

**VARIACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* EN
RELACIÓN CON LA RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD DE HÍBRIDOS DE
CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*).**



Aura Vanessa Hernández Rodríguez

**Universidad Militar Nueva Granada
Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas
Programa de Biología Aplicada
Bogotá D.C. 2023**

**VARIACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* EN
RELACIÓN CON LA RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD DE HÍBRIDOS DE
CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*).**



AUTOR

Aura Vanessa Hernández Rodríguez

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

BIÓLOGO APLICADO

Director:

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

Universidad Militar Nueva Granada

Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas

Programa de Biología Aplicada

Bogotá D.C. 2023

Este trabajo está dedicado a mis Padres y Hermanos.
Porque siempre haya una voz de un ser amado diciendo:

“Puedes lograr todo lo que te propongas”

Ese es mi propósito digno

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la fuerza creadora del universo por conectar todas las situaciones posibles para que eligiera este camino.

Desde lo más profundo de mi ser, agradezco a mis padres por abrirme las puertas y crear las posibilidades en medio de cualquier circunstancia para que pudiera estudiar; apoyándome en todo sentido posible para que nunca me falte nada, siempre enseñándome con amor a disfrutar el trayecto.

A mis hermanos, por ser una fuerza inmensa de motivación, por su apoyo, su compañía, por ser mis despertadores muchas noches de traspasado y, sobre todo, porque aun sin entender muchas veces lo que hacía, se sienten orgullosos de mis proyectos.

A mi director, el Dr. Juan José Filgueira Duarte, por recibirme en el grupo de Fitopatología Molecular, las palabras son pocas para agradecer su paciencia, su apoyo incondicional durante todo el tiempo de mi estancia en la universidad, no sólo como investigador y docente, poniéndonos retos, sino como ser humano, motivándome a dar lo mejor de mí, en cada aspecto de mi vida ¡No ver el mundo caer frente a mis ojos sin reacción, a ser mejor científica con disciplina y dedicación... Muchas Gracias Juan José!

A la Universidad, por permitirme formarme en un espacio tan ameno como mi otra casa; Por brindarme siempre las mejores ayudas desde la participación en el proyecto que abarca mi trabajo de grado y siempre de la mano de grandes personas, que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme a ser mejor profesional y mejor persona.

Gracias a los laboratoristas, a Adriana, a Carito, a Melva, por alegrarnos los laboratorios; Al Dr. Pedro Jiménez por abrir las puertas de una forma distinta y desafiante de ver la ciencia; Al Dr. Francisco Sánchez Barrera, porque fue quien desde un principio me dio a entender lo compleja y maravillosa que es la biología; a la Dra. Biviana Barrera, por ayudarme a confirmar que la biología molecular y la neurociencia son ramas de la ciencia que me apasionan.

A cada una de las personas dentro y fuera de la universidad, que hicieron mucho más alegre y amena la vida universitaria, que aportaron su grano de arena en el proceso. A Loren, por ser la voz de la consciencia en la universidad, a mis compañeros y amigos del laboratorio, en especial Daniela y Sebastián con quienes aprendí y disfruté mucho nuestros debates de laboratorio, mientras desarrollamos nuestros proyectos.

Muchas Gracias por todo,

¡Eureka!

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE ANEXOS	9
1. CAPÍTULO I: Variabilidad genética de <i>Fusarium oxysporum</i> y su relación con la patogenicidad	10
1.1. <i>Fusarium oxysporum</i> características y su impacto	10
1.2. Ciclo de vida de <i>F. oxysporum</i>	11
1.3. El clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>) y el impacto de <i>Fusarium oxysporum</i>	12
1.4. Patogenicidad y Virulencia de <i>F. oxysporum</i>	13
1.5. Variabilidad genética de <i>Fusarium oxysporum</i>	14
1.6. Estado de las Formas especiales de <i>Fusarium oxysporum</i>	16
1.7. Biotecnología y los mecanismos de control de <i>Fusarium oxysporum</i>	16
2. CAPÍTULO 2: Variación de la patogenicidad de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> en relación con la resistencia o susceptibilidad de híbridos de <i>Dianthus caryophyllus</i> .	18
2.1. RESUMEN	18
2.2. ABSTRACT	18
2.3. INTRODUCCIÓN	19
2.4. OBJETIVOS	21
2.4.1. General	21
2.4.2. Objetivos Específicos	21
2.5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.5.1. Área de estudio	21
2.5.2. Obtención del Material Biológico	21
2.5.2.1. Obtención y propagación de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i>	21
2.5.2.2. Obtención de cultivos monospóricos y propagación de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i>	22
2.5.2.3. Propagación de material vegetal <i>in vitro</i>	22
2.5.3. Ensayos de patogenicidad <i>in vitro</i>	24
2.5.3.1. Evaluación de síntomas del hospedero y determinación de la incidencia y severidad ensayo <i>in vitro</i>	24
2.5.3.2. Análisis estadístico en ensayos de patogenicidad <i>in vitro</i>	25
2.5.4. Ensayos de patogenicidad <i>ex vitro</i>	25
2.5.4.1. Seguimiento de síntomas del hospedero y determinación del progreso de la enfermedad en ensayo <i>ex vitro</i>	26
2.5.4.2. Análisis estadístico y AUDPC en ensayos de patogenicidad <i>ex vitro</i>	26
2.5.5. Caracterización molecular	27
2.5.5.1. Extracción de ADN	27
2.5.5.2. Evaluación por PCR de genes representativos del genoma y genes SIX	27

2.6. RESULTADOS	30
2.6.1. Caracterización morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i>	30
2.6.2. Ensayo de patogenicidad in vitro de los cinco aislados de FOX sobre las variedades resistentes y susceptibles de clavel	31
2.6.3. Evaluación de la infección de FOX en las plantas por indexación	37
2.6.3.1. Incidencia y severidad para el ensayo in vitro y la respuesta de las variedades resistentes y susceptibles de clavel a la presencia de FOX.	40
2.6.3.2. Análisis estadístico de los valores de incidencia y severidad para el ensayo in vitro	44
2.6.4. Ensayos de patogenicidad, sintomatología de marchitez vascular y seguimiento de los síntomas ex vitro.	47
2.6.5. Incidencia y severidad para el ensayo ex vitro y la respuesta de las variedades resistentes y susceptibles de clavel a la presencia de FOX.	50
2.6.5.1. Análisis estadístico de los valores de Incidencia y Severidad para el ensayo ex vitro	51
2.6.6. Caracterización molecular	53
2.6.6.1. Extracción de ADN Fúngico	53
2.6.6.2. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa para genes ortólogos y genes SIX.	54
2.6.6.3. PCR con los primers H4a/H4b, ITS1/ITS2/ITS4	54
2.6.6.4. PCR con los primers SIX	56
2.7. DISCUSIÓN	57
2.7.1. Evaluación de síntomas en las variedades resistentes y susceptibles de clavel frente a la infección ocasionada por los cinco aislados de FOX	57
2.7.2. Diferencias en las respuesta de resistencia a la infección ocasionada por distintos aislados de FOX en variedades resistentes y susceptibles de clavel	58
2.7.3. Variaciones en la patogenicidad de aislados de FOX sobre variedades resistentes y susceptibles de clavel	59
2.7.4. Diferencias en la resistencia entre variedades resistentes y susceptibles a distintos aislados	60
2.7.5. Respuesta de resistencia en ensayos <i>ex vitro</i>	60
2.7.6. Importancia de cultivares resistentes	61
2.7.7. Evaluación de los genes SIX en los cinco aislados de FOX.	62
2.8. CONCLUSIONES	64
2.9. RECOMENDACIONES	65
2.10. BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de variedades híbridas de clavel, obtenidas de cruces silvestres susceptibles y comerciales resistentes

Figura 2. Micro Plantas de clavel cultivadas *in vitro* en su proceso de crecimiento y ambientación

Figura 3. Plantas de clavel en adaptación *ex vitro* a invernadero para su posterior inoculación.

Figura 4. características morfológicas de *Fusarium oxysporum*

Figura 5. Plantas de clavel de la variedad susceptible (6515) *in vitro* 0, 5 y 10 días después de la infección de FOX.

Figura 6. Plantas de clavel de la variedad resistente 395 *in vitro* mostrando los diferentes síntomas tras la infección de FOX.

Figura 7. Tratamiento posterior al periodo de infección de FOX.

Figura 8. Indexación de las plantas de clavel de las variedades resistentes 395 y F1B2.

Figura 9. Indexación de las plantas de clavel de las variedades susceptibles SH2 y 6515

Figura 10. Porcentaje de incidencia de los distintos aislados de FOX en ensayos *in vitro*

Figura 11. Porcentaje de severidad de los distintos aislados de FOX en ensayos *in vitro*

Figura 12. Distribución del efecto de las variedades de clavel con respecto a la severidad de FOX

Figura 13. Distribución del efecto de los aislados de FOX con respecto a la severidad ocasionada.

Figura 14. Relación de los porcentajes de severidad en interacción planta-patógeno entre las variedades de clavel

Figura 15. Distribución de los datos, muestra de la normalidad en los cuartiles

Figura 16. Plantas de variedades híbridas de clavel en invernadero

Figura 17. Porcentaje de severidad e incidencia de *F. oxysporum* para ensayo *ex vitro*

Figura 18. Valores de log AUDPC a los 60 DPI para los cinco aislados de *Fusarium oxysporum ex vitro*

Figura 19. Diferencias en el porcentaje de severidad de distintos aislados de *F. oxysporum* sobre *Dianthus caryophyllus ex vitro*

Figura 20. Electroforesis en gel Agarosa al 1%, bandas producto de la extracción de ADN de distintos aislados de *Fusarium oxysporum*

Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de PCR de los primers H4a y H4b

Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de PCR de los primers ITS1-2 e ITS1-4

Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de PCR de los primers SIX de 1 al 5

Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de PCR de los primers SIX de 5 al 7

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo para los reactivos empleados para hacer PCR.

Tabla 2. Datos de secuencia de los primers empleados en la amplificación de genes de aislados de FOX.

Tabla 3. Datos de los ciclos del termociclador para la PCR.

Tabla 4. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - 2011 sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Tabla 5. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - 2019 sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Tabla 6. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - 2021 sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Tabla 7. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - Unal sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Tabla 8. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - Uchuva sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Tabla 9. Porcentaje de incidencia (%I) y severidad (%S) de los ensayos para cada aislado de frente a cada variedad resistente y susceptible de clavel.

Tabla 10. Organización de los aislados de *Fusarium oxysporum* de acuerdo al porcentaje de severidad

Tabla 11. Valores de Anova para ambas variables (variedades de clavel y aislados de FOX).

Tabla 12. Porcentaje de incidencia (%I) y severidad (%S) de los ensayos *ex vitro*

Tabla 13. Descripción del carácter de resistencia de los aislados de *Fusarium oxysporum* de acuerdo al porcentaje de severidad.

Tabla 14. Valores de Anova para la respuesta de resistencia del clavel a los Aislados de Fox, Pruebas de normalidad de Levene y de Bartlett.

Tabla 15. Valores cuantitativos de concentración de ADN.

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 25. BLAST de la secuencia de oligonucleótidos del gen ITS en la base de datos NCBI

Figura 26. BLAST de la secuencia de oligonucleótidos del gen SIX1 en la base de datos NCBI

Figura 27. BLAST de la secuencia de oligonucleótidos del gen SIX5 en la base de datos NCBI

Figura 28. BLAST de la secuencia de oligonucleótidos del gen SIX6 en la base de datos NCBI

Figura 29. BLAST de la secuencia de oligonucleótidos del gen SIX7 en la base de datos NCBI

1. CAPÍTULO I: Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* y su relación con la patogenicidad

1.1. *Fusarium oxysporum* características y su impacto

Fusarium oxysporum (FOX) es un hongo filamentoso cosmopolita de la familia Nectriaceae de hábito endofítico, destacado por ser patogénico y uno de los fitopatógenos más agresivos sobre distintas especies vegetales; aparte de las plantas, es causante de enfermedades en animales y humanos (Srivastava, 2018 y Zhang, 2018). Por ello, para el tratamiento de la enfermedad que causa en plantas, se ha promovido en algunos grupos de investigación la generación de líneas híbridas con el fin de obtener variedades vegetales resistentes al patógeno (Lecomte *et al.*, 2016). Algunas de las líneas vegetales se han demostrado resistentes mientras otras han perdido esa cualidad en el proceso de selección, motivo para estudiar la variación genética en *Fusarium* y su posible incidencia en el cambio en la resistencia del clavel. Además, es importante considerar otros factores que pueden incidir en la pérdida de la resistencia en las plantas, como situaciones de estrés o perturbaciones, la disponibilidad de agua, y, por otro lado el manejo de las enfermedades (Rosenzweig *et al.*, 2001 y Hatfield *et al.*, 2011).

FOX es un patógeno filamentoso y ubicuo (Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Subclase Hipocreomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Nectriaceae, Género *Fusarium*, Especie *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*) que componen uno de los grupos de patógenos de plantas de mayor importancia e impacto en la agricultura (Nelson *et al.*, 1983; Torres, 2000; Moretti, 2009; ITIS, 2012).

Las especies de *Fusarium* se encuentran comúnmente en suelos, debido a la persistencia de algunas estructuras y a que este medio facilita el contacto con su hospedero (Schulz, 2006 y Satyanarayana *et al.*, 2017). Algunas de sus especies presentan variabilidad morfológica y fisiológica, lo que les permite ampliar aún más su distribución y su adaptabilidad en diversos nichos ecológicos, optimizando su permanencia y colonización de hospederos; algunas de estas especies son *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium oxysporum* (FOX), las cuales han representado un mayor impacto fitosanitario las últimas décadas (Refai *et al.*, 2015). *Fusarium oxysporum* (FOX) destaca en el género por ser un complejo de especies ubicuas de alto impacto por su capacidad patogénica que afecta más de 150 especies vegetales a nivel mundial y cuya dispersión ocurre a través de múltiples vías; la asociación con especies animales como vectores, la manipulación humana, el material vegetal que ha sido infectado, entre otros, incrementan el riesgo de infección (Flores-Pacheco, 2017; Joshi, 2018).

FOX es un complejo de especies que presenta prevalencia de un estado anamórfico (González *et al.*, 2012; Moo-Young, 2019). Usualmente, presenta micelio abundante y algodonoso con coloración variable. blanca a durazno, pero mayormente oscila entre coloraciones violeta-púrpura (Lezcano *et al.*, 2012). Produce tres tipos de esporas reproductivas en su fase asexual: microconidios, esporas unicelulares con uno o dos septos o aseptadas, hialinas formadas en conidióforos poco ramificados, su tamaño oscila entre 7,7 x

2,5 μm ; macroconidios, septados, de mayor tamaño 32 x 3,1 μm , con un grado de curvatura y que se producen en los esporodoquios; finalmente, las clamidosporas son estructuras globosas de pared gruesa que se encuentran comúnmente solas terminales o pareadas intercaladas, y se forman a partir de hifas o conidios, son las estructuras de resistencia que permiten la persistencia de FOX en el suelo (De Granada *et al.*, 2001; Estupiñán, 2007; Osorio-Gutiérrez, 2011; Soleha *et al.*, 2022).

FOX comprende saprofitos, que permanecen en restos vegetales; endófitos, que colonizan raíces sin daño aparente; patógenos asociados a enfermedades humanas y patógenos en plantas causantes de marchitez vascular por colonización xilemática, y pudrición basal en variedad de hospederos, lo cual se atribuye a su diversidad genética, que permite establecer relaciones con algunos hospederos de forma específica (Michelse, 2009; Cantoral, 2017).

1.2. Ciclo de vida de *F. oxysporum*

Fusarium oxysporum puede afectar las fases vegetativa y regenerativa de su hospedero y permanecer extensos períodos de tiempo en el suelo sobre restos vegetales, en forma de clamidospora (Soleha *et al.*, 2022). Su ciclo de vida inicia nuevamente cuando entra en contacto con exudados secretados por las raíces de las plantas, que son una fuente rica en azúcares y aminoácidos (De Silva, 1964; Ochoa *et al.*, 2010; Guillén *et al.*, 2017). Los exudados estimulan la germinación de las clamidosporas y el crecimiento del tubo germinal hacia la rizosfera (Noguera, 1980); al entrar en contacto cercano con el ápice de las raíces despliegan una red de hifas sobre la cutícula de ellas; para posteriormente empezar la producción de enzimas de degradación de las paredes y de hifas que llevan a cabo la penetración directamente en las células epidermales o el crecimiento entre ellas (Li *et al.*, 2017).

Así avanza por el córtex celular produciendo microconidios hasta llegar al xilema, de ahí empieza la colonización apical de la planta a través del xilema con la producción y germinación permanente de microconidios en los vasos, lo cual produce una obstrucción o taponamiento vascular provocando la muerte de la planta (Rodríguez, 1995; Zapata, 2012; Vázquez, 2017). En adelante, el hongo vive como saprófito en competencia con otros microorganismos, y su competitividad promueve la producción de inóculo post infección, así como la formación de clamidosporas que quedarán en los residuos y en el suelo para reiniciar el ciclo de vida (Cantoral, 2017). En resumen, el ciclo de vida de FOX consta de cuatro fases: germinación de la spora, infección de la raíz, colonización de la planta y un estado como saprófito para finalmente persistir en el suelo en forma de estructuras de resistencia o clamidosporas (Gordon, 2017).

1.3. El clavel (*Dianthus caryophyllus*) y el impacto de *Fusarium oxysporum*

El clavel es una planta ornamental perenne cuya floración se presenta casi todo el año, su tamaño va de 40 y 60 cm de alto en el tallo y de base leñosa, pertenece al orden Caryophyllales, suborden Caryophyllineae, familia Caryophyllaceae, género *Dianthus*, epíteto específico

caryophyllus (Álvarez, 2016). Este presenta dentro de su organización una división de dos grupos que en inglés se conocen como “pink” y “carnation”; los primeros, conocidos como clavellinas, que son más sencillas, y los segundos que pasan por perennes, debido a los procesos de hibridación por los que han pasado (Kuehnle, 2007). Una de las principales enfermedades que lo afectan es la fusariosis, que genera marchitez vascular y es uno de los problemas potenciales para los cultivos de clavel a nivel global, por la pérdida de producción y problemas fitosanitarios (Soto *et al.*, 2009; FAO, 2018).

Internacionalmente, una de las áreas de mayor movilización económica dentro del sector agrícola es el mercado floricultor, el cual presenta productos de interés global; las flores de corte, por su atractivo en aroma, coloración y diversas formas, actúan como un símbolo representativo de este sector, teniendo un uso predominante en arreglos para múltiples festividades y demás (Tenjo *et al.*, 2006). A nivel global, Colombia está posicionada en el segundo lugar como mayor exportador de flores de corte, después de Holanda (Sierra, 2020), mientras que la Sabana de Bogotá es la principal zona de producción de flores a nivel nacional (Mesa, 2014).

Debido a su alta producción, los cultivos de clavel se han sometido a una mejora genética para aumentar las características que los hacen llamativos. Al mismo tiempo, se han sometido a hibridación para potenciar aún más sus características y crear variedades con resistencia a *Fusarium*. (Soto, 2016; Onozaki, 2018). Por ello, una forma eficiente para el manejo de la enfermedad es el enfoque desde el mejoramiento genético del clavel, reduciendo el uso de sistemas de control con protectantes. Por lo anterior, ha crecido el estudio sobre el genoma de este y los posibles grupos de genes cuya expresión puede asociarse a la resistencia al patógeno (Ben Yephet *et al.*, 1997). El desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades para plantas ornamentales como el clavel, se ha logrado mediante el uso de mecanismos derivados de otros grupos de plantas (Michelmore, 2003); la resistencia del hospedero se ha trabajado desde la hibridación convencional, sin uso de transgénicos, a través de selección asistida por marcadores basados en ADN y repetidos ciclos de entrecruzamiento para poder obtener rasgos de resistencia, con caracteres fenotípicos de preferencia en un mismo genotipo (Summers, 2013). Por otro lado, el empleo de transgénicos involucra genes altamente regulados para la resistencia y para poder introducirlos en cultivares con caracteres fenotípicos de interés comercial (Mekapogu *et al.*, 2021). No obstante, la eficiencia y persistencia en la utilización de cultivares resistentes, para poder dar control a las enfermedades, es afectada por la capacidad que tiene el patógeno de hacer una rápida selección de virulencia dirigida hacia variedades de hospederos específicos, lo cual se debe a la fuerte variabilidad genética de los patógenos (Sharma *et al.*, 2012).

1.4. Patogenicidad y Virulencia de *F. oxysporum*

Fusarium oxysporum es uno de los mayores representantes en la lista de patógenos importantes a nivel global, al ocasionar enfermedades en más de 150 especies vegetales, la mayoría de ellas de interés comercial como el banano (*Musa x paradisiaca*) o el tomate (*Solanum lycopersicum*)

(Dita *et al.*, 2010; Vázquez *et al.*, 2017). Una de las características por las que es tan agresivo en el sector agrícola es su adaptabilidad, asociada a permanecer latente largos periodos de tiempo en el suelo, sin que esta permanencia interfiera en su capacidad de colonizar al hospedero al entrar en contacto con él (Gathak, 2017). Esta facultad requiere del desarrollo de un mecanismo complejo de infección para poder inducir la enfermedad en sus hospederos. En él se involucra el metabolismo principal y secundario, asociado a la producción de tricotecenos y fumonisinas, y a la producción de micotoxinas y fitotoxinas, que tienen efectos negativos sobre el desarrollo de las plantas (Shimisu *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2013; Askun, 2018). Todo lo anterior conforma el arsenal molecular que despliega el hongo para colonizar e iniciar la enfermedad en el hospedero (Horwitz *et al.*, 2013; Vos, 2016).

La incidencia de FOX en distintos cultivos está sujeta a sus mecanismos de acción, la respuesta de la planta y las condiciones ambientales; algunas de las condiciones climáticas ideales de infección son temperaturas de 23-28 °C, humedad relativa de 75-80%, entre otros (Ramos *et al.*, 2017). Factores como la fertilización de las plantas pueden tener implicaciones en el desarrollo de la patogenicidad, pues la fuente de nitrógeno está relacionada con la síntesis de toxinas de la regulación de vías de señalización como en el caso de las MAPKs; estas resultan importantes en la virulencia de FOX para la formación de las estructuras utilizadas en el proceso de infección a su hospedero, como los apresorios y la producción de enzimas útiles en la ruptura de las barreras físicas del hospedero, entre las que se comprenden las quitinasas, pectinasas y proteasas (Torre *et al.*, 2014, Segorbe, 2015; Villa *et al.*, 2015). Se ha reportado que la fertilización con nitrógeno puede incrementar o disminuir la incidencia, acorde a la fuente de origen, cuando se aplica en forma de amoníaco la incidencia es mayor que cuando se aplican nitratos (Lopez-Berges *et al.*, 2010). Esto se debe a la reducción química que debe hacer el hongo para asimilar el nitrógeno de fuente secundaria. Además, cuando hay turgencia en el hospedero por la presencia de nitrógeno, la lignificación de sus tejidos de soporte no resulta benéfica, favoreciendo el ingreso del patógeno (Almonacid, 2005; Cantoral, 2017).

Algunos hongos se han adaptado más allá del hábito saprofítico para atacar a sus hospederos vivos, convirtiéndolos en su fuente principal de nutrición. Este proceso de infección involucra mecanismos identificados como genes asociados a la patogenicidad; estos se codifican para diferentes componentes principales en la transducción de señales, como las proteínas G o las proteínas RAS, entre otros precursores útiles en producción de enzimas hidrolíticas y/o estructuras que estimulan el desarrollo y virulencia del patógeno, facilitando el proceso de infección (Villa, *et al.*, 2015). Se reconoce que en los genes accesorios ocurre la producción de unas proteínas denominadas efectores que promueven la virulencia de los patógenos al interactuar directamente con el sistema inmune del hospedero; además, en los cromosomas accesorios hay genes que intervienen en la virulencia hospedero-específica del patógeno (Rep, 2010; Williams *et al.*, 2016).

Fusarium oxysporum y sus cepas patogénicas son diferenciadas en formas especiales (f. sp), con base en su/s hospedero/s (Gordon, 2017). De acuerdo a esa diferenciación, se ha determinado la existencia de más de 150 formas especiales en todo el mundo, dificultando su

manejo y control, por el amplio rango de distribución, y capacidad de infectar distintos cultivares, asociado a su variabilidad genética; así mismo, con el reconocimiento de las formas especiales se ha evidenciado patogenicidad cruzada entre aislados de diferentes grupos, modificando su virulencia y sus proteínas efectoras sobre distintos patosistemas (López *et al.*, 2019).

1.5. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum*

La organización taxonómica de FOX ha sido tema de controversia, a razón de la inestabilidad de características morfológicas dentro del género y alta variación genética, que inducen al surgimiento de subgrupos entre los cuales se incluyen las especies que componen el mismo complejo, las formas especiales y, sobre todo, las razas (Samiksha, 2021). Dentro de estas agrupaciones se ha llegado a especies crípticas morfológicamente, surgiendo a partir de esto formas especiales que resaltan la diversidad genética de FOX (Kistler, 1997 y Sumerrel, 2019).

El genoma de muchos hongos patógenos como *F. oxysporum* puede presentar plasticidad al estar expuesto a condiciones de estrés como la presencia de hospederos resistentes o la permanente renovación de las defensas de su hospedero. A partir de esto, surge la descripción de dos regiones constituyentes del genoma de estos organismos: una central, que contiene los genes necesarios para el funcionamiento y supervivencia de un organismo en condiciones normales, y otra región que puede tener segmentos incompletos de cromosomas centrales o cromosomas totalmente dispensables denominados como accesorios (AC's), supernumerarios o de linaje específico (LS's), (Vlaardingerbroek *et al.*, 2016). Estos AC's presentan diferencias frente a los cromosomas centrales (CC's); los AC's tienen mayor densidad de elementos transponibles y menor cantidad de genes, atribuyéndose este porcentaje de genes más bajo en relación con los CC's a la baja presión de selección soportada en un alto polimorfismo. Además, los AC's pueden codificar genes útiles durante la interacción planta patógeno, al igual que con algunos efectores, y se conoce que su forma de herencia puede ser no mendeliana (Armitage *et al.*, 2018; Bertazzoni *et al.*, 2018).

Se estima que cambios frecuentes en el genoma son la base para la adaptación de los individuos a diferentes ambientes, esto se ha expresado en múltiples modelos; sin embargo, FOX es uno de los casos en que se relacionan los cambios genómicos a su facultad adaptativa (Kashyap *et al.*, 2016). Por ello, se atribuye la alta diversidad genética a la posibilidad de infectar distintos hospederos de forma específica, lo cual se adjudica a la actividad de estos cromosomas LS (Ma *et al.*, 2010; Delulio *et al.*, 2018). Estos cromosomas LS representan más de un cuarto del genoma de FOX, cuya transferencia se demostró con la transformación de un aislado no patógeno a uno patógeno, determinando que pueden codificar factores de virulencia específicos (Refai, 2015; Van der Does *et al.*, 2016).

A lo largo del tiempo en que se ha estudiado a *Fusarium oxysporum*, se ha determinado que comprende un complejo de especies que comparten rasgos morfológicos y presentan filogenia polifilética, como si fuesen un conjunto de líneas clonales que pueden intercambiar

material genético de forma horizontal (Michelse, 2009; Aime *et al.*, 2017; Singh, 2017). En ese sentido, se reconoce que algunas de esas especies presentan actividad patogénica dirigida a diferentes hospederos, denominada capacidad multi hospedero, sin presentar cambios aparentes en su morfología (Van Baarlen *et al.*, 2007). A las especies con esta capacidad se les da el nombre de formas especiales (f.sp), con base en un carácter fisiológico referido a la patogenicidad, sin determinar la existencia de otros caracteres diagnósticos útiles para diferenciarlos morfológica o molecularmente (Baayen, 2000; Alanis *et al.*, 2015; Edel-Hermann, 2019).

Con lo anterior, se han reportado algunas relaciones filogenéticas asociadas a la divergencia de las formas especiales, además de cambios localizados en cromosomas móviles que podrían explicar su capacidad patogénica específica en distintos hospederos (Heras, 2004; Fourie *et al.*, 2011; Zaquinaula, 2018). Se ha establecido que algunas formas especiales son específicas para un hospedero, mientras otras tienen un rango más amplio de hospederos (Linares, 2010). Por tanto, se han evaluado los efectores empleados en el proceso infectivo del patógeno, reconociendo algunos genes posiblemente ligados a la patogenicidad de estos grupos denominados vegetativamente compatibles (Martin, 2011; Henry, 2013; Van dam *et al.*, 2016; Satyanarayana *et al.*, 2017). No obstante, se ha reconocido que, en el tiempo, esa especificidad se mantiene o presenta cambios correspondientes a la capacidad patogénica entre aislados o formas especiales (López *et al.*, 2019).

De acuerdo con Ma y Colaboradores (2013), se distinguen dos clases de genes asociados a la patogenicidad: genes de patogenicidad básica y genes de patogenicidad especializada; el primero grupo de genes es compartido dentro del género *Fusarium* y también con otras especies de hongos distintas a *Fusarium*, que codifican los componentes involucrados en las primeras señales de reconocimiento del hongo (MAPK, RAS, Proteína - G). El segundo grupo de genes se asocia mayormente con especies del género *Fusarium* debido a la relación específica que tiene con algunos hospederos, que se localizan en los cromosomas móviles (Rampersad, 2020). Aquí se involucran los genes SIX (Secreted in xylem), determinantes en la virulencia del patógeno y a su vez en la respuesta de resistencia del hospedero, debido a su interacción con los genes de resistencia reportados en tomate (I-1 o Immunity-1), (Zuriegat *et al.*, 2021).

La virulencia de los patógenos está determinada por uno o más genes, que le confiere el rasgo de patógeno, como la capacidad de producir toxinas específicas para un hospedero. En ese sentido, estos grupos de genes pueden presentar mutaciones, duplicación y otro tipo de cambios que pueden ser de nucleótidos únicos como los (SNP's), (Kulik *et al.*, 2022). La expresión de estos genes, aún en aislados no patógenos, modifica la capacidad de estos de infectar hospederos y dificulta la exploración de la variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* para su control, ya que son estos mecanismos los que dan forma a la diversidad de *Fusarium* (Lievens *et al.*, 2008 y Gardiner *et al.*, 2018).

A partir del intercambio de material genético con este tipo de cromosomas se ha demostrado que, por transferencia horizontal, aislados no patogénicos pueden adquirir la capacidad de volverse patogénicos (Baston et al., 2021; Fulton et al., 2022). Esto puede dar lugar a explicar que los elementos transponibles pueden modificar la virulencia de aislados que no son patogénicos para mejorar su virulencia, y, en consecuencia, llevarlos a tener una infección más eficiente en cultivares (López, 2019).

1.6. Estado de las Formas Especiales de *Fusarium oxysporum*

Con el reconocimiento de estos subgrupos denominados formas especiales, se ha evidenciado patogenicidad cruzada entre aislados de diferentes grupos, modificando su virulencia y sus proteínas efectoras sobre distintos patosistemas (López et al., 2019).

Como se describe anteriormente, el complejo FOX presenta, dentro de sí, especies que comparten características morfológicas y donde podemos encontrar especies crípticas (Retania et al., 2018). La forma de diferenciar estos grupos es mediante la realización de pruebas de patogenicidad, teniendo en cuenta que, por su cercanía, muchos pueden provenir de ancestros comunes (Rana et al., 2017). Estas f.sp. son reunidas en grupos vegetativamente compatibles (GVC), se caracterizan por la formación de heterocariones, células híbridas fusionando sus núcleos (Garibay, 1993; Gutiérrez, 2004), y presentan alelos idénticos en los loci de compatibilidad, lo que permite el recambio genético entre ellos mismos, asociándose con cambios en la patogenicidad (Lievens et al., 2008 y Batlle 2009).

Por otro lado, la taxonomía de FOX ha sido tema de discusión al grado tal, que, desde su descripción como género en 1809, no se ha podido establecer una taxonomía adecuada. Esto se debe a la estrecha relación que presentan las distintas especies de este género y sus características genéticas (Ploetz, 2006; Laurence et al., 2015; Askun, 2018). Esta capacidad de intercambiar material genético entre especies del mismo género lo hace más propenso a ser agresivo ante sus hospederos, y a su vez dificulta el proceso de adecuación de un sistema de clasificación taxonómica apropiada para él (Torres, 1992; Chelkowski 2014). De acuerdo con lo reportado en algunos estudios, se establece que entre distintas especies del complejo FOX el intercambio genético promueve el paso de cromosomas asociados con patogenicidad, por lo cual el contacto puede generar que las denominadas formas especiales hagan recambio entre ellas y se vuelvan potencialmente más virulentas (Semeneov et al., 2016; Gai et al., 2017; Panwar et al., 2018).

1.7. Biotecnología y los mecanismos de control de *Fusarium oxysporum*

En la actualidad, se emplean múltiples métodos en el control de la enfermedad ocasionada por *Fusarium oxysporum*. Una de las técnicas más utilizadas para el control de este patógeno es la rotación de cultivos, que conduce a una disminución en la incidencia y favorece el desarrollo

y abundancia de comunidades bacterianas del suelo (Scott *et al.*, 2012; Goncharov *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2022).

El control biológico, por medio de cultivos de bacterias y hongos, promueve la reducción de los valores de incidencia de *Fusarium oxysporum*, adicionalmente, estos agentes de control biológico presentan ciertos tipos de competencia con este patógeno, bien sea por nutrientes o espacio, y, gracias a ello, muestran niveles de inhibición frente a FOX (Li *et al.*, 2018); entre estos agentes de control biológico se pueden encontrar *Trichoderma spp*, *Pseudomonas spp*, *Bacillus spp* e incluso formas no patogénicas de *Fusarium oxysporum*. Además, este tipo de control ha tenido gran auge debido al impacto ambiental, económico y de salubridad, que tienen otros tipos de control, como el manejo químico por medio de pesticidas (De Cal, 1995; Net *et al.*, 2006; Bubici *et al.*, 2019).

El control químico presenta múltiples productos fungicidas tales como Carbendazim® y Mancozeb®, los cuales han sido de utilidad para el control de *Fusarium*. Sin embargo, tienen costos elevados, efectos negativos sobre el medio ambiente al no ser biodegradables, y pueden persistir durante largos periodos de tiempo en el ambiente (Bawa, 2016). Adicionalmente, se ha demostrado que *Fusarium oxysporum* ha presentado niveles de resistencia a este tipo de fungicidas (Liu *et al.*, 2019), por lo cual se ha sugerido el uso de extractos botánicos que han mostrado efecto controlador sobre FOX y reducen los efectos negativos en términos ambientales (Mahmood *et al.*, 2015; Ramaiah, 2015).

La biotecnología, por su parte, cumple una parte importante en estrategias para el control y manejo de la enfermedad desde la perspectiva del manejo del patógeno y el entendimiento de la variabilidad genética que lo caracteriza. Esto acoge la comprensión de los rasgos genéticos de su hospedero, la relación hospedero-patógeno, los mecanismos de defensa involucrados a nivel molecular y la implementación de múltiples estrategias utilizando toda esa información para el control de la enfermedad (Joshi, 2018). El uso de variedades resistentes de las plantas es una de las mejores técnicas, con las cuales se han obtenido resultados favorables para el manejo de la enfermedad (Zorrila-Fontanesi *et al.*, 2020).

La resistencia poligénica se asocia a la activación de rutas metabólicas involucradas en la producción de enzimas degradantes de la pared celular, como la quitinasa, pectinasa y poligalacturonasa (Baayen *et al.*, 1997; Jaroszuk-Ściseł *et al.*, 2011). Las proteínas asociadas a la respuesta de la planta, los efectores, los factores de avirulencia y los patrones de reconocimiento, son relevantes para la comprensión y planteamiento de técnicas moleculares afines al manejo de la enfermedad desde el mejoramiento de rasgos genéticos del hospedero, procurando una mejor respuesta frente al proceso de infección del hongo (Dubey, 2010). Sin embargo, una de las limitantes de su utilización es la durabilidad que tienen, pues se ve afectada por los cambios en los patógenos, que tienen un gran potencial evolutivo y alta variabilidad genética (Poland *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 2: Variación de la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en relación con la resistencia o susceptibilidad de híbridos de *Dianthus caryophyllus*.

1.8. RESUMEN

Fusarium oxysporum (FOX) es un complejo de especies, mundialmente reconocido por su agresividad y capacidad de afectar varias especies vegetales. FOX es el causante de la marchitez vascular, una enfermedad que en la actualidad se considera un factor de impacto en el sector agrícola debido a las grandes pérdidas económicas que genera. Las características más destacadas de este complejo de especies de FOX son: la alta variabilidad genética y la similitud morfológica. Debido a lo anterior, hay dificultades tanto en su taxonomía como en el manejo de la enfermedad, por lo que se propuso considerar diferencias fisiológicas con base en la patogenicidad del parásito, como caracteres para su clasificación y manejo. Este trabajo tiene como finalidad determinar variaciones en la patogenicidad de distintos aislados de *Fusarium oxysporum* en variedades híbridas de clavel e identificar polimorfismo en genes asociados a patogenicidad. Para ello, se evaluó la patogenicidad de cinco aislados distintos sobre variedades híbridas de clavel; dos resistentes y dos susceptibles en condiciones controladas *in vitro* y *ex vitro*. Para evaluar variaciones en genes asociados a la patogenicidad, se realizó extracción de ADN de los aislados de FOX y posteriormente se hizo amplificación por PCR de un grupo de genes ortólogos y genes reportados para patogenicidad, de los cuales se obtuvo secuencias. A partir de ellas, se determinó polimorfismo entre los aislados, variaciones en la patogenicidad y diferencias en la respuesta de resistencia de variedades resistentes y susceptibles de clavel.

1.9. ABSTRACT

Fusarium oxysporum (FOX) is a species complex, worldwide recognized for its aggressiveness and ability to affect several plant species. FOX is the cause of vascular wilt, a disease that is currently considered an impact factor in the agricultural sector due to the large economic losses it generates, affecting several plant species. The most outstanding characteristics of this complex of FOX species are: high genetic variability and morphological similarity. Due to the above, there are difficulties both in their taxonomy and in the management of the disease, so it was proposed to consider physiological differences based on the pathogenicity of the parasite, as characters for its classification and management. This work aims to determine variations in the pathogenicity of different isolates of *Fusarium oxysporum* in hybrid varieties of carnation and to identify polymorphism in genes associated with pathogenicity. For this purpose, the pathogenicity of five different isolates of FOX on hybrid carnation varieties was evaluated; two resistant and two susceptible under controlled *in vitro* and *ex vitro* conditions. To evaluate variations in genes associated with pathogenicity, DNA was extracted from FOX isolates and then PCR amplification was performed on a group of orthologous genes and genes reported for pathogenicity, from which sequences were obtained. From these sequences. Polymorphism among isolates, variations in pathogenicity and differences in the resistance response of resistant and susceptible carnation varieties were determined.

1.10. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, una de las enfermedades más persistentes en cultivos a nivel global es la Fusariosis, causada por hongos del género *Fusarium*. Uno de los tipos de Fusariosis es la marchitez vascular (Granada *et al.*, 2001; Elliot, 2010). Esta y otras enfermedades, como la pudrición basal, están asociadas a distintas especies de hongos pertenecientes al género *Fusarium*, que ocasiona grandes pérdidas en producción para el sector agrícola y un riesgo en sanidad y salud humana (Sedano, 2012; Villa *et al.*, 2015). Ante la dificultad para distinguir morfológicamente algunas especies de este género, se dio lugar a una diferenciación con base en su fisiología, creando las formas especiales específicas para un hospedero (f.sp.), (Alanis *et al.*, 2015). Por otro lado, a través de estudios moleculares se observó una estrecha relación genética y un alto polimorfismo entre especies de este género, representando estas dos características una alternativa para su diferenciación taxonómica, empleando herramientas moleculares (Singh *et al.*, 2006). Sin embargo, la falta de información sobre la relación entre la morfofisiología y las variaciones genéticas de las distintas especies de *Fusarium oxysporum*, han sido un obstáculo para su taxonomía y eventual filogenia, (Torres, 2000; De la Torre - Hernández *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017; Hiremani, 2019).

Mientras que poblaciones de ese complejo de especies de FOX no presentan diferencias morfológicas suficientes para distinguirlos ni clasificarlos como especies diferentes, paralelamente se han observado diferencias fisiológicas entre poblaciones de FOX asociadas a la patogenicidad hacia hospederos específicos (Nelson, 1981; De Granada *et al.*, 2001), dando lugar a las formas especiales (f.sp.) como una alternativa para diferenciar dichas poblaciones, en las que se han reportado más de 120 posibles formas especiales para FOX (Poli *et al.*, 2013). El reconocimiento de estas formas especiales surge a partir de las diferencias entre las proteínas efectoras involucradas en el proceso de infección específico para ciertos cultivares (van Dam *et al.*, 2016). Adicionalmente, se han reconocido grupos de genes asociados a la patogenicidad; como reportados en *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* los denominados secretados en el xilema (SIX), cuya presencia puede variar entre formas especiales (Schmidt *et al.*, 2013; Jangir *et al.*, 2021). La presencia de estos genes en cromosomas móviles, donde puede ocurrir transferencia horizontal, la cual ha indicado que el intercambio de información genética da lugar a cambios en la virulencia y este es uno de los factores de mayor importancia en descifrar la variabilidad genética del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (Laurence *et al.*, 2015; Simbaqueba *et al.*, 2018).

Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi* es una de estas formas especiales. Esta forma especial está asociada al clavel, planta ornamental perenne, entre 40 a 60 cm de alto en el tallo y de base leñosa (Álvarez, 2016). El clavel ha sido uno de los cultivos más afectados por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, manifestando una reducción en su producción y exportación (Trujillo *et al.*, 2005; Ceballos, 2015). Las pérdidas que puede ocasionar la fusariosis en el cultivo de clave son considerables, y pocos tratamientos han tenido efectos positivos para su control (Rodríguez *et al.*, 1995; Al-hatmi *et al.*, 2016; Bravo, 2016; Bhat *et al.*, 2016). Una de las

alternativas para su control ha sido la generación de líneas híbridas con el fin de obtener variedades resistentes a *Fusarium oxysporum* (Soto et al., 2009; Mesterházy et al., 2012; Lecomte et al., 2016; Soto, 2016). Considerando lo anterior y su alto polimorfismo genético, en el cual están involucrados genes asociados a la patogenicidad (Frac et al., 2016; Vlaardingerbroek et al., 2016), se hace necesario contar con herramientas que permitan distinguir los cambios genéticos que se presentan en relación con estos dos aspectos.

De acuerdo con lo anterior, surge la idea de enfocar una investigación dirigida a la evaluación de la variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (FOX) por medio de la evaluación de genes previamente asociados a la patogenicidad, así mismo identificar cambios en la patogenicidad de FOX de la misma forma especial, haciendo una comparación con una forma especial diferente. También, reconocer las variaciones que esta pueda presentar en la respuesta de resistencia de variedades híbridas en el clavel, que presentan antecedentes de carácter resistente y susceptible. Lo anterior, con el fin de identificar posibles cambios en la patogenicidad que puedan ser utilizados en programas de mejoramiento de cultivos, mediante el reconocimiento del polimorfismo en relación con la patogenicidad de FOX, lo que aportará conocimiento respecto a las implicaciones genéticas sobre variaciones en la patogenicidad del hongo sobre el hospedero. Entender esto puede llevar al planteamiento de estrategias eficientes para el manejo de *Fusarium oxysporum* y su impacto en el cultivo de clavel.

En los últimos años, con la generación de líneas resistentes a FOX en el programa de mejoramiento genético de clavel de la UMNG, se ha demostrado un potencial para contener la enfermedad con variedades de clavel híbrido resistentes. A pesar de ello, algunas de estas líneas han vuelto a presentar síntomas una vez se reinfectan, lo cual se atribuye al polimorfismo genético del hongo y su posible relación con variaciones en la patogenicidad. Lo anterior se debe a que no hay una relación clara entre los aislados de una forma especial, su patogenicidad y la presencia de marcadores moleculares asociados a patogenicidad.

1.11. OBJETIVOS

1.11.1. General

Evaluar las variaciones en la patogenicidad de diferentes aislados de FOX sobre variedades híbridas resistentes y susceptibles de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Así mismo, identificar factores asociados a la patogenicidad de FOX con respecto a su capacidad de actuar como patógeno en secuencias de genes ortólogos útiles para taxonomía y filogenia, y genes asociados a la patogenicidad.

1.11.2. Objetivos Específicos

- Identificar el progreso de la infección con cada uno de los aislados de FOX, en las variedades resistentes y susceptibles de clavel en campo.
- Determinar si existe variabilidad en la patogenicidad de los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en micro plantas de clavel híbrido en condiciones *in vitro*.
- Determinar la relación entre la presencia de genes SIX de distintos aislados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* y las variaciones en la respuesta de variedades híbridas de *Dianthus caryophyllus* en condiciones *in vitro* y en campo con respecto a cambios en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*.
-

1.12. MATERIALES Y MÉTODOS

1.12.1. Área de estudio

El estudio se realizó en las instalaciones de la Universidad Militar Nueva Granada, situada en el Km 2 vía Cajicá-Zipacquirá (Cundinamarca - Colombia).

1.12.2. Obtención del Material Biológico

1.12.2.1. Obtención y propagación de los aislados de *Fusarium oxysporum*

Se trabajaron cuatro cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*: dos aislados evaluados en campo por su grado de patogenicidad en clavel; uno con un tiempo de antigüedad de aproximados diez años FOX-2011; tres proporcionados por el cepario del grupo de Fitopatología Molecular de la Universidad Militar FOX-2019, FOX-2021 todos aislados de clavel sintomático y FOX-Uchuva, un aislado de *Fusarium oxysporum* infectando *Physalis peruviana*. El último aislamiento proporcionado por el cepario de la Universidad Nacional de Colombia aislado de clavel (FOX-UN).

1.12.2.2. Obtención de cultivos monospóricos y propagación de los aislados de *Fusarium oxysporum*

Para cada aislado, se tomó un trozo de micelio en PDA, se transfirió a un Erlenmeyer de 150 mL con medio Czapek Dox (Sigma®) líquido, se dejó en agitación a 120 r.p.m. a una temperatura de 27 °C por una semana. Posterior a ese tiempo, se pasó la suspensión a través de gasa estéril, filtrando el medio en un vaso de precipitado, para retener el micelio del hongo en la gasa y dejar pasar las esporas. Con el filtrado libre de micelio se hicieron diluciones con agua destilada estéril de 1×10^{-6} , a partir de la suspensión se tomaron 20 μ L y se inocularon en cajas Petri con medio PDA, seguidamente se hizo la dispersión con un rastrillo en cajas de Petri y se mantuvo a 24 °C en incubadora (Filgueira, 2011).

El crecimiento de las esporas se observó 24 horas posterior a su siembra, se seleccionaron conidios individuales germinados para su siembra en medio PDA. Durante siete días se desarrolló la colonia a partir de una sola spora y pasado ese tiempo se tomó un disco del medio y se inoculó en medio líquido Czapek Dox (Sigma ®), dejándolo en agitación por una semana, para la obtención de esporas limpias nuevamente, las cuales se usaron en los ensayos de inoculación (Filgueira, 2011).

Obtenidos los monospóricos, se tomó una muestra de cada una de las cepas seleccionadas para su caracterización macro y microscópica siguiendo la guía de identificación de especie en el género (Nelson *et al.*, 1983), con el microscopio ZEISS® Axioskop 2 Plus.

1.12.2.3. Propagación de material vegetal *in vitro*

Se seleccionaron plántulas híbridas de clavel proporcionadas por el laboratorio de biotecnología vegetal, obtenidas del cruce entre variedades silvestres resistentes y variedades comerciales catalogadas como susceptibles; de estas variedades, dos resistentes (UM395 y UMF1B2) y dos susceptibles (UMSH2 y UM6515), estados del carácter descritos por Soto (2012), (Resistente, medianamente resistentes, medianamente susceptible y susceptible), tomadas del programa de mejoramiento de clavel de la Universidad Figura 1).

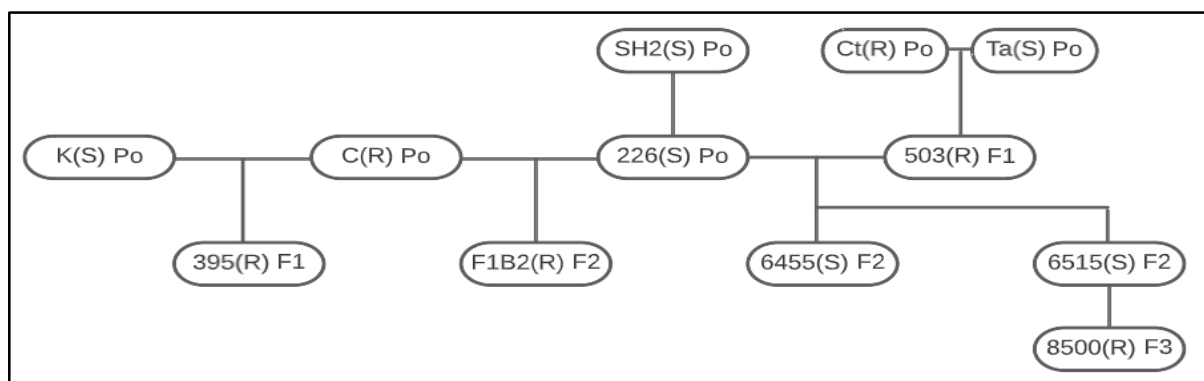


Figura 1. Árbol de procedencia de las variedades híbridas de clavel, obtenidas de cruces silvestres susceptibles y comerciales resistentes, en Po, F1 y F2 obtenidas a partir de autopolinización en el programa de mejoramiento de la Universidad Militar Nueva Granada.

Se seleccionaron micro-plantas con rasgos fenotípicos sobresalientes sobre el resto (turgencia, tamaño, grosor, entre otros). A partir de ellas se realizó una micro-propagación intermodal en condiciones *in vitro* (Fig. 2). Cada cuatro semanas, sembrando cinco plantas por frasco, en medios de cultivo *in vitro* para plantas MS (Murashige y Skoog, 1962) sin hormona, 30 g/L de sacarosa, 13 g/L de agar-agar, con pH ajustado a 5.8 y en condiciones de cuarto de cultivo a 6000 lux, 26 °C +/- 2, y fotoperiodo de 16 horas/luz (Cuéllar, 1998). Para ensayos *in vitro* se obtuvo un promedio de 230 plantas por variedad, que fueron acondicionadas para su posterior infección y evaluación. A partir de las plantas propagadas *in vitro* para obtener nuevos explantes; se seleccionaron un estimado de 100 plantas, que fueron posteriormente ambientadas en condiciones de invernadero para los ensayos *ex vitro*

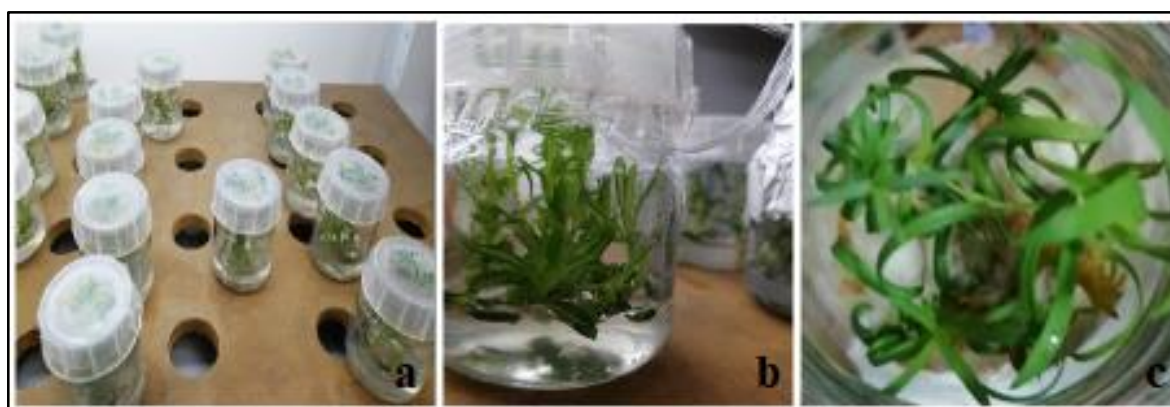


Figura 2. Micro - plantas de clavel cultivadas *in vitro* en su proceso de crecimiento (a) y ambientación (b y c).

Es necesario que la plantas tengan un crecimiento mínimo de 4 nudos para propagar y obtener nuevos explantes. Alcanzar ese tamaño tomó un tiempo aproximado de 4-6 semanas, hasta la producción de raíces y acondicionamiento de las plantas. Transcurrido el tiempo, se tomaron micro-plantas ambientadas para obtener nuevos explantes en medios nuevos, en condiciones controladas de esterilidad, proporcionando los nutrientes requeridos, y previniendo su contaminación (Morales, 2015; Espinosa *et al.*, 2018).

1.12.3. Ensayos de patogenicidad *in vitro*

Cada aislado de FOX fue ensayado con 35 plantas de cada variedad y se tuvo un control de 10 plantas por variedad. Una vez las plantas tuvieron más de 3 nudos, se realizó la inoculación, en las mismas condiciones de propagación, en medios de cultivo *in vitro* para plantas MS (Murashige y Skoog 1962) sin hormona, 30 g/L de sacarosa, 13 g/L de agar-agar, con pH ajustado a 5.8 y en condiciones de cuarto de cultivo a 6000 lux, 26 °C +/- 2, y fotoperiodo de 16 horas/luz (Cuellar, 1998). En el centro de cada frasco se colocó un disco de papel filtro

estéril, sobre el cual se inocularon 20 µl de una solución de conidios de FOX a una concentración de 1×10^6 conidios/ml. Posteriormente, se hizo el seguimiento de la infección.

1.12.3.1. Evaluación de síntomas del hospedero y determinación de la incidencia y severidad ensayo in vitro

Durante siete días se observó el proceso de infección del hongo, invadiendo la planta desde las raíces; se hizo el seguimiento a partir del segundo día para registrar la aparición de síntomas iniciales según la escala de infección modificada por Soto (2012): (0) sin síntomas, (1) pérdida de turgencia, (2) clorosis y/o amarillamiento, (3) marchitez severa y/o necrosis, (4) muerte. A partir de esta escala se determinó por observación el progreso de la enfermedad (Trusov *et al.*, 2013). La observación de síntomas tuvo un tiempo estimado de diez días, con un intervalo de un día entre cada evaluación los primeros cinco días, y posteriormente un intervalo de dos días. Se tomó una planta sintomática y una asintomática (en caso que hubiera) para cada tratamiento, con el fin de determinar cambios en los tejidos por la presencia del patógeno. Este ensayo fue realizado durante el tiempo de cuarentena por la pandemia (Diciembre 2020), principalmente por la imposibilidad de utilizar los invernaderos.

Transcurrido el tiempo, se tomaron plantas infectadas, se retiraron hojas y raíces, dejando solo el tallo pasaron por un lavado en hipoclorito de sodio 5% durante 2 minutos, etanol 96% durante 1 minuto y ADE durante 1 minuto. Se hicieron 4 cortes transversales al tallo por planta, los cuales fueron sembrados en PDA de forma consecutiva para mantener su orientación desde la base al ápice, se dejaron en incubación durante siete días a 24 °C, pasado el tiempo se re aisló el hongo en PDA para confirmar qué los cambios tisulares fueron consecuencia de la invasión del patógeno (Figura 3) (Filgueira, 2011, Forero *et al.*, 2015).

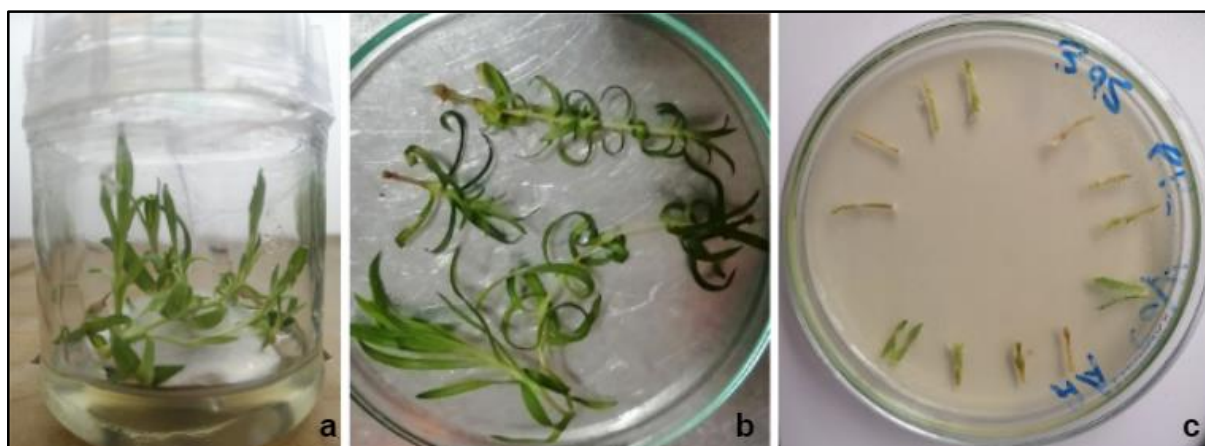


Figura 3. Indexación posterior a la infección de FOX - 2011; (A) Ensayo de patogenicidad, crecimiento de *Fusarium oxysporum* en Micro plantas de clavel (395 - resistente) en medio MS durante 4 días, (B) Separación de los tallos para remover hojas, raíces y desinfectar, (C) Cortes transversales de tres plantas del mismo ensayo, cada planta cortada en cuatro secciones

organizadas manteniendo el orden de base a ápice, para la observación del crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

1.12.4. Ensayos de patogenicidad *ex vitro*



Figura 4. Plantas híbridas de clavel de la línea resistente 395, en adaptación *ex vitro* a invernadero para su posterior inoculación. Citar figura en el texto

Se seleccionó un total de 100 plantas de variedades híbridas de clavel en invernadero catalogadas como resistentes (395), que fueron propagadas por esqueje y pasadas a invernadero en bolsas de 1 kg con sustrato de escoria y tierra estéril, en proporción 3:1 en condiciones de riego y fertilización semejantes a las que se realizan en cultivo comercial (Triana, 2009). Esto tres veces a la semana empleando macro y micronutrientes máster 30-40-30. Transcurridas cinco semanas o al tener cuatro nudos aproximadamente, se retiró la yema apical “pinch” para estimular su crecimiento y brotación (Papone *et al.*, 2008; Buitrago, 2018), acondicionadas para pruebas de patogenicidad (Fig. 4)

1.12.4.1. Seguimiento de síntomas del hospedero y determinación del progreso de la enfermedad en ensayo *ex vitro*

Con plantas de cuatro nudos se hizo inicialmente la inoculación del parásito en tierra a partir de una solución madre de concentración 1×10^6 conidios/ml. Se inoculó una cantidad de 10 mL en la tierra alrededor de las raíces, pasada una semana se realizó una inoculación inyectando en el cuello de la planta con la misma solución madre, esta vez se inocularon 5 mL de solución. Durante dos meses se observó el proceso de infección del hongo, invadiendo la planta desde las raíces, se hizo el seguimiento a partir de la segunda semana después de la inoculación para registrar la aparición de síntomas iniciales según la escala de infección modificada por Soto (2012): (0) sin síntomas, (1) pérdida de turgencia, (2) clorosis y/o amarillamiento, (3) marchitez

severa y/o necrosis, (4) muerte. A partir de esta escala se determinó por observación el progreso de la enfermedad (Trusov *et al.*, 2013) La observación de síntomas tuvo un tiempo estimado de 60 días con un intervalo de 7 días entre cada evaluación.

Transcurrido el tiempo, se tomaron plantas infectadas, se retiraron hojas y raíces, pasaron por un lavado en hipoclorito de sodio 5% durante 2 minutos, etanol 96% durante 1 minuto y ADE durante 1 minuto. Se hicieron cortes transversales, los cuales fueron sembrados en PDA, se dejaron en incubación durante siete días a 24 °C, pasado el tiempo se re-aisló el hongo en PDA para confirmar que los cambios tisulares fueron consecuencia de la invasión del patógeno (Forero *et al.*, 2015).

1.12.4.2. Análisis estadístico *in vitro* y *ex vitro* y AUDPC

Posterior a la evaluación de los síntomas, con los datos obtenidos se efectuó un análisis de varianza, una prueba de normalidad de varianzas de Levene y de Bartlett. Con los datos obtenidos, se estimó el progreso de la enfermedad de acuerdo a los síntomas evaluados con base al cálculo del Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC).

$$AUDPC = \Sigma((X_i + X_{i+1})/2) \times ((T_{i+1}) - T_i)) \quad (1)$$

De los datos obtenidos de la escala de severidad de los síntomas de la enfermedad, se determinó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad por medio de la ecuación (1). Donde, $i=1$, T_i = Es el número de días entre la fecha de inoculación y de registro de síntomas, X_i = la tasa que usa la escala de síntomas, $(T_{i+1}) - T_i$ = tiempo entre lectura de síntomas (Jeger y Viljanen-Rollinson, 2001; Huang *et al.*, 2012 y Soto 2012). Con los valores obtenidos del AUDPC, se realizó una prueba de shapiro-wilks para confirmar normalidad de varianzas.

1.12.5. Caracterización molecular

1.12.5.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de los aislados de *Fusarium* spp. fue realizada siguiendo el protocolo de Cenis (1992), modificado y reportado por Rincón (2010). Se sembraron los aislados en medio Czapek Dox Broth (Sigma®) durante 72 horas a 26 °C. Luego, se centrifugaron individualmente a 13000 rpm durante 5 minutos, se hizo un lavado con TE (10mM Tris HCl (pH 8.0), 1mM EDTA). Enseguida, se adicionó 300 µL de buffer de lisis (200 mM Tris HCl (pH 8.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) por 5 minutos y se adicionaron 150 µL de acetato de sodio 3M (pH 5.2). Los tubos se llevaron a 20 °C por 10 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo previamente congelado, posterior se adicionó un volumen 1:1 de isopropanol y se almacenó a 4 °C, pasadas 24 horas, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante

y al pellet se le agregó etanol al 70% para retirar el exceso de sales. Finalmente, el ADN se resuspendió en TE.

Tras la extracción de ADN, se hizo la medición de la concentración de ADN utilizando el kit Qubit® dsDNA HS. Posteriormente, con TBE 1X como buffer de corrida (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), se evaluó la calidad del ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, por una hora a 50 V, utilizando BrET (Sigma®) a una concentración de 0.5 mg/ml, por último, el gel se reveló en un transiluminador UV para la observación de las bandas (Filgueira, 2011).

1.12.5.2. Evaluación por PCR de genes representativos del genoma y genes SIX

Utilizando ADN genómico, se realizó amplificación por PCR (Tabla 1) con el kit de PCR MyTaq™ DNA Polymerase de Bioline® ajustado a volumen de 20 uL, se realizó en un termociclador Eppendorf® 035735 Mastercycler Nexus Gradient, bajo el siguiente protocolo:

Tabla 1. Protocolo para los reactivos empleados para hacer PCR (Polymerase Chain Reaction).

Protocolo PCR	
Reactivo	Volumen
Buffer 5x	4 uL
Primer Forward	0.5 uL
Primer Reverse	0.5 uL
DNA	0.5 uL
Agua	14 uL

Se amplificaron por PCR (Tabla 1 y 2) regiones de Internal Transcribed Spacer (ITS1 e ITS2), (200pb) que rodean la región codificante 5.8S de ADN_r, usando los primers ITS-1 - ITS-2 e ITS1 - ITS4, los cuales codifican un fragmento específico para el género *Fusarium oxysporum* (Abd *et al.*, 2003). Se usaron los primers H4-f y H4-r (300 pb), como complemento a los datos iniciales. También se evaluaron genes SIX (1 al 7) (Meshram *et al.*, 2018 y Selim *et al.*, 2015).

Tabla 2. Datos de secuencia de los primers empleados en la amplificación de genes de asilados de FOX (Taylor *et al.*, 2016), (F = Forward, R = Reverse).

Primer	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicón (pb)
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	200
ITS-2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	200
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	500
H4-F	GCTATCCGCCGTCTCGCT	300
H4-R	GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT	
SIX-1F	GTATCCCTCCGGATTTTGAGC	992
SIX-1R	AATAGAGCCTGCAAAGCATG	
SIX-2F	CAACGCCGTTTGAATAAGCA	749
SIX-2R	TCTATCCGCTTTCTTCTCTC	
SIX-3F	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT	608
SIX-3R	GGCAATTAACCACTCTGCC	
SIX-4F	TCAGGCTTCACTTAGCATAC	967
SIX-4R	GCCGACCGAAAAACCCTAA	
SIX-5F	ACACGCTCTACTACTCTTCA	667
SIX-5R	GAAAACCTCAACGCGGCAAA	
SIX-6F	CTCTCCTGAACCATCAACTT	793
SIX-6R	CAAGACCAGGTGTAGGCATT	
SIX-7F	CATCTTTTCGCCGACTTGGT	862
SIX-7R	CTTAGCACCCCTTGAGTAACT	

Tabla 3. Datos de los ciclos del termociclador para la PCR.

Ciclos de PCR	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
30 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	1 min
Annealing	55.8 °C	30 seg
Extensión	72 °C	1 min
Fin del Ciclo		

El producto de todas las PCR (amplicones) analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % fue teñido con bromuro de etidio 0.5 µg/mL. Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados usando el sistema (Invitrogen™ PureLink™ PCR Purification Kit ®) y enviados a secuenciar dos veces directamente, tanto con el primer “reverse”, como con el “forward” a MacroGen® en Corea.

Obtenidas las secuencias, se hicieron los consensos y se analizaron empleando el software bioinformático CLC DNA WorkBench®. Seguidamente, se compararon en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para corroborar que la identidad de los aislados corresponde a *Fusarium oxysporum* y comparar la identidad de las secuencias con secuencias previamente reportadas para los genes evaluados.

1.13. RESULTADOS

1.13.1. Caracterización morfológica de *Fusarium oxysporum*

Las principales características fueron un micelio algodonoso, primero blanco, posteriormente violeta-morado. Las estructuras identificadas fueron fiálides cortas sin ramificaciones, microconidios de forma característica ovalada, clamidosporas terminales. En casos de observación de macroconidios se distinguen por su forma de banano o medialuna, son hialinos, más gruesos en la parte medial que en los extremos y poseen de 3 a 4 septos (Nelson *et al.*, 1983 y Leslie 2006).

En la Figura 5 se rotulan las estructuras morfológicas características de *Fusarium oxysporum* descritas de acuerdo a la guía de Leslie *et al.*, (2006), y Rentería *et al.*, (2019); las cuales comprenden sus estructuras de reproducción, que son las micro y macroconidias, las estructuras alargadas donde se producen los conidios, que son las monofialides, la estructuras de resistencia para su supervivencia en el suelo como las clamidosporas, y las estructuras que componen el cuerpo vegetativo del hongo como son las hifas (Mandhare *et al.*, 2011; Nirmaladevi *et al.*, 2016)

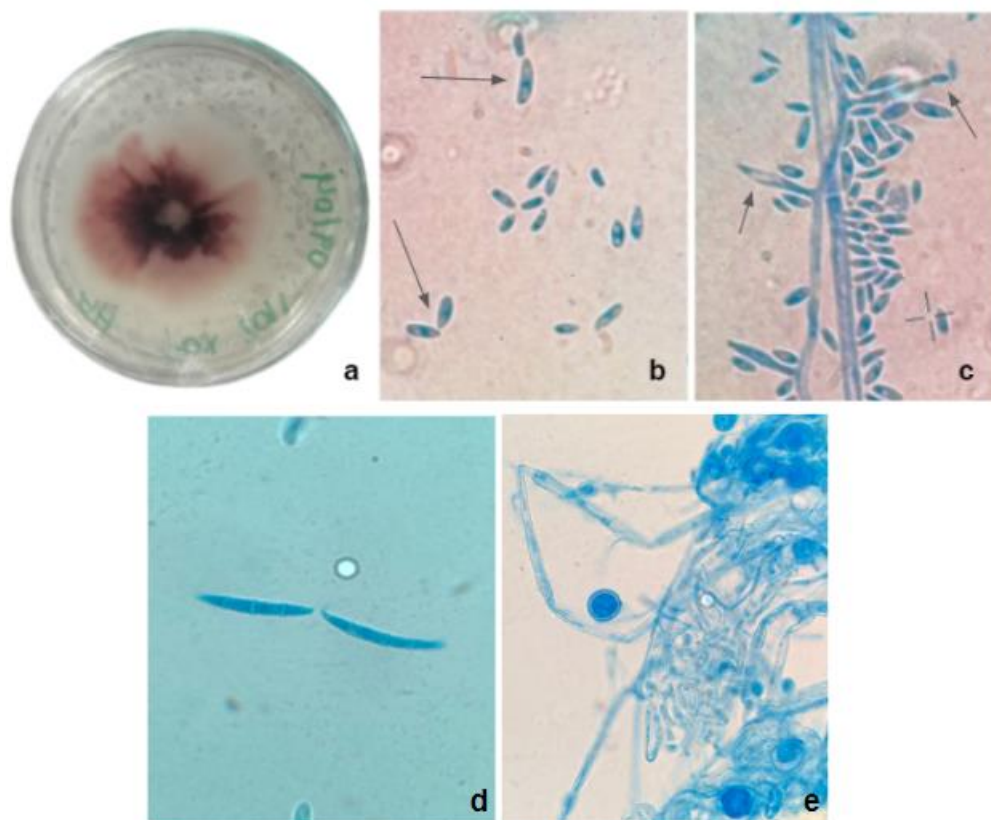
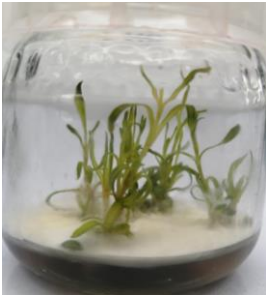
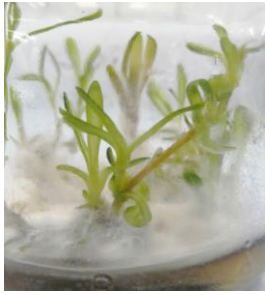


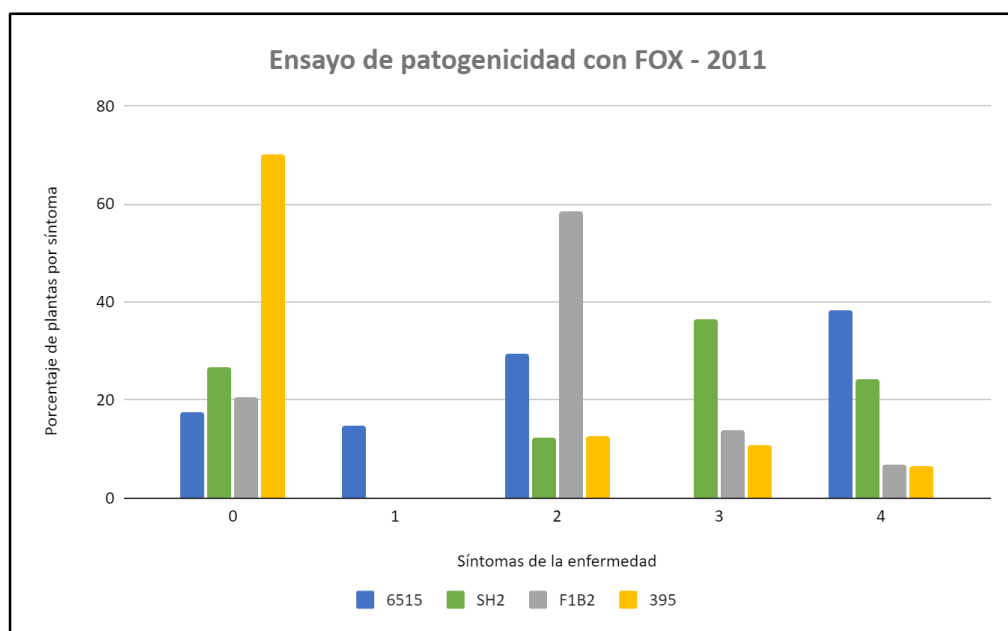
Figura 5. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum* obtenidas del aislado FOX-2011 en microscopía de luz: (A) Observación macroscópica de una colonia en medio PDA con micelio algodonoso, coloración blanca, rosa y púrpura, (B) Observación microscópica de los microconidios, ovalados, de base redondeada y unicelulares (flechas), (C) Hifas septadas, presencia de monofialides cortas (flechas), (D) macroconidias en forma de medialuna, hialinos y con cuatro septos, (E) clamidosporas de pared gruesa aisladas y algunas terminales.

1.13.2. Ensayo de patogenicidad *in vitro* de los cinco aislados de FOX sobre las variedades resistentes y susceptibles de clavel

Los síntomas presentados a partir de la infección de FOX - 2011 (Tabla 4 y Gráfica 5), indicaron que 6515 (S) y SH2 (S) tuvieron mayor porcentaje de mortalidad; 6515 tuvo menos plantas asintomáticas y más plantas con clorosis en comparación con SH2, mientras que SH2 tuvo más plantas con marchitez vascular. En el caso de 395 (R) tuvo mayor cantidad de plantas asintomáticas y menor presencia de síntomas, comparada con F1B2 (R) que tuvo mayor mortalidad y fue la variedad con mayor porcentaje de amarillamiento.

Tabla 4. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - 2011 sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Ensayos de patogenicidad con FOX - 2011			
A - 6515 (S)	B - SH2 (S)	C - 395 (R)	D - F1B2 (R)
			

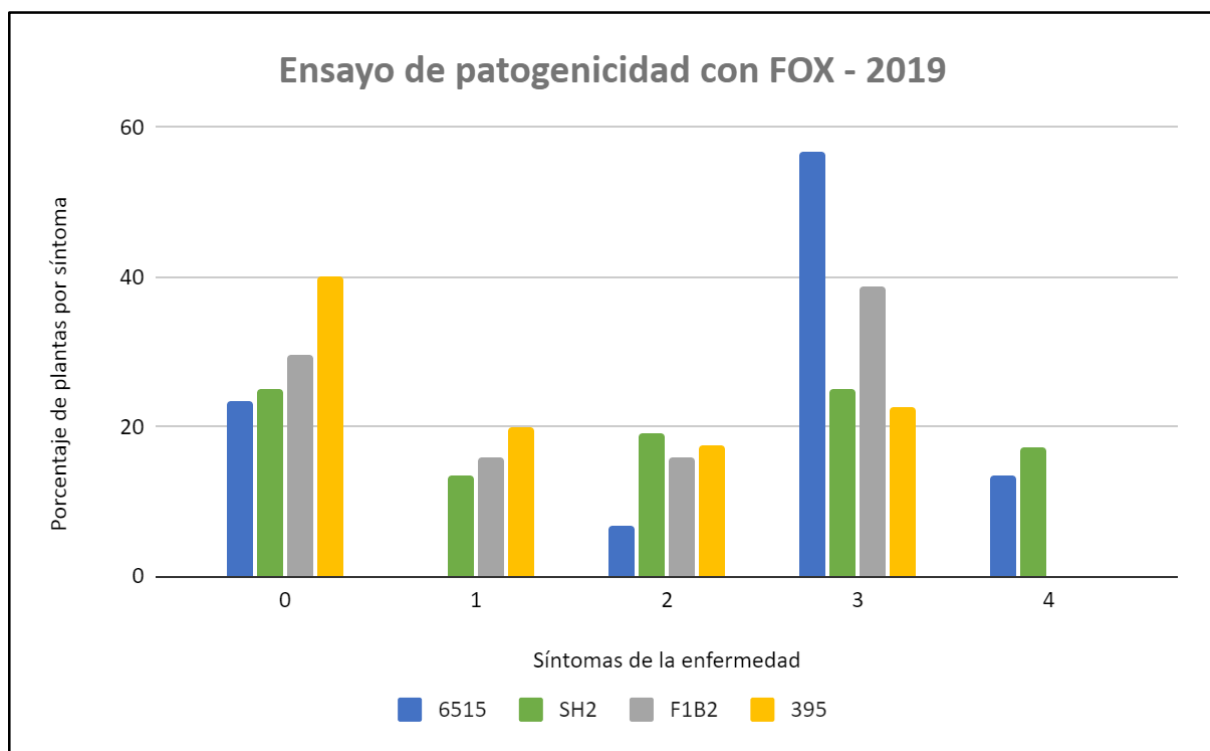


Gráfica 1. Síntomas de la infección ocasionada por el aislado FOX - 2011 sobre las variedades susceptibles (6515 y SH2) y Resistentes (395 y F1B2), posterior a 10 días de infección, de acuerdo a la escala de infección modificada por Soto (2012): (0) sin síntomas, (1) pérdida de turgencia, (2) clorosis y/o amarillamiento, (3) marchitez severa y/o necrosis, (4) muerte.

En el caso de los síntomas presentados durante la infección causada por FOX - 2019, se evidenció que 6515 (S) tuvo mayor porcentaje de marchitez vascular, seguido de F1B2 (R); SH2 (S) tuvo mayor porcentaje de plantas asintomáticas y mayor porcentaje de muertes comparado con 6515; mientras que 395 (R) tuvo mayor porcentaje de plantas asintomáticas y no presentó muertes (Tabla 5 y Gráfica 2).

Tabla 5. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - 2019 sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Ensayos de patogenicidad con FOX – 2019			
6515 (S)	SH2 (S)	395 (R)	F1B2 (R)
			



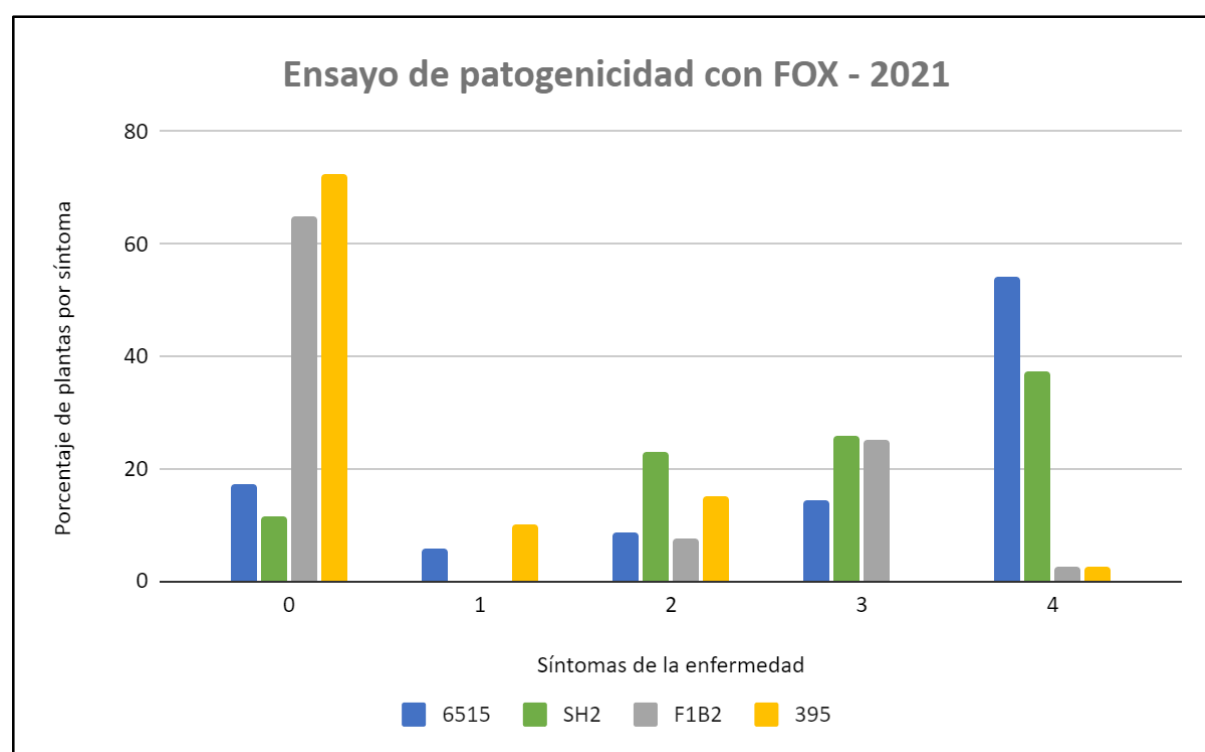
Gráfica 2. Síntomas de la infección ocasionada por el aislado FOX - 2019 sobre las variedades susceptibles (6515 y SH2) y Resistentes (395 y F1B2), posterior a 10 días de infección, de acuerdo a la escala de infección modificada por Soto (2012): (0) sin síntomas, (1) pérdida de turgencia, (2) clorosis y/o amarillamiento, (3) marchitez severa y/o necrosis, (4) muerte.

Los síntomas ocasionados por la infección de FOX - 2021 fueron mayor porcentaje de plantas vivas en variedades resistentes (395 y F1B2) y 395 presentó pérdida de turgencia y clorosis; en contraste con la presencia de mayor porcentaje de plantas muertas en las variedades

susceptibles (6515 y SH2), en este caso SH2 presentó más plantas con amarillamiento y marchitez comparada con 6515 que tuvo pérdida de turgencia y el mayor porcentaje de muertes (Tabla 6 y Gráfica 3).

Tabla 6. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - 2021 sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Ensayos de patogenicidad con FOX – 2021			
6515 (S)	SH2 (S)	395 (R)	F1B2 (R)
			

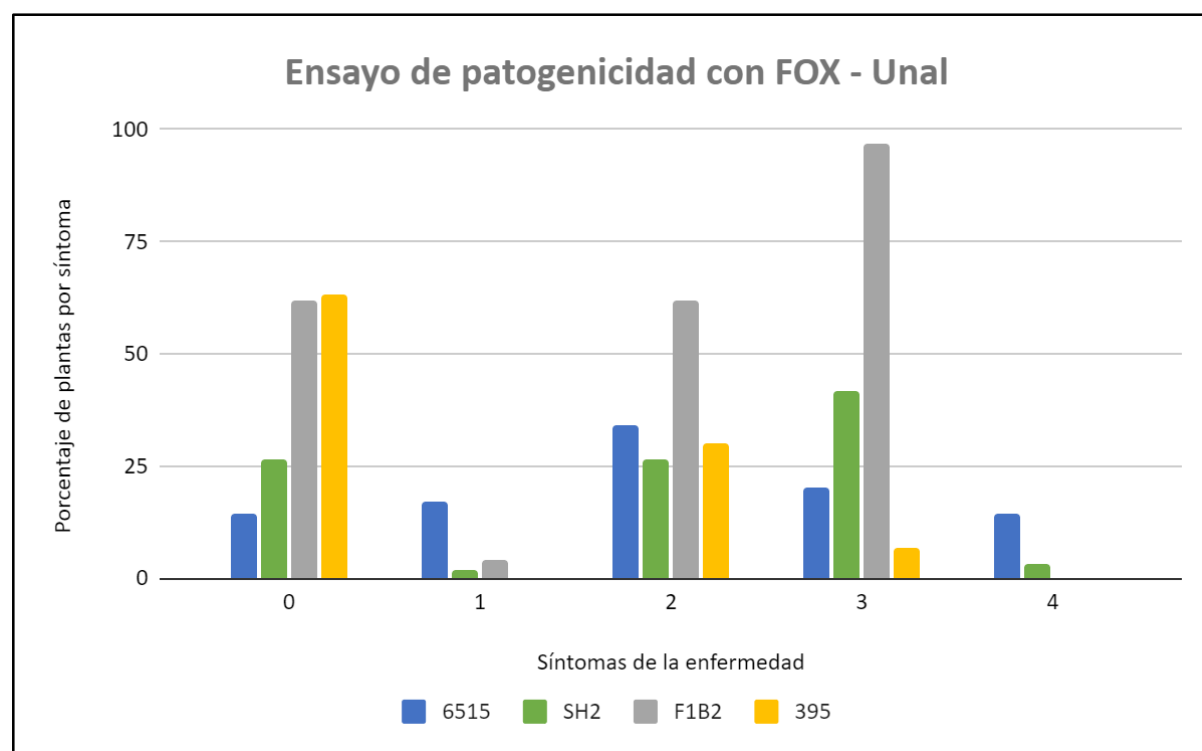


Gráfica 3. Síntomas de la infección ocasionada por el aislado FOX - 2021 sobre las variedades susceptibles (6515 y SH2) y Resistentes (395 y F1B2), posterior a 10 días de infección, de acuerdo a la escala de infección modificada por Soto (2012): (0) sin síntomas, (1) pérdida de turgencia, (2) clorosis y/o amarillamiento, (3) marchitez severa y/o necrosis, (4) muerte.

Los síntomas ocasionados por FOX - Unal fueron notorios en F1B2 (R) que presentó el mayor porcentaje de amarillamiento, y marchitez vascular comparada con las demás variedades, incluso las susceptibles, en este caso SH2 (S) tuvo mayor cantidad de plantas con marchitez y plantas asintomáticas comparada con 6515 (S) que tuvo más plantas con pérdida de turgencia y amarillamiento (Tabla 7 y Gráfica 4)

Tabla 7. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - Unal sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Ensayos de patogenicidad con FOX - Unal			
6515 (S)	SH2 (S)	395 (R)	F1B2 (R)
			



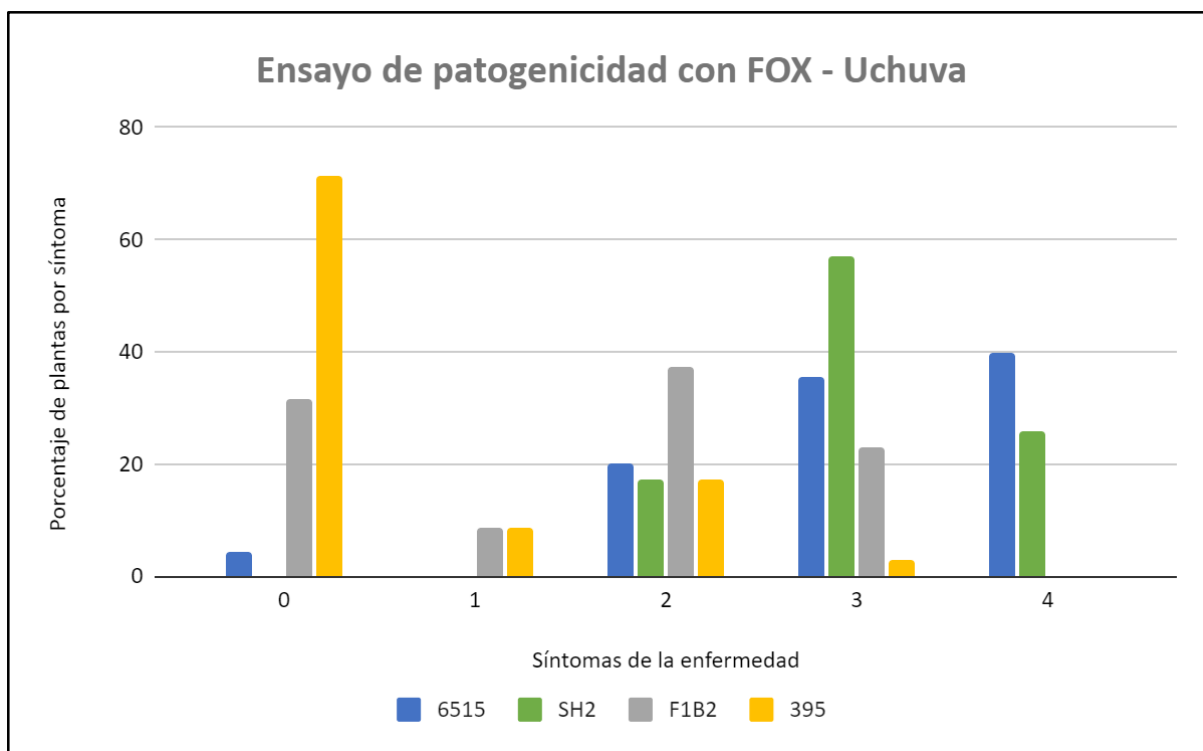
Gráfica 4. Síntomas de la infección ocasionada por el aislado FOX - Unal sobre las variedades susceptibles (6515 y SH2) y Resistentes (395 y F1B2), posterior a 10 días de infección, de

acuerdo a la escala de infección modificada por Soto (2012): (0) sin síntomas, (1) pérdida de turgencia, (2) clorosis y/o amarillamiento, (3) marchitez severa y/o necrosis, (4) muerte.

Finalmente, en la Tabla 8 y Gráfica 5, se observan los síntomas presentados por la infección de FOX - Uchuva. En este caso no hubo plantas asintomáticas en SH2 (S), esta variedad presentó mayor porcentaje de plantas con marchitez vascular y menos muertes, en comparación con 6515 (S) que tuvo más mortalidad. Para el caso de F1B2 (R) presentó mayor cantidad de plantas con clorosis y marchitez qué 395 (R), la cual tuvo el mayor porcentaje de plantas asintomáticas.

Tabla 8. Micro - plantas de clavel de las variedades resistentes (R) y susceptibles (S) infectadas con el aislado FOX - Uchuva sobre mostrando los síntomas tras 10 días de infección.

Ensayos de patogenicidad con FOX - Uchuva			
6515 (S)	SH2 (S)	395 (R)	F1B2 (R)
			



Gráfica 5. Síntomas de la infección ocasionada por el aislado FOX - Uchuva sobre las variedades susceptibles (6515 y SH2) y Resistentes (395 y F1B2), posterior a 10 días de infección, de acuerdo a la escala de infección modificada por Soto (2012): (0) sin síntomas, (1) pérdida de turgencia, (2) clorosis y/o amarillamiento, (3) marchitez severa y/o necrosis, (4) muerte.

1.13.3. Evaluación de la infección de FOX en las plantas por indexación

La disposición de los cortes transversales de las plantas infectadas, se hizo con el fin de evaluar el progreso de la infección por medio del alcance del hongo dentro de la planta. Observando donde empieza el crecimiento de las colonias de FOX en cada uno de los cuatro cortes realizados y organizados de acuerdo a su disposición de la base al ápice de la planta.

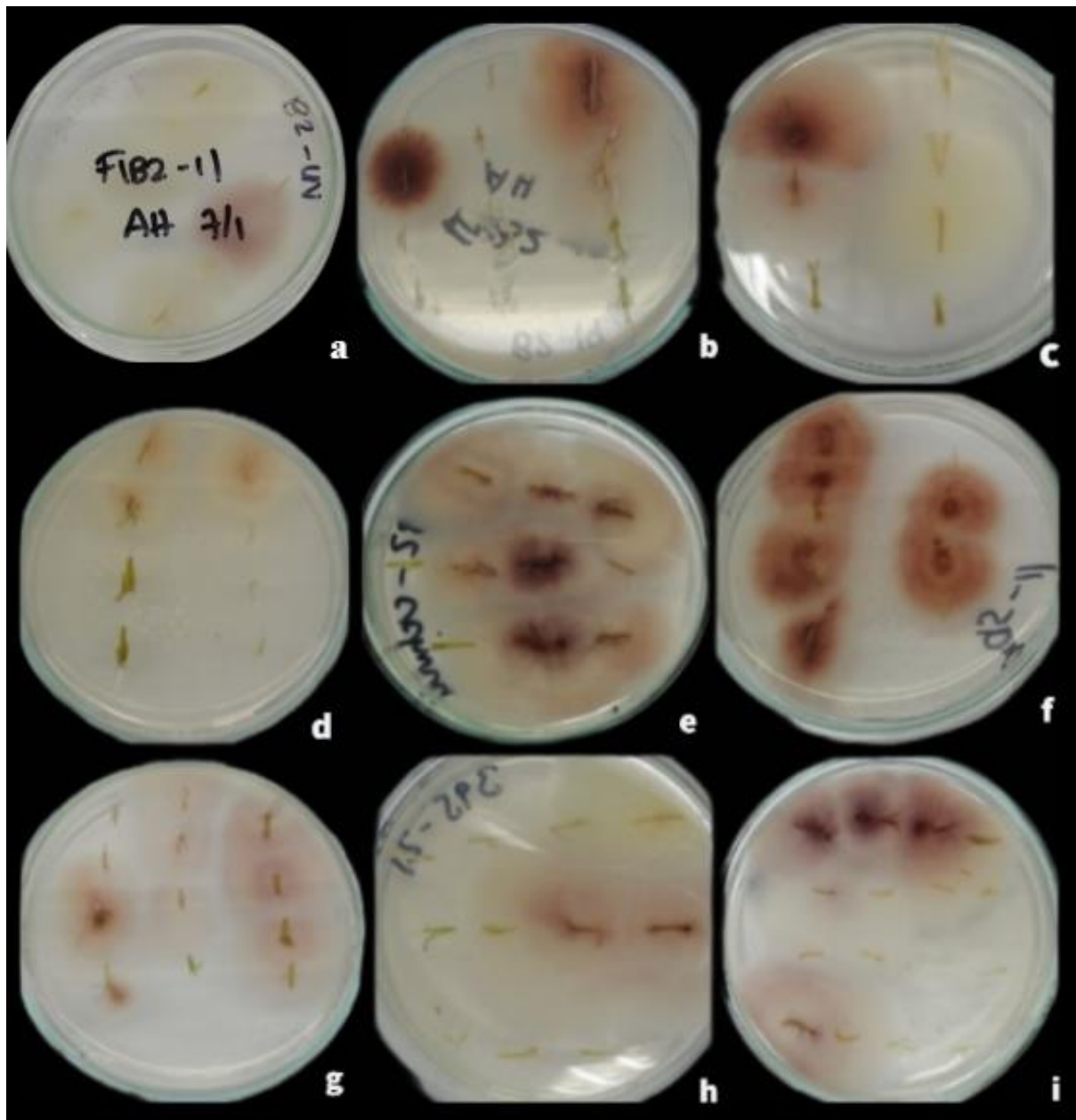


Figura 6. Indexación de las plantas de clavel de las variedades resistentes 395 y F1B2, para todos los ensayos de patogenicidad *in vitro* con cada uno de los aislados evaluados de FOX (2011, 2021, 2019, Unal y Uchuva); (a) F1B2 - 2011, (b) F1B2 - 2019, (c) F1B2 - 2021, (d) F1B2 - Unal, (e) F1B2 - Uchuva, (f) 395 - 2011, (g) 395 - 2019, (h) 395 - 2021, (i) 395 - Uchuva (Figura 6).

El desarrollo de las colonias de los cinco aislados de FOX a partir de los cortes de meristemos de la variedad resistente F1B2 fue: FOX-2011 creció por encima de los 3/4 de la planta, FOX - 2019 creció entre 1/4 y 2/4 de la planta, FOX-2021 creció por encima de los 2/4 de la planta, FOX-Unal creció entre 1/4 y 2/4 de la planta y, finalmente, el FOX-Uchuva tuvo un crecimiento de 3/4 de la planta (Fig., 6: a, b, c, d y e).

Lo anterior, indicando que los aislados 2011 y Uchuva fueron los que tuvieron mayor crecimiento de micelio en la variedad F1B2, mientras que 2019 y Unal fueron los que tuvieron menor crecimiento de micelio en plantas de esta variedad resistente.

Los aislados cuyo crecimiento fue superior a los 2/4 basales de la planta pueden ser una indicación de que hubo mayor colonización de FOX, mientras que, si el crecimiento fue primordialmente hacia la parte inferior de las plantas, que no creciera micelio de la parte superior del meristemo puede ser un indicador de que la infección no se dio hacia la parte apical, o de que la cantidad de inóculo presente no fue lo suficientemente abundante para prosperar en la parte apical de la planta.

En el caso de la variedad resistente 395, el crecimiento de las colonias de los cinco aislados fue: FOX-2011 creció por encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta, FOX-2019 creció por encima de los $\frac{2}{4}$ de la planta, FOX-2021 creció por encima de los $\frac{2}{4}$ de la planta. FOX-Unal creció en $\frac{1}{4}$ de la planta y, finalmente, FOX-Uchuva tuvo un crecimiento de $\frac{3}{4}$ de la planta. Lo anterior, indicando que los aislados 2011, 2019 y Uchuva fueron los que tuvieron mayor crecimiento de micelio en la variedad 395, mientras que 2021 y Unal fueron los que tuvieron menor crecimiento de micelio en plantas de esta variedad resistente (Fig., 6: a, b, c, d y e). En F1B2, el crecimiento de los aislados 2011, 2021 y Uchuva fue por encima de los $\frac{3}{4}$ mientras que para 2019 y Unal, el crecimiento ocurrió hasta las $\frac{2}{4}$ de la planta.

Se puede observar que, además, el crecimiento de las colonias varía entre las variedades resistentes de clavel, además de presentar cambios en la coloración; el aislado 2011 tiene una coloración más oscura en las colonias que crecieron de la variedad 395, ocurre lo opuesto con el aislado 2019, cuya coloración es más oscura en las colonias obtenidas de la variedad F1B2. Mientras que las colonias de 2021, Unal y Uchuva, presentan colores similares en su crecimiento en las dos variedades resistentes.

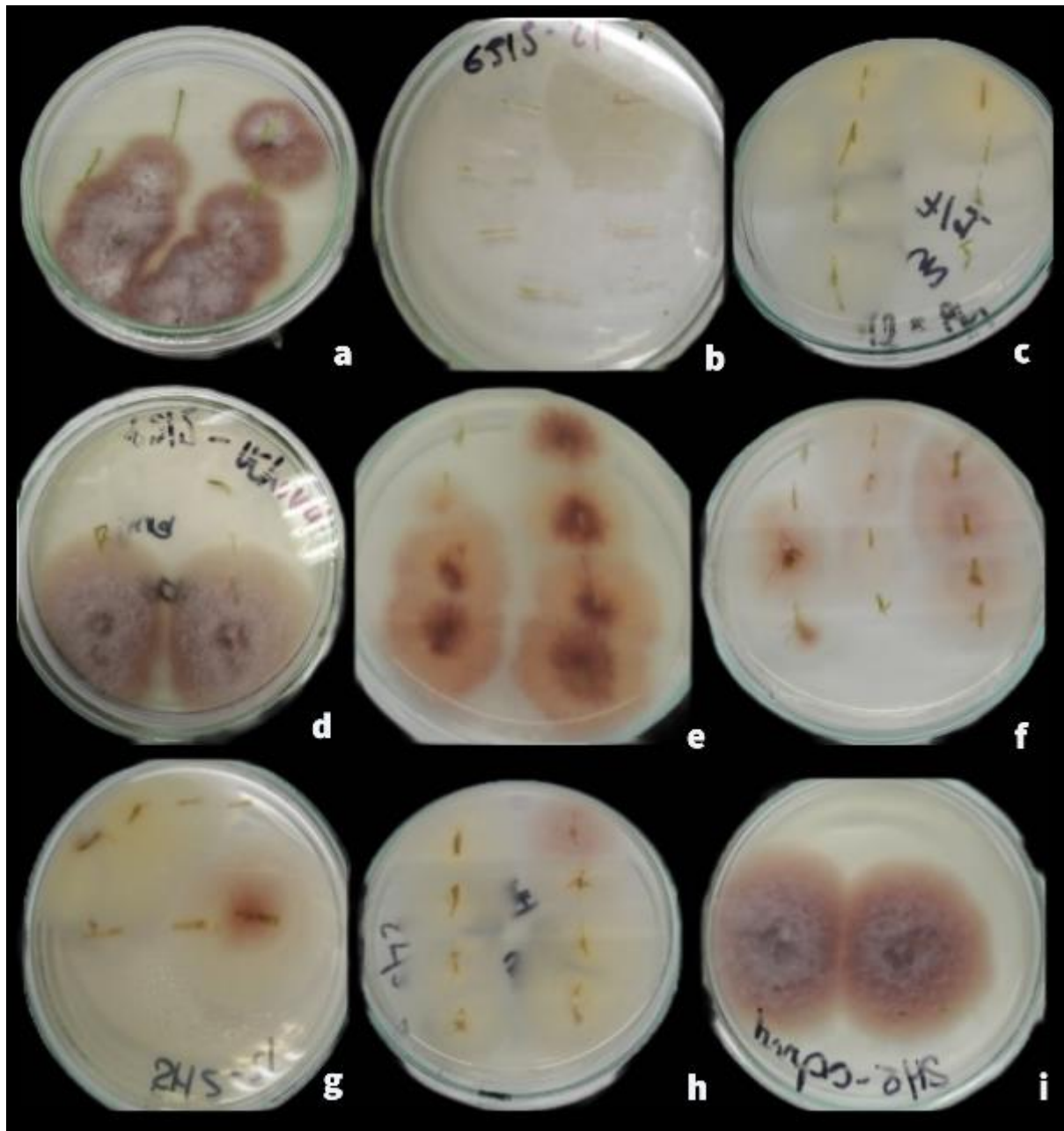


Figura 7. Indexación de las plantas de clavel de las variedades susceptibles SH2 y 6515 para todos los ensayos de patogenicidad con cada uno de los aislados evaluados de FOX (2011, 2021, 2019, Unal y Uchuva); (a) 6515- 2011, (b) 6515- 2021, (c) 6515 - Unal, (d) 6515 - Uchuva, (e) SH2 - 2011, (f) SH2 - 2019, (g) SH2 - 2021, (h) SH2 - UN, (i) SH2 – Uchuva (Figura 7).

El crecimiento de las colonias de los cinco aislados en las variedades susceptibles, fue: En 6515, FOX-2011 tuvo crecimiento por encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta, FOX - 2019, creció por encima de $\frac{3}{4}$ de la planta, FOX-2021 tuvo crecimiento en $\frac{2}{4}$ de la planta, FOX-Unal creció por encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta y FOX-Uchuva creció por encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta. Para el caso de SH2, el crecimiento fue: FOX-2011 tuvo crecimiento por encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta, FOX-2019 tuvo crecimiento por encima de $\frac{3}{4}$ de la planta, FOX-2021 creció por

encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta, y FOX-Uchuva creció por encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta (Fig., 7: a, b, c, d y e).

Con lo anterior, se observa que en las variedades 6515 y SH2 categorizadas como susceptibles, todos los aislados tienen un crecimiento de micelio por encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta (Fig. 7; a, c, d, e, f, g, h), a excepción del crecimiento basal que tiene el aislado 2021 en la variedad 6515. Esto puede ser un indicador de que el progreso de la infección por parte de los aislados en estas variedades fue más eficiente comparado con las variedades catalogadas resistentes.

Al comparar el crecimiento de los aislados en las variedades resistentes, el crecimiento de los aislados en ambas variedades tanto resistentes como susceptibles supera la mitad de los tallos. Por ello, es importante observar el crecimiento de las colonias, que parte del tallo origina el crecimiento, pues se observa que en el micelio que proviene de las variedades susceptibles es más abundante, además de asociarse al inóculo que prospera en esa parte de la planta, en contraste con el crecimiento del micelio en las variedades resistentes..

En respuesta a lo anterior, las causas de la variación en la respuesta diferencial de las distintas variedades de clavel a FOX, se asocian a diferencias en la agresividad de los distintos aislados, y a su vez a las categorías de resistencia y susceptibilidad previamente descritas en las variedades de clavel, que se manejan en el grupo de fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granada.

1.13.3.1. Incidencia y severidad para el ensayo *in vitro* y la respuesta de las variedades resistentes y susceptibles de clavel a la presencia de FOX.

A partir de los datos obtenidos de la observación de síntomas durante las pruebas de patogenicidad *in vitro*, se obtuvo el porcentaje de incidencia y severidad de cada uno de los aislados sobre las diferentes variedades resistentes y susceptibles, con el fin de determinar diferencias en la infección entre aislados y, a su vez, sobre las diferentes variedades.

Tabla 9. Porcentaje de incidencia (%I) y severidad (%S) de los ensayos para cada aislado de frente a cada variedad resistente y susceptible de clavel (Tabla 9)

	2011		2019		2021		UNAL		Uchuva	
VARIEDAD	% I	%S	% I	%S	% I	%S	% I	%S	% I	%S
F1B2(R)	76,7	0,45	70,5	0,41	35,0	0,25	60,5	0,30	68,6	0,38
395(R)	29,8	0,21	60,0	0,31	27,5	0,13	36,7	0,20	28,6	0,13
6515(S)	82,4	0,57	76,7	0,59	82,9	0,71	85,7	0,51	95,6	0,77
SH2(S)	51,2	0,58	75,0	0,49	85,7	0,70	73,3	0,48	100,0	0,77

A partir de la observación de los síntomas en las pruebas de patogenicidad de cada aislado con cada variedad, se obtuvo el porcentaje de incidencia y severidad para cada ensayo:

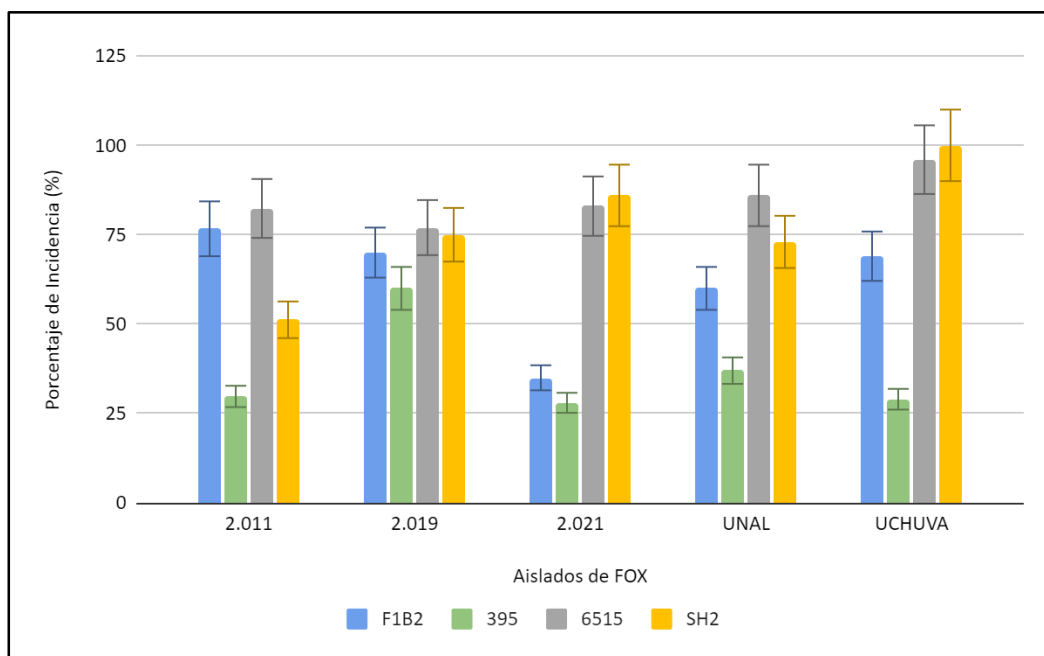
F1B2 (resistente) tuvo porcentajes de incidencia superiores al 60% con todos los aislados, excepto 2021, cuyo porcentaje fue inferior a 40%; porcentajes de severidad superiores al 40% con 2011 y 2019 e inferiores a 40% con 2021, Unal y Uchuva; 395 (resistente) presentó un porcentaje superior al 60% de incidencia únicamente con FOX-2019, porcentajes inferiores a 40% con los demás aislados, mientras que presentó porcentajes de severidad superiores al 20% con los aislados 2011 y 2019, por otro lado, los porcentajes fueron inferiores a 20% en los aislados 2021, Unal y Uchuva.

SH2 (susceptible) presentó un porcentaje superior al 50% de incidencia únicamente con todos los aislados de FOX, mientras que presentó porcentajes de severidad superiores al 70% con los aislados 2021, Unal y Uchuva, en cambio, el porcentaje fue inferior al 60% en 2011 y 2019, caso contrario a los porcentajes de la variedad resistente (395); Finalmente, 6515 (susceptible) presentó un porcentaje superior al 70% de incidencia únicamente con todos los aislados de FOX, mientras que presentó porcentajes de severidad superiores al 70% con los aislados 2021 y Uchuva, en tanto que el porcentaje fue inferior al 60% en 2011, 2019 y Unal, caso contrario a los porcentajes de la variedad resistente (395).

Según los resultados de las pruebas de patogenicidad, F1B2 (resistente) la severidad de la enfermedad supera el 40% para el caso de 2011 y para el resto de los aislados se encuentra en un rango de 20-40%. Por ende, el carácter de resistencia de la variedad F1B2 es moderadamente resistente frente a todos los aislados de FOX, exceptuando el aislado 2011, frente al cual presenta un carácter de susceptibilidad. Esta variedad presenta una respuesta favorable en la tolerancia a la enfermedad, pues previene el rápido progreso de la infección al punto de la marchitez,

En el caso de 395 (resistente), presenta un porcentaje de severidad por debajo del 20% frente a los aislados 2021, Unal y Uchuva, por ende, mantiene su carácter resistente frente a estos aislados. Sin embargo, presenta un carácter de resistencia moderada frente a los aislados 2011 y 2019 al tener porcentajes de severidad por encima de 20%.

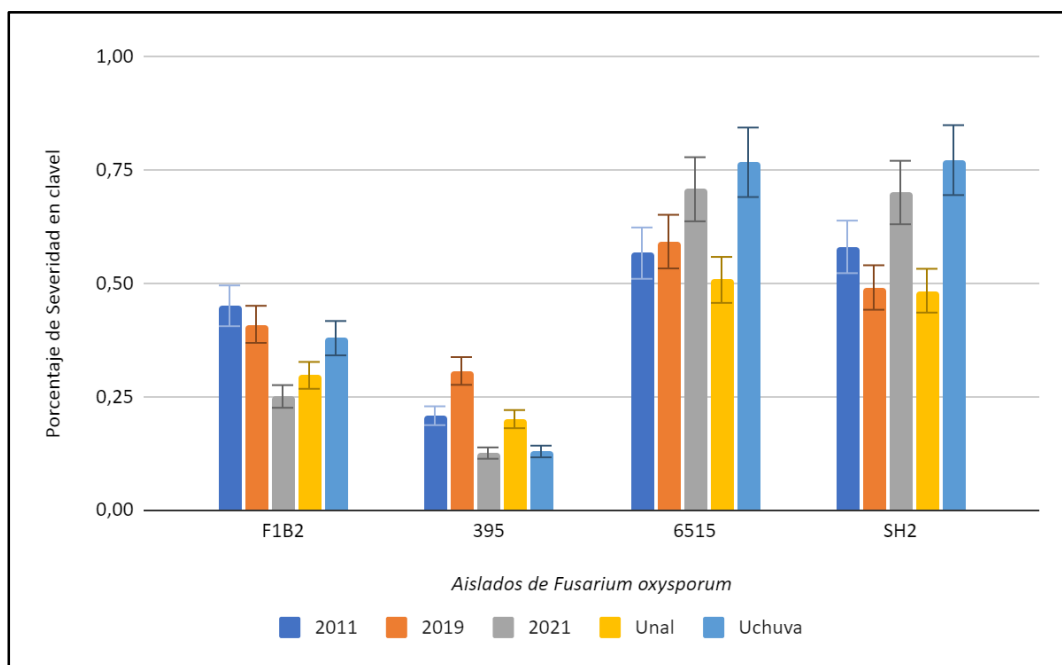
.



Gráfica 6. Porcentaje de incidencia de los distintos aislados de FOX (2011, 2019, 2021, Unal y Uchuva) en ensayos *in vitro* de *F. oxysporum* en variedades híbridas de *Dianthus caryophyllus* 10 días posterior a la inoculación; resistentes (395 y F1B2) y susceptibles (6515 y SH2) (Gráfica 6).

En los ensayos de patogenicidad se logró observar que todos los aislados infectaron las plantas de las variedades resistentes y susceptibles. Se obtuvo el porcentaje de incidencia a partir de la división del total de plantas infectadas sobre el total de plantas del ensayo por 100 (Christopher *et al.*, 2010). De acuerdo con la estimación de la incidencia, se observa (Gráfica 6) que los valores de incidencia para todos los ensayos superan el 25 %. Se estima que en las variedades susceptibles los valores promedio son mayores a los estimados para las variedades resistentes. Para las variedades resistentes los porcentajes oscilan entre 25-75%, en el caso de 395 el porcentaje supera el 50% en el ensayo con 2019, mientras que en F1B2 supera el 50 % en todos los ensayos, excepto con 2021.

En los valores estimados para las variedades susceptibles los porcentajes oscilan entre 50-100%, donde la variedad 6515 supera en todos los ensayos el 75%, mientras que SH2 tiene una incidencia de 50% y en 2011 y en los demás ensayos está entre 75 y 100 %.



Gráfica 7. Porcentaje de severidad *in vitro* de *F. oxysporum* en variedades híbridas de *Dianthus caryophyllus* 10 días posterior a la inoculación; variedades resistentes 395 y F1B2 y susceptibles 6515 y SH2; distribución normal y homogeneidad de varianzas, existen diferencias significativas ($Pr(>F) = < 0.05$). Hay significancia estadística en el efecto de las variables, pero no en la interacción de las mismas.

En la estimación de la severidad se observa (Gráfica 7) que los porcentajes de las variedades resistentes se mantienen por debajo del 50 % para todos los ensayos, mientras que para las variedades susceptibles los valores superan el 50%. En las variedades resistentes se puede resaltar para F1B2; los valores de severidad son menores con los aislados de 2021 y Unal, y superan el 40% con los aislados 2011, 2019 y Uchuva, donde 2011 tuvo el valor más elevado. Para 395, todos los ensayos tuvieron valores menores a 25% a excepción del ensayo con 2019, que tuvo un porcentaje superior al 30%.

Por otro lado, las variedades susceptibles tuvieron valores superiores al 48%, en el caso de 6515 el aislado que tuvo menor porcentaje fue Unal con un porcentaje de 50%, mientras que los aislados 2021 y Uchuva tuvieron los mayores porcentajes entre 70 y 75%. Para el caso de SH2, los aislados 2019 y Unal tuvieron los porcentajes más bajos cerca al 50%, y al igual que en 6515, los valores más altos fueron para los aislados 2021 y Uchuva.

Tabla 10. Organización de los aislados de *Fusarium oxysporum* de acuerdo al porcentaje de severidad alcanzados sobre variedades resistentes (F1B2 y 395) y susceptibles (SH2 y 6515) donde los porcentajes se organizan; 0-20% resistente, 20-40% resistencia moderada y $\geq 50\%$ susceptible (tabla 10) (Kumar *et al.*, 2012).

Variedades de clavel				
Aislado de FOX	F1B2	395	6515	SH2
2011	S	MR	S	S
2019	MR	MR	S	S
2021	MR	R	S	S
Unal	MR	R	S	S
Uchuva	MR	R	S	S

Con lo anterior, se puede observar (Tabla 10) que, de acuerdo a los resultados en las pruebas de patogenicidad *in vitro*, en la respuesta de todas las variedades a la infección ocasionada por los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* hay diferencias significativas en la respuesta a la infección entre las variedades resistentes y susceptibles, y, adicionalmente, hay diferencias en la respuesta de resistencia de las variedades previamente catalogadas como resistentes; mientras las variedades susceptibles mantienen su carácter de susceptibilidad.

1.13.3.2. *Análisis estadístico de los valores de incidencia y severidad para el ensayo in vitro*

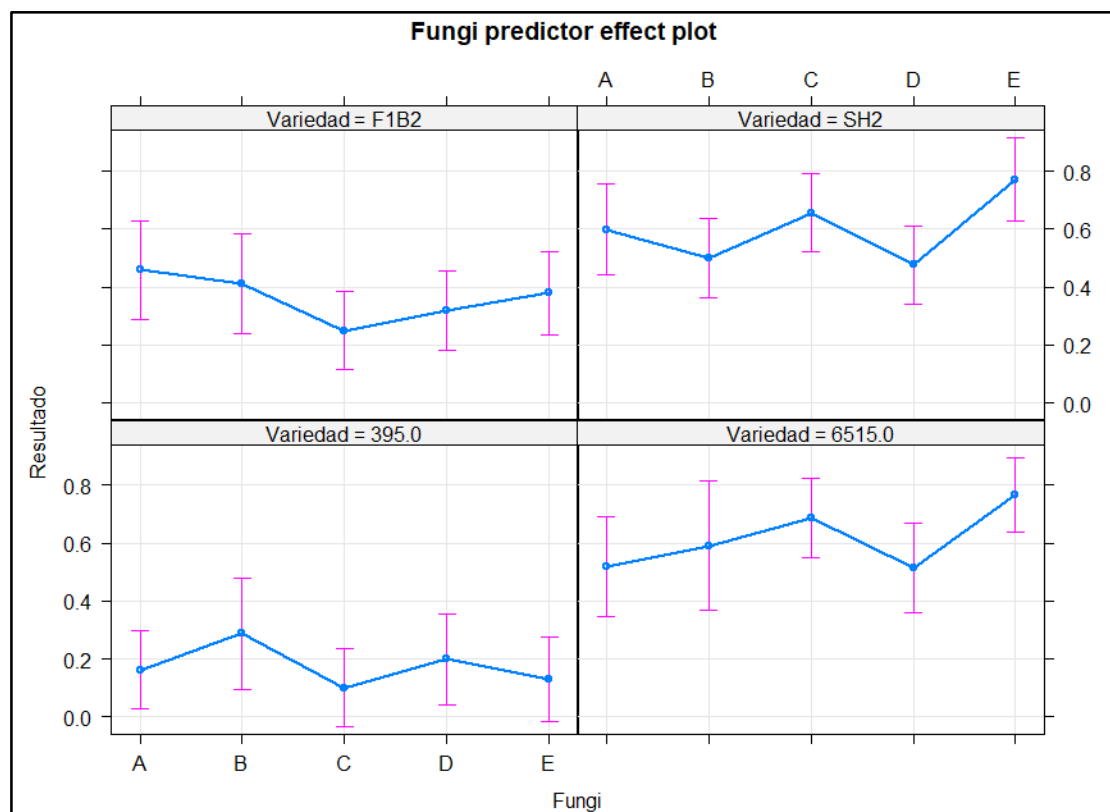
Con datos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, existen diferencias significativas ($Pr(>F) = < 0.05$) en la severidad de la infección ocasionada por diferentes aislados de FOX sobre el clavel. Hay diferencias significativas tanto para los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* como para las variedades resistentes y susceptibles del clavel utilizadas en este estudio. Aun así, la interacción entre las variables, variedad de las plantas y aislado del FOX, no es significativa. Se realizó una prueba de efecto de las variables donde se muestra que tanto la variable (variedad) denominada al tipo de variedad resistente o susceptible, como la variable (hongo) asociada a los distintos aislados, tienen efecto sobre la severidad de la infección, sin embargo, la variable de la variedad tiene un efecto mayor comparado con el efecto de los aislados, estadísticamente hablando.

Con base en los resultados de la prueba de Anova, se puede observar (Tabla 11) que hay diferencias en el efecto de las variedades sobre los valores de severidad de la infección, donde las variedades susceptibles 6515 y SH2 presentan niveles de severidad mayores al 50%, mientras que las variedades resistentes 395 y F1B2 presentan valores para 395 inferiores al 40% y para F1B2 inferiores a 50%.

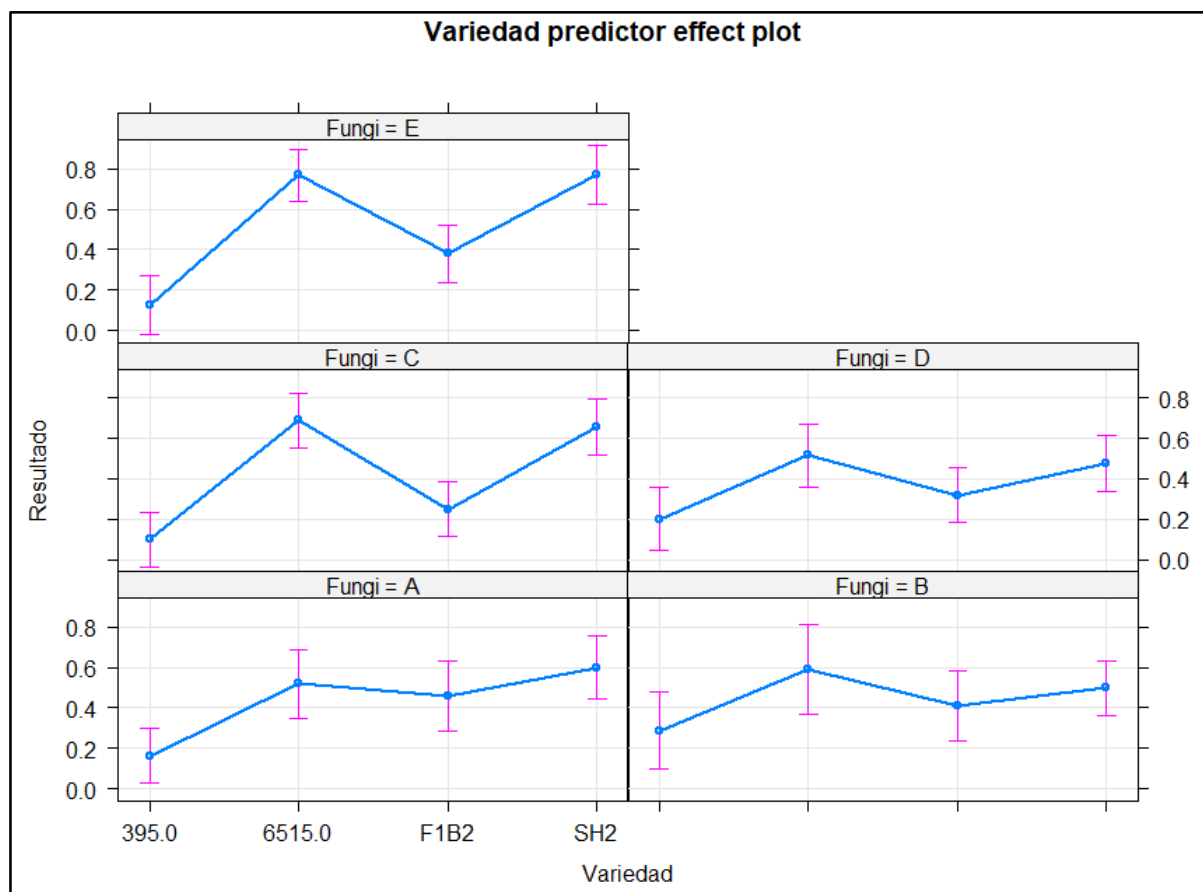
Tabla 11. Valores de Anova para ambas variables (variedades de clavel y aislados de FOX), Pruebas de normalidad de Levene y de Shapiro-Wilks, Tamaño del efecto de las variables sobre la severidad de la enfermedad (Tabla 11).

Anova	
Variable: Variedades de Clavel	Pr (>F) = < 2e-16
Variable: Aislados de Fox	Pr (>F) = 0.04881
Pruebas de Normalidad	
Prueba de Levene para homogeneidad de las varianzas	Pr (>F) = 0.1187
Prueba de Shapiro - Wilks para normalidad en la distribución de los datos	P value = 0.9101
Valores del efecto de las variables	
Parámetro	Eta2
Hongos	0.04
Variedades de plantas	0.48
Hongos*Variedades de plantas	0.07

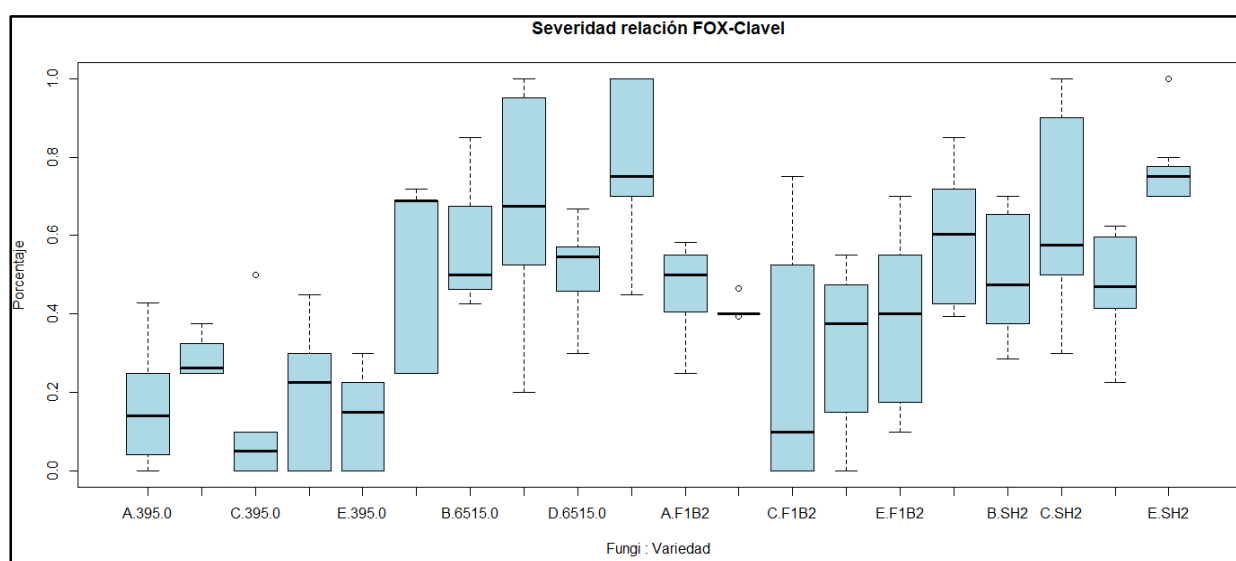
En este caso se observa (Gráfica 8) que el efecto de los aislados presenta diferencias significativas, es decir, el efecto de los aislados tiene un impacto diferencial en los valores de severidad de las distintas variedades; de acuerdo a los resultados de anova ($Pr(>F) < 0.05$) sobre los porcentajes de severidad de la infección. Aquí se pueden resaltar diferencias como el efecto del aislado Unal (D), que tiene valores entre 20 y 50%, comparado al efecto del aislado Uchuva (E), que tienen valores entre 20 y 80%.



Gráfica 8. Distribución del efecto de las variedades de clavel (resistentes; F1B2 y 395) y (susceptibles; SH2 y 6515) sobre los valores de severidad de la enfermedad causada por FOX, donde la organización de los aislados es (A) 2011, (B) 2019, (C)2021, (D)Unal y (E) Uchuva.

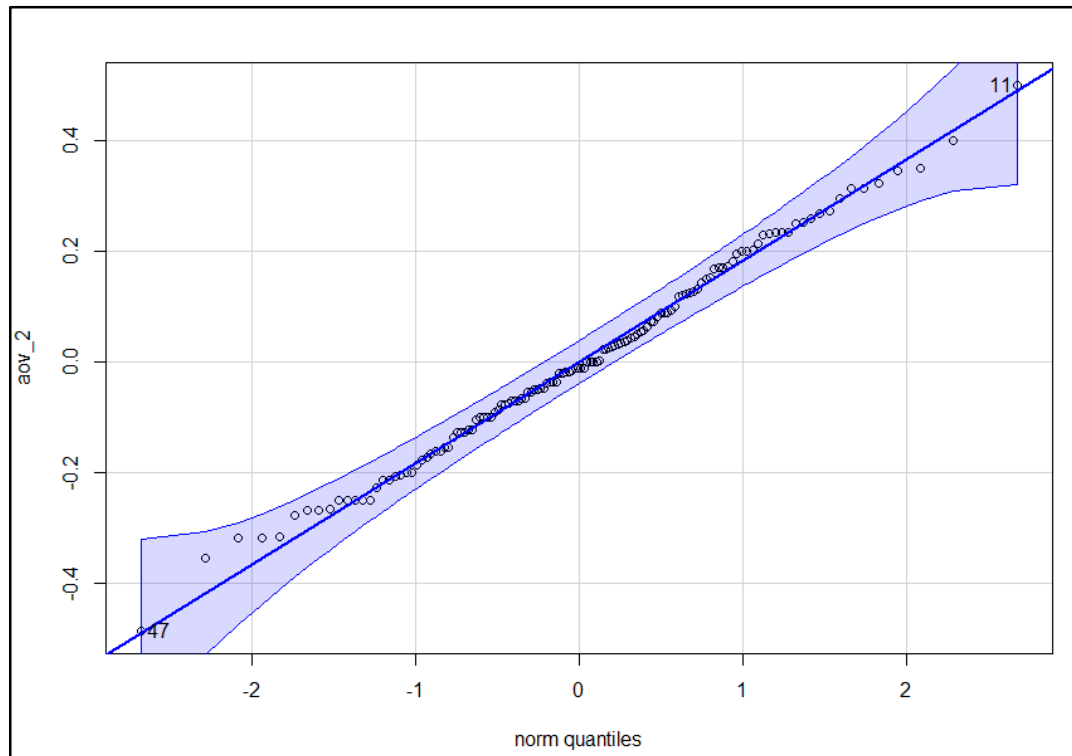


Gráfica 9. Distribución del efecto de los distintos aislados de FOX sobre los porcentajes de severidad de la enfermedad en variedades híbridas de clavel, donde la organización de los aislados es (A) 2011, (B) 2019, (C) 2021, (D) Unal y (E) Uchuva; sobre los valores de severidad de la infección causada en el clavel.



Gráfica 10. Relación de los porcentajes de severidad en interacción planta-patógeno entre las variedades susceptibles 6515 y SH2, y resistentes 395 y F1B2 con relación a cada uno de los aislados de FOX (A) 2011, (B) 2019, (C) 2021, (D) Unal y (E) Uchuva.

Se pueden observar las diferencias en los porcentajes de severidad entre variedades resistentes y susceptibles; así como se puede destacar que los aislados que ocasionaron mayores porcentajes de severidad fueron 2019 y Uchuva para ambas variedades, mientras que los aislados que ocasionaron menos porcentajes de severidad fueron 2021 en las variedades resistentes y Unal en las variedades susceptibles.



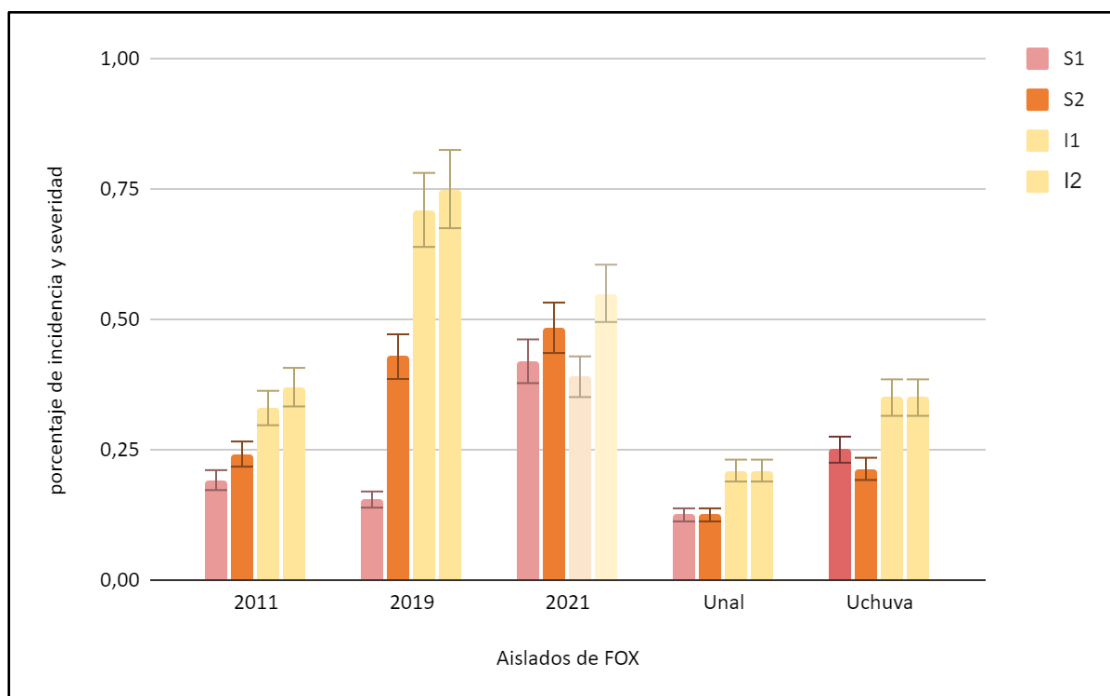
Gráfica 11. Distribución de los datos y muestra de la normalidad en los cuantiles. Aquí se observa cómo la distribución de los datos es homogénea, donde los puntos representan el coeficiente de correlación, mientras la zona coloreada representa el intervalo de confianza de 95% y la línea azul el valor de cero (Gráfica 11).

1.13.4. Ensayos de patogenicidad, sintomatología de marchitez vascular y seguimiento de los síntomas *ex vitro*.

Los ensayos de patogenicidad *ex vitro* se realizaron en plantas híbridas de clavel previamente catalogadas como resistentes. Este ensayo fue realizado en condiciones de invernadero en un transcurso de 12 semanas; fue a partir de la tercera semana que se presentaron síntomas asociados a la marchitez vascular ocasionada por *Fusarium oxysporum*. Se observaron síntomas de clorosis, pérdida de turgencia, posteriormente marchitez vascular y en algunas plantas la muerte (Fig. 14).



Figura 14. Plantas de variedades híbridas de clavel previamente catalogadas con caracteres de resistencia a *Fusarium oxysporum*. Luego de varios años sin síntomas aparentes de la enfermedad, algunas de las plantas empiezan a mostrar síntomas de marchitez vascular en el invernadero.



Gráfica 12. Porcentaje de severidad (S1 y S2) e incidencia (I1 e I2) de *F. oxysporum* sobre *Dianthus caryophyllus* para la evaluación de plantas resistentes por medio de la prueba de patogenicidad en invernadero en dos tiempos de medición.

Se observan (Gráfica 12) cambios en la incidencia y severidad de los distintos aislados sobre las variedades híbridas de clavel catalogadas como resistentes por el grupo de Fitopatología Molecular de la Universidad Militar Nueva Granada. El mayor porcentaje de incidencia para este ensayo fue reportado para el efecto del aislado 2019 por encima del 70%, seguido del aislado 2021, que reportó valores de incidencia superiores al 50% en el tiempo S2, es decir, a los dos meses de observación; en tanto que el aislado Unal fue el que tuvo menor valor de incidencia, con un porcentaje inferior al 25%.

Por otro lado, los valores de severidad reportados para las variedades híbridas de varias líneas clonales fueron mayores para el aislado 2021 inicialmente, con un porcentaje superior a 45%, seguido de Uchuva con un porcentaje de 25%, pero que posteriormente, en el transcurso de la infección, dicho porcentaje cambió para el segundo tiempo de medición. En 2021 se mantuvo en 48% y en 2019 incrementó a 43%, mientras que el aislado Unal tuvo el valor más bajo reportado en 13%. Cabe destacar que, para el aislado Uchuva, el valor de severidad disminuyó un 4% en el segundo tiempo de medición.

1.13.5. Incidencia y severidad para el ensayo *ex vitro* y la respuesta de las variedades resistentes y susceptibles de clavel a la presencia de FOX.

Tabla 12. Porcentaje de incidencia (%I) y severidad (%S) de los ensayos *ex vitro* de cada aislado de frente a una variedad resistente de clavel en el ensayo en invernadero, donde t1, un mes después de la infección, y t2, dos meses después de la infección, representan los tiempos de medición respectivamente.

Aislado de FOX	% Severidad		% Incidencia	
	t1	t2	t1	t2
2011	19	24	33	37
2019	15	43	71	75
2021	42	48	39	55
Unal	13	13	21	21
Uchuva	25	21	35	35

Tabla 13. Descripción del carácter de resistencia de los aislados de *Fusarium oxysporum* de acuerdo al porcentaje de severidad alcanzada sobre las variedades híbridas de clavel evaluadas en invernadero, donde los porcentajes se organizan; 0-20% Resistente, 20-40% Resistencia moderada y $\geq 50\%$ Susceptible (Tabla 13)

Aislado FOX	Carácter de la Variedad Híbrida de clavel
2011	MR
2019	S
2021	S
Unal	MR
Uchuva	MR

Con base en los porcentajes de severidad obtenidos, se indicó un carácter de resistencia de las variedades híbridas de varias líneas clonales evaluadas previamente como resistentes, frente a la respuesta dada frente al proceso de infección ocasionado por FOX. En ese sentido, un porcentaje de severidad de 20 a 40% se considera un carácter medianamente resistente, y valores superiores al 40% indican susceptibilidad. Según lo anterior, el porcentaje indicado para los aislados 2011, Unal y Uchuva se encuentran en el rango de carácter medianamente resistente, mientras que los aislados 2019 y 2021 indican un porcentaje superior, por tanto, frente a ellos las variedades se describen como susceptibles.

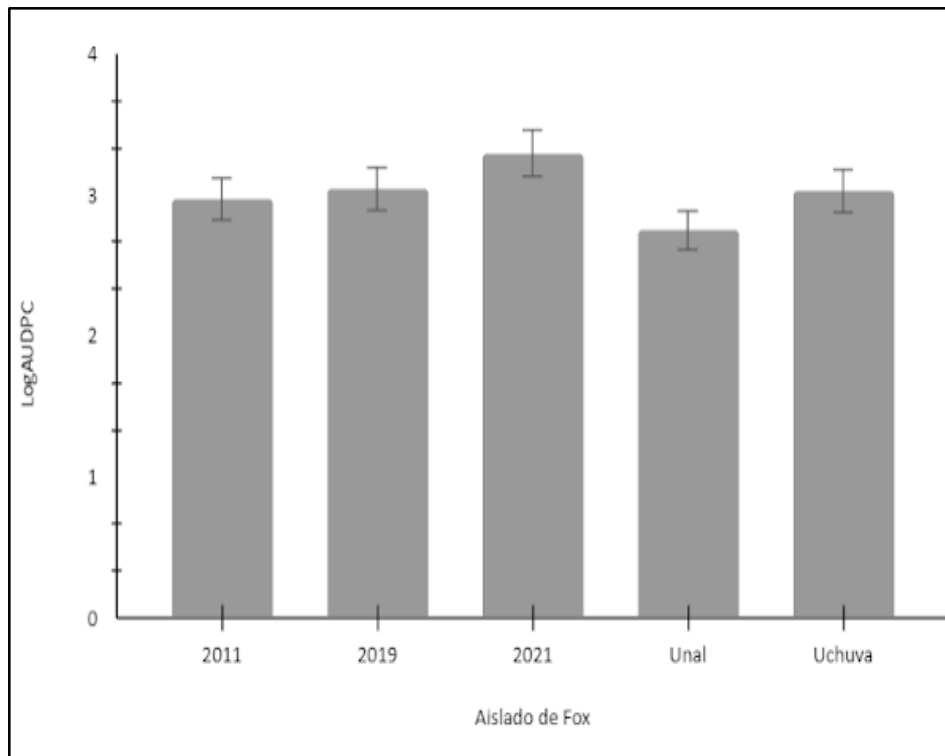
1.13.5.1. Análisis estadístico de los valores de Incidencia y Severidad para el ensayo ex vitro

Se pueden observar diferencias en los valores de severidad de los aislados sobre las variedades de varias líneas clonales (Tabla 14). Con normalidad en los datos en la prueba de Levene ($Pr(>F) = 0.2868$) indicando que hay normalidad en los datos. Con las estimaciones de los valores de Anova ($Pr(>F) = 0.0302$) se estima que existen diferencias significativas en los porcentajes de severidad ocasionados por distintos aislados de *Fusarium oxysporum* (2011, 2019, 2021, unal y Uchuva).

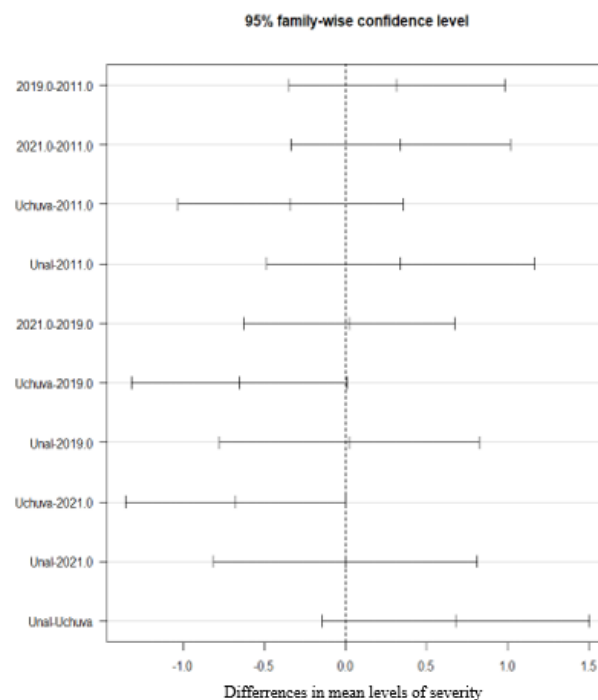
Tabla 14. Valores de Anova para la respuesta de resistencia del clavel a los Aislados de Fox, Pruebas de normalidad de Levene y de Bartlett.

Anova	
Variable: Aislados de Fox	$Pr(>F) = 0.0302$
Pruebas de Normalidad	
Prueba de Levene para homogeneidad de las varianzas	$Pr(>F) = 0.2868$
Prueba de Bartlett para normalidad de las varianzas	P value = 0.4354

Se pueden observar diferencias en el progreso de la enfermedad para los distintos aislados, con normalidad en los datos en la prueba de Shapiro-Wilks (P value = 0.3507), indicando que hay normalidad en los datos. Con las estimaciones de los valores del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (Gráfica 13), se observan diferencias entre 2019 y 2021, comparados con el aislado, que tuvo menor progreso, siendo Unal, mientras que el progreso de la enfermedad entre los aislados 2011, 2019 y Uchuva tienen medias similares.



Gráfica 13. Valores de log AUDPC a los 60 DPI para los cinco aislados de *Fusarium oxysporum* evaluados en ensayos *ex vitro*, se evidencian diferencias en los valores de AUDPC, donde aislado con mayor valor de AUDPC fue 2021, mientras que Unal fue el aislado con el valor más bajo.



Gráfica 14. Diferencias en el porcentaje de severidad de distintos aislados de *F. oxysporum* sobre *Dianthus caryophyllus* para la evaluación de plantas resistentes por medio de la prueba de patogenicidad en invernadero.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las variedades híbridas evaluadas y previamente catalogadas como resistentes presentaron rasgos de susceptibilidad frente a los aislados 2019 y 2021, mientras que para los aislados 2011, Unal y Uchuva presentan un rasgo de resistencia parcial. Siendo 2021 y 2019 los aislados con el mayor porcentaje de severidad acercándose a un 50%. Para el caso de 2019 se evidenció en el tiempo mayor severidad con respecto al progreso de la enfermedad ocasionado por 2021.

Por otro lado, para los aislados, Unal y uchuva (Tabla 13), se observó que no hubo progreso de la enfermedad en el tiempo, es decir, frente al proceso de infección de estos aislados hubo una respuesta eficiente de las plantas asociada al rasgo de resistencia previamente descrito para estas variedades. Esto es de utilidad tanto en términos de investigación, como en la práctica, la oportunidad de obtener nuevas líneas de clavel con rasgos de resistencia asociados a la respuesta frente a aislados menos agresivos, y a su vez frente a aislados agresivos, donde la respuesta de las plantas al patógeno pueda ser eficiente en la prevención del progreso de la enfermedad.

1.13.6. Caracterización molecular

1.13.6.1. Extracción de ADN Fúngico

Como resultado de la extracción de ADN de los aislados de cultivos monospóricos de *Fusarium oxysporum* evaluados y utilizados para las pruebas de patogenicidad, se observan (Fig. 18) las bandas de ADN obtenidas a partir del método de Cenís (1992) modificado por Rincón (2010).

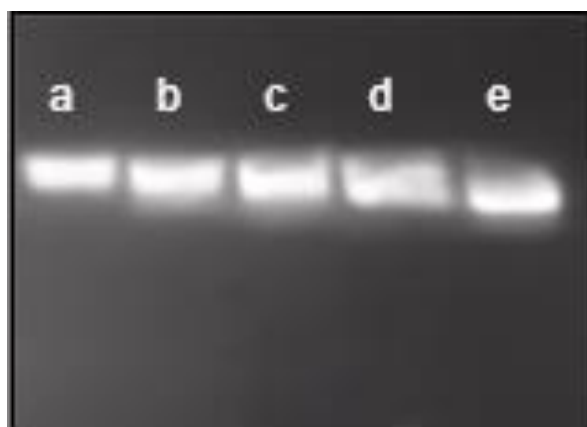


Figura 18. Electroforesis en gel Agarosa al 1%, bandas producto de la extracción de ADN de distintos aislados de *Fusarium oxysporum*; (a) 2011, (b) 2019, (c) 2021, (d) Unal y (e) Uchuva.

Se obtuvo la concentración de las muestras de ADN (Tabla 11) para cada uno de los aislados de FOX. De acuerdo a Rincón (2010), el cambio en las concentraciones de ADN se puede atribuir a la cantidad de micelio empleado en la extracción o a la pérdida del mismo durante el proceso de macerado. Aun así, las concentraciones obtenidas fueron buenas para poder hacer la posterior amplificación por PCR de genes ortólogos y genes SIX.

Tabla 15. Valores cuantitativos de concentración de ADN para distintos aislados de *Fusarium oxysporum* (1) 2011, (2) 2019, (3) 2021, (4) Unal y (5) Uchuva. Utilizando el Kit Qubit™ dsDNA HS con el método de fluorómetro.

Aislado de FOX	Concentración ng/μL
2011	155
2019	115
2021	152
Unal	226
Uchuva	243

1.13.6.2. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa para genes ortólogos y genes SIX.

Se obtuvieron resultados positivos en la amplificación de los genes ITS con los tamaños esperados para las regiones de ADN. Por consiguiente, los aislados previamente identificados morfológicamente como parte del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* también se identificaron por amplificación de regiones de DNA, propias del género *Fusarium* (Abd-El salam et al., 2003, como se citó en Buraglia, 1999). Los productos de amplificación de los cinco aislados, con las regiones genicas evaluados de ITS, H4 y los genes SIX, fueron purificados y enviados a secuenciar a Macrogen Corea; las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando la herramienta Blast en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Anexo 1).

1.13.6.3. PCR con los primers H4a/H4b, ITS1/ITS2/ITS4

Con la pareja de primers se obtuvo para los cinco aislados productos de amplificación de la histona 4 con peso molecular esperado de 300, pares de bases aproximadamente y de buena calidad con bandas definidas y de buena concentración. La amplificación de histona en *Fusarium oxysporum* se realiza porque son secuencias con un alto grado de conservación útiles para la identificación molecular de hongos (Henao-Henao et al., 2018; Ujat et al., 2021). De las secuencias obtenidas se realizó BLAST en la base de datos de GenBank en NCBI, obteniendo porcentaje de identidad de 99.05% con secuencias de *Fusarium oxysporum* (CP052045.1).

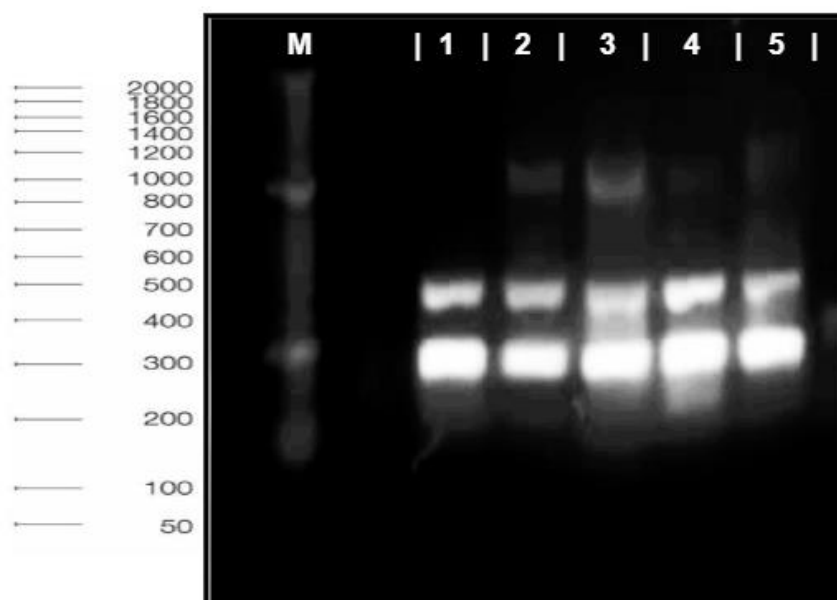


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de PCR de los primers H4a y H4b. (1) Marcador de peso molecular Hyperlader II® (2) Amplificación de histona 4 - 2011; (3) Amplificación de histona 4 - 2019; (4) Amplificación de histona 4 - 2021; (5) Amplificación de histona 4 - Unal; (6) Amplificación de histona 4 - Uchuva (Figura 19)

Para cada uno de los 5 aislamientos, se obtuvo producto de Amplificación por PCR para ITS1-2 de 250 pares de bases aproximadamente (Landlinger *et al.*, 2009 y Rupesh *et al.*, 2013), mientras que para los productos de amplificación de ITS1-4 fue de 500 pares de bases aproximadamente (Kim *et al.*, 2017). Al momento de realizar blast con las secuencias obtenidas, para este par de genes se obtuvo un porcentaje de identidad de 100% con regiones ITS en secuencias de *Fusarium oxysporum* (OQ923670.1).x

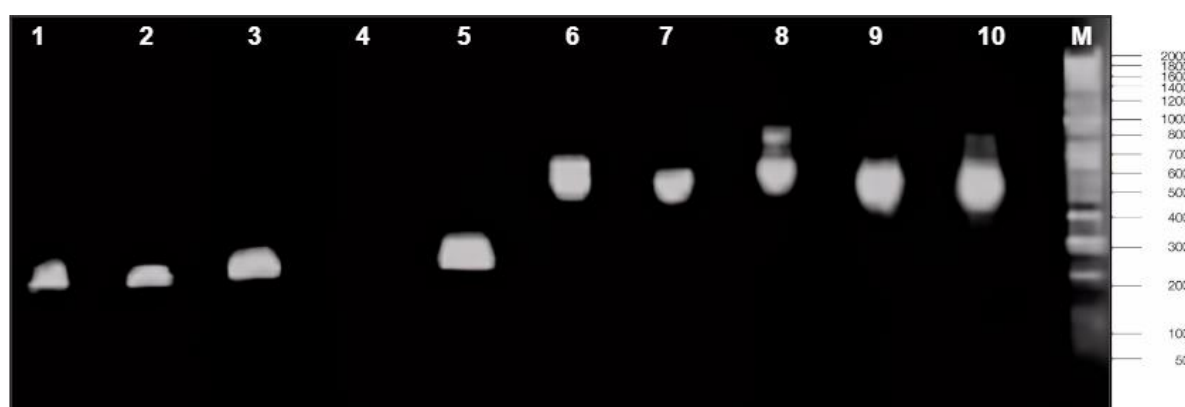


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de PCR de los primers ITS1-2 e ITS1-4. (1) Amplificación de ITS1-2 - 2011; (3) Amplificación de ITS1-2 - 2019; (4) Amplificación de ITS1-2 - Uchuva (5) Amplificación de ITS1-4 - 2011; (6) Amplificación 9 de ITS1-4 - 2019; (7) Amplificación de ITS1-4 - 2021; (8) Amplificación de ITS1-4 - Unal y (9) Amplificación de ITS1-4 - Uchuva. Citar en el texto

1.13.6.4. PCR con los primers SIX

En la amplificación de los genes SIX hubo diferencias en la presencia de algunos de los genes para algunos aislados con bandas de tamaño esperado (Fig. 20). De las secuencias obtenidas se realizó BLAST en la base de datos de GenBank en NCBI, obteniendo porcentajes de identidad de la siguiente forma: SIX1 amplificó para los aislados 2019 y Uchuva (Fig. 21-2, 23-5) con un porcentaje de identidad en GenBank de 100 %, con secuencias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (MW160896.1); SIX2 no tuvo amplificación para ningún aislado; SIX3 solo hubo amplificación en 2021, SIX4 no amplificó para ninguno de los aislados.



Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de PCR de los primers SIX. (1) SIX1 - 2011; (2) SIX1 - 2019; (3) SIX1 - 2021 (4) SIX1 - Unal; (5) SIX1 - Uchuva; (6) SIX2 - 2011; (7) SIX2 - 2019; (8) SIX2 - 2021; (9) SIX2 - Unal; (10) SIX2 - Uchuva; (11) SIX 3 - 2011; (12) SIX3 - 2019; (13) SIX3 - 2021; (14) SIX3 - Unal; (15) SIX3 - Uchuva; (16) SIX4 - 2011; (17) SIX4 - 2019; (18) SIX4 - 2021; (19) SIX4 - Unal; (20) SIX4 - Uchuva y (21) SIX5 - 2011 (Figura 21)xto la figura

En el caso de SIX5, amplificó para 2011 y 2019 con la realización de Blast en GenBank del NCBI se obtuvo un porcentaje de identidad de 90.28% del gen SIX5 reportado para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (MN745209.1). SIX6 amplificó únicamente para los aislados Unal y Uchuva; al realizar Blast en GenBank se obtuvo un porcentaje de identidad de 90.81%, para una secuencia del gen SIX6 correspondiente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (HM467128.1), y, por último, para SIX7 hubo amplificación para todos los aislados excepto para 2011, al realizar el Blast, se obtuvo un porcentaje de identidad de 99.38% en secuencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (MK906619.1).

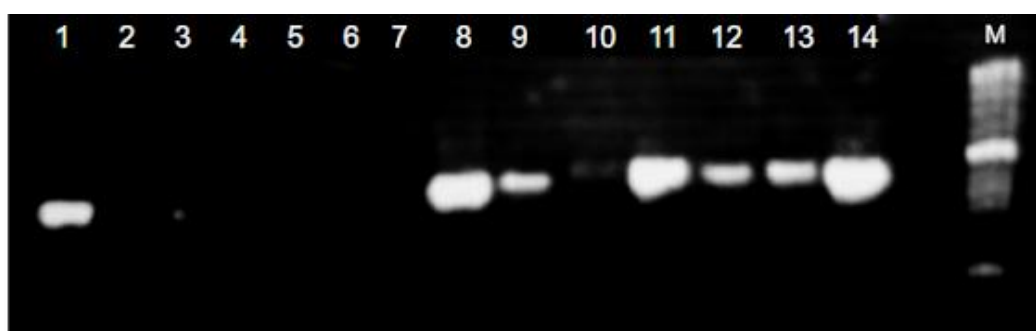


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación de PCR de los primers SIX. (1) SIX5 - 2019; (2) SIX5 - 2021; (3) SIX5 - Unal (4) SIX5 - Uchuva; (5) SIX6 - 2011; (6) SIX6 - 2019; (7) SIX6 - 2021; (8) SIX6 - Unal; (9) SIX6 - Uchuva; (10) SIX 7 - 2011; (11) SIX7 - 2019; (12) SIX7 - 2021; (13) SIX7 - Unal y (14) SIX7 - Uchuva.

1.14. DISCUSIÓN

1.14.1. Evaluación de síntomas en las variedades resistentes y susceptibles de clavel frente a la infección ocasionada por los cinco aislados de FOX *in vitro*

El principal objetivo de este trabajo fue determinar variaciones en la infección ocasionada por distintos aislados de FOX sobre distintas variedades de clavel híbrido. Se evidenciaron diferencias significativas entre el efecto patogénico de los distintos aislados, y a su vez diferencias en la respuesta de las variedades susceptibles y resistentes de clavel.

La selección de las micro plantas se hizo considerando rasgos de turgencia, grosor y coloración, sin embargo, hay que tener en cuenta que hay rasgos varietales propios de cada una de las distintas variedades de clavel seleccionadas. Por tanto, la propagación de micro-plantas de clavel se llevó a cabo a partir del corte y siembra de meristemos primarios o apicales de la misma línea clonal, manteniendo con ello las características morfogénicas de la misma línea clonal determinadas por el origen, la posición y la estructura del meristemo; teniendo en cuenta el fotoperiodo, la luz y la temperatura, ya que cambios en estos factores físicos alteran la morfogénesis de las plantas (Suárez, 2020 y Mroginski *et al.*, 2010).

Por lo anterior, es importante considerar los rasgos de turgencia, grosor del tallo y coloración de las plantas al momento de hacer la evaluación o seguimiento de los síntomas; rasgos como en la variedad susceptible 6515 que tienen un tallo delgado y una coloración verde más clara (Tabla 4a); la variedad susceptible SH2 tiene hojas más anchas y nudos más cortos en comparación a las demás (Tabla 5b), la variedad resistente 395 que tiene una coloración verde más clara en el tallo y las hojas más oscuras (Tabla 5c), o la variedad F1B2, que tiene un tallo grueso y color verde oscuro característico de la variedad (Tabla 4d).

1.14.2. Diferencias en la respuesta de resistencia a la infección ocasionada por distintos aislados de FOX en variedades resistentes y susceptibles de clavel

Los resultados de severidad obtenidos para las interacciones entre las distintas variedades de clavel versus los distintos aislados del hongo al ser sometidos estadísticamente presentaron normalidad (Gráfica 11) y homogeneidad de varianzas, es decir, sí cumplieron los supuestos estadísticos, por ello, aparte de las pruebas de normalidad de Levene y Shapiro Wilks, se evaluó el tamaño del efecto para las variables mencionadas anteriormente (Gráfica 9), donde el objetivo principal fue probar la existencia de diferencias significativas entre ensayos de patogenicidad con respecto a estas variables.

La prueba tuvo una significancia inferior a 0,05 para cada una de las variables (Tabla 11), lo cual indicó la existencia de diferencias significativas en el efecto de estas variables con respecto a los tratamientos, es decir, las diferentes variedades de clavel presentan diferencias en los porcentajes de severidad, así como también se aprecian diferencias en los porcentajes de severidad ocasionados por los diferentes aislados de FOX.

En la Gráfica 7 se muestran los porcentajes de severidad de la infección de los distintos aislados sobre las variedades de clavel, las susceptibles (SH2 y 6515) tuvieron valores de 50% para arriba y la variedad resistente 395 tuvo valores por debajo de 31% presentando diferencias con F1B2 que tuvo valores entre 25 y 45%. En la Tabla. 9 se muestran los porcentajes de incidencia y severidad de los distintos aislados que fueron más agresivos en cada variedad, indican que las variedades susceptibles (SH2 y 6515) mantienen el carácter de susceptibles frente a todos los aislados; siendo Uchuva el que mayor porcentaje de severidad ocasiona, mientras que Unal es el que ocasiona menor porcentaje. Para los casos de las variedades resistentes, en 395 el aislado que ocasionó mayor severidad fue 2019, mientras que 2021 y Uchuva fueron los que ocasionaron menor porcentaje de severidad.

Estos cambios en la resistencia del clavel a la infección ocasionada por FOX han sido previamente relacionados a la producción de fitoalexinas. Estas producen especies reactivas de oxígeno, cambian sus concentraciones de calcio, activan las cascadas de señalización de MAPKs, cierran sus estomas y ocurre la transcripción de genes asociados a la resistencia de la planta (Yu *et al.*, 2012 y Pritchard, 2014). En el momento que se reduce la producción de fitoalexinas, la respuesta de resistencia en la planta es transgredida por la agresividad de FOX; mientras que al producirse en gran cantidad puede contrarrestar el efecto de FOX y reducir los síntomas (Romero, 2020 y Parthasarathu *et al.*, 2021). Con ello, se observan diferencias entre variedades susceptibles y resistentes, pues en ambas ocurre la infección, pero la resistente la contrarresta de tal forma que no presenta el mismo progreso en los síntomas como la susceptible.

Adicionalmente, las plantas resistentes tienen una mayor concentración de compuestos antifúngicos; ácidos fenólicos, como el ácido 4-hydroxybenzoico; presentan modificaciones en el xilema, previniendo el progreso de la colonización del patógeno, reduciendo el espacio disponible en los haces vasculares (Kasote *et al.*, 2020). En las variedades susceptibles la respuesta a la infección es más lenta, pues estos compuestos están en menores concentraciones y no ocurre un cambio vascular al inicio de la infección (Khan *et al.*, 2005).

Además, se han descrito mecanismos de defensa de la planta mediante inductores de resistencia o elicitores, que estimulan mecanismos de respuesta como la resistencia sistémica adquirida mediada por ácido salicílico y la respuesta sistémica inducida mediada por el ácido jasmónico y etileno (Perez *et al.*, 2021). Se ha demostrado en ensayos de patogenicidad con *Fusarium oxysporum* que hay cambios en la concentración de jasmonatos; estos se acumulan en las variedades resistentes, pues incrementan la actividad de enzimas de defensa, disminuyen

el efecto de especies reactivas de oxígeno y promueven la acumulación de fitoalexinas. Igualmente, se ha reportado que altas concentraciones de melanina están asociadas con una respuesta de resistencia frente a la infección de FOX (Kasote et al., 2020). Esa concentración de melanina, puede ser un indicativo de la respuesta de resistencia presentada principalmente por 395 (R), seguida por F1B2, ante la infección de los distintos aislados de FOX (Figura 3 y Tablas 4 a 8).

1.14.3. Variaciones en la patogenicidad de aislados de FOX sobre variedades resistentes y susceptibles de clavel

A pesar de los múltiples mecanismos de defensa en las plantas para evitar o prevenir la enfermedad, FOX ha desarrollado estrategias para que sus efectores de forma específica, superen la respuesta inicial de inmunidad dirigida por PAMP, facilitando la infección y colonización (Coupto, 2016 y Gust, 2017). Esto, a través de un proceso denominado Susceptibilidad dirigida por efectores, por la secreción de factores de virulencia; algunos secretados por el haustorio, trascolocado a la célula del huésped, donde inhibe la ubiquitina ligasa y suprime la muerte programada de la planta en un estadio temprano de la infección (Vleeshouwers, 2014 y Lo Presti *et al.*, 2015).

Debido a las diferencias en la respuesta de las plantas ante la infección, FOX tiene una colonización limitada y lenta en cultivares resistentes, mientras que los cultivares susceptibles pueden ser colonizados de forma rápida y agresiva (Joshi, 2018 & Xu *et al.*, 2021). En los ensayos de patogenicidad realizados se observan las dos variedades de plantas susceptibles (6515 y SH2) que en casos como en el ensayo con los aislados 2011, 2019, 2021 y Uchuva (Gráfica 1, 2, 3 y 5) tienen una mayor cantidad de plantas con síntomas avanzados de la enfermedad, mientras que con el aislado Unal (Gráfica 4), los porcentajes de plantas muertas se reducen.

Lo anterior comparado con el progreso del crecimiento de FOX en cada variedad muestra un comportamiento conforme a la severidad ocasionada; en el ensayo con 6515 (S) todos los aislados a excepción de FOX - 2021, tuvieron crecimiento por encima de los $\frac{3}{4}$ de la planta (Fig. 8a - d). FOX - Unal tuvo menor impacto en términos de severidad, y un halo de crecimiento mucho menor a los que ocasionaron mayor severidad, además de micelio blanco no pigmentado, en 6515 y SH2. Mientras FOX - 2021 tuvo un crecimiento de $\frac{2}{4}$ en la planta y un halo de crecimiento mayor comparado con Unal en las dos variedades susceptibles y si presentó pigmento en micelio, Allí la respuesta de inmunidad de las variedades susceptibles es frustrada por la agresividad de FOX (Li *et al.*, 2013)

En las variedades susceptibles se puede explicar que hay una clara respuesta de las plantas a la infección con la presencia de síntomas al intentar prevenir la enfermedad, aun así, los porcentajes de severidad ocasionados por los distintos aislados superando el 50% indicaron que las dos variedades no pudieron contener la infección. En los casos de los ensayos con 2021

y Uchuva con los cuales hubo valores de severidad superiores al 70%, se puede decir que estos aislados fueron más agresivos que los demás frente a las dos variedades susceptibles (6515 y SH2), pues se puede decir que la capacidad de FOX - 2021 y FOX - Uchuva al suprimir la respuesta inmune de la planta, condujo a la respuesta hipersensible en estas variedades, aumentando la apoptosis celular y por ende eso explica que en estos dos ensayos, haya mayor porcentaje de plantas con marchitez y muerte (Vanegas, 2019)

Por otro lado, las plantas de carácter resistente, tienen diferencias entre sí; pues 395 con mayor porcentaje de plantas asintomáticas y menor severidad en comparación con F1B2 (R). Los aislados 2011 y 2019 tuvieron crecimiento por encima de $\frac{3}{4}$ de la planta y 2011 tuvo mayor pigmentación en el micelio que 2019; estos dos aislados ocasionaron mayor porcentaje de severidad en 395 (R) frente a los demás aislados. F1B2 (R) tiene más plantas sintomáticas con los ensayos de los aislados 2011, 2019, Unal y Uchuva (Gráfica 1, 2, 4 y 5), siendo 2021 el ensayo con el cual presenta menos plantas sintomáticas y menor severidad (Gráfica 3). El crecimiento de los aislados en este caso fue mayor a $\frac{3}{4}$ en 2011, Unal y Uchuva, mientras que en los aislados 2019 y 2021 fue hacia $\frac{2}{4}$ de la planta. Aquí se resalta que el aislado 2019 tuvo la pigmentación rojiza más marcada que en los demás ensayos.

FOX ha presentado colores característicos en el micelio desde violeta a rojizos, sin embargo, esa coloración puede variar a coloración entre blanca y amarillo pálido, dependiendo de la edad, o también se puede asociar a otros factores (Vásquez, 2021). De acuerdo a Chen y colaboradores (2006), la producción de síntomas en plantas infectadas no se origina exclusivamente por la presencia de inóculo, también es mediada por la presencia de tricotecenos como el deoxynivalenol (DON), la cual tiene un efecto importante en el aumento de la severidad en el hospedero (Maier et al., 2006). Con esto, se entiende que, durante la infección, puede haber producción de micotoxinas como los tricotecenos que son dispersadas en la planta aunque el micelio no se haya propagado aún hacia el área donde se presentan los síntomas.

Mientras que, en las variedades susceptibles, la respuesta hipersensible en aislados más agresivos puede conllevar a la muerte; en las variedades resistentes 395 y F1B2, estos mismos aislados tuvieron menor efecto en la severidad de variedades resistentes y fueron otros aislados los que causaron mayor severidad. En 395 este presentó carácter de medianamente resistente frente a los aislados 2011 y 2019, y tuvo una respuesta eficiente a la enfermedad ocasionada por 2021, Unal y Uchuva, manteniendo su carácter de resistencia. Por otro lado, F1B2 cambió su carácter de resistente a medianamente resistente frente a todos los aislados, excepto con 2011, cuya infección no tuvo una respuesta eficiente y se mostró susceptible.

De acuerdo a las evaluaciones de patogenicidad con diferentes aislados, se ha descrito que de las formas especiales descritas en los últimos años, aproximadamente el 50% se asocian a una especie determinada, mientras otras formas especiales han demostrado tener incidencia sobre otras especies, ampliando su rango de especificidad en diferentes plantas por patogenicidad cruzada (Edel-Hermann, 2019).

Para *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi y *Fusarium oxysporum* f. sp. physali, se pudo determinar que las formas especiales asociadas a un hospedero específico tienen la capacidad de afectar a otros hospederos (Tabla. 9), e incluso pueden ser más agresivos sobre un nuevo hospedero, como en el caso de Foca, donde se han demostrado diferencias en la agresividad entre aislados (Araujo *et al.*, 2017); así puede suceder con *F. oxysporum* f. sp. physali comparado a la severidad que tiene el aislado específico para ese hospedero como es *F. oxysporum* f. sp. dianthi (Simbaqueba *et al.*, 2018).

Lo anterior se debe a que en muchos casos distintas formas especiales comparten y codifican grupos de proteínas necesarias para que la patogenicidad hospedero-específica de Fox (Branes *et al.*, 2022); así mismo, a partir de la transferencia horizontal de genes presentes en los cromosomas móviles ocurre el recambio de efectores, los cuales pueden conferir rasgos de virulencia a aislados descritos previamente como no patogénicos o también incidir en la agresividad de un aislado previamente descrito como virulento, bien sea para acrecentar su capacidad patogénica o disminuirla (Sajeena *et al.*, 2020).

1.14.4. Evaluación de síntomas en las variedades resistentes y susceptibles de clavel frente a la infección ocasionada por los cinco aislados de FOX *ex vitro*

El uso de cultivares resistentes es de gran importancia en mitigar la incidencia de la enfermedad en los cultivos, de allí la importancia de confirmar la resistencia de las plantas (Baez *et al.*, 2010). En el ensayo de patogenicidad de la variedad híbrida de carácter resistente frente a los distintos aislados se presentaron diferencias significativas en el efecto de los aislados y normalidad en los datos. Los aislados 2019 y 2021 causaron mayor severidad por encima del 40% y en estos ensayos se observó mayor progreso de la enfermedad en menos tiempo, siendo 2021 el aislado más agresivo en esta variedad. Esto indica que el carácter de esta variedad frente a estos aislados es susceptible; mientras que 2011, Unal y Uchuva causaron severidad con porcentajes por debajo del 24%. Es decir, fueron menos agresivos y en este caso, las plantas de esta variedad presentaron carácter de medianamente resistentes.

En el ensayo con el aislado Unal, este fue el menos agresivo, no hubo progreso en la enfermedad, es decir, esta variedad de clavel resistió la enfermedad y previno el progreso de los síntomas. De acuerdo a Forero *et al.*, (2015), las plantas tienen la capacidad de responder ante un proceso de infección o colonización, inicialmente de una forma química que da lugar a efectos fisiológicos tales como la formación de nuevos brotes basales, el incremento de hojas nuevas y la concentración de clorofila, promoviendo así la asimilación de nutrientes (Manghwar *et al.*, 2021). Se entiende que, ante el estrés, las plantas manejan diferentes estrategias para la regulación de los factores que las estresan, entre ellos la presencia de patógenos, que conlleva a la adquisición de una resistencia sistémica o inducción de resistencia, con la que incrementa la expresión de genes asociados a la respuesta inmune de la planta frente a distintos patógenos (Medina, 2011).

Frente a los aislados Unal y Uchuva, no hubo progreso de la infección, por el contrario, se contuvo y en el caso del ensayo con Uchuva, la severidad se redujo en el tiempo. Esto ocurre cuando la planta ha perdido su dominancia apical como respuesta a la colonización del patógeno. Lo anterior es un factor esencial para prevenir el progreso de la enfermedad, compensando los efectos de la infección que causa FOX (Sanzón *et al.*, 2012). Por otro lado, en algunos casos la planta recurre a la muerte celular previniendo el desarrollo del patógeno al necrosar el tejido tras presentar una respuesta de hipersensibilidad ocasionada por especies reactivas de oxígeno (Dinolfo *et al.*, 2017). Así como es el caso del ensayo 2021, que presentó síntomas de marchitez desde un estadio temprano de la infección, allí, esta variedad de clavel se presentó susceptible.

Existe una correlación inversa entre virulencia y agresividad; lo que se refiere a la capacidad de especializarse en infectar un tipo de cultivar, reduciendo, a su vez, la capacidad de infectar otros y, por tanto, limitando la supervivencia. En cambio, si hay un patógeno que tiene un amplio espectro de hospederos, incrementa su supervivencia, pero limita la posibilidad de infectar todos sus hospederos de forma exitosa (Burbano-Figueroa, 2020). Con esta premisa, se puede estimar que los valores de severidad obtenidos del aislado Uchuva son menores, ya que, al tener un espectro de hospedero más amplio, su capacidad de infectar puede verse reducida.

En ese sentido, se ha descrito también que hay distintas formas en las que un patógeno se puede relacionar con su hospedero. Puede haber una interacción específica entre variedades del hospedero y razas del patógeno, o bien puede ser que el patógeno varíe independientemente de las diferencias en las variedades del hospedero; en este caso se atribuye a esa interacción planta-patógeno un rasgo de resistencia horizontal y agresividad en el patógeno (Vanderplank, 2012). Por su parte, para el caso del aislado 2021, que tuvo el valor más elevado de severidad sobre las plantas, se puede asociar el efecto contrario al aislado Uchuva, pues el aislado 2021, en vez de tener un rango más amplio de hospederos, puede ser más agresivo con un solo tipo de cultivar.

1.14.5. Evaluación de los genes SIX en los cinco aislados de FOX.

Los genes SIX se consideran candidatos a genes de avirulencia por su contribución a la virulencia de *Fusarium oxysporum*; entre los más descritos están *avr1*, *avr2* y *avr3* (Taylor *et al.*, 2016). El reconocimiento de estos efectores por parte de la planta activa la ETI, segunda barrera de defensa de la planta contra el patógeno. En ese momento, la inmunidad de la planta, en caso de tener genes asociados a la resistencia, resulta en una interacción no compatible con el patógeno, previniendo el progreso de la infección (Huarhua *et al.*, 2020).

Con frecuencia se menciona la capacidad de los hongos de producir estructuras para infectar a su hospedero. En el caso de *Fusarium oxysporum*, una de las proteínas efectoras que secreta es SIX1 (Fig. 21: 2 y 5), la cual es codificada por el gen de avirulencia *avr3*, y es una

de las encargadas de determinar la virulencia de FOX, mientras que proteínas como SIX4, a partir del gen *avr1*, no son necesarias para la virulencia de FOX (Hernández *et al.*, 2021; Pothiraj *et al.*, 2023).

Fusarium oxysporum se caracteriza por tener una huella molecular impresa en sus mecanismos de infección y cambios que puede adquirir para evadir el reconocimiento de la planta a la infección; esto ocurre por medio de mutaciones frecuentes, constituyendo una de las características más importantes en la capacidad de infectar de *Fusarium oxysporum*, dentro de su complejo de especies (Boutrot, 2017). Con base en lo anterior, la presencia/ausencia de algunos genes asociados a la patogenicidad, como los SIX, puede interferir en la virulencia de los aislados, haciendo más eficaz la infección, o, por el contrario, cuando se expresan los genes en varios aislados, puede ser un indicativo de adaptabilidad al hospedero, lo que no siempre se requieren para la virulencia (Li *et al.*, 2020)

Los aislados pertenecientes a la misma forma especial de *Fusarium oxysporum* pueden presentar cambios en la expresión y presencia de estos genes SIX (Fig. 21 y 22). Hay algunos aislados que pueden presentar solo un gen SIX en común, mientras que habrá algunos que no lo tengan presente (Gamboa-Becerra *et al.*, 2021). De acuerdo con el estudio realizado por Taylor *et al.*, (2016), en *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* no se encontraron presentes los genes SIX 1, 2, 3, 4, 5 y 6; sin embargo, SIX7 sí se encontró. En contraste, en el estudio realizado por Lievens *et al.*, (2009), en los aislados de Fod no hubo expresión del gen SIX7. Esto explica la presencia de diferencias en la presencia de estos genes en diferentes aislados pertenecientes a la misma forma especial, como ocurre con SIX1, que fue evaluado y sólo se encontró en los aislados más agresivos (2019 y Uchuva).

Se conoce que la virulencia de estos patógenos está mediada por un grupo de genes que son reguladores de los mecanismos de infección por parte del patógeno, la disrupción de la respuesta de resistencia de la planta, y eventualmente la invasión y el progreso de FOX en la planta (Jangir *et al.*, 2021). Así, es importante es entender qué cambios sutiles en estos genes pueden afectar la virulencia del patógeno; estos cambios se relacionan a la presencia de la secuencia que contiene elementos transponibles en cromosomas móviles (Lievens *et al.*, 2008; Ponukumati *et al.*, 2019)

Así como se determinó en la amplificación de los genes SIX (Fig. 21), se ha logrado identificar que el efector de SIX1 es requerido y está directamente relacionado con la patogenicidad en *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* siendo necesario para la penetración de la raíz e infección del hospedero (Li *et al.*, 2016). Considerando el modo en que se relaciona su expresión con la infección, la ausencia de expresión de este gen (Fig. 21: 1, 3 y 4) en algunas formas especiales ha sido característica de aislados más virulentos o no patogénicos (Lievens *et al.*, 2008).

También se ha demostrado previamente la transferencia horizontal de algunos de estos genes SIX entre formas especiales de *Fusarium oxysporum*, entre ellas se ha reportado la

presencia de este gen para *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (Simbaqueba *et al.*, 2018). La transferencia horizontal entre linajes de aislados lejanos puede explicar el origen de nuevas líneas patogénicas de origen polifilético (Ma *et al.*, 2010)

Igualmente, en algunas formas especiales se han realizado evaluaciones de los genes SIX, con el fin de determinar diferencias en la agresividad de FOX con respecto a variedades susceptibles y resistentes. Se ha encontrado como el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon), que los genes SIX están asociados a la infección de variedades resistentes, y para SIX6 se describió como el responsable de ocasionar infección en cultivares resistentes (Hudson *et al.*, 2021).

De acuerdo a lo anterior, se podría establecer que la presencia de este gen puede influir en su agresividad sobre las variedades híbridas previamente catalogadas como resistentes. Sin embargo, los únicos aislados en donde se encontró la presencia de este gen (Figura 22: 8 y 9) fueron los que tuvieron menor porcentaje de severidad (Tabla 9), pero, adicionalmente, frente a estos dos aislados (Unal y Uchuva) las plantas no presentaron progreso de la enfermedad en el tiempo, sino una respuesta eficiente para ser consideradas como medianamente resistentes contra estos aislados (Tabla 10). Según Niu *et al.*, (2016), este rasgo de SIX6 ha descrito su función dentro del proceso de infección como un gen de avirulencia. Sin embargo, de acuerdo con lo observado para *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, los aislados en los cuales se encontró la presencia de este gen fueron los que ocasionaron menor severidad.

Por último, SIX7 fue el único gen que estuvo presente en cuatro de los aislados exceptuando 2011; su presencia ha sido ampliamente reportada en varias formas especiales incluyendo Fod, de modo que se ha señalado que no está relacionada con la virulencia, pues su ausencia en casos como Fol no ha indicado pérdida de virulencia (Li *et al.*, 2020). Su presencia en distintas formas del complejo FOX se da por transferencia horizontal de los cromosomas móviles 12 y 15 entre aislados y formas especiales; presenta diferencias en las copias provenientes de distintos cromosomas (Samsonova *et al.*, 2021).

Del mismo modo, se considera que, dependiendo del origen de SIX7, este puede tener una función útil en la capacidad del patógeno de colonizar al hospedero o no, es decir, puede haber aislados dentro del complejo de FOX que tengan presencia de SIX7, pero esta puede ser una copia no relacionada a la capacidad patogénica de FOX (Haapalainen *et al.*, 2023).

1.15. CONCLUSIONES

- Existen diferencias en la infección por marchitez vascular ocasionada por distintos aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en clavel, donde aislados previamente descritos como virulentos por el grupo de Fitopatología molecular, ya no ocasionan tanta severidad como aislados recientes tanto en ensayos *in vitro*, como en evaluaciones de patogenicidad con plantas catalogadas como resistentes en invernadero.

- Hay diferencias en la respuesta de resistencia *in vitro* entre variedades catalogadas como resistentes y susceptibles de clavel frente a la marchitez vascular ocasionada por *Fusarium oxysporum*, e incluso aislados obtenidos en los últimos años pueden romper la resistencia de variedades catalogadas como resistentes.
- Aislados de *Fusarium oxysporum* asociados al patosistema de la Uchuva (*Physalis peruviana*), pueden tener mayor severidad sobre plantas de clavel en comparación con los aislados propios de la forma especial *dianthi*. Por tanto, se entiende que estas formas especiales no son totalmente especie-específicas.
- Variedades de clavel mantenidas en invernadero descritas previamente con carácter de resistencia frente a Fox, mostraron ser susceptibles ante aislados obtenidos recientemente (2021), mientras que logran controlar la enfermedad ocasionada por aislados obtenidos hace más de una década y aislados de la forma especial *physali*, previniendo el progreso de la enfermedad ocasionada por estos últimos.
- Los aislados evaluados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* tienen diferencias en la presencia/ausencia de los genes “secreted in xylem” (SIX) comúnmente presentes en la forma descrita como específica para tomate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*; de los 7 genes SIX evaluados en este ensayo, no todos están presentes y no en todos los aislados.
- Los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (2019) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (Uchuva) que ocasionaron mayor severidad en las variedades resistentes *in vitro*, compartieron la presencia del gen SIX1 asociado a la virulencia. Por tanto, se podría sugerir que estos grupos considerados especie-específicos pueden ampliar su rango de hospedero al compartir genes asociados a la virulencia.

1.16. RECOMENDACIONES ser más concretos

- A futuro, con el fin de ampliar el reconocimiento de los SIX en FOX, hacer RFLP's para identificar polimorfismos entre las secuencias obtenidas en diferentes aislados, daría una visión más completa para identificar su participación en el proceso de infección de FOX
- Repetir los ensayos para confrontar los primeros resultados obtenidos con la presencia de los genes SIX
- Implementar una metodología cuantitativa para el progreso de la enfermedad en las plantas y poder comparar esos datos con el seguimiento de los síntomas podría ser una forma más precisa de darle seguimiento a la infección ocasionada por FOX.

1.17. BIBLIOGRAFÍA No revise, recomiendo que todo lo citado en el texto este aquí y todo lo que este aquí este citado en el texto al igual os anexos

1. Abd, K., Aly, I., Abdel, M., Abdel, M., Khalil, M., and Verreet, J. (2003). PCR identification of genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. African Journal of Biotechnology. 2(4): 82-85pp.

2. Afanador, A. M. (2005). Propagación *in vitro* a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L., (clavel). Pontificia Universidad Javeriana, 137p.
3. Aime, M. C., McTaggart, A. R., Mondo, S. J., and Duplessis, S. (2017). Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. *Advances in genetics*, 100, 267-307 pp.
4. Akbar, A., Hussain, S., Ullah, K., Fahim, M., & Ali, G. S. (2018). Detection, virulence and genetic diversity of *Fusarium* species infecting tomato in Northern Pakistan. *PloS one*, 13(9).
5. Al-Hatmi, A. M., Meis, J. F., and de Hoog, G. S. (2016). *Fusarium oxysporum*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS pathogens*, 12(4).
6. Alanis-Martínez, I., Medina-Mendoza, C., Marbán-Mendoza, N., y Valadez-Moctezuma, E. (2015). Técnicas moleculares clásicas para la diferenciación de formas especiales de *Fusarium oxysporum*. *Revista mexicana de micología*, 42, 1-7pp.
7. Alvarado, A. (2005). Identificación de cepas patógenas de *Fusarium* Link. Causantes de nueva patología en el cultivo de calas de colores bajo condiciones productivas de invernadero en Chile. Disertación Doctoral, Universidad Austral de Chile.
8. Álvarez, M. Á. M. (2016). Operaciones culturales, riego y fertilización. AGAC0108. IC Editorial. Sección 3.3. 3p.
9. Araújo, N. A. F., Pasqual, M., Pio, L. A. S., Alves, E., de Matos Moura, N., and Costa, S. D. S. (2017). Identification and aggressiveness of four isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Latundan banana in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 165(4), 257-264pp.
10. Askun, T. (Ed.). (2018). *Fusarium: plant diseases, pathogen diversity, genetic diversity, resistance and molecular markers*. BoD–Books on Demand.
11. Baayen, R. P., Schoffemeer, E. A. M., Toet, S., & Elgersma, D. M. (1997). Fungal polygalacturonase activity reflects susceptibility of carnation cultivars to fusarium wilt. *European Journal of Plant Pathology*, 103(1), 15-23pp.
12. Baayen, R. P. (2000). Diagnosis and detection of host-specific forms of *Fusarium oxysporum*. *EPPO Bulletin*, 30(3-4), 489-491 pp.
13. Báez-Valdez, E. P., Carrillo-Fasio, J. A., Báez-Sañudo, M. A., García-Estrada, R. S., Valdez-Torres, J. B., and Contreras-Martínez, R. (2010). Resistant rootstocks utilization for *Fusarium* control (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Snyder & Hansen race 3) in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under shade conditions. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 111-123 pp.
14. Batson, A. M., Fokkens, L., Rep, M., and du Toit, L. J. (2021). Putative effector genes distinguish two pathogenicity groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(2), 141-156 pp.
15. Batlle Viera, A., y Pérez Vicente, L. (2009). Variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* en bananos y plátanos de Cuba. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Fitosanidad, 13(3), 169-186 pp.
16. Bawa, I. (2016). Management strategies of *Fusarium* wilt disease of tomato incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(Sacc.) A Review. *Int. J. Adv. Acad. Res*, 2(5).
17. Becerra, V., y Paredes, C. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en

- estudios de diversidad genética. Agricultura técnica, 60(3), 270-281 pp.
18. Bharti, P., Jyoti, P., Kapoor, P., Sharma, V., Shanmugam, V., & Yadav, S. K. (2017). Host-Induced Silencing of Pathogenicity Genes Enhances Resistance to *Fusarium oxysporum* Wilt in Tomato. *Molecular Biotechnology*, 59(8), 343–352pp.
 19. Bhat, M. N., Mesta, R., Yenjerappa, S. T., Tatagar, M. H., Sardana, H. R., Singh, D., ... and Ahmad, M. (2016). Biological control of *Fusarium oxysporum* wilt of chillies using *Trichoderma* spp. *The Horticultural Society of India (Regd.)*, 73(1), 74-77pp.
 20. Ben Yephet, Y., Reuven, M., and Shtienberg, D. (1997). Complete resistance by carnation cultivars to *Fusarium* wilt induced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* race 2. *Plant disease*. 81(7): p 777-780.
 21. Bertazzoni, S., Williams, A. H., Jones, D. A., Syme, R. A., Tan, K. C., and Hane, J. K. (2018). Accessories make the outfit: Accessory chromosomes and other dispensable DNA regions in plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(8), 779-788pp.
 22. Betancourt-Resendes, I., Gonzaga Espíritu, J. F., Fernández Pavía, S. P., y Rodríguez Alvarado, G. (2010). Compatibilidad vegetativa de aislamientos de *Fusarium sp.* obtenidos de árboles de mango (*Mangifera indica* L.) con malformación en Michoacán. *Biológicas*, 12, 135-142 pp.
 23. Boutrot, F, and Zipfel, C. (2017). Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 257–286pp.
 24. Brenes Guallar, M., Fokkens, L., Rep, M., Berke, L., and van Dam, P. (2022). *Fusarium oxysporum* Effector Clustering version 2 (FoEC2): an updated pipeline to infer host range. *bioRxiv*.
 25. Bravo, P. M. (2016). Gira de captura tecnológica en manejo técnico y de postcosecha de flores a Ecuador y Colombia. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 16p.
 26. Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Gómez-Lama Cabanás, C., and Mercado-Blanco, J. (2019). Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in microbiology*, 10, 616.
 27. Buitrago García, Y. M. (2018). Evaluación de Refuerzos en Fertilización y su Posible Efecto Sobre la Calidad de Clavel Estándar y Mini (*Dianthus caryophyllus* L.). Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cundinamarca.
 28. Buraglia Osorio, G. A. (1999). Estudio de *Fusarium oxysporum foetens* asociado a la pudrición basal en clavel (*dianthus caryophyllus l.*) variedad Nelson. Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
 29. Burbano-Figueroa, Ó. (2020). Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 245–255 pp.
 30. Cantoral Castro, M. (2017). Influencia de la fuente de nitrógeno en el desarrollo y patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Trabajo de Posgrado, Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana.

31. Carr, C., Sánchez, M., Alfaro, F., Villalta, R., Sandoval, J., y Guzmán, M. (2017). Marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá del banano y otras musáceas. Sección de Fitoprotección, Dirección de Investigaciones CORBANA. Hoja divulgativa n. 11-2017.
32. Ceballos Rojas, A. M. (2015). Evaluación de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* spp aislados de humanos, animales y plantas sobre tres especies vegetales. Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias. Universidad Pontificia Javeriana. 3-10 pp.
33. Canizares, M. C., Gómez-Lama, C., García-Pedrajas, M. D., and Pérez-Artes, E. (2015). Study of phylogenetic relationships among *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* isolates: Confirmation of intrarace diversity and development of a practical tool for simple population analyses. *Plant disease*, 99(6), 780-787pp.
34. Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic acids research*, 20(9), 2380p.
35. Chen, X., Steed, A., Harden, C., and Nicholson, P. (2006). Characterization of *Arabidopsis thaliana*–*Fusarium graminearum* interactions and identification of variation in resistance among ecotypes. *Molecular Plant Pathology*, 7(5), 391-403pp.
36. Collins, T. A. (2018). Identification, characterization, and genetic comparison of *Fusarium oxysporum* species isolated from switchgrass (*Panicum virgatum* L.). Master Thesis, Entomology and Plant Pathology. University Of Tennessee.
37. De Cal, A., Pascual, S., Larena, I., and Melgarejo, P. (1995). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant pathology*, 44(5), 909-917 pp.
38. De Granada, E. G., De Amézquita, M. C. O., Mendoza, G. R. B., y Zapata, H. A. V. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7-25pp.
39. Couto, D., & Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537–552pp.
40. De la Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., y Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin—Síntesis y función en la interacción *Fusarium oxysporum* verticillioides-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77-91 pp.
41. De Silva, R. L., and Wood, R. K. S. (1964). Infection of plants by *Corticium solani* and *C. praticola*—effect of plant exudates. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(1), 15-24pp.
42. DeIulio, G. A., Guo, L., Zhang, Y., Goldberg, J. M., Kistler, H. C., and Ma, L. J. (2018). Kinome expansion in the *Fusarium oxysporum* species complex driven by accessory chromosomes. *ASM Journals, mSphere*, 3(3), 231-18pp.
43. Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza Jr, M. T., and Kema, G. H. J. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology*, 59(2), 348-357pp.
44. Dubey, S. C., Singh, S. R., and Singh, B. (2010). Morphological and pathogenic variability of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cicer* is causing chickpea wilt. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 43(2), 174–190 pp.
45. Edel-Hermann, V., and Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109(4), 512-530pp.

46. Elliott, M. L. (2010). Marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum*. Revista Palmas, 31(especial), 366-375 pp.
47. Estrella, F. S. (2003). Persistencia y capacidad infectiva del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, f. Sp. Melonis en residuos vegetales de melón (Vol. 104). Universidad Almería.
48. Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., and García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta, 248(1), 1-18pp.
49. Estupiñán Rodríguez, H., y Ossa Canencio, J. A. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo.
50. Fan, P., Lai, C., Yang, J., Hong, S., Yang, Y., Wang, Q., ... and Ruan, Y. (2022). Crop rotation suppresses soil-borne *Fusarium* wilt of banana and alters microbial communities. Archives of Agronomy and Soil Science, 68(4), 447-459pp.
51. FAO (2018) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Databases FAOSTAT, FAOS, Recuperado abril 18, 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
52. Filgueira, J. 2007. Peligrosa especie del género *Fusarium oxysporum*. Revista Agricultura de las Américas. Colombia. Octubre 2007, Núm. 368. 28 – 33pp.
53. 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
54. Fletcher, J., Bender, C., Budowle, B., Cobb, W. T., Gold, S. E., Ishimaru, C. A., and Seem, R. C. (2006). Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(2), 450-471pp.
55. Flores-Pacheco, J. A. (2017). Chancro resinoso del pino (*Fusarium Circinatum*) Historia, evolución, dispersión y estrategias de manejo. Nexa Revista Científica, 30(01), 19-42pp.
56. Forero, R., Ortiz, E., de León, W., Gómez, J. C., y Hoyos-Carvajal, L. (2015). Analysis of resistance to *Fusarium oxysporum* in *Passiflora maliformis* L. plants. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 9(2), 197-208 pp.
57. Fourie, G., Steenkamp, E. T., Ploetz, R. C., Gordon, T. R., and Viljoen, A. (2011). Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis cubense within the *Fusarium oxysporum* complex. Infection, Genetics and Evolution, 11(3), 533-542pp.
58. Frąc, M., Gryta, A., Oszust, K., and Kotowicz, N. (2016). Fast and accurate microplate method (Biolog MT2) for detection of *Fusarium oxysporum* fungicides resistance/sensitivity. Frontiers in microbiology, 7, 489p.
59. Fulton, J. C., Brawner, J. T., Huguet-Tapia, J. C., Smith, K. E., Fernandez, R., and Dufault, N. S. (2022). Six De Novo Assemblies from Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. PhytoFrontiers™, 2(1), 3-9pp.
60. Gai, X. T., Xuan, Y. H., and Gao, Z. G. (2017). Diversity and pathogenicity of

- Fusarium oxysporum graminearum* species complex from maize stalk and ear rot strains in northeast China. Plant pathology, 66(8), 1267-1275 pp.
61. Gamboa-Becerra, R., López-Lima, D., Villain, L., Breitler, J. C., Carrión, G., and Desgarennes, D. (2021). Molecular and Environmental Triggering Factors of Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* Isolates Involved in the Coffee Corky-Root Disease. Journal of fungi (Basel, Switzerland), 7(4), 253p.
 62. Gardiner, D. M., Benfield, A. H., Stiller, J., Stephen, S., Aitken, K., Liu, C., and Kazan, K. (2018). A high-resolution genetic map of the cereal crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum* provides a near-complete genome assembly. Molecular plant pathology, 19(1), 217-226pp.
 63. Garibay, M. G., Ramírez, R. Q., y Canales, A. L. M. (Eds.). (1993). Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa.
 64. Ghatak, A., and Ansar, M. (Eds.). (2017). The Phytopathogen: Evolution and adaptation. CRC Press.
 65. Goncharov, A. A., Glebova, A. A., and Tiunov, A. V. (2019). Trophic interactions between *Fusarium* species and soil fauna: A meta-analysis of experimental studies. Applied Soil Ecology.
 66. González, I., Yailén, A., y Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*-tomate. Revista de Protección Vegetal, 27(1), 1-7pp.
 67. Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. Annual review of phytopathology, 55, 23-39.
 68. Guillen Mora, R. E., León Paredes, J. E., y Vera Suárez, M. J. (2017). 1.18. El hongo *Fusarium oxysporum* raza 4 como contenido didáctico. Estrategia para el impacto y prevención de su entrada en Ecuador.. Comité Editorial, 196.
 69. Gutierrez, A. D. L. H. (2004). Caracterización de genes de poligalacturonasas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* y su análisis en sistemas heterólogos (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid). 16-33 pp.
 70. Gust A. A., Pruitt R., Nürnberger T. (2017). Sensing danger: key to activating plant immunity. Trends Plant Sci. 22 779–791 pp.
 71. Haapalainen, M., Kuivainen, E., Iivonen, S., Niemi, M., & Latvala, S. (2023). Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium proliferatum* isolates from symptomless onions (*Allium cepa*) and onions with *Fusarium* basal rot. Plant Pathology.
 72. Hatfield, J. L., Boote, K. J., Kimball, B. A., Ziska, L. H., Izaurralde, R. C., Ort, D., ... & Wolfe, D. (2011). Climate impacts on agriculture: implications for crop production. Agronomy journal, 103(2), 351-370 pp.
 73. Henao-Henao, E. D., Hernández-Medina, C. A., Salazar-González, C., Velasco-Belalcázar, M. L., & Gómez-López, E. D. (2018). Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia. Agronomía Mesoamericana, 29(1), 56-65pp.
 74. Henry, R. J. (Ed.). (2013). Molecular markers in plants. Wiley-Blackwell.
 75. Heras Gutiérrez, A. D. L. (2004). Caracterización de genes de poligalacturonasas de"

- Fusarium oxysporum*" f. sp." *Radicis lycopersici*" y su análisis en sistemas heterólogos. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
76. Hernández-Aparicio, F., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., and López-Gresa, M. P. (2021). Signaling in the tomato immunity against *Fusarium oxysporum*. *Molecules*, 26(7), 1818.
 77. Hiremani, N. S., and Dubey, S. C. (2019). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* populations causing wilt of lentil in India. *Indian Phytopathology*, 1-7 pp.
 78. Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., and Kubicek, C. P. (Eds.). (2013). *Genomics of Soil-and Plant-Associated Fungi* (Vol. 36). Springer Science & Business Media
 79. Hossain, M. M., Hossain, N., Sultana, F., Islam, S. M. N., Islam, M. S., and Bhuiyan, M. K. A. (2013). Integrated management of *Fusarium oxysporum* wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* with microbial antagonist, botanical extract sp. *ciceris* with microbial antagonist, botanical extract. *African Journal of Biotechnology*, 12(29) p.
 80. Hu, Z., Parekh, U., Maruta, N., Trusov, Y., & Botella, J. R. (2015). Down-regulation of *Fusarium oxysporum* endogenous genes by host-delivered RNA interference enhances disease resistance. *Frontiers in chemistry*, 3, 1.
 81. Huang, Y. H., Wang, R. C., Li, C. H., Zuo, C. W., Wei, Y. R., Zhang, L., and Yi, G. J. (2012). Control of Fusarium wilt in banana with Chinese leek. *European Journal of Plant Pathology*, 134(1), 87–95pp.
 82. Huarhua, M., Aragón, L., Flores, J., Tsuzuki, R., and Arie, T. (2020). Primer reporte de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 aislada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) proveniente de la Costa central del Perú. *Scientia fungorum*, 50p.
 83. Hudson, O., Fulton, J. C., Dong, A. K., Dufault, N. S., and Ali, M. E. (2021). *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* molecular diagnostics past, present and future. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9735p.
 84. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). <http://www.itis.gov>. Accedida en noviembre del 2020
 85. Islas Jiménez, C. G. (2021). Estudio de efecto antagónico de una cepa bacteriana contra *Fusarium oxysporum* en jitomate *Solanum lycopersicum* L (Master's thesis).
 86. Jangir, P., Mehra, N., Sharma, K., Singh, N., Rani, M., and Kapoor, R. (2021). Secreted in xylem genes: Drivers of host adaptation in *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in plant science*, 12.
 87. Jaroszuk-Ściseł, J., Kurek, E., Słomka, A., Janczarek, M., & Rodzik, B. (2011). Activities of cell wall degrading enzymes in autolyzing cultures of three *Fusarium culmorum* isolates: growth-promoting, deleterious and pathogenic to rye (*Secale cereale*). *Mycologia*, 103(5), 929-945.
 88. Joshi, R. (2018). A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. *J. Med. Plants Stud*, 6(3), 112-115pp.
 89. Kashyap, P. L., Rai, S., Kumar, S., and Srivastava, A. K. (2016). Genetic diversity, mating types and phylogenetic analysis of Indian races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* from chickpea. *Archives of PhytoPathology And PlAnt Protection*, 49(19-20),

- 533-553pp.
90. Kasote, D. M., Jayaprakash, G. K., Ong, K., Crosby, K. M., and Patil, B. S. (2020). Hormonal and metabolites responses in *Fusarium* wilt-susceptible and-resistant watermelon plants during plant-pathogen interactions. *BMC plant biology*, 20(1), 1-12pp.
 91. Khan, I. A., Alam, S. S., Haq, A., & Jabbar, A. B. D. U. L. (2005). Biochemistry of resistance in chickpea against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Pak. J. Bot*, 37(1), 97-104 pp.
 92. Kim, J. S., Kang, N. J., Kwak, Y. S., and Lee, C. (2017). Investigation of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using PCR-RFLP. *The plant pathology journal*, 33(2), 140p.
 93. Klessig, D. F., Choi, H. W., and Dempsey, D. M. A. (2018). Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Molecular plant-microbe interactions*, 31(9), 871-888pp.
 94. Kistler, H. C. (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 87(4), 474-479pp.
 95. Kuehnle, A. R., & Mudalige-Jayawickrama, R. G. (2007). Transgenic ornamental crops. *Plant Breeding Reviews*, 28, 125.
 96. Kulik, T., Molcan, T., Fiedorowicz, G., van Diepeningen, A., Stakheev, A., Treder, K., ... and Stenglein, S. (2022). Whole-genome single nucleotide polymorphism analysis for typing the pandemic pathogen *Fusarium graminearum* sensu stricto. *Frontiers in Microbiology*, 13p.
 97. Kumar, A., Lal, H. C., and Akhtar, J. (2012). Morphological and pathogenic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing wilt of chickpea. *Indian Phytopathology*, 65(1), 64-66pp.
 98. Landlinger, C., Bašková, L., Preuner, S., Willinger, B., Buchta, V., and Lion, T. (2009). Identification of fungal species by fragment length analysis of the internally transcribed spacer 2 region. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 28(6), 613-622 pp.
 99. Laurence, M. H., Summerell, B. A., & Liew, E. C. Y. (2015). *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*: evidence for horizontal gene transfer of putative pathogenicity genes. *Plant Pathology*, 64(5), 1068-1075 pp.
 100. Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., & Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review. *Biological control*, 101, 17-30pp.
 101. Lezcano, J. C., Martínez, B., y Alonso, O. (2012). Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas. *Pastos y Forrajes*, 35(2), 187-196 pp.
 102. Laurence, M. H., Summerell, B. A., and Liew, E. C. Y. (2015). *Fusarium oxysporum* f.sp. *canariensis*: evidence for horizontal gene transfer of putative pathogenicity genes. *Plant pathology*, 64(5), 1068-1075 pp.

103. León, J., Arbeláez, G., González, M., Molina, J. C., Parra, J., Guzmán, S y Álvarez, J. D. (1993). Control integrado del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana*, 10(1), 68-89pp.
104. Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Wiley-Blackwell Publishing. Ames, IA, USA. 388p.
105. Li, X., Bai, T., Li, Y., Ruan, X., and Li, H. (2013). Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4-inoculated response to *Fusarium* wilts in the banana root cells. *Proteome science*, 11(1), 1-14pp.
106. Li, E., Wang, G., Xiao, J., Ling, J., Yang, Y., and Xie, B. (2016). A SIX1 Homolog in *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* Is Required for Full Virulence on Cabbage. *PloS one*, 11(3), e0152273.
107. Li, C., Yang, J., Li, W., Sun, J., and Peng, M. (2017). Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish. *Plant disease*, 101(12), 2073-2078pp.
108. Li, N., Alfiky, A., Wang, W., Islam, M., Nourollahi, K., Liu, X., and Kang, S. (2018). Volatile compound-mediated recognition and inhibition between *Trichoderma* biocontrol agents and *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2614p.
109. Li, J., Fokkens, L., Conneely, L. J., & Rep, M. (2020). Partial pathogenicity chromosomes in *Fusarium oxysporum* are sufficient to cause disease and can be horizontally transferred. *Environmental microbiology*, 22(12), 4985–5004pp.
110. Lievens, B., Rep, M., and Thomma, B. P. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(8), 781-788pp.
111. Lievens, B., Houterman, P. M., and Rep, M. (2009). Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS microbiology letters*, 300(2), 201-215pp.
112. Linares Linares, M. Y. (2010). *Fusarium spp.: un modelo para el análisis de patógenos multihospedero* (Master's thesis, Facultad de Ciencias).
113. Liu, S., Fu, L., Wang, S., Chen, J., Jiang, J., Che, Z., Tian, Y., and Chen, G. (2019). Carbendazim Resistance of *Fusarium graminearum* From Henan Wheat. *Plant disease*, 103(10), 2536–2540pp.
114. Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., ... and Kahmann, R. (2015). Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 513–545 pp.
115. López-Berges, M. S., Rispail, N., Prados-Rosales, R. C., & Di Pietro, A. (2010). A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell*, 22(7), 2459-2475 pp.
116. López-Díaz, C. (2019). Mecanismos genéticos y moleculares implicados en la plasticidad genómica de *Fusarium oxysporum*.

117. López-Orona, C. A., Hernández-Verdugo, S., Velarde-Félix, S., Garzón-Tiznado, J. A., Sy, O., and Retes-Manjarrez, J. E. (2019). Cross pathogenicity of *Fusarium oxysporum* isolated from peppers. *European Journal of Plant Pathology*.
118. Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., ... and Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399-416pp.
119. Ma, L. J., Van Der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., ... and Housterman, P. M. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367-373 pp.
120. Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., ... and Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399-416pp.
121. Mandhare, V. K., Deshmukh, G. P., Patil, J. V., Kale, A. A., & MPKV, R. (2011). Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates from Maharashtra, India
122. Maier, F. J., Miedaner, T., Haderer, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., ... and Schäfer, W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular plant pathology*, 7(6), 449-461pp.
123. Manghwar, H., Hussain, A., Ali, Q., Saleem, M. H., Abualreesh, M. H., Alatawi, A., ... & Munis, M. F. H. (2021). Disease severity, resistance analysis, and expression profiling of pathogenesis-related protein genes after the inoculation of *Fusarium equiseti* in wheat. *Agronomy*, 11(11), 2124 pp.
124. Martin, F., and Kamoun, S. (Eds.). (2011). *Effectors in plant-microbe interactions*. John Wiley & Sons.
125. Mahmood, Y., Khan, M. A., Javed, N., and Arif, M. J. (2015). Comparative efficacy of fungicides and biological control agents for the management of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(4).
126. Marín-Ortiz, J. C., Gutierrez-Toro, N., Botero-Fernández, V., and Hoyos-Carvajal, L. M. (2020). Linking physiological parameters with visible/near-infrared leaf reflectance in the incubation period of vascular wilt disease. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1), 88-99pp.
127. Medina Ríos, Melissa. (2011). Inducción de resistencia a *Fusarium oxysporum* y estimulación del desarrollo vegetal en jitomate (*solanum lycopersicum*) empleando *methylobacterium* spp. (Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable). Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Michoacán, México.
128. Mekapogu, M., Jung, J. A., Kwon, O. K., Ahn, M. S., Song, H. Y., and Jang, S. (2021). Recent progress in enhancing fungal disease resistance in ornamental plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7956p.

129. Meshram, S., Kumar, S., and Srivashtav, V. (2018). Primers in Plant Pathology Bonanza for Plant Disease Diagnosis. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.
130. Mesterházy, Á., Lemmens, M., and Reid, L. M. (2012). Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium oxysporum* spp. in maize—a review. Plant Breeding, 131(1), 1-19pp.
131. Michelmore, R. W. (2003). The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. Current opinion in plant biology, 6(4), 397-404pp.
132. Michielse, C. B. Rep M (2009) Pathogen profile oxysporum. Mol Plant Pathol, 10, 311-324pp.
133. Moo-Young, M. (2019). Comprehensive biotechnology. Elsevier.
134. Moretti, A. N. (2009). Taxonomy of *Fusarium* genus: a continuous fight between lumpers and splitters. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, (117), 7-13 pp.
135. Morales, M. M. B. (2015). Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 6(1), 67-82 pp.
136. Mroginski, L., Sansberro, P., Flaschland, E., Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., ... y Mroginski, L. (2010). I-CAPÍTULO 1 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Biotecnología y mejoramiento vegetal II, 17p.
137. Murashige, T. y F. Skoog, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant 15, 473-479 pp.
138. Nejat, N., Rookes, J., Mantri, N. L., and Cahill, D. M. (2016). Plant–pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. Critical Reviews in Biotechnology, 37(2), 229–237pp.
139. Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., and Viljoen, A. (2006). The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. Plant Pathology, 55(2), 217-223 pp.
140. Nelson, P.E. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. p. 51-80. Mace, A. A. Bell and e. H. Beckman (eds.). Fungal wilt diseases of plants. Academic Press. New York.
141. Nelson, P. et al. *Fusarium* species. An Illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Park, University Park and London. 1983
142. Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., & Chandra, N. S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Scientific reports, 6(1), 21367p.
143. Niu, X., Zhao, X., Ling, K. S., Levi, A., Sun, Y., & Fan, M. (2016). The FonSIX6 gene acts as an avirulence effector in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*-watermelon pathosystem. Scientific Reports, 6(1), 1-7pp.
144. Noguera, G. (1980). Growth and germination of spores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the root extracts of tomato plants infected with *Meloidogyne incognita*. Agronomía Tropical, 30(1/6), 305-313pp.
145. Ochoa, M. S., Madrigal, R. P., Martínez, M. T., y Carreón, A. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Biológicas, 12(1), 65-71 pp.

146. O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P.R., Crous, P.W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N.C., Colyer, P., Waalwijk, C., Lee, T., Moretti, A., Kang, S., Kim, H.S., Geiser, D.M., Juba, J.H., Baayen, R.P., Crome, M.G., Bithell, S., Sutton, D.A., Skovgaard, K., Ploetz, R., Corby Kistler, H., Elliott, M., Davis, M. and Sarver, B.A. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetic Biology*. 46(12): 936-948pp.
147. Onozaki, T. (2018). Breeding of carnations (*Dianthus caryophyllus* L.) for long vase life. *Breeding science*, 68(1), 3-13pp.
148. Ortiz, E y Hoyos, L. (2016). Standart methods for inoculations of *F. oxysporum* and *F. solani* in Passiflora. *African J. Agricultural Res. (Nigeria)*. 11(17):1569- 1575 pp.
149. Osorio-Gutiérrez, L. A., & Castaño-Zapata, M. (2011). Caracterización del agente causante de la pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* linneo), enfermedad endémica en el municipio de Manizales, Caldas (Colombia). *Agronomía*, 19(2), 33-43.
150. Panwar, P. K., Bishnoi, J., Gaur, V. K., Kumar, S., Sharma, R., Mehta, S., and Rizwan, M. (2018). Genetic diversity and pathogenic variability among different isolates of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), 2108-2113pp.
151. Papone, M., Mata, D., Wicky, A., Karlanian, M., Bárbaro, L., Morisigue, D., y Payo, G. (2008). Estudios preliminares del efecto del pinzado sobre la calidad de la vara floral en dos variedades de *Lisianthus* de corte. In Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 4. Jornadas Nacionales de Floricultura. 10. 2008 11 04-07, 4 al 7 de noviembre de 2008. Corrientes. AR. 1p
152. Parthasarathy, A., Borrego, E. J., Savka, M. A., Dobson, R. C. J., & Hudson, A. O. (2021). Amino acid-derived defense metabolites from plants: A potential source to facilitate novel antimicrobial development. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100438.
153. Perea Dallos, M., González, T., Campos Mosos, H. A., Guillot Monroy, G., y Cogua Suárez, J. E. (2009). Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de prácticas de laboratorio.
154. Pérez Mora, W., Melgarejo, L. M., and Ardila, H. D. (2021). Effectiveness of some resistance inducers for controlling carnation vascular wilting caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(13-14), 886–902 pp.
155. Ploetz, R. C. (2006). *Fusarium oxysporum* -induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology*, 96(6), 648-652 pp.
156. Poland, J. A., Balint-Kurti, P. J., Wissner, R. J., Pratt, R. C., and Nelson, R. J. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(1), 21–29pp.
157. Poli, A., Bertetti, D., Rapetti, S., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. (2013). Characterization and identification of Colombian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Journal of plant pathology*, 255-263 pp.

158. Ponukumati, S. V., Elliott, M. L., & Des Jardin, E. A. (2019). Comparison of Secreted in Xylem (SIX) genes in two fusarium wilt pathogens of ornamental palms. *Plant Pathology*, 68(9), 1663-1681pp.
159. Porteles, M., Rodríguez, D., Ulacio, D., y Torres, J. (2015). Determinación de razas y grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en Musa, en los estados Carabobo, Cojedes, Guárico y Miranda, Venezuela. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 27(2), 334-340 pp.
160. Pothiraj, G., Shanmugam, V., Tyagi, A., Hussain, Z., Aggarwal, R., Haritha, M. M., ... & Krishnan, G. (2023). Physiological race characterisation of *Fusarium oxysporum* strains infecting tomato employing candidate pathogenicity genes and host resistance. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 66 pp.
161. Pritchard, L., & Birch, P. R. (2014). The zigzag model of plant-microbe interactions: is it time to move on?. *Molecular plant pathology*, 15(9), 865–870.
162. Ramaiah, A. K., and Garampalli, R. K. H. (2015). In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(1), 22-27pp.
163. Ramos Quintana, F., Bautista Hernández, A., & Sotelo Nava, H. (2017). Relación de la temperatura y humedad relativa con el brote del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(3), 713-720 pp.
164. Rampersad, S. N. (2020). Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants. *Pathogens*, 9(5), 340p.
165. Rana, A., Sahgal, M., and Johri, B. N. (2017). *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant–host interaction. In *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology* (159-199 pp). Springer, Singapore.
166. Refai, M., Hassan, A., and Hamed, N. (2015). Monograph of the genus *Fusarium*.
167. Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Meza-Moller, A. D. C., y Guzmán-Ortíz, J. M. (2019). Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenicos en sandía cultivada en Sonora, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(1), 16-34 pp.
168. Retana, K., Ramírez-Coché, J. A., Castro, O., y Blanco-Meneses, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115-126 pp.
169. Rep, M., and Kistler, H. C. (2010). The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 420–426pp.
170. Rodríguez Alvarado, G., Betancourt Resendes, I., Rodríguez Fernández, R., Velázquez Monreal, J. J., Fernández Pavía, S. P., y Gómez Dorantes, N. (2012). Caracterización de Grupos de Compatibilidad Vegetativa de *Fusarium mexicanum* Causante de la Malformación del Mango en Jalisco, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 30(2), 128-140 pp.
171. Rodriguez-Galvez, E., and Mendgen, K. (1995). The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma*, 189(1-2), 61-72pp..

172. Rodríguez, J. C., Lobo, P. R., Rojas, J., Sánchez, J. L., y Arbeláez, G. (1993). Control biológico del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* con aislamientos no patogénicos de *Fusarium oxysporum* . Agronomía Colombiana, 10(1), 62-67 pp.
173. Rodríguez, R., Ramírez, M., y Simpson, J. (2004). Capacidad de Anastomosis de cepas del Hongo Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. et Magn.)Scrib., Agente Causal de la Antracnosis del Frijol (Phaseolus vulgaris L.)Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 22, núm. 1. 37-43 pp.
174. 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*.
175. Rosenzweig, C., Iglesius, A., Yang, X. B., Epstein, P. R., & Chivian, E. (2001). Climate change and extreme weather events-Implications for food production, plant diseases, and pests.
176. Rupesh, K. M., Vijai, S., Neelam, P., and Mohd, Z. (2013). Genetic characterization of *Fusarium oxysporum* isolated from guava in northern India. African Journal of Microbiology Research, 7(33), 4228-4234pp.
177. Sajeena, A., Nair, D. S., & Sreepavan, K. (2020). Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* as a biocontrol agent. Indian Phytopathology, 73, 177-183 pp.
178. Salvalaggio, A. E. (2009). Morfología, grupos de compatibilidad vegetativa, patogenicidad y patrones moleculares de *Fusarium spp.* aislados de ajo y cebolla (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata).
179. Samiksha, & Kumar, S. (2021). Molecular taxonomy, diversity, and potential applications of genus *Fusarium*. In Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 1: Biodiversity and Ecological Perspectives, 277-293 pp.
180. Samsonova, A., Kanapin, A., Bankin, M., Logachev, A., Gretsova, M., Rozhmina, T., & Samsonova, M. (2021). A genomic blueprint of flax fungal parasite *Fusarium oxysporum* f. sp. lini. International Journal of Molecular Sciences, 22(05), 2665 pp.
181. Sanzón Gómez, D., Valdovinos Ponce, G., Rojas Martínez, R. I., Zavaleta Mejía, E., Mora Avilés, M. A., and Guevara Olvera, L. (2012). Morphological changes in cells of chilli CM334 inoculated with *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*. Revista mexicana de fitopatología, 30(1), 66-71 pp.
182. Satyanarayana, T., Deshmukh, S. K., and Johri, B. N. (Eds.). (2017). Developments in Fungal Biology and Applied Mycology. Springer.
183. Schulz, B., and Boyle, C. (2006). What are endophytes?. In Microbial root endophytes (pp. 1-13). Springer, Berlin, Heidelberg.
184. Scott, J., Gordon, T., Kirkpatrick, S., Koike, S., Matheron, M., Ochoa, O., ... and Michelmore, R. (2012). Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from *Fusarium* wilt in lettuce. California Agriculture, 66(1), 20-24pp.
185. Sedano, J. C. S., and Duarte, J. J. F. (2016). Evaluation of the reproduction proficiency of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) hybrids and varieties as search of useful

- parentals for a breeding program. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 8(2), 184-195 pp.
186. Segorbe Luque, D. (2015). Mecanismos de señalización por nitrógeno en el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.
 187. Selim, M. E., Khalifa, E. Z., Amer, G. A., Ely-kafrawy, A. A., & El-Gammal, N. A. (2015). Evaluation and characterization of some Egyptian *Fusarium oxysporum* isolates for their virulence on tomato and PCR detection of (SIX) effector genes. *J. Bioprocess. Biotechnol*, 5.
 188. Semenov, A. N., Divashuk, M. G., Karlov, G. I., Tereshonkova, T. A., Bazhenov, M. S., Samosorov, G. G., and Khovrin, A. N. (2016). Molecular analysis of populations of pathogenic species of *Fusarium oxysporum* genus. *Potato and Vegetables*.
 189. Schmidt, S. M., Houterman, P. M., Schreiver, I., Ma, L., Amyotte, S., Chellappan, B., ... & Rep, M. (2013). MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC genomics*, 14(1), 1-21pp.
 190. Sharma, M., Babu, T. K., Gaur, P. M., Ghosh, R., Rameshwar, T., Chaudhary, R. G., ... and Pande, S. (2012). Identification and multi-environment validation of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea. *Field Crops Research*, 135, 82-88p.
 191. Shimizu, B. I., Saito, F., Miyagawa, H., Watanabe, K., Ueno, T., Sakata, K., and Ogawa, K. (2005). Phytotoxic components produced by pathogenic *Fusarium* against morning glory. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(11-12), 862-866 pp.
 192. Sierra Labrador, S. (2020). Evolución y perspectivas de la industria de flores frescas cortadas colombianas para exportación (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).
 193. Singh, B. P., Saikia, R., Yadav, M., Singh, R., Chauhan, V. S., and Arora, D. K. (2006). Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing wilt of chickpea. *African Journal of Biotechnology*, 5(6), 497-502.
 194. Singh, B. P., and Gupta, V. K. (2017). *Molecular Markers in Mycology*. Springer International Publishing Switzerland.
 195. Simbaqueba, J., Catanzariti, A. M., González, C., and Jones, D. A. (2018). Evidence for horizontal gene transfer and separation of effector recognition from effector function revealed by analysis of effector genes shared between cape gooseberry-and tomato-infecting formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 19(10), 2302-2318pp.
 196. Somrith, A., Singburaudom, N., and Piasai, O. (2011). Vegetative Compatibility Groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Kasetsart Journal of Natural Science*, 45, 451-460pp.
 197. 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 oxysporum* . *Rev. Fac. Cienc. Bá físicas*, 5, 116-129 pp.
 198. Soleha, S., Muslim, A., Suwandi, S., Kadir, S., and Pratama, R. (2022). The identification and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* causing acacia seedling wilt disease. *Journal of Forestry Research*, 33(2), 711-719pp.

199. Soto-Sedano, J. C., Clavijo-Ortiz, M. J., and Filgueira-Duarte, J. J. (2012). Phenotypic evaluation of the resistance in F1 carnation populations to vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana*, 30(2), 172-178 pp.
200. Srivastava, S., Kadooka, C., and Uchida, J. Y. (2018). *Fusarium oxysporum* species as pathogen on orchids. *Microbiological research*, 207, 188-195pp.
201. Suárez, I. (2020). Cultivo De Tejidos Vegetales. In Fondo editorial, Universidad de Córdoba.
202. Summerell, B. A. (2019). Resolving *Fusarium*: current status of the genus. *Annual review of phytopathology*, 57, 323-339pp.
203. Summers, R. W., & Brown, J. K. M. (2013). Constraints on breeding for disease resistance in commercially competitive wheat cultivars. *Plant Pathology*, 62, 115-121.
204. Taylor, A., Vágány, V., Jackson, A. C., Harrison, R. J., Rainoni, A., and Clarkson, J. P. (2016). Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Molecular Plant Pathology*, 17(7), 1032-1047pp.
205. Thatcher, L. F., Gardiner, D. M., Kazan, K., and Manners, J. M. (2012). A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 180-190 pp.
206. Tenjo, F., Montes, E. y Martínez, J. (2006). Comportamiento reciente (2005-2006) del sector floricultor colombiano, recuperado Mayo 19 de 2019, www.banrep.gov.co.
207. Torre-Hernández Ma. E., Sánchez-Rangel D., Galeana-Sánchez E., y Plasencia-de la Parra J. (2014). Fumonisin-Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada en ciencias Químico-Biológicas* 17 (1): 77-91 pp.
208. Torres, G. A. (1992). Avances en el manejo del marchitamiento vascular del clavel, ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana*, 9(2), 187-191 pp.
209. Torres, G. A. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium oxysporum* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*, 17(1-3), 11-16pp.
210. Triana Palomino, J. A. (2009). Evaluación de la respuesta de variedades y líneas experimentales de clavel (*Dianthus caryophyllus*) a la inoculación artificial con *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* bajo condiciones de invernadero.
211. Trujillo, E., Moreno, B., Acevedo, R., y Vera, R. (2005). Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum*., causante de la marchitez en clavel, determinada mediante electroforesis. *Fitopatología venezolana*, 18(1), 9-14pp.
212. Trusov, Y., Chakravorty, D., and Botella, J. R. (2013). *Fusarium oxysporum* infection assays in *Arabidopsis*. In *G Protein-Coupled Receptor Signaling in Plants* (pp. 67-72). Humana Press, Totowa, NJ.
213. Ujat, A. H., Vadamalai, G., Hattori, Y., Nakashima, C., Wong, C. K. F., & Zulperi, D. (2021). Current classification and diversity of *Fusarium* species complex, the causal pathogen of *Fusarium* wilt disease of banana in Malaysia. *Agronomy*, 11(10), 1955p.
214. van Baarlen, P., van Belkum, A., Summerbell, R., Crous, P. and B. Thomma. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 239 – 277 pp.

215. van Dam, P., Fokkens, L., Schmidt, S. M., Linmans, J. H., Kistler, H. C., Ma, L. J., and Rep, M. (2016). Effector profiles distinguish formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Environmental Microbiology*, 18(11), 4087-4102pp.
216. van Dam, P., Fokkens, L., Schmidt, S. M., Linmans, J. H., Kistler, H. C., Ma, L. J., & Rep, M. (2016). Effector profiles distinguish formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Environmental Microbiology*, 18(11), 4087-4102pp.
217. van der Does, H. C., Fokkens, L., Yang, A., Schmidt, S. M., Langereis, L., Lukasiewicz, J. M., ... and Rep, M. (2016). Transcription factors encoded on core and accessory chromosomes of *Fusarium oxysporum* induce expression of effector genes. *PLoS genetics*, 12(11).
218. Vanderplank, J. E. (2012). Genetic and molecular basis of plant pathogenesis (Vol. 6). Springer Science & Business Media.
219. Vanegas cano, 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*.
220. Vásquez Ramírez, L. M., y Castaño Zapata, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) Wc snyder & hn hansen]: una revisión.
221. Vásquez Barajas, D. A. (2021). Estudio de la diversidad molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* presente en Colombia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
222. Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., y Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium oxysporum*. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2). 194 - 205 pp.
223. Vlaardingerbroek, I., Beerens, B., Rose, L., Fokkens, L., Cornelissen, B. J., and Rep, M. (2016). Exchange of core chromosomes and horizontal transfer of lineage-specific chromosomes in *Fusarium oxysporum*. *Environmental microbiology*, 18(11), 3702-3713pp.
224. Vleeshouwers, V. G. A. A., & Oliver, R. P. (2014). Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(3), 196–206pp.
225. Vos, C. M., and Kazan, K. (Eds.). (2016). Belowground defence strategies in plants. Cham, Switzerland: Springer.
226. Wang, L., Li, X., Xu, Y., Chang, Y., and Wang, J. (2017). Analysis of population distribution and genetic variation of plant pathogenic *Fusarium oxysporum* in Shanxi Province. *Scientia Agricultura Sinica*, 50, 1802-1816 pp.
227. Westcott, C., and Horst, R. K. Ralph K. (2008). Westcott's plant disease handbook. Springer. Book.
228. Williams, A. H., Sharma, M., Thatcher, L. F., Azam, S., Hane, J. K., Sperschneider, J., ... and Lichtenzweig, J. (2016). Comparative genomics and prediction of conditionally dispensable sequences in legume-infecting *Fusarium oxysporum* formae speciales facilitates identification of candidate effectors. *BMC genomics*, 17(1), 191p.

229. Xu, T., Qin, D., Muhae Ud Din, G., Liu, T., Chen, W., and Gao, L. (2021). Characterization of histological changes at the tillering stage (Z21) in resistant and susceptible wheat plants infected by *Tilletia controversa* Kühn. *BMC plant biology*, 21(1), 49p.
230. Yang, H., Yu, H., & Ma, L. J. (2020). Accessory chromosomes in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 110(9), 1488-1496 pp..
231. Yu, J., Gonzalez, J. M., Dong, Z., Shan, Q., Tan, B., Koh, J., Zhang, T., Zhu, N., Dufresne, C., Martin, G. B., & Chen, S. (2021). Integrative Proteomic and Phosphoproteomic Analyses of Pattern- and Effector-Triggered Immunity in Tomato. *Frontiers in plant science*, 12, 768693.
232. Zapata, J. (2012). Importancia del cultivo de uchuva en Colombia: Estado actual. Avances en el manejo y control de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de uchuva.
233. Zaquinaula, H., y Heidi, M. (2018). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici aisladas de tomate (*Solanum lycopersicum*) proveniente de Costa Central del Perú.
234. Zhang, M., and Jeyakumar, J. M. J. (2018). *Fusarium oxysporum* Species Complex Causing Pokkah Boeng in China. In *Fusarium oxysporum -Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*. IntechOpen. 143-145 pp
235. Zuriegat, Q., Zheng, Y., Liu, H., Wang, Z., y Yun, Y. (2021). Current progress on pathogenicity-related transcription factors in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 22(7), 882-895pp.

ANEXOS

Fusarium oxysporum strain D3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [OQ923670.1](#) Length: 528 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 214 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
344 bits(186)	7e-90	186/186(100%)	0/186(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGTAAAC	60		
Sbjct 29	CCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGTAAAC	88		
Query 61	GGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAACC	120		
Sbjct 89	GGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAACC	148		
Query 121	ATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA	180		
Sbjct 149	ATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA	208		
Query 181	GCAAAA	186		
Sbjct 209	GCAAAA	214		

Figura 25: BLAST de la secuencia de la región génica ITS1-2 en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia obtenida con porcentaje de identidad de 100% con regiones ITS en secuencias de *Fusarium oxysporum* (OQ923670.1).

Fusarium oxysporum f. sp. physali isolate UB47 secreted in the xylem 1b (SIX1b) gene, complete cds

Sequence ID: [MW160896.1](#) Length: 856 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 856 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1519 bits(822)	0.0	849/861(99%)	6/861(0%)	Plus/Plus
Query 19	ATGGTACTCCTTGGCGCCCTCTCGATCCTTGGGTTGGGGCTTATGCTCAAGAGGCTGCG	78		
Sbjct 1	ATGGTACTCCTTGGCGCCCTCTCGATCCTTGGGTTGGGGCTTATGCTCAAGAGGCTGCG	60		
Query 79	GTTCGGGAGCCCGAGATATTTTCAACTTGACCTACACGGAATATCTGGAATAGGTGGCA	138		
Sbjct 61	GTTCGGGAGCCCGAGATATTTTCAACTTGACCTACACGGAATATCTGGAATAGGTGGCA	120		
Query 139	GCATCCACCGGAGTCCCTCAGACAAGAGTGATTTGCCCGGAATGACATATGAGCAGC	198		
Sbjct 121	GCATCCACCGGAGTCCCTCAGACAAGAGTGATTTGCCCGGAATGACATATGAGCAGC	180		
Query 199	TTTCTTGGAAACGAGACGACGATGGTGTCCAGACCGAGACGGGCAAGCTTATCGAGG	258		
Sbjct 181	TTTCTTGGAAACGAGACGACGATGGTGTCCAGACCGAGACGGGCAAGCTTATCGAGG	240		
Query 259	CGTGGTCACATTGTCAACCTTAGAAAGCGTGAGCTGTTCGGCGAGGAGTCTCGCAACGAT	318		
Sbjct 241	CGTGGTCACATTGTCAACCTTAGAAAGCGTGAGCTGTTCGGCGAGGAGTCTCGCAACGAT	300		
Query 319	CGTGTACACACAAGACATGCTCCAGGCGCTTCATGATCTGTGCGTTGAAAAATTTGGCAC	378		
Sbjct 301	CGTGTACACACAAGACATGCTCCAGGCGCTTCATGATCTGTGCGTTGAAAAATTTGGCAC	360		
Query 379	GGCTATCGAGCGGTAGTGGGATGTGTGACCTGGAGCTCGGCGGACTAGGAGCTTCGAA	438		
Sbjct 361	GGCTATCGAGCGGTAGTGGGATGTGTGACCTGGAGCTCGGCGGACTAGGAGCTTCGAA	420		
Query 439	TGTGGGACACCGGCTGTAGGGGGGAGACAGACCAATGACCAAGCTTTGCCCAAGGAC	498		
Sbjct 421	TGTGGGACACCGGCTGTAGGGGGGAGACAGACCAATGACCAAGCTTTGCCCAAGGAC	480		
Query 499	CAGGAGTGCACCACTTTCCAGGCGTACAACTATCGTAACGGTAAGCGTCAGGTACTTTT	558		
Sbjct 481	CAGGAGTGCACCACTTTCCAGGCGTACAACTATCGTAACGGTAAGCGTCAGGTACTTTT	540		
Query 559	CCTGTCTGTGGGACAAAAATTGAGGTGAAGSAAAGACATGATATAGGGATAGACAGGAG	618		
Sbjct 541	CCTGTCTGTGGGACAAAAATTGAGGTGAAGSAAAGACATGATATAGGGATAGACAGGAG	600		
Query 619	TGGGATGGATCCTGGTTCCCGGAAAGCCCTGAATCGCTGGGACTTACGATTTTCGTC	678		
Sbjct 601	TGGGATGGATCCTGGTTCCCGGAAAGCCCTGAATCGCTGGGACTTACGATTTTCGTC	660		
Query 679	CAGATGGCTGGCAGTCTCGGTGCGCACTTCGACTTTCATGGTGTATTTCGGATGGATAT	738		
Sbjct 661	CAGATGGCTGGCAGTCTCGGTGCGCACTTCGACTTTCATGGTGTATTTCGGATGGATAT	720		
Query 739	GAGATGAATCCCGGGGAAATGGACACTCATGGGCTGGCTTAAATGCCCAGGTAGGCT	798		
Sbjct 721	GAGATGAATCCCGGGGAAATGGACACTCATGGGCTGGCTTAAATGCCCAGGTAGGCT	778		
Query 799	AGCTGATTTCACAAGCACATATCGCCCAACTTGGGCGCATTTGGGATATACCATCCCAA	857		
Sbjct 779	AGCTGATTTCACAAGCACATATCGCCCAACTTGGGCGCATTTGGGATATACCATCCCAA	836		
Query 858	CCTAATTGCTATCCAAAGCC	878		
Sbjct 837	CTAAGTGCATCCAAAGCC	856		

Figura 26: BLAST de la secuencia de SIX1 en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia obtenida con porcentaje de identidad en genbank de 100 % con secuencias de *Fusarium oxysporum* f. sp. physali (MW160896.1)

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate Fol59 secreted in the xylem 5 (SIX5) gene, complete cds

Sequence ID: [MN745209.1](#) Length: 573 Number of Matches: 1

Range 1: 8 to 573 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
745 bits(403)	0.0	520/576(90%)	10/576(1%)	Plus/Plus
Query 29	AATCGTATACAATCAATCATGCGCTTCGAGTACATCTCTGTTCTAGCCCTTTGCGGC	88		
Sbjct 8	AATCGTATACAATCAATCATGCGCTTCGAGTACATCTC---TGTTCTAGCCCTTTGCGGC	64		
Query 89	ACGAGGTAATCTCAGCCCTTTGTTATCTACACGCTGTGAAATTCGTGTTTGTCTAAT	148		
Sbjct 65	GCGAGGTAATCTTAGCCCTTTGTTATCTACACGCTGTGAGTTCGTGTTTGTCTAAC	124		
Query 149	ATGGTCATAGTCTCGCAAGGCTTCATCAGTACTGTGCTTGCCAGTCCGGTCTGGTGACA	208		
Sbjct 125	ATGGTCTTAGTCTCGCAAGGGATCATCAGTACTGTGCTTGCCAGTCCGGTCTGGTGACA	184		
Query 209	GCATTGATATAGAACCCACCTATCAGCTTCAGAACAAAAATCCTCATACATATCTGTGGG	268		
Sbjct 185	GCATTGATATAGATGCCACCACTCAGCTTCAGAACGATAATAGTAAATCATATTGTGGG	244		
Query 269	GTATGTATACCTCATAGTAATTGGGCAATTGGGCAAGCTTACAATTCTATAGCTCAGACA	328		
Sbjct 245	GTATGTATACCTCATAGTGATTGGGCAATTGGGCAAGCTTACAATTCTATAGCTCAGACC	304		
Query 329	ACTCCGGCATATTGGTTTGGGATGCTGACCGTCATAAACCTGGTCCACGATTCTGCTGGC	388		
Sbjct 305	TCCTCAGCATATTGGTT-----TGCTGACCGTCATAAACCTGGTCCACGATTCTGCTGGC	358		
Query 389	GTTTATGTAAGTCTACAGCTTAGGATCCTGAAGCGCCTGAGCTAACCTTGACTAGCTGAA	448		
Sbjct 359	ATTTATGTAAGTCTACAGCTTAGGATGATTAAGTGCCTGAACTAACCTTGACTAGCTGAA	418		
Query 449	AGCGGCAAAATGGCAAAATTGACGGCGATACATTCTATGATCTTTGCATTAAATAGTGGAGG	508		
Sbjct 419	AGCTGCAAAATGGCAAAATTGATGGCGATACATTCTATAATCTTTGCATTAAATAGTGGAGG	478		
Query 509	ATCAGACTCAACATGCTTTGACTGCTCTAAGTTTAAACAGGTTGGGGACATTATCTATTG	568		
Sbjct 479	AGCAGACTCAACATGCTTTGACTGCTCTAATCTCACCAGGTTAGAAACGTTATCTATTG	538		
Query 569	TAATAAGGCTAGAGGTATCTACAGCTTTTGTCTCT	604		
Sbjct 539	TGATGCGGCTAGAGGTATCTACAGCTTCT-GTCTCT	573		

Figura 27: BLAST de la secuencia de SIX5 en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia obtenida con porcentaje de identidad de 90.28% del gen SIX5 reportado para *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (MN745209.1)

Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum SIX6 gene, complete cds

Sequence ID: [HM467128.1](#) Length: 645 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 183 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-60	168/185(91%)	2/185(1%)	Plus/Plus
Query 45	ATGAATCTTCGCTTCTTATCGTATCAATCTTGGCTGCTGGCTGCGTACCTGGTCCCCTTG	104		
Sbjct 1	ATGAAGC-TCGC-TCTTATCGCATCAATCTTGGCTGCCGGCTGCGTAGCTGGTCCCCTTG	58		
Query 105	CTCAAACCGAATCCGAATCTGCTGATGTTGCTGATCACACCATCAATTATTTACATCG	164		
Sbjct 59	CTCAAACCGAATCCGAATCTGCTGATGTTGCTGATGAGCACACCATCAATTATTTACATCG	118		
Query 165	CTCCAGAAGATCTTGAATCACTGTAAGCGAAATTATCATCTTTGGTCTCTCGAGACAGGC	224		
Sbjct 119	CTCCAGAAGAGTTTGAACCACCGAAGGCGAATTATCATCTTTGGTCTCTCGAGACACGC	178		
Query 225	TTCCC	229		
Sbjct 179	TTCCC	183		

Figura 28: BLAST de la secuencia de SIX6 en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia obtenida con porcentaje de identidad de 90.81% para secuencia del gen SIX6 correspondiente a *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum (HM467128.1)

Fusarium oxysporum isolate Fo13 secreted in xylem 7 (SIX7) gene, complete cds

Sequence ID: [MK906619.1](#) Length: 834 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 834 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1458 bits(789)	0.0	800/805(99%)	1/805(0%)	Plus/Plus
Query 18	TAAACCCAGAGTAAGTTATGTGGCACAAAGTTTAGGATCAGGCTAACTTCCATATGCAGETT	77		
Sbjct 31	TAAA-CCAGAGTAAGTTATGTGGCACAAAGTTTAGGATCAGGCTAACTTCCATATGCAGETT	89		
Query 78	ATGAAGTACCTTTACCTCCTTTTCCATTTCGCCCTGTTTGGAGTGTCTATACCTATGCTC	137		
Sbjct 98	ATGAAGTACCTTTACCTCCTTTTCCATTTCGCCCTGTTTGGAGTGTCTATACCTATGCTC	149		
Query 138	GACCTATTTTCAAGACAAGGGCAATGCTTTAGCACCACCGGCTCAACACCACACGACCA	197		
Sbjct 158	GACCTATTTTCAAGACAAGGGCAATGCTTTAGCACCACCGGCTCAACACCACACGACCA	209		
Query 198	CCACC CGCGGTAGAGAGGTGACATTTGACATCACC AAAATGTCAACAGTTTCACTAGC	257		
Sbjct 218	CCACC CGCGGTAGAGAGGTGACATTTGACATCACC AAAATGTCAACAGTTTCACTAGC	269		
Query 258	GCCGCGTCCACACCATGGACTGAGGGGTAGGACTCTCGAATATTAGATACCAATGGCGC	317		
Sbjct 278	GCCGCGTCCACACCATGGACTGAGGGGTAGGACTCTCGAATATTAGATACCAATGGCGC	329		
Query 318	GCATACTACAGTACCAAGGCAACAACTACATTGTTGAGGTTGCGGTTTTCGGTACTGCC	377		
Sbjct 338	GCATACTACAGTACCAAGGCAACAACTACATTGTTGAGGTTGCGGTTTTCGGTACTGCC	389		
Query 378	GAGGCGCAAGTAGTCTTGCTTCCGATGCTCCCGAAACAAGTCGATATCGCGCTATCGAT	437		
Sbjct 398	GAGGCGCAAGTAGTCTTGCTTCCGATGCTCCCGAAACAAGTCGATATCGCGCTATCGAT	449		
Query 438	AGCAACGTCTTTAGGCCCAACGAAGCGGTACAGGCGGTGGTTAGCGGGCTGGGGTCAG	497		
Sbjct 458	AGCAACGTCTTTAGGCCCAACGAAGCGGTACAGGCGGTGGTTAGCGGGCTGGGGTCAG	509		
Query 498	GTGACTACGGTCTGCCTTCAAACCTTGGGGTGGCGAGGAGATATTACCTATCGGCTCCGG	557		
Sbjct 518	GTGACTACGGTCTGCCTTCAAACCTTGGGGTGGCGAGGAGATATTACCTATCGGCTCCGG	569		
Query 558	ATTCAAAGTAAGCCCAAGCACTCCTACCCCTTGAAGTCATTCTTGAGAGGCAATACGCC	617		
Sbjct 578	ATTCAAAGTAAGCCCAAGCACTCCTACCCCTTGAAGTCATTCTTGAGAGGCAATACGCC	629		
Query 618	AACCGCTTAATGAATGCCGTTGCTACGCCAAAACCATCAGATGATTTATAAGCCGAGG	677		
Sbjct 638	AACCGCTTAATGAATGCCGTTGCTACGCCAAAACCATCAGATGATTTATAAGCCGAGG	689		
Query 678	GGCCTTGCTGACTTTTCTTTTATAGGTTAACACAGTCTGTAGTAAATCTGTAGTCAAGC	737		
Sbjct 698	GGCCTTGCTGACTTTTCTTTTATAGGTTAACACAGTCTGTAGTAAATCTGTAGTCAAGC	749		
Query 738	AGTTCAATATCGCGAAGGGGAAGAAGACAGGTGTGAGATCAGAAAAACAGETTTTACAG	797		
Sbjct 758	AGTTCAATATCGCGAAGGGGAAGAAGACAGGTGTGAGATCAGAAAAACAGETTTTACAG	809		
Query 798	CTTCAATCTCTTGCTAGTTACTCA	822		
Sbjct 818	CTTCAATCTCTTGCTAGTTACTCA	834		

Figura 29: BLAST de la secuencia de SIX7 en la base de datos NCBI, relacionando la secuencia obtenida con porcentaje de identidad de 99.38% en secuencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (MK906619.1).