-532. Disponible en: <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.521>
144. Oumouloud, A., El-Otmani, M., Chikh-Rouhou, H., Claver, A. G., Torres, R. G., Perl-Treves, R. y Alvarez, J. M. (2013). Breeding melon for resistance to *Fusarium* wilt: recent developments. *Euphytica*, 192(2), 155-169. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0904-4>
145. Owen, C. A., Spano, T., Hajjar, S. E., Tunaru, V., Harytunyan, S., Filali, L. y Kalaitzis, P. (2004). Expression of genes for alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in petals of cut carnation flowers in response to hypoxia and anoxia. *Physiologia Plantarum*, 122(4), 412-418. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00423.x>
146. Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S. y Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem Anal Biochem*, 6(1), 308. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
147. Pathuri, I. P., Reitberger, I. E., Hückelhoven, R. y Proels, R. K. (2011). Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Journal of experimental botany*, 62(10), 3449-3457. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/err017>
148. Perchepped, L., y Pitrat, M. (2004). Polygenic inheritance of partial resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in melon. *Phytopathology*, 94(12), 1331-1336. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.12.1331>

149. Pérez, A. B., Sanz, R., & Díez, M. A. (2003). Bromuro de metileno como fumigante de suelos: alternativas y usos. *Vida rural*, (171), 22-24. ISSN 1133-8938, N° 171, 2003, págs. 22-24
150. Perez-Nadales, E., Nogueira, M. F. A., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E. y Naik, V. (2014). Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genetics and Biology*, 70, 42-67. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.011>
151. Perilla, L. (2014). Evaluación de polimorfismos con marcadores microsatélites asociados a la Resistencia a *Fusarium oxysporum* en líneas híbridas de *Dianthus caryophyllus*. Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad militar Nueva Granada. (UMNG). (Bachelor's thesis)
152. Pottorff, M. O., Li, G., Ehlers, J. D., Close, T. J. y Roberts, P. A. (2014). Genetic mapping, synteny, and physical location of two loci for *Fusarium oxysporum* f. sp. tracheiphilum race 4 resistance in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Molecular breeding*, 33(4), 779-791. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9991-0>
153. Pottorff, M., Wanamaker, S., Ma, Y. Q., Ehlers, J. D., Roberts, P. A. y Close, T. J. (2012). Genetic and physical mapping of candidate genes for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. tracheiphilum race 3 in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *PLoS One*, 7(7), e41600. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041600>
154. Quirós, M. L. (2001). La Floricultura en Colombia en el marco de la globalización: Aproximaciones hacia un análisis microy macroeconómico. *Revista universidad EAFIT*, 37(122), 59-68. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10784/17295>
155. Quiroz, L.C., Corrales, R.L.y Sánchez-Leal, C. (2018). Fitopatógenos y aguas de riego NOVA *Revista Universidad Eafit*. 16(29): 71-89.
156. Rao, J., Liu, D., Zhang, N., He, H., Ge, F. y Chen, C. (2013). Identification of genes differentially expressed in a resistant reaction to *Fusarium oxysporum* in *Lilium regale* by SSH. *Ieri Procedia*, 5, 95-101. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ieri.2013.11.076>
157. Rathinam, M., Rao, U. y Sreevathsa, R. (2020). Novel biotechnological strategies to combat biotic stresses: polygalacturonase inhibitor (PGIP) proteins as a promising comprehensive option. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(6), 2333-2342. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10396-3>

158. Redagícola Colombia. (2020). Mejoramiento genético en clavel: Del laboratorio al mercado. Redagícola: Especial Flores Colombianas, 6(1), 17. Disponible en: <https://www.redagricola.com/co/assets/uploads/2020/11/racol06.pdf>.
159. Reinhard, K. y Matern, U. (1989). The biosynthesis of phytoalexins in *Dianthus caryophyllus* L. cell cultures: induction of benzoyl-CoA: anthranilate N-benzoyltransferase activity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 275(1), 295-301. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90376-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90376-7)
160. Ríos, D. y Filgueira, J. (2019). Estudio de las características reproductivas de híbridos de clavel (*Dianthus caryophyllus*). *Temas Agrarios*, 24(1), 27-33. Disponible en: <https://doi.org/10.21897/rta.v24i1.1775>
161. Rios, M. Y. y Olivo, H. F. (2014). Natural and synthetic alkaloids: applications in pain therapy. *Studies in natural products chemistry*, 43, 79-121. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00003-5>
162. Romero - Rincón, A. (2020). Efecto de la aplicación de elicitores de origen biótico en la biosíntesis de flavonoides en clavel (*Dianthus caryophyllus* L) durante la interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Universidad Nacional de Colombia (Tesis maestría). Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78330>
163. Rossi, F., Marina, M. y Pieckenstein, F. L. (2015). Role of Arginine decarboxylase (ADC) in *Arabidopsis thaliana* defence against the pathogenic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 17(4), 831–839. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/plb.12289>
164. Ryan, C. A. (1987). Oligosaccharide signalling in plants. *Annual Review of Cell Biology*, 3(1), 295-317. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.03.110187.001455>
165. Salehzadeh, A. (2012). Interaction of polygalacturonase enzymes from *Fusarium oxysporum* with tomato polygalacturonase inhibiting protein. *African Journal of Agricultural Research*, 7(13). Disponible en: <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1971>
166. Salim, A. P., Saminaidu, K., Marimuthu, M., Perumal, Y., Rethinasamy, V., Palanisami, J. R. y Vadivel, K. (2011). Defense responses in tomato landrace and wild genotypes to early blight pathogen *Alternaria solani* infection and accumulation of pathogenesis-related proteins. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(12), 1147-1164. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/03235408.2010.482763>

167. Sanmartín, L. (2008). Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate. Identificación y estudio de moléculas implicadas en la respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Doctoral dissertation). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=18191>
168. Schaller, G. E. (2012). Ethylene and the regulation of plant development. *BMC biology*, 10(1), 1-3. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-9>
169. Seifi, H. S. y Shelp, B. J. (2019). Spermine differentially refines plant defense responses against biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 117. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00117>
170. Seo, P. J., Lee, A. K., Xiang, F. y Park, C. M. (2008). Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant and Cell Physiology*, 49(3), 334-344. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn011>
171. Sestili, S., Polverari, A., Luongo, L., Ferrarini, A., Scotton, M., Hussain, J. y Belisario, A. (2011). Distinct colonization patterns and cDNA-AFLP transcriptome profiles incompatible and incompatible interactions between melon and different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *BMC genomics*, 12(1), 122. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-122>
172. Shadle, G. L., Wesley, S. V., Korth, K. L., Chen, F., Lamb, C., & Dixon, R. A. (2003). Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry*, 64(1), 153-161. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00151-1)
173. Shadle, G., Wesley, S., Korth, K., Chen, F., Lamb, C. y Dixon, R. (2003). Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry*, 64(1), 153-161. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00151-1)
174. Shanmugam, V. (2005). Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms. *Microbiological research*, 160(1), 83-94. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.014>
175. Sharma, A., Tyagi, S., Alok, A., Singh, K. y Upadhyay, S. K. (2020). Thaumatin-like protein kinases: Molecular characterization and transcriptional profiling in five cereal crops. *Plant Science*, 290, 110317. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110317>

176. Sharma, I. y Ahmad, P. (2014). Catalase: a versatile antioxidant in plants. In *Oxidative damage to plants* (pp. 131-148). Academic Press. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>
177. Shen, Y. y Diener, A. C. (2013). *Arabidopsis thaliana* resistance to *Fusarium oxysporum* 2 implicates tyrosine-sulfated peptide signaling in susceptibility and resistance to root infection. *PLoS genetics*, 9(5), e1003525. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003525>
178. Sheshukova, E., Komarova, T., Pozdyshev, D., Ershova, N., Shindyapina, A., Tashlitsky, V. y Dorokhov, Y. (2017). The intergenic interplay between aldose 1-epimerase-like protein and pectin methylesterase in abiotic and biotic stress control. *Frontiers in plant science*, 8, 1646. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01646>
179. Shibuya, K. (1998). A cDNA encoding a putative ethylene receptor related to petal senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *Plant Physiol.*, 116, 867. Disponible en: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10006287189/>
180. Shivakumar, P. D., Geetha, H. M. y Shetty, H. S. (2003). Peroxidase activity and isozyme analysis of pearl millet seedlings and their implications in downy mildew disease resistance. *Plant Science*, 164(1), 85-93. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00339-4)
181. Silva, M., Arraes, F, de Araújo-Campos, M., Grossi-de-Sa, M., Fernandez, D., de Souza Cândido, E. y Grossi-de-Sa, M. (2018). Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant science*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.013>
182. Singh, S. y Farsodia, M. (2018). Polyamine's metabolism and their relation with reactive oxygen species and other cellular molecules during plant interactions with pathogens. *International Journal of Plant and Environment*, 4, 76–90. Disponible en: <https://doi.org/10.18811/ijpen.v4i01.12420>
183. Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. y Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive3 and ethylene-response-factor1. *Genes y development*, 12(23), 3703-3714. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3703>
184. Song, J. (2006). Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules y Cells (Springer Science y Business Media BV)*, 22(2). Vol. 22 Issue 2, p233-238. 6p.

185. Soto, J. Pabón, F. y Filgueira, J. (2009). Relación Entre el Color de la Flor del Clavel (*Dianthus caryophyllus*) y la Tolerancia a Patógenos del Género *Fusarium*. Revista Facultad De Ciencias Básicas, 5(1-2), 116-129. Disponible en: <https://doi.org/10.18359/rfcb.2125>
186. Soto, J. y Filgueira, J. (2016). Evaluación de la capacidad de reproducción de híbridos y variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) como búsqueda de parentales útiles para un programa de cría. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10654/37528>.
187. Stich, K., Eidenberger, T., Wurst, F. y Forkmann, G. (1992). Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3, 4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L.(carnation). *Planta*, 187(1), 103-108. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00201630>
188. Stitt, M. y Zeeman, S. C. (2012). Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current opinion in plant biology*, 15(3), 282-292. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.016>
189. Svingen, T., Letting, H., Hadrup, N., Hass, U. y Vinggaard, A. M. (2015). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ*, 3, e855. Disponible en: <https://doi.org/10.7717/peerj.855>
190. Swarbrick, P., Schulze-Lefert P. y Scholes, J. (2006). Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell y Environment*, 29(6), 1061-1076. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01472.x>
191. Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M. y Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (No. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated. ISBN: 9781605353531
192. Tameling, W. I., Elzinga, S. D., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Tekken, F. L., Haring, M. A. y 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1105/tpc.005793>
193. Tanase, K., Nishitani, C., Hirakawa, H., Isobe, S., Tabata, S., Ohmiya, A. y Onozaki, T. (2012). Transcriptome analysis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) based on next-generation sequencing technology. *BMC genomics*, 13(1), 292. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-292>

194. Tekeoglu, M., Tullu, A., Kaiser, W. y Muehlbauer, F. (2000). Inheritance and linkage of two genes that confer resistance to *Fusarium* wilt in chickpea. *Crop science*, 40(5), 1247-1251. Disponible en: <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051247x>
195. Tesfaye, M., Temple, S., Allan, D., Vance, C. y Samac, D. (2001). Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant physiology*, 127(4), 1836-1844. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.010376>
196. Thapa, G., Gunupuru, L., Hehir, J., Kahla, A., Mullins, E. y Doohan, F. (2018). A pathogen-responsive leucine rich receptor like kinase contributes to *Fusarium* resistance in cereals. *Frontiers in plant science*, 9, 867. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00867>
197. Tirado-Perea, A. y Perea Dallos, M. (2011). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de prácticas de laboratorio* (No. 634.77396 S211c). Bogotá, CO: Universidad Nacional de Colombia, 2011. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79882>
198. Togami, J., Okuhara, H., Nakamura, N., Ishiguro, K., Hirose, C., Ochiai, M. y Tanaka, Y. (2011). Isolation of cDNAs encoding tetrahydroxychalcone 2'-glucosyltransferase activity from carnation, cyclamen, and catharanthus. *Plant biotechnology*, 28(2), 231-238. Disponible en: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.11.0106b>
199. Toussoun, T., Nelson, P., y Marasas, W. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. The Pennsylvania state universidad press. ISBN 0-271-00349-9
200. Van der Does, D., Boutrot, F., Engelsdorf, T., Rhodes, J., McKenna, J. F., Vernhettes, S. y Segonzac, C. (2017). The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase MIK2/LRR-KISS connects cell wall integrity sensing, root growth and response to abiotic and biotic stresses. *PLoS genetics*, 13(6), e1006832. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006832>
201. Van verk, M. C., Bol, J. F. y Linthorst, H. J. (2011). WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes. *BMC plant biology*, 11(1), 1-12. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-89>
202. Vanegas, L. (2019). Aproximación bioquímica al estudio de las rutas de señalización involucradas en la resistencia del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) al

- patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Departamento de Química. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76509>
203. Vásquez A, Soto J, López C. (2018). Unraveling the molecules hidden in the gray shadows of quantitative disease resistance. *Acta Biol Colomb.*;23:5-16. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.66487>
 204. Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358> e-ISSN 2323-0118
 205. Waki, K., Shibuya, K., Yoshioka, T., Hashiba, T. y Satoh, S. (2001). Cloning of a cDNA encoding EIN3-like protein (DC-EIL1) and decrease in its mRNA level during senescence in carnation flower tissues. *Journal of Experimental Botany*, 52(355), 377-379. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.355.377>
 206. Wang, D., Amornsiripanitch, N. y Dong, X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS pathogens*, 2(11), e123. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020123>
 207. Wang, K. L. C., Li, H. y Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The plant cell*, 14, S131-S151. Disponible en: <https://doi.org/10.1105/tpc.001768>
 208. Wang, Q., Zhao, Y., Yi, Q., Li, K. Z., Yu, Y. X. y Chen, L. M. (2010). Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic tobacco leaves: enhanced malate synthesis and augmented Al-resistance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(6), 1209-1220. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0522-x>
 209. Wang, X., Tang, C., Deng, L., Cai, G., Liu, X., Liu, B. y Kang, Z. (2010). Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. *Physiologia Plantarum*, 139(1), 27-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01338.x>
 210. Wang, Z. A., Li, Q., Ge, X. Y., Yang, C. L., Luo, X. L., Zhang, A. H. y Wu, J. H. (2015). The mitochondrial malate dehydrogenase 1 gene GhmMDH1 is involved in plant and root growth under phosphorus deficiency conditions in cotton. *Scientific reports*, 5(1), 1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep10343>

211. Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. y Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth edition edición). San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.
212. Wei, C., Kuang, H., Li, F. y Chen, J. (2014). The I2 resistance gene homologues in *Solanum* have complex evolutionary patterns and are targeted by miRNAs. *BMC genomics*, 15(1), 743. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-743>
213. Westfall, C., Herrmann, J., Chen, Q., Wang, S. y Jez, J. (2010). Modulating plant hormones by enzyme action: the GH3 family of acyl acid amido synthetases. *Plant signaling y behavior*, 5(12), 1607-1612. Disponible en: <https://doi.org/10.4161/psb.5.12.13941>
214. Wojtasik, W., Kulma, A., Namysł, K., Preisner, M. y Szopa, J. (2015). Polyamine metabolism in flax in response to treatment with pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* strains. *Frontiers in Plant Science*, 6, 291. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00291>
215. Wu, Y. y Zhou, J. (2013). Receptor-Like Kinases in Plant Innate Immunity. *Journal of integrative plant biology*, 55(12), 1271-1286. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jipb.12123>
216. Yagi, M., Kosugi, S., Hirakawa, H., Ohmiya, A., Tanase, K., Harada, T y Yamaguchi, H. (2014). Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *DNA Research*, 21(3), 231-241. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/dnares/dst053>
217. Yagi, M., Yamamoto, T., Isobe, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Tanase, K., Yamaguchi, H. y Onozaki, T. (2013). Construction of a reference genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *BMC Genomics* 14: 734-736. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-734>
218. Yang, C., Ma, B., He, S. J., Xiong, Q., Duan, K. X., Yin, C. C. y Zhang, J. S. (2015). maohuzi6/ethylene insensitive3-like1 and ethylene insensitive3-like2 regulate ethylene response of roots and coleoptiles and negatively affect salt tolerance in rice. *Plant Physiology*, 169(1), 148-165. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.15.00353>
219. Yang, Q., Grimmig, B. y Matern, U. (1998). Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase gene from carnation: rapid elicitation of transcription and promoter analysis. *Plant molecular biology*, 38(6), 1201-1214. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1006003731919>

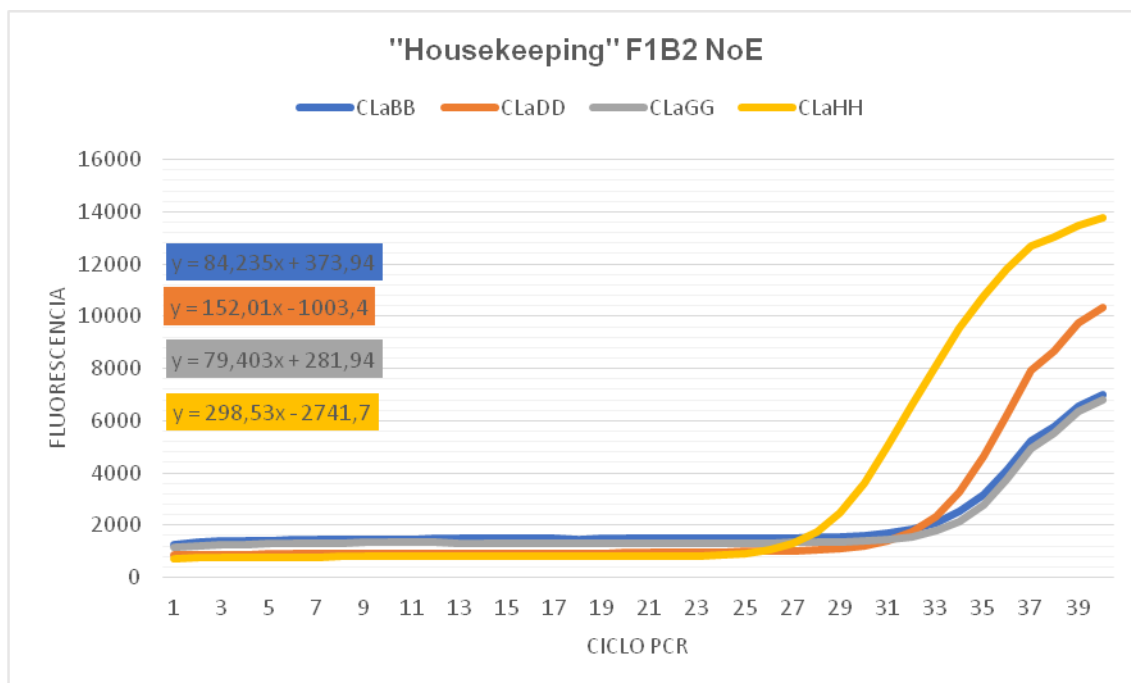
220. Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E. y Matern, U. (1997). Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA: anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant molecular biology*, 35(6), 777-789. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1005878622437>
221. Yang, Y., Shah, J. y Klessig, D. F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes y development*, 11(13), 1621-1639.
222. Yao, Y. X., Li, M., Zhai, H., You, C. X. y Hao, Y. J. (2011). Isolation and characterization of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene reveal its function in malate synthesis. *Journal of plant physiology*, 168(5), 474-480. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.08.008>
223. Yoffe, D., Frim, R., Ukeles, S. D., Dagani, M. J., Barda, H. J., Benya, T. J., & Sanders, D. C. (2013). Bromine compounds. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1-31. Disponible en: https://doi.org/10.1002/14356007.a04_405.pub2
224. Yogendra, K., Kumar, A., Sarkar, K., Li, Y., Pushpa, D., Mosa, K. A. y Kushalappa, A. C. (2015). Transcription factor StWRKY1 regulates phenylpropanoid metabolites conferring late blight resistance in potato. *Journal of experimental botany*, 66(22), 7377-7389. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv434>
225. Yu, W., Tao, Y., Luo, L., Hrovat, J., Xue, A. y Luo, H. (2021). Evaluation of housekeeping gene expression stability in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01140671.2021.1883069>
226. Yuan, M., Lu, Y., Zhu, X., Wan, H., Shakeel, M., Zhan, S. y Li, J. (2014). Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PloS one*, 9(1), e86503. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086503>
227. Zalepa-King, L. y Citovsky, V. (2013). A plasmodesmal glycosyltransferase-like protein. *PLoS One*, 8(2), e58025. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058025>
228. Zeiss, D. R., Piater, L. A. y Dubery, I. A. (2020). Hydroxycinnamate amides: intriguing conjugates of plant protective metabolites. *Trends in Plant Science*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.011>

229. Zhang, C., Zhang, L., Wang, D., Ma, H., Liu, B., Shi, Z., y Chen, Q. (2018). Evolutionary history of the glycoside hydrolase 3 (GH3) family based on the sequenced genomes of 48 plants and identification of jasmonic acid related GH3 proteins in *Solanum tuberosum*. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1850. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms19071850>
230. Zhang, Z., Ortiz, O., Goyal, R., & Kohn, J. (2014). Biodegradable polymers. *Handbook of polymer applications in medicine and medical devices*, 303-335. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-22805-3.00013-X>
231. 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. Disponible en: <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.1.13>

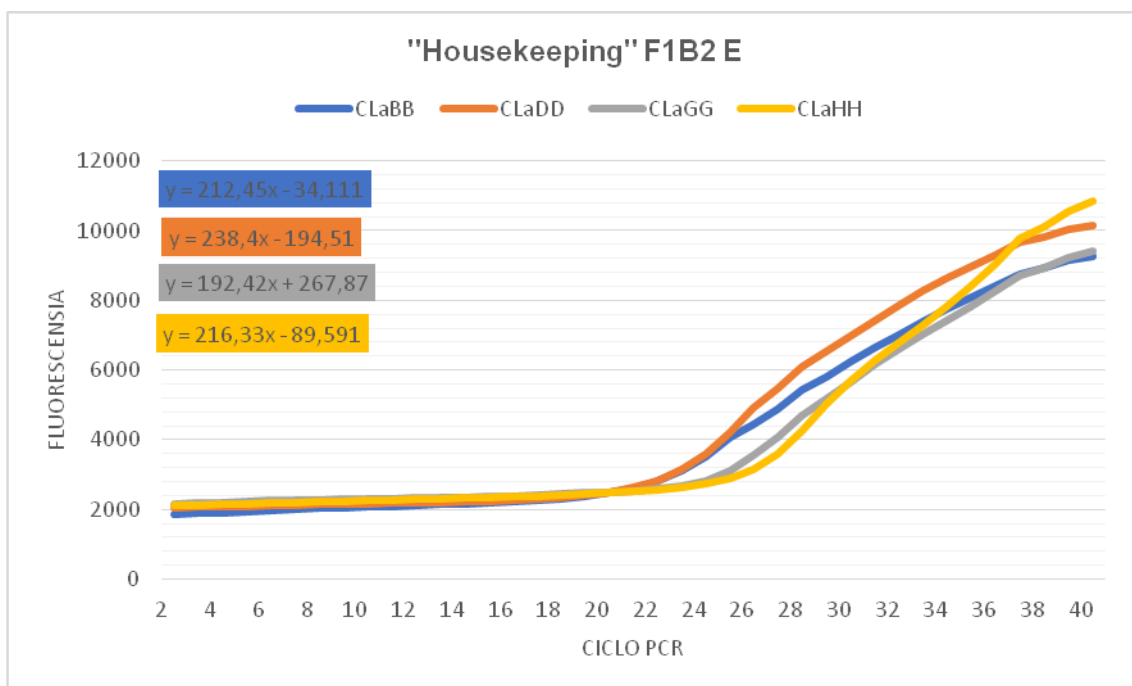
6. ANEXOS

6.1. Graficas análisis de expresión RT-qPCR

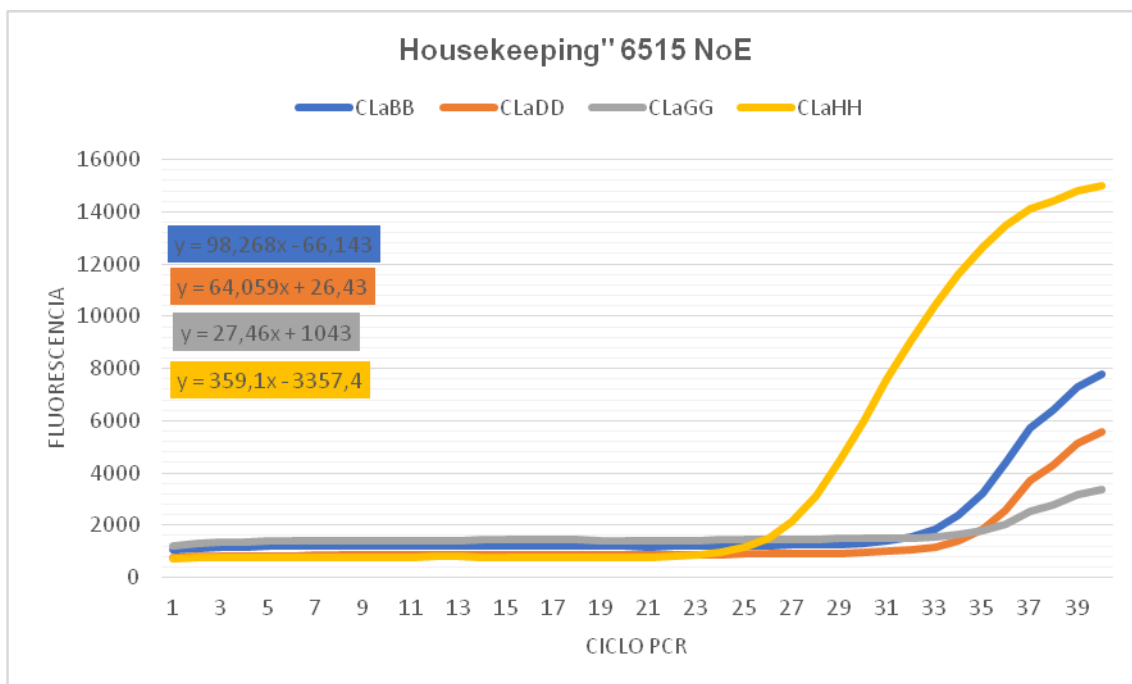
6.1.1. Graficas RT-qPCR genes “Housekeeping”



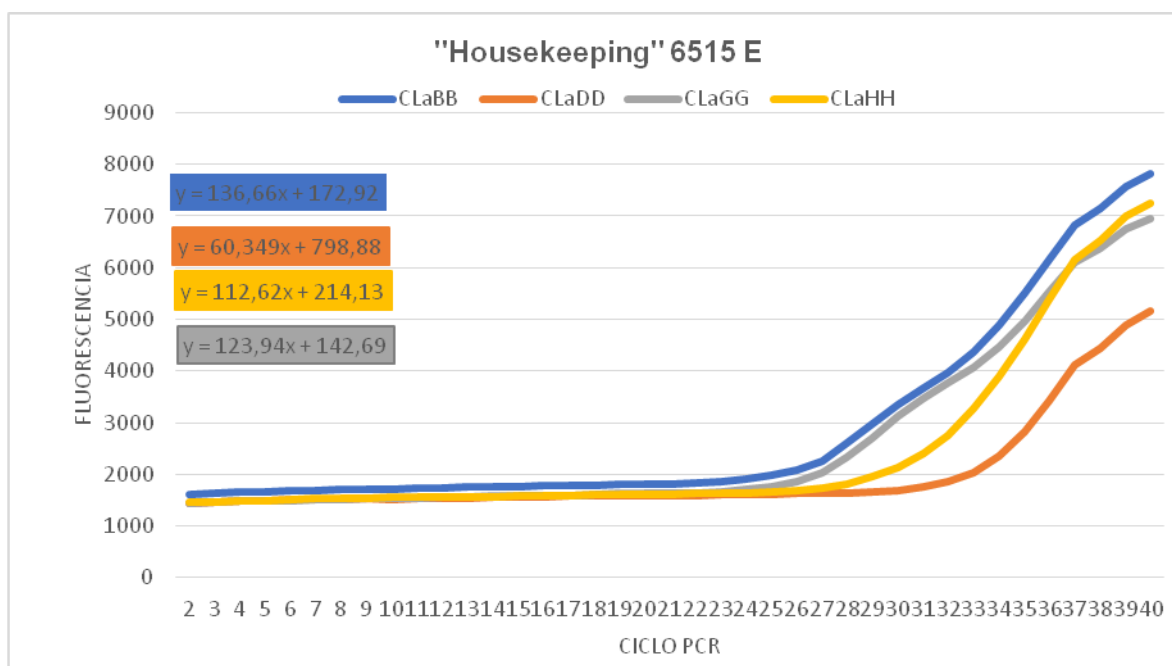
Gráfica 3. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes Housekeeping: Clabb: Alcohol deshidrogenasa; Cladd: Arginina Descarboxilasa; Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; Clahh: “Ethylene Insensitive 3-like 2”. En el ensayo no elicitado de la variedad FIB2.



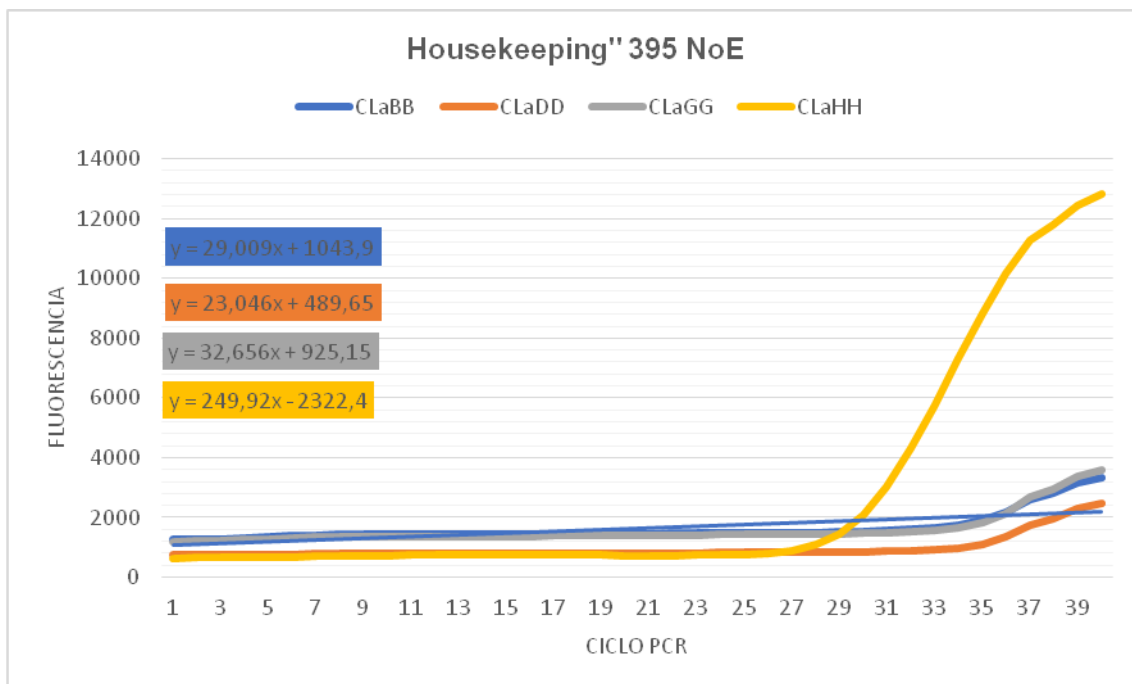
Gráfica 4. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes Housekeeping: Clabb: Alcohol deshidrogenasa; Cladd: Arginina Descarboxilasa; Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; Clahh: "Ethylene Insensitive 3-like 2". En el ensayo elicitado de la variedad FIB2.



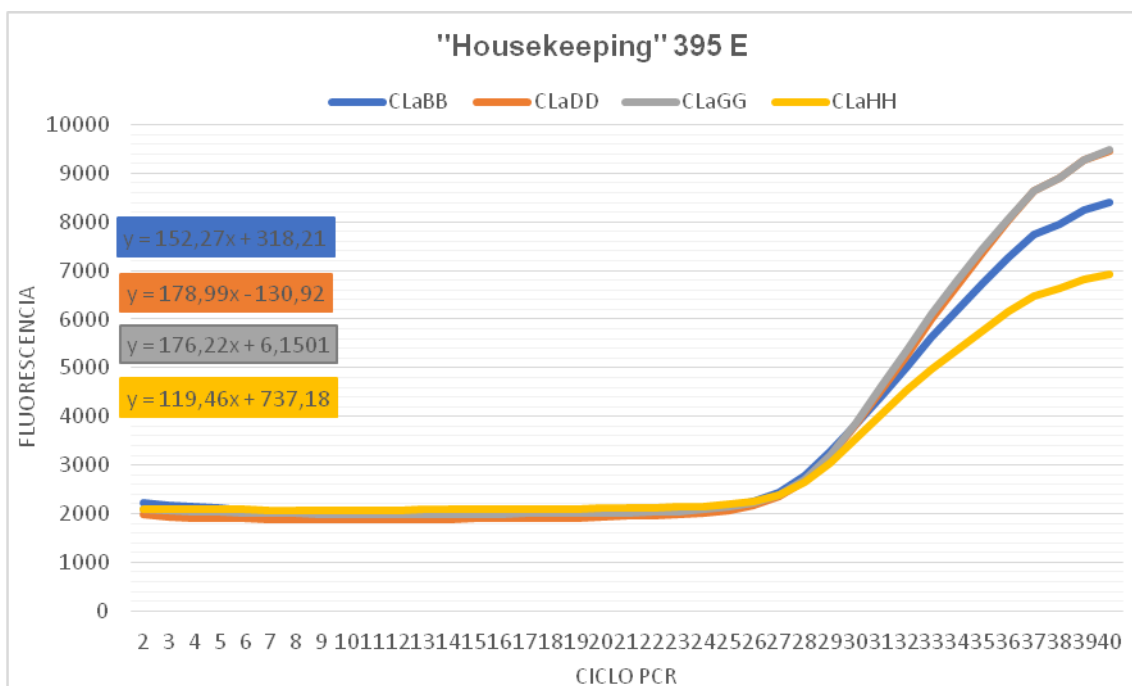
Gráfica 5. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes Housekeeping: Clabb: Alcohol deshidrogenasa; Cladd: Arginina Descarboxilasa; Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; Clahh: "Ethylene Insensitive 3-like 2". En el ensayo no elicitado de la variedad 6515.



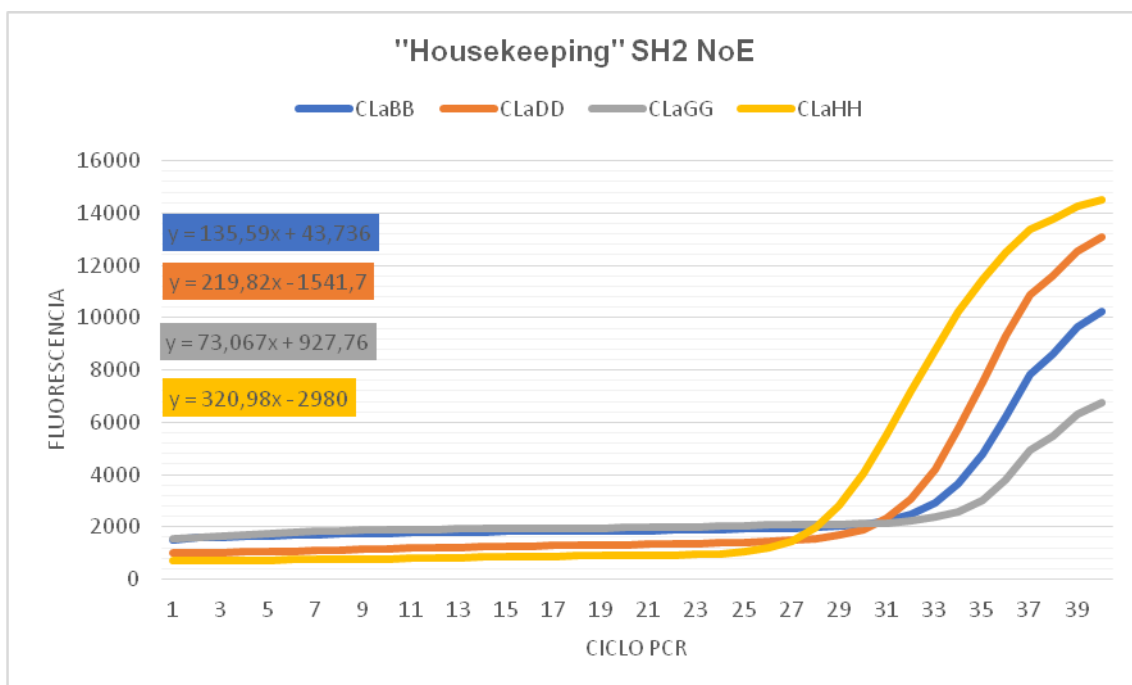
Gráfica 6. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes Housekeeping: Clabb: Alcohol deshidrogenasa; Cladd: Arginina Descarboxilasa; Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; Clahh: "Ethylene Insensitive 3-like 2". En el ensayo elicitado de la variedad 6515.



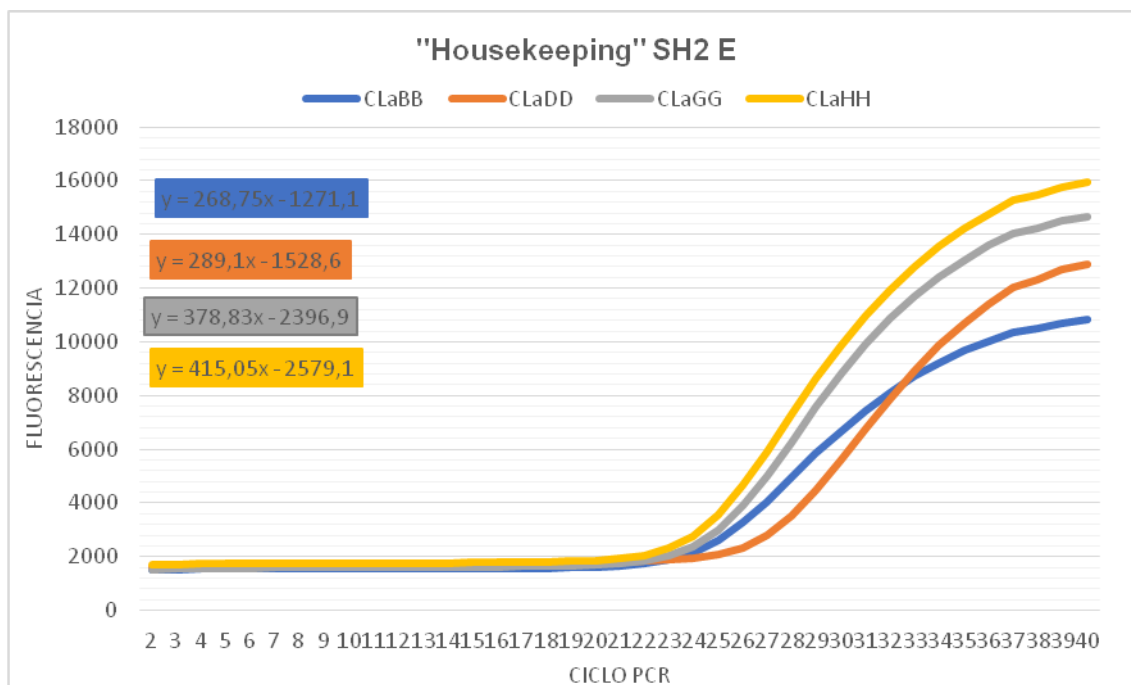
Gráfica 7. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes Housekeeping: Clabb: Alcohol deshidrogenasa; Cladd: Arginina Descarboxilasa; Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; Clahh: "Ethylene Insensitive 3-like 2". En el ensayo no elicitado de la variedad 395.



Gráfica 8. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes Housekeeping: Clabb: Alcohol deshidrogenasa; Cladd: Arginina Descarboxilasa; Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; Clahh: "Ethylene Insensitive 3-like 2". En el ensayo elicitado de la variedad 395.

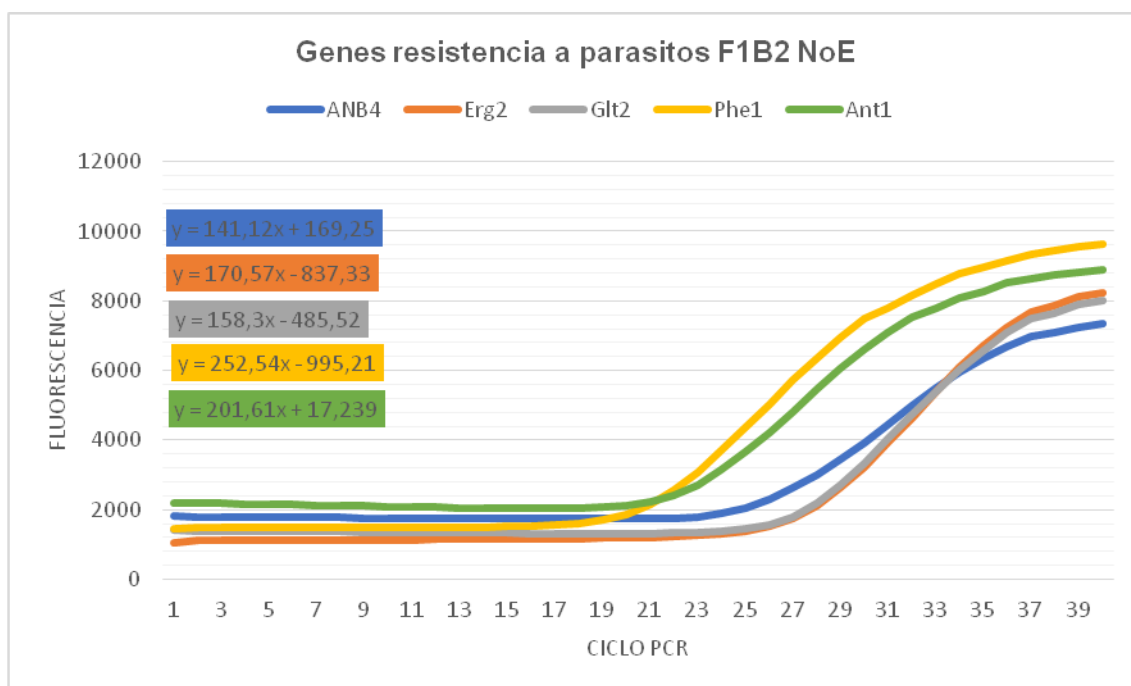


Gráfica 9. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes Housekeeping: Clabb: Alcohol deshidrogenasa; Cladd: Arginina Descarboxilasa; Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; Clahh: "Ethylene Insensitive 3-like 2". En el ensayo no elicitado de la variedad SH2.

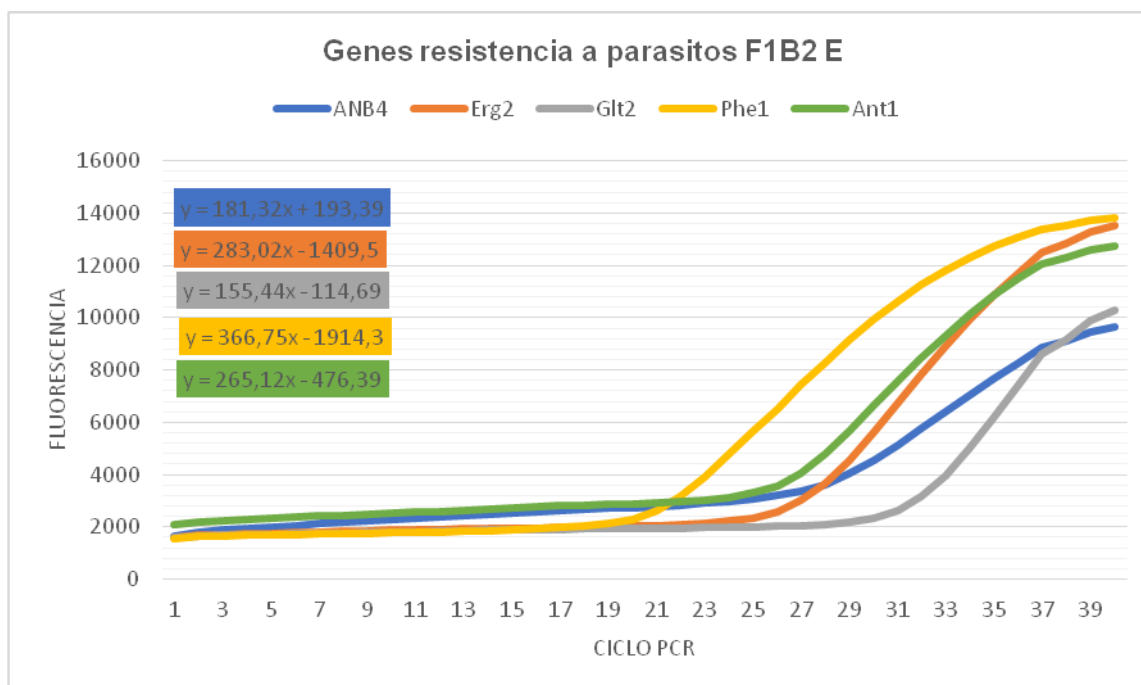


Gráfica 10. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes Housekeeping: Clabb: Alcohol deshidrogenasa; Cladd: Arginina Descarboxilasa; Clagg: Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa; Clahh: "Ethylene Insensitive 3-like 2". En el ensayo elicitado de la variedad SH2.

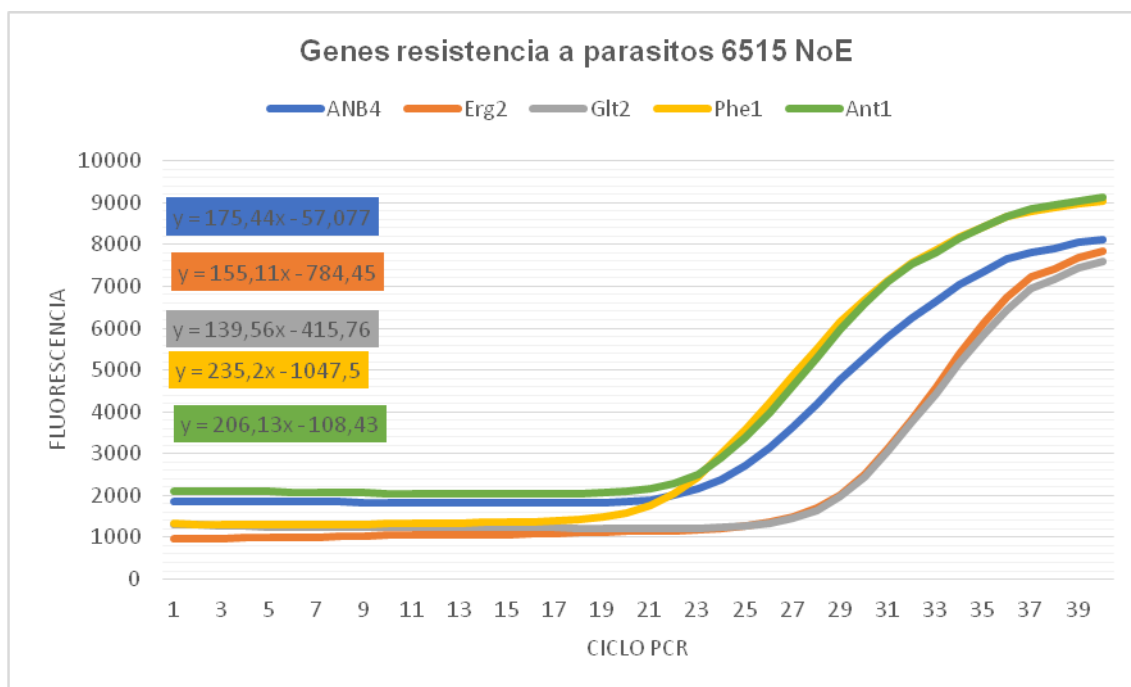
6.1.2. Graficas de RT-qPCR de Genes relacionados con resistencia a parásitos



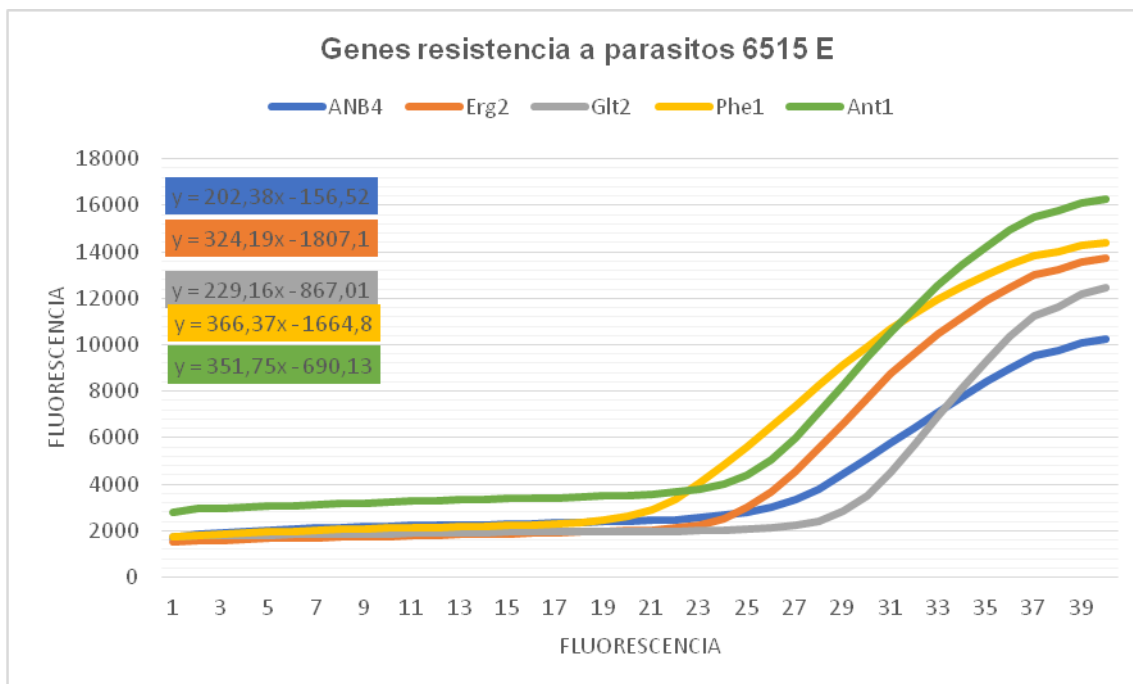
Gráfica 11. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes ANB4: Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa; Ers2: Gen del receptor de etileno; DicGT: Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa; Phe1: Fenilalanina amonio-liasa y Ant1: Antocianidina sintasa. En el ensayo no elicitado de la variedad F1B2.



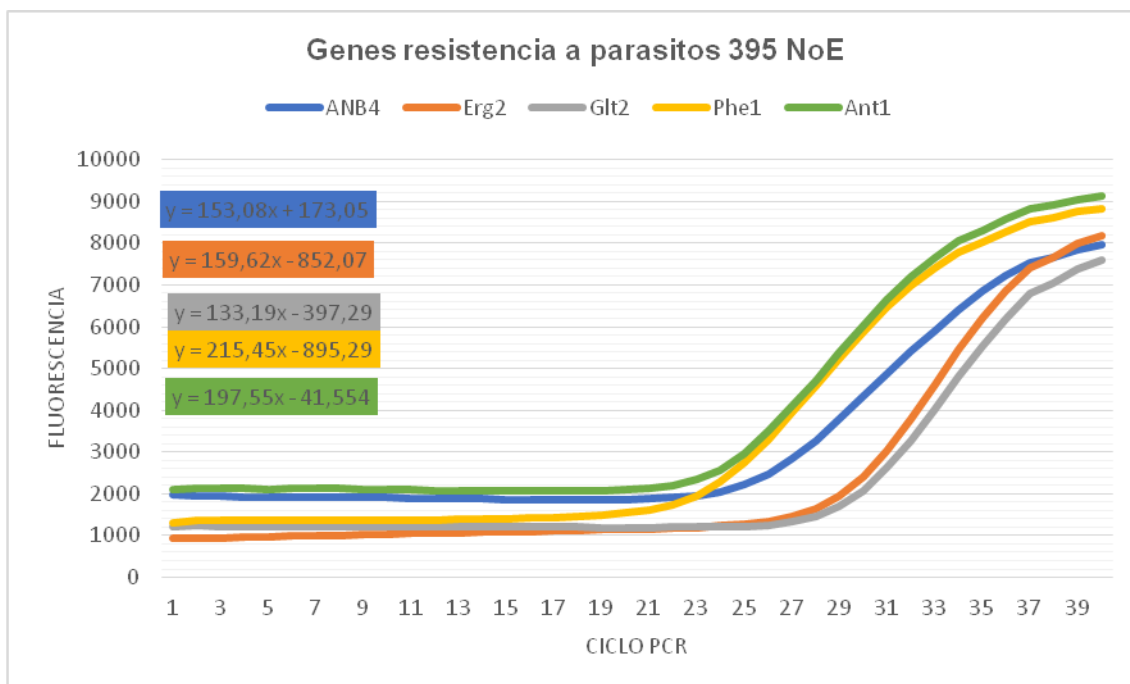
Gráfica 12. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes ANB4: Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa; Ers2: Gen del receptor de etileno; DicGT: Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa; Phe1: Fenilalanina amonio-liasa y Ant1: Antocianidina sintasa. En el ensayo elicitado de la variedad F1B2.



Gráfica 13. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes ANB4: Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa; Ers2: Gen del receptor de etileno; DicGT: Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa; Phe1: Fenilalanina amonio-liasa y Ant1: Antocianidina sintasa. En el ensayo no elicitado de la variedad 6515.

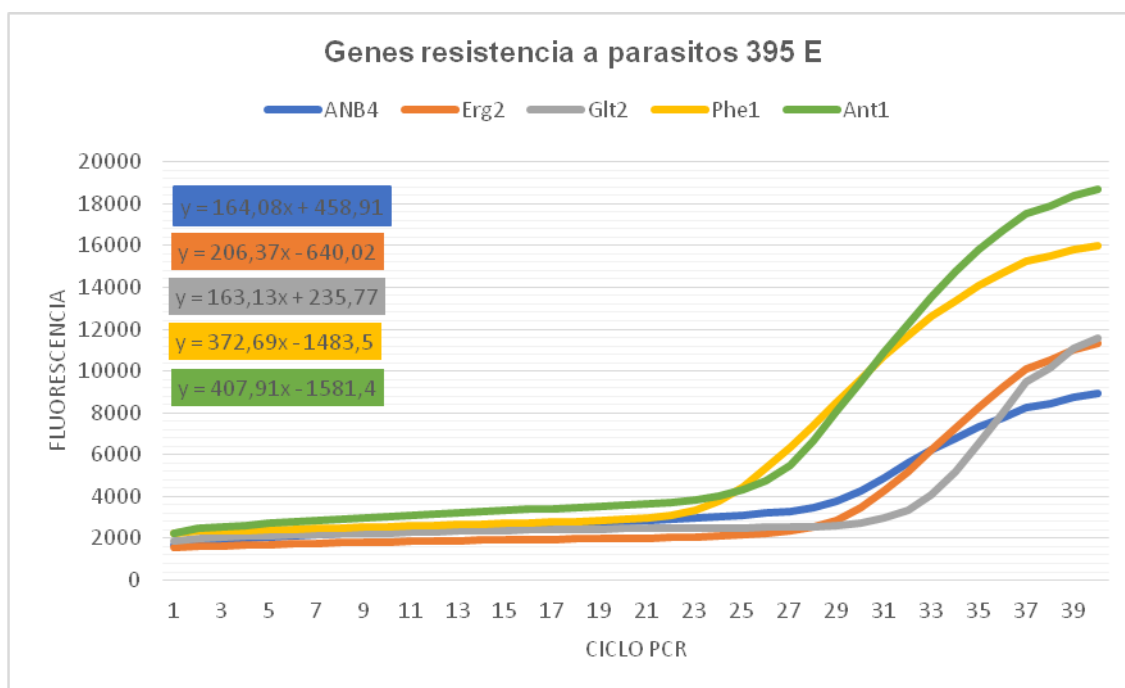


Gráfica 14. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes ANB4: Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa; Erg2: Gen del receptor de etileno; Glt2: Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa; Phe1: Fenilalanina amonio-lasa y Ant1: Antocianidina sintasa. En el ensayo elicitado de la variedad 6515.

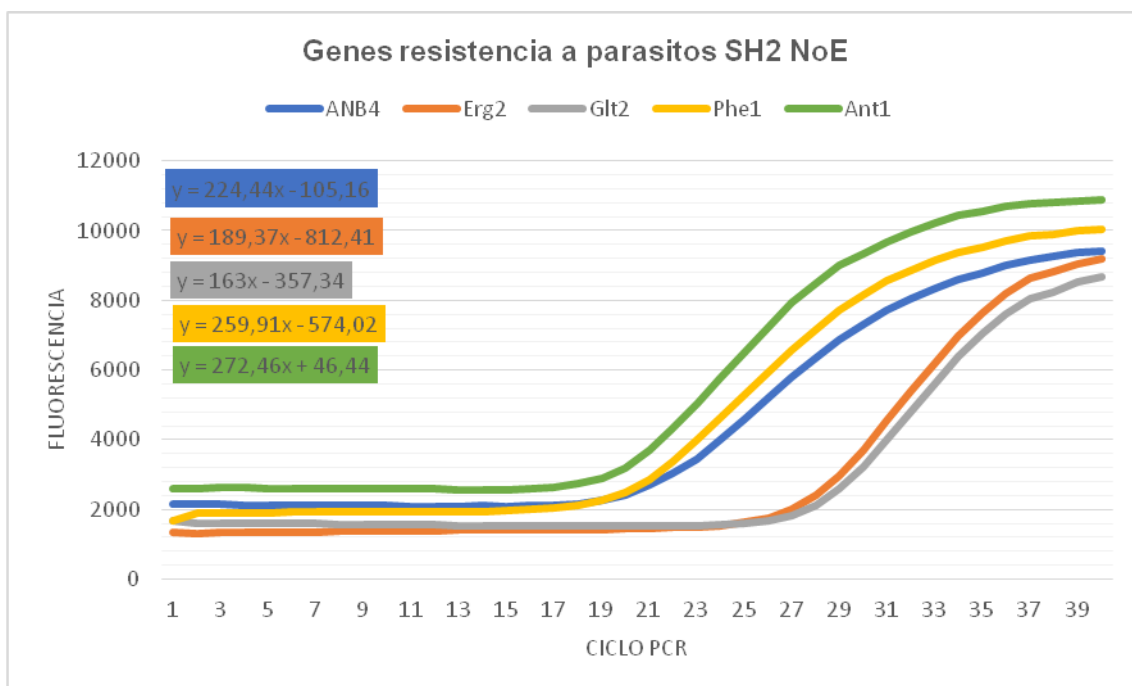


Gráfica 15. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes ANB4:

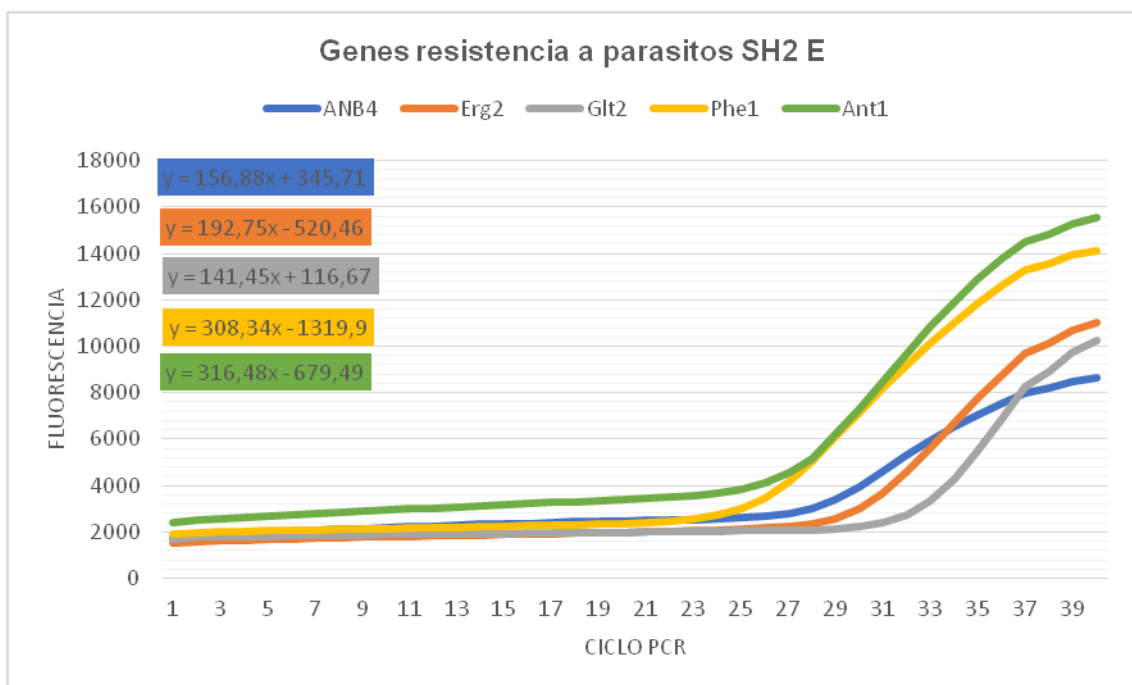
Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa; Ers2: Gen del receptor de etileno; DicGT: Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa; Phe1: Fenilalanina amonio-liasa y Ant1: Antocianidina sintasa. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.



Gráfica 16. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes ANB4: Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa; Ers2: Gen del receptor de etileno; DicGT: Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa; Phe1: Fenilalanina amonio-liasa y Ant1: Antocianidina sintasa. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.

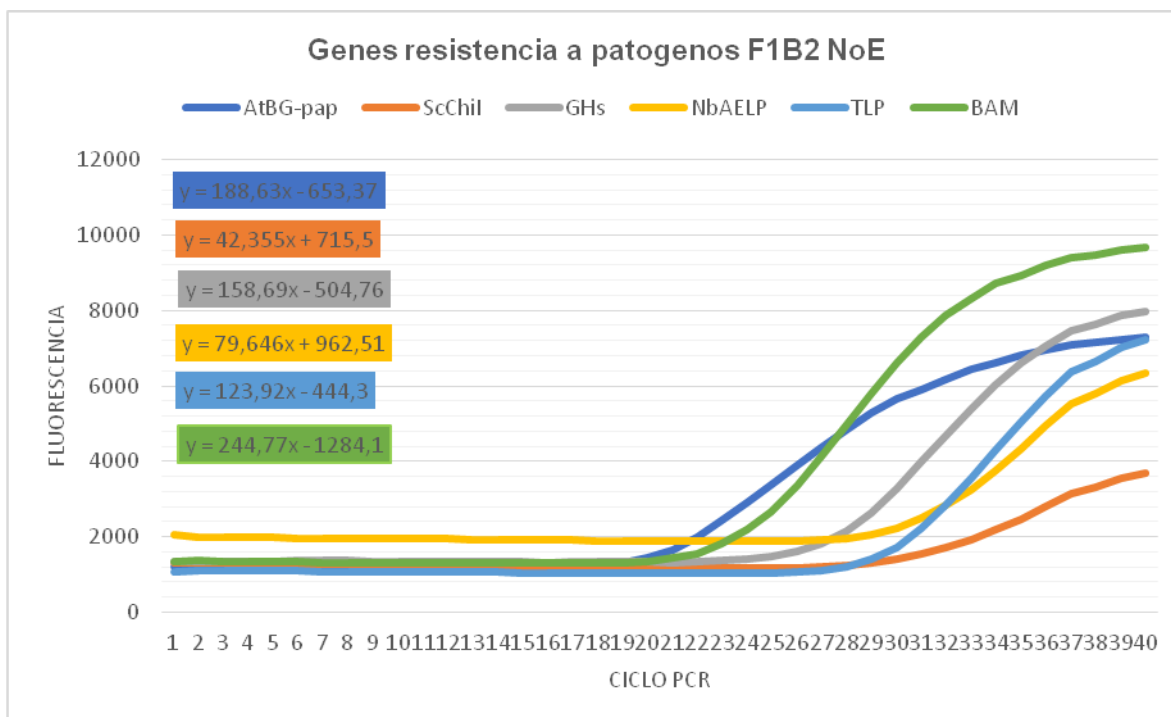


Gráfica 17. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes ANB4: Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa; Erg2: Gen del receptor de etileno; Glt2: Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa; Phe1: Fenilalanina amonio-liasa y Ant1: Antocianidina sintasa. En el ensayo no elicitado de la variedad SH2.

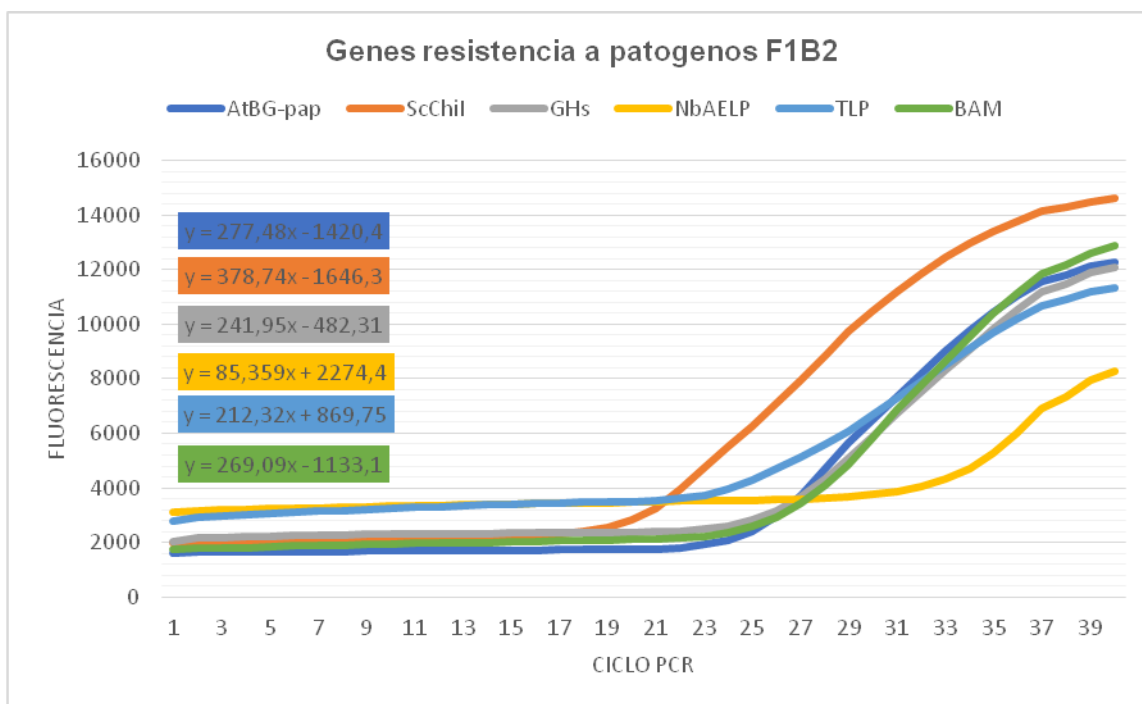


Gráfica 18. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes ANB4: Antranilato-Hidroxicinamoil Benzoiltransferasa; Ers2: Gen del receptor de etileno; DicGT: Flavonol 3-O-Glucosil Transferasa; Phe1: Fenilalanina amonio-liasa y Ant1: Antocianidina sintasa. En el ensayo elicitado de la variedad SH2.

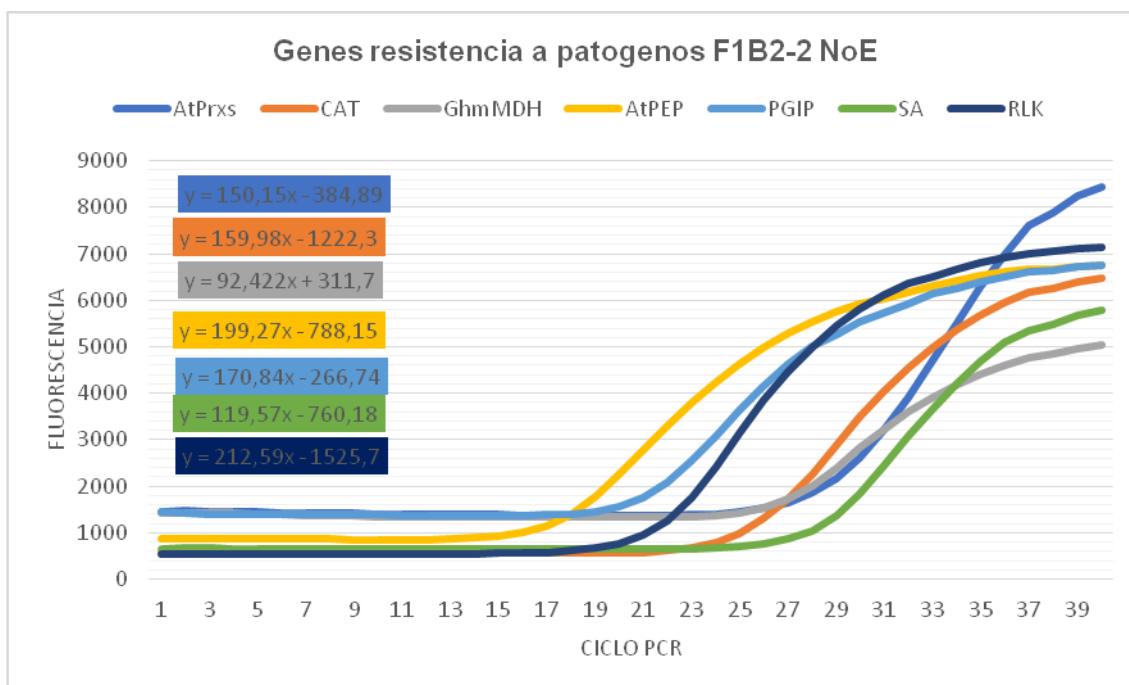
6.1.3. Genes relacionados con proteínas de patogenicidad



Gráfica 19. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtBG-pap: β -1,3-Glucanasa; ScChil: “Chitinase 4-like”; GHs: β -glucosidasa glucósido hidrolasas; NbAELP: Aldosa 1-epimerasa; TLP: “Thaumatococcus daniellii protein”; BAM: β -Amilasa. En el ensayo no elicitado de la variedad F1B2.

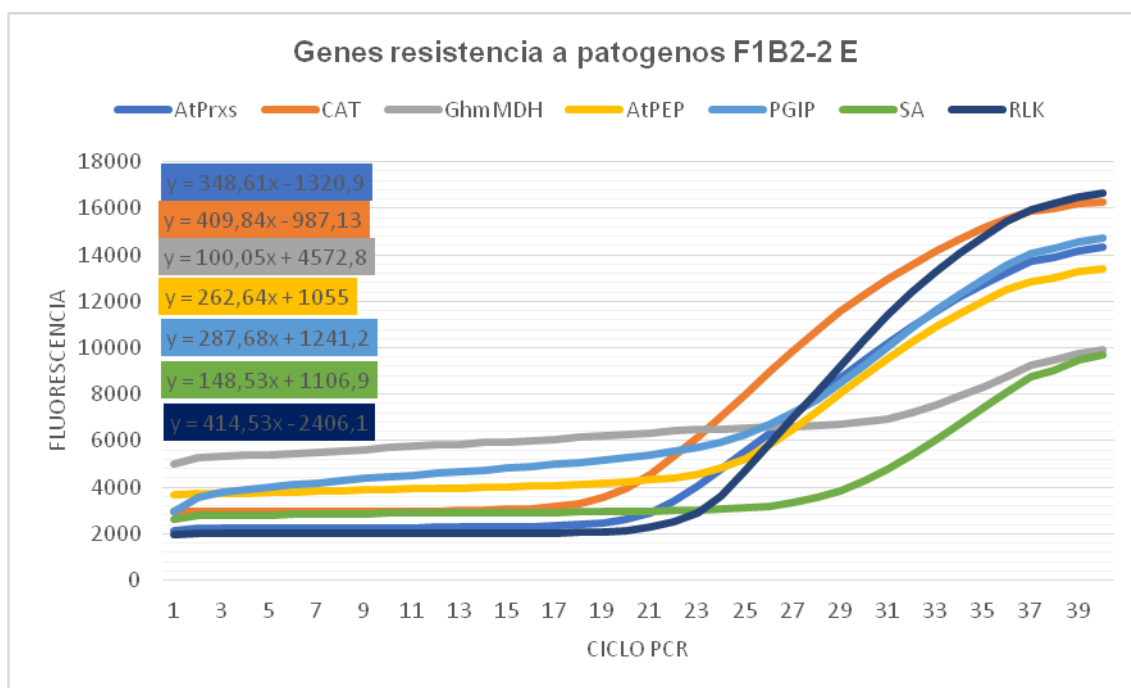


Gráfica 20. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtBG-pap: β -1,3-Glucanasa; ScChil: "Chitinase 4-like"; GHs: β -glucosidasa glucósido hidrolasas; NbAELP: Aldosa 1-epimerasa; TLP: "Thaumatococcus like protein"; BAM: β -Amilasa. En el ensayo elicitado de la variedad F1B2.

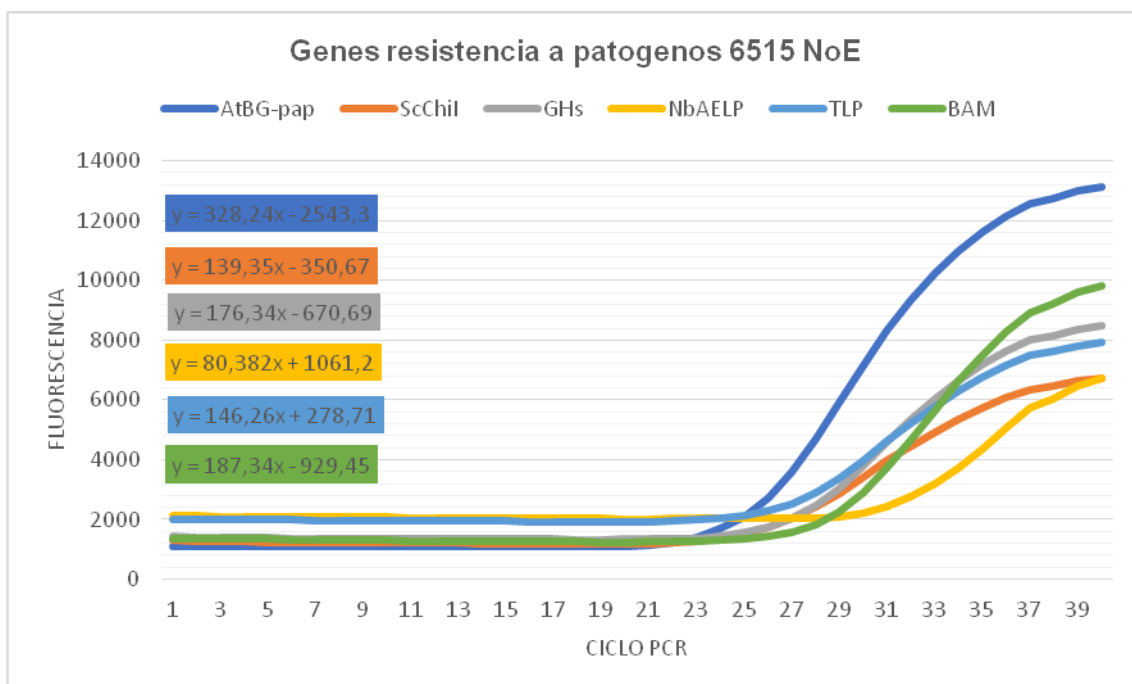


Gráfica 21. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtPrxs: Homólogo a las peroxidases; CAT: Catalasa; GhmMDH: Malato deshidrogenasa; AtPEP:

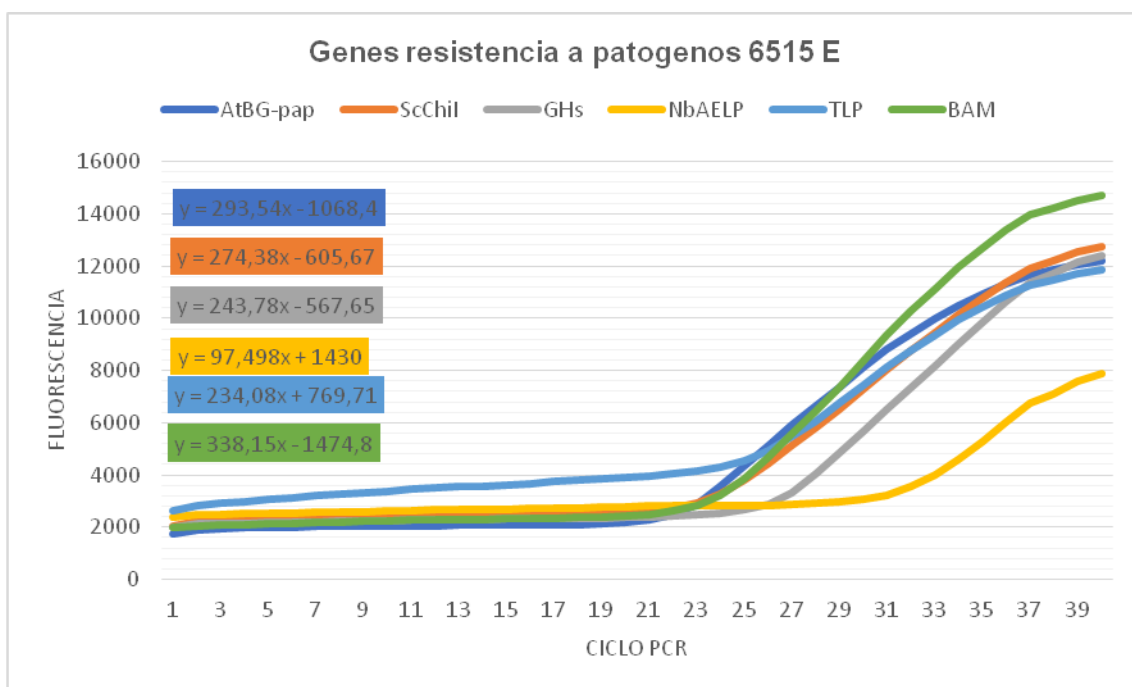
Vía de señalización del ácido jasmonico; PGIP: Proteína inhibidora de la poligalacturonasas; SA: Vía de señalización mediada por ácido salicílico y RLK: “Receptor-Like Kinase”. En el ensayo no elicitado de la variedad F1B2.



Gráfica 22. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtPrxs: Homólogo a las peroxidasas; CAT: Catalasa; GhmMDH: Malato deshidrogenasa; AtPEP: Vía de señalización del ácido jasmonico; PGIP: Proteína inhibidora de la poligalacturonasas; SA: Vía de señalización mediada por ácido salicílico y RLK: “Receptor-Like Kinase”. En el ensayo elicitado de la variedad F1B2.

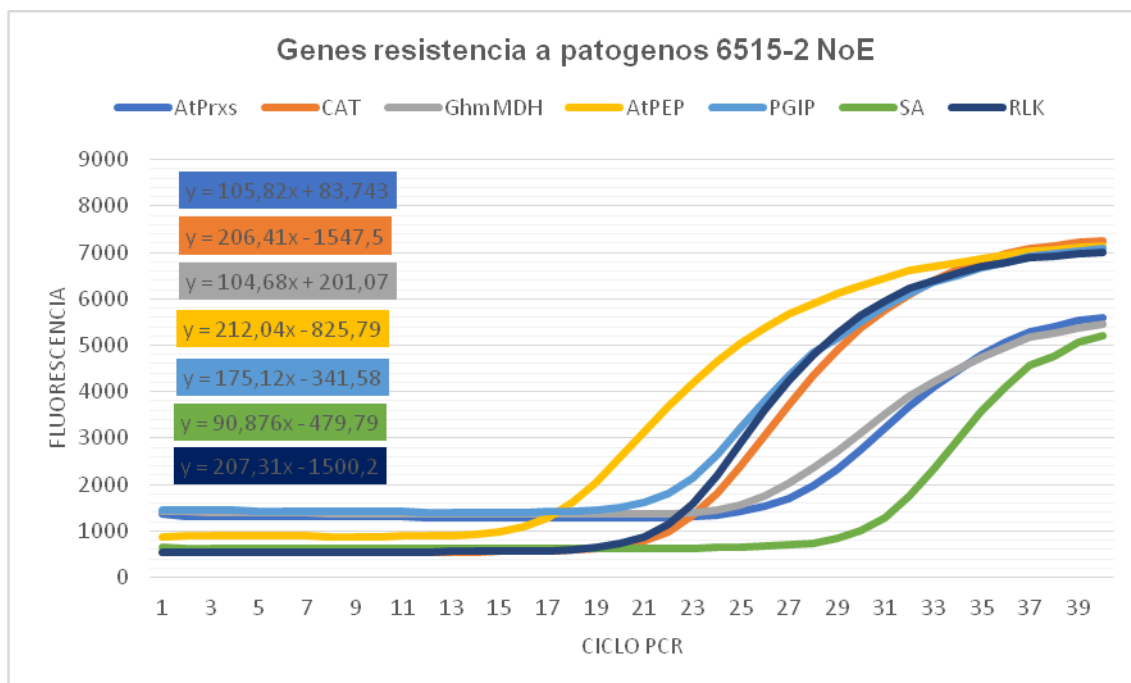


Gráfica 23. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtBG-pap: β -1,3-Glucanasa; ScChil: “Chitinase 4-like”; GHs: β -glucosidasa glucósido hidrolasas; NbAELP: Aldosa 1-epimerasa; TLP: “Thaumatococcus palmifolius like protein”; BAM: β -Amilasa. En el ensayo no elicitado de la variedad 6515.

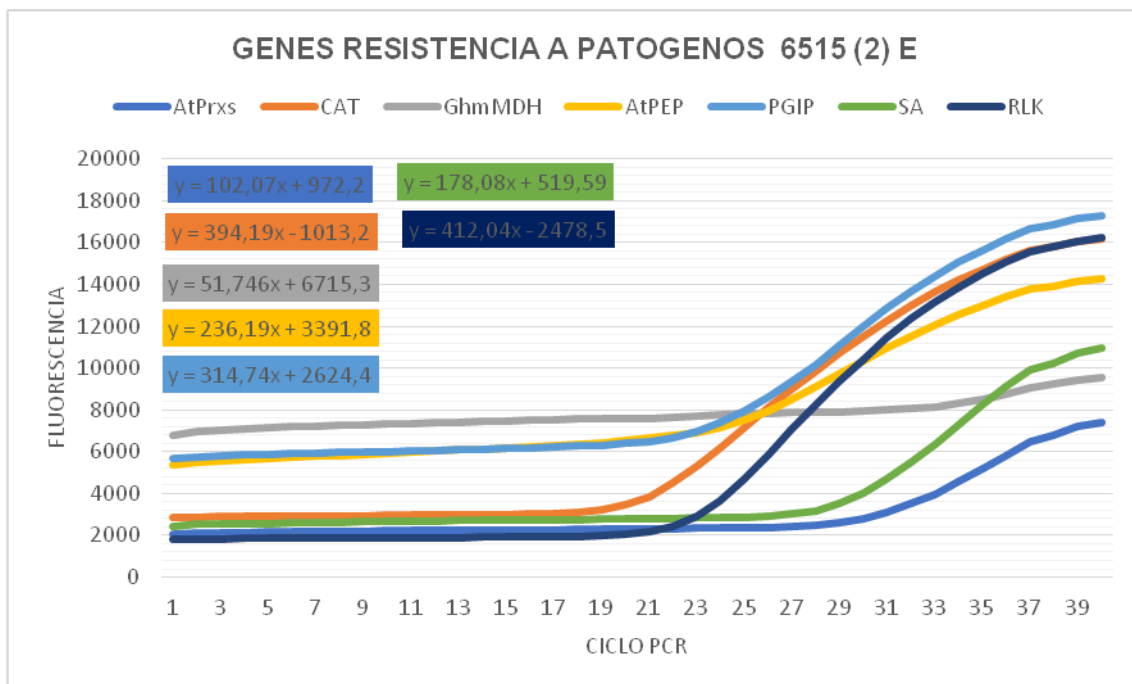


Gráfica 24. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtBG-pap: β -1,3-Glucanasa; ScChil: “Chitinase 4-like”; GHs: β -glucosidasa glucósido hidrolasas;

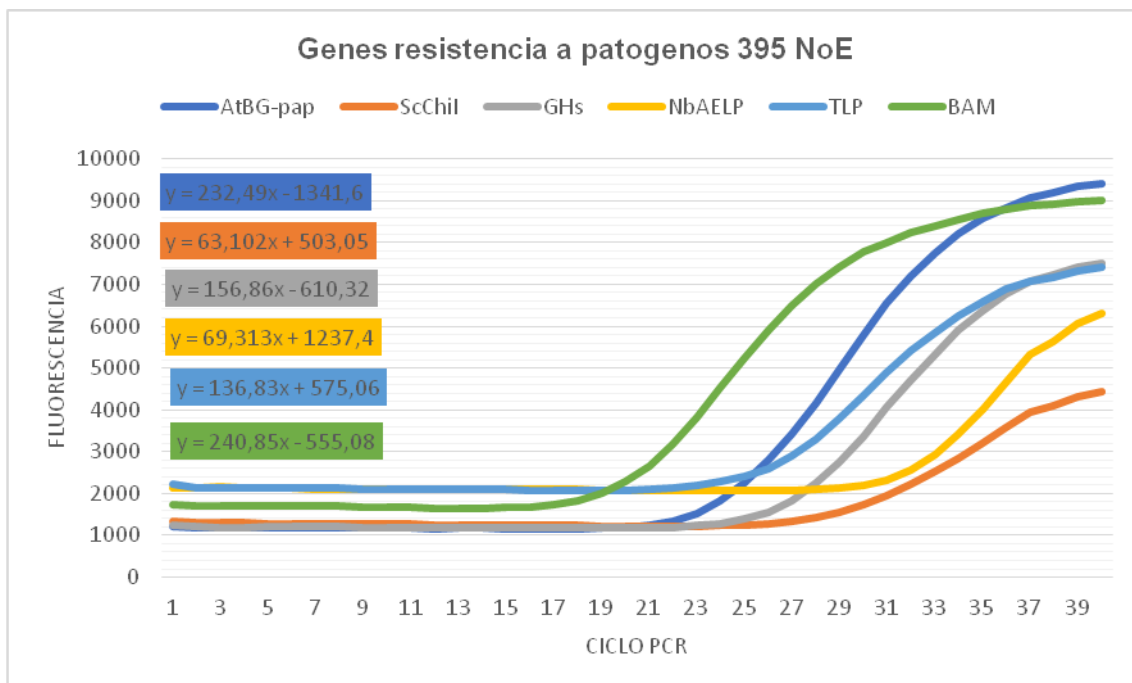
NbAELP: Aldosa 1-epimerasa; TLP: “Thaumatococcus palmifolius”; BAM: β -Amilasa. En el ensayo elicito de la variedad 6515.



Gráfica 25. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtPrxs: Homólogo a las peroxidases; CAT: Catalasa; GhmMDH: Malato deshidrogenasa; AtPEP: Vía de señalización del ácido jasmonico; PGIP: Proteína inhibidora de la poligalacturonasas; SA: Vía de señalización mediada por ácido salicílico y RLK: “Receptor-Like Kinase”. En el ensayo no elicito de la variedad 6515.

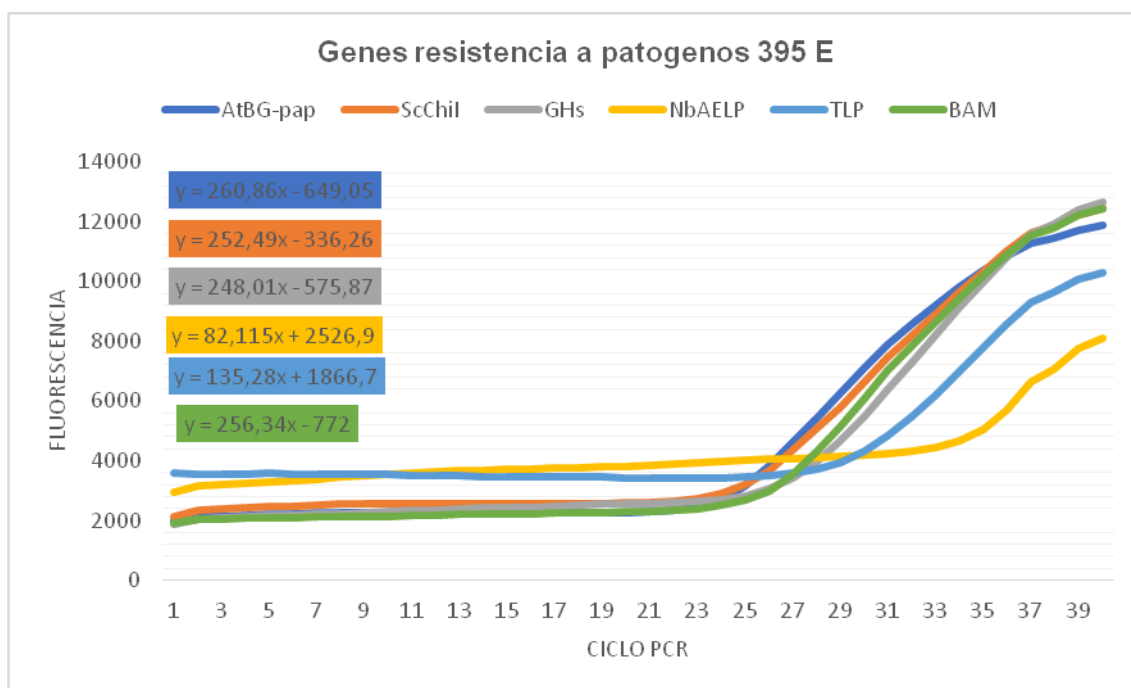


Gráfica 26. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtPrxs: Homólogo a las peroxidasas; CAT: Catalasa; GhmMDH: Malato deshidrogenasa; AtPEP: Vía de señalización del ácido jasmonico; PGIP: Proteína inhibidora de la poligalacturonasas; SA: Vía de señalización mediada por ácido salicílico y RLK: “Receptor-Like Kinase”. En el ensayo elicitado de la variedad 6515.

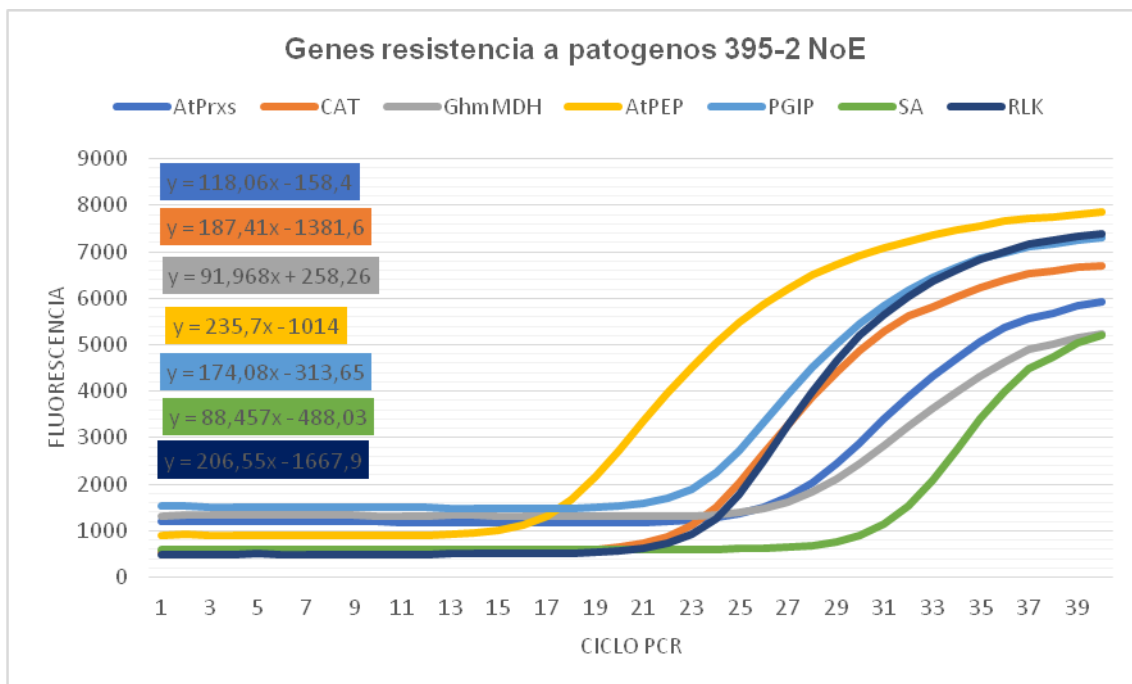


Gráfica 27. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtBG-pap:

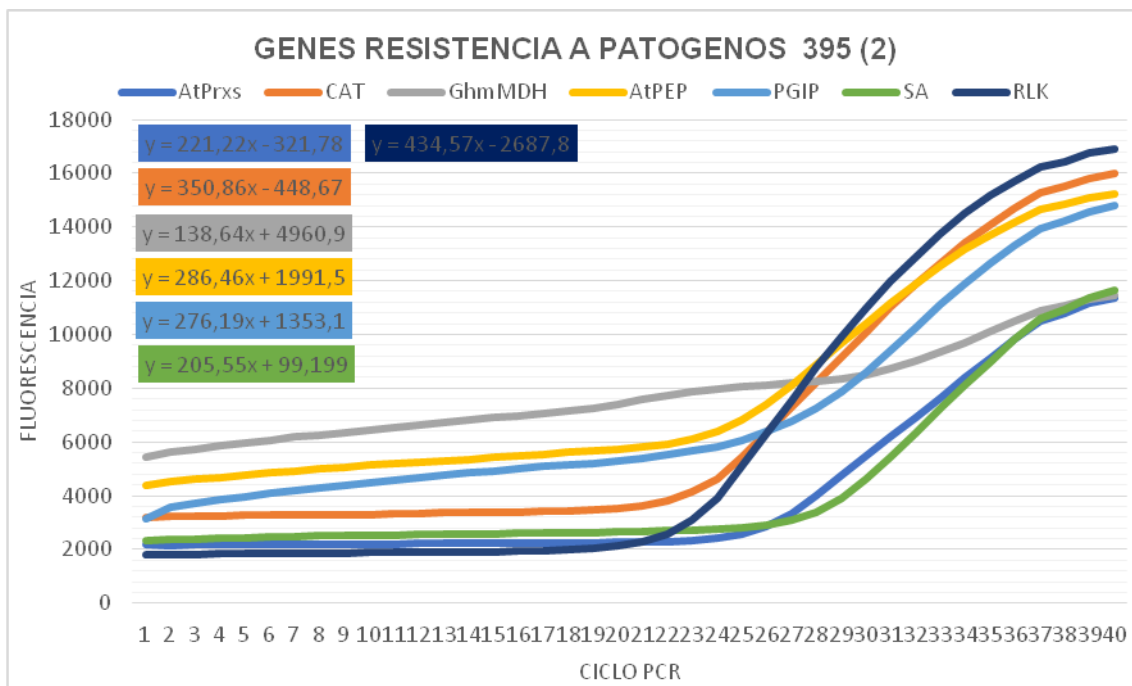
β -1,3-Glucanasa; ScChil: “Chitinase 4-like”; GHs: β -glucosidasa glucósido hidrolasas; NbAELP: Aldosa 1-epimerasa; TLP: “Thaumatococcus like protein”; BAM: β -Amilasa. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.



Gráfica 28. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtBG-pap: β -1,3-Glucanasa; ScChil: “Chitinase 4-like”; GHs: β -glucosidasa glucósido hidrolasas; NbAELP: Aldosa 1-epimerasa; TLP: “Thaumatococcus like protein”; BAM: β -Amilasa. En el ensayo elicitado de la variedad 395.

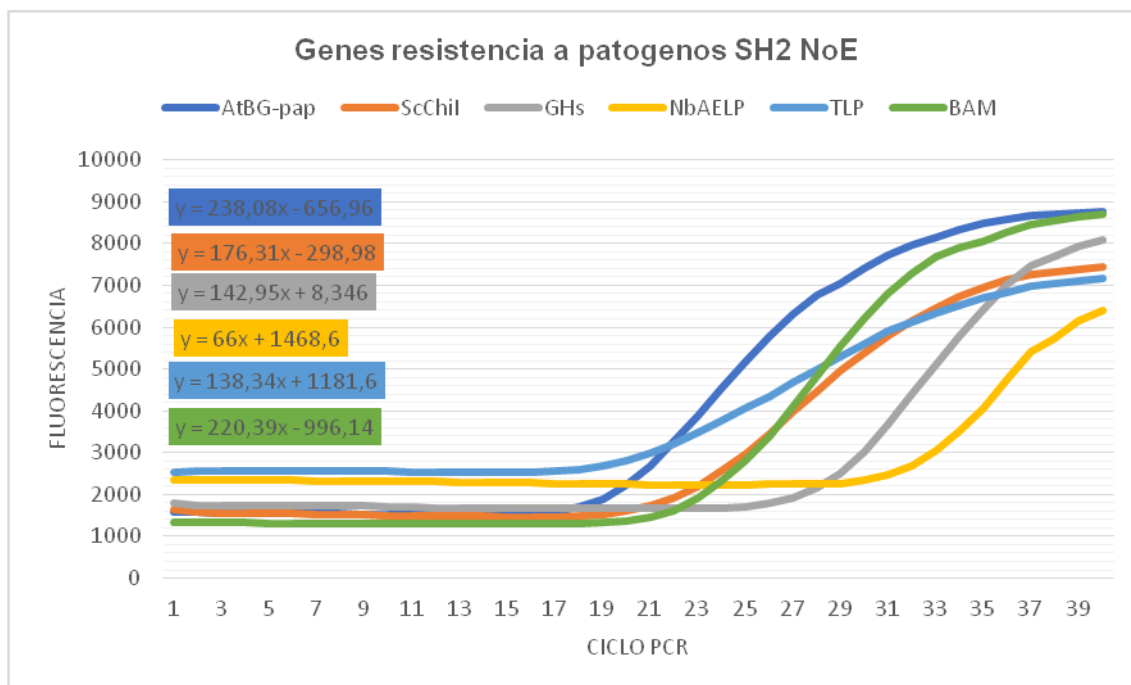


Gráfica 29. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtPrxs: Homólogo a las peroxidases; CAT: Catalasa; GhmMDH: Malato deshidrogenasa; AtPEP: Vía de señalización del ácido jasmonico; PGIP: Proteína inhibidora de la poligalacturonasas; SA: Vía de señalización mediada por ácido salicílico y RLK: “Receptor-Like Kinase”. En el ensayo no elicitado de la variedad 395.

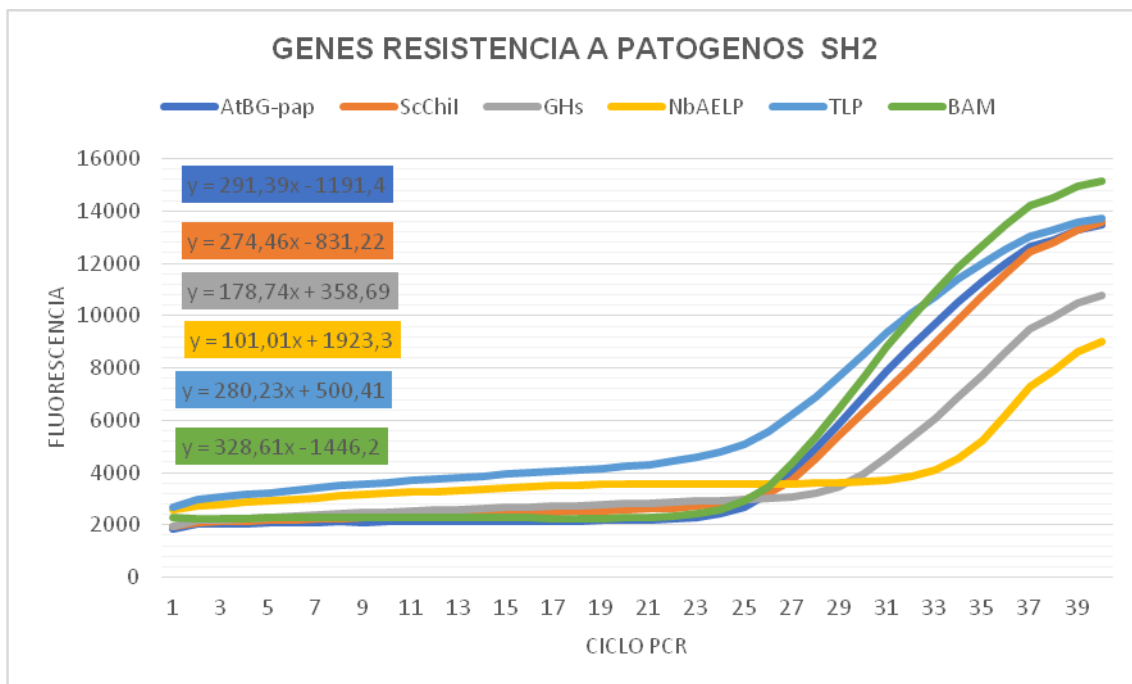


Gráfica 30. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtPrxs:

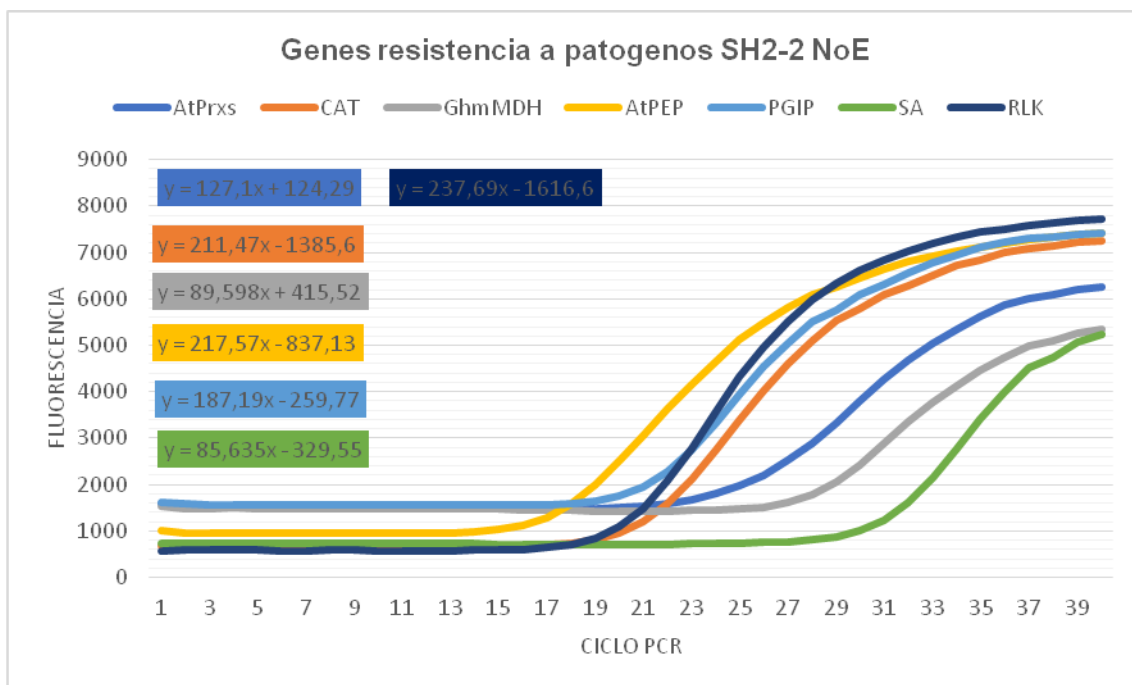
Homólogo a las peroxidasas; CAT: Catalasa; GhmMDH: Malato deshidrogenasa; AtPEP: Vía de señalización del ácido jasmonico; PGIP: Proteína inhibidora de la poligalacturonasas; SA: Vía de señalización mediada por ácido salicílico y RLK: “Receptor-Like Kinase”. En el ensayo elicitado de la variedad 395.



Gráfica 31. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtBG-pap: β -1,3-Glucanasa; ScChil: “Chitinase 4-like”; GHs: β -glucosidasa glucósido hidrolasas; NbAELP: Aldosa 1-epimerasa; TLP: “Thaumatococcus like protein”; BAM: β -Amilasa. En el ensayo no elicitado de la variedad SH2.

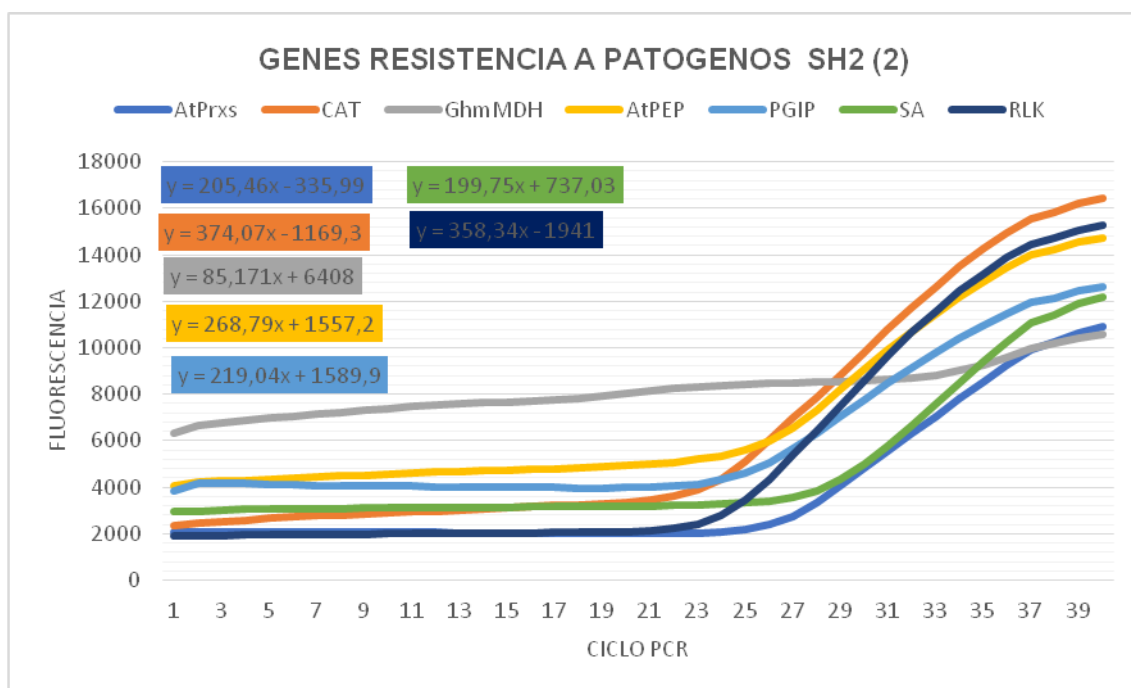


Gráfica 32. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtBG-pap: β -1,3-Glucanasa; ScChil: "Chitinase 4-like"; GHs: β -glucosidasa glucósido hidrolasas; NbAELP: Aldosa 1-epimerasa; TLP: "Thaumatococcus like protein"; BAM: β -Amilasa. En el ensayo elicitado de la variedad SH2.



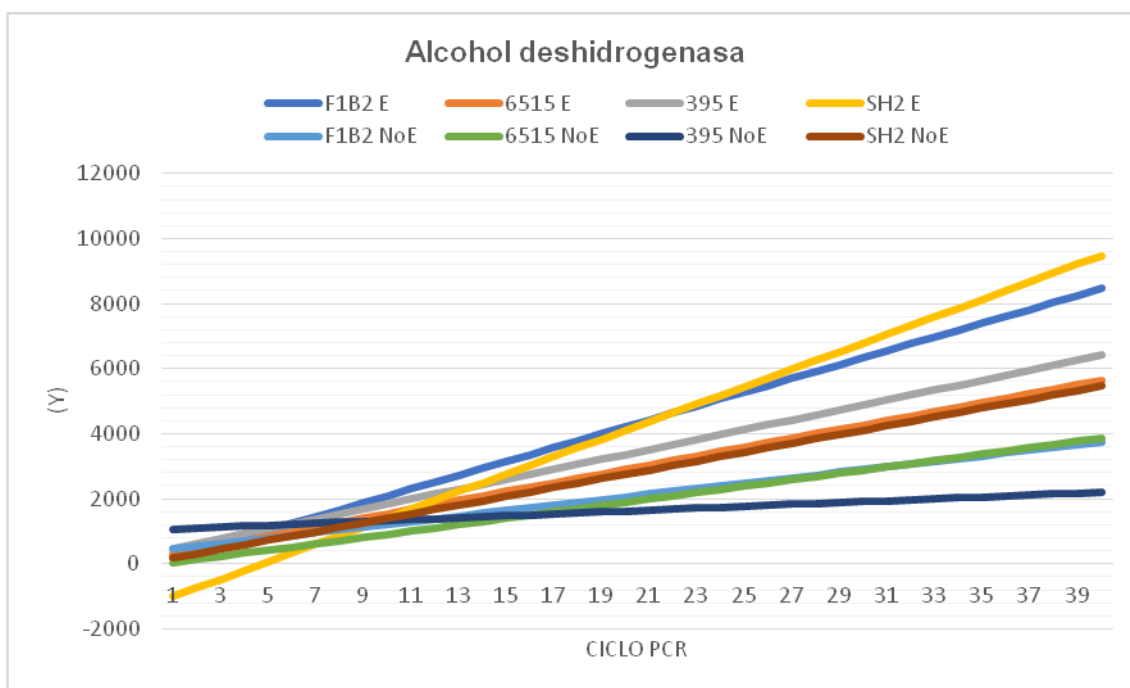
Gráfica 33. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtPrxs: Homólogo a las peroxidases; CAT: Catalasa; GhmMDH: Malato deshidrogenasa; AtPEP:

Vía de señalización del ácido jasmonico; PGIP: Proteína inhibidora de la poligalacturonasas; SA: Vía de señalización mediada por ácido salicílico y RLK: “Receptor-Like Kinase”. En el ensayo no elicitado de la variedad SH2.

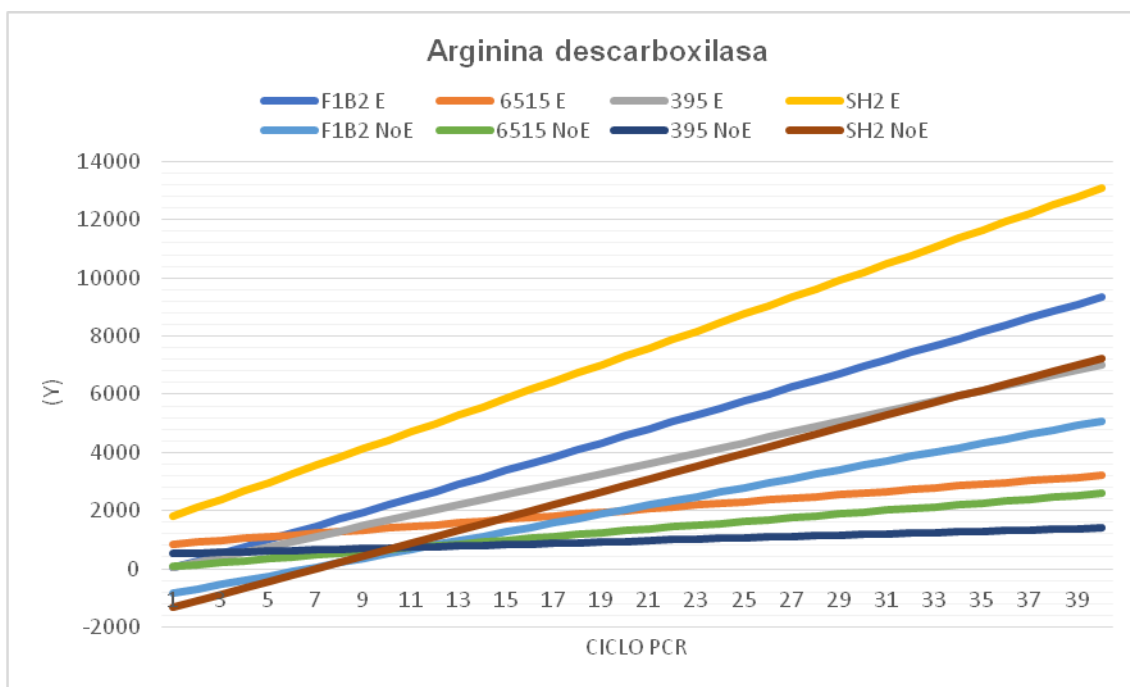


Gráfica 34. Curva de detección por fluorescencia y # de ciclo de PCR de genes AtPrxs: Homólogo a las peroxidasas; CAT: Catalasa; GhmMDH: Malato deshidrogenasa; AtPEP: Vía de señalización del ácido jasmonico; PGIP: Proteína inhibidora de la poligalacturonasas; SA: Vía de señalización mediada por ácido salicílico y RLK: “Receptor-Like Kinase”. En el ensayo elicitado de la variedad SH2.

6.1.4. Graficas ecuación lineal genes

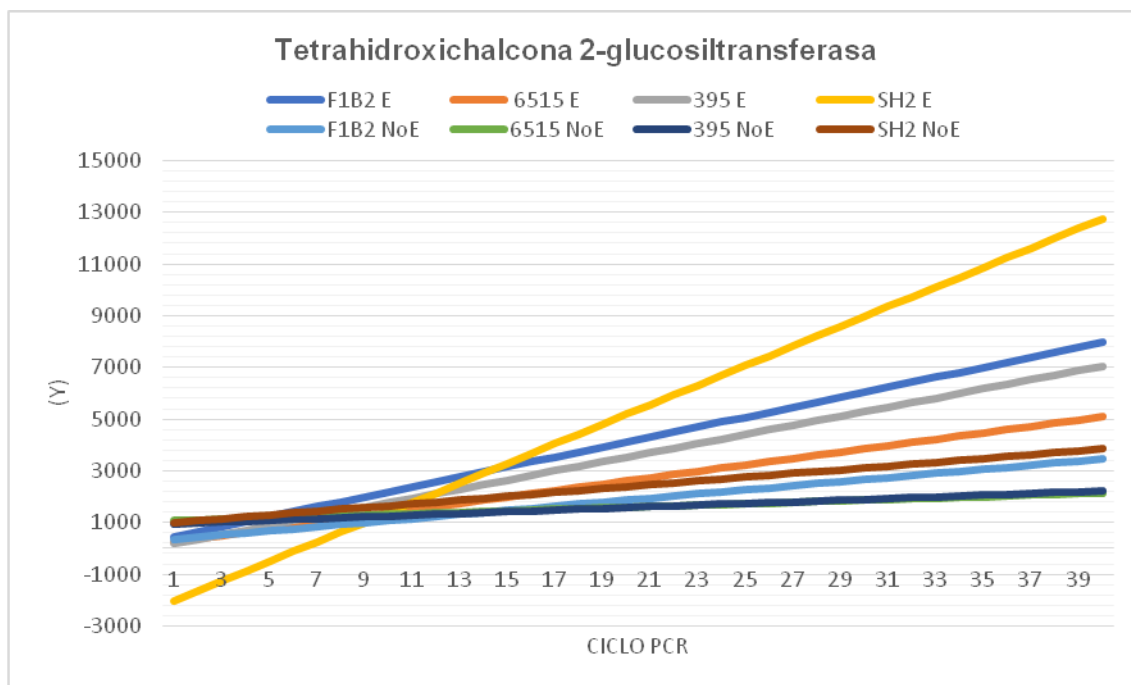


Gráfica 35. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen alcohol deshidrogenasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).

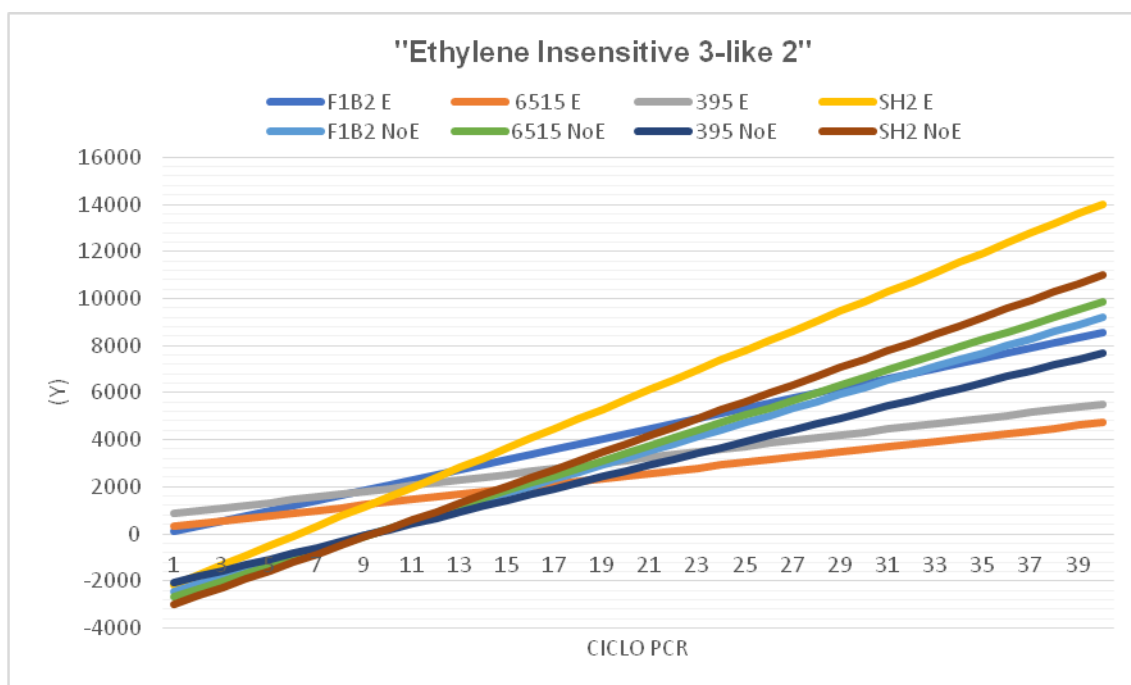


Gráfica 36. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia

del correspondiente gen arginina descarboxilasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicadas (E) y no elicadas (NoE).

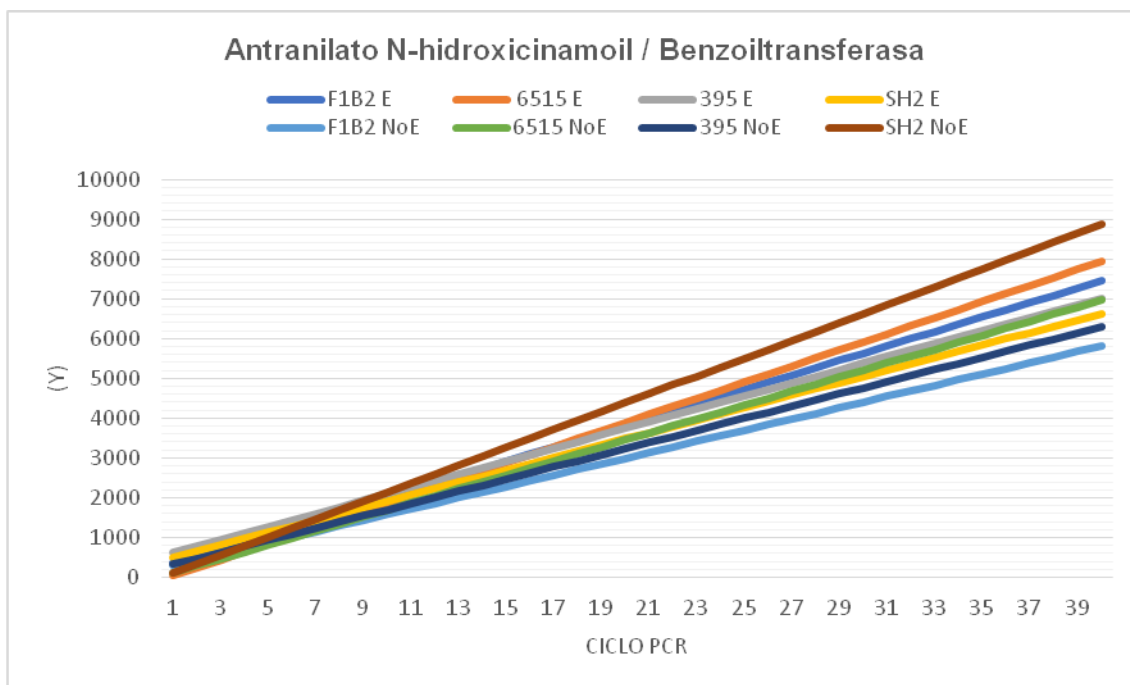


Gráfica 37. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen Tetrahidroxichalcona 2-glucosiltransferasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicadas (E) y no elicadas (NoE).

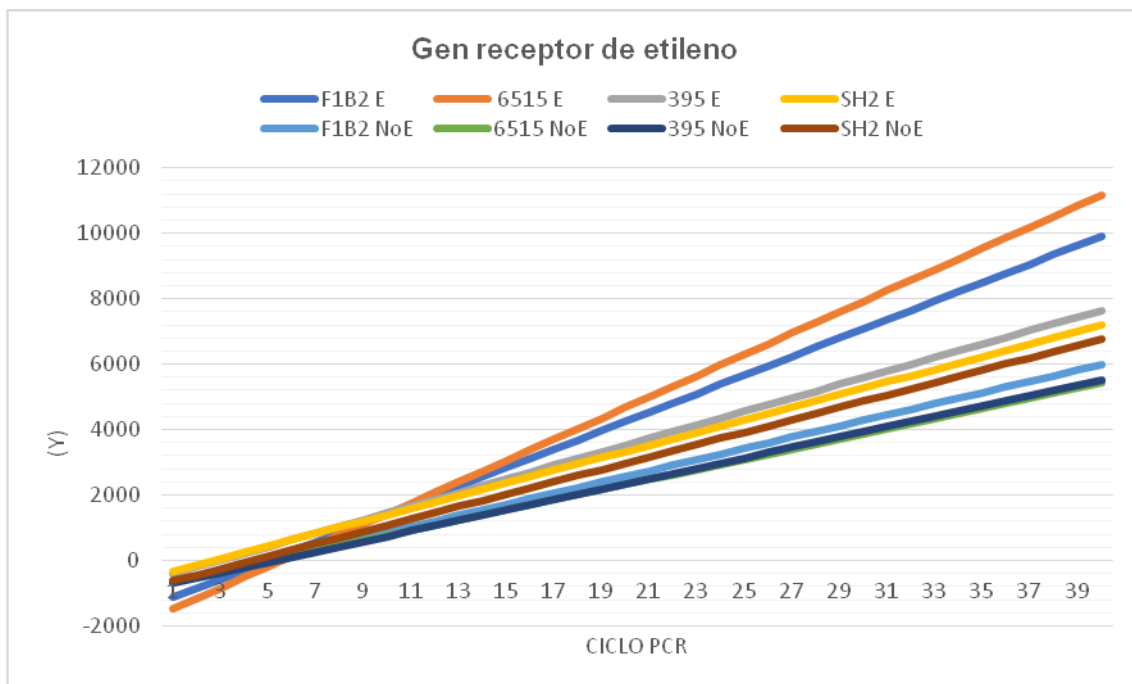


Gráfica 38. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia

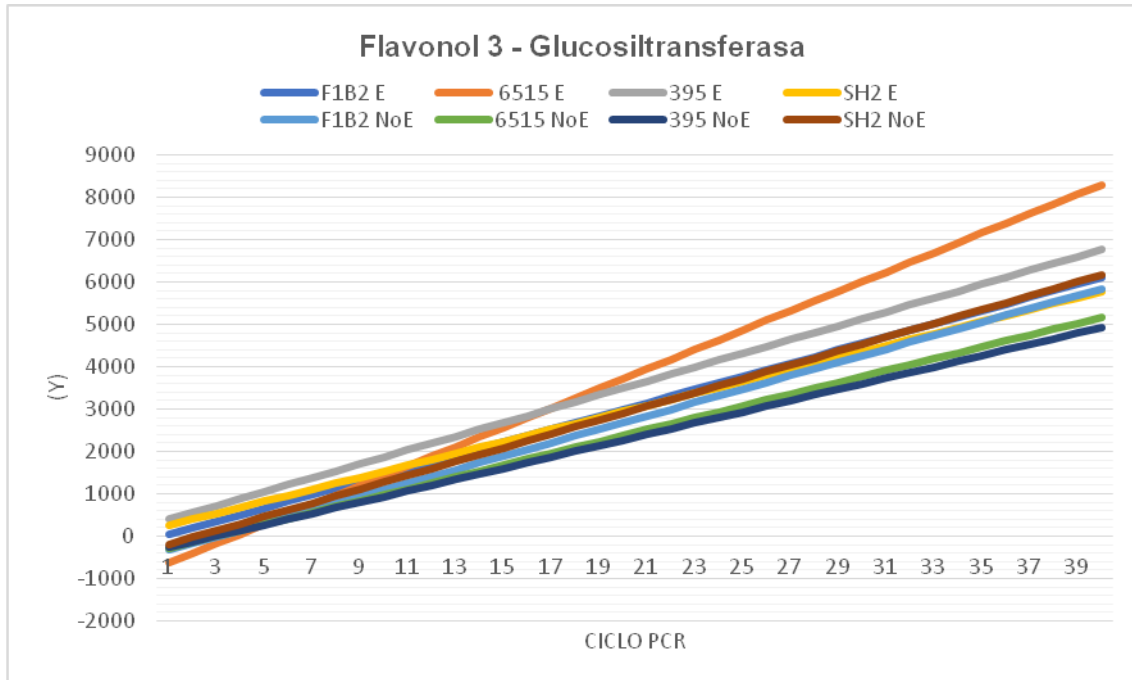
del correspondiente gen "Ethylene Insensitive 3-like 2" de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).



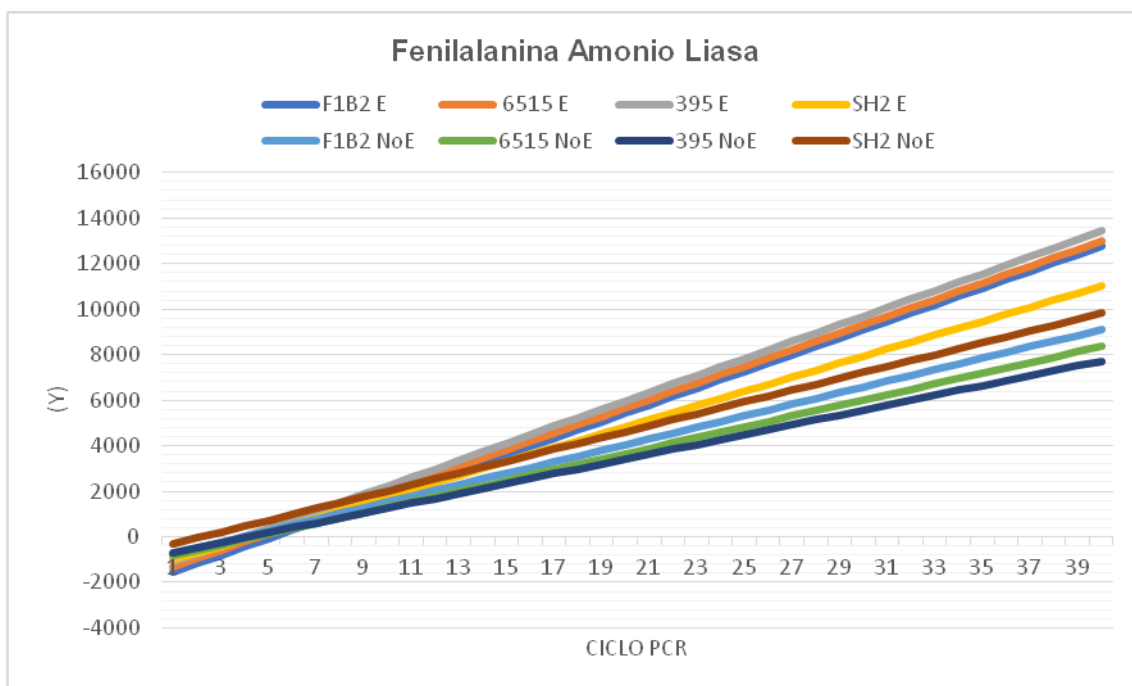
Gráfica 39. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen Antranilato N-hidroxicinamoil / Benzoiltransferasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).



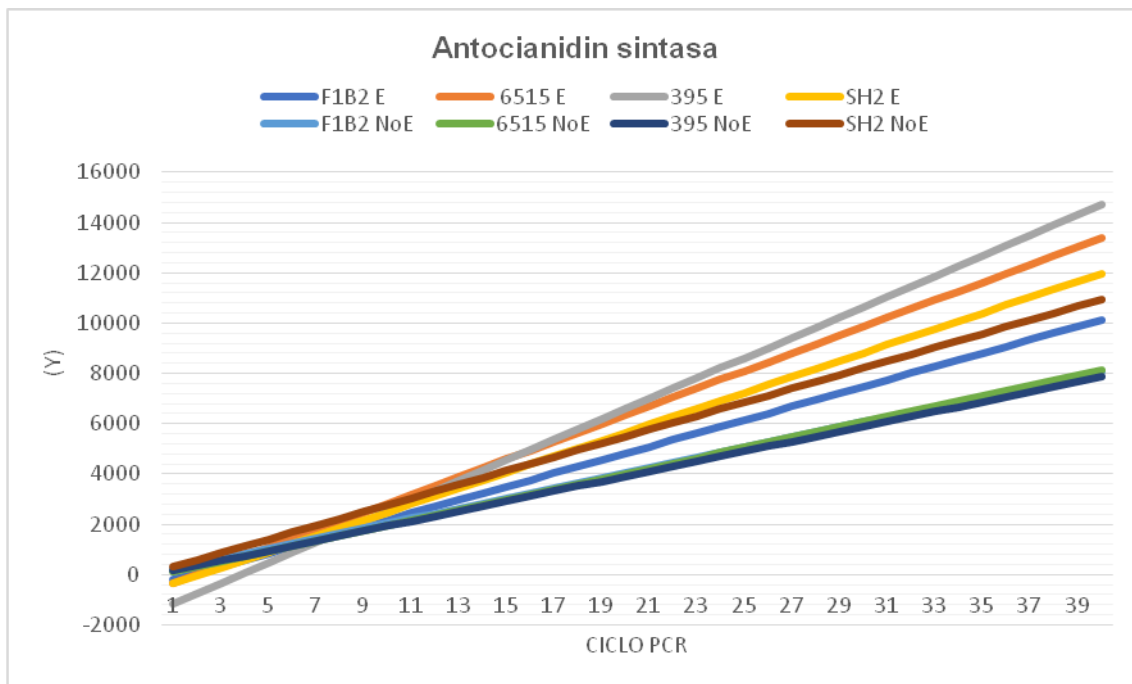
Gráfica 40. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen receptor de etileno de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).



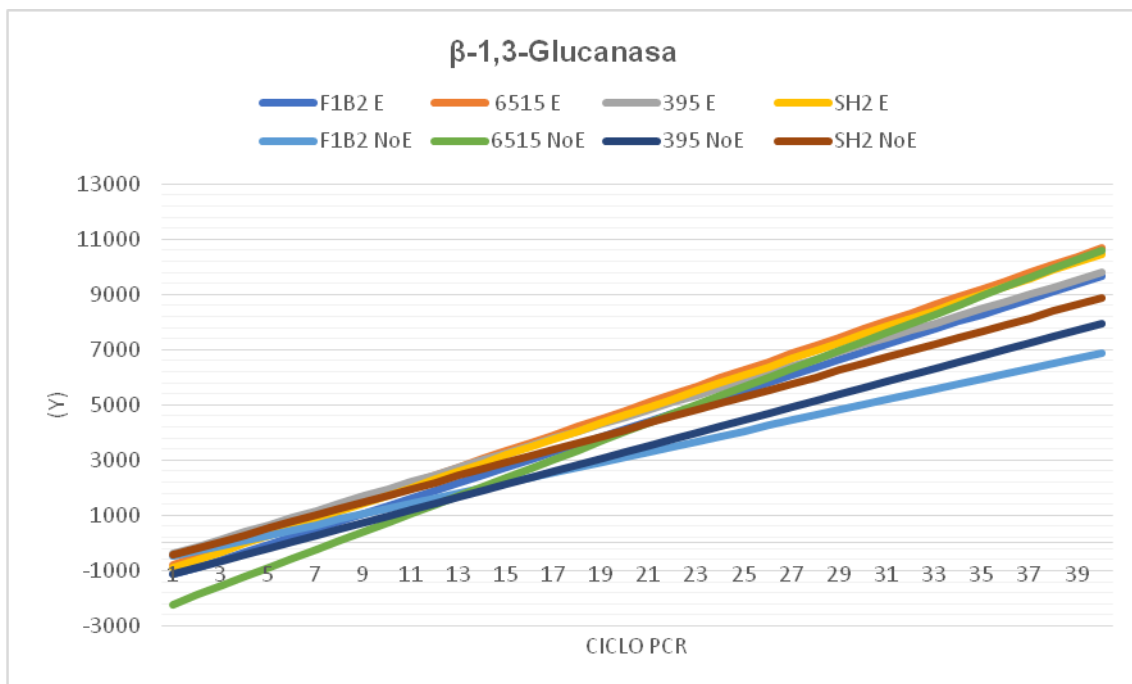
Gráfica 41. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen Flavonol 3 - Glucosiltransferasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).



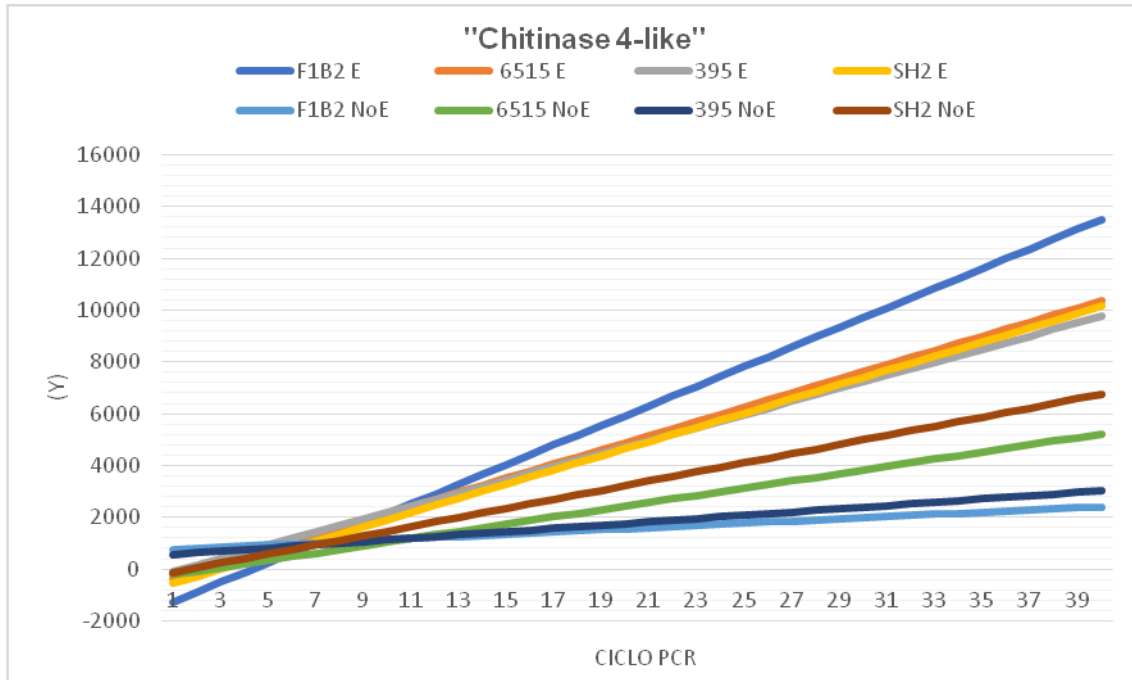
Gráfica 42. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen fenilalanina amonio liasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).



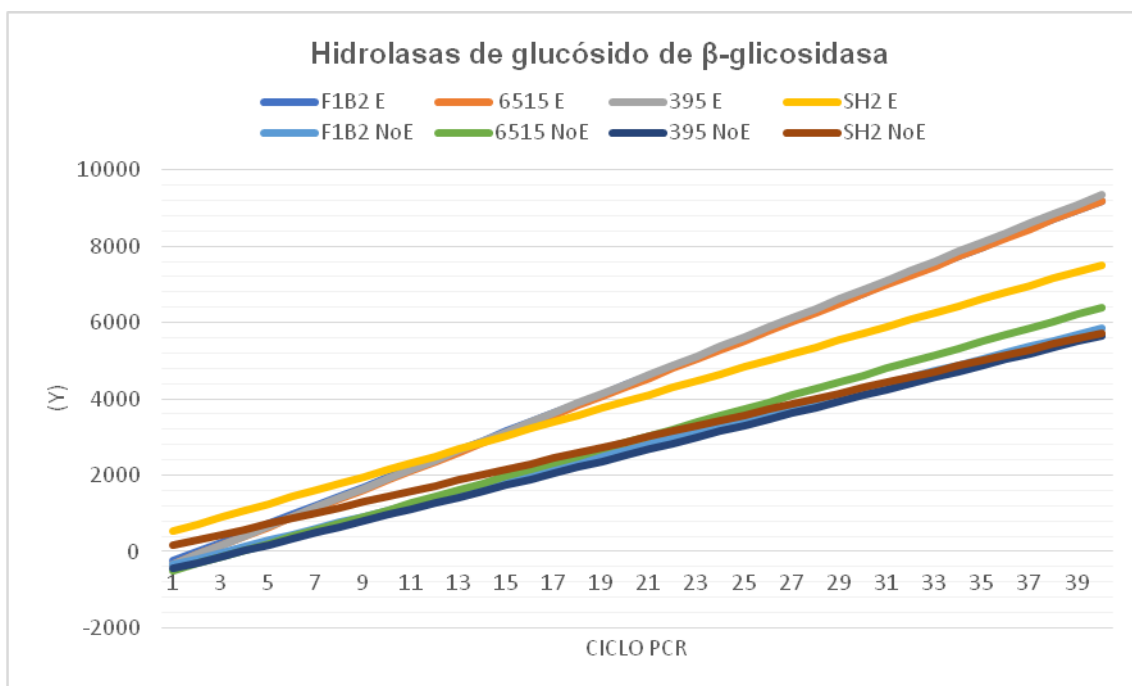
Gráfica 43. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen Antocianidin sintasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).



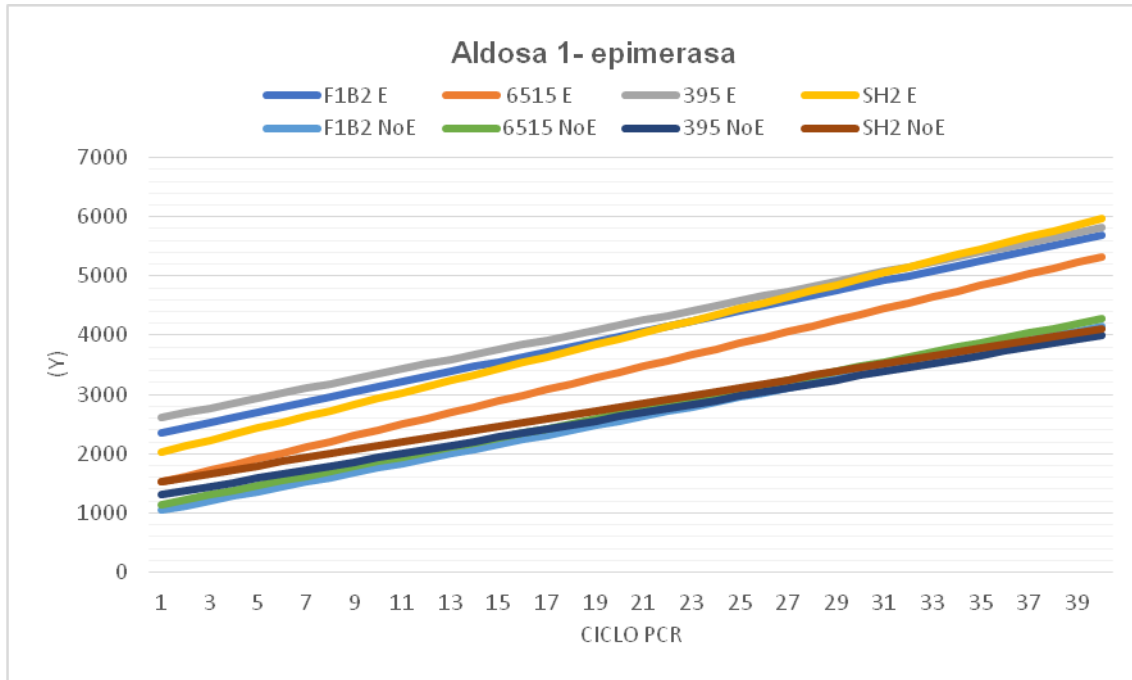
Gráfica 44. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen β -1,3-Glucanasa las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).



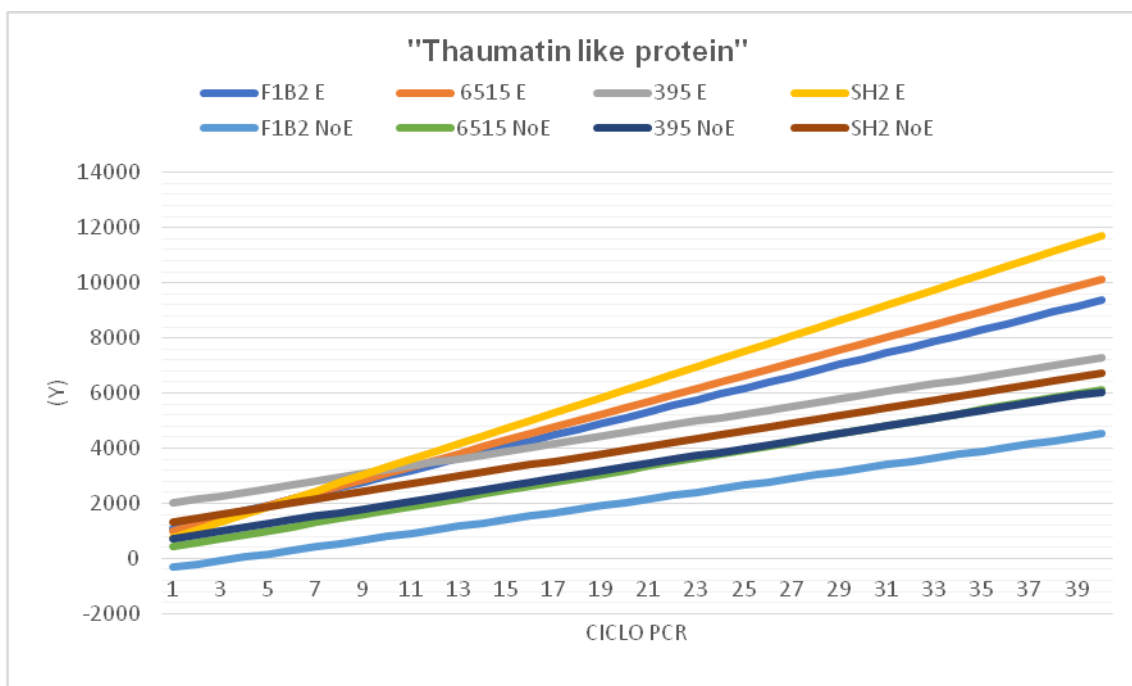
Gráfica 45. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen "Chitinase 4-like" de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).



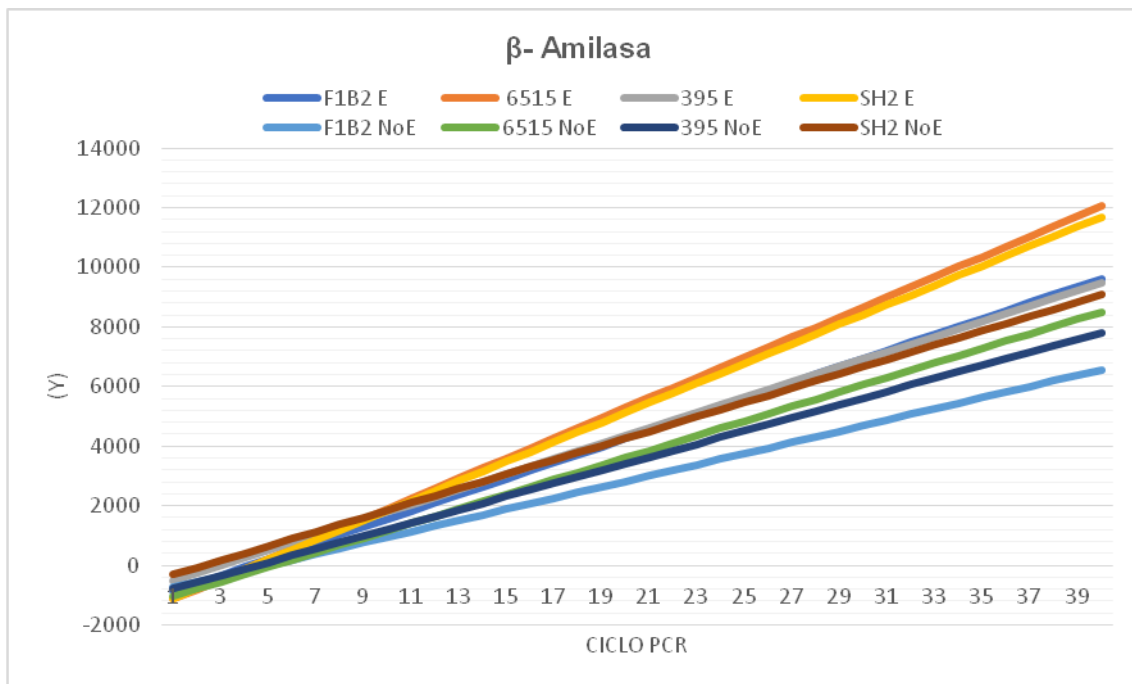
Gráfica 46. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen Hidrolasas de glucósido de β -glicosidasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).



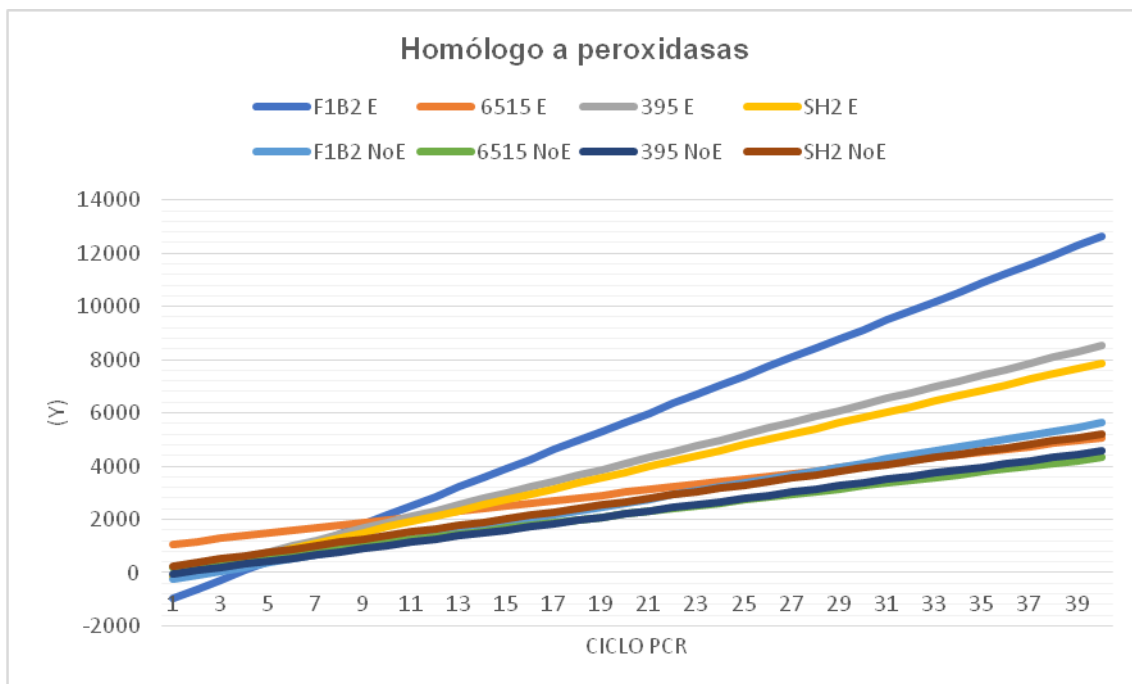
Gráfica 47. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen aldosa 1-epimerasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).



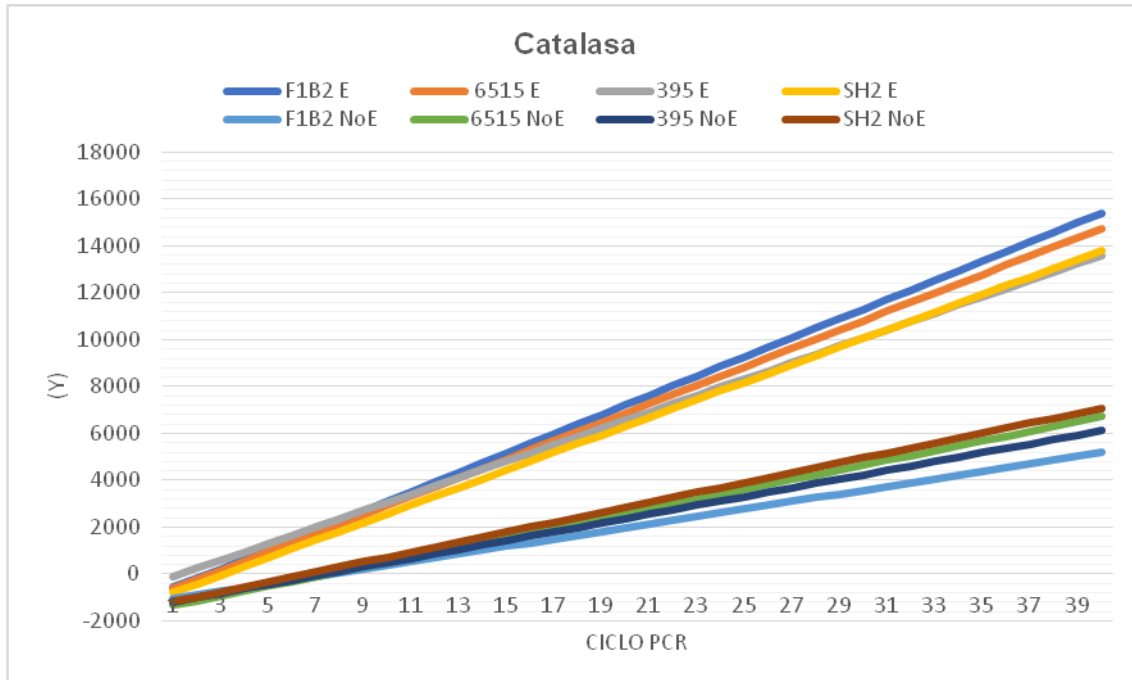
Gráfica 48. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen "Thaumatococcus" de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).



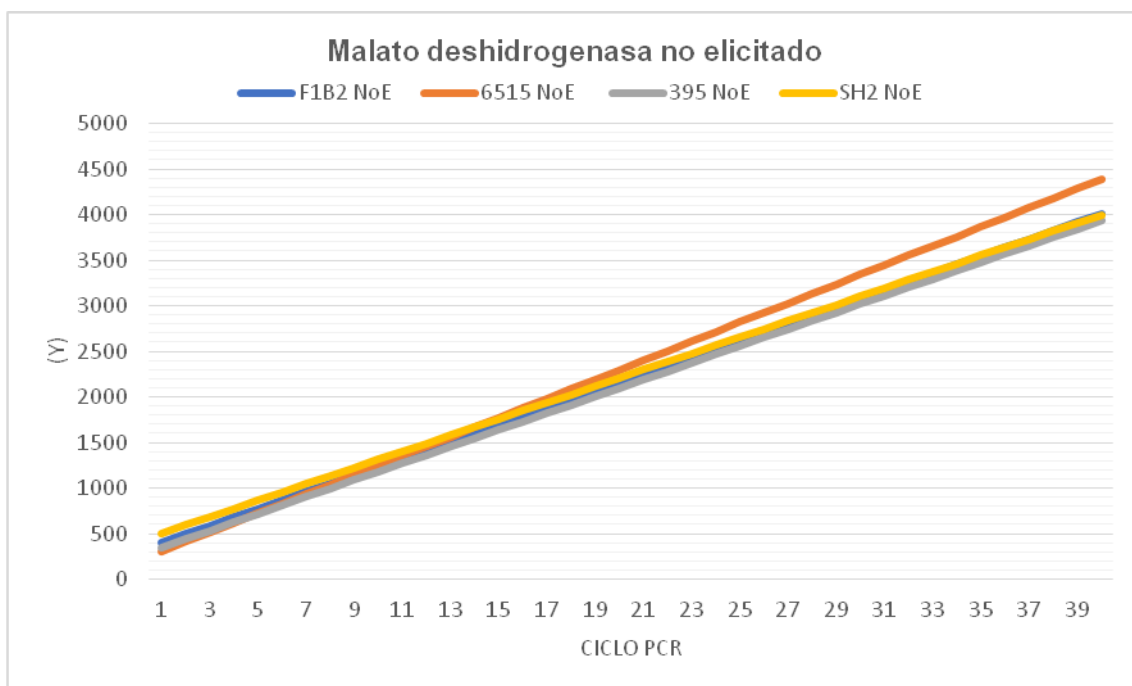
Gráfica 49. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen β - Aamilasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicidadas (E) y no elicidadas (NoE).



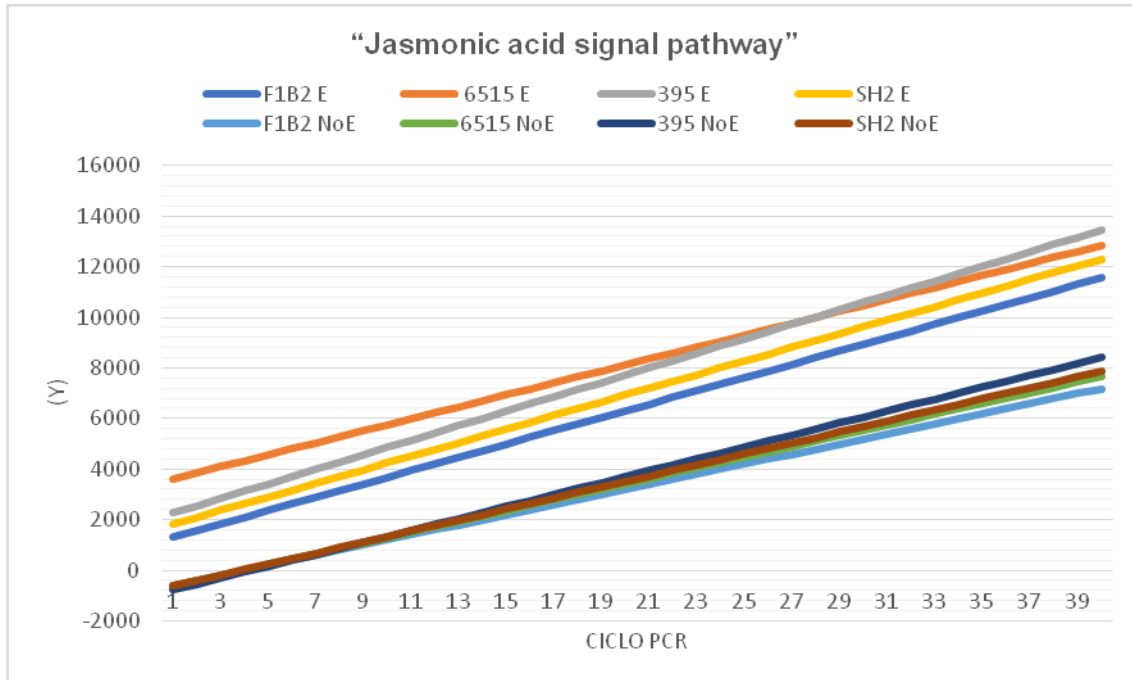
Gráfica 50. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen homologo a peroxidasas de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).



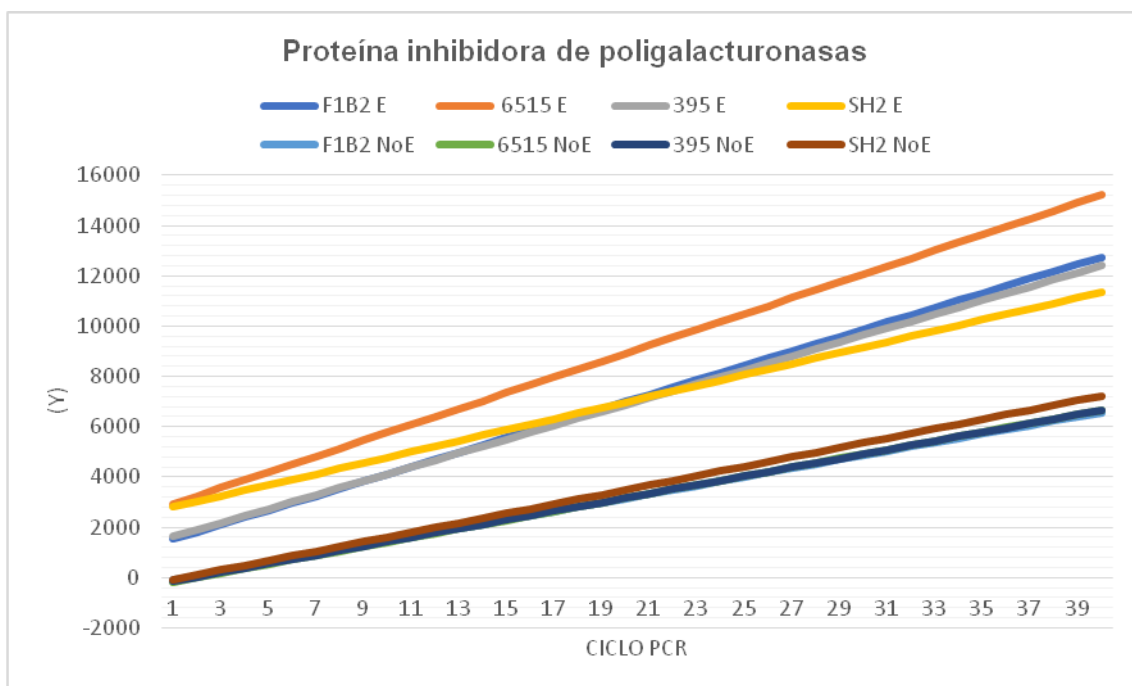
Gráfica 51. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen catalasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).



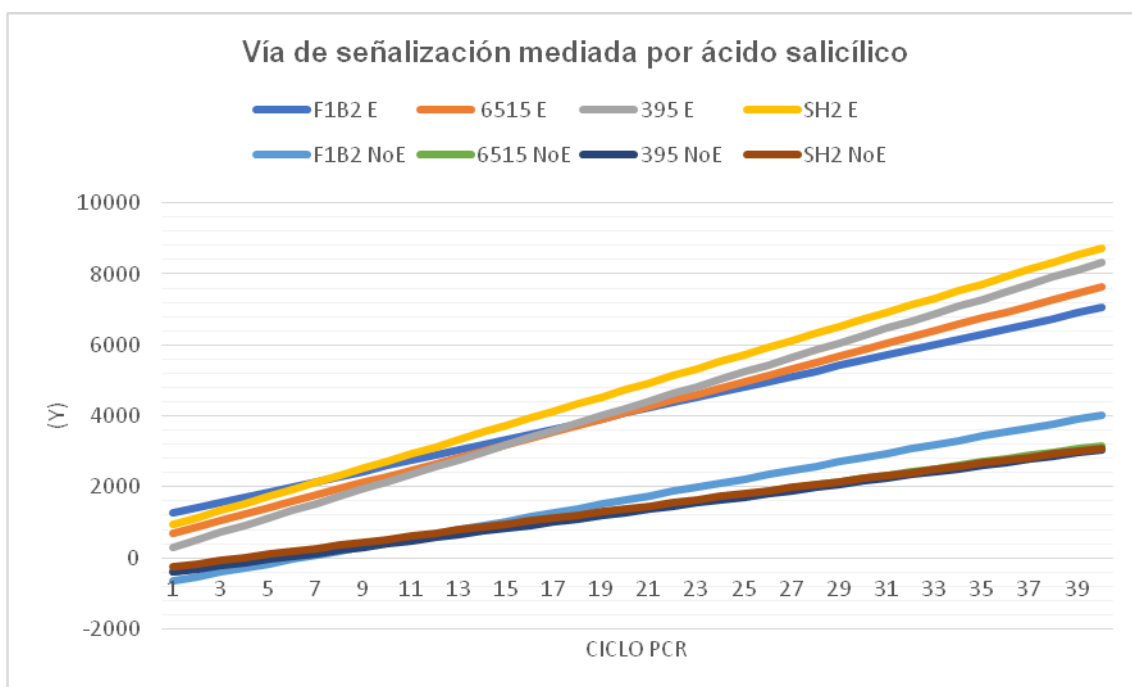
Gráfica 52. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen malato deshidrogenasa de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2, no elicadas (NoE).



Gráfica 53. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen “Jasmonic acid signal pathway” de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicadas (E) y no elicadas (NoE).

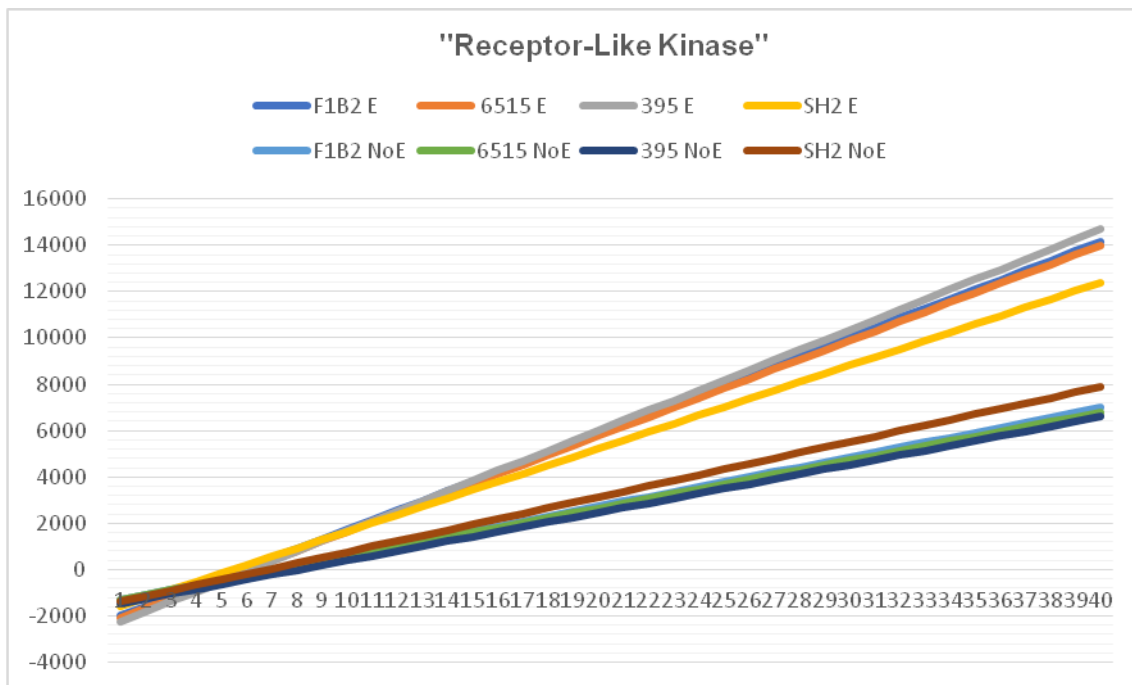


Gráfica 54. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen relacionado con “proteína inhibidora de poligalacturonasas” de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).



Gráfica 55. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen relacionado con Vía de señalización mediada por ácido salicílico

de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).



Gráfica 56. Regresión lineal a partir de la ecuación $y=mx+b$ de la curva de fluorescencia del correspondiente gen "Receptor-Like Kinase" de las variedades resistentes F1B2 – 395, susceptibles 6515 - SH2 elicitadas (E) y no elicitadas (NoE).