

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



Daniela Londoño Serna

**Universidad Militar Nueva Granada
Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas
Biología Aplicada
Bogotá D.C. 2022**

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



AUTOR

Daniela Londoño Serna

**Trabajo presentado como requisito para optar el título de Bióloga Aplicada en
Biología Aplicada**

Director

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

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PREGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA
TRABAJO DE GRADO
2022**

Este trabajo está dedicado a la naturaleza,
eternamente maravillada con su grandeza.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a José Hernández Gómez y Jeison Triana Díaz, sin ustedes no habría sido posible el orden de la inmensidad de datos. Eternamente agradecida con ustedes.

Agradezco a mi padre Rubén Londoño Gaviria y Pahola Del Castillo por apoyarme económicamente.

A mi director Juan José Filgueira Duarte por abrir las puertas de su grupo de investigación y darme la oportunidad de ser parte de esta rama de la biología. Por los consejos, apoyo, y aprendizaje que obtuve de él. Por creer en mí a pesar de mis situaciones y darme la oportunidad de trabajar. Siempre estaré agradecida.

A la Universidad Militar Nueva Granada por darme las herramientas para poder ser una bióloga aplicada. Igualmente, agradecida con los auxiliares de laboratorio, que estuvieron presentes en mis etapas de formación.

A los docentes por ser parte de mi formación profesional, especialmente a Diego Quiroga, Diego Riaño, Maurin Salamanca, Ericsson Coy, Carlos Coy, Jaime Mauricio González, Maribeb Castro, Juan José Filgueira, Mariana Restrepo, Martha Vallejo, Nelsy Pinto, Wilder Gamboa y Francisco Briceño por sus tremendas clases tan llenas de conocimiento, pero principalmente, por la motivación, curiosidad, entusiasmo y ánimos que transmitían. Las disfruté tanto que siempre las recordaré y a ustedes también. ¡Gracias por esa energía!

A la vicerrectoría de investigaciones por financiar los proyectos CIAS-2540, CIAS-3148 y CIAS-3138 del grupo de investigación de Fitopatología Molecular. Obtuve una comprensión y conocimiento con mayor profundidad a través de las prácticas, así que gracias por esa oportunidad.

Muchas Gracias

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos	10
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y ESTADO DEL ARTE	10
3.1. Importancia del clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	10
3.2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. dianthi, causante de la enfermedad fusariosis	11
3.3. Antecedentes fenotípicos y bases genéticas de la interacción planta-patógeno	12
3.4. Mejoramiento de clavel	13
3.5. Fitopatología Molecular	14
3.6. ARN-seq	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1. Propagación de células desdiferenciadas	18
4.2. Aislamiento del patógeno	19
4.3. Obtención de cultivo monospórico y caracterización morfológica	19
4.4. Elicitación en “Cultivo Dual”	20
4.5. Extracción de ARN total, calidad y cuantificación	20
4.6. Secuenciación del transcriptoma, calidad, y ensamblaje <i>de novo</i>	21
4.7. Anotación Funcional	22
4.8. Comparación en los niveles de expresión en las variedades de clavel	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Caracterización morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
5.2. Ensayos preliminares y cultivo dual	25
5.3. Calidad de extracción	26

5.4. Secuenciación transcriptómica y análisis de calidad	29
5.5. Anotación Funcional	30
5.6. Comparación en los niveles de expresión	31
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. Naturaleza fisiológica de las células desdiferenciadas	38
6.2. Transcritos asociados a los cloroplastos	38
6.3. Transcritos asociados al metabolismo de carbohidratos y respiración	38
6.4. Pared Celular	44
6.5. Transcritos asociados a la pared celular	45
6.6. Transcritos asociados al metabolismo fenilpropanoide	46
6.7. Transcritos asociados a proteínas multifuncionales	47
6.8. Transcritos asociados al control de compuestos reactivos	48
6.9. Transcritos asociados a los peroxisomas	50
6.10. Transcritos asociados a la vía proteolítica y muerte celular programada	50
6.11. Transcritos asociados a la defensa y estrés general	53
6.12. Transcritos asociados a la regulación transcripcional y post-transcripción	53
6.13. Transcritos asociados a la traducción	54
6.14. Transcritos asociados al transporte	56
7. CONCLUSIONES	57
8. OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES	59
9. BIBLIOGRAFÍA	60
10. ANEXOS	78

RESUMEN

Al ser Colombia uno de los países con mayor producción de clavel a nivel mundial, es de gran importancia económica para el sector floricultor prevenir la enfermedad fusariosis, causa principal en las pérdidas del cultivo, a través de la obtención de variedades resistentes a esta enfermedad vascular provocado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (FOX). Con el fin de realizar un acercamiento a la comprensión y conocimiento de la respuesta de variedades de clavel a la presencia de FOX, el objetivo principal de este trabajo de grado fue estudiar la expresión génica (ARNm) entre variedades susceptibles y resistentes de clavel durante la elicitación con dicho patógeno. Para esto, primero, se extrajo el ARNm de células des-diferenciadas de clavel, cultivadas *in vitro*, en condiciones elicítadas y no elicítadas, con tecnología de membrana de sílice. Segundo, se obtuvo un librería transcriptómica a través de la secuenciación RNA-seq al igual que la abundancia relativa de cada transcrito. Con esta información, se prosiguió en evaluar la variación de la respuesta génica en términos de ARNm producido por variedades susceptibles y resistentes de clavel a FOX. Finalmente, se detectó grupos de genes que podrían participar en el fenotipo de resistencia en variedades de clavel con la presencia a FOX.

Palabras claves: Clavel, *Fusarium oxysporum*, ARNm, ARN-seq, resistencia, susceptibilidad

ABSTRACT

Since Colombia is one of the countries with the highest production of carnations worldwide, it is of great economic importance for the flower sector to prevent the disease fusariosis, the main cause of crop losses, by acquiring resistant varieties to this vascular disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* (FOX). In order to make an approach to the comprehension and knowledge of the response of carnation varieties to the presence of FOX, the main objective of this degree thesis was to study the gene expression (mRNA) between susceptible and resistant varieties of carnation during the elicitation with such pathogen. For this, first, mRNA was extracted from de-differentiated carnation cells, cultured *in vitro*, under elicited and non-elicited conditions with silica membrane technology. Second, a transcriptomic library was obtained through RNA-seq sequencing as well as the relative abundance of each transcript. With this information, the variation of the gene response in terms of mRNA produced by susceptible and resistant varieties of carnation to

FOX, was analyzed. Finally, groups of genes that could participate in the resistance phenotype in carnation varieties with the presence of FOX were detected.

Keywords: Carnation, *Fusarium oxysporum*, mRNA, RNA-seq, resistance, susceptibility

1. INTRODUCTION

La floricultura en Colombia se ha convertido en una industria de desarrollo rural importante para la exportación (Conlon, 2015) donde la rosa (21%), el clavel (17%), crisantemo (15%), alstroemeria (8%) y hortensia (7%) son las flores más demandadas y cultivadas en el país (Asocolflores, 2022). Dicha actividad económica ha posicionado al país como segundo productor de flores a nivel mundial, representando una participación porcentual de 22,4% en las exportaciones mundiales para el año 2021 al obtener \$1.727.000 millones de dólares en ventas (MinCIT, 2022). Sin embargo, de acuerdo con los reportes desde el siglo XIX, la participación de clavel ha descendido de un 37-56% (Arbeláez, 1993) a un 17% para el año 2017 y 2018 (Grant *et al.*, 2017; Betancur, 2018) y un 9,63% para 2021 (Legis, 2022).

Una de las causas principales en las pérdidas del cultivo de clavel se debe a la enfermedad fusariosis generada por el hongo *Fusarium oxysporum* (Arbeláez & Calderón, 1991; Filgueira, 2011). Su colonización en el tejido del xilema del clavel produce síntomas como marchitez vascular, amarillamiento asimétrico y pudrición de raíz y tallo (Filgueira, 2011). Por otro lado, las prácticas convencionales agrícolas como el uso inadecuado de los pesticidas al igual que el dominio de monocultivos, han limitado la presencia de diversidad microbiana significativamente y cambiado la estructura de los suelos (Wolinska *et al.*, 2022). El uso extensivo de monocultivos con limitada rotación ha sido una explicación de la aparición de patógenos formas especiales, los cuales presentan una especificidad con el huésped (De Lamo & Takken, 2020). Una de las ventajas del hongo son sus estructuras de reproducción asexuales, microconidios y macroconidios, las cuales pueden permanecer viables en los suelos por décadas, al igual que su estructura de resistencia a múltiples factores, las clamidosporas (De Lamo & Takken, 2020).

Teniendo en cuenta que existen plantas resistentes y susceptibles (Yephet & Shtienberg, 1997), como se manifiesta en las líneas híbridas del programa de mejoramiento de clavel del grupo de Fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granda, el

conocimiento de las interacciones entre planta-patógeno podría revelar los mecanismos de respuesta (Groenewald, 2006). Si la planta es resistente puede detectar directa o indirectamente patrones moleculares del patógeno y responder enviando señales intracelulares para la producción de proteínas inhibidoras de crecimiento del patógeno, entre otras proteínas (de Wit, 2007). Sin embargo, este mecanismo de defensa es gobernado por un control génico aún desconocido (Scovel *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2012) pero que necesariamente requiere de un reconocimiento y posteriores vías de señalización entre el huésped y patógeno (Mansoor *et al.*, 2022). Se convierte relevante poder identificar información génica asociada a proteínas involucradas en los mecanismos de respuesta y defensa de las plantas, igualmente, comparar dicha información entre plantas susceptibles y resistentes. Por esta razón, la pregunta de investigación de este trabajo de grado fue la siguiente: ¿existen diferencias detectables en la expresión génica entre variedades susceptibles y resistentes de *Dianthus caryophyllus* ante la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*?

Una manera de obtener la información génica, precursora de los procesos bioquímicos que benefician el fenotipo de las plantas, es a través del ARNm (Chung *et al.*, 2021). Dicho perfil de expresión de genes brindaría información sobre rasgos agronómicos importantes de clavel como la resistencia a enfermedades (Tanase *et al.*, 2012). Por esta razón, en este trabajo de grado se obtuvo el ARNm de células de clavel expuestas y no expuestas al patógeno *Fusarium oxysporum* en un momento determinado. A través de su secuenciación, las variaciones en los niveles de expresión génica fueron analizados entre variedades susceptibles y resistentes de *Dianthus caryophyllus* ante la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (FOX). La identificación de los genes asociados a la respuesta de defensa del clavel podría permitir desarrollar marcadores moleculares de resistencia, a su vez, mejorando las variedades comerciales de clavel que son altamente demandadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Estudiar la expresión génica (ARNm) de variedades susceptibles y resistentes de clavel durante la elicitación con FOX.

2.2. Objetivos específicos:

- Cuantificar la expresión génica (ARNm) de variedades de clavel como respuesta a la actividad del patógeno.
- Evaluar la variación de la respuesta génica en términos de ARNm producido por variedades susceptibles y resistentes de clavel a la presencia de FOX.
- Detectar grupos de genes que podrían participar en el fenotipo de resistencia en variedades de clavel por la presencia a FOX.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Importancia del clavel

Dentro de la familia Caryophyllaceae se encuentra el clavel, *Dianthus caryophyllus*, una planta perenne, alógama y hermafrodito (dicogamia) (Soto & Filgueira, 2012). Aunque se desconoce su origen, las plantas silvestres fueron inicialmente registradas en regiones del Mediterráneo como Grecia, Italia, Sicilia y Sardinia, zonas donde actualmente tiene una distribución natural restringida (OGTR, 2006). La importancia del clavel se debe a su amplia variedad de colores, delicados aromas a clavo y su alta duración ornamental (OGTR, 2006; Filgueira, 2010), además, para el tratamiento de trastornos digestivos y cicatrización de heridas en culturas asiáticas (Saidi *et al.*, 2018) y el uso de sus aceites en perfumería (OGTR, 2015). Por más de 2,000 años el clavel ha sido ampliamente cultivado, siendo uno de los cultivos más antiguos (Ward, 2008).

El clavel es considerado como una flor de producción tradicional que es altamente valorada mundialmente, siendo en Colombia, la segunda flor de corte más importante en la floricultura (Cuestas, 2018; Betancur, 2018). La estabilidad climática, suelos fértiles, diversas fuentes hídricas al igual que la disponibilidad lumínica de 12 horas han permitido que el país se destaque en la producción de clavel especialmente en las regiones de la Sabana de Bogotá y Antioquia (Cárdenas & Rodríguez, 2011), representando una producción de 66% y 33%, respectivamente (Asocolflores, 2022). Los principales países productores y exportadores de flores en orden son Holanda (50%), Colombia (15%), Ecuador (10%), Kenia (6%) y Etiopía (2%). De la producción colombiana, las rosas ocupan un 24%, el clavel un 17% y crisantemos un 11%, reflejando su nivel de importancia (Grant *et al.*, 2017; Betancur, 2018).

3.2. *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi, causante de la enfermedad fusariosis

Los patógenos causantes de las 21 enfermedades en clavel se caracterizan por presentar múltiples formas de propagación y supervivencia (Nakkeeran *et al.*, 2018), donde se destaca sus transmisiones a través del suelo, implementos agrícolas, agua de riego, plantas infectadas, como también por condiciones ambientales favorables para el patógeno al igual que la alta fertilización y el flujo de esporas con el viento (Wolcan *et al.*, 2016; Nakkeeran *et al.*, 2018). El principal patógeno que limita significativamente la producción exitosa de clavel a nivel mundial es *Fusarium oxysporum* (Prados *et al.*, 2007; Hedge *et al.*, 2017; Sharma & Raj, 2019) afectando la producción en Colombia hasta un 10% (Soto *et al.*, 2012b), al causar la enfermedad de la fusariosis (Arbeláez & Calderón, 1991; Filgueira, 2011).

Fusarium oxysporum es una especie anamórfica, habitante ubicua del suelo que infecta las raíces del hospedero, el cual se ha diferenciado en patógenos oportunistas, verdaderos y obligatorios donde varía el nivel de interacción entre planta- patógeno (Rana *et al.*, 2017). Varios estudios han demostrado que diferentes aislados de *F. oxysporum* tienen un nivel de patogenicidad de acuerdo con la especificidad con el hospedero, en el caso de clavel, se agrupa en la forma especial (f. sp.) dianthi (Rana *et al.*, 2017; Lombard *et al.*, 2019). Su complejidad se expande al considerar sus ocho razas fisiológicas reportadas en diferentes países y cómo el tipo de resistencia de los cultivares de clavel varían con estas razas (Ben-Yephet *et al.*, 1997; Chiocchetti *et al.*, 1997; Rana *et al.*, 2017; Lombard *et al.*, 2019).

De acuerdo con Michielis y Rep (2009), el proceso de infección por FOX se resume de la siguiente manera: reconocimiento de exudados de la raíz; proceso estimulador de pre-penetración mediante secreción de compuestos; fijación/adhesión y colonización de la superficie/epidermis de la raíz mediante aperturas naturales, heridas o penetración forzada, el cual permite el acceso a la membrana plasmática del huésped. Luego, coloniza e invade el xilema a través del conjunto micelial y acumulación de microconidios, perjudicando el flujo de agua y nutrientes y provocando un estrés hídrico (Michielis & Rep, 2009). Dicho proceso resumido ocurre durante la etapa biotrófica del hongo; luego de establecerse en el xilema, libera compuestos tóxicos y también enzimas que degradan las células del hospedero, siendo éste su estado necrotrófico (Chen *et al.*, 2014; Lyons *et al.*, 2015) que conlleva a los síntomas de marchitez vascular, amarillamiento asimétrico, pudrición de raíz y tallo, seguido por la muerte de la planta (Clavijo, 2007; Filgueira, 2011; Niño, 2016;

Nakkeeran *et al.*, 2018). La colonización del tejido xilemático es acompañado por la degradación de las paredes celulares y lisis de las células parenquimáticas, seguido por degradación del floema y el cambium en el hospedero (Baayen *et al.*, 1988).

La persistencia de *Fusarium oxysporum* en el suelo por su naturaleza saprofítica facultativa ha permitido su rápida diseminación y resistencia, a su vez, se considera uno de los principales problemas para controlar el patógeno (Filgueira, 2011). A pesar de que los fungicidas aún se consideran una estrategia de control efectivo (Dahal & Shrestha, 2018), su uso continuo e inadecuado genera un impacto negativo en el suelo al reducir o, en casos extremos, eliminar la microflora del suelo, además de su contribución en la contaminación ambiental (Sharma & Raj, 2019). Igualmente, el manejo de monocultivos intensivos genera también deterioro en la salud del suelo e invasión de una manera oportunista de hongos resistentes como *Fusarium oxysporum* (Shen *et al.*, 2017; Nakkeeran *et al.*, 2018).

3.3. Antecedentes fenotípicos y bases genéticas de la interacción planta patógeno

Algunos estudios histopatológicos han logrado detectar diferencias anatómicas posiblemente asociadas a la resistencia, donde se destaca una respuesta prevalente: la lignificación localizada alrededor de las zonas colonizadas por *Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi* (Baayen & Elgersma, 1985; Baayen *et al.*, 1996; Cuervo *et al.*, 2009). Dichos estudios han reconocido la producción de exudados en las células parenquimáticas y en fibras xilemáticas adyacentes al punto de infección de las plantas, dentro de estos se incluyen los fenoles, polifenoloxidasas que participan en la oxidación de polifenoles a quinonas, fitoalexinas, entre otros metabolitos secundarios, especialmente fenólicos, que cumplen una función de defensa antifúngica (Baayen & Elgersma, 1985; Ardila & Higuera, 2005; Curir *et al.*, 2006). Las investigaciones realizadas por Baayen y sus colegas (1996), demostraron no solo la presencia de vesículas que contenían grandes cantidades de geles, sino una respuesta de hiperplasia e hipertrofia en células parenquimáticas entre el xilema afectado y médula en variedades resistentes y susceptibles, seguido por un continuo cambio regenerativo de las células parénquimas únicamente en variedades resistentes (Baayen & Elgersma, 1985; Baayen, 1986; Baayen *et al.*, 1988; Baayen *et al.*, 1996).

Las evaluaciones fenotípicas en las diferentes variedades de clavel ante la presencia de *Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi* (FOX) han permitido reconocer la herencia de la resistencia. En el 2001, Scovel *et al.*, realizaron varios cruzamientos entre variedades

susceptibles y resistentes; mediante las generaciones F2, sugirieron una herencia digénica y aditiva de la resistencia a *Fusarium*. El grupo de investigación de Fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granada tiene un programa de hibridación de los cuales 36 líneas han sido evaluadas para la resistencia a *Fusarium*. Teniendo en cuenta la ploidía del clavel ($2n=30$) y el uso de material madre del programa de hibridación, en el 2012(a), Soto y colaboradores analizaron fenotípicamente la proporción de la distribución de resistencia en la descendencia, determinando así que existe un control genético de la resistencia a FOX asociado con la presencia de tres genes con comportamiento aditivo.

3.4. Mejoramiento de clavel

Para la obtención de características deseadas, el mejoramiento interespecífico ha sido el método tradicional empleado, el cual considera el cruzamiento selectivo entre individuos genéticamente diferentes (hibridación), la endogamia (autopolinización) y selección (OGTR, 2015). El cruce de líneas parentales endogámicas son empleadas en programas de fitomejoramiento para la obtención de líneas puras como es el caso de las generaciones F1 homogéneas (Filgueira, 2010; OGTR, 2015), de esta manera, se adquiere características importantes que mejoran las variedades comerciales (Clavijo, 2007). Sin embargo, las plantas pueden desarrollar depresión de la endogamia (Souza Jr., 2011). Por otro lado, la hibridación sin el empleo de endogamia permitiría la ocurrencia de una forma de reproducción natural, dando como resultado, poblaciones heterocigotas (Filgueira, 2010; OGTR, 2015). A pesar de esto, la hibridación interespecífica ha sido el método más empleado en los cultivos de clavel dando como resultado los claveles actuales, comercialmente importantes por sus características ornamentales favorables (Clavijo, 2007).

El grupo de investigación de Fitopatología Molecular de la UMNG ha venido desarrollando trabajos de genética básica en clavel dirigidos a estudiar la resistencia a FOX. Estos trabajos han permitido conocer el patrón de herencia en clavel: herencia poligénica (Soto *et al.*, 2012a), resultados también obtenidos por Bayeen *et al.* (1996) y Scovel *et al.* (2001). Sobre los resultados del grupo de investigación, se ha predicho las nuevas variedades resistentes a FOX, utilizando métodos convencionales de cruzamiento (Filgueira, 2011).

Una de las estrategias previamente utilizadas, ha sido técnicas moleculares potencialmente vinculadas a rasgos agronómicos importantes de clavel, como el uso de amplificación

aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) para mejorar la longevidad de la flor (De Benedetti *et al.*, 2003) e identificar locus que controlan la resistencia a FOX (Scovel *et al.*, 2001). Igualmente, junto con la técnica estudio de repetición de secuencias simples (SSR), se han construido mapas de enlace genético en líneas derivadas de un cruce entre variedades resistentes y susceptibles a la marchitez bacteriana localizando así un loci de rasgos cuantitativos (QTL) en regiones cromosómicas para la identificación de marcadores nuevos vinculados a rasgos como el contenido de antocianinas en pétalos de clavel, el tipo de flor y genes de resistencia (Yagi *et al.*, 2006; Yagi *et al.*, 2013).

Siendo Colombia el segundo productor de claveles a nivel mundial y el principal proveedor a Estados Unidos (Conlon, 2015; Betancur, 2018), el desarrollo de variedades genéticamente resistentes es una de las mejores maneras en el control de patógenos (Filgueira, 2011). Igualmente, la presencia y disponibilidad de variedades resistentes en los cultivos de clavel podría disminuir los usos químicos contra *Fusarium*, un caso ambientalmente importante (Scovel *et al.*, 2001).

3.5. Fitopatología molecular

Al ser las plantas productores primarios, resultan ser fuente importante de nutrientes para varios organismos, por lo que han desarrollado defensas estructuralmente complejas tanto físicas o químicas y constitutivas o inducidas (Freeman & Beattie, 2008; Afzal *et al.*, 2008; Diaz, 2012). Las barreras constitutivas físicas como cutícula cerosa, pared celular rígida y químicas como algunos compuestos con actividad antimicrobiana y/o compuestos tóxicos proporcionan protección, fuerza, rigidez y respuesta inmediata a cualquier señal de peligro (Freeman & Beattie, 2008; Shamrai, 2014; Nishad *et al.*, 2020). A pesar de esto, carecen del potencial para amplificar la respuesta (Paludan *et al.*, 2021). Por otro lado, las plantas también poseen en su membrana plasmática receptores de reconocimiento de patrones (PRR) con dominios extracelular como las proteínas de tipo receptor (RLP: receptor-like proteins) y dominios transmembranales e intracelulares como las quinasas de tipo receptor (RLK: receptor-like kinases) los cuales al detectar “componentes estructurales conservados de patógenos,” también conocidos como patrones moleculares asociados a microbios (MAMPS) o elicitores exógenos, inician los mecanismos de defensa inducida (Dodds & Thrall, 2009; Toruño *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Igualmente, dichos receptores también reconocen de las plantas patrones moleculares asociados a daños (DAMP) o elicitores endógenos debido al daño causado por microbios (Boller & Felix, 2009). Esta etapa de

reconocimiento de los elicitores por parte de los receptores PRR, desembocan en la inmunidad activada por patrones (PTI), también conocida como defensa basal, que induce flujos de iones a través de la membrana plasmática e incluye cascadas de señalización a través de liberación de especies reactivas de oxígeno (Zhang *et al.*, 2021). Esto induce la elevación de calcio en el citosol, producción de fitohormonas, activación de quinasas dependientes de calcio (CDPK) y quinasas activadas por mitógenos (MAPK), reprogramación metabólica y transcripcional mediados por factores de transcripción, al igual que cambios en la traducción (Bent & Mackey, 2007; Hou *et al.*, 2019; Mata & Spoel, 2019; Nishad *et al.*, 2020), resultando en el reforzamiento de la pared celular con calosa, secreción de proteasas, producción de fitoalexinas entre otras proteínas con actividad antimicrobiana (Toruño *et al.*, 2016).

Sin embargo, tanto los PRR de las plantas como los MAMPS de los patógenos son sujetos a la selección natural que, a través de una adaptación evolutiva, el hospedero o el patógeno adquieren variaciones en sus diversas vías de interacción hospedero–patógeno de manera estratégica (Jones & Dangl, 2006). En términos bioquímicos, la capacidad del parásito para causar una enfermedad es evadiendo el reconocimiento o modulando la inmunidad innata de la planta (Staskawicz, 2001; Petit-Houdénot & Fudal, 2017), contribuyendo así a la virulencia (Bent & Mackey, 2007). El patógeno puede inhabilitar el “sistema de seguridad de las plantas” (Freeman & Beattie, 2008) produciendo proteínas que degradan las PRR, igualmente, enmascarar los MAMPS (Toruño *et al.*, 2016), y promoviendo la fuga de nutrientes de las plantas (Jones & Dangl, 2006), desarrollando así, factores de virulencia conocidos como efectores que pueden interferir intracelularmente con los componentes de PTI e inmunidad activada por efectores (ETI), resultando a una susceptibilidad activada por efectores (ETS) en el hospedero (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Thrall, 2009). Los efectores de hongos filamentosos contienen en sus péptidos secuencia de motivos (motifs) implicados en la translocación dentro del hospedero (Toruño *et al.*, 2016).

Las plantas a su vez han desarrollado receptores inmunes extracelulares e intracelulares llamados proteínas de unión a nucleótidos ricas en leucina (NBL-RR o NLR) que directamente reconocen y se unen a los efectores (Thordal, 2020) o indirectamente reconocen los efectores mediante el seguimiento de la integridad del componente proteico de la célula de planta que es afectado/inhibido/inhabilitado/modificado por el efector, lo cual, conduce al ETI (Jones & Dangl, 2006; McHale *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2018), siendo

el reconocimiento indirecto reportado más número de veces en la literatura (Nguyen *et al.*, 2021). Estas proteínas NLRs, codificadas por los genes resistentes, estructuralmente poseen residuos que tienden a variar, los cuales son expuestos en la superficie de la proteína ya que son los primeros candidatos en determinar la especificidad patogénica (McHale *et al.*, 2006; Bent & Mackey, 2007). Adicionalmente, los dominios CNL-NLR (bobina en espiral o coiled-coil) y TNL-NLR (receptor de toll-interleucina) forman redes de señalización a través de diversas vías para servir como sensores o auxiliares, los cuales cooperativamente median diferentes respuestas de defensa (Anderson *et al.*, 2018; Thordal, 2020). Una de estas respuestas es la muerte celular programada que junto con factores de transcripción dan lugar a una respuesta hipersensible (Zhang *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021), la cual, desencadena la resistencia sistemática adquirida, mediado por diferentes fitohormonas (Marino *et al.*, 2012). ETI amplifica y acelera transcripcionalmente la respuesta de PTI (Cui *et al.*, 2015), sin embargo, la continua interacción entre ambos tipos de respuesta potencia la respuesta inmune (Nguyen *et al.*, 2021).

Cabe resaltar la importancia de los microARN (ARN pequeños de 24 nucleótidos o menos) como mecanismos de defensa y patogenicidad conocido como interferencia de ARN de organismos/ reino cruzado (CKRI: cross-kingdom/ organism RNA interference) (Zhang *et al.*, 2019). Debido a los altos costos en la respuesta inmune de la planta, los microARN regulan estrictamente transcritos ya sea reprimiéndolos y posteriormente degradarlos al unirse complementariamente, cortando las cadenas poliadeniladas o inhibiendo la traducción (Qiao *et al.*, 2021). Se ha encontrado un gran número de actividades reguladas por los miARN en la respuesta inmune de las plantas (Marthur *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). Tanto los patógenos como las plantas hospederas pueden producir miARN que silencian actividades y expresiones de genes (Zhang *et al.*, 2019; Qiao *et al.*, 2021).

3.6. ARN-seq

El uso de secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido la obtención del flujo de información que conforma el dogma central de la biología molecular bajo un mayor rendimiento (Kukurba & Montgomery, 2015). Teniendo como objetivo principal asegurar el orden de los nucleótidos, la tecnología NGS consiste en secuenciar millones de veces fragmentos de ADN simultáneamente bajo un alto rendimiento, creando así una vasta cantidad de datos crudos, lo cual ha generado retos en el procesamiento y preservación de

la información, pero también una alta confiabilidad en ella (Egan *et al.*, 2012). El sistema de Illumina® se basa en el uso de nanotecnología bajo un control preciso del espacio en la matriz y de la simultaneidad secuencial ordenada, resultando en una mayor salida de datos, también conocidas como lecturas (Singh *et al.*, 2015). En la matriz de Illumina Genome Analyzer, cada nano pozo contiene adaptadores que se adhieren a la plantilla de ADNc (DNA template) para su amplificación, formando clusters de plantillas de ADN idénticas por pozo (Egan *et al.*, 2012). Adicionalmente, la tecnología hace uso de fluoróforos que se adhieren a cada nucleótido para su reconocimiento en capturas de imágenes (Egan *et al.*, 2012).

Siendo el transcriptoma esencial para interpretar la funcionalidad del genoma y comprender el desarrollo y la respuesta a enfermedades (Wang *et al.*, 2009; Kukurba & Montgomery, 2015), la aplicación de secuenciación de ARN (RNA-seq) ha sido de gran uso para obtener una anotación génica de acuerdo con un genoma de referencia o un ensamblaje de novo (Li & Dewey, 2011). De dicho perfil transcriptómico, se puede cuantificar los niveles de expresión de transcritos y reconocer la expresión diferencial (Li *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2019), así, descubrir y aislar genes asociados a actividades e interacciones bioquímicas que controlan fenotipos favorables en la planta (Singh *et al.*, 2015).

En el 2012, Tanase y colaboradores construyeron una librería de ADNc de clavel con más de 300,000 transcritos, los cuales fueron clasificados en categorías funcionales (biosíntesis, degradación y señalización) según la ontología del gen con el genoma de referencia *Arabidopsis thaliana*, adicionalmente, detectaron alrededor de 17,000 posibles SSRs en 14,291 unigenes. Yagi y colaboradores (2014), identificaron los diferentes tipos de ARN mediante el uso de diversos programas, igualmente, se asignaron 217 posibles genes de resistencia asociados a genes con repeticiones ricas en leucina, los cuales se distribuyen de forma desigual en el genoma del clavel. Con la aplicación de RNA-seq, una tecnología que se utiliza en el presente trabajo, se logró tener acceso al reconocimiento y actividad de genes que se expresan bajo diferentes condiciones, en este caso, ante la interacción a FOX. El estudio elaborado por Martínez en el 2019 permitió conocer algunas de las rutas metabólicas principales y reguladas de clavel durante la expresión de resistencia a FOX en el apoplasto, igualmente, logró asociar la expresión de posibles genes de resistencia durante la interacción utilizando la herramienta RTqPCR. Sin embargo, hasta el momento

los genes que gobiernan estos mecanismos de defensa para el caso del clavel aún son desconocidos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Propagación de células desdiferenciadas

El programa de mejoramiento de clavel ha realizado diferentes cruzamientos entre variedades silvestres y variedades comerciales (Po), obteniendo así, descendientes híbridos F1 a F3, los cuales han demostrado fenotípicamente niveles de resistencia (R) o susceptibilidad (S) a la presencia de *FOX* (Figura No.1). Las células desdiferenciadas (callos) provenientes de explantes de hojas de plántulas de líneas híbridas, dos resistentes (F1-395 y F2-F1B2) y dos susceptibles (F2-6455 y Po-SH2), fueron consideradas para este experimento. Para la obtención de las células, se aseguró en retirar la base y el ápice de las hojas de micro plántulas para inducir formación de callos a través de heridas (Buraglia, 2013). Estos explantes fueron colocados en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS), al cual se le adiciona hormona 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético 1 ppm), sacarosa y fitagel bajo un pH de 5.88 (Soto *et al.*, 2009). Se mantuvieron en un cuarto aislado a temperatura de 26°C, con luz de 16 horas. Las condiciones del medio de cultivo fueron iguales para la posterior propagación de los callos.

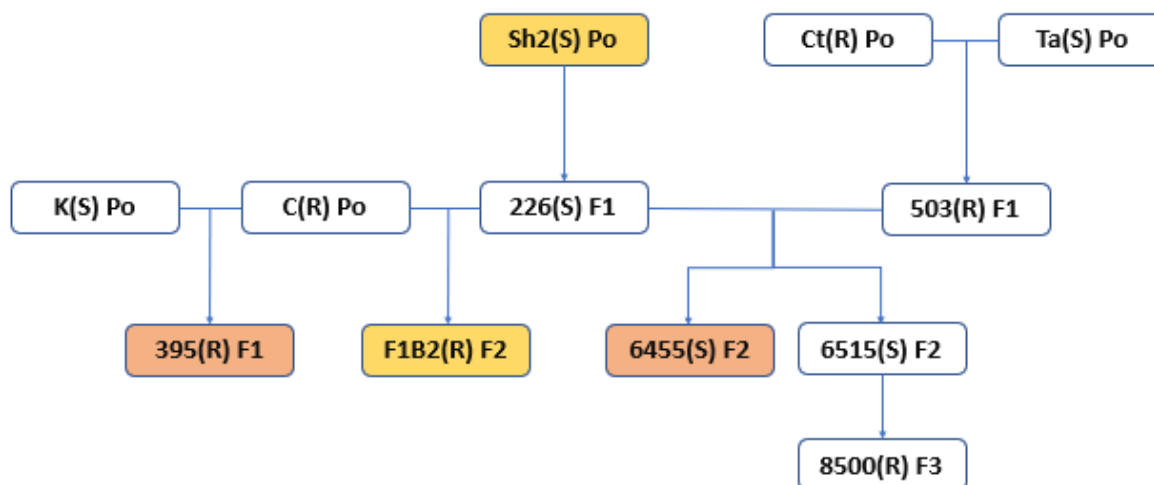


Figura No.1: Árbol genealógico de variedades resistentes (R) y susceptibles (S) de *Dianthus caryophyllus* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*.

4.2. Aislamiento del patógeno

El aislamiento de *Fusarium oxysporum* se obtuvo de tallos de claveles híbridos sintomáticos, cultivados en el invernadero de la UMNG en el municipio de Cajicá, Cundinamarca. Primero, el tallo se desinfectó mediante: lavado con agua destilada estéril (ADE), inmersión en etanol al 70% durante 2 minutos, inmersión en hipoclorito al 5% por 1 minuto y nuevamente lavado profundo con ADE. El tallo se cortó en varios fragmentos y cada uno se sembró en PDA y medio sólido Czapek-Dox broth®, los cuales se incubaron a 26°C durante siete días.

4.3. Obtención de cultivo monospórico y caracterización morfológica

Se hizo un pase del aislado y se sembró por agotamiento en cajas de Petri con PDA, los cuales se mantuvieron en incubadora a 25°C por menos de 24 horas, luego, se aisló un conidio con hifa con el uso de una aguja de insulina, el cual se puso a crecer en el centro de una caja Petri con PDA durante siete días (Buraglia, 2009). Posteriormente, se hizo un pase del aislado en 2mL de medio líquido Czapek donde se dejó crecer durante dos días en un agitador orbital a 90 rpm. Finalmente, se filtró en tubos Falcon de 15 mL para obtener una suspensión de $1,9 \times 10^6$ conidios/mL, confirmado a partir del conteo de conidios en una cámara de Neubauer. Para poder identificar y confirmar que el cultivo monospórico era *Fusarium oxysporum*, se consideraron las estructuras características de este, observadas bajo microscopio, con el uso del manual de identificación de Nelson y colaboradores (1983).

4.4. Elicitación en “Cultivo Dual”

En cajas de Petri con 30 mL de medio de MS, se colocó 3g de callos de las variedades de clavel en un extremo durante un periodo de siete días a una temperatura de 26°C. Posterior a este tiempo, se inoculó 20µL de la suspensión de conidios sobre un círculo de papel filtro estéril de 0.7cm de diámetro al extremo opuesto de la posición de los callos. Para cada variedad se realizaron tres réplicas. Los montajes se mantuvieron en un cuarto aislado a una temperatura de 26°C con luz de 16 horas. Durante un periodo de diez días, se midió la longitud de la masa micelial cada 24 horas (ensayo preliminar). De acuerdo con el crecimiento micelial y previos resultados de Buraglia (2013), a partir del cuarto a sexto día se presenta una indicación de primera respuesta de resistencia, dada por las velocidades de avance del hongo, indicando así, el tiempo más apropiado para la posterior extracción de ARN de los callos: para esto se realizó el mismo montaje de nuevo y se mantuvo bajo las mismas condiciones ambientales durante un periodo de cinco días. Al día quinto del

cultivo dual, se realizó la extracción de ARN de una de las tres replicas para cada variedad de clavel.

4.5. Extracción de ARN total, Calidad y Cuantificación

Se realizaron extracciones de ARN utilizando el Kit de ARN NucleoSpin® basado en la tecnología de aislamiento en membrana de sílice (Matter Methods, 2012; Thermo Fisher Scientific, 2017). Primero, se realizó una ruptura mecánica con el uso de mortero y pistilo para romper la membrana celular en nitrógeno líquido, seguido por el uso del buffer de solubilización (agente caotrópico), el cual contiene sales de guanidina que desnaturalizan las ARNasas y otras biomoléculas excepto los ácidos nucleicos (Hu *et al.*, 2020). La extracción de fase sólida inicia al transferir la mezcla a la columna donde las partículas de sílice adsorben los ácidos nucleicos mientras que el resto de la solución abandona la columna debido a las fuerzas centrífugas (11000rpm por 1min). Mediante varios lavados que regulan el pH y fuerzas iónicas seguido por centrifugaciones y la adición de ADNasa, las partículas de sílice mantienen la adsorción con los ácidos nucleicos de ARN a medida que pasa el ADN digerido y demás contaminantes (Hu *et al.*, 2020). Finalmente, la fase de elución consiste en adicionar una solución acuosa libre de ARNasa con el fin de que el ARN abandone la columna. Inmediatamente, la solución acuosa que contiene el ARN se conserva bajo una temperatura de -80°C. Esta metodología fue llevada a cabo para la extracción de ARN de variedades en condiciones no elicadas 6455 (6455-NE) y 395 (395-NE) y elicadas 6455 (6455-E), 395 (395-E), F1B2 (F1B2-E) y SH2 (SH2-E). La muestra 395-E había sido extraída previamente por Juan José Filgueira en el 2014.

La calidad e integridad de las extracciones de ARN de variedades susceptibles y resistentes de clavel fue observada bajo electroforesis a concentraciones de 1µl de ARN, corridas en 1% de gel de agarosa. El contenido de ARN fue medido por fluometría, un ensayo de cuantificación basado en fluorescencia sensible con el uso del kit Qubit™ RNA Broad Range Assay Kit (Q10211). El compuesto fluorescente exclusivamente se adhiere covalentemente a moléculas de ADN, ARN y proteínas en las muestras con un rango de detección lineal (Invitrogen, 2010; Thermo Fisher Scientific, 2020). La cantidad e integridad del ARN fue igualmente evaluada mediante el sistema bioanalizador Agilent 2100 por MacroGen Inc.

4.6. Secuenciación del transcriptoma, calidad y ensamblaje *de novo*

Las muestras F1B2-E, SH2-E, 395-E, 395-NE, 6455-NE y 6455-E fueron enviadas a Macrogen Inc. para la realización de secuenciación de ARN (ARN-seq). La muestra 395-E extraída en 2014 fue secuenciada por la plataforma HiSeq2000 y las muestras F1B2-E, SH2-E, 395-NE, 6455-NE y 6455-E extraídas en el 2019 fueron secuenciadas bajo el sistema de secuenciación NovaSeq 6000 S4. Para verificar si los datos de secuenciación sin procesar (raw data) proporcionan métricas simples sobre la calidad general de la ejecución, se obtiene un reporte de control de calidad para datos de secuenciación realizada por la aplicación de grafica interactiva FastQC (Legget et al., 2013; McDonald, 2014; Han et al., 2015) a través de la página web <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Las secuencias adaptadoras fueron recortadas con el programa Trimmomatic® para la obtención de lecturas libres de contaminación. Dichas lecturas fueron sometidas al ensamblaje *de novo* usando la plataforma Trinity (realizado por Macrogen Inc.) para la reconstrucción genómica del clavel contenida en el transcriptoma. Bajo esta metodología, las regiones que se sobrelapan entre las lecturas cortas son posteriormente ensambladas a secuencias más largas denominados “contigs” que se representan como los transcritos expresados por el clavel, los cuales son fusionados con otros transcritos únicos no redundantes para la formación de unigenes (Macrogen, 2020).

4.7. Anotación Funcional

Los unigenes fueron comparados con bases de datos públicos para su anotación (BLASTN, BLASTX, NCBI nucleotide, Pfam, Gene Ontology, NCBI non redundant protein, UniProt, EggNOG), la predicción de ORFs (open Reading frames) y el análisis de expresión. Adicionalmente, se utilizó el software Augustus para adquirir las secuencias previamente en forma de nucleótidos a secuencias de proteína, así, conocer la anotación funcional arrojada por Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

4.8. Comparación en los niveles de expresión en las variedades de clavel

Debido a que los códigos de las secuencias de la muestra 395-E extraída en el 2014, difieren con los códigos de las secuencias de las demás muestras extraídas en el 2019, se realizó una comparación secuencial entre los datos 2014 y los datos de la base de datos Kasuza Genome DataBase: Carnation DB de Kazusa DNA Reasearch Institue. Dicha plataforma contiene todos los genes codificantes de proteínas anotadas de clavel con los

códigos que identifican las secuencias de las muestras extraídas en el 2019. Este proceso se realizó con el fin de encontrar homologías más asertivas al considerar el porcentaje de identidad, longitud de alineamiento, discordancia (mismatch), brechas (gaps), y el valor-e (e-value). Con base en dicha información, se seleccionaron únicamente aquellas secuencias con porcentaje de identidad mayor a 97% y con longitudes de alineamiento mayor a 100 bases. De esta manera, se obtuvo un total de 12,041 transcritos homólogos, sobre los cuales se realizó el análisis comparativo en los niveles de expresión.

Los valores de los niveles de expresión fueron analizados manualmente bajo la métrica de cuantificación fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas (FPKM), teniendo en cuenta que su análisis se limita bajo un nivel ordinal (Minikel, 2013). Los niveles de expresión de las variedades resistentes y susceptibles (figura No.2A) fueron comparadas entre las que fueron elicitadas y no elicitadas (Figura No.2B), realizando así una comparación entre todas las variedades (Figura No.2C). La comparación se basó en ordenar los 12,041 transcritos destacando los primeros 100 transcritos con valores de diferencia más grandes entre los niveles de expresión de cada de las comparaciones de variedades presentadas en la figura No.2C (Apéndice 1.1). Sin embargo, de estos 1,500 datos totales destacados, realmente se identificaron 299 transcritos no repetidos (Apéndice 1.2). Con estos, se reconocieron sus posibles genes codificantes de proteínas anotados en la base de datos Kasuza Genome Database: Carnation DB de Kazusa DNA Research Institute; las funciones de cada proteína fueron reconocidas con el uso de la base de datos Uniprot y artículos científicos (Apéndice 1.3). Bajo el orden observados en el apéndice 1.2, se graficaron los transcritos (Apéndice 1.4).

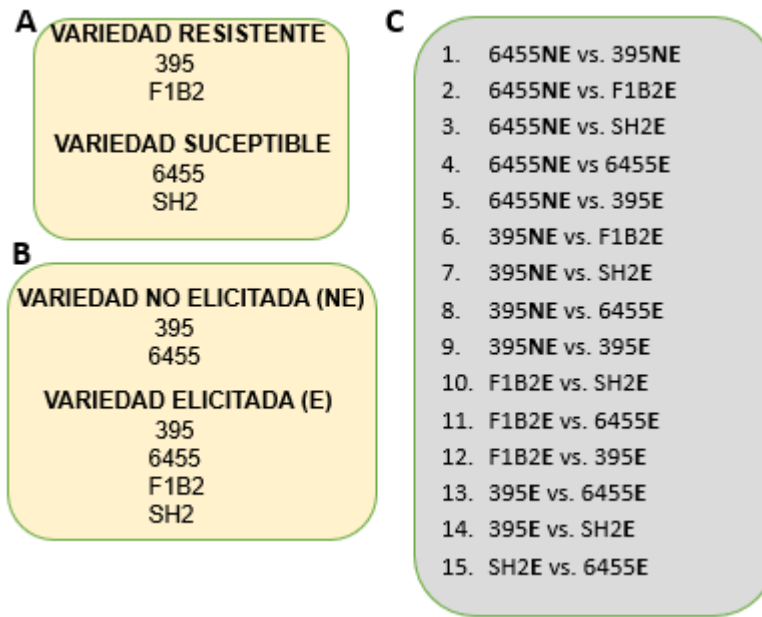


Figura No.2: **A.** Variedades resistentes y variedades susceptibles; **B.** Variedades no elicidadas y variedades elicidadas; **C.** Comparación entre variedades elicidadas (E) con variedades no elicidadas (NE).

Para conocer si en la librería genómica del transcriptoma existen genes diferencialmente expresados, se realizó un análisis estadístico basado en distribuciones binomiales negativas con el paquete R DESeq2 (Love et al., 2015; Yang & Kim, 2015; Anjum et al., 2016; Yue et al., 2018; Zhang et al., 2021), el cual utiliza las lecturas de los 12,041 transcritos de las muestras 395-E, 395-NE, 6455-E y 6455-NE, como entrada.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización morfológica de *Fusarium oxysporum*

Se lograron observar las diferentes estructuras reproductivas producidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi después de 20 días de haberlo cultivado en PDA. En la figura No.3 se observan macroconidios con diferentes tamaños y abundantes microconidios agrupados. En la figura No.4 también se observa grandes cantidades de clamidosporas formadas individuales o en masas.

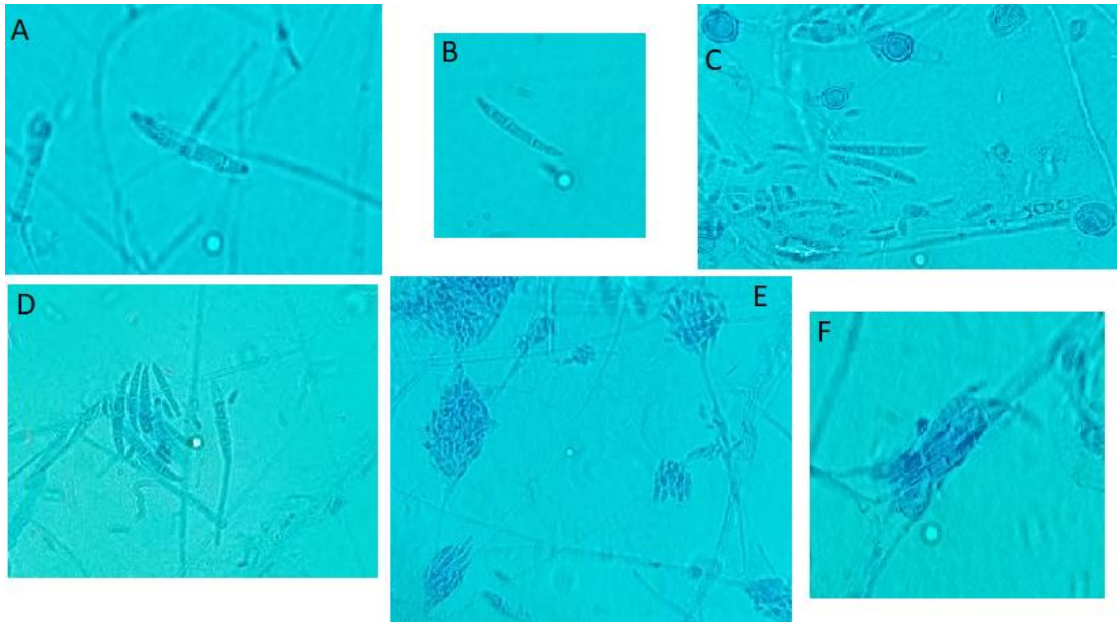


Figura No.3: Estructuras reproductivas de *Fusarium oxysporum* bajo microscopio (100X). **A-D)** macroconidios en diferentes tamaños; **C)** presencia de clamidosporas y microconidios; **E)** fialides con microconidios en masa; **F)** macroconidioforo

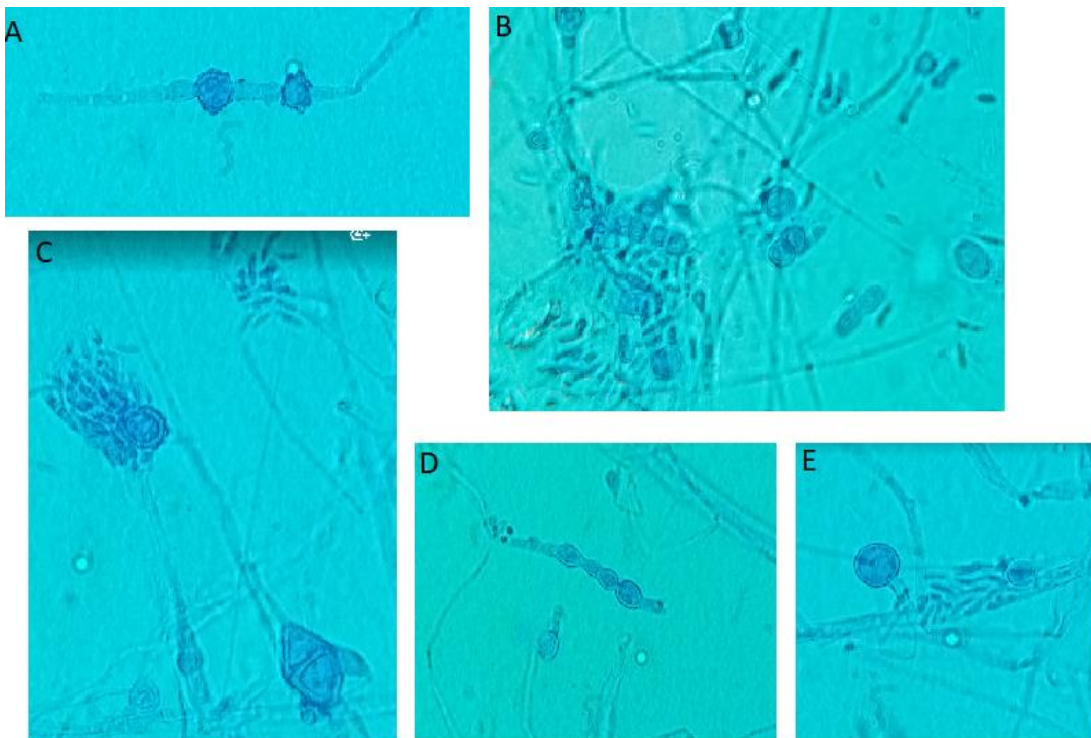


Figura No.4: Estructuras reproductivas de resistencia de *Fusarium oxysporum* (100X). **A-E)** clamidosporas; **B y D)** Clamidosporas en cadenas; **C)** microconidios en fialides; **E)** clamidospora individual.

5.2. Ensayos preliminares y cultivo dual

Los ensayos preliminares se realizaron con el fin de demostrar la patogenicidad de FOX mediante el comportamiento en su velocidad de crecimiento al estar presente frente a las diferentes variedades de clavel en las cajas de Petri con respecto a su crecimiento sin la presencia de las células de clavel. Durante el periodo de 10 días, se logra observar (figura No.5) diferencias en la velocidad de crecimiento donde crece menos en el cultivo dual con la variedad más resistente 395, seguido por la otra variedad resistente F1B2. Mientras, la velocidad de crecimiento en el cultivo dual con la variedad susceptible 6455 se asimila a la velocidad de crecimiento del control (sin presencia de callos, denominado FOX), seguido por el crecimiento en la otra variedad susceptible SH2. Sin embargo, entre los días 4 y 6, las líneas de crecimiento caen bajo una deflexión en los cultivos duales con 395, F1B2 y 6455. Teniendo en cuenta que el hongo fue inoculado siete días después de haber tenido los callos en las cajas de Petri, se estima que el hongo es elicitado como respuesta a la presencia bioquímica de compuestos de los callos, liberando también compuestos entre las 24-72 horas después de inoculación (Groenwald, 2006). Se consideró probable una posible respuesta por parte de las variedades de clavel entre los días 4 y 6, concordando con los días que también reportó Buraglia (2013) como tiempos de primeras respuestas de resistencia por parte de las variedades de clavel.

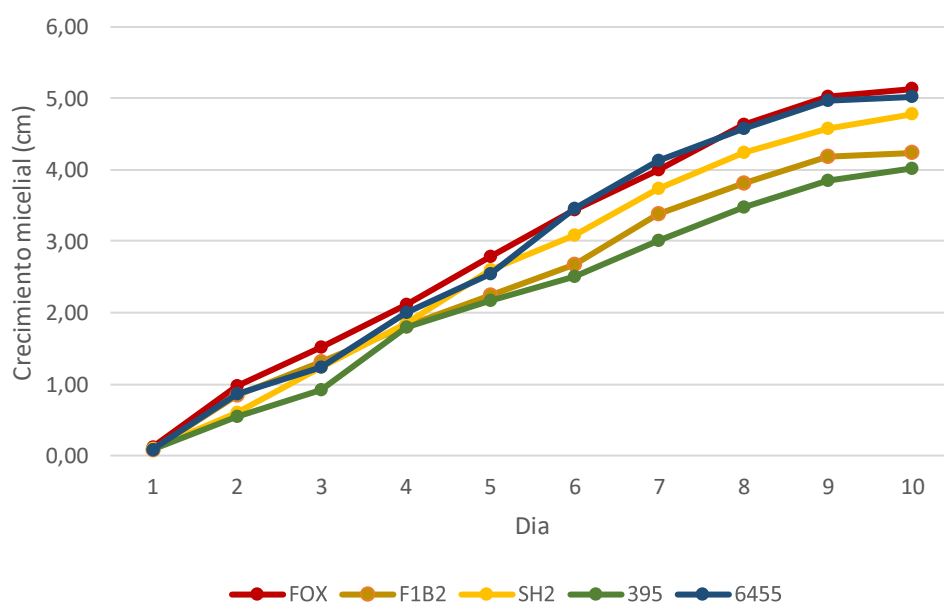


Figura No.5: Crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* en el cultivo dual con diferentes variedades de clavel (F1B2, SH2, 395 y 6455) y sin la presencia de las células de clavel (FOX como control).

En la figura No. 6 se logra observar diferencias en el crecimiento del micelio del hongo frente a las diferentes variedades en el día cinco, posterior a la inoculación fúngica, siendo menor el crecimiento micelial en el cultivo dual con la variedad que presenta mayor resistencia, 395.

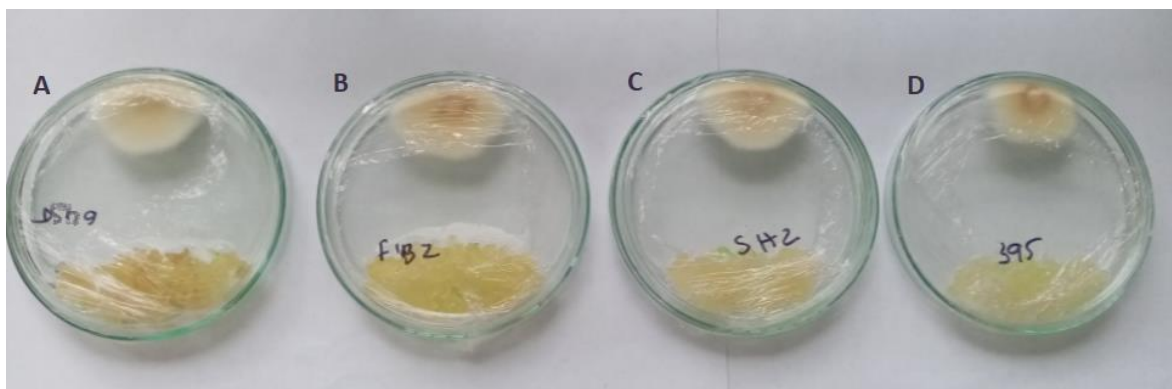


Figura No.6: Cultivo dual entre células indiferenciadas de clavel y *Fusarium oxysporum* previo a la extracción de ARN de cada variedad. **A)** variedad susceptible 6455; **B)** variedad resistente F1B2; **C)** variedad susceptible SH2; **D)** variedad resistente 395.

Una de las observaciones consideradas durante la propagación de las células desdiferenciadas, necesarias para el experimento del cultivo dual, fue evidenciar una coloración característica entre las variedades. En este caso, los cultivos celulares de las variedades susceptibles presentaban coloraciones celulares oscuros mientras las variedades resistentes poseían colores pálidos. A pesar de una continua propagación bajo las mismas condiciones, las coloraciones permanecían siendo características de cada variedad. Por lo tanto, al considerar la figura No. 6, es importante resaltar que la coloración diferenciada, resultado de la producción del pigmento oscuro melanina debido a la oxidación de compuestos fenólicos (Glagoleva *et al.*, 2020), no fue como resultado de la presencia del patógeno.

5.3. Calidad de extracción

Debido a que el ARN total consta de 1-3% de ARNm y 80% de ARN ribosomal, se determina la calidad del ARN extraído en electroforesis por el mayor reflejo de las especies 18S y 28S las cuales tienen una proporción 1:2, respectivamente, además son indicadores de ARN intacto (Palmer & Prediger, 2016). En la figura No. 7, se observa una variación en el contenido del ARN entre las variedades no elicidadas y elicidadas, donde en condiciones no

elicitadas todas las variedades producen menores cantidades de ARN, mientras, todas las variedades bajo elicitación presentan cantidades mayores de ARN, tanto que no se logra observar las barras separadas. Esto se ve reflejado en la cuantificación de las concentraciones presentes en cada muestra, donde aquellas muestras no elicitadas, 6455-NE y 395-NE, presentan menores concentraciones que en sus condiciones elicitadas, 6455-E y 395-E (Tabla No.1).



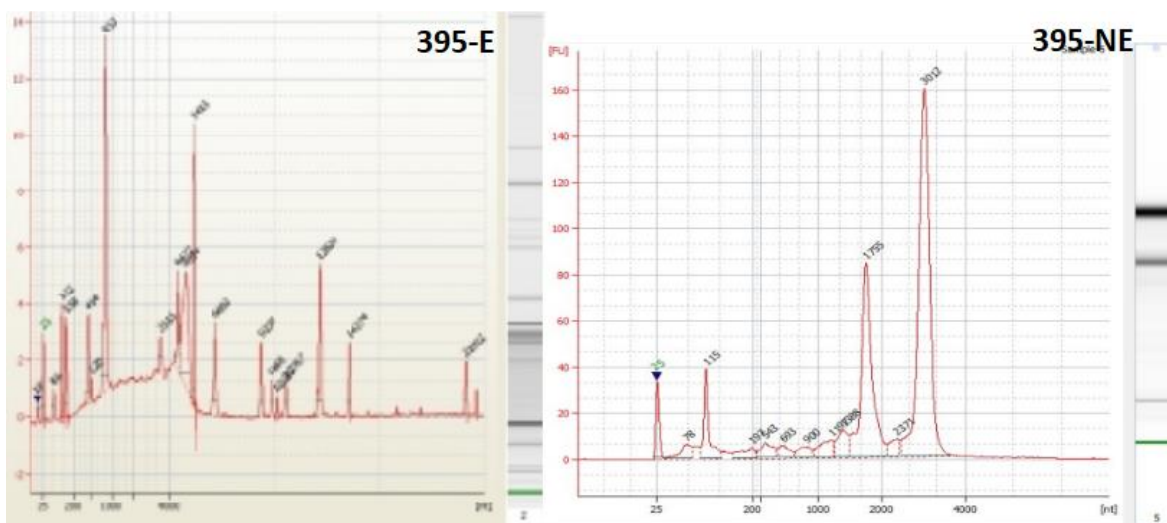
Figura No.7: Integridad del ARN bajo electroforesis de diferentes variedades de clavel no elicitadas y elicitadas con FOX. **F1B2-NE:** variedad resistente no elicitada con FOX extraída por Sebastián Rincón; **SH2-NE:** variedad susceptible no elicitada con FOX extraída por Sebastián Rincón; **395-NE:** variedad resistente no elicitada con FOX; **6455-NE:** variedad susceptible no elicitada con FOX; **F1B2-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **SH2-E:** variedad susceptible elicitada con FOX; **395-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **6455-E:** variedad susceptible elicitada con FOX.

Tabla No1. Concentración de ARN total extraídas de las muestras de clavel.

Muestra	Concentración de ARN vía Qubit (ng/mL)	Concentración de ARN vía bioanálisis (ng/ul)	Numero de integridad de ARN
395-E	55,3	38,602	N/A
395-NE	21,2	31,859	8,7
6455-E	870	1310,291	9,5
6455-NE	256	329,097	8,7
F1B2-E	273	348,058	8,8
SH2-E	59,2	99,075	7,2

395-E: variedad resistente elicitada con FOX; **395-NE:** variedad resistente no elicitada con FOX; **6455-E:** variedad susceptible elicitada con FOX; **6455-NE:** variedad susceptible no elicitada con FOX; **F1B2-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **SH2-E:** variedad susceptible elicitada con FOX.

Dado la abundancia de las subunidades ribosomales 18S y 28S en el ARN total, sus proporciones abundantes deben ser representados en el electroferograma por los picos más altos. El tercer pico debe representar el marcador de bajo peso (25 nucleótidos). Aparte de estos tres, las muestras también pueden presentar diversos picos pequeños, los cuales representan otras subunidades ribosomales de menores pesos, ARNt y fragmentos pequeños (Agilent, 2010). Entre más cercanos estos pequeños picos a la línea base, más intacto el ARN y mayor el número de integridad de ARN (RIN), siendo este el valor que elimina la interpretación individual del control de calidad del ARN (Mueller *et al.*, 2004). Por lo contrario, un ARN degradado tendrá menores cantidades en las proporciones ribosomales y aumento en la señal de la línea base entre los dos picos y el marcador (Mueller *et al.*, 2004). En la figura No.8 se observan los fragmentos 18S y 28S bajo diferentes proporciones en todas las muestras por los picos más altos, igualmente, todos presentan el pico del marcador, sin embargo, la muestra que presenta el mayor ARN intacto es 6455-E, la cual posee el mayor RIN (tabla No1). La muestra extraída en el 2014, 395-E, presenta diversos picos no solo entre el marcador y las subunidades ribosomales sino también picos con pesos superiores, indicando un aumento de ARN digerido/degrado. Igualmente, de acuerdo con la intensidad de las bandas a la derecha de la imagen, la muestra 395-E tiene mayor cantidad de subunidad 18S que de 28S, indicando nuevamente un ARN parcialmente degradado (Agilent, 2010). A pesar de esto, todas las muestras lograron ser aprobadas por MacroGen para su posterior secuenciación.



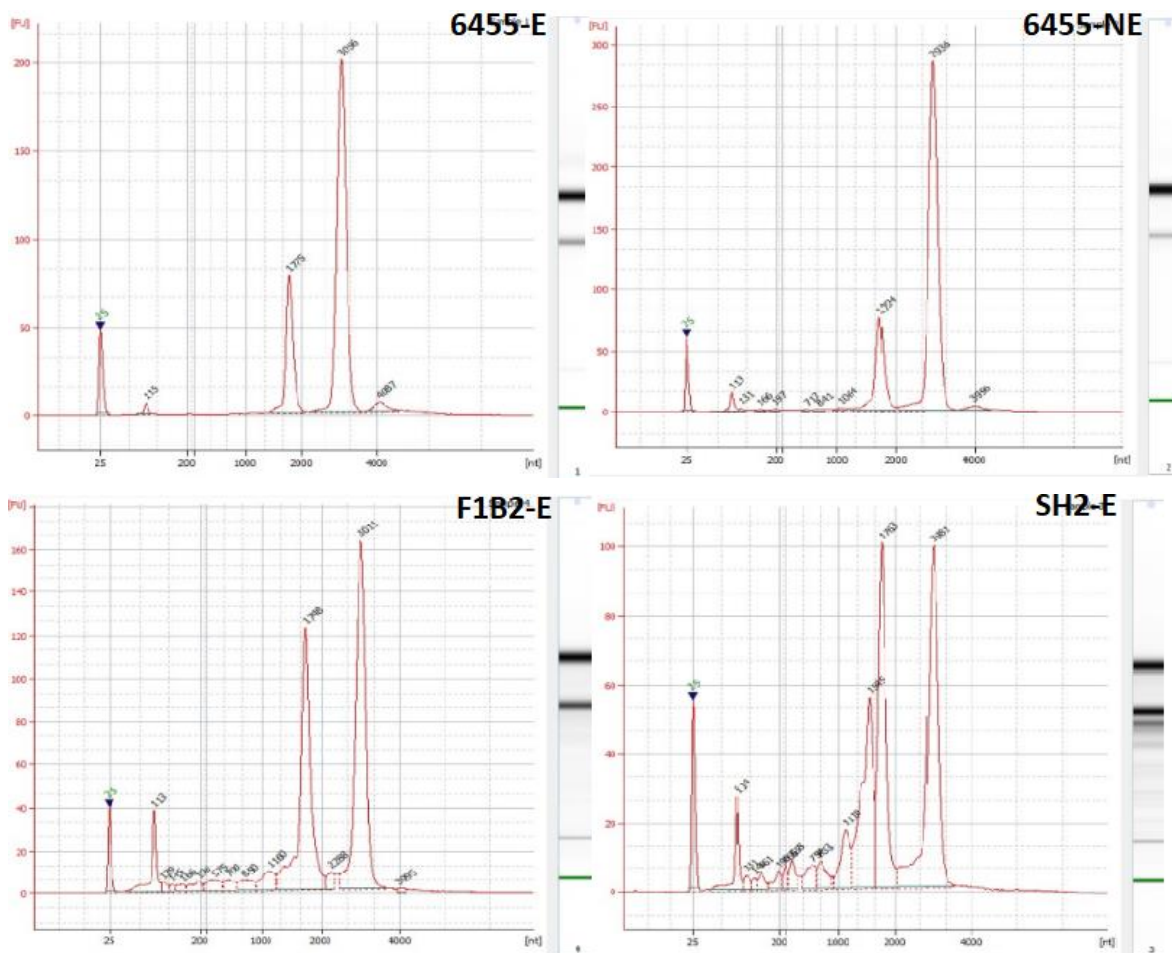


Figura No.8: Calidad de la extracción para cada muestra de clavel bajo el chip bioanalizador ARN Nano 6000. **395-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **395-NE:** variedad resistente no elicitada con FOX; **6455-E:** variedad susceptible elicitada con FOX; **6455-NE:** variedad susceptible no elicitada con FOX; **F1B2-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **SH2-E:** variedad susceptible elicitada con FOX.

5.4. Secuenciación transcriptómica y análisis de calidad

Un total de 6 librerías de ADNc fueron construidas de las cuales 4 variedades fueron expuestas a FOX (SH2-E, F1B2-E, 6455-E y 395-E) y 2 variedades no fueron expuestas a FOX (6455-NE y 395-NE). La tabla No.2 presenta las cantidades de lecturas totales, bases totales, contenidos de GC, Q20 y Q30 para cada muestra, siendo el puntaje de calidad phred 20 (Q20), una precisión del 99%, mientras, el puntaje de calidad phred 30 (Q30), una precisión del 99.9%. Con base en esto, el rango de calidad buena se encuentra en más del 89% de los datos, reflejando la alta calidad de los datos secuenciados crudos, seguido por un aumento en la calidad de los datos recortados con calidad superior al 90%. La mayor

distribución del contenido de GC por lectura se encuentra entre 45-47.3%, siendo este porcentaje normal para regiones provenientes del exoma únicamente (Guo *et al.*, 2014).

Tabla No.2: Resumen del procesamiento de los datos sin procesar y datos recortados en la secuenciación transcriptómica

DATOS SIN PROCESAR						
No.	Muestra	Bases Totales	Lecturas Totales	GC%	Q20%	Q30%
1	395-E	1,211,544,086	11,995,486	46.01	95.31	89.08
2	395-NE	4,098,370,124	27,141,524	45.58	97.92	94.06
3	6455-E	3,541,393,940	23,452,940	47.28	97.99	94.26
4	6455-NE	3,119,586,614	20,659,514	46.37	97.86	93.99
5	F1B2-E	3,446,298,368	22,823,168	46.07	97.92	94.09
6	SH2-E	3,301,945,086	21,867,186	45.52	97.86	93.96

DATOS RECORTADOS						
No.	Muestra	Bases Totales	Lecturas Totales	GC%	Q20%	Q30%
1	395-E	1,130,831,717	11,559,688	45.82	98.76	93.03
2	395-NE	3,908,533,672	26,787,840	45.41	98.55	95.00
3	6455-E	3,393,320,265	23,159,002	47.20	98.59	95.13
4	6455-NE	2,991,248,968	20,368,712	46.30	98.52	94.95
5	F1B2-E	3,282,661,221	22,519,154	45.93	98.55	95.04
6	SH2-E	3,155,704,244	21,549,288	45.44	98.52	94.93

395-E: variedad resistente elicitada con FOX; **395-NE:** variedad resistente no elicitada con FOX; **6455-E:** variedad susceptible elicitada con FOX; **6455-NE:** variedad susceptible no elicitada con FOX; **F1B2-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **SH2-E:** variedad susceptible elicitada con FOX.

5.5. Anotación Funcional

En la figura No.9, se presenta cuales rutas metabólicas requieren de más números de transcritos, en este caso, la ruta de procesamiento de información genética (transcripción, traducción, plegamiento, clasificación y degradación, replicación y reparación), seguido por procesamiento celular (transporte y catabolismo, crecimiento y muerte celular, motilidad y comunicación celular) y procesamiento de información del ambiente (transporte membranal y transducción de señalización) son las principales. Igualmente, se nota que la variedad 395-E presenta menor número de transcritos para las rutas metabólicas consideradas, mientras, 395-NE y las demás variedades poseen similares números de transcritos. Sin embargo, bajo el metabolismo lipídico, 6455-E se asemeja a 395-E. También, se logra detallar que la variedad SH2-E posee un leve aumento en el número de transcritos en la mayoría de las rutas.

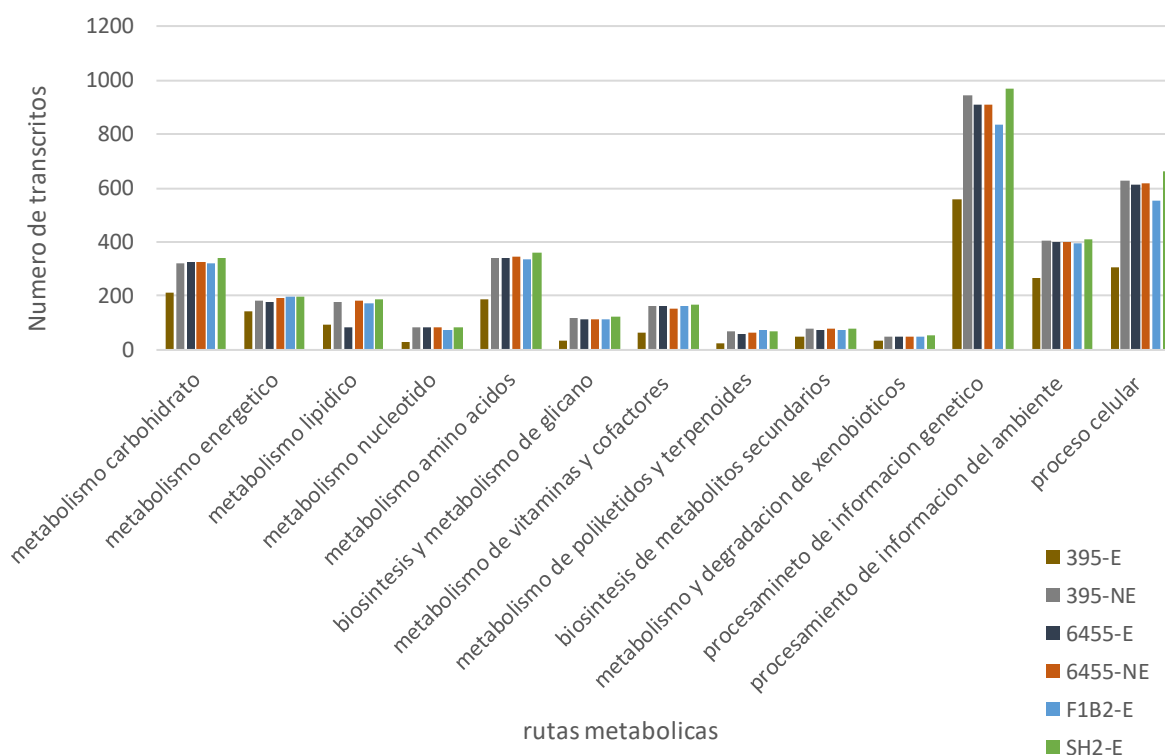


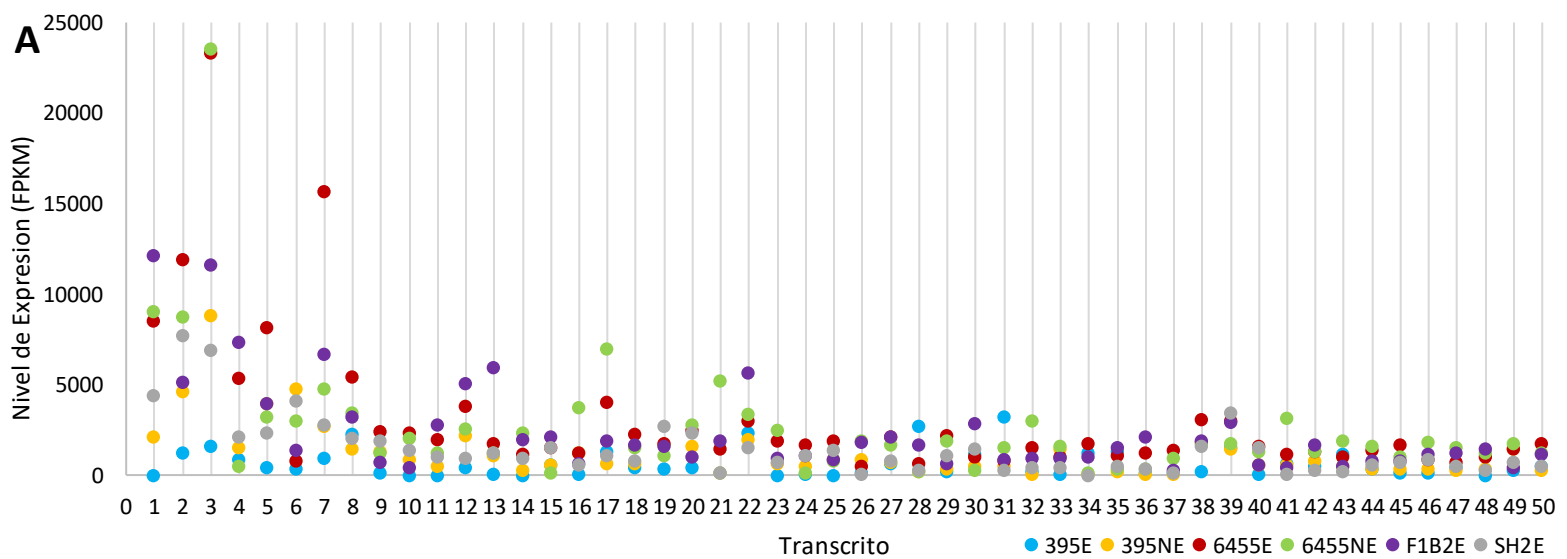
Figura No.9: Numero de transcritos por diferentes rutas metabólicas en las variedades elicidadas, 395-E, 6455-E, F1B2-E, SH2-E y no elicidadas, 395-NE y 6455-NE.

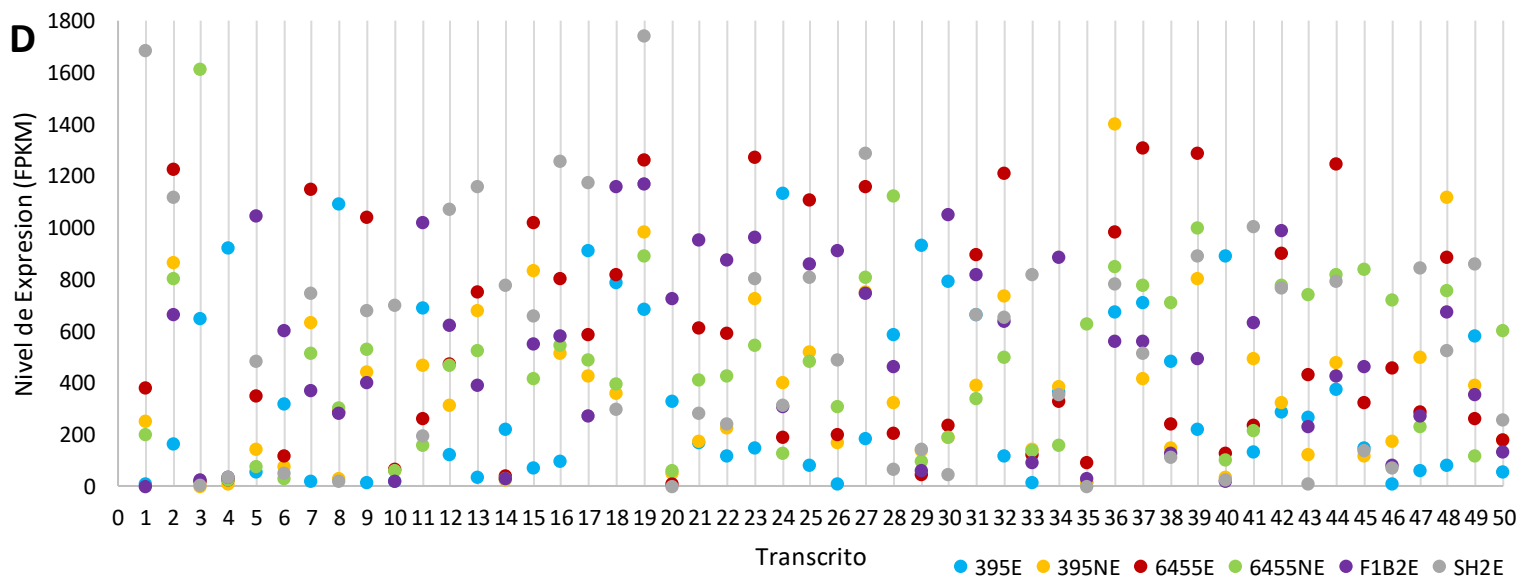
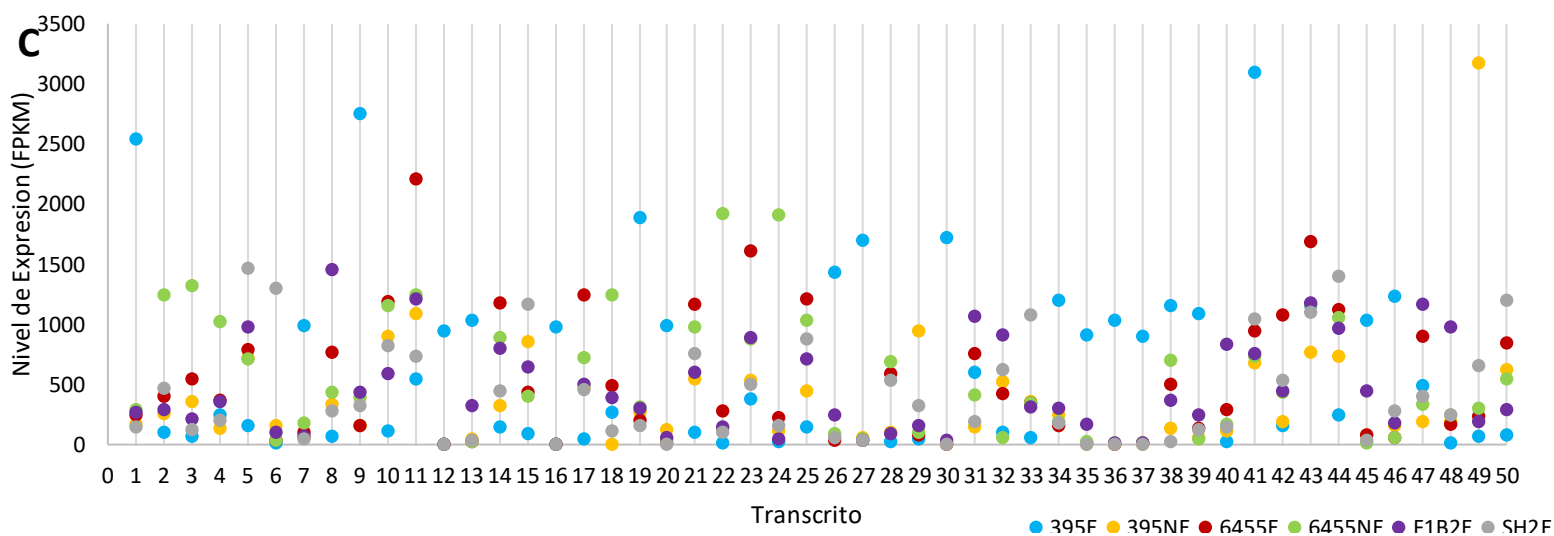
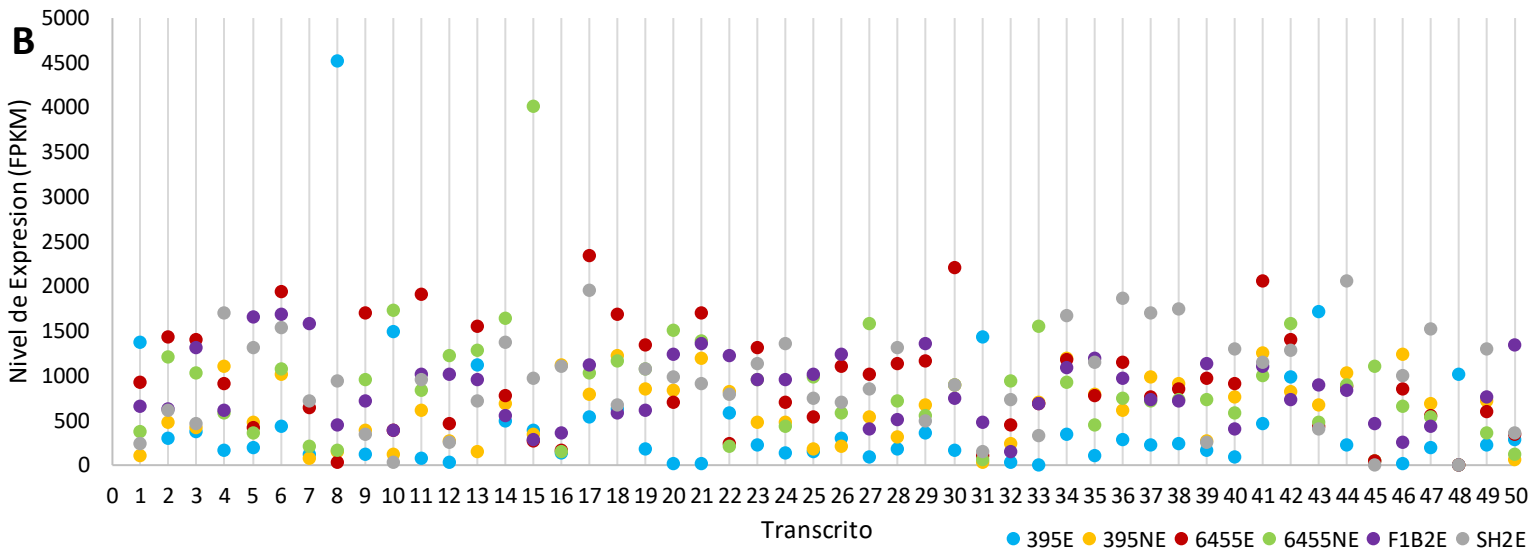
5.6. Comparación en los niveles de expresión

Bajo ambas condiciones experimentales, la variedad susceptible 6455 presenta mayores niveles de expresión en la mayoría de los 299 transcritos analizados (figura No. 10), con unas grandes diferencias en algunos transcritos con respecto a la variedad resistente. Se observan considerables aumentos en los niveles de expresión de 103 transcritos en la variedad susceptible elicitada 6455-E con respecto a la misma variedad en condiciones no elicidadas 6455-NE, mientras, disminuyen las expresiones a niveles muy inferiores en la variedad 395-E con respecto a 395-NE en alrededor 161 transcritos de los 299 transcritos. Sin embargo, 54 transcritos son expresados de manera prominente en 395-E con respecto a 395-NE, 6455-E y 6455-NE. Otro de los escenarios observados es la disminución en los niveles de expresión en las variedades elicidadas, 395-E y 6455-E con respecto a sus condiciones no elicidadas, en 56 de los transcritos analizados.

La variedad susceptible elicitada SH2-E posee mayores niveles de expresión en 63 transcritos, de los cuales, 39 corresponden a la expresión de proteínas ribosomales. La

variedad resistente F1B2-E muestra mayores niveles de expresión en 52 transcritos. En el resto de los 299 transcritos, varían los niveles de expresión, pero, no se asimilan a los niveles de expresión de la otra variedad resistente elicitada 395-E o de 395-NE. Al igual que las variedades 6455-E y SH2-E, la variedad F1B2-E tiende a mantener niveles de expresión altos en los transcritos donde 395-E tiene valores de expresión bajos, hasta por debajo de su control, 395-NE. Al observar con mayor detalle aquellos transcritos en los cuales los niveles de expresión de 395-E son superiores, es notorio la extensa diferencia entre la posición de esta variedad con respecto a la posición del resto de variedades en los niveles de expresión, incluyendo 395-NE. Bajo este contexto, parece ser que las variedades responden de manera diferencial bajo condiciones no elicitadas y elicitadas ya que cada una expresa diferencialmente transcritos codificantes de proteínas importantes en funciones constitutivas, defensa y estrés.





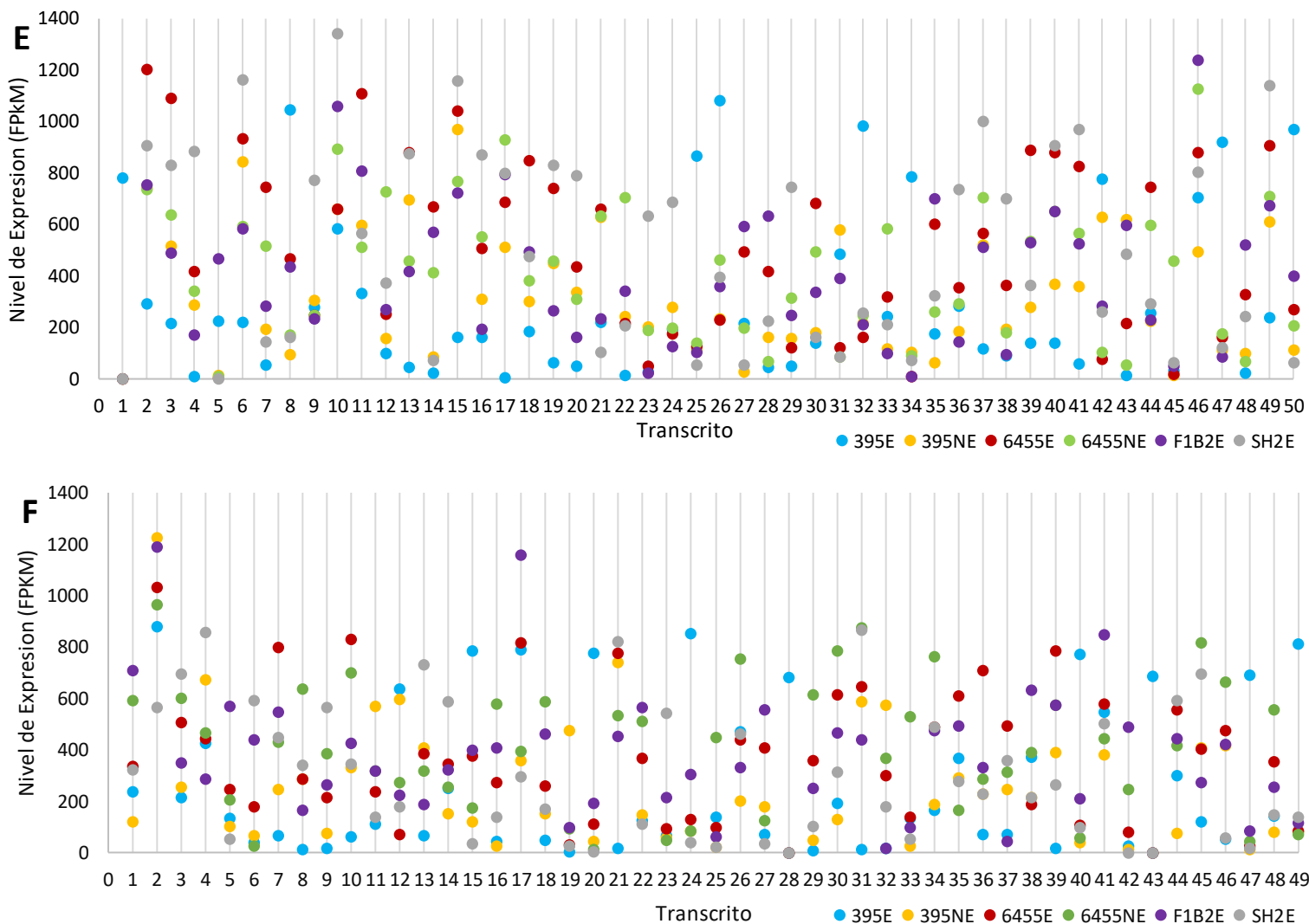


Figura No.10: Niveles de expresión (FPKM) de las variedades 395E, 395NE, 6455E, 6455NE, F1B2E, SH2E a través de los 299 transcritos bajo análisis. **Grafica A** eje x: transcritos 1-50; **Grafica B** eje x: transcritos 51-100; **Gráfica C** eje x: transcritos 101-150; **Grafica D** eje x: transcritos 151-200; **Grafica E** eje x: transcritos 201-250; **Grafica F** eje x: transcritos 251-299. ***Los valores del eje x son iguales por cuestiones de espacio (Ver Apéndice 1.3 para conocer las proteínas codificantes de cada transcrito y sus funciones).** **395-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **395-NE:** variedad resistente no elicitada con FOX; **6455-E:** variedad susceptible elicitada con FOX; **6455-NE:** variedad susceptible no elicitada con FOX; **F1B2-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **SH2-E:** variedad susceptible elicitada con FOX.

A partir de los 299 transcritos resultantes, se realizó una agrupación teniendo en cuenta las funciones que desempeñan dentro de la célula, las cuales se ajustaron en cuatro agrupaciones: funciones proteicas con respuesta a defensa, respuesta a estrés general, respuesta a estrés oxidativo y biosíntesis, desarrollo y control proteico (incluyendo procesos de transcripción y traducción, seguido por una gran variedad de proteínas ribosomales y varios relacionados con mantenimiento celular, construcción de pared celular y metabolismo). Las funciones de los 299 transcritos codificantes de proteínas se encuentran en el Apéndice 1.3.

Al realizar una comparación entre las únicas dos variedades a las que se logró obtener librería genómica del transcriptoma tanto en condiciones elicidadas como en condiciones no elicidadas (395-E, 395-NE, 6455-E y 6455-NE), en la figura No.11 se resalta la distribución de las funciones mencionadas previamente de acuerdo con los transcritos que más se expresan en la variedad 6455-E (figura No. 11a) y variedad 395-E (figura No. 11b) con respecto a sus controles, donde se logra detallar que 6455-E produce mayor número de transcritos con altos niveles de expresión para la categoría procesamiento celular. Por el otro lado, los transcritos con altos niveles de expresión en 395-E son relativamente proporcionales entre las cuatro categorías analizadas.

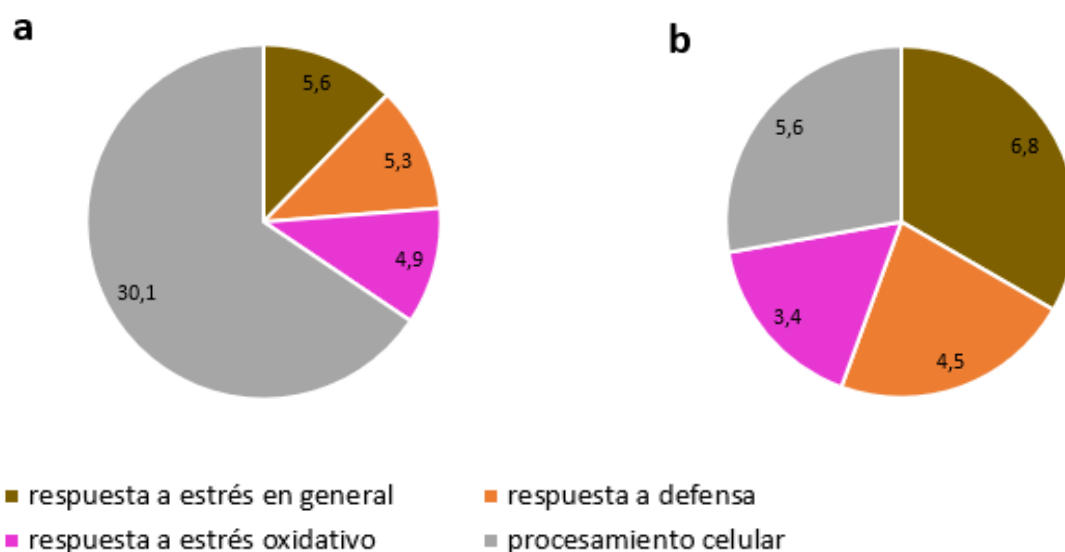


Figura No. 11: Distribución de categorías resaltadas de acuerdo con porcentaje de transcritos más expresados en la variedad susceptible elicitada 6455-E (a) y variedad resistente elicitada 395-E (b).

Con base a la propiedad de distribución estadística, en la figura No.12, aquellos transcritos que más se expresan en condiciones no elicitada están posicionados por encima de la línea

horizontal, donde se llega a observar mayores transcritos, mientras, aquellos transcritos que más se expresan en condiciones elicítadas están ubicados por debajo de la línea horizontal, observando menores cantidades. Este comportamiento coincide con lo observado en la figura No. 10, donde 250 transcritos de los 299 estudiados, se expresan más en condiciones no elicítadas de 6455 (89 transcritos) y 395 (161 transcritos) que en sus condiciones elicítadas.

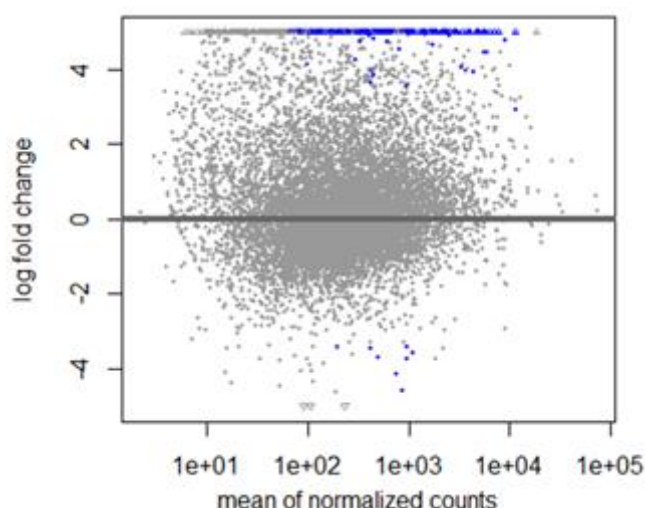


Figura No.12: Posición de los transcritos de acuerdo con la media de las lecturas normalizadas para cada transcrito en relación con la proporción entre condiciones no elicítadas y condiciones elicítadas de variedades 6455 y 395.

En la figura No.13, la mayoría de los transcritos se expresan en cantidades bajas, reflejados por el color azul, sin embargo, la variedad resistente elicitada 395-E presenta algunas barras de color blanco, naranja y rojo lo cual indica que esos transcritos se expresan significativamente más que en el resto de las muestras bajo análisis, incluyendo su control. Adicionalmente, el mapa de calor indica relaciones entre las muestras, en este caso, los valores de expresión entre las muestras 395-NE y 6455-NE se relacionan cercanamente, a su vez, se relacionan medianamente con los valores de expresión de la muestra 6455-E, los cuales se relaciona lejanamente con las expresiones de 395-E.

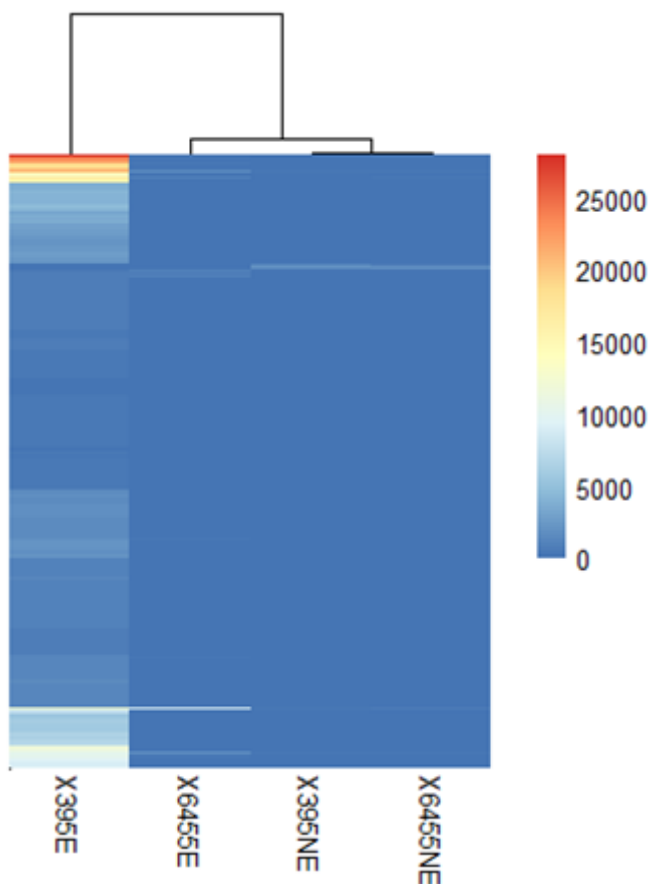


Figura No.13: Valores de expresión sobre lecturas normalizadas de variedades elicidadas y no elicidadas de clavel a FOX. Color rojo indica expresión elevada/superior/signicativa, color azul indica expresiones muy bajas. **395-E:** variedad resistente elicitada con FOX; **395-NE:** variedad resistente no elicitada con FOX; **6455-E:** variedad suceptible elicitada con FOX; **6455-NE:** variedad suceptible no elicitada con FOX.

6. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primera instancia, se logra cumplir con el objetivo general a fondo a partir de los primeros 299 transcritos con las mayores diferencias en la expresión entre las diferentes variedades. De esta manera, se logra identificar cuatro principales categorías de proteínas con funciones constitutivas, defensa, estrés oxidativo y estrés en general, las cuales participan una serie de potenciales proteínas muy posiblemente necesarias en la primera respuesta a la presencia de un patógeno, en este caso *Fusarium oxysporum*. Cabe resaltar que cada variedad se expresa diferencialmente bajo condiciones tanto en ausencia (excluyendo SH2 y F1B2) como en presencia de FOX. Sin embargo, es importante considerar en el transcurso

de esta discusión que, en este estudio se llevó a cabo la extracción de ARNm y consecuente análisis de expresión de una muestra por cada variedad de clavel, por lo tanto, se limita el reconocimiento o precisión en forma de tendencia o patrón de los cambios verdaderamente característicos de cada variedad.

6.1. Naturaleza fisiológica de las células desdiferenciadas

Uno de los principales factores que condicionan, de una u otra manera, la expresión en las variedades es la naturaleza fisiológica de los callos, una masa celular compuesta de células parenquimáticas no especializadas y/o con varios grados de diferenciación (Bhatia, 2015). Igualmente, aunque las plantas generalmente producen callos inducidos por heridas, se ha registrado que estos tienen un patrón/ perfil de expresión génica diferente a los callos inducidos *in vitro* de tal manera que los dos tipos de callos se consideran diferentes en sus propiedades fisiológicas y moleculares (Ikeuchi *et al.*, 2013). Se ha logrado conocer que diferentes tipos de callos de *A. thaliana* poseen perfiles de expresión génica diferentes (Bhatia, 2015). De acuerdo con Feher (2019), los callos inducidos *in vitro* tienen un patrón de expresión génica bien definido. Por último, la disponibilidad de azúcares exógenos tiene un efecto en la regulación de genes, teniendo en cuenta los mecanismos de señalización por azúcares (Zeeman, 2015). Con base a lo anteriormente expuesto, es posible que entre los 299 transcritos bajo análisis se encuentren algunos relacionados con la producción necesaria para construir lo que se encuentra ausente o aun por desarrollar en las células o quizá se encuentre una regulación en la expresión, propia del patrón de expresión génica de los callos inducidos *in vitro*. Igualmente, diversas proteínas cumplen diversas funciones en determinadas condiciones, por lo tanto, es difícil considerar cual y/o cuales funciones se desempeñarían en ausencia o presencia a un patógeno en determinado tiempo de acuerdo con los niveles de expresión.

6.2. Transcritos asociados a los cloroplastos

Ante un crecimiento fotoheterótrofo de los callos cultivados en medios, una fuente de luz apropiada permite la señal de luz inicial para desencadenar la activación de fotorreceptores, siendo estos los iniciadores de la señalización intracelular para el desarrollo de cloroplastos (Dubreuil *et al.*, 2017). A pesar de esto, la función fotosintética realizada en los cloroplastos de callos *in vitro* es bastante reducida o débil (Pashkovskiy *et al.*, 2017). El transcrito C1 (Figura 10: grafica C, #1) codificante de una proteína multisensorial/ fotorreceptora, similar a rodopsina, posee un nivel de expresión prominente y abundante en 395-E, mientras que

el resto de las variedades, incluyendo 395-NE, expresan niveles similarmente muy inferiores. Curiosamente, proteínas como deshidrogenasa de cadena corta putativa (transcrito C30), involucrada en la biosíntesis de la clorofila y señalización de azúcar (Yu *et al.*, 2021) y fotosistema II subunidad R (transcrito D8), responsable de la captura inicial de electrones de moléculas de agua (Järvi *et al.*, 2016), son producidas por 395-E con niveles de expresión bastante superiores que 395-NE y demás variedades. Es pertinente mencionar que la subunidad R del fotosistema II es importante para la estabilidad e integridad de los supercomplejos fotosintéticos, pues se ha registrado que bajos niveles de expresión desestabiliza la unión de los supercomplejos fotosintéticos, reduce la re-oxidación de quinonas, además, de ser la única subunidad que se induce con el cambio de condiciones fotoheterótrofos a fotoautotróficas (Xue *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta que varias subunidades de proteínas fotosintéticas se codifican en el núcleo y otras en los plastidios, la comunicación entre los componentes de codificación nuclear y codificación de plastidios es esencial para el establecimiento de la fotosíntesis (Berry *et al.*, 2013; Dubreuil *et al.*, 2017; Eseverri *et al.*, 2020). Una de las funciones de las proteínas de unión a grupos hemo es actuar como señal derivada de plastidios para la coordinación en la expresión de los genes nucleares (Espinosa *et al.*, 2012), además de proteger contra la toxicidad del hemo libre y agentes ROS mediante una auto regulación o retroalimentación inhibitoria (Chattopadhyay *et al.*, 2015; Shanmugabalaji *et al.*, 2020). Estas proteínas son codificadas por transcritos F20 y F24 y son igualmente expresadas de manera elevada en 395-E con respecto a 395-NE y demás variedades. Con todo lo mencionado previamente, las variedades en estado no elicitado, 6455-NE y 395-NE, mostraron bajos niveles de expresión en estos transcritos. Caso contrario, bajo el estado elicitado por el patógeno, 395-E se destaca sobre las demás variedades inclusive de 395-NE en la producción de proteínas importantes para una transición a un potencial cloroplasto funcional. Mientras, 6455-E reduce sus expresiones en algunos transcritos con respecto a 6455-NE, F1B2-E supera por poco los niveles de expresión de 6455-E y SH2-E posee los niveles más inferiores. Sin embargo, se observa la expresión diferencial entre variedades.

6.3. Transcritos asociados al metabolismo de carbohidratos y respiración

El metabolismo de carbohidratos alimenta varias vías anabólicas y catabólicas, teniendo en cuenta que el flujo de las reacciones depende de los requerimientos y actividades de las células (Zeeman, 2015). El catabolismo de sacarosa es realizado por sacarosa sintasa,

proteína codificada por F35, la cual es expresada principalmente por 6455-E, seguido por F1B2-E y 395-E. Los productos de dicha reacción son fructosa, necesaria para la glucólisis y UDP-glucosa, esencial para la pared celular. En el transcrito B1 codificador de la fructokinasa, 395-E presenta niveles mayores que 395-NE, inclusive, superando los niveles de expresión de las demás variedades. Las fructokinasas son esenciales en la vía de fosfato de hexosas, al fosforilar la fructosa 6-fosfato a fructosa 1-6-bifosfato, producto necesario en la continuación de la glucólisis. La enzima fructokinasa juega un papel muy importante en direccionar el metabolismo de los carbohidratos hacia distintas vías metabólicas bajo diferentes condiciones ambientales, influyendo en las vías de señalización (Gupta & Narinder, 2005; Stein & Granot, 2018), la regulación en la síntesis de almidón, el desarrollo de las fibras del floema y xilema y en la partición de carbono a la celulosa (Stein & Granot, 2018), además de ser activado para satisfacer las demandas respiratorias y biosintéticas en tejidos no fotosintéticos (Zeeman, 2015). Su producto, fructosa 1-6-bifosfato, puede ser posteriormente catalizado por la fructosa-bifosfato aldolasa para formar dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehido-3-fosfato, otra reacción clave en la ruta de glucólisis. La fructosa-bifosfato aldolasa, codificada por el transcrito E18, se expresa mayoritariamente en 6455-E, superando 6455-NE, y las demás variedades. Mientras, 395-E disminuye su nivel de expresión con respecto a 395-NE.

Por otro lado, la transaldolasa, cataliza la reacción de fructosa 6-fosfato y eritrosa 4-fosfato a sedoheptulosa 7-fosfato y gliceraldehido-3-fosfato, una reacción clave en la fase reversible no oxidativa de la ruta pentosa fosfato, donde se redistribuye el flujo de carbón para la síntesis de diversos aminoácidos, lípidos, polisacáridos y metabolitos (Tittman, 2014; Labbé, 2009; Zheng *et al.*, 2020). Dicha enzima es codificada por el transcrito B43, donde 395-E se expresa en mayores cantidades que 395-NE y F1B2-E, mientras 6455-E, 6455-NE y SH2-E expresan niveles inferiormente similares. Mediante cualquiera de las dos aldolasas, se adquiere gliceraldehido-3-fosfato, molécula que puede ser catalizada por la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa para producir 1,3-bifosfoglicerato en la vía glucolítica y que es representada por el transcrito A8, donde los niveles de expresión aumentan en 6455-E y 395-E con respecto a 6455-NE y 395-NE, igualmente, F1B2-E y SH2-E se acercan a las elicadas. La proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa es una catalizadora importante en la producción de energía glucolítica en plastidios no verdes a través de la transformación de almidón para producir aminoácidos como la serina, glicina, cisteína, metionina y otras moléculas necesarias para la biosíntesis de ácidos grasos

(Muñoz *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2019), además de responder ante el estrés oxidativo (Meng *et al.*, 2016a).

Uno de los compuestos importantes en la glucólisis es 3-fosfoglicerato, adquirido por la transformación de 1,3-bifosfoglicerato y por la transformación de ribulosa 1,5-bifosfato, siendo este último catalizado por ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco), la cual es codificada por el transcrito A34 donde sus niveles de expresión aumentan de manera evidente en 6455-E y 395-E con respecto a ambos controles, mientras, F1B2-E también expresa niveles de expresión altos y SH2-E expresa cantidades muy bajas. Es pertinente mencionar que los plastidios contienen Rubisco activo el cual cataliza de manera simultánea y competitiva las dos reacciones, carboxilación y/u oxigenación al adquirir dióxido de carbono y/u oxígeno de las vías metabólicas ocurrientes. Una de las siguientes enzimas en la ruta de glucólisis es la enolasa, catalizadora de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, codificada por transcrito B23 donde se observan mayores cantidades en 6455-E, SH2-E y F1B2-E, mientras, 395-E posee el menor nivel, hasta inferior a 395-NE. Dicho producto es posteriormente catalizado por fosfoenolpiruvato carboxilasa para formar oxalacetato, metabolito intermediario necesario en varias rutas metabólicas. Dicha enzima es codificada por el transcrito E28, con mayores expresiones en 6455-E mientras el resto expresan niveles inferiores.

La enzima malato deshidrogenasa citosólica cataliza la reducción de oxalacetato a malato, la cual es codificada por el transcrito C10 donde se logra observar una expresión similar y elevada de 6455-E y 6455-NE mientras 395-E disminuye bastante su expresión con respecto a 395-NE. Por otro lado, 395-E expresa mayores cantidades del transcrito C34 codificador de la enzima isocitrato deshidrogenasa [NADP] citosólica, mientras todas las demás poseen niveles de expresiones bastante inferiores y similares. Dicha enzima utiliza el citrato disponible en el citosol para generar alfa-cetoglutarato para la asimilación o transaminación de amoníaco en el citosol y plastidios (Millar *et al.*, 2015). Aquí, el grupo amino es transportado de alfa-cetoglutarato a glutamato para formar aminoácidos como glutamina por la enzima glutamina sintasa, otra enzima bastante importante en la vía metabólica del ácido cítrico y que es codificada por transcrito A27 donde 6455-E y F1B2-E son superiores a 6455-NE y SH2-E, 395-NE y 395-E se expresan en menores y similares cantidades. Por supuesto es también importante destacar la importancia de los transportadores o particionadores de carbohidratos entre las vías metabólicas, localizados

en las envolturas membranales de diferentes compartimentos. Una de estas proteínas transportadoras de azúcares es representada por el transcrito C7, la cual se expresa principalmente en 395-E mientras las demás se expresan en cantidades similares y demasiado inferiores.

Con base a todo lo descrito anteriormente, en la variedad 395 expuesta al hongo se logra detallar, primero, eleva bastante su expresión en la transaldolasa y reduce en la fructosa-bifosfato aldolasa, indicando un mayor direccionamiento metabólico hacia la ruta pentosa fosfato. Segundo, reduce la producción de enolasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato deshidrogenasa citosólica indicando una disminución en la culminación glucolítica. Algunas enzimas pueden ser inhibidas en la ruta glucolítica para ser útiles en otras actividades como en el suministro de carbono para la asimilación de nitrógeno y biosíntesis de aminoácidos (Zeeman, 2015), lo cual podría explicar el aumento de la enzima isocitrato deshidrogenasa citosólica y también la expresión similar de glutamina sintasa en 395-E y 395-NE. Tercero, requiere de bastantes proteínas transportadoras de azúcares. Los transportadores de azúcares actúan como señalizadores de azúcar, activando así vías de señalización citosólica (Zeeman, 2015). Debido a la ausencia de algunas enzimas pertenecientes a la vía pentosa fosfato en el citosol como la transaldolasa, la presencia de transportadores en las envolturas membranales de compartimentos es esencial para el flujo de compuestos en varias vías metabólicas (Zeeman, 2015). Simultáneamente, el transcrito D29 es más expresado por 395-E que el resto, siendo F1B2-E y 6455-E los que menos lo expresan. Dicho transcrito codifica la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa, encargada de utilizar UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato para formar trehalosa-6-fosfato, metabolito intermediario biosintético de la trehalosa, es un compuesto de señalización biológicamente activo en las plantas que, al reconocer la sacarosa, refleja los niveles y el estado de esta (Zeeman, 2015) y regula su utilización (Ponnu *et al.*, 2011). De acuerdo con Paul y colaboradores (2018), el aumento de los niveles de trehalosa-6-fosfato promueve el flujo de carbono hacia vías biosintéticas de crecimiento, mientras, su disminución promueve el flujo de carbono hacia las vías de reserva de carbono.

Adicionalmente, el transcrito A28, codificador de la proteína B12D, es el quinto más expresado por 395-E con respecto a 395-NE y demás variedades. Las proteínas con dominio B12D son proteínas ancladas a la membrana mitocondrial implicadas en el tráfico de membranas mediadoras de hierro y oxígeno, además de la coordinación en la expresión

de genes relacionados (He *et al.*, 2014; Almutairi, 2022). Otro transcrito expresado principalmente por 395-E es transcrito E50, codificador de carboxyfosfoenolpiruvato mutasa, una de las enzimas que actúa sobre los enlaces carbono-fosforo de fosfoenolpiruvato para formar su estructura isómera, fosfonopiruvato, siendo este la primera transformación de los compuestos fosfonatos encontrados en lípidos, oligasacáridos, proteínas y metabolitos secundarios (Narayanam, 2008; Christie, 2022). Existe una gran variedad de organismos que contienen fosfolípidos en sus membranas, los cuales podrían conferir estabilidad hidrolítica y resistencia a la degradación por lipasas (Wang *et al.*, 1993). Por último, 395-E también expresa mayores cantidades del transcrito E25, codificador de hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, la segunda enzima requerida en el catabolismo de tirosina al transformar el segundo producto, hidroxifenilpiruvato a ácido homogentísico. Las demás variedades poseen niveles de expresión notablemente inferiores y similares. La degradación de la tirosina es una fuente de energía importante en el metabolismo de carbohidratos al generar mayores cantidades de ATP en su degradación que cualquier otro aminoácido, además de ser precursor de varios intermediarios del ciclo de Krebs y de diversos metabolitos como las benzoquinonas isoprenoides, siendo estos los principales transportadores de electrones y protones en las cadenas de transporte fotosintéticas y respiratorias (Wang *et al.*, 2019) y también realizan la función como antioxidantes en sus formas reducidas (Nowicka *et al.*, 2010).

Por el otro lado, 6455 expuesta al hongo, primero, aumenta la producción de las enzimas glucolíticas, siendo malato, piruvato y oxalacetato los sustratos mitocondriales prevalentes en tejidos no fotosintéticos o en condiciones oscuras (Millar *et al.*, 2015). Además, la oxidación del malato reducido en el mitocondria está asociado con mayor síntesis de ATP que su oxidación por deshidrogenasas en el citosol (Millar *et al.*, 2015). Segundo, la posible explicación del aumento de glutamina sintasa puede deberse para evitar posible acumulación del producto amoníaco en el mitocondria al reasimilarlo en el plastidio a través de dicha enzima, entre otras (Millar *et al.*, 2015). Adicionalmente, se logra observar un aumento en la expresión del transcrito F21 codificador de la alfa-1,4-glucano sintasa (formadora de ADP), proteína necesaria en la síntesis de almidón, en variedad 6455-E con respecto a 6455-NE, mientras, 395-E disminuye casi por completo con respecto a 395-NE. El transcrito A1, codificador de la subunidad beta de la ATP sintasa, es uno de los primeros más expresados por F1B2-E, 6455-NE y 6455-E, respectivamente, seguido por SH2-E y 395-NE. Tanto 6455-NE como 6455-E lo expresan en cantidades muy superiores en

comparación con 395-NE y 395-E, el cual no lo expresa o quizá no es percibida su expresión. La subunidad beta es la única que cataliza la fosforilación de ADP para producir ATP, además de liberarlo a la matriz. De acuerdo con Chivasa y colaboradores (2011), las cantidades de ATP extracelular influyen en varios procesos fisiológicos, por ejemplo, bajo la presencia de una micotoxina de *Fusarium*, se inactivaba la señalización mediada por ATP extracelular al desencadenar un colapso en sus niveles en cultivos de células de *Arabidopsis*.

Tanto 395-E y 6455-E aumentan la producción de fructokinasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y Rubisco, las cuales conducen la producción del mismo intermediario metabólico y que ocurre en varios compartimentos: 3-fosfoglicerato. Otro de los más expresados por F1B2-E, 395-E y 6455-E, respectivamente, es el transcrito A35, codificador de alcohol deshidrogenasa, enzima catalizadora de la reducción de acetilaldehído, derivado del piruvato, a etanol. Aunque dicha reacción ocurre usualmente en condiciones carentes de oxígeno (Shinozaki *et al.*, 2015), el aumento de su expresión está relacionada con la acumulación de azúcares solubles y expresión de genes relacionados con ácido salicílico bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, sin embargo, se desconoce su participación directa (Shi *et al.*, 2017).

Variedades SH2-E, 395-E y 6455-E expresan mayores cantidades del transcrito D17, respectivamente. Dicho transcrito codifica el dominio proteico CX9C, el cual se comporta como un sustrato contribuyendo al plegamiento de proteínas en el espacio intermembranal del mitocondria, un mecanismo de intercambio crucial en la comunicación entre este organelo con el resto de la célula (Banci *et al.*, 2012). Se observa que, en condiciones sin la presencia de FOX, ambos controles, 6455-NE y 395-NE poseen niveles de expresión similares. La variedad F1B2-E poseen niveles de expresión inferiores a los dos controles mencionados previamente.

6.4. Pared Celular

La pared celular es una elaborada red extracelular continuamente cambiante y conformada por varias redes. Algunos estudios han utilizado los callos *in vitro* como modelo para el estudio de los mecanismos que regulan la diferenciación y reprogramación celular (Kukzak *et al.*, 2020) y para el estudio de la formación y lignificación de las paredes celulares (Christiernin *et al.*, 2005). Es importante también mencionar que la constitución o carácter

de la pared celular se sintetiza, modifica y reorganiza en relación con los cambios en el destino celular y su programa morfogénico (Kuczak *et al.*, 2020; Popielarska *et al.*, 2020). De acuerdo con Zeeman (2015), “la biosíntesis de la pared celular puede ser limitada a una fase definida de crecimiento y expansión, y apenas la célula este completamente expandida, otras vías metabólicas dominan.” A pesar de que los callos al igual que las células parenquimáticas, poseen únicamente pared celular primaria, la arquitectura de la pared celular en condiciones *in vitro* es diferente. Por ejemplo, se ha registrado una reducción en la tasa de síntesis de celulosa (16-17%) en cultivos de callos *in vitro* de cebada con respecto al contenido de celulosa en la pared celular (55-67%) de las hojas (Yeo *et al.*, 1995). También se ha reportado presencia de proteínas posiblemente asociadas a la diferenciación celular en la pared celular de cultivo de callos de *A. arguta* (Popielarska *et al.*, 2020). Otro ejemplo es la enzima xiloglucan endo-beta-transglucosylasa, la cual no puede inducir la expansión de la pared celular en condiciones *in vitro* (Carpita *et al.*, 2015). Con base a esto, es posible considerar en este análisis que la composición, proporciones y funciones del contenido superficial de los callos *in vitro* sea diferente, y, por lo tanto, su expresión también, tanto en condiciones no elicitadas como elicitadas por un patógeno.

6.5. Transcritos asociados a la pared celular

Entre los 299 transcritos, varios codifican proteínas con funciones importantes en la conformación de la pared celular, entre otra serie de funciones. La pared celular primaria está conformada por diferentes redes estructuralmente independientes, pero interconectadas (Zeeman, 2015). La red principal está compuesta por celulosa y glicanos entrecruzados. Un enzima marcador, inclusive en los callos, de la síntesis de celulosa, es la presencia de sacarosa sintasa, la cual sintetiza el sustrato UDP-glucosa a partir de la sacarosa, esencial también para polisacáridos no celulósicos (Carpita *et al.*, 2015). El transcrito F35, codificador de dicha enzima es expresado más en 6455-E y 395-E que sus respectivos controles y SH2-E y F1B2-E se encuentra entre ambas elicitadas. Por otro lado, una de las dos grandes familias de proteínas en la reestructuración de la red entre celulosa y glicano entrecruzado es la familia xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa, responsable de escindir y unir nuevamente cadenas de xiloglucano a otras cadenas de xiloglucano para reorganizar la arquitectura de la pared celular sin cambiar su composición (Carpita *et al.*, 2015), esto con varios fines. Esta enzima es codificada por transcrito D9 donde 6455-E aumenta bastante su expresión con respecto a 6455-NE, mientras 395-E disminuye bastante su expresión con respecto a 395-NE y por transcrito E17, donde 6455-

NE, SH2-E y F1B2-E son superiores, 6455-E disminuye con respecto a 6455-NE, pero disminuye más 395-E con respecto a 395-NE. Se ha considerado que la actividad reestructuradora de la transglucosilación puede ser importante en el fortalecimiento de la pared (Sharmin *et al.*, 2012) y como posible respuesta a varios tipos de estrés (Meng *et al.*, 2016a). Adicionalmente, dependiendo de las interacciones bióticas y abióticas, en la pared celular primaria se puede incorporar diversas proteínas y lignina para proteger su integridad (Carpita *et al.*, 2015). Aquí, la red fenilpropanoide juega un papel importante al estar conformada de lignina.

El segundo transcrito más expresado por 395-E es A31, codificador de una proteína del dominio transmembranal de la tira de Casparian, pertenecientes a la familia de proteínas no caracterizadas UPF0497, el cual aumenta drásticamente con respecto a 395-NE, mientras, 6455-E disminuye con respecto a 6455-NE y las expresiones de F1B2-E y 6455-E se asimilar. Las proteínas del dominio membranal son fundamentales en la formación de la tira de Casparian al anclar la membrana plasmática a la pared celular (Yang *et al.*, 2015) y guían la deposición local de la lignina (Li *et al.*, 2018).

6.6. Transcritos asociados al metabolismo fenilpropanoide

La primera enzima de este metabolismo, fenilalanina amoniaco liasa, codificada por transcrito C8, es expresada principalmente por variedad F1B2-E, mientras, 6455-E aumenta su expresión con respecto a 6455-NE y 395-E disminuye su expresión con respecto a 395-NE. Las variedades 6455-NE, 395-NE y SH2-E poseen niveles de expresión cercanos. Su producto, cinamato, es transformado a p-cumarato por la enzima cinamato 4-hidroxilasa, la cual es codificada por el transcrito C32, donde, igualmente, F1B2-E expresa mayor cantidad, en 6455-E aumenta la expresión con respecto a 6455-NE y 395-E disminuye su expresión con respecto a 395-NE. En este caso, los niveles de expresión de SH2-E, 395-NE y 6455-E se acercan. Los niveles de expresión de estas dos enzimas mencionadas se asimilar en 395-E. Enzimas requeridas en la formación de diferentes clases de lignanos es secoisolariciresinol deshidrogenasa codificada por transcrito E14, la cual, igualmente, es expresada en mayores cantidades por 6455-E y F1B2-E, mientras, 395-E disminuye con respecto a 395-NE. Igualmente, cafeoil CoA O-metiltransferasa, codificado por transcrito F18 es expresado más en F1B2-E, mientras disminuye la expresión en 6455-E y 395-E con respecto a sus controles.

La enzima lacasa es esencial en la oxidación de varios sustratos generados en la vía fenilpropanoide (Janusz *et al.*, 2020). A pesar de la disminución de esta vía metabólica por 395-E, el nivel de expresión de dicha enzima (transcrito F47) es notoriamente superior que el resto de las variedades, las cuales se asimilan a la expresión de 395-NE. Se ha considerado que la expresión diferencial de dicha enzima se relaciona con la especificidad de sustrato necesaria de acuerdo con los factores de estrés reconocidos (Janusz *et al.*, 2020). Adicionalmente, se ha registrado paredes celulares primarias lignificadas en cultivo de células de álamo, junto con aumentos de actividades proteicas como lacasa y peroxidasa durante la formación de lignina, bajo la ausencia de una pared celular secundaria (Christiernin *et al.*, 2005).

6.7. Transcritos asociados a proteínas multifuncionales

Una proteína esencial, multifuncional y requerida en los procesos catalíticos de muchas enzimas es el citocromo P450, el cual cataliza una amplia variedad de reacciones de mono oxigenación. Este es codificado por el transcrito C13, el cual es expresado de manera prominente por 395-E, mientras, 395-NE, SH2-E, 6455-NE y 6455-E lo expresan en bajas cantidades. Otra proteína multifuncional y expresada ubicuamente en las plantas es la proteína TCTP (transitionally controlled tumour protein), la cual está implicada en procesos de crecimiento celular, diferenciación, señalización en especial del gen TOR, respuesta inmune, apoptosis, organización microtubular, homeostasis iónica, actúa como chaperones o factores de intercambio (Bekowitz *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2018b). Aunque aún se desconocen sus funciones biológicas, se ha reportado en plantas de pepino con TCTPs silenciados, una mayor resistencia a *S. filiginea*, mientras, en las plantas que sobreexpresaban TCTPs, significativamente comprometían la resistencia al hongo, lo cual indica que los TCTPs actúan como moduladores negativos en la respuesta de defensa (Meng *et al.*, 2018b). Dicha proteína es codificada por transcrito A3 y es el más expresado por 6455-NE y 6455-E a niveles muy similares y superiores que cualquier otra expresión de los demás transcritos. Es también el transcrito más expresado por 395-NE y SH2-E y el segundo más expresado por F1B2-E, respectivamente. A pesar de que la expresión en 395-E reduce drásticamente, es una de las secuencias más expresadas por esta variedad en estado elicitado.

6.8. Transcritos asociados al control de compuestos reactivos

En los transcritos A33, A46, E43 y F32, codificantes de enzimas peroxidasas y transcrito C29, codificador de NADPH quinona oxidoreductasa, se logra observar una mayor expresión de estos en variedades no elicidadas 6455-NE y 395-NE, mientras, bajo elicitación, las expresiones de estos disminuyen. El reconocimiento de un elicitor del patógeno por las proteínas en la superficie membranal de las células de la planta genera una cascada de señalización al interior de la célula a través de moléculas señalizadoras también conocidos como mensajeros secundarios. Por ejemplo, surge una afluencia de calcio a la célula y se producen agentes ROS por enzimas peroxidasas extracelulares y oxidasas NADPH, los cuales, en cantidades grandes y localizados, tienen un efecto antimicrobiano y en cantidades bajas tiene un efecto de señalización (Hammond-Kosack & Jones, 2015). Igualmente, las cantidades de agentes reactivos pueden conllevar a respuestas tempranas de hipersensibilidad programada (Thomas *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta las diferentes fuentes de generación de agentes ROS en el interior de célula, tanto de manera constitutiva como bajo estrés, para evitar que estos se acumulen, es crítico la regulación del perfil de expresión génica para producir enzimas y moléculas antioxidantes que los aíslan (Mansoor *et al.*, 2022). Asimismo, los niveles de peróxido de hidrogeno pueden conducir cambios en la expresión de una gran variedad de genes (Vandenbroucke *et al.*, 2008). Por ejemplo, el transcrito C18 codificador de una proteína inducida por peróxido de hidrogeno, posee niveles de expresión superiores en 6455-NE mientras 395-NE no la expresa. En condiciones elicidadas, la expresión de 6455-E es considerablemente menor, llegando a niveles similares a F1B2-E y 395-E. Entre los 299 transcritos analizados, 27 codifican proteínas que cumplen varias funciones siendo una de estas responder ante un estrés oxidativo. Algunas de estas capturan y/o transforman agentes ROS, otras mantienen la regulación/homeostasis redox y algunas responden a través de cambios metabólicos que puede incluir el control hormonal ante presencia de ciertas cantidades de agentes ROS o un estrés oxidativo. Al observar transcritos B10 (metalotioneína), B31, E42 (glutatión-s-transferasas), C26, E32 (tioredoxinas), F20 (proteína de unión a hemo) y transcrito F28 (lipocalina), se ve un mismo comportamiento: un aumento considerable de la expresión en 395-E mientras las demás variedades expresan cantidades notablemente muy bajas. Transcritos A13 (proteína similar a Gast1), A24 (ACP-estearoil desaturasa), A25 (L-ascorbato peroxidasa), A29 (ascorbato peroxidasa), B22, B38, C40, E44 (glutatión-s-transferasa) y transcrito C42 (proteína

inducida por aluminio), se expresan más en 6455-E que 6455-NE. mientras, algunos se expresan más en SH2-E y F1B2-E y en otros transcritos como B12 (glutación peroxidasa) y B20 (protein Gast1), la expresión de 6455-E y 395-E disminuye. Con esto, se detalla que el mantenimiento de los niveles de ROS se debe a la expresión de una gran variedad de proteínas que se expresan de manera diferencial entre las diferentes variedades.

Las proteínas de estrés universales se caracterizan por contener un dominio conocido como hidrolasa alfa de nucleótido de adenina, lo cual les permite hidrolizar los enlaces alfa-fosfatos de nucleótidos de adenina en procesos enzimáticos de tiolación para la formación de cisteína (Savage *et al.*, 1997). Las reacciones de oxidación del grupo tiol encontrado en la cisteína son de suma importancia en la defensa de agentes oxidativos ya que incorporan agentes ROS a sitios activos de las enzimas donde son preservados (Ulrich & Jakob, 2019). Igualmente, dicho dominio les permite a las proteínas tener mayores interacciones y uniones con otras proteínas e integrarse a cascadas de fosforilación (Gorshkova & Pojidaeva, 2021). Precisamente, el transcrito E8 que codifica dicho dominio es principalmente expresado por 395-E, sobresaliendo de las demás variedades nuevamente.

Una manera de responder ante un estrés biótico y abiótico es a través de la acumulación de varios carbohidratos y solutos ya que no solo sirven como almacenamiento de energía, pero también participan en la tolerancia al estrés osmótico al ser antioxidantes, estabilizadores de macromoléculas y preservadores de la membrana (Shinozaki *et al.*, 2015). Por ejemplo, los oligosacáridos de la familia de las rafinosas (RFOs) reducen la acumulación de agentes ROS, son osmoprotectores y moléculas de señalización (Vinson *et al.*, 2020), además, hacen parte del transporte y almacenamiento de carbono, exportación de ARNm, tráfico membranal y estabilización del fotosistema II (Sengupta *et al.*, 2015). Un sustrato clave para la biosíntesis y control en el flujo del grupo de galactosilo de RFOs es galactinol, el cual es sintetizado por la enzima galactinol sintasa (Sengupta *et al.*, 2015), proteína codificada por el transcrito C20, la cual tiene el nivel de expresión elevado en 395-E que las demás variedades, las cuales se expresan menos que 395-NE. Curiosamente, se logra observar un nivel de expresión igual de elevado en transcrito C12 y aún más elevado en transcrito C27 por la variedad 395-E con respecto a las demás muestras que expresan niveles muy similarmente inferiores, siendo codificadores de alfas galactosidasas, proteínas que degradan una diversidad de macromoléculas como proteínas, lípidos y galactoligosacaridos, en especial RFOs (Chrost *et al.*, 2007). Esto

conduce a la formación de melibiosa y fructosa y posteriormente a sacarosa y galactosa (Dai *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2018). Estas diferentes azúcares pueden seguir siendo transformadas en otros azúcares y participar en la vía glucolítica para la formación de energía celular, entre otros procesos de desarrollo.

Alguno de los cambios fisiológicos desencadenados como respuesta a estrés biótico y abiótico es la formación y/o acumulación de compuestos dicarbonilos reactivos, bioproductos de las vías metabólicas como glucólisis y ciclo de Calvin (Mostofa *et al.*, 2018; Singla-Pareek *et al.*, 2020). Estos compuestos también participan en la transducción de señales para la iniciación de varios procesos fisiológicos, sin embargo, el control de su acumulación es importante para evitar formación de glicación, intervención de los antioxidantes, y mayor acumulación de agentes ROS (Mostofa *et al.*, 2018). La vía metabólica glioxalasa, descompone el compuesto carbonilo metilglyoxal a través de la enzima lactoilglutathione liasa (Singla-Pareek *et al.*, 2020), la cual es codificada por el transcrito C19, uno de los diez transcritos más expresados por 395-E. Las demás variedades se expresan en cantidades inferiores donde 6455-NE, F1B2-E y 395-NE se expresan en cantidades similares, 6455-E y SH2-E expresan las menores cantidades, respectivamente. De acuerdo con Singla-Pareek (2020), debido a que las cantidades de metilglyoxal aumentan bajo un estrés, la sobre expresión de genes de glioxalasa en algunas especies de plantas ha mejorado la tolerancia al estrés biótico y abiótico.

6.9. Transcritos asociados a los peroxisomas

Entre los más expresados por 395-E, también se encuentra el transcrito E47, codificador del factor de biogénesis peroxisomal. Su y colaboradores (2019), indican que ante un ataque patogénico, la liberación de agentes oxidantes induce la expresión de genes peroxisomales indicando que la biogénesis/producción del peroxisoma responde directamente a los cambios intracelulares. Teniendo en cuenta las vías catabólicas y biosintéticas que se llevan a cabo en el interior de los peroxisomas, además de reacciones importantes en el secuestro de agentes ROS, detoxificación celular y señalización (Kao *et al.*, 2018), la presencia de peroxisomas debe ser fundamental en los mecanismos de defensa.

6.10. Transcritos asociados a la vía proteolítica y muerte celular programada

Tras la elicitación, varias proteínas son activadas al igual que la expresión de genes, en tiempos diferentes, que codifican proteínas reguladoras con el fin de amplificar y mejorar los mecanismos de defensa (Hammond-Kosack & Jones, 2015). Una de las maneras de promover la defensa es a través de la eliminación de los reguladores negativos de defensa y/o la reprogramación de la respuesta de defensa a través de la ubiquitinación (Hammond-Kosack & Jones, 2015). Transcritos que aumentan sus niveles de expresión de manera elevada en 395-E y, que además sobresalen, son C45 codificador de una proteína de la familia de pliegues Rossmann NAD(P), participe de la modificación proteica al unir cofactores de nucleótidos; C46 codificador de una proteína ubiquitinadora mediadora de la proteólisis; F15 codificador de la proteína Rma1, responsable de regular proteínas acuaporinas mediante la regulación proteolítica; F49 codificador de la atpasa del retículo endoplásmico de transición, la cual es requerida en la gemación de vesículas del retículo hacia el aparato de Golgi, además, forma un complejo multiproteico requerido en la dislocación de sustratos y proteínas del retículo endoplasmático al citosol para su posterior degradación (Uniprot). Curiosamente, las demás variedades, incluyendo 395-NE, contienen niveles de expresión bastante inferiores y en su mayoría, muy similares.

Por el otro lado, la variedad 6455-E también presenta unos niveles de expresión altos en algunos transcritos como en A50, codificador de la proteína conjugadora de ubiquitina; UBC2, encargada de regular la degradación proteica; C11, codificador de enzima conjugador/ transportadora de ubiquitina; B2, codificador de una proteína similar a la enzima de conjugación SUMO, responsable de cambiar el destino de proteínas y sus interacciones. A diferencia de los transcritos que se mencionaron sobresalir en 395-E con respecto a las demás muestras, aquellos que aumentaron más en 6455-E no sobresalen del resto de muestras y algunos se asimilar a los niveles de expresión de 6455-NE. Mientras, SH2-E expresa en elevadas cantidades transcritos como D1, codificador de la proteína ubiquitina carboxiterminal hidrolasa, responsable de la desubiquitinación y transcrito F4, codificador de una enzima conjugadora de ubiquitina. Ambos transcritos participan en procesos biológicos como reparación del ADN. Transcrito F13, codificador de la proteína de fusión de ubiquitina y transcrito E24, codificador del proteasoma subunidad alfa también se expresan más en SH2-E. De estos transcritos se logra observar que las variedades resistentes 395-E y F1B2-E poseen niveles de expresión mucho menor, inclusive que 395-NE. En transcritos E46, codificador de proteína transportadora de ubiquitina y transcritos

F22 y F41, codificadores de proteínas necesarias en el complejo de ubiquitina ligasa, los niveles de expresión son mayores en F1B2-E.

Existe una gran variedad de genes relacionados con la muerte celular programada que participan desde los procesos metabólicos constitutivos a procesos de respuesta a un tipo de estrés. Según Thomas y colaboradores (2015), “las cascadas de transducción de señales unidas a varios factores desencadenantes, como estímulos hormonales o ambientales conducen a una fase de iniciación que involucra la activación e inactivación de muchos genes y la transición a una fase de re-diferenciación controlada de estructuras celulares y re-movilización de materiales.” Ante un ataque patogénico, las plantas intentan confinar una amenaza de infección a través de una expresión genética asociada a la respuesta hipersensible, en el cual genes relacionados con la muerte celular programada se integran a otros mecanismos de defensa y otros responden suprimiendo la muerte celular programada (Thomas *et al.*, 2015). Uno de los transcritos más expresados por 395-E es el D24, codificador de un dominio de la proteína desarrollo y muerte celular, donde se observa que sus niveles de expresión sobresalen, mientras, las demás variedades tienen niveles de expresión inferior a 395-NE.

Las cisteína proteasas también están involucradas en la regulación del inicio de la muerte celular programada en respuesta al estrés biótico o abiótico, a través de una rápida degradación proteica para reciclar aminoácidos y redistribuir el nitrógeno (Thomas & Van der Hoorn, 2018), sin embargo, pueden ser inhibidas o desactivadas por algunos efectores del patógeno (Hammond-Kosack & Jones, 2015). Una de las cisteína proteasas es codificada por el transcrito E26, que, al detallar los niveles de expresión, 395-E eleva su expresión con respecto a 395-NE y demás variedades, mientras 6455-E disminuye con respecto a 6455-NE. Mientras las cisteína proteasas se conservan en la vacuola, casi todas las proteasas apoplásticas pertenecen a la familia de la cisteína proteasa similar a la papaína (PLCP), las cuales están fuertemente asociadas con la respuesta ETI (Balakireva & Zamayatnin, 2018), aunque, son igualmente interferidas y funcionalmente bloqueadas por una gran variedad de efectores de patógenos (Misas-Villamil *et al.*, 2016). Dicha proteína es codificada por el transcrito D43, donde se logra observar un aumento de la expresión de 395-E con respecto a 395-NE y una disminución de 6455-E con respecto a 6455-NE. A pesar de esto, estas dos variedades elicítadas terminan expresando el transcrito a niveles similares, mientras, F1B2-E y SH2-E son los que menos lo expresan.

El transcrito F12 representa un gen relacionado con la senescencia, el cual es principalmente expresado por 395-E seguido por 395-NE a un nivel similar, en ese tiempo, los niveles de expresión del resto de variedades incluyendo 6455-E son menores que 6455-NE. Dicho transcrito es uno de los últimos más expresados por 395-E en comparación con las demás variedades y 395-NE. La expresión sobresaliente de la variedad 395 en ambas condiciones experimentales podría atribuirle una ventaja en el mecanismo regulador de una gran variedad de procesos fisiológicos, por ejemplo, en la respuesta de defensa al patógeno ya que la expresión de genes codificadores de proteínas importantes en la defensa aumenta en rutas de señalización de senescencia (Thomas *et al.*, 2015).

6.11. Transcritos asociados a la defensa y estrés general

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) son inducidas de manera local (en la zona afectada) y/o inducidas sistemáticamente en respuesta a la presencia de un patógeno como mecanismo de defensa general, además, se caracterizan por ser de bajo peso molecular y resistir a las proteasas (Jain & Khurana, 2018). La quitinasa, una PR, es codificada por transcrito B8, siendo este el más expresado por 395-E que cualquier otro transcrito mientras el resto de las variedades lo expresan en cantidades mucho menores, donde, SH2-E expresa mayor cantidad que F1B2-E, las variedades 6455-NE y 395-NE lo expresan en similares cantidades bajas y 6455-E disminuye su expresión. Jain y Khurana (2018) mencionan que las enzimas hidrolíticas como la quitinasa y beta-1,3-glucanasas juegan el papel principal en la reacción de defensa contra el patógeno al ser degradadoras de los polímeros de quitina y beta-1,3-glucana, respectivamente, de la pared celular fúngica, sugiriendo una contribución no solo como inhibidoras del crecimiento fúngico, pero también responsables de la resistencia sistemática adquirida. De acuerdo con los autores, varios estudios han reportado una sobreexpresión de la proteína quitinasa que las variedades susceptibles en varias especies de plantas, sin embargo, la co-expresión de genes codificadores de diferentes proteínas hidrolíticas promueve la resistencia. Por otra parte, existen efectores que pueden inactivar enzimas del hospedero o unirse a fragmentos de quitina para no ser detectados por receptores de las plantas, así, evitar una respuesta inducida (Hammond-Kosack & Jones, 2015). Es posible considerar que alguna de estas posibilidades, entre otras, pudo haber ocurrido en 6455-E.

6.12. Transcritos asociados a la regulación transcripcional y post-transcripción

La familia de genes NAC se reconocen por regular la reprogramación transcripcional en condiciones constitutivas y bajo estrés (Nuruzzaman *et al.*, 2013). Por ejemplo, las proteínas del dominio NAC desencadenan la expresión de genes que a su vez regulan otros genes para la síntesis de la pared celular (Carpita *et al.*, 2015). Igualmente, los NAC modulan la respuesta hipersensible y señalización hormonal ante la presencia de varios patógenos (Yuan *et al.*, 2019). Al detallar el transcrito D30, codificador de una proteína que contiene el dominio NAC, en condiciones sin la presencia de FOX, las variedades 6455-NE y 395-NE tienen niveles de expresión similarmente bajos, sin embargo, con la presencia de FOX, las variedades F1B2-E y 395-E poseen niveles de expresión superiores que cualquier otra variedad.

Existen algunas proteínas que interactúan con las proteínas de unión a poliadenilato para formar complejos que cooperan en el anclaje a la cola poliA del ARNm, mediar la interacción del ARNm con otras proteínas, reclutar proteínas, ensamblar proteínas, evitar la deadenilación, brindar estabilidad, exportar, regular la traducción, entre otros (Bravo *et al.*, 2005; Jimenez-Lopez *et al.*, 2015). Uno de los dominios proteicos de alguna de las proteínas interactivas es codificado por el transcrito A7, el cual es el segundo más expresado por 6455-E en cantidades elevadas con respecto a los demás niveles de expresión del resto de transcritos. También es uno de los más expresados por F1B2-E, 6455-NE, SH2-E y 395-NE, respectivamente.

6.13. Transcritos asociados a la traducción

De los 299 transcritos analizados, 60 codifican proteínas constituyentes estructurales de ribosomas. De estos 60, únicamente 7 transcritos se expresan más en 395-E que 395-NE, mientras en el resto de transcritos, el nivel de expresión de 395-E es inferior a 395-NE. En 53 transcritos, 6455-E aumenta los niveles de expresión con respecto a 6455-NE y en 37 transcritos, SH2-E expresa mayores cantidades que cualquier otra variedad, inclusive, en algunos, los niveles son elevados. Las expresiones de F1B2-E varían bastante. El transcrito C41 que codifica una proteína de la familia ribosomal L16p/L10e, es el tercer transcrito más expresado por 395-E, mientras, las demás variedades, incluyendo 395-NE se expresan en niveles similares. Se ha estudiado bajo un análisis de interacción proteica, que varias proteínas, incluyendo proteínas ribosomales L16p, juegan un papel activo durante la respuesta inmune (Ayash *et al.*, 2021). Igualmente, la promiscuidad proteica conduce a que

las proteínas puedan tener diversas interacciones en diferentes momentos del PTI (Ayash *et al.*, 2021).

La traducción involucra un conjunto de proteínas encargadas de cubrir todos los pasos desde la formación de complejos, unión de proteínas al ARNm, a la selección de sitios de iniciación y finalización entre ARNm y los otros tipos de ARN, hasta auxiliar en la unión entre aminoácidos y en la velocidad en que se realiza los procesos en el transcurso de las cuatro fases de la síntesis proteica: iniciación, elongación, terminación y reciclaje de ribosomas (Dutt *et al.*, 2015). Entre los 299 transcritos analizados se encuentran varios asociados a las fases de iniciación y elongación únicamente. El transcrito C9, codificador de la proteína SUI1-B, es el cuarto transcrito más expresado por 395-E, de manera notoria y elevada. El resto de las variedades, incluyendo 395-NE lo expresan en cantidades muy bajas, siendo 6455-E la variedad que menor lo expresa. La proteína SUI1 es uno de los factores de iniciación de la traducción, responsable de dirigir correctamente el ribosoma al sitio de inicio de la traducción bajo el codón de inicio AUG del ARNm. El tercer transcrito más expresado por 6455-E, seguido por 6455-NE y 395-NE, es transcrito A2, codificador del factor de iniciación 5A3. En este, se observa que mientras 6455-E expresa aún más que 6455-NE, 395-E reduce su expresión notoriamente. Otro factor de iniciación 5A codificado por transcrito B14 es expresado principalmente por 6455-NE y SH2-E, respectivamente. Igualmente, el transcrito B22 que codifica el factor de iniciación SUI1-A, es otro de los transcritos más expresados por las variedades no elicidadas. Aunque 6455-E disminuye su expresión mientras 395-E aumenta con respecto a ambos controles, los niveles de expresión de esta potencial proteína permanecen altos, siendo una de las más altas expresiones en F1B2-E, 395-E y 6455-E, respectivamente.

Los factores de elongación asisten en acompañar ARNt al ribosoma, aseguran el flujo y requerimiento energético a través de la hidrólisis de GTP para varios procesos y de la reconversión de GDP a GTP para la continuidad cíclica en la formación de uniones peptídicas (Cooper, 2000). Transcritos B9, B18 y B41, codificadores de diferentes factores de elongación, son más expresados en 6455-E con respecto a 6455-NE, mientras 395-E reduce sus niveles de expresión con respecto a 395-NE. Existen dos transcritos, D18 y F17, codificadores de factores de elongación de goma. En ambos F1B2-E los expresa en mayores cantidades, 6455-E y 395-E aumentan su expresión a niveles similares con respecto a 6455-NE y 395-NE que también poseen niveles de expresión similares, seguido

por SH2-E. Los factores de elongación del goma parecen jugar un papel importante en la coagulación de látex como un mecanismo de defensa (Cornish & Blakeslee, 2021). Una variedad de especies de plantas produce pequeñas proteínas de partículas de goma o gotas de lípidos que pueden ser conservadas en las vacuolas y liberadas para formar una barrera contra la invasión de patógenos en las células parenquimáticas (Gracz *et al.*, 2021; Cornish & Blakeslee, 2021; Men *et al.*, 2019).

Con todo esto, primero, se logra observar que las variedades susceptibles elicítadas, 6455-E y SH2-E, en general expresan en mayores cantidades la mayoría de los transcritos codificadores de proteínas ribosomales, mientras, 395-E aumenta en cantidades elevadas específicas proteínas ribosomales. La variedad F1B2-E tiende a expresarse entre las variedades susceptibles y la variedad resistente 395. Segundo, cada variedad expresa en cantidades elevadas diferentes factores de iniciación. Igualmente, algunos de estos y los factores de elongación se expresan de manera similar entre algunas variedades.

6.14. Transcritos asociados al transporte

Varios transcritos codificadores de proteínas chaperonas se expresan diferencialmente entre las variedades. Por ejemplo, uno de los transcritos más expresados de manera elevada por 6455-E es A5, el cual codifica la proteína chaperona Hsp70 (heat shock protein). Las demás variedades, incluso 6455-NE la expresan en menores cantidades, especialmente 395-E. La proteína Hsp70 asiste en mantener una variedad de proteínas plegadas o desplegadas y hacen parte de complejos proteicos intermembranales para facilitar el transporte (Callis *et al.*, 2015). Por el otro lado, al detallar transcritos C36 y C37, codificadores de Hsp18 y transcrito C40 codificador de otra Hsp pequeña, se observa un aumento elevado en la expresión de 395-E con respecto al nivel de expresión de 395-NE, el cual se asimila a los niveles de expresión del resto de variedades con cantidades notoriamente bajas. Al igual que las Hsp70, las proteínas Hsp de pequeños tamaños parecen jugar un papel fundamental en condiciones de estrés biótico y abiótico al estabilizar los posibles despliegues tempranos de proteínas propensas a la agregación por condiciones de estrés y mantenerlas en estados competentes al correcto plegamiento por otras proteínas chaperonas de mayores tamaños, además, tienen la capacidad de unirse a sustratos desnaturalizados (Kuang *et al.*, 2017).

Uno de los transcritos que más se expresa en todas las variedades es A39, codificador de del factor de ribosilación de ADP, encargado de la regulación del transporte vesicular (Li *et al.*, 2021) y regula factores de elongación (Callis *et al.*, 2015). Se logra observar que SH2-E, 6455-E y F1B2-E, respectivamente, lo expresan en mayores cantidades, mientras, 6455-NE, 395-E y 395-NE, respectivamente, mantienen niveles de expresión inferiores y similares. De acuerdo con Li y colaboradores (2021), el factor de ribosilación de ADP podría estar participando en varias vías de señalización de defensa de las plantas.

Las proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP) y proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIP) facilitan no solo el transporte de agua sino también el flujo de sustratos (Wang *et al.*, 2016). Ambas de estas proteínas son codificadas por transcritos A17 y C38, respectivamente. El transcrito A17 es uno de los más expresados por todas las variedades, especialmente en 6455-NE seguido por 6455-E. Se observa que los niveles de expresión del resto de las variedades son inferiores y similares. La expresión y función de las acuaporinas es regulado por los nutrientes disponibles en condiciones sin estrés y bajo diferentes tipos de estrés (Wang *et al.*, 2016), siendo su abundancia proporcional con la permeabilidad de agua en la membrana de la vacuola ((Kurowska, 2020). Aunque se desconoce su papel en condiciones de estrés biótico o abiótico, las isoformas de las TIPs expresadas en determinado tiempo bajo determinada condición podría definir la función de la vacuola en respuesta a la condición (Kurowska, 2020). En el transcrito C38 los niveles de expresión aumentan notoriamente en 395-E con respecto a 395-NE, superando los niveles de expresión de las demás variedades. Debido a que las PIPs interactúan directamente con la región extracelular, algunas isoformas se encuentran implicadas en la respuesta a través del reconocimiento de patrones moleculares de microorganismos, además, del flujo de diversos sustratos como señales (Li *et al.*, 2015). De acuerdo con Zhang y colaboradores (2019), cuando la infección es inminente, la función de las PIPs cambia de transporte de sustratos a la regulación de la respuesta al patógeno.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de la cuantificación de expresión génica de las diferentes variedades de clavel permitieron evaluar la respuesta de estas a la presencia de FOX. La variedad resistente 395 elicada principalmente produjo altas cantidades de transcritos codificadores de la quitinasa, proteína relacionada a las tiras de Casparian, proteína ribosomal L16p,

proteína SUI1-B y SUIA (factores de iniciación de la traducción), proteína B12d (componente principal de la membrana mitocondrial), proteína similar a la rodopsina, seguido por una serie de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos con respecto a 395 no elicitado. Por el otro lado, 6455 y F1B2 elicidadas produjo mayores cantidades de transcritos codificadores de proteína TCTP, proteína de unión a poliadenilato, factor de iniciación, ATP sintasa y proteína HSP-70 con respecto a 6455-NE. Las expresiones de las variedades F1B2 y SH2 elicidadas se asimilaban a las expresiones de la variedad 6455.

Altos niveles de expresión de transcritos, representantes de genes codificadores de proteínas, podría estar indicando un mayor flujo hacia la vía en la que participa la proteína y no necesariamente a la producción de esa proteína (Thomas *et al.*, 2015). De esta manera, bajo determinado tiempo de exposición al hongo patogénico, el hospedero podría estar produciendo proteínas importantes en determinadas vías metabólicas en determinado momento.

A pesar de observar expresiones similares entre las variedades, cada variedad posee un perfil de expresión único y diferente. Sin embargo, bajo esta diferencia, es bastante notorio la reducción en los niveles de expresión de gran cantidad de transcritos en 395-E con respecto a 395-NE, mientras ocurre lo contrario en 6455-E con respecto a 6455-NE.

Las librerías de expresión obtenidas reflejan el mecanismo de respuesta de las variedades de clavel a la presencia de FOX en un tiempo inicial determinado. En dicho tiempo, el reconocimiento de la presencia del patógeno y la consecuente señal desencadenada al interior de las células por el hospedero, son claves para la elaboración de la respuesta de cada variedad y en sí en la determinación resistente o susceptible. La orquestación inicial de respuesta de cada variedad se diferencia, la cual se logra evidenciar en 6455 y 395 teniendo en cuenta sus controles. Sin embargo, la variedad 395, reconocida por su resistencia en experimentos *ex situ* en invernadero, posee expresiones particularmente diferentes. Del análisis de las librerías de expresión, surgen preguntas como: teniendo en cuenta los transcritos más expresados por 395-E, ¿por qué las expresiones de las otras variedades son similarmente menores?, ¿existe algún factor inhibitorio que limita la expresión de esa información genética en esas variedades? o ¿qué podría estar

promoviendo un aumento en la expresión de estos transcritos en 395-E que quizá no ocurre en el resto de las variedades?

8. OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES

Al considerar el uso células desdiferenciadas como modelo del experimento, se convierte importante también reconocer e identificar sus condiciones iniciales y posibles limitaciones en experimentos como respuesta a la presencia de un patógeno, teniendo en cuenta que las plantas poseen estructuras necesarias para la respuesta como todos los organelos, tejidos y órganos. Adicionalmente, un factor limitante fue no tener el control para las variedades F1B2 y SH2. Se recomienda considerar el control para cada variedad, además de tener mínimo tres repeticiones de cada muestra con el fin de poder realizar comparaciones estadísticas necesarias para la identificación de tendencias. En este trabajo de grado únicamente se logró comparar información transcriptómica de una muestra experimental frente a una muestra control, limitando reconocer e identificar importantes diferencias y similitudes en los perfiles génicos que se pudieron haber obtenido a partir del estudio estadístico de varias muestras. Igualmente, teniendo en cuenta que las expresiones de cada variedad reflejan el mecanismo de respuesta en un tiempo inicial determinado a la presencia de FOX, puede llegar a ser importante los cambios en los niveles expresiones de los transcritos expresados en diferentes tiempos para cada variedad. Así, poder conocer los cambios en la expresión y sus niveles en diferente tiempo.

Por otro lado, la sensibilización de la tecnología de secuenciación NGS ha aumentado en el transcurso del tiempo. Por lo tanto, se convierte importante la realización de secuenciación de las muestras bajo estudio, al mismo tiempo para evitar diferencias de sensibilización por el continuo progreso tecnológico.

Teniendo en cuenta las estrategias de los patógenos, sería interesante extraer el ARNm del hongo en el mismo tiempo de la extracción de ARNm del hospedero para identificar relaciones y diferencias en su expresión frente a las expresiones de las variedades resistentes y susceptibles.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Afzal, A. J., Wood, A. J., & Lightfoot, D. A. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5), 507-517
2. Agilent (2010). Bioanalyzer Interpretation: Bioanalyzer RNA Total Eukaryote 2100 Nano. Jabsom Genomics Core Facility. Agilent. 1-19pp.
3. Alberts, B., Chaffey, N., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2003). The Plant Cell Wall. *Molecular biology of the cell*. 4th edn.
4. Almutairi, Z. M. (2022). In Silico Identification and Characterization of B12D Family Proteins in Viridiplantae. *Evolutionary Bioinformatics*, 18. DOI: <https://doi.org/10.1177/11769343221106795>
5. Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. *Genes*, 9(7), 339.
6. Anjum, A., Jaggi, S., Varghese, E., Lall, S., Bhowmik, A., & Rai, A. (2016). Identification of differentially expressed genes in rna-seq data of arabidopsis thaliana: A compound distribution approach. *Journal of Computational Biology*, 23(4), 239-247.
7. Arbeláez, G. (1993). La floricultura colombiana de exportación. *Agronomía Colombiana*. Volumen 10, Número 1, p. 5-11.
8. Arbeláez, G. y Calderón, O.L. (1991). Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi del clavel en Colombia. *Agronomía Colombiana*. 8(2): 243–247.
9. Asolcoflores. 2022. Informe de Logros 2021. Asociacion colombiana de Exportadores de Flores. pp 1-81.
10. Ayash, M., Abukhalaf, M., Thieme, D., Proksch, C., Heilmann, M., Schattat, M. H., & Hoehenwarter, W. (2021). LC–MS Based Draft Map of the Arabidopsis thaliana Nuclear Proteome and Protein Import in Pattern Triggered Immunity. *Frontiers in Plant Science*, 12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.744103>
11. Baayen, R. P., & Elgersma, D. M. (1985). Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnation cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 91(3), 119–135. doi:10.1007/bf01976386

12. Baayen, R. P. (1986). Regeneration of vascular tissues in relation to *Fusarium* wilt resistance of carnation. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 92(6), 273–285. doi:10.1007/bf01977590
13. Baayen, R. P., Elgersma, D. M., Demmink, J. F., & Sparnaaij, L. D. (1988). Differences in pathogenesis observed among susceptible interactions of carnation with four races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94(2), 81–94. doi:10.1007/bf01998398
14. Baayen, R. P., Ouellette, G. B. & Rioux. (1996). Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Phytopathology*. 86:1018-1031.
15. Balakireva, A. V. & Zamyatnin Jr, A. A. (2018). Indispensable role of proteases in plant innate immunity. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 629. DOI: 10.3390/ijms19020629
16. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Jaiswal, D., Neri, S., Peruzzini, R., & Winkelmann, J. (2012). Structural characterization of CHCHD5 and CHCHD7: two atypical human twin CX9C proteins. *Journal of structural biology*, 180(1), 190-200. DOI: 10.1016/j.jsb.2012.07.007
17. Ben-Yephet, Y., Reuven, M., & Shtienberg, D. (1997). Complete Resistance by Carnation Cultivars to Fusarium Wilt Induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Race 2. *Plant Disease*, 81(7), 777–780. doi:10.1094/pdis.1997.81.7.777
18. Bent, A. F., & Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 399-436.
19. Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S., & Masle, J. (2008). Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 20(12), 3430-3447. DOI: 10.1105/tpc.108.061010
20. Berry, J. O., Yerramsetty, P., Zielinski, A. M., & Mure, C. M. (2013). Photosynthetic gene expression in higher plants. *Photosynthesis research*, 117(1), 91-120.
21. Betancur, J. F. (2018). Ventaja comparativa del sector floricultor colombiano que promueva su presencia y le permite fortalecerse en el marco del TLC con Corea del Sur. Universitaria Agustiniiana. Negocio Internacionales. Universitaria Agustiniiana. Trabajo de Grado. Bogotá, D.C. pp 26-29.
22. Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Tanmoy, B. *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. pp. 31-107. London, UK. Academic press.

23. Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, 379-406.
24. Bravo, J., Aguilar-Henonin, L., Olmedo, G., & Guzman, P. (2005). Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of *Arabidopsis thaliana* Poly (A)-binding proteins. *Molecular genetics and genomics*, 272(6), 651-665. DOI 10.1007/s00438-004-1090-9
25. Buraglia, G. A. (2013). Análisis de SNPs como posible maracadores moleculares de resistencia a *Fusarium oxysporum* en una población de clavel (*Dianthus caryophyllus* L). Pontifica Universidad Javeriana. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Bogotá, D.C pp22-26.
26. Callis, J., Browning, K. S. & Spremulli, L. (2015). Protein Synthesis, Folding and degradation. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. pp. 438-490. Oxford, UK. John Wiley & Sons.
27. Cárdenas, L. M. & Rodríguez, M. Y. (2011). Estudio de la agroindustria de las flores en Colombia y la creación de una empresa productora de flores. Universidad La Sabana. Trabajo de Grado. Bogotá, D.C. pp29-33.
28. Carpita, N. C., Ralph, J. & McCann, M. C. (2015). The Cell Wall. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. pp. 45-107. Oxford, UK. John Wiley & Sons.
29. Chattopadhyay, T., Das, P. K., Roy, S., & Maiti, M. K. (2015). *Proposed physiological mode of action of rice hemopexin fold protein OsHFP: linking heme-binding with plant cell death*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(5). DOI:10.1007/s11738-015-1842-7
30. Chen, Y. C., Kidd, B. N., Carvalhais, L. C., & Schenk, P. M. (2014). Molecular defense responses in roots and the rhizosphere against *Fusarium oxysporum*. *Plant signaling & behavior*, 9(12), e977710, DOI: 10.4161/15592324.2014.977710
31. Chiocchetti, A., Bernardo, I., Daboussi, M. J., Garibaldi, A., Gullino, M. L., Langin, T., & Migheli, Q. (1999). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. *Phytopathology*, 89(12), 1169-1175.
32. Chivasa, S., Tome, D. F., Hamilton, J. M., & Slabas, A. R. (2011). Proteomic analysis of extracellular ATP-regulated proteins identifies ATP synthase β -subunit as a novel plant cell death regulator. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(3). DOI: 10.1074/mcp.M110.003905

33. Christie, W. W. (2022). Phosphonolipids. The Lipid Web. Web consultada el 1 de septiembre del 2022. Recuperada de: https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/complex/phosphono/index.htm
34. Christiennin, M., Ohlsson, A. B., Berglund, T., & Henriksson, G. (2005). Lignin isolated from primary walls of hybrid aspen cell cultures indicates significant differences in lignin structure between primary and secondary cell wall. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(8), 777-785. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.007>
35. Chrost, B., Kolukisaoglu, U., Schulz, B., & Krupinska, K. (2007). An α -galactosidase with an essential function during leaf development. *Planta*, 225(2), 311-320. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0350-9>
36. Chung, M., Bruno, V.M., Rasko, D.A. et al. Best practices on the differential expression analysis of multi-species RNA-seq. *Genome Biol* **22**, 121 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02337-8>
37. Clavijo, M. J. (2007). Caracterización molecular de la interacción clavel *Dianthus caryophyllus* - *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. pp 1-31.
38. Conlon, M. (2015). The History of the Colombian Flower Industry and Its Influence on the United States. USDA Foreign Agricultural Service. *Gain Report*. pp 1-9
39. Cooper GM. (2000). The Cell: A Molecular Approach. Translation of mRNA. 2nd edition. *Sunderland (MA): Sinauer Associates*. Consultado el 29 de agosto del 2022. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9849/>
40. Cornish, K. & Blakeslee, J. (2021). Rubber Biosynthesis in Plants. The American Oil Chemist's Society. Consultado el 29 de agosto del 2022. Recuperado de: <https://lipidlibrary.aocs.org/chemistry/physics/plant-lipid/rubber-biosynthesis-in-plants>
41. Cuestas, A. (2018). Análisis de las ventajas competitivas del sector floricultor de Colombia y Holanda en el periodo 2012-2017. Fundación Universidad de América. Título de especialización. Bogotá, D.C. pp 40-46.
42. Dai, N., Cohen, S., Portnoy, V., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Pompan-Lotan, M., Carmi, N., Zhang, G., Diber, A., Pollock, S., Karchi, H., Yeselson, Y., Petreikov, M., Shen, S., Sahar, U., Hovav, R., Lewinsohn, E., Tadmor, Y., Granot, D., Ophir, R., Sherman, A., Fei, Z., Giovannoni, J., Burger, Y., Katzir, N & Schaffer, A. A. (2011). Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic

transition to sucrose accumulation. *Plant molecular biology*, 76(1), 1-18.
DOI:10.1007/s11103-011-9757-1

43. Dahal, N., & Shrestha, R. K. (2018). Evaluation of Efficacy of Fungicides Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* in Vitro at Lamjung, Nepal. *Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science*, 35(1), 105-112.
44. De Benedetti, L., Burchi, G., Bruna, S., Mercuri, A., & Schiva, T. (2002). Use of molecular markers to improve cut flowers longevity in carnation. In *XXVI International Horticultural Congress: Elegant Science in Floriculture 624*. pp. 343-348.
45. de Wit, P. J. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell molecular life science*. 64(21):2726-32.
46. De Lamo, F. J., & Takken, F. L. (2020). Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11, 37. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00037>
47. Díaz, N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 10(2), 257-267.
48. Dodds, P. & Thrall, P. (2009). Recognition events and host-pathogen co-evolution in gene-for-gene resistance to flax rust. *Functional Plant Biology*. 36(5): 395–408. doi:10.1071/FP08320
49. Dubreuil, C., Jin, X., Barajas-López, J. de D., Hewitt, T. C., Tanz, S. K., Dobrenel, T., Schröder, W., Hanson, J., Pesquet, E., Grönlund, A., Small, I. & Strand, Å. (2017). Establishment of Photosynthesis through Chloroplast Development Is Controlled by Two Distinct Regulatory Phases. *Plant Physiology*, 176(2), 1199–1214. DOI:10.1104/pp.17.00435
50. Dutt, S., Parkash, J., Mehra, R., Sharma, N., Singh, B., Raigond, P., Chopra, S. & Singh, B. P. (2015). Translation initiation in plants: roles and implications beyond protein synthesis. *Biologia plantarum*, 59(3), 401-412. DOI: 10.1007/s10535-015-0517-y
51. Egan, A. N., Schlueter, J., & Spooner, D. M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American journal of botany*, 99(2), 175-185. DOI: 10.3732/ajb.1200020
52. Eseverri, Á., Baysal, C., Medina, V., Capell, T., Christou, P., Rubio, L. M., & Caro, E. (2020). Transit Peptides From Photosynthesis-Related Proteins Mediate Import of a Marker Protein Into Different Plastid Types and Within Different Species. *Frontiers in plant science*, 11, 560701. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.560701>

53. Espinas, N. A., Kobayashi, K., Takahashi, S., Mochizuki, N., & Masuda, T. (2012). Evaluation of unbound free heme in plant cells by differential acetone extraction. *Plant and Cell Physiology*, 53(7), 1344-1354. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs067>
54. Evans, M. (2019). Oxidation Reactions of Thiols.
55. Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. *Frontiers in plant science*, 10, 536. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
56. Filgueira, J. J. (2011). Experiencias en mejoramiento del clavel (*Dianthus caryophyllus*). Primera edición. Universidad Militar Nueva Granada. pp 1-100.
57. Freeman, B. C., & Beattie, G. A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01
58. Glagoleva, A. Y., Shoeva, O. Y. & Khlestkina, E. K. (2020). Melanin Pigment in Plants: Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science*. 11:770. doi: 10.3389/fpls.2020.00770
59. Gorshkova, D. S., & Pojidaeva, E. S. (2021). Members of the universal stress protein family are indirectly involved in gibberellin-dependent regulation of germination and post-germination growth. *Russian Journal of Plant Physiology*, 68(3), 451-462. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1021443721030055>
60. Gracz-Bernaciak, J., Mazur, O., & Nawrot, R. (2021). Functional studies of plant latex as a rich source of bioactive compounds: Focus on proteins and alkaloids. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12427. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222212427>
61. Grant, D., Britto, R., Soto, J. P. & Thiell, M. (2017). International Freight transport in South America: the case of Colombia. Beresford, A. K., & Pettit, S. *International freight transport: Cases, structures and prospects*. 244p.
62. Groenewald, S. (2006). Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. University of Pretoria. Tesis de Maestría en Ciencias. pp 5-8.
63. Guo, Y., Ye, F., Sheng, Q., Clark, T., & Samuels, D. C. (2014). Three-stage quality control strategies for DNA re-sequencing data. *Briefings in bioinformatics*, 15(6), 879–889. DOI:10.1093/bib/bbt069
64. Gupta, A. K., & Kaur, N. (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences*, 30(5), 761–776. DOI:10.1007/bf02703574

65. Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (2015). Responses to Plant Pathogens. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. pp. 984-1049. Oxford, UK. John Wiley & Sons.
66. Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., & Zhou, B. (2015). Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges. *Bioinformatics and biology insights*, 9(Suppl 1), 29–46. DOI:10.4137/BBI.S28991
67. He, D., Zhang, H., & Yang, P. (2014). The mitochondrion-located protein OsB12D1 enhances flooding tolerance during seed germination and early seedling growth in rice. *International journal of molecular sciences*, 15(8), 13461-13481. DOI: 10.3390/ijms150813461
68. Hegde, K. T., Narayanaswamy, H., Veeraghanti, K. S., & Manu, T. G. (2017). Efficacy of bio-agents, botanicals and fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing wilt of carnation. *International Journal of Chemical Studies*, 5(6), 139-142.
69. Hou, S., Liu, Z., Shen, H., & Wu, D. (2019). Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. *Frontiers in plant science*, 10, 646.
70. Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
71. Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2016). The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in plant science*, 7, 984.
72. Hu, WP., Chen, YC. & Chen, WY. (2020). Improve sample preparation process for miRNA isolation from the culture cells by using silica fiber membrane. *Sci Rep* 10, 21132. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78202-8>
73. Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell*, 25(9), 3159-3173.
74. Invitrogen. (2010). Qubit 2.0 Fluorometer User Manual. Invitrogen.
75. Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In *Molecular aspects of plant-pathogen interaction* (pp. 265-281). Springer, Singapore. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12
76. Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 966. DOI: 10.3390/ijms21030966
77. Järvi, S., Isojärvi, J., Kangasjärvi, S., Salojärvi, J., Mamedov, F., Suorsa, M., & Aro, E. M. (2016). Photosystem II repair and plant immunity: Lessons learned from *Arabidopsis*

mutant lacking the THYLAKOID LUMEN PROTEIN 18.3. *Frontiers in plant science*, 7, 405.

78. Jiménez-López, D., Bravo, J., & Guzmán, P. (2015). Evolutionary history exposes radical diversification among classes of interaction partners of the MLLE domain of plant poly (A)-binding proteins. *BMC evolutionary biology*, 15(1), 1-13. DOI: 10.1186/s12862-015-0475-1
79. Kao, Y. T., Gonzalez, K. L., & Bartel, B. (2018). Peroxisome function, biogenesis, and dynamics in plants. *Plant Physiology*, 176(1), 162-177. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01050>
80. Kuang, J., Liu, J., Mei, J., Wang, C., Hu, H., Zhang, Y., ... & Yang, L. (2017). A class II small heat shock protein OsHsp18. 0 plays positive roles in both biotic and abiotic defense responses in rice. *Scientific reports*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11882-x>
81. Kuczak, M., & Kurczyńska, E. (2020). Cell wall composition as a marker of the reprogramming of the cell fate on the example of a *Daucus carota* (L.) hypocotyl in which somatic embryogenesis was induced. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8126. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21218126>
82. Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11). DOI: 10.1101/pdb.top084970
83. Kurowska, M. M. (2020). TIP aquaporins in plants: role in abiotic stress tolerance. *Abiotic stress in plants*, 423. DOI: 10.5772/intechopen.94165
84. Labbé, G. (2009). Dynamics and inhibition of class II fructose 1, 6-bisphosphate aldolase. Doctorado en Química de la Universidad de Waterloo. Ontario, Canadá. pp. 1-18.
85. Leggett, R. M., Ramirez-Gonzalez, R. H., Clavijo, B., Waite, D., & Davey, R. P. (2013). Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. *Frontiers in genetics*, 4, 288.
86. Legis. (2022). Analisis de la exportación de flores en Colombia. Legis. Consultado el 1 de octubre del 2022. Recuperado de: <https://blog.legis.com.co/comercio-exterior/exportacion-de-flores-colombia>
87. Li, B., Dewey, C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323 (2011). DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>

88. Li, J. R., Liu, C. C., Sun, C. H., & Chen, Y. T. (2018). Plant stress RNA-seq Nexus: a stress-specific transcriptome database in plant cells. *BMC genomics*, 19(1), 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5367-5>
89. Li, L., Wang, H., Gago, J., Cui, H., Qian, Z., Kodama, N., Ju, H., Tian, S., Shen, D., Chen, Y., Sun, F., Xia, Z., Ye, Q., Sun, W., Flexas, J. & Dong, H. (2015). Harpin Hpa1 interacts with aquaporin PIP1; 4 to promote the substrate transport and photosynthesis in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 5(1), 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep17207>
90. Li, P., Yang, M., Chang, J., Wu, J., Zhong, F., Rahman, A., ... & Wu, S. (2018). Spatial expression and functional analysis of Casparian strip regulatory genes in endodermis reveals the conserved mechanism in tomato. *Frontiers in plant science*, 9, 832. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00832>
91. Li, Y., Song, J., Zhu, G., Hou, Z., Wang, L., Wu, X., Fang, Z., Liu, Y. & Gao, C. (2021). Genome-wide identification and expression analysis of ADP-ribosylation factors associated with biotic and abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PeerJ*, 9, e10963. DOI: 10.7717/peerj.10963
92. Li, X., Wei, W., Li, F., Zhang, L., Deng, X., Liu, Y., & Yang, S. (2019). The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for abiotic stress response in wheat. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1104. DOI: 10.3390/ijms20051104
93. Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Lamprecht, S. C., & Crous, P. W. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum*—clearing the taxonomic chaos. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43, 1.
94. Love, M. I., Anders, S., Kim, V., & Huber, W. (2015). RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Research*, 4.
95. Lyons, R., Stiller, J., Powell, J., Rusu, A., Manners, J. M., & Kazan, K. (2015). *Fusarium oxysporum* triggers tissue-specific transcriptional reprogramming in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one*, 10(4), e0121902.
96. Ma, Y., Liu, M., Stiller, J., & Liu, C. (2019). A pan-transcriptome analysis shows that disease resistance genes have undergone more selection pressure during barley domestication. *BMC genomics*, 20(1), 12. doi:10.1186/s12864-018-5357-7
97. MacroGen. (2019). *Dianthus caryophyllus* Transcriptome Sequencing Report. MacroGen. pp1-20.
98. MacroGen. (2020). *Dianthus caryophyllus* De Novo Assembly Report. MacroGen. pp 1-

99. Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A. & Ahmad, P. (2022). Reactive Oxygen Species in plants: From source to sink. *Antioxidants*, 11(2), 225. DOI: 10.3390/antiox11020225
100. Marino, D., Peeters, N., & Rivas, S. (2012). Ubiquitination during plant immune signaling. *Plant physiology*, 160(1), 15-27.
101. Mata-Pérez, C., & Spoel, S. H. (2019). Thioredoxin-mediated redox signalling in plant immunity. *Plant science*, 279, 27-33.
102. Mathur, M., Nair, A., & Kadoo, N. (2020). Plant-pathogen interactions: MicroRNA-mediated trans-kingdom gene regulation in fungi and their host plants. *Genomics*, 112(5), 3021–3035. doi:10.1016/j.ygeno.2020.05.021
103. McDonald, J.H. (2014). Handbook of Biological Statistics. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. Tercera edicion.
104. McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome biology*, 7(4), 1-11.
105. Men, X., Wang, F., Chen, G. Q., Zhang, H. B., & Xian, M. (2019). Biosynthesis of natural rubber: current state and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 50. DOI: 10.3390/ijms20010050
106. Meng, X., Song, T., Fan, H., Yu, Y., Cui, N., Zhao, J., & Meng, K. (2016a). A comparative cell wall proteomic analysis of cucumber leaves under *Sphaerotheca fuliginea* stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(11), 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2266-8>
107. Meng, X., Yu, Y., Zhao, J., Cui, N., Song, T., Yang, Y., & Fan, H. (2018b). The two translationally controlled tumor protein genes, CsTCTP1 and CsTCTP2, are negative modulators in the *Cucumis sativus* defense response to *Sphaerotheca fuliginea*. *Frontiers in plant science*, 9, 544. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00544>
108. Meyer, T., Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Comte, G., Vial, L., Lavire, C., & Moréra, S. (2018). The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(21), 7930-7941. DOI: 10.1074/jbc.RA118.001856
109. Michielsse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 10(3), 311-324.
110. Millar, A. H., Siedow, J. M. & Day, D. (2015). Respiration and Photorespiration. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. pp. 610-655. Oxford, UK. John Wiley & Sons.

111. MinCIT. (2022). Gobierno Nacional celebra con los floricultores las cifras historicas de San Valentin. Consultado el 1 de octubre del 2022. Recuperado de: <https://www.mincit.gov.co/prensa/noticias/comercio/cifras-historicas-exportacion-flores-san-valentin>
112. Minikel, E. V. (2013). Counts vs. FPKM in RNA-seq. CureFFi. Consultado el 26 de julio del 2021. Recuperado de: <https://www.cureffi.org/2013/09/12/counts-vs-fpkms-in-rna-seq/>
113. Misas-Villamil, J. C., van der Hoorn, R. A., & Doehlemann, G. (2016). Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytologist*, 212(4), 902-907. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14117>
114. Möller, R., McDonald, A. G., Walter, C., & Harris, P. J. (2003). Cell differentiation, secondary cell-wall formation and transformation of callus tissue of *Pinus radiata* D. Don. *Planta*, 217(5), 736-747. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1053-0>
115. Mostofa, M. G., Ghosh, A., Li, Z. G., Siddiqui, M. N., Fujita, M., & Tran, L. S. P. (2018). Methylglyoxal—a signaling molecule in plant abiotic stress responses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 96-109. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.009
116. Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2004). RNA integrity number (RIN)—standardization of RNA quality control. *Agilent application note, publication*, 1, 1-8.
117. Munoz-Bertomeu, J., Cascales-Minana, B., Mulet, J. M., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J., Kuhn, J. M., ... & Ros, R. (2009). Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151(2), 541-558. DOI: 10.1104/pp.109.143701
118. Nakkeeran, S., Vinodkumar, S., Dheepa, R., & Renukadevi, P. (2017). Diseases of Carnation and their management. Department of Plant Pathology, Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore-641.
119. Narayanan, B. C. (2008). Structure function diversity within the phosphoenolpyruvate mutase/isocitrate lyase superfamily as revealed by the enzymes oxaloacetate decarboxylase and 2, 3-dimethylmalate lyase (Doctoral dissertation, University of Maryland, College Park). pp. 1-140.
120. Nguyen, Q. M., Iswanto, A. B. B., Son, G. H., & Kim, S. H. (2021). Recent advances in effector-triggered immunity in plants: new pieces in the puzzle create a different paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4709.

121. Niño, J. (2016). La familia génica FTF determina el patrón de colonización y la virulencia en *Fusarium oxysporum*. Universidad de Salamanca. Tesis doctoral. pp 3-18
122. Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1298.
123. Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., & Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in microbiology*, *4*, 248. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00248
124. Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Penn State University Press.
125. Nowicka, B., & Kruk, J. (2010). Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(9), 1587–1605. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.06.00
126. OGTR (Office of the Gene Technology Regulator). (2006). The biology and ecology of *Dianthus caryophyllus* L.(carnation). Office of the Gene Technology Regulator. pp 1-31.
127. OGTR (Office of the Gene Technology Regulator). (2015). The biology *Dianthus caryophyllus* L.(carnation). Office of the Gene Technology Regulator. pp 1-31.
128. Palmer, M. & Prediger, E. (2016). Assessing RNA quality: mRNA integrity. Thermo Fisher Scientific Inc. Recuperado el 06 de Junio del 2018 de: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html>
129. Paludan, S. R., Pradeu, T., Masters, S. L., & Mogensen, T. H. (2021). Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, *21*(3), 137-150.
130. Pashkovskiy, P. P., Soshinkova, T. N., Korolkova, D. V., Kartashov, A. V., Zlobin, I. E., Lyubimov, V. Y., ... Kuznetsov, V. V. (2017). *The effect of light quality on the pro-/antioxidant balance, activity of photosystem II, and expression of light-dependent genes in Eutrema salsugineum callus cells. Photosynthesis Research*, *136*(2), 199–214. DOI:10.1007/s11120-017-0459-7
131. Paul, M. J., Gonzalez-Uriarte, A., Griffiths, C. A., & Hassani-Pak, K. (2018). The role of trehalose 6-phosphate in crop yield and resilience. *Plant Physiology*, *177*(1), 12-23. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01634>

132. Petit-Houdenot, Y. & Fudal, I. Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance. Management. *Frontiers in Plant Science*. 8:1072. doi: 10.3389/fpls.2017.01072
133. Ponnu, J., Wahl, V., & Schmid, M. (2011). Trehalose-6-phosphate: connecting plant metabolism and development. *Frontiers in Plant Science*, 2, 70. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00070>
134. Popielarska-Konieczna, M., Sala, K., Abdullah, M., Tuleja, M., & Kurczyńska, E. (2020). Extracellular matrix and wall composition are diverse in the organogenic and non-organogenic calli of *Actinidia arguta*. *Plant cell reports*, 39(6), 779-798. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02530-2>
135. Prados-Ligero, A. M., Basallote-Ureba, M. J., López-Herrera, C. J., & Melero-Vara, J. M. (2007). Evaluation of susceptibility of carnation cultivars to fusarium wilt and determination of *Fusarium oxysporum* fsp. *dianthi* races in southwest Spain. *HortScience*, 42(3), 596-599.
136. Qiao, Y., Xia, R., Zhai, J., Hou, Y., Feng, L., Zhai, Y., & Ma, W. (2021). Small RNAs in Plant Immunity and Virulence of Filamentous Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 59.
137. Rana, A., Sahgal, M., & Johri, B. N. (2017). *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant–host interaction. In *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology* (pp. 159-199). Springer, Singapore.
138. Saidi, A., Jabalameli, Z., & Ghalamboran, M. (2018). Evaluation of genetic diversity of carnation cultivars using CDDP and DAMD markers and morphological traits. *The Nucleus*, 61(2), 129-135.
139. Savage, H., Montoya, G., Svensson, C., Schwenn, J. D., & Sinning, I. (1997). Crystal structure of phosphoadenylyl sulphate (PAPS) reductase: a new family of adenine nucleotide α hydrolases. *Structure*, 5(7), 895-906. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00244-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00244-X)
140. Scovel, G., Ovadis, M., Vainstein A. Reuven, M. & Yefet, B. (2001). Marker assisted selection for resistance to *Fusarium oxysporum* in the greenhouse carnation. *Acta Horticulturae*. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.552.16
141. Sengupta, S., Mukherjee, S., Basak, P., & Majumder, A. L. (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 656. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00656>

142. Shamrai, S. N. (2014). Plant immune system: basal immunity. *Cytology and genetics*, 48(4), 258-271.
143. Shamrai, S. N. (2014). Plant immune system: basal immunity. *Cytology and genetics*, 48(4), 258-271.
144. Shanmugabalaji, V., Grimm, B., & Kessler, F. (2020). Characterization of a plastoglobule-localized SOUL4 heme-binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 2.
145. Sharma, S., & Raj, H. (2019). In vitro evaluation of botanicals and bio-pesticides against the Fusarium wilt of carnation (*Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 1406-1408.
146. Sharmin, S., Azam, M. S., Islam, M. S., Sajib, A. A., Mahmood, N., Hasan, A. M., Ahmed, R., Sultana, K. & Khan, H. (2012). Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase genes from a susceptible and resistant jute species show opposite expression pattern following *Macrophomina phaseolina* infection. *Communicative & integrative biology*, 5(6), 598-606. DOI: 10.4161/cib.21422
147. Shen, Z., Penton, C. R., Lv, N., Xue, C., Yuan, X., Ruan, Y., ... Shen, Q. (2017). Banana Fusarium Wilt Disease Incidence Is Influenced by Shifts of Soil Microbial Communities Under Different Monoculture Spans. *Microbial Ecology*, 75(3), 739–750. doi:10.1007/s00248-017-1052-5
148. Shi, H., Liu, W., Yao, Y., Wei, Y., & Chan, Z. (2017). Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) confers both abiotic and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 262, 24–31. DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.05.013
149. Shinozaki, K., Uemura, M., Bailey-Serres, J., Bray, E. A. & Weretilnyk, E. (2015). Response to Abiotic Stress. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. pp. 1051-1100. Oxford, UK. John Wiley & Sons.
150. Singh, V. K., Singh, A. K., Singh, S., & Singh, B. D. (2015). Next-Generation Sequencing (NGS) Tools and Impact in Plant Breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*, 563–612. DOI:10.1007/978-3-319-22521-0_20
151. Singla-Pareek, S. L., Kaur, C., Kumar, B., Pareek, A., & Sopory, S. K. (2020). Reassessing plant glyoxalases: Large family and expanding functions. *New Phytologist*, 227(3), 714-721. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16576>

152. Soto-Sedano, J. C., Clavijo-Ortiz, M. J., & Filgueira-Duarte, J. J. (2012a). 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.
153. Soto Sedano, J. C., & Filgueira Duarte, J. J. (2012b). 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.
154. Soto, J., Pabon, F. & Filgueira, J. J. (2009). Relación entre el color de la flor del clavel (*Dianthus caryophyllus*) y la tolerancia a patógenos del género *Fusarium*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 5(1-2), 116-129.
155. Soto, J., Clavijo, M. & Filgueira, J. J. (2012). Phenotypic evaluation of the resistance in F1 in Carnation populations to vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Agronomía Colombiana*, 30(2), 172-178.
156. Souza Jr, C. L. D. (2011). Cultivar development of allogamous crops. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11(SPE), 8-15.
157. Staskawicz, B. J. (2001). Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistance. *Plant Physiology*. 125 (1) 73-76; DOI: 10.1104/pp.125.1.73
158. Stein, O., & Granot, D. (2018). Plant fructokinases: evolutionary, developmental, and metabolic aspects in sink tissues. *Frontiers in Plant Science*, 9, 339. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00339>
159. Su, T., Li, W., Wang, P., & Ma, C. (2019). Dynamics of peroxisome homeostasis and its role in stress response and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 705. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00705>
160. Tanase, K., Nishitani, C., Hirakawa, H., Isobe, S., Tabata, S. Ohmiya, A. & Onozaki, T. (2012). Transcriptome analysis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) based on next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 13(1):292. DOI:10.1186/1471-2164-13-292
161. Tittmann, K. (2014). Sweet siblings with different faces: The mechanisms of FBP and F6P aldolase, transaldolase, transketolase and phosphoketolase revisited in light of recent structural data. *Bioorganic Chemistry*, 57, 263–280. DOI: 10.1016/j.bioorg.2014.09.001
162. Thermo Fisher Scientific. 2020. Qubit Fluorometric Quantification. Thermo Fisher Scientific. Consultado 24 de febrero del 2021. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope->

analysis/molecular-

spectroscopy/fluorometers/qubit.html?gclid=Cj0KCQjw9O6HBhCrARIsADx5qCSlpeO7HHQI-

tl9dYax86wCKqL2i0UXgpgQHmg1xvqLMSGGpFo3fLwaAjlw5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw9O6HBhCrARIsADx5qCSlpeO7HHQI-

tl9dYax86wCKqL2i0UXgpgQHmg1xvqLMSGGpFo3fLwaAjlw5EALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!529745253588!e!!g!!qubit%20quantification&cid=bid_pca_aqb_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con

163. Thomas, H., Ougham, E., Mur, L. & Jansson, S. (2015). Senescence and Cell Death. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. pp. 925-980. Oxford, UK. John Wiley & Sons.
164. Thomas, E. L. & Van der Hoorn, R. A. (2018). Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 639. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19020639>
165. Thordal-Christensen, H. (2020). A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-14
166. Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., & Coaker, G. (2016). Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual review of phytopathology*, 54, 419-441.
167. Ulrich, K., & Jakob, U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 14-27. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035
168. Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inzé, D., Van de Peer, Y., & Van Breusegem, F. (2008). Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 25(3), 507-516. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msm276>
169. Vinson, C. C., Mota, A. P., Porto, B. N., Oliveira, T. N., Sampaio, I., Lacerda, A. L., ... & Brasileiro, A. (2020). Characterization of raffinose metabolism genes uncovers a wild *Arachis* galactinol synthase conferring tolerance to abiotic stresses. *Scientific reports*, 10(1), 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72191-4>
170. Wang, H., Brandt, A. S. & Woodson, W. R. (1993). A flower senescence-related mRNA from carnation encodes a novel protein related to enzymes involved in phosphonate biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 22(4), 719-724. DOI: 10.1007/bf00047414

171. Wang, M., Toda, K., Block, A. & Maeda, H. A. (2019). TAT1 and TAT2 tyrosine aminotransferases have both distinct and shared functions in tyrosine metabolism and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(10), 3563-3576. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006539>
172. Wang, M., Ding, L., Gao, L., Li, Y., Shen, Q. & Guo, S. (2016). The interactions of aquaporins and mineral nutrients in higher plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1229. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17081229>
173. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57. doi: 10.1038/nrg2484
174. Ward, C. (2008). The American Carnation. *Applewood Books*. p. 17-30.
175. Wolińska, A., Podlewski, J., Słomczewski, A., Grządziel, J., Gałązka, A., & Kuźniar, A. (2021). Fungal indicators of sensitivity and resistance to long-term maize monoculture: a culture-independent approach. *Frontiers in microbiology*, 12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.799378>
176. Wolcan S.M., Malbrán, I., Mourellos, C. A., Sisterna, M. N.; González. M., Alippi, A., Nico, A. & Lori, G. (2018) Diseases of Carnation. *Handbook of Florists' Crops Diseases. Handbook of Plant Disease Management. Springer, Cham*. pp. 317-378
177. Xue, H., Tokutsu, R., Bergner, S. V., Scholz, M., Minagawa, J., & Hippler, M. (2015). PHOTOSYSTEM II SUBUNIT R Is Required for Efficient Binding of LIGHT-HARVESTING COMPLEX STRESS-RELATED PROTEIN3 to Photosystem II-Light-Harvesting Supercomplexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 167(4), 1566–1578. DOI:10.1104/pp.15.00094
178. Yagi, M., Onozaki, T., Taneya, M., Watanabe, H., Yoshimura, T., Yoshinari, T., Ochiai, Y. & Shibata, M. (2006). Construction of a Genetic Linkage Map for the Carnation by Using RAPD and SSR Markers and Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) for Resistance to Bacterial Wilt Caused by *Burkholderia caryophylli*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75 (2): 166–172.
179. Yagi, M., Yamamoto, T., Isobe, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Tanase, K., Yamagushi, H. & Onozaki, T. (2013). Construction of a reference genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *BMC genomics*, 14(1), 734.
180. Yagi, M., Kosugi, S., Hirakawa, H., Ohmiya, A., Tanase, K., Harada, T., Kishimoto, K., Nakayama, M., Ichimura, K., Onozaki, T., Yamaguchi, H., Sasaki, H., Miyahara, T., Nishizaki, Y., Ozeki, Y., Nakamuro, M., Suzuki, T., Tanaka, Y., Sato, S., Shirasawa,

- K., Isobe, S., Miyamura, Y., Watanabe, A., Nakayama, S., Kishida, Y., Kohara, M. & Tabata, S. (2014). Sequence Analysis of the Genome of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *DNA Research*. 21(3): 231–241.
181. Yang, I. S., & Kim, S. (2015). Analysis of whole transcriptome sequencing data: workflow and software. *Genomics & informatics*, 13(4), 119.
 182. Yang, J., Ding, C., Xu, B., Chen, C., Narsai, R., Whelan, J., ... & Zhang, M. (2015). A Casparian strip domain-like gene, CASPL, negatively alters growth and cold tolerance. *Scientific reports*, 5(1), 1-11. DOI: 10.1038/srep14299
 183. Yang, X., Zhang, L., Yang, Y., Schmid, M., & Wang, Y. (2021). miRNA Mediated Regulation and Interaction between Plants and Pathogens. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2913.
 184. Yeo, U. D., Soh, W. Y., Tasaka, H., Sakurai, N., Kuraishi, S., & Takeda, K. (1995). Cell wall polysaccharides of callus and suspension-cultured cells from three cellulose-less mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant and cell physiology*, 36(5), 931-936. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078841
 185. Yephet, B. & Shtienberg, D. (1997). Effects of the Host, the Pathogen and the Environment and Their Interactions, on *Fusarium* wilt in Carnation. Agricultural Research Organization. *Phytoparasitica* 25(3):207-216
 186. Yu, S., Sun, Q., Wu, J., Zhao, P., Sun, Y., & Guo, Z. (2021). Genome-Wide Identification and Characterization of Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR) Gene Family in *Medicago truncatula*. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9498.
 187. Yuan, X., Wang, H., Cai, J., Li, D., & Song, F. (2019). NAC transcription factors in plant immunity. *Phytopathology Research*, 1(1), 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42483-018-0008-0>
 188. Yue, J., Zhu, C., Zhou, Y., Niu, X., Miao, M., Tang, X., ... & Liu, Y. (2018). Transcriptome analysis of differentially expressed unigenes involved in flavonoid biosynthesis during flower development of *Chrysanthemum morifolium* 'Chuju'. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
 189. Zeeman, S. C. (2015). Carbohydrate Metabolism. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. pp. 567-610. Oxford, UK. John Wiley & Sons.

190. Zhang, F., Xuan, L., Chen, H., Yu, C., Chong, X., Yin, Y., & Lu, X. (2021). Comparative Transcriptome Profiling of Resistant and Susceptible Taxodium Trees in Responding to the Infection by Pestalotiopsis maculans. *Forests*, 12(8), 1090.
191. Zhang, L., Chen, L., & Dong, H. (2019). Plant aquaporins in infection by and immunity against pathogens—a critical review. *Frontiers in Plant Science*, 10, 632. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00632>
192. Zheng, M., Zhu, C., Yang, T., Qian, J., & Hsu, Y.-F. (2020). GSM2, a transaldolase, contributes to reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*. DOI:10.1007/s11103-020-01022-x
193. Zhang, R., Zheng, F., Wei, S., Zhang, S., Li, G., Cao, P., & Zhao, S. (2019). Evolution of disease defense genes and their regulators in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 335.

10. ANEXOS

Apéndice 1.1: 100 primeros transcritos para cada comparación dando un total de 12,041 transcritos para analizar. Encontrado en el archivo de Excel con el título “Suplementario.”

Apéndice 1.2: FPKM de cada transcrito para cada variedad evaluada. Encontrado en el archivo de Excel con el título “Suplementario.”

Apéndice 1.3: Función proteica de los 299 transcritos analizados. Encontrado en el archivo de Excel con el título “Suplementario.”

Apéndice 1.4: 299 transcritos graficados. Encontrado en el archivo de Excel con el título “Suplementario.”

- A: transcrito 1-50
- B: transcrito 51-100
- C: transcrito 101-150
- D: transcrito 151-200
- E: transcrito 201-250
- F: transcrito 251-299