

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Aproximación metabolómica y proteómica
para el estudio de los mecanismos
asociados a la inducción de resistencia
mediante el uso de sustancias inductoras
comerciales en clavel (*Dianthus
caryophyllus* L), para el control del
marchitamiento vascular causado por
Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi***

Walter Hernando Pérez Mora

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2023

**Aproximación metabólica y proteómica
para el estudio de los mecanismos
asociados a la inducción de resistencia
mediante el uso de sustancias inductoras
comerciales en clavel (*Dianthus
caryophyllus* L), para el control del
marchitamiento vascular causado por
Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi***

Walter Hernando Pérez Mora

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias - Química

Directora:

Doctora Luz Marina Melgarejo Muñoz

Codirector:

Doctor Harold Duban Ardila Barrantes

Línea de Investigación:

Bioquímica de las interacciones hospedero-patógeno

Grupos de Investigación:

Fisiología del Estrés y Biodiversidad en Plantas y Microorganismos

Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2023

A Ángela, musa inspiradora.

A Julián, mi pequeño héroe.

Así, el contador de historias concluyó su relato con una sonrisa en los labios. Agradeció al público por su amable atención y se retiró del escenario con la satisfacción del deber cumplido.

WPM

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Walter Hernando Pérez Mora

Fecha 27/07/2023

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que me han apoyado y acompañado en este camino de investigación y aprendizaje para la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, querida alma mater, y al Departamento de Química, por darme una oportunidad de formación profesional desde el pregrado hasta el doctorado.

Agradezco sinceramente a mi directora de tesis, la profesora Luz Marina Melgarejo, por su guía experta y su inquebrantable apoyo durante todo mi proceso en la universidad. Sus conocimientos y consejos fueron fundamentales en el desarrollo de esta investigación, y su compromiso con mi crecimiento académico y personal durante estos 15 años desde que tuve la fortuna de llegar a su laboratorio son algo por lo que siempre la recordaré con afecto.

También deseo agradecer a mi codirector de tesis, el Profesor Harold Ardila Barrantes, por su confianza puesta en mi para hacer parte de su grupo de investigación. Sin lugar a duda, he sido muy afortunado por contar con su guía, conocimientos y dedicación, que hoy me permiten culminar esta etapa del proceso.

Al grupo de investigación Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales, quienes generosamente compartieron su tiempo y conocimientos para enriquecer mi trabajo en especial a mi querida amiga Eliana Bustos.

Al laboratorio de Química Bioorgánica de la Universidad Militar Nueva Granada, en especial al profesor Ericsson Coy por el valioso apoyo en la realización de los análisis metabólicos.

A la Universidad de Córdoba en España, en especial a los profesores Jesús Jorrín Novo y María Ángeles Castillejo por su valioso aporte al análisis de los datos de proteómica.

También quisiera agradecer a los integrantes del Grupo de Investigación Bioquímica, Proteómica y Biología de Sistemas Vegetal y Agroforestal quienes no dudaron en colaborar cuando lo necesité durante mi pasantía doctoral, en especial a Tamara Hernández, Marta Tienda. Mónica Labella, Daniela Hernández, Mercedes Jiménez, María del Mar Luna, Irene Honrubia, Javier Ramírez, y a las profesoras Dolores Rey y María del Carmen Molina. También al laboratorio del servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) por el apoyo en el análisis proteómico de mis muestras.

A la empresa floricultora FLORVAL SAS Sede QFC por su generosa donación del material vegetal.

Al Centro De Gestión Industrial del SENA, por su apoyo durante el proceso y permitirme poder aportar a la construcción de país desde mis conocimientos. También a mis compañeros del SENA, es especial a mis queridas amigas Melissa, Jaquelin y Luisa.

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación y la Universidad Nacional de Colombia por medio del proyecto **Estudio de las respuestas bioquímicas, moleculares y fisiológicas ocasionadas por la aplicación de inductores de resistencia en el clavel (*Dianthus caryophyllus* L): nuevas alternativas limpias para el control del marchitamiento vascular**, con número de contrato RC No. 80740-148-2019. Agradezco sinceramente el respaldo que me brindaron para llevar a cabo esta investigación.

No puedo dejar de expresar mi gratitud a mi familia, a mi esposa Ángela y a mi pequeño Julián, por su amor incondicional, apoyo constante y paciencia durante todo este proceso. A mis padres Blanca y Hernando, por su amor, dedicación, apoyo y ejemplo. A Stellita, segunda madre que la vida y mi esposa me regalaron. A mis hermanos, Nelson, Andrés, David y Natalia. Su aliento y comprensión fueron mi mayor fortaleza en momentos de desafío.

A Los compañeros poetas.

A los compañeros de música.

A los compañeros de historia.

X Aproximación metabolómica y proteómica para el estudio de los mecanismos asociados a la inducción de resistencia mediante el uso de sustancias inductoras comerciales en clavel (*Dianthus caryophyllus* L), para el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Este logro no habría sido posible sin el apoyo, el amor y la dedicación de cada una de las personas e instituciones mencionadas anteriormente. A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento.

Resumen

Aproximación metabolómica y proteómica para el estudio de los mecanismos asociados a la inducción de resistencia mediante el uso de sustancias inductoras comerciales en clavel (*Dianthus caryophyllus* L), para el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

La floricultura es un sector económico de interés en Colombia, siendo el clavel uno de los productos destacados. No obstante, el clavel se ve afectado por enfermedades como el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (*Fod*), el cual es el factor de mayor impacto en la producción. Ante esta problemática, se están explorando distintas estrategias para el control de esta enfermedad, como es el caso de la potencialización de la respuesta de defensa innata mediante el uso de inductores de resistencia. En el presente estudio se evaluó el efecto que tienen moléculas inductoras en el patosistema y se seleccionó la tiamina aplicada por aspersion foliar en concentración 1mmol L^{-1} como potencial inductor de resistencia para el control del patógeno en el clavel. Posteriormente, se estudiaron los cambios bioquímicos causados por la tiamina en la planta a nivel de proteínas y metabolitos, usando herramientas de la proteómica y la metabolómica. La aplicación de tiamina promueve la acumulación de proteínas de diversos procesos bioquímicos en la raíz, que han sido previamente vinculados a la defensa vegetal. Además, también promueve la acumulación de metabolitos de tipo flavonoide y derivados del antranilato, que han sido relacionados a cultivares de clavel resistentes a *Fod*. Los resultados obtenidos sugieren que los tratamientos con tiamina permiten la activación de mecanismos de defensa que protegen a la planta frente al patógeno. Estos resultados aumentan el conocimiento sobre el uso de tiamina como agente bioestimulante en plantas y permiten proponer los principales mecanismos bioquímicos asociados a su modo de acción.

Palabras clave: Clavel, Inductor de resistencia, sensibilización, inmunidad innata en plantas, tiamina.

Abstract

Metabolomics and proteomics-based approach for studying mechanisms associated with resistance induction through the use of commercial inducing substances in carnation (*Dianthus caryophyllus* L) for the control of vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Floriculture holds significant economic importance in Colombia, with carnation among the prominent products. Unfortunately, carnations are highly susceptible to diseases, with vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) being a major production-limiting factor. Various strategies are being explored to address this issue, including enhancing the innate defense response using resistance inducers. In this study, we investigated the effect of inducing molecules on the pathosystem and specifically evaluated thiamine as a potential resistance inducer for controlling the Fod pathogen incarnation. Thiamine was applied through foliar spraying at a concentration of 1mmol L⁻¹. Subsequently, we delved into the biochemical changes induced by thiamine in the plants at the protein and metabolite levels, employing proteomic and metabolomic tools. Remarkably, thiamine application promoted the accumulation of proteins involved in diverse biochemical processes in the roots, which have been previously linked to plant defense mechanisms. Additionally, it stimulated the accumulation of flavonoid-type metabolites and anthranilate derivatives, known to be associated with Fod-resistant carnation cultivars. These results suggest that thiamine treatments activate defense mechanisms safeguarding plants against this pathogen. By shedding light on using thiamine as a biostimulant agent in plants, our findings contribute to a better understanding of its mode of action. This knowledge allows us to propose the primary biochemical mechanisms associated with thiamine effectiveness in bolstering plant resistance. Overall, our study opens new possibilities for disease control in carnation and advances our comprehension of how thiamine can be harnessed as a valuable tool in promoting plant defense strategies.

Keywords: Carnation, plant innate immunity, *priming*, resistance inductors, thiamine

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XIX
Lista de abreviaturas.....	XXI
Introducción	1
1. Estado actual del tema.....	7
1.1 Interacción planta patógeno	7
1.2 Modelo experimental <i>Dianthus caryophyllus</i> L. – <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> ¹²	
1.2.1 El hospedero: Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	12
1.2.2 El patógeno: <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	13
1.2.3 La enfermedad: Marchitamiento vascular del clavel.....	15
1.2.4 Manejo del marchitamiento vascular del clavel	17
1.3 Inducción de resistencia	19
1.3.1 Hormonas vegetales como inductores de resistencia	20
1.3.2 Vitaminas como inductores de resistencia	21
1.3.3 Otros compuestos inductores de resistencia.....	22
1.4 Tiamina como inductor de resistencia	23
1.4.1 Funciones de la tiamina en la planta.....	25
1.4.2 El contenido endógeno de tiamina se modula en la interacción planta patógeno	25
1.4.3 La tiamina presenta actividad antioxidante y actúa como modulador del estado redox celular.....	26
1.4.4 La aplicación de tiamina presenta efecto inhibitorio en la colonización y en el crecimiento de la población de patógenos.....	27
1.4.5 La tiamina induce resistencia por mecanismos de elicitación.....	27
1.5 Proteómica aplicada al estudio de la inducción de resistencia en interacciones planta patógeno	29
1.6 Metabolómica aplicada al estudio de la inducción de resistencia en interacciones planta patógeno	33
2. Selección de la tiamina como potencial inductor de resistencia al marchitamiento vascular en clavel	38
Resumen	38
Abstract	39

XIV Aproximación metabolómica y proteómica para el estudio de los mecanismos asociados a la inducción de resistencia mediante el uso de sustancias inductoras comerciales en clavel (*Dianthus caryophyllus* L), para el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

2.1	Introducción	39
2.2	Materiales y métodos	41
2.2.1	Material vegetal y microorganismo	42
2.2.2	Selección del potencial inductor de resistencia al marchitamiento vascular en clavel	44
2.2.3	Efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en clavel	46
2.2.4	Efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en diferentes cultivares susceptibles de clavel.....	47
2.2.5	Ensayo <i>in vivo</i> para la obtención de muestras para análisis proteómico y metabolómico en las condiciones de trabajo determinadas	49
2.2.6	Estimación de la incidencia y severidad de la enfermedad.....	51
2.2.7	Procesamiento de muestras	51
2.2.8	Medición de fenoles y flavonoides	52
2.2.9	Análisis estadístico.....	53
2.3	Resultados y discusión	53
2.3.1	Selección del potencial inductor de resistencia al marchitamiento vascular en clavel	53
2.3.2	Efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en clavel	64
2.3.3	Efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en diferentes cultivares de clavel	69
2.3.4	Ensayo <i>in vivo</i> para la obtención de muestras para análisis proteómico y metabolómico en las condiciones de trabajo determinadas	74
2.4	Conclusiones	76
3. Efecto de la aplicación de tiamina y el reto con el patógeno en el perfil de proteínas de dos cultivares de clavel		79
	Resumen.....	79
	Abstract	80
3.1	Introducción	80
3.2	Materiales y métodos.....	81
3.2.1	Material vegetal y microorganismo	82
3.2.2	Preparación de la muestra	82
3.2.3	Análisis de proteínas	85
3.2.4	Identificación de proteínas.....	86
3.2.5	Anotación funcional de proteínas	86
3.2.6	Análisis estadístico.....	87
3.3	Resultados y discusión	87
3.4	Conclusiones	114
4. Efecto de la aplicación de tiamina y el reto con el patógeno en el perfil de metabolitos de dos cultivares de clavel		117
	Resumen.....	117
	Abstract	118
4.1	Introducción	119
4.2	Materiales y métodos.....	121
4.2.1	Material vegetal y microorganismo	122
4.2.2	Obtención de la muestra y extracción de metabolitos.....	122

4.2.3	Análisis de metabolitos	123
4.2.4	Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	124
4.2.5	Anotación de metabolitos.....	125
4.3	Resultados y discusión.....	125
4.3.1	Efecto en el contenido total de fenoles y flavonoides de la raíz del clavel....	125
4.3.2	Efecto en los perfiles de metabolitos fenólicos de la raíz de clavel	127
4.3.3	Efecto de la inoculación en el perfil de metabolitos.....	136
4.3.4	Efecto de la aplicación de tiamina en el perfil de metabolitos.....	140
4.3.5	Efecto de la aplicación de tiamina y posterior inoculación con <i>Fod</i> en el perfil de metabolitos.....	144
4.4	Conclusiones.....	148
5.	Discusión general	150
6.	Conclusiones y recomendaciones.....	159
6.1	Conclusiones.....	159
6.2	Recomendaciones.....	160
	Bibliografía	163

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Modelo Zig-Zag de la interacción planta patógeno.....	9
Figura 1-2: Diferentes cultivares de clavel muestran la diversidad de colores de la flor y por qué es apreciada en los mercados internacionales.	12
Figura 2-1: Diagrama de flujo general de trabajo.	41
Figura 2-2: Esquema general del ensayo de obtención de muestras para análisis metabolómicos y proteómicos.	50
Figura 2-3: Escala descriptiva de severidad empleada para medir el progreso de la enfermedad del marchitamiento vascular del clavel producido por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	51
Figura 2-4: Efecto de cuatro inductores de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en clavel en la semana 4.....	54
Figura 2-5: Efecto de cuatro inductores de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en clavel en la semana 8.....	55
Figura 2-6: Efecto de cuatro inductores de resistencia en la severidad del marchitamiento vascular del clavel.	55

Figura 2-7:	Gráfico de jerarquización por clúster del efecto de cuatro inductores de resistencia al marchitamiento vascular del clavel.	58
Figura 2-8:	Efecto del ácido salicílico y la tiamina como inductores de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en clavel.	59
Figura 2-9:	Efecto del ácido salicílico y la tiamina como inductores de resistencia en la severidad del marchitamiento vascular del clavel.	59
Figura 2-10:	Diagrama biplot del análisis de componentes principales para el efecto de la tiamina (B1) y ácido salicílico (AS) como inductores de resistencia al marchitamiento vascular del clavel.	61
Figura 2-11:	Efecto de la tiamina en las plantas de clavel a las 8 semanas post inoculación.	62
Figura 2-12:	Incidencia del marchitamiento vascular del clavel causado por <i>Fusarium oxysporum</i> en relación con la concentración de tiamina.	65
Figura 2-13:	Índice de severidad del marchitamiento vascular causado por <i>Fusarium oxysporum</i> , en relación con la concentración de tiamina.	65
Figura 2-14:	Diagrama de doble proyección del análisis de componentes principales del efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por <i>Fod</i> en clavel.	67
Figura 2-15:	Dendrograma del análisis de jerarquización por clústers del efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por <i>Fod</i> en clavel.	68
Figura 2-16:	Efecto de la aplicación foliar de tiamina como inductor de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en cultivares susceptibles de clavel en el tiempo.	69
Figura 2-17:	Índice de severidad del marchitamiento vascular causado por <i>Fusarium oxysporum</i> en diferentes cultivares susceptibles de clavel ('Brisa', 'Mizuki' y 'Vorágine').	71
Figura 2-18:	Diagrama de doble proyección del análisis de componentes principales del efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por <i>Fod</i> en los cultivares susceptibles de clavel 'Brisa', 'Mizuki' y 'Vorágine'.	73
Figura 2-19:	Dendrograma del análisis de jerarquización por clústers del efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por <i>Fod</i> en los cultivares susceptibles de clavel 'Brisa', 'Mizuki' y 'Vorágine'.	73
Figura 2-20:	Efecto de la aplicación foliar de tiamina como inductor de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en cultivares susceptibles de clavel en el tiempo.	75
Figura 2-21:	Índice de severidad del marchitamiento vascular causado por <i>Fusarium oxysporum</i> en cultivares con niveles de resistencia contrastantes clavel ('Mizuki' y 'Golem').	75
Figura 3-1:	Electroforesis unidimensional para el cultivar resistente 'Golem' en diferentes tiempos de muestreo.	88

Figura 3-2:	Electroforesis unidimensional para el cultivar susceptible 'Mizuki' en diferentes tiempos de muestreo.	89
Figura 3-3:	Diagrama de Venn del total de proteínas identificadas en cada uno de los tratamientos en los cultivares de clavel A: Susceptible-'Mizuki' y B: Resistente-'Golem'. 90	
Figura 3-4:	Análisis discriminante del conjunto de proteínas detectadas en dos cultivares de clavel con resistencia contrastante al marchitamiento vascular, por efecto de los diferentes tratamientos.....	91
Figura 3-5:	Clasificación funcional de proteínas reguladas en raíz de clavel por efecto de los tratamientos: A. Cultivar susceptible 'Mizuki'. B. Cultivar resistente 'Golem'.	93
Figura 3-6:	Análisis de interacción de redes proteicas de homólogos de <i>A. thaliana</i> inducidas en las raíces de dos cultivares de clavel con resistencia contrastada a la marchitez vascular, por efecto de los diferentes tratamientos.....	97
Figura 4-1:	Contenido total de compuestos fenólicos en cultivares de clavel con niveles de resistencia contrastantes al marchitamiento vascular causado por <i>Fod</i> (Susceptible-'Mizuki' y Resistente-'Golem').	126
Figura 4-2:	Contenido total de flavonoides en cultivares de clavel con niveles de resistencia contrastantes al marchitamiento vascular causado por <i>Fod</i> (Susceptible-'Mizuki' y Resistente-'Golem')......	126
Figura 4-3:	Perfiles cromatográficos de iones totales (TIC) de los extractos metanólicos de raíces de clavel: A: cultivar susceptible – 'Mizuki' (SM) 48 hpi; B: cultivar resistente – 'Golem' (RG)96 hpi.	127
Figura 4-4:	Análisis discriminante de los metabolitos de naturaleza fenólica detectados por medio de cromatografía líquida de alta resolución que evaluó el efecto de los diferentes tratamientos: A: cultivar susceptible – 'Mizuki' (SM); B: cultivar resistente – 'Golem' (RG). 128	
Figura 4-5:	Diagrama <i>Volcano plot</i> e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en el cultivar susceptible de clavel – 'Mizuki' (SM). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – rojo.....	137
Figura 4-6:	Diagrama <i>Volcano plot</i> e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en el cultivar resistente de clavel – 'Golem' (RG). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – rojo.	138
Figura 4-7:	Diagrama <i>Volcano plot</i> e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la aplicación de tiamina en el cultivar susceptible de clavel – 'Mizuki' (SM). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – azul claro.	140
Figura 4-8:	Diagrama <i>Volcano plot</i> e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la aplicación de tiamina en el cultivar resistente de clavel – 'Golem' (RG). Plantas control – rosado; plantas con tiamina – azul claro.....	141
Figura 4-9:	Diagrama <i>Volcano plot</i> e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la aplicación de tiamina y posterior inoculación en el cultivar susceptible de clavel – 'Mizuki' (SM). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – azul oscuro. 144	
Figura 4-10:	Diagrama <i>Volcano plot</i> e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la aplicación de tiamina y posterior inoculación en el cultivar	

XVIII Aproximación metabolómica y proteómica para el estudio de los mecanismos asociados a la inducción de resistencia mediante el uso de sustancias inductoras comerciales en clavel (*Dianthus caryophyllus* L), para el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

resistente de clavel – ‘Golem’ (RG). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – azul oscuro. 145

Figura 5-1 Aproximación al mecanismo asociado a la sensibilización e inducción de resistencia mediante el uso de tiamina aplicada por aspersión foliar en clavel (*Dianthus caryophyllus* L), para el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. 156

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Reportes en los cuales se ha reportado a la tiamina como inductor de resistencia en diferentes sistemas planta patógeno y sus principales efectos.	23
Tabla 1-2: Revisión de algunos estudios realizados en proteómica asociada a la interacción planta-patógeno	32
Tabla 1-3: Revisión de algunos estudios realizados en metabolómica asociada a la interacción planta-patógeno y el uso de algunos inductores de resistencia.	36
Tabla 2-1: Tratamientos del ensayo del efecto de cuatro sustancias comerciales en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en el cultivar 'Solex' de clavel	45
Tabla 2-2: Tratamientos del ensayo del efecto de cuatro sustancias comerciales en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en el cultivar 'Solex' de clavel	45
Tabla 2-3: Tratamientos del ensayo del efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en clavel	47
Tabla 2-4: Tratamientos del ensayo del efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en diferentes cultivares susceptibles de clavel	48
Tabla 2-5: Tratamientos del ensayo del efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por <i>Fod</i> , en cultivares contrastantes de resistencia.	50
Tabla 2-6: Efecto de cuatro inductores de resistencia en el contenido en raíces de compuestos fenólicos y flavonoides.	57
Tabla 2-7: Efecto del ácido salicílico y la tiamina como inductores de resistencia en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.	60
Tabla 2-8: Contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides en raíces de clavel del cultivar 'Solex' por efecto de la aplicación de tiamina en diferentes concentraciones y retos con el patógeno.	66
Tabla 2-9: Contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides en raíces de clavel por efecto de la aplicación de tiamina y retos con el patógeno en diferentes cultivares susceptibles de clavel.	71
Tabla 3-1: Bandas que presentan diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos respecto al control.	88
Tabla 3-2: Resumen de proteínas identificadas por el análisis <i>shotgun</i> -MS/MS en dos cultivares de clavel con resistencia contrastada a la marchitez vascular, por efecto de los	

diferentes tratamientos. (B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*)..... 90

Tabla 3-3: Listado de proteínas que se han reportado en eventos de estrés y aumentaron en los tratamientos evaluados..... 99

Tabla 4-1: Metabolitos regulados en los diferentes tratamientos a dos tiempos de análisis en el cultivar susceptible – ‘Mizuki’ (SM). 130

Tabla 4-2: Metabolitos regulados en los diferentes tratamientos a dos tiempos de análisis en el cultivar Resistente – ‘Golem’ (RG)..... 130

Tabla 4-3: Anotación de metabolitos que se regulan positivamente respecto al control por efecto de los tratamientos en el cultivar susceptible – ‘Mizuki’ (SM) a las 48 horas. 131

Tabla 4-4: Anotación de metabolitos que se regulan positivamente respecto al control por efecto de los tratamientos en el cultivar resistente – ‘Golem’ a las 96 horas. 133

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura Término

AA	Ácido ascórbico
ANOVA	Análisis de varianza
AS	Ácido salicílico
AUDPC	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad
B1	Aplicación de Tiamina
B1 + <i>Fod</i>	Aplicación de tiamina y posterior inoculación con <i>Fod</i>
ETI	Inmunidad desencadenada por efectores
F	Fosfito de potasio
FDR	Tasa de descubrimiento falso
<i>Fod</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IR	Resistencia inducida
ISR	Resistencia sistémica inducida
JA	Ácido jasmónico
MS	Espectrometría de masas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCA	Análisis de Componentes Principales
PDA	Papa dextrosa agar
POD	Peroxidasa
PLSDA	Análisis Discriminante Mínimos Cuadrados Parciales
PRRs	Receptores de reconocimiento de patógenos
PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis
PTI	Inmunidad desencadenada por patrones
RG	Cultivar resistente 'Golem'
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SM	Cultivar susceptible 'Mizuki'
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución

Introducción

En Colombia, la actividad floricultora es una de las más dinámicas y modernas dentro del sector de la agricultura. Colombia es el principal exportador de flores en Latinoamérica y segundo en el mundo, solo superado por Holanda. De acuerdo con los datos presentados por la asociación colombiana de exportadores de flores - Asocolflores, durante el año 2021 en nuestro país se presentaron exportaciones de flor fresca cortada que ascendieron a US\$ 1727 millones de dólares (registrando un aumento del 22.4% respecto a 2020) y 302 mil toneladas de tallos. Dentro de este sector, el clavel (*Dianthus caryophyllus*) se posiciona después de la rosa (21%), como la flor más exportada con una participación del 17%, ubicando al país como el principal exportador de esta flor a nivel mundial, con exportaciones de 256 millones de dólares y 50 mil toneladas exportadas, siendo los principales mercados el estadounidense (40%) y el japonés (17%) (International Trade Center, 2022; MADR, 2022). La floricultura representa una de las actividades económicas de mayor impacto en Colombia, caracterizado por una gran variedad de especies cultivables, un alto impacto en la generación de empleo directo e indirecto (200 mil empleos formales), altos índices en el aporte al desarrollo rural donde se aporta el 25 % del empleo formal femenino y su aporte al comercio exterior, que consolidan a este sector como estratégico en la economía del país (MADR, 2022).

Sin embargo, los costos de producción del clavel se ven afectados actualmente por la incidencia de enfermedades de tipo infeccioso, como es el caso del marchitamiento vascular causado por el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, patógeno que infecta las plantas a nivel de la raíz y coloniza los haces vasculares de la misma. La presencia del patógeno impide el transporte normal de nutrientes y agua a través del xilema, lo cual puede afectar el funcionamiento de la planta y generar altos porcentajes de pérdidas en la producción en variedades susceptibles. Actualmente, para resolver este problema, la principal estrategia de manejo y control de la enfermedad consiste en la aplicación de un plan integrado de control que incluye, además de buenas prácticas agrícolas, la aplicación de fungicidas sistémicos que generan sobrecostos e impactos

negativos sobre el medio ambiente (Basallote-Ureba et al., 2016; Nakkeeran et al., 2018; Wolcan et al., 2018).

La presencia frecuente de *Fod* en los cultivos ha generado un interés particular en el desarrollo de nuevos métodos de control. Sin embargo, la falta de información sobre las bases bioquímicas y moleculares de la resistencia a la enfermedad ha generado un retraso en su desarrollo (Ardila et al., 2014). Métodos de control no químico como la adición de enmiendas orgánicas al suelo (compost, estiércol avícola, residuos vegetales) y la solarización del suelo han sido utilizados; sin embargo, estos métodos son a menudo inadecuados porque no proporcionan una actividad de amplio espectro o no logran el grado de consistencia alcanzado con la fumigación con pesticidas (Basallote-Ureba et al., 2016; Melero-Vara et al., 2011).

En ese contexto, se ha propuesto la resistencia inducida por compuestos químicos de baja toxicidad, como una aproximación promisorio hacia la prevención de enfermedades causadas por patógenos (Ahmed et al., 2016), con la ventaja particular de que dichos compuestos tienen un impacto mínimo en el medio ambiente, comparado con el uso de plaguicidas; además de ser una alternativa relativamente económica que permite el desarrollo de resistencia de amplio espectro a diferentes patógenos (Devi et al., 2020). Dentro de este tipo de compuestos, se destacan vitaminas como la riboflavina, el ácido fólico, la tiamina y el ácido ascórbico, las cuales se les ha demostrado tener un efecto inductor de resistencia en diferentes interacciones planta-patógeno (Abdel Monaim, 2011; Boubakri, 2020; Boubakri et al., 2016; González-Bosch, 2018; Kheyri et al., 2022; Pérez Mora et al., 2021). Así mismo se ha demostrado que hormonas como el ácido jasmónico, ácido salicílico, ácido abscísico y el etileno, pueden ser usadas como agentes de control de enfermedades en plantas (Bertini et al., 2019; Chandrasekhar et al., 2017; Cueto-Ginzo et al., 2016; Hosseinii Zarandi et al., 2022; Linlin Li et al., 2016; Romanazzi et al., 2016). De la misma manera, otros compuestos inorgánicos como el fosfito de potasio (K_3PO_3), fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), o de aluminio ($AlPO_4$), u orgánicos como el ácido β -aminobutírico (BABA), benzotiadiazol (BTH), ácido hexanoico, ácido oleico, ácido indolacético (IAA), entre otros, pueden tener efectos positivos para el control de diferentes enfermedades causadas por patógenos (Alexandersson et al., 2016; Hosseinii Zarandi et al., 2022; Joshi et al., 2021; Lim et al., 2013; Morkunas et al., 2013; Sanabria et al., 2020).

La aplicación de estas alternativas debe estar sujeta a investigaciones que permitan, no solo evaluar su efectividad en el control de la enfermedad, sino que además permita conocer los cambios químicos y bioquímicos que presenta la planta; es bien sabido que la posible aprobación del uso de este tipo de productos requiere de estudios detallados que habiliten la comprensión del efecto que presentan estos compuestos en el metabolismo global de la planta. Bajo esta consideración, el grupo de investigación en Estudio de Actividades Metabólicas vegetales, junto con aliados estratégicos, propuso el proyecto **Estudio de las respuestas bioquímicas, moleculares y fisiológicas ocasionadas por la aplicación de inductores de resistencia en el clavel (*Dianthus caryophyllus* L): nuevas alternativas limpias para el control del marchitamiento vascular**. Proyecto financiado por Minciencias (antes Colciencias) bajo el número de contrato RC No. 80740-148-2019.

En el marco de este proyecto se realizó la presente tesis doctoral con el fin de seleccionar un potencial inductor de resistencia como alternativa para el manejo integrado del marchitamiento vascular del clavel causado por *Fod* y profundizar en los mecanismos bioquímicos involucrados. De acuerdo con esto, en la presente investigación se planteó la siguiente hipótesis: *La aplicación de un inductor de resistencia en el clavel (*Dianthus caryophyllus*) genera cambios bioquímicos a nivel de proteínas y metabolitos, que se pueden asociar con la inducción de resistencia para el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.*

Para confirmar esta hipótesis, el presente trabajo de investigación doctoral se llevó a cabo en etapas secuenciales; primero se seleccionó un potencial inductor de resistencia y luego se estudió la respuesta a nivel de proteínas y metabolitos asociados a dicho proceso. Para ello, en un primer acercamiento, se evaluó el efecto en el control de la enfermedad de diferentes tipos de sustancias inductoras comerciales previamente reportadas en otros sistemas planta/patógeno (i.e., tiamina, ácido ascórbico, ácido salicílico y fosfito de potasio), y el método de aplicación del inductor (i.e., aspersión y *drench*). A partir de los resultados de esta primera etapa, se seleccionó a la tiamina aplicada por aspersión en las hojas, como el método con el mayor potencial para actuar como inductor de resistencia en el patosistema de estudio. Posteriormente, se analizó el efecto de la concentración de la tiamina y el efecto sobre diferentes cultivares

susceptibles de clavel, encontrando que la aplicación de tiamina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tuvo un efecto positivo en la disminución de la incidencia y severidad de la enfermedad en los diferentes cultivares analizados. Posteriormente, se estudiaron los cambios bioquímicos en la planta a nivel de proteínas y acumulación diferencial de metabolitos especializados, usando herramientas de la proteómica y la metabolómica, respectivamente, con el fin de profundizar en los posibles mecanismos en los que se fundamenta este proceso. Lo anterior, permitió la identificación de moléculas (proteínas y metabolitos) que fueron asociadas a la inducción de resistencia debido al aumento en el metabolismo especializado de la planta, proceso asociado posiblemente a la de hormonas como el ácido salicílico. Estos resultados aportaron, por primera vez, evidencia de la posible acción de una vitamina como un inductor de resistencia sistémica adquirida (RSA) en plantas ornamentales; esto es fundamental para plantear su potencial aplicación en los cultivos comerciales.

Estudios enfocados a la investigación básica como el presentado en esta tesis, permiten ampliar el estado del arte relacionado con los fenómenos de inducción de resistencia por la aplicación de tiamina a nivel bioquímico; conocimiento necesario para avanzar en el desarrollo de nuevas alternativas de control al marchitamiento vascular, que puedan integrarse al manejo integrado de la enfermedad, teniendo en cuenta la necesidad de fortalecer el sector de producción de claveles a nivel regional e internacional.

Los resultados de este estudio se presentan en 5 capítulos independientes, tratando de abarcar los aspectos más relevantes de las diferentes fases de la investigación. De acuerdo con esto, en el primer capítulo se presenta el estado del arte de la investigación, en el segundo capítulo la selección del potencial inductor de resistencia y las condiciones de aplicación, en el tercer y cuarto capítulo se presenta el efecto de la aplicación del inductor a nivel de proteínas y metabolitos, respectivamente, y en el capítulo final se presenta una discusión general de los resultados obtenidos.

La divulgación parcial de los resultados de la presente investigación a la comunidad científica se ha realizado hasta la fecha, mediante la publicación de un artículo en revista internacional, dos artículos sometidos a revista internacional, artículos en preparación y diversas presentaciones en eventos, tal como se describe a continuación:

Artículos científicos

Pérez Mora, W., Melgarejo, L. M., & Ardila, H. D. (2021). Effectiveness of some resistance inducers for controlling carnation vascular wilting caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 54:13-14, 886-902. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1868734>

Pérez Mora, W., Melgarejo, L. M., & Ardila, H. D. (2024). Response of susceptible carnation cultivars during thiamine application as inducer of resistance to vascular wilting caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Aceptado para publicación en la revista Ornamental Horticulture con publicación en el volumen 30 del año 2024.

Pérez Mora, W., Castillejo, M.A., Jorrín Novo, J., Melgarejo, L. M., & Ardila, H. D. (2024). Thiamine-induced resistance in carnation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and mode of action studies based on the proteomics analysis of root tissue. Scientia Horticulturae, 323, 112549. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112549>

Presentaciones en eventos científicos

XXXIV Congreso colombiano de fitopatología y ciencias afines. Mosquera, Colombia. Septiembre de 2019. Ponencia oral: Efecto de cuatro inductores sintéticos de resistencia sobre la incidencia, severidad y contenido de fenoles y flavonoides en el patosistema clavel- *Fusarium oxysporum*.

Primer Congreso Colombiano en Biotecnología, Química y Ambiental. Bogotá Colombia, noviembre de 2020. Conferencia magistral: Aplicaciones de la proteómica al estudio del estrés en plantas: Estudio de caso

34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020. Cartagena, Colombia. Octubre de 2021. Ponencia oral: Efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia contra el marchitamiento vascular causado por fusarium en clavel.

IX Simposio Internacional de la Floricultura. Medellín, Colombia. Noviembre de 2022. Conferencia magistral: Aplicación de inductores de resistencia para el control de fitopatógenos en floricultura: un estudio de caso.

V Congreso Colombiano de Bioquímica C2B2-2023. Bucaramanga, Colombia. Noviembre 2023. Ponencia oral: Metabolite profile variations in Carnation roots under the effect of thiamine as a resistance inducer against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* con código C2B20097.

1.Estado actual del tema

1.1 Interacción planta patógeno

Las plantas continuamente se ven sometidas a factores abióticos y bióticos que generan condiciones que pueden ser estresantes. Por esto, requieren de un sistema de respuesta para resistir, tolerar o adaptarse a dichas condiciones. En condiciones de estrés biótico, las plantas emplean múltiples mecanismos para interactuar con diversos organismos (bacterias, hongos, virus, oomicetos, nemátodos, herbívoros, plantas parásitas), detectar patógenos potenciales y activar la respuesta inmune vegetal (Ngou et al., 2022). De esta manera, pueden retrasar la colonización de microorganismos en los tejidos de la planta y, por ende, detener el desarrollo de la enfermedad.

Durante la interacción entre las plantas y los patógenos, estos últimos requieren la expresión de diferentes genes para evitar la detección de la planta y de esta manera poder efectuar la colonización del hospedero vegetal. Para esto requieren una serie de procesos como adherirse a su superficie, secretar enzimas que contribuyan a la descomposición de barreras físicas e inactivar los mecanismos de defensa que se activan en la planta por respuesta a la infección (Ngou et al., 2022).

Evolutivamente, las plantas han desarrollado un sistema innato de defensa inmune contra diversos patógenos; así como patógenos se han especializado en diferentes variedades específicas de plantas. La respuesta de la planta a los microorganismos potencialmente patógenos empieza por el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés *pathogen-associated molecular patterns*) a través de receptores de reconocimiento específicos (PRRs, por su siglas en inglés *pattern recognition receptor*) ubicados principalmente en la superficie celular; esta respuesta se conoce como Inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI por sus siglas en inglés *pattern triggered immunity*). Durante el curso del PTI, varias respuestas intracelulares están asociadas con la defensa como son: el aumento en la expresión de

los genes relacionados con la defensa, cambios en el flujo de Ca^{2+} , producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de fitoalexinas, cascadas de proteína quinasas, reforzamiento de la pared celular de la planta en sitios de infección por producción de ligninas y calosa, así como cierre estomático (Ngou et al., 2022; Sukarta et al., 2022).

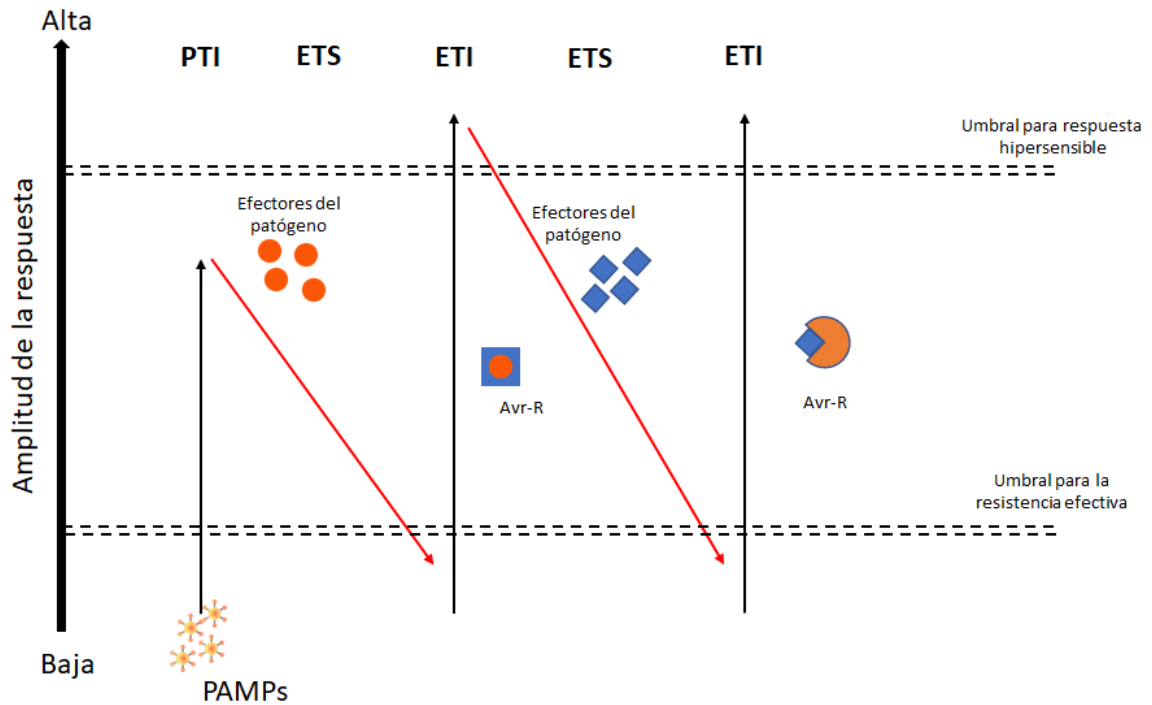
La PTI es suficiente para prevenir la colonización microbiana y el crecimiento en la mayoría de los casos; sin embargo, los patógenos evolutivamente adaptados han desarrollado independientemente efectores, los cuales son proteínas que tienen como objetivo interferir en la respuesta que se desarrolla en la planta durante la expresión de la PTI, desencadenando respuestas que favorecen el éxito del patógeno (Ngou et al., 2022). Dentro de los efectores más estudiados, se encuentran los secretados por el sistema de secreción tipo III (TTSS) de patógenos bacterianos o la familia de efectores de RxLR de oomicetos. La secreción de estos efectores en la célula del huésped puede, en diversos casos suprimir con éxito la PTI, manipulando las vías de señalización a favor del patógeno. A su vez, algunos de estos efectores pueden ser reconocidos por sistemas de vigilancia específicos (receptores citoplasmáticos evolucionados), que han desarrollado las plantas, los cuales involucran un grupo de proteínas denominadas como proteínas de resistencia (R). Este reconocimiento ha sido aceptado como el fundamento de la activación de la segunda rama del sistema inmune innato de las plantas, conocido como inmunidad provocada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés *Effector Triggered Immunity*) (El Kasmi et al., 2017; Lin et al., 2020; Ngou et al., 2022).

En general, las respuestas involucradas en la activación de la ETI son similares a las asociadas a PTI. Sin embargo, la ETI es una respuesta más rápida y de mayor intensidad que la PTI, que a menudo se acompaña de muerte celular localizada en la planta conocida como respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés *Hypersensitive Response*) y resistencia sistémica adquirida, una forma de resistencia inducida que tiene como objetivo prevenir infecciones secundarias (Lin et al., 2020).

La interacción constante de los patógenos con sus hospederos y los continuos procesos evolutivos logran que el patógeno produzca nuevas proteínas efectoras o diversifique las existentes para lograr el éxito en la infección, ya que no serán reconocidas por las proteínas R que son específicas. Este evento suprime la ETI en la planta, generando

virulencia en el patógeno por ETS y produciendo la enfermedad. A su vez, la planta con el tiempo generará nuevas proteínas de resistencia para reconocer estos nuevos efectores y suprimir la enfermedad, y así sucesivamente en el tiempo. Este estado biológico de eventos de interacción planta patógeno PTI - ETS - ETI, se puede resumir en el modelo Zig - Zag (Ngou et al., 2022), de acuerdo a la figura 1-1.

Figura 1-1: Modelo Zig-Zag de la interacción planta patógeno.



En esta gráfica, el eje horizontal representa el tiempo y el eje vertical la amplitud de la respuesta por parte de la planta. La planta reconoce los PAMPs activando sus mecanismos de defensa (PTI) y generando una respuesta de defensa. Sin embargo, el patógeno puede secretar efectores y evadir la respuesta de la planta generando ETS. La planta que ha generado proteínas de resistencia (R) reconoce estos efectores y activa una segunda capa de defensa de mayor amplitud en la respuesta (ETI). El patógeno evolucionado desarrolla nuevas estrategias para superar la ETI de la planta, generando ETS nuevamente y la planta puede entonces activar nuevas defensas, y así sucesivamente, lo que resulta en una dinámica no lineal a manera de "zig-zag", la cual describe el continuo reto de la interacción entre la planta y el patógeno.

A partir de este reconocimiento, se activan en la planta diferentes procesos bioquímicos asociados a la defensa, que están regulados por moléculas de señalización hormonal como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el etileno (ET), las auxinas, las giberelinas, el ácido abscísico (ABA), las citoquininas, los brassinosteroides y las hormonas peptídicas. Sin embargo, entre estas moléculas se destacan, el SA, el JA y el

ET, las cuales se consideran centrales en la respuesta de las plantas a estrés biótico y abiótico, y a procesos de inducción de resistencia (X. Li et al., 2013; Lin et al., 2020).

Durante la interacción se activan de manera local (en el sitio de la infección) los mecanismos de defensa innata de la PTI y la ETI, generando una cascada de señalización que va a producir una respuesta efectiva de la planta. En este proceso, una variedad de señales móviles se sintetiza en sitios infectados por patógenos y luego se transportan a través del floema o por volatilización a tejidos sistémicos no infectados por patógenos y alejados al punto inicial del estímulo, donde inducen una resistencia duradera de amplio espectro al desafío posterior de patógenos. Esto le permite a estos tejidos de la planta tener una mejor respuesta ante retos posteriores con patógenos (Gao, Ma, Ji, Pan, Wang, et al., 2022).

Esta capa de defensa se denomina resistencia inducida y se han descrito dos tipos en las plantas: resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés *Systemic Acquired Resistance*) y resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés *Induced Systemic Resistance*). Ambos mecanismos pueden inducir defensas que confieren protección duradera contra un amplio espectro de microorganismos y están mediadas por fitohormonas (Devi et al., 2020; Romanazzi et al., 2016). La SAR requiere de moléculas señal como ácido salicílico, salicilato de metilo, ácido azelaico, monoterpenos, derivados de glicerol-3-fosfato, entre otros (Gao, Ma, Ji, Pan, Wang, et al., 2022), y está asociada con la acumulación de cierto grupo de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs, *Pathogenesis Related* por sus siglas del inglés), para las cuales se ha descrito un papel importante en la resistencia de la planta. Por otro lado, la ISR se induce por microorganismos a nivel de la raíz, funcionando independientemente de ácido salicílico; se ha encontrado que depende principalmente de la ruta ácido jasmónico/etileno y desencadena la inducción de otro grupo diferente de proteínas PRs (Fernandes & Ghag, 2022; Jia et al., 2020; Romanazzi et al., 2016).

Varios productos químicos y estímulos ambientales pueden actuar sobre las plantas para inducir la resistencia sistémica (Devi et al., 2020). Este tipo de respuestas sistémicas permiten que la planta se encuentre en un estado de "alerta", de modo que, ante un futuro ataque de patógeno, la planta pueda responder de manera más eficiente. Tras el tratamiento con un agente inductor de resistencia sistémica, las plantas adquieren una

capacidad defensiva mejorada que da como resultado una reacción de defensa más rápida y/o más fuerte en el momento en que la planta está expuesta a estrés biótico o abiótico. De manera general, este fenómeno se conoce comúnmente como *priming* y se ha asociado con las diferentes formas de resistencia sistémica, en donde las plantas son capaces de "recordar" infecciones previas, colonización de raíces o tratamientos químicos. El *priming* acelera y aumenta la capacidad de la planta para activar los mecanismos de defensa que le permiten resistir la situación de estrés a la que está expuesta. En consecuencia, las plantas sensibilizadas responden de manera más rápida y/o efectiva cuando se vuelven a exponer al estrés biótico o abiótico (Goellner & Conrath, 2008; Mauch-Mani et al., 2017).

Las respuestas de defensa en las plantas frente a diversos estreses bióticos y abióticos son diversas y pueden involucrar diferentes mecanismos. Estos mecanismos incluyen la activación de cascadas de señalización como la MAP-Kinasa, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de vías metabólicas como la del ácido octadecanoico y la vía fenilpropanoide, el aumento de compuestos fenólicos, la lignificación en el sitio de infección, la activación de enzimas antioxidantes y la inducción de diversos transcritos, entre otros (Devi et al., 2020; Jain et al., 2021; Romanazzi et al., 2016).

Se ha descrito que los mecanismos de SAR se basan en la defensa mediada por ácido salicílico. El factor de transcripción no-expresivo de los genes relacionados con la patogénesis 1 (NPR1, por sus siglas en inglés *nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*) se considera el regulador de este tipo de respuesta inducida (Fernandes & Ghag, 2022). La SAR puede ser desencadenada por inductores bióticos y abióticos (químicos y físicos), y puede activar respuestas de defensa tanto localmente como de manera sistémica a través de señales móviles (Gao, Ma, Ji, Pan, Wang, et al., 2022; Romanazzi et al., 2016).

Una de las características clave de la SAR es su capacidad para establecer una "memoria" de defensa que puede durar semanas o meses, brindando protección a la planta contra futuras infecciones. Durante la SAR, se producen cambios en el sistema redox y las especies reactivas de oxígeno en la célula. Se ha demostrado que el factor de transcripción NPR1, el cual es el regulador principal de la SAR, se activa mediante la reducción mediada por tiorredoxina. Esto provoca la ruptura del oligómero de NPR1 y la entrada de sus monómeros al núcleo, lo cual activa la defensa mediada por el ácido

salicílico (Hönig et al., 2023; Romanazzi et al., 2016). La activación de NPR1 y la respuesta de defensa mediada por el ácido salicílico resultan en la SAR y la activación de aproximadamente el 10% del transcriptoma de la planta. Esta respuesta de defensa implica la regulación directa de factores de transcripción de la familia WRKY, así como la síntesis y secreción de diversas proteínas relacionadas con la resistencia (proteínas PR). También se activan cascadas de señalización como la MAP-Kinasa, la maquinaria de reparación del ADN y se producen modificaciones en las histonas, además de la inducción de transcritos relacionados con la defensa (Lim et al., 2013; Romanazzi et al., 2016).

1.2 Modelo experimental *Dianthus caryophyllus* L. – *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

1.2.1 El hospedero: Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), es una planta herbácea dicotiledónea miembro de la familia *Caryophyllaceae*, originaria de la región del Mediterráneo, que ocupa el segundo lugar entre las principales flores cortadas del mundo (Dehestani-Ardakani et al., 2022; Vanegas-Cano et al., 2022). Esta flor es muy apreciada debido a su diversidad de colores debida a múltiples variedades obtenidas principalmente por cruzamientos (Vanegas-Cano et al., 2022).

La secuencia del genoma del clavel, cultivar Francesco se determinó en el año 2014, estimando el tamaño del genoma en 638,7 Mb (Hirakawa, 2020). Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Figura 1-2: Diferentes cultivares de clavel muestran la diversidad de colores de la flor y por qué es apreciada en los mercados internacionales. Todos los cultivares presentados en la figura se usaron en el presente estudio.

Super Reino: Eucariota

Reino: vegetal

Tipo: Fanerógama

Subtipo: Angiosperma

Phyllum: Dicotiledónea

Clase: Centrospermales



Familia: Caryophyllaceae

Género: *Dianthus*

Especie: *Dianthus caryophyllus* L

El clavel es una de las flores cortadas comerciales más populares del mundo, ocupando el segundo lugar en importancia comercial después de la rosa. Los claveles, las rosas y los crisantemos cortados contribuyen con casi el 50% del comercio mundial de flores cortadas (Jawaharlal et al., 2010; Romero-Cuervo et al., 2021). El clavel (Figura 1-2), se prefiere a las rosas y crisantemos en varios países exportadores, debido a su excelente conservación y mantenimiento de parámetros de calidad, amplia gama de formas y colores, facilidad de cultivo durante todo el año, capacidad para soportar el transporte por largas distancias y de rehidratarse después del transporte continuo (Dehestani-Ardakani et al., 2022; Jawaharlal et al., 2010). Los claveles han sido utilizados y comercializados como flores cortadas y para diferentes tipos de decoración con flores como tapetes, macetas, bordes, ribetes, interiores y jardines rocosos (Jawaharlal et al., 2010).

Comercialmente se utiliza la propagación por esquejes para el cultivo de la planta, porque mantiene las características de la variedad, sumado al hecho de que de la planta madre se pueden obtener un número elevado de esquejes. Las condiciones climáticas de la sabana de Bogotá son las ideales para la producción del clavel, con temperaturas entre 18°C y 20°C de día y entre 6°C y 8°C en la noche, factor que, sumado a otras condiciones, han permitido que el cultivo de esta flor sea una de las más importantes dentro de las flores de exportación cultivadas en Colombia (Ardila, 2013; Pizano de M, 2000).

Sin embargo, el cultivo del clavel se ve afectado por diversas enfermedades de tipo infeccioso, entre las cuales se destaca el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod), la cual es considerada la principal enfermedad del cultivo (Pérez Mora et al., 2021; Romero-Rincón et al., 2021; Santos-Rodríguez et al., 2021; Vanegas-Cano et al., 2022).

1.2.2 El patógeno: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*

Fusarium es un género de hongos ampliamente distribuido que pertenece al Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales y

Familia Nectriaceae. Numerosos patógenos agrícolas económicamente importantes, hacen parte de este género. Dentro de estos patógenos se encuentran: *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum*, los cuales causan diferentes enfermedades en plantas de interés económico (Fernandes & Ghag, 2022; Kumar et al., 2015).

Fusarium oxysporum es un hongo ampliamente distribuido en el suelo, incluye diferentes cepas patógenas (formas especiales) que infectan una amplia gama de especies de plantas, causando pérdidas económicas tanto en cultivos agrícolas como ornamentales, causando diferentes tipos de enfermedad que incluyen pudriciones y marchitamientos vasculares (Ardila, 2013; Fernandes & Ghag, 2022). En el caso de este último tipo de enfermedades, se ha determinado que el patógeno ingresa a través de las raíces en una amplia variedad de especies vegetales, taponando los haces vasculares del xilema y evitando el tránsito normal del agua. *F. oxysporum*, tiene más de 120 formas especiales (f. sp) descritas, las cuales se especializan en relación con la especie vegetal que pueden infectar y posteriormente colonizar. Las formas especiales de *F. oxysporum* se subdividen en razas fisiológicas, dependiendo de la especificidad para causar la enfermedad en determinadas variedades de una misma especie de planta. Dentro de las formas especiales descritas para *F. oxysporum*, se destaca la forma especial *dianthi*, la cual es específica para el clavel y que genera la enfermedad más importante de esta especie vegetal. Dentro de la forma especial *dianthi*, se presentan 8 razas fisiológicas, que difieren ampliamente en su virulencia. Dentro de estas se ha identificado la raza 2 como la más patogénica, mientras que las razas 8, 4 y 1 le siguen en virulencia, y por último, las razas 5, 6 y 7 (Ardila, 2013; Martínez González, 2019). De acuerdo con Poli y colaboradores (Poli et al., 2013), se han descrito tres nuevas razas (9, 10 y 11) en claveles enfermos de Australia (raza 9) y los países Bajos (razas 10 y 11). Se ha reportado que la raza 2 tiene prevalencia en todas las áreas cultivadas con clavel en el mundo, y es la raza predominante en suelos de la Sabana de Bogotá (Arbelaez y Calderon, 1991; Poli et al., 2013).

Poli y colaboradores (Poli et al., 2013), realizaron un estudio con el objetivo de caracterizar el agente causante de la enfermedad en Colombia mediante aproximaciones moleculares y biológicas, comparando aislamientos colombianos con cepas de referencias de las razas fisiológicas de *F. oxysporum* más ampliamente representadas en Europa, confirmando la patogenicidad de los aislamientos colombianos.

Los aislamientos patogénicos y no patogénicos de *Fusarium* sobreviven en las capas superiores del suelo (0-20 cm) como clamidosporas o en forma vegetativa saprofitica como micelio creciendo sobre restos de material vegetal que permanecen en el suelo de cultivos anteriores. Ambas estructuras fúngicas pueden infectar las plantas de clavel en cualquier etapa del ciclo de cultivo (Basallote-Ureba et al., 2016).

El ciclo de infección de *F. oxysporum* se inicia por la germinación de esporas en el suelo en respuesta a una señal que se genera en los exudados de la raíz del huésped. Después de la germinación, las hifas infecciosas se adhieren a la superficie de la raíz y penetran en la epidermis de la raíz sin la formación de ninguna estructura distintiva (Castillejo et al 2015). Posteriormente penetran la endodermis, hasta llegar a los tejidos vasculares, donde se propagan en forma ascendente, ya sea por crecimiento micelial o por difusión pasiva de microconidias (Ardila 2013). Cuando llega a los vasos del xilema el hongo cambia a un modo endofítico de colonización del hospedador, durante el cual permanece exclusivamente dentro de los vasos del xilema, usándolos como vías para colonizar rápidamente el huésped. En esta etapa, los síntomas característicos de marchitamiento aparecen como resultado de estrés por déficit hídrico severo, que finalmente conduce a la muerte completa de la planta. Finalmente, el patógeno crece en la superficie de la planta muerta donde produce clamidosporas que se dispersan en el suelo para un segundo ciclo de infección (Castillejo et al., 2015).

Respecto al mecanismo molecular de la infección, al igual que muchos otros patógenos de plantas, *Fusarium* libera un repertorio de proteínas (enzimas que degradan la pared celular, efectores, factores inductores de necrosis, entre otras), metabolitos y toxinas (ácido fusárico y tricotecenos) que modulan la fisiología de la planta huésped para amortiguar su respuesta inmune (manipulando su hospedador vegetal y suprimiendo las proteínas de defensa del huésped), promover la virulencia y permitir la proliferación de *F. oxysporum* (Fernandes & Ghag, 2022).

1.2.3 La enfermedad: Marchitamiento vascular del clavel

A pesar de la disponibilidad de cultivares que son resistentes a las razas más comunes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*), la marchitez de *Fusarium* sigue siendo una enfermedad crítica para este cultivo (Gullino et al., 2015). El marchitamiento vascular causado por *Fod* en el clavel, se ha convertido en un factor limitante de la producción

comercial de esta flor. Actualmente esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, sin excepción, en todas las regiones donde se cultiva clavel (Pizano de M, 2000; Wolcan et al., 2018).

Típicamente, los primeros síntomas del marchitamiento de clavel consisten en el amarillamiento de la hoja. Los síntomas incluyen coloración vascular (Internamente, se produce una coloración marrón de los tejidos del xilema invadidos por el hongo), pudrición de la raíz (aunque el sistema radicular permanece usualmente intacto; una inspección interna del sistema vascular revela una coloración marrón de los tejidos), marchitamiento de la hoja y del tallo, necrosis desarrollada acropétalmente en tallos individuales o en toda la planta. El taponamiento de los haces vasculares impide el transporte de agua y nutrientes hacia los tejidos superiores lo que causa síntomas de déficit hídrico, y en los casos más severos, conducen a la muerte de la planta. En consecuencia, el rendimiento de los cultivos disminuye lentamente, debido al menor vigor de las plantas (Basallote-Ureba et al., 2016; Poli et al., 2013).

En Colombia se han realizado diferentes estudios para el control de la enfermedad enfocados en la producción de nuevos cultivares de clavel resistentes al ataque del patógeno conservando sus características comerciales a través de mejoramiento convencional y manipulación biotecnológica (Soto-Sedano et al., 2012; Soto-sedano & Filgueira-Duarte, 2012; Soto et al., 2009). Además, trabajos previos realizados sobre la interacción hospedero-patógeno clavel – *Fod*, incluyendo los realizados en el grupo de investigación, han mostrado la susceptibilidad y resistencia de diferentes cultivares de clavel al efecto del patógeno y que las bases moleculares de dicha resistencia son de carácter cuantitativo (Ardila, 2013; Martínez González, 2019). A nivel bioquímico y molecular, con el fin de identificar moléculas relacionadas con los mecanismos de defensa de la planta, se han encontrado cambios en metabolitos a nivel constitutivo e inducible, de tipo flavonoide y sus derivados, los cuales se han relacionado con aumento en la actividad inhibitoria contra hongos en el apoplasto de raíz de clavel (Martínez González, 2019) y en tejido de raíz de clavel (Ardila, 2013; Clematis et al., 2011; Romero-Rincón et al., 2021), por lo cual esta familia de compuestos se considera biomarcador en la interacción Clavel – *Fod*. También se han encontrado proteínas con alguna función en el proceso, dentro de las cuales se resaltan trabajos en peroxidasas tipo III (Ardila et al., 2014), enzimas relacionadas con la ruta fenilpropanoide (Ardila, 2013; Higuera, 2001) y

sus transcritos (Romero-Rincón et al., 2021), enzimas degradadoras de pared celular (poligalacturonasas, pectatoliasas, proteasas, entre otras) (Gómez García & Martínez, 2005) o enzimas relacionadas con la regulación de especies reactivas de oxígeno como las peroxidasas (Ardila & Higuera, 2005; Cuervo et al., 2009; Vanegas-Cano et al., 2022). Además, se ha reportado también el efecto que tiene la adición de un elicitador de origen biótico en la inducción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) enzima principal de la ruta fenilpropanoide, la acumulación de los metabolitos de la ruta y otras respuestas de defensa (Ardila, 2013; Santos-rodíguez et al., 2021). Sin embargo, no hay reportes para el patosistema en el uso de inductores de resistencia de origen sintético.

1.2.4 Manejo del marchitamiento vascular del clavel

Las cepas patógenas de *F. oxysporum* representan una seria amenaza para la producción y no existe ningún método de control curativo (Lecomte et al., 2016). Para lograr un control óptimo, es necesario integrar diversas herramientas de gestión y buenas prácticas agrícolas a lo largo del ciclo de producción. Los programas de manejo integrado de plagas se enfocan en reducir la dependencia de los pesticidas, con el objetivo de minimizar la contaminación ambiental y el impacto en la salud humana (Sanabria et al., 2020).

Las medidas de prevención de enfermedades y las prácticas culturales son los primeros métodos utilizados para evitar la introducción y propagación de los patógenos. Estas medidas incluyen mantener los invernaderos y el equipo en condiciones sanitarias adecuadas, limpiar y desinfectar las semillas, utilizar materiales vegetales libres de *F. oxysporum*, utilizar variedades o cultivares resistentes a los patógenos, desinfectar suelos y sustratos, manejar adecuadamente el agua, monitorear los cultivos de forma regular y practicar la rotación de cultivos (Lecomte et al., 2016; Mehta et al., 2014; Moya-Elizondo & Jacobsen, 2016).

Sin embargo, estos enfoques integrados no eliminan por completo los patógenos del suelo debido a la complejidad de la naturaleza del suelo, que permite la supervivencia de estos patógenos durante largos períodos de tiempo. Además, los estándares de la industria requieren la ausencia de enfermedades.

En el pasado, el control del marchitamiento por *F. oxysporum* en claveles comerciales se realizaba mediante la aplicación del biocida bromuro de metilo antes de la siembra. Sin embargo, debido a su contribución al agotamiento de la capa de ozono, su uso ha sido

prohibido según el Protocolo de Montreal. Como alternativas al bromuro de metilo, se han utilizado productos fitosanitarios como el 1,3-dicloropropeno y el dimetilsulfuro, ya sea solos o combinados con cloropicrina. Estos compuestos tienen una menor volatilidad, son tóxicos para *Fod* y han mostrado buenos resultados en el control de la enfermedad. Sin embargo, su uso está siendo revisado debido a posibles efectos ambientales (Melero-Vara et al., 2011). También se han utilizado fungicidas como captafol, clasificado como sumamente peligroso por la Organización Mundial de la Salud (OMS); difenoconazol, clasificado como moderadamente peligroso por la OMS; y azoxiestrobina, clasificado como de baja toxicidad en condiciones normales de uso por la OMS (Nakkeeran et al., 2018; OMS, 2019; Wolcan et al., 2018). Estas estrategias de control generalmente tienen impactos negativos en la salud humana y el medio ambiente, además de promover el desarrollo de microorganismos resistentes (Boubakri, 2020; Fernández-Cabanás et al., 2022).

En este sentido, se prefieren métodos de control ambientalmente amigables y se han investigado diversas estrategias alternativas a los fungicidas. Se han realizado numerosos informes que exploran estas alternativas. La rotación de cultivos se ha reportado como método de control de patógenos del suelo. Se ha sugerido que el cultivo mixto de girasoles y tagetes, así como la rotación de cultivos utilizando tagetes y repollo, pueden manejar la podredumbre de los cormos del gladiolo causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Riaz et al., 2009). El uso de compost se ha demostrado eficaz en la supresión de una variedad de patógenos que afectan a diferentes plantas, como *Rhizoctonia solani* en frijol y algodón, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en pepino, y *Sclerotinia sclerotium* en lechuga, siendo una alternativa ecológica a los productos químicos para el control de patógenos en las plantas (Fernández-Cabanás et al., 2022; Lecomte et al., 2016; Mehta et al., 2014). También se ha evaluado el uso de estiércol avícola (Melero-Vara et al., 2011) y la solarización del suelo (Suárez-Bonnet et al. 2005) como alternativa al bromuro de metilo para el control del marchitamiento vascular del clavel causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, así como la combinación de estos dos tratamientos en claveles bajo condiciones de invernadero (Basallote-Ureba et al., 2016).

Otra herramienta efectiva para controlar enfermedades de las plantas es el control biológico usando microorganismos no patógenos. En el caso específico del clavel y

Fusarium oxysporum, la cepa T34 de *Trichoderma asperellum* ha demostrado ser efectiva en el control del marchitamiento vascular, reduciendo la incidencia y severidad (Sant et al., 2010). En la actualidad, la mayoría de los productos de agentes de control biológicos microbianos comercializados para controlar *F. oxysporum* en plantas ornamentales están compuestos de cepas de *Trichoderma* (Lecomte et al., 2016); aunque, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., y *Pseudomonas fluorescens*, también han mostrado eficacia en el control del marchitamiento causado por *Fod* (Jawaharlal et al., 2010).

Sin embargo, estos métodos aumentan costos en la producción considerablemente y no son completamente efectivos. Razón por la cual en la actualidad se están explorando métodos de control donde se induce la respuesta de defensa innata de la planta, lo que se conoce como inducción de resistencia y se tratará a continuación.

1.3 Inducción de resistencia

El reconocimiento de un patógeno a menudo desencadena una reacción de resistencia localizada, conocida como la respuesta hipersensible (HR), que se caracteriza por la muerte celular rápida en el sitio de la infección. Se ha comprobado que, ante una segunda infección en un tejido distal de la misma planta, esta presenta un mayor grado de resistencia, denominada resistencia inducida (IR) (Gao, Ma, Ji, Pan, Wang, et al., 2022). En plantas, se han descrito dos formas de IR; la resistencia sistémica adquirida (SAR) que se basa principalmente en la vía de señalización del ácido salicílico (SA) y la resistencia sistémica inducida (ISR) que se basa en las vías de señalización del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET) y está asociada al reconocimiento de microorganismos no patogénicos como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y los hongos micorrícicos, (Boubakri, 2020; Orozco-Mosqueda et al., 2023). Varios inductores bióticos (por ejemplo, a través de una infección controlada por microorganismos patógenos, inoculación con patógenos avirulentos, o inoculación con microorganismos no patógenos), e inductores abióticos (por ejemplo, inductores químicos y físicos) pueden desencadenar resistencia en las plantas (Romanazzi et al., 2016), que se ha descrito como eficaz contra un amplio espectro de patógenos que incluyen virus, hongos, bacterias y nemátodos (Devi et al., 2020; Gao, Ma, Ji, Pan, Wang, et al., 2022).

La acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) es característica de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y su inducción se utiliza como indicador de SAR. Moya-Elizondo y Jacobsen (2016), estudiaron la actividad de tres proteínas PR en diferentes cultivares de trigo para analizar la SAR inducida por un inductor biológico (*B. mycooides*) y un inductor químico (acibenzolar-SMetilo), encontrando que la inducción de SAR está asociada con el aumento de la actividad de las proteínas PR.

El ácido salicílico desempeña un papel importante en la señalización de la SAR. Estudios en plantas de *A. thaliana* han mostrado que los niveles de esta fitohormona están regulados durante la inducción de SAR. La acumulación de ácido salicílico se inicia mediante el reconocimiento de proteínas R con dominios CC-NBS-LRR y TIR-NBS-LRR, que inducen la biosíntesis de ácido salicílico a través de proteínas específicas. Además, el ácido salicílico puede convertirse en salicilato de metilo, una forma móvil que se desmetila en tejidos distales para generar una respuesta sistémica. Después de una defensa exitosa, el ácido salicílico activo se glicosila para inactivarse (Días Puentes, 2012; M. I. Mhlongo et al., 2017).

Diferentes metabolitos, como el ácido salicílico, el ácido jasmónico, el ácido abscísico, las vitaminas, los polifenoles y los flavonoides, y otros compuestos de origen biológico y productos químicos sintéticos, actúan como inductores de resistencia en las plantas. Estos compuestos pueden activar la resistencia local y/o sistémica mediante la inducción de SAR o resistencia sistémica inducida (ISR). Los inductores de resistencia ofrecen una opción para el control de enfermedades infecciosas en las plantas mientras se mantiene la sostenibilidad de la producción (Boubakri, 2020; Linlin Li et al., 2016; Romanazzi et al., 2016).

1.3.1 Hormonas vegetales como inductores de resistencia

Reportes indican, que durante las interacciones planta-patógeno, las moléculas señal y las fitohormonas inducen la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs). Por ejemplo, PR-1, PR-2 y PR-5 son inducidos por ácido salicílico, mientras que, PR-3, PR-4, PR-12, así como la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) son regulados por JA (Linlin Li et al., 2016; Poór et al., 2019). El ácido salicílico (SA) es una molécula de señalización central durante la respuesta inmune

innata de la planta. Se suele inducir por la infección con patógenos biotróficos y hemibiotróficos, y sirve como un componente importante de la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI), la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) y la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Chandrasekhar et al., 2017).

La aplicación exógena de ácido salicílico induce la resistencia sistémica adquirida (SAR) en muchas especies vegetales, lo cual conduce a la expresión de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) y propiedades antimicrobianas. El tratamiento con ácido salicílico afecta diversos procesos fisiológicos, como la transpiración, el cierre estomático, el crecimiento de la planta y la capacidad antioxidante (Chandrasekhar et al., 2017; Cueto-Ginzo et al., 2016; Hosseini Zarandi et al., 2022; F. Yang et al., 2022). Por ejemplo, la adición foliar de ácido salicílico en rosa, moduló el contenido de metabolitos y mejoró la respuesta de la planta contra el áfido *Macrosiphum rosae* (Hosseini Zarandi et al., 2022). En otro estudio sobre el tomate, se encontró que la adición de ácido salicílico al suelo aumentó los compuestos fenólicos y la actividad de enzimas antioxidantes, lo cual contribuyó a la resistencia contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Suprakash Ojha, 2012).

Otra hormona, el ácido jasmónico y sus derivados, también desempeñan un papel importante en la resistencia de las plantas. Estos compuestos regulan la respuesta a patógenos necrotróficos y su adición exógena mejora la resistencia a enfermedades (Bertini et al., 2019; Fernandes & Ghag, 2022; Vanegas-Cano et al., 2022). Por ejemplo, la aplicación exógena de jasmonato de metilo en el banano redujo la incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum*, y se observó un aumento en las actividades enzimáticas antioxidantes y enzimas relacionadas con la defensa como la quitinasa, la fenilalanina amonio liasa y la β -1,3-glucanasa. Este tipo de respuesta se ha relacionado con la inducción de resistencia sistémica inducida similar a la generada por microorganismos benéficos como rizobacterias y micorrizas (Aleandri et al., 2010; Bertini et al., 2019).

1.3.2 Vitaminas como inductores de resistencia

En recientes estudios, se ha demostrado que las vitaminas actúan como inductores de la resistencia a enfermedades, lo cual ha recibido gran atención debido a su seguridad a nivel ambiental y a su rentabilidad, ya que generalmente son económicas. Vitaminas, incluyendo vitaminas del complejo B (tiamina B1, riboflavina B2 y ácido fólico B9),

bisulfito sódico de menadiona (vitamina K3), ácido paraaminobenzoico (PABA, vitamina Bx), ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles (vitamina E), entre otras, han mostrado un efecto protector eficaz frente a una amplia gama de agentes patógenos (Boubakri, 2020; M. Sathiyabama & Indhumathi, 2022).

Hoda Ahmed y colaboradores (2016), investigaron el efecto de la adición de ácido ascórbico y tiamina en semillas de cártamo para controlar enfermedades de la raíz causadas por *Fusarium verticillioides*. Se observó que estas vitaminas estimulaban el crecimiento de las plantas, aumentaban los pigmentos fotosintéticos y los niveles de azúcares solubles y aminoácidos. La riboflavina también ha demostrado capacidad para inducir resistencia. Estudios han mostrado que actúa como señalizador que estimula la resistencia sistémica, reduciendo la incidencia de enfermedades en plantas como *Arabidopsis thaliana* contra *Peronospora parasitica* y *Pseudomonas syringae*; tabaco contra virus del mosaico del tabaco (TMV) y *Alternaria alternata*; soya contra *Macrophomina phaseolina*; y garbanzo contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Además, se ha observado que la riboflavina aumenta la acumulación de compuestos fenólicos, la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y el contenido de proteínas relacionadas con patogénesis (Abdel Monaim, 2011; Saikia et al., 2006).

Los estudios en general concluyen que la aplicación de compuestos químicos simples no tóxicos como la tiamina, el ácido ascórbico y la riboflavina, tienen un efecto en el control de enfermedades y que su uso puede ser viable, debido entre otros factores a su bajo costo, baja toxicidad para el hombre y la no contribución a la contaminación ambiental (Abdel Monaim, 2011; Ahmed et al., 2016). El caso de la tiamina en particular se analiza en el numeral 1.4.

1.3.3 Otros compuestos inductores de resistencia

Se ha demostrado que la capacidad de respuesta de las plantas ante diferentes tipos de estrés (biótico y abiótico), mejora mediante el tratamiento con diferentes productos químicos como son; el ácido β -aminobutírico (BABA, un aminoácido no proteico), el acibenzolar-SMetilo (también conocido como BTH, un análogo funcional del ácido salicílico) y diferentes sales inorgánicas, como los fosfitos. Se ha demostrado que estos productos químicos sensibilizan los tejidos de la planta preactivando las respuestas de

defensa y aumentando los niveles de resistencia contra una amplia gama de patógenos a través de SAR (Anup et al., 2015; Boubakri, 2020; Lim et al., 2013).

Varias sales del ácido fosforoso (fosfitos), se están utilizando cada vez más como fungicidas alternativos, ya que se consideran más amigables con el medio ambiente, pues pueden degradarse a fosfatos por los microorganismos del suelo que poseen la enzima fosfito deshidrogenasa. Los fosfitos son fungicidas sistémicos, que se movilizan por el floema y se utilizan para el control de enfermedades foliares y enfermedades causadas por microorganismos propios del suelo (Lim et al., 2013). También se han utilizado sales del ácido fosfórico como inductores de resistencia contra oomicetos mediante aplicaciones foliares del inductor en papa (Sanabria et al., 2020). Sin embargo, en plantas de melón contra el patógeno de la pudrición de la raíz *M. cannonballus* tratadas con fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4), se reportó que las plantas tratadas con el inductor tenían una mayor biomasa de raíces en comparación con las plantas de control y aquellas tratadas con otros inductores. Sin embargo, este aumento se asocia a una mejora en el estado nutricional de las plantas y no a una resistencia efectiva contra el patógeno (Aleandri et al., 2010). Esto demuestra que no todos los tratamientos de inducción de resistencia son efectivos en todos los modelos planta-patógeno, y que es necesario encontrar el inductor más adecuado para cada sistema de interés.

1.4 Tiamina como inductor de resistencia

La tiamina ha sido utilizada como inductor de resistencia en diferentes sistemas planta patógeno. En la tabla 1-1, se resumen los reportes encontrados después de una búsqueda bibliográfica, en los que se utiliza la tiamina como inductor de resistencia a enfermedades vegetales, y a partir de estos se analiza el mecanismo de inducción de esta vitamina en los numerales a continuación.

Tabla 1-1: Reportes en los cuales se ha reportado a la tiamina como inductor de resistencia en diferentes sistemas planta patógeno y sus principales efectos.

Compuesto	planta	Patógeno	Respuesta inducida	Referencia
Tiamina 30 mM (aspersión sobre las hojas)	uva (<i>Vitis vinífera</i>)	Oomiceto biotrófico <i>Plasmopara viticola</i>	Expresión de genes de la ruta fenilpropanoide, deposición de calosa, acumulación de compuestos fenólicos.	(Boubakri et al., 2013)

Tiamina 50 mM (aspersión)	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Hongo hemibiotrófico <i>Magnaporthe grisea</i>	Efecto de <i>priming</i> persistente en el tiempo, Inducción de SAR a través de la vía de señalización del ácido salicílico, activación del gen <i>PR1</i> .	(Ahn et al., 2005)
	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Bacteria <i>Xanthomonas oryzae</i>		
	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	Virus del mosaico de la pimienta Hongo hemibiotrófico <i>Colletotrichum lagenarium</i>		
Tiamina 10 mM (aspersión sobre las hojas)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato	SAR a través de <i>priming</i> . Acumulación de H ₂ O ₂ , inducción de calosa, y activación de la transcripción de <i>PR1</i> y <i>PAL1</i> .	(Ahn et al., 2007)
Tiamina 5 mM (inyección en la base del tallo)	Soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merr)	Hongo necrotrófico <i>Macrophomina phaseolina</i>	Incremento en actividad de enzimas relacionadas con defensa (POD, PPO, PAL, Quitinasa), aumento en contenido de fenoles. Inducción de resistencia sistémica.	(Abdel Monaim, 2011)
Tiamina 100 mM (inmersión de los frutos en la solución)	Asian pear (<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd. cv. Zaosu)	Hongo necrotrófico <i>Alternaria alternata</i>	Aumento en la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa, peroxidasa, SOD y polifenoloxidasas, además del contenido de flavonoides, fenoles y lignina.	(Yin et al., 2012)
Tiamina encapsulada en nanopartículas de quitosán	Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	Hongo hemibiotrófico <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceri</i>	Aplicación foliar induce enzimas de defensa (quitinasa, β-1,3 glucanasa, peroxidasa, polifenol oxidasa) en hojas y raíces.	(Muthukrishnan Sathiyabama et al., 2019)
Tiamina 100 mM (inmersión de los frutos en la solución)	Melón (<i>Cucumis melo</i> L.)	Hongo <i>Trichothecium roseum</i>	Disminución en la severidad de la enfermedad, acumulación de compuestos fenólicos flavonoides y lignina. Aumento en las actividades PAL, CAT, APX, GR y POD.	(Yong-hong et al., 2017)
	Melón (<i>Cucumis melo</i> L.)	Hongo necrotrófico <i>Alternaria alternata</i>		
Tiamina 1 mM (aspersión sobre las hojas)	Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	Hongo hemibiotrófico <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	Disminución en incidencia y severidad, acumulación de flavonoides	(Pérez Mora et al., 2021)
Tiamina 2,5 mM por drench en raíces	Arroz (<i>Oryza sativa</i> cv. Nipponbare)	Nemátodo <i>Meloidogyne graminicola</i>	Acumulación de H ₂ O ₂ y deposición de lignina. Aumento en la expresión de genes de la ruta fenilpropanoide.	(Huang et al., 2016)
Tiamina entre 0.25 y 15 mM, aspersión sobre semillas	Pimentón (<i>Capsicum annuum</i>)	Virus del mosaico del tabaco	Aumento en la actividad de las enzimas PAL, PPO y POD. Aumento en la expresión de genes relacionados con defensa PAL, POD, PR4, PR9 y	(Torky, 2016)

PR10

Tiamina 0,2 mM (aspersión de la hoja)	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Hongo <i>Rhizoctonia solani</i>	Disminución del progreso de la enfermedad. Inducción de la producción de poliaminas.	(Kheyri et al., 2022)
---	---	---------------------------------	---	--------------------------

1.4.1 Funciones de la tiamina en la planta

La tiamina es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B (vitamina B1). Es conocida en su forma activa (tiamina pirofosfato TPP), por su papel fundamental como cofactor enzimático en diferentes procesos fisiológicos, incluidas las vías metabólicas de la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato, el ciclo del ácido tricarboxílico y la síntesis de aminoácidos (Boubakri et al., 2012; Kamarudin et al., 2017; Sathiyabama et al., 2019). En las plantas, las vitaminas funcionan como cofactores enzimáticos de flavoproteínas enzimáticas implicadas en peroxidación lipídica, proceso en el cual hay generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que sirven como una red de señalización en las respuestas de defensa de las plantas (Boubakri et al., 2012).

1.4.2 El contenido endógeno de tiamina se modula en la interacción planta patógeno

La tiamina se sintetiza en el cloroplasto a partir de la condensación de un anillo de pirimidina (pirofosfato de 4-amino-2-metil-5-hidroxi metilpirimidina (HMP-PP)) y un anillo tiazol (4-metil-5-β-hidroxi etiltiazol fosfato (HET-P)), catalizado por la enzima hidroximetilpirimidina fosfato kinasa (TH1), para formar monofosfato de tiamina. El anillo pirimidínico se sintetiza a partir de aminoimidazol ribonucleótido por acción de la enzima hidroximetilpirimidina sintasa (THIC) y se fosforila por la acción de la enzima TH1. El anillo tiazol se sintetiza a partir de glicina y NAD, mediado por la enzima hidroxietilfosfato sintasa (THI4). La tiamina monofostato sintetizada se defosforila para formar tiamina, la cual se transporta al citosol y se fosforila a su forma activa pirofosfato de tiamina, por la enzima tiamina pirofosfato kinasa (TPK) (Dong et al., 2015; Goyer, 2010; Kamarudin et al., 2017).

Diferentes estudios, incluyendo bioingeniería, han mostrado que la biosíntesis de tiamina puede aumentar la resistencia frente al estrés biótico y abiótico modulando el contenido endógeno de la vitamina (Dong et al., 2015). En palma de aceite se demostró que la colonización exitosa de plántulas por *Hendersonia toruloidea*, da como resultado la regulación positiva de los genes relacionados con la biosíntesis de tiamina THIC, TH14, TH1 y TPK; y una mayor acumulación de la vitamina y sus ésteres (Kamarudin et al., 2017). Por otro lado, se ha reportado que dos de los genes implicados en la biosíntesis de la tiamina son esenciales en la respuesta a patógenos: Los transcritos del gen OsDR8 de arroz, que codifica para la proteína de síntesis del anillo tiazol de la tiamina (TH14) aumentan por interacción con la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y el hongo *Pyricularia grisea* (Wen, Chu, & Wang, 2003), esto fue demostrado en plantas transgénicas que reprimen la expresión del gen, las cuales mostraron menores niveles de tiamina y mayor susceptibilidad a *X. Oryzae*, que fue revertida por la aplicación exógena de tiamina (Dong et al., 2015); y el gen Rox1 que codifica para TPK, el cual es un regulador positivo del gen XA21 en arroz, que confiere resistencia a *X. oryzae*. Se demostró que, cuando Rox1 es silenciado aumenta la susceptibilidad (Lee et al., 2011).

1.4.3 La tiamina presenta actividad antioxidante y actúa como modulador del estado redox celular

El papel antioxidante de la tiamina puede ser indirecto, como precursor de NADH y NADPH a la red antioxidante o afectando el balance redox de la célula; o directo, actuando como antioxidante, para la cual se ha reportado una capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC) de $0,32 \pm 0,01$ y su habilidad como eliminador del anión radical superóxido y de radicales hidroxilos (Asensi-Fabado & Munné-Bosch, 2010).

Un estudio en plantas de *A. thaliana* sometidas al reto con el patógeno necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, reportó que tratamientos con tiamina previos a la inoculación, evidencian que se interfiere con el establecimiento de un estado reductor inicial que es crucial para el mecanismo de patogénesis de *Sclerotinia* (Y. Zhou et al., 2013). El éxito del patógeno se potencia con la inhibición del complejo de las NADPH oxidasas (NOX), el cual es el principal productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la planta, que están involucradas en bajas concentraciones con la señalización en estrés biótico, en la respuesta hipersensible (HR) inducida por ETI en plantas, en la deposición de calosa y en

la promoción de resistencia inducida por mecanismos de SAR (Y. Wang et al., 2016). La aplicación de tiamina mostró aliviar este efecto en el patosistema *A. thaliana*-Sclerotinia, generando una transición celular hacia el estado oxidativo en los tejidos infectados, deposición de calosa activada por NOX-ROS y cierre de estomas dependientes de ROS generados por NOX; respuestas que son favorables para la planta contra el patógeno (Y. Zhou et al., 2013).

Además, la aplicación de tiamina afecta el contenido de ROS y la actividad de enzimas antioxidantes en la planta. En frutos de melón y uva, la tiamina aumenta las concentraciones de ROS, como el peróxido de hidrógeno, y también aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) (Boubakri et al., 2012; Yong-hong et al., 2017).

1.4.4 La aplicación de tiamina presenta efecto inhibitorio en la colonización y en el crecimiento de la población de patógenos

La aplicación de tiamina ha demostrado tener un efecto inhibitorio en el crecimiento y colonización de diversos patógenos en plantas. Por ejemplo, en estudios con hongos, bacterias, virus y áfidos se observó una restricción del crecimiento fúngico en áreas específicas de las plantas tratadas con tiamina (Ahn et al., 2005; Yin et al., 2012; Yong-hong et al., 2017), así como una disminución en la población bacteriana (Ahn et al., 2007), viral (Torky, 2016; Vinchesi et al., 2017) y de áfidos (Hamada et al., 2017; Hamada & Jonsson, 2013). Sin embargo, estos efectos pueden variar según el sistema planta-patógeno y la concentración de tiamina utilizada. En algunos casos, como en el nemátodo *Meloidogyne graminicola* (Huang et al., 2016) y el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, (Muthukrishnan Sathiyabama et al., 2019), no se encontró un efecto significativo de la tiamina. Estas diferencias demuestran la importancia de determinar el mecanismo de acción de la tiamina en cada sistema específico.

1.4.5 La tiamina induce resistencia por mecanismos de elicitación

Cuando las plantas son tratadas con elicitores, ocurre la sensibilización (*priming*) y, en consecuencia, se activan diversas vías de señalización que inducen el mecanismo de defensa en plantas tratadas con elicitor, con el fin de hacer frente a condiciones

ambientales adversas y patógenos invasores (Torky, 2016). En ese sentido, las diferencias clave entre las interacciones compatibles (susceptibles) e incompatibles (resistentes) son el reconocimiento oportuno del ataque del patógeno y la expresión rápida y adecuada de las respuestas de defensa (Muthukrishnan Sathiyabama et al., 2019), y los elicitores son importantes en dicha respuesta como se muestra a continuación.

❖ Induce la respuesta de genes relacionados con la defensa

Las plantas pretratadas con tiamina exógena y desafiadas con patógenos virulentos mostraron acumulación de ARNm de PR en plantas de *A. thaliana* (Ahn et al., 2007), arroz y pepino (Ahn et al., 2005). Aumentaron en la actividad de las enzimas PAL, PPO y POD y en la expresión de genes relacionados con defensa PAL, POD, PR4, PR9 y PR10 en plantas de ají contra el virus del mosaico del tabaco (Torky, 2016). La aplicación foliar de nanopartículas de tiamina, aumentó significativamente las actividades de enzimas relacionada con las defensas, como la polifenol oxidasa (PPO), peroxidasa (POD), β -1,3 glucanasa, quitinasa, quitosanasa y la actividad de proteasa en hojas y raíces de plántulas de garbanzo (Huang et al., 2016).

❖ La inducción de resistencia con tiamina está influenciada por la fenilalanina amonio liasa (PAL)

La fenilalanina amonio liasa (PAL) es una de las enzimas de la ruta fenilpropanoide. El aumento de PAL está asociado con la biosíntesis de ácido salicílico (un importante señalizador de resistencia sistémica en plantas), y de antifúngicos, incluidos compuestos fenólicos como flavonoides y lignina (Yong-hong et al., 2017). Uno de los efectos de inducción de resistencia reportados por la aplicación de tiamina, es precisamente el aumento en PAL a nivel de genes en ají contra el virus del mosaico del tabaco (Torky, 2016) y en la actividad de la enzima PAL; así como de sus transcritos en frutos de melón contra *A. alternata* (Yong-hong et al., 2017) y en frutos de pera contra *A. alternata* (Yin et al., 2012).

La influencia de PAL en el mecanismo de acción de la tiamina para la inducción de resistencia fue demostrada cuando se adiciona conjuntamente el inductor con ácido L-2-aminooxi-3-fenilpropiónico (AOPP), compuesto que actúa como un inhibidor de PAL.

Este experimento encontró una disminución significativa en el efecto de inducción de resistencia por la aplicación de tiamina en la interacción arroz-*M. graminícola*, lo cual sugiere que la síntesis de fenilpropanoides está envuelta en la defensa mediada por tiamina contra *M. graminícola* (Huang et al., 2016).

❖ La inducción de resistencia con tiamina es ácido salicílico dependiente

La resistencia sistémica adquirida se da cuando la planta después del reconocimiento de un patógeno en un punto específico de la planta y la generación de la respuesta produce una cascada de señalización que confiere resistencia a un ataque posterior en otras partes de la planta (Ahn et al., 2007). Ese tipo de resistencia es influenciado por la hormona vegetal ácido salicílico. Diferentes estudios han demostrado que la capacidad de la tiamina para el control de enfermedades en plantas se induce por mecanismos de resistencia sistémica adquirida, ya que al realizar ensayos de inducción de resistencia por aplicación de tiamina en mutantes que no acumulan la hormona, no se obtuvo la misma respuesta positiva en plantas sin la mutación (Ahn et al., 2005; Wang et al., 2016).

1.5 Proteómica aplicada al estudio de la inducción de resistencia en interacciones planta patógeno

Entendiendo el proteoma como el conjunto de las proteínas expresadas (presencia y abundancia) por el genoma en las condiciones de estudio; la proteómica es entonces, el conjunto de técnicas experimentales que permiten obtener información del proteoma. La proteómica intenta caracterizar integralmente el conjunto proteico derivado de la expresión del genoma, en sistemas biológicos de diversa complejidad, en unas condiciones determinadas. En comparación con la naturaleza estática del genoma, el proteoma es altamente dinámico, responsable de la modulación del fenotipo de la planta, a través de cambios en la expresión y degradación de proteínas, modificaciones postraduccionales, localización subcelular e interacciones proteína-proteína y de proteínas con otras biomoléculas (Jain et al., 2021; Maldonado Alconada et al., 2022).

La proteómica combina instrumentación sofisticada, flujos de trabajo experimentales personalizados y herramientas bioinformáticas avanzadas para explorar los cambios en el proteoma celular, el entorno extracelular, las interacciones entre proteínas y las modificaciones postraduccionales (PTM) (B. Liu et al., 2022). De manera general para

realizar un estudio en proteómica se deben realizar básicamente tres etapas secuenciales, que deben ser adaptadas de manera particular a cada especie vegetal objeto de estudio (Ardila, 2013). En la primera se debe realizar la extracción (proceso que depende de la matriz objeto de estudio y que se debe optimizar al inicio del análisis) y la separación de proteínas, en donde se utiliza técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y/o la electroforesis en geles de poliacrilamida en una o dos dimensiones. En una segunda etapa se debe realizar la identificación de las proteínas de interés seleccionadas, por medio de una técnica de alta sensibilidad y exactitud, como lo es la espectrometría de masas en tandem (MSMS), usando métodos débiles de ionización (ES electrospray o la ionización asistida por matriz o MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). Finalmente, en una tercera etapa, es necesario hacer una asignación de función biológica para la proteína encontrada por comparación con bases de datos, usando para ello motores de búsqueda.

La extracción es el paso más importante en todos los estudios proteómicos, ya que va a definir el tipo de proteínas que se va a analizar y por tanto el alcance de los resultados. La extracción y posterior precipitación de las proteínas, debe ser lo más simple posible con el fin de incrementar la reproducibilidad del experimento. La solubilización de la muestra se hace generalmente usando una solución que contiene un agente caotrópico como urea y/o tiourea, los cuales aumentan la solubilidad de las proteínas, rompiendo puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Esta solución además contiene detergentes no iónicos o zwitteriónicos como el CHAPS o el Tritón X-100, los cuales previenen interacciones hidrofóbicas y evitan la formación de agregados de proteínas que además son útiles en la solubilización de proteínas hidrofóbicas; también contiene agentes reductores como el DTT o el β -mercaptoetanol, para reducir y evitar la reoxidación de los puentes disulfuro tanto intra como intermoleculares logrando una completa desnaturalización (Jorrín-novo et al., 2009; Pérez-Mora et al., 2018).

Actualmente, el método de separación de proteínas y péptidos utilizado con mayor frecuencia en análisis proteómicos es la cromatografía líquida (Chandrasekhar et al., 2017; Jain et al., 2021). En la proteómica basada en LC-MS (cromatografía líquida – espectrometría de masas), las mezclas complejas de proteínas se someten primero a digestión enzimática, para que los productos peptídicos puedan ser separados usando cromatografía líquida y posteriormente identificados usando espectrómetros de masas

acoplados. Generalmente el sistema cromatográfico incluye columnas con fases estacionarias hidrofóbicas, que van a separar a los péptidos de acuerdo con su polaridad. La cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas es una técnica que permite identificar y cuantificar de manera simultánea grandes grupos de proteínas y se constituye actualmente como la técnica de mayor resolución para la identificación de péptidos y el análisis de proteoma (Valledor & Weckwerth, 2014).

Después de realizar la separación y posterior identificación por MS/MS es necesario realizar el análisis de los espectros de masas obtenidos y de esta manera identificar la proteína y asignar su función utilizando bases de datos y motores de búsqueda. La identificación de proteínas se realiza interpretando los espectros de masas de péptidos (huella peptídica - *Peptide Mass Fingerprinting*), o los espectros de masas de fragmentos de un determinado péptido (huella de fragmentación peptídica - *Peptide Fragment Fingerprinting*). Algunos de los motores de búsqueda más usados en análisis de proteómica son MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>), Profound (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>), Sequest (<http://www.thermoscientific.com/>), EasyProt (<http://easyprot.unige.ch/>), entre otros, que permiten la identificación de proteínas tanto por huella peptídica como la identificación de péptidos a partir del espectro de fragmentación.

Teniendo en cuenta que las proteínas median los principales mecanismos de respuesta de las plantas a los patógenos desde reconocimiento a través de proteínas PRR y proteínas R; transducción de las señales a través de proteínas de señalización; resistencia inducida y respuesta de defensa a través de proteínas PR; la proteómica se ha convertido en un método de uso frecuente para el estudio de las complejas interacciones entre plantas y patógenos (Castillejo et al., 2015; Ngou et al., 2022). Sumado a esto, el desarrollo técnico de las ciencias "ómicas" y de las herramientas bioinformáticas, así como el creciente número de genomas de hongos que están siendo secuenciados promueven el uso de la proteómica para analizar estas interacciones (Castillejo et al., 2015). El análisis de los grupos de proteínas diferenciales en tejidos de la planta sometida a un reto con un patógeno, proporciona una visión más clara de los mecanismos fisiológicos y celulares de la interacción en comparación con análisis de ADN o ARN (Jain et al., 2021). Con relación a la resistencia inducida, las herramientas de la proteómica han sido utilizadas para el estudio de la interacción planta-patógeno, y la inducción de resistencia sistémica por la adición exógena

de agentes inductores. En la tabla 1-2 se muestran algunos de estos estudios, artículos publicados en los últimos años.

Tabla 1-2: Revisión de algunos estudios realizados en proteómica asociada a la interacción planta-patógeno

Modelo planta-patógeno	Objetivo del trabajo	Técnica proteómica	Referencia
Maíz - <i>Fusarium verticillioides</i>	Análisis de proteínas de apoplasto desencadenadas en respuesta al patógeno	LC-MS/MS	(Abdul Hasseb et al., 2022)
Pepino - <i>F oxysporum</i> f. sp. <i>Cucumerium</i>	Cambios a nivel de proteínas tras inoculación con patógeno	2D SDS-PAGE – MALDI-TOF/TOF	(Zhang et al 2016)
Ginseng - <i>Alternaria panax</i>	Mecanismos de defensa durante la infección asociados a ruta fenilpropanoide y biosíntesis de lignina.	LC-MS/MS	(Q. Yang et al., 2022)
Uva - <i>Plasmopara vitícola</i>	Resistencia inducida por β -1,3 glucano (laminarin)	2D SDS-PAGE NanoLC-MS/MS	(Lemaître-Guillier et al., 2017)
Ají - <i>R. solanacearum</i>	Efecto de la adición exógena de Ácido salicílico	2D-PAGE - Nano LC-MS/MS	(Chandrasekhar et al., 2017)
Papa - <i>P. infestans</i>	Inducción de resistencia asociada a la adición de fosfitos	iTRAQ – UPLC-MS/MS	(Lim et al., 2013)
<i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomate DC3000	Resistencia inducida por oligosacáridos de quitosán	iTRAQ – RP-HPLC LC-MS/MS	(Jia et al., 2020)
Tomate - <i>Botrytis cinérea</i>	Análisis de la resistencia inducida por ácido salicílico y una mezcla de este con iones calcio	2D-SDS-PAGE – MALDI-TOF/TOF	(Linlin Li et al., 2016)
Mijo perla - <i>S. graminícola</i>	Resistencia inducida por ácido β -aminobutírico	2D SDS-PAGE NanoLC-MS/MS	(Anup et al., 2015)

La acumulación diferencial de proteínas por la aplicación de inductores de resistencia en diferentes tipos de interacción planta – patógeno, ha sido usada como herramienta para entender los fenómenos bioquímicos detrás del proceso de inducción de resistencia. Por ejemplo, la adición exógena de ácido salicílico mediante aspersion en hojas de tomate infectadas con el virus X de la papa (PVX), demostró que, el tratamiento con la fitohormona compensa parcialmente la reducción de la tasa fotosintética causada por el virus, aumentó el contenido de proteínas relacionadas con la termotolerancia y el estrés, y disminuyó el contenido de proteínas relacionadas con la apertura estomática (Cueto-Guinzo et al 2016). Otro estudio proteómico en tomate (*Solanum lycopersicum*), demostró que la aplicación de ácido salicílico y un tratamiento combinado con CaCl_2 , presentó un aumento en la resistencia en tomate contra el hongo patógeno *Botrytis cinérea* a través de la acumulación de proteínas implicadas en la respuesta de defensa,

la fotosíntesis, la energía, chaperonas moleculares, el metabolismo y la transducción de señales. (Li et al 2016).

Chandrasekhar y colaboradores (2017), estudiando el modelo planta patógeno Ají (*Capsicum annuum*)-*Ralstonia solanacearum*, encontraron que la aplicación exógena de ácido salicílico 0,5 mM durante 3 días, aumentó la resistencia del ají al marchitamiento causado por esta bacteria. Se evidenció que se presentaba una reducción en el nivel de incidencia de la enfermedad. Además, utilizando herramientas proteómicas, encontraron la sobrerregulación de proteínas relacionadas con el estrés y la defensa, la energía y el metabolismo, la síntesis de proteínas, proteínas de almacenamiento y de transcripción. Estos resultados mostraron el papel que tenía el ácido salicílico en la inducción de RSA para el control de esta enfermedad en las plantas de ají. En otro estudio, en plantas de papa (*Solanum tuberosum*), se analizó el efecto de la adición en el suelo de fosfitos (KH_2PO_3 y K_2HPO_3), antes y después de la infección con el oomicete *Phytophthora infestans*, utilizando herramientas proteómicas. Se encontró que la adición de fosfitos generó cambios en la expresión de proteínas de defensa vegetal asociadas a la vía dependiente del ácido salicílico, la actividad antimicrobiana, la ruta de señalización de ROS, la vía dependiente del ion Ca^{2+} y la respuesta hipersensible (Lim et al 2013). Finalmente, es de resaltar que más allá del estudio de algunas enzimas en particular, a la fecha no se tienen estudios que apliquen herramientas proteómicas para el estudio de la inducción de resistencia con tiamina.

1.6 Metabolómica aplicada al estudio de la inducción de resistencia en interacciones planta patógeno

Los metabolitos son considerados el puente entre el genotipo y el fenotipo. Los cambios en los niveles de metabolitos pueden revelar directamente la función de los genes, revelando así los mecanismos bioquímicos y moleculares que caracterizan el evento estudiado de forma más efectiva (Shen et al., 2023). En ese contexto, la metabolómica hace referencia al análisis de los metabolitos en un sistema biológico a través de un conjunto de herramientas analíticas y estadísticas que permiten realizar investigación exhaustiva de las variaciones de estos metabolitos en el evento estudiado. Generalmente consiste en la obtención de perfiles metabólicos totales (o al menos con la mayor amplitud posible) y análisis estadísticos multivariados, tanto de clasificación como de reconocimiento, que proporcionan una visualización eficiente de los cambios asociados

en términos de ausencia/presencia y/o abundancia, a una condición particular. Esta visualización debe acompañarse de la, identificación y cuantificación de los metabolitos diferencialmente reconocidos bajo las condiciones fisiológicas específicas de estudio (Shen et al., 2023; K. S. Singh et al., 2022); en virtud de lo anterior, se pueden usar herramientas de la metabolómica para el estudio de diferentes tipos de estrés, incluyendo el estrés causado por microorganismos patogénicos.

El término metabolómica aparece a comienzos de este siglo como un enfoque orientado al estudio del metaboloma. Este enfoque agrupa a las técnicas de la química analítica convencionales y modernas, que permiten analizar cantidades considerables de compuestos de bajo peso molecular (i.e., metabolitos), los cuales incluyen una amplia gama de moléculas fisicoquímicamente heterogéneas que se producen a partir de vías metabólicas primarias y secundarias que, debido a su naturaleza y rol, suelen estar asociados a una respuesta fisiológica diferencial en el organismo objeto de estudio (Maldonado Alconada et al., 2022).

Existen varias plataformas tecnológicas disponibles para realizar análisis basados en metabolómica, pero las técnicas cromatográficas, líquida o de gases, acoplada a espectrometría de masas (LC/MS, GC/MS), son las plataformas analíticas de preferencia para los experimentos de análisis de alto rendimiento de metabolitos, porque miles de señales son detectadas a partir de un extracto adecuadamente obtenido de una muestra biológica (Shen et al., 2023). En la práctica, los datos crudos obtenidos por cualquiera de estas técnicas utilizadas en metabolómica son comparados por similitud espectral con bases de datos públicas y comerciales, lo cual es requisito para dar una identidad química a los datos obtenidos, lo que a su vez conduce a su asociación desde la bioquímica para establecer una posible función biológica. Algunas de las bases de datos públicas más utilizadas se listan a continuación:

- HMDB (www.hmdb.ca, base de datos de metabolitos de humanos. Se encuentran espectros de masas y RMN de aproximadamente 114000 metabolitos).
- METLIN (<https://metlin.scripps.edu>, espectros de masas de 16000 compuestos analizados y cerca de 200000 espectros de compuestos predichos *in silico*).
- mzCloud (www.mzcloud.org, espectro de espectrometría de masas de alta resolución de metabolitos).

- Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, información espectral de más de 300000 compuestos).
- Golm Metabolome Database, GMD, (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>, espectros de masas de compuestos metabólicamente activos obtenidos por GC-MS).
- Global Natural Products Social Molecular Networking, GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>, Espectros de masas de diferentes metabolitos).

Debido a que el análisis del metaboloma es todavía un reto analítico y tecnológico dada la enorme diversidad que tienen los diversos metabolitos producidos por un organismo, los análisis en metabolómica se han subdividido en dos enfoques que dependen del tipo de alcance que se dé al experimento, a saber:

- **Análisis metabólico dirigido:** Hace referencia a la medición cuantitativa de un grupo específico de metabolitos (por ejemplo, aminoácidos, lípidos, azúcares, flavonoides, entre otros) con el fin de elucidar las vías metabólicas específicas relacionadas con el objetivo de estudio o para validar biomarcadores identificados en perfiles metabólicos no dirigidos. En ese sentido, los enfoques dirigidos requieren un conocimiento *a priori* de los metabolitos de interés en el sistema de estudio y por lo tanto su objetivo no es tener una cobertura global de los metabolitos (Liu et al., 2022; Shen et al., 2022).
- **Análisis metabólico no-dirigido:** En contraste con los análisis dirigidos, los enfoques metabólicos no dirigidos implican el perfil global del metaboloma en función de los metabolitos que sean detectables por la técnica en el extracto analizado; este grupo de metabolitos detectables suele llamarse perfil metabólico. La metabolómica no dirigida a menudo proporciona más información que la metabolómica específica dada su naturaleza exploratoria, pero el enfoque dirigido suele ser más cuantitativo y orientado a la confirmación de una hipótesis biológica (Liu et al., 2022; Shen et al., 2022).

Los estudios en metabolómica se están utilizando debido a las ventajas que presentan frente a otras herramientas ómicas, como la proteómica y la transcriptómica. Por ejemplo, obtener el perfil metabólico es un análisis más económico, y la tecnología utilizada en esta, es versátil y genérica (Vazques 2015). En años recientes la metabolómica se ha utilizado para el estudio de interacciones planta-patógeno en plantas modelo, mientras

que estudios en plantas no-modelo han sido limitados, debido en gran parte a la falta de conocimiento químico (e.g., metabolitos registrados en bases de datos) y bioquímico (rutas primarias y especializadas) en tales plantas no-modelo, que permitan una interpretación más certera (Kumar et al., 2015).

En la tabla 1-3 se presentan algunos estudios en los que se usan herramientas de la metabolómica para estudiar la interacción planta patógeno, incluyendo fenómenos de inducción de resistencia. Mediante un análisis metabolómico no dirigido, Kumar y colaboradores (2015), analizaron el marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (*Foc*) en garbanzo (*Cicer arietinum*), enfoque que permitió obtener una comprensión de la red metabólica modulada durante el desarrollo de la enfermedad. Se encontró que ciertos metabolitos, como triterpenoides, flavonas, flavonoles y antraquinonas, se acumulan en las raíces de las plantas resistentes y fortalecen los mecanismos de defensa contra *Foc*. Por otro lado, empleando una aproximación de metabolómica no dirigida, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), identificaron el perfil de compuestos orgánicos volátiles (VOC) asociados con la respuesta del tomate en interacción con cepas virulentas o avirulentas de *Pseudomonas syringae* DC3000 pv. Tomate. Los VOC se acumularon diferencialmente cuando las plantas resistieron eficazmente la infección bacteriana, lo que indica que podrían desempeñar un papel en la defensa (López-Gresa et al., 2017).

Estudios en plantas de tabaco usando herramientas de la metabolómica, sugieren que el tratamiento con lipopolisacáridos (LPPs), inductores reconocidos de respuestas de defensa, altera las fitohormonas asociadas a la defensa, como el ácido salicílico, su forma metilada y el ácido azelaico. Se propone que el tratamiento con LPPs induce resistencia a través de un estado de *priming* regulado por estas fitohormonas (Mhlongo et al 2017). Además, en rosas, se descubrió mediante metabolómica que los triterpenoides están relacionados con la resistencia contra el hongo *Podosphaera pannosa* y la inducción de resistencia por la aplicación exógena de ácido salicílico (F. Yang et al., 2022).

Tabla 1-3: Revisión de algunos estudios realizados en metabolómica asociada a la interacción planta-patógeno y el uso de algunos inductores de resistencia.

Modelo planta-patógeno	Objetivo del trabajo	Técnica de separación y	Referencia
------------------------	----------------------	-------------------------	------------

		análisis	
Garbanzo – <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceri</i>	Respuesta metabólica a la enfermedad en variedades susceptibles y resistentes. Análisis metabolómico no dirigido.	UHPLC-MS	(Kumar et al., 2015)
Banano - <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>	Análisis metabolómico comparativo de plantas inoculadas con el patógeno frente a controles	HPLC-MS	Li et al 2017
Tomate - <i>P. syringae</i>	Análisis metabolómico no dirigido en respuesta de la interacción planta patógeno	GC-MS	(López-Gresa et al., 2017)
Rosa - <i>Podosphaera pannosa</i>	Análisis metabolómico no dirigido en respuesta a la inducción de resistencia al oídio o blanquilla de la rosa por adición de ácido salicílico.	UHPLC-MS	(F. Yang et al., 2022)
Tabaco- <i>Burkholderia cepacia</i>	Respuesta metabólica a Inducción de SAR por y lipopolisacáridos	HPLC- MSMS	(M. I. Mhlongo et al., 2017)
Trigo - <i>Zymoseptoria tritici</i>	Respuesta metabólica a inducción de resistencia por el polisacárido Ulvano	UHPLC-MS	(de Borba et al., 2021)
<i>A. thaliana</i> - - <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Análisis metabólico no dirigido a inducción de resistencia por Sistemina de tomate	UHPLC-MS	(Pastor-Fernández et al., 2022)

2. Selección de la tiamina como potencial inductor de resistencia al marchitamiento vascular en clavel

Resumen

En la primera etapa del estudio, se evaluó el efecto de diferentes inductores de resistencia en el marchitamiento vascular del clavel causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*) y su relación con los contenidos de fenoles y flavonoides en las raíces de las plantas de clavel. Se utilizaron esquejes de clavel indexados (cultivar 'Solex' susceptible a la enfermedad) con tres semanas de enraizamiento. Los inductores de resistencia, como ácido ascórbico, ácido salicílico, tiamina y fosfito de potasio se aplicaron por aspersión o *drench* antes de la inoculación con *Fod*. Los resultados mostraron que la aplicación de todos los inductores, excepto el tratamiento de aspersión de K_3PO_3 , redujo la incidencia y severidad de la enfermedad en comparación con los controles. Además, las plantas tratadas con tiamina por aspersión mostraron un aumento en los contenidos de fenoles y flavonoides. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó a la tiamina como potencial inductor de resistencia. Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de la tiamina y además el efecto sobre diferentes cultivares susceptibles. Los resultados mostraron que la aplicación de tiamina en las cuatro concentraciones evaluadas redujo de manera similar la incidencia y la severidad de la enfermedad, según el análisis estadístico multivariante. Además, se observó que la aplicación de tiamina en una concentración de 1 mmol L^{-1} tuvo una respuesta positiva en la reducción de los efectos de la enfermedad en tres cultivares susceptibles. Estos hallazgos resaltan el potencial de la tiamina como inductor de resistencia en el manejo del marchitamiento vascular del clavel causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Abstract

In the first stage of this study, the impact of various resistance inducers on vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*) in carnation, along with their correlation with phenolic and flavonoid contents in carnation roots, were assessed. Three-week-rooted, indexed carnation cuttings of the 'Solex' cultivar, known to be susceptible to the disease, were employed for this phase. The resistance inducers, such as ascorbic acid, salicylic acid, thiamine, and potassium phosphite, were administered via foliar spray or drench before inoculation with *Fod*. The results indicated that application of all inducers, except for the K_3PO_3 foliar spray treatment, effectively reduced the incidence and severity of the disease when compared to the control group. Notably, the plants treated with thiamine via foliar spray exhibited an increase in phenolic and flavonoid contents, which further highlighted thiamine as a potential resistance inducer. Subsequently, the effect of different thiamine concentrations and their impact on various susceptible carnation varieties was evaluated. The results demonstrated that the application of thiamine at the four assessed concentrations equally reduced the incidence and severity of the disease, as revealed by multivariate statistical analysis. Remarkably, it was observed that thiamine application at a concentration of 1 mmol L^{-1} elicited a positive response in mitigating disease effects in three susceptible cultivars. These findings underscore the significant potential of thiamine as a valuable resistance inducer in managing vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation. By identifying thiamine's effectiveness in combating this disease, our study contributes to the development of innovative strategies for disease management in the floriculture industry.

2.1 Introducción

Los inductores de resistencia de las plantas (PRI por sus siglas en inglés *plant resistance inducers*) son agentes que inducen los mecanismos de defensa propios de la planta y conducen a la protección contra patógenos como virus, bacterias, oomicetos y hongos. También se conocen como activadores de resistencia de plantas, bioestimulantes, activadores de defensa de plantas o elicitores (Overbeek et al., 2022). Para desencadenar respuestas de resistencia en las plantas se han descrito dos mecanismos que confieren una protección duradera frente a un amplio espectro de microorganismos. Estos mecanismos son la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) mediada por ácido salicílico y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR) mediada por ácido jasmónico y etileno

(Romanazzi et al., 2016; Ton et al., 2009). Estas respuestas sistémicas permiten que la planta esté en un estado de “alerta”, de modo que, ante un futuro ataque del patógeno, la planta pueda responder de manera más eficiente. Este fenómeno se conoce como *priming* (Romanazzi et al., 2016; Ton et al., 2009; Tripathi et al., 2019). Como una de las características destacables, los PRI tienen el potencial de ser más sostenibles ambientalmente y tener un menor impacto en la salud humana comparado con los pesticidas que se usan para control de enfermedades (Alexandersson et al., 2016; Boubakri et al., 2013). Entre los inductores de resistencia vegetal (PRI) más utilizados se encuentran las vitaminas asociadas a la activación de los mecanismos SAR. Por ejemplo, en algunas plantas modelo se ha determinado que la aplicación de tiamina (B1) genera la transcripción del gen PR1 que regula la vía del ácido salicílico con inducción de resistencia sistémica (Ahn et al., 2005, 2007; Afaf M Hamada & Jonsson, 2013), y se reporta que el ácido ascórbico (AA) activa la proteína NPR1 relacionada con la vía de señalización del ácido salicílico en procesos de defensa frente a patógenos (Boubakri, 2017). Adicionalmente, fitohormonas como el ácido salicílico (AS) inducen resistencia sistémica adquirida en las plantas (Tripathi et al., 2019), y sales inorgánicas como el fosfito de potasio (Phi) incrementan la biosíntesis de enzimas de la vía fenilpropanoide y estimulan la acumulación de fitoalexinas y compuestos fenólicos (Mohammadi et al., 2019; Yáñez-Juárez et al., 2018).

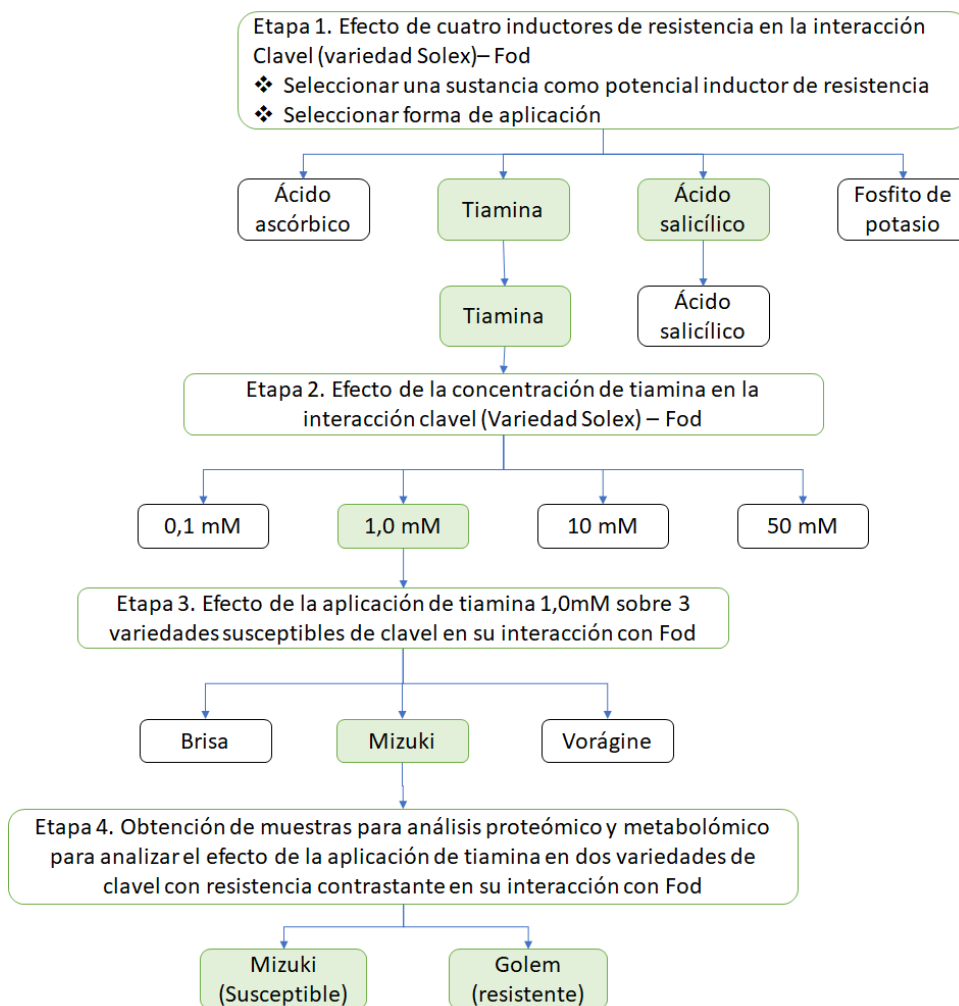
De acuerdo con lo anterior, los inductores de resistencia vegetal se han propuesto como una alternativa para reducir el uso de plaguicidas sintéticos. Sin embargo, su uso en algunos cultivos comerciales sigue sin comprenderse y popularizarse por falta de conocimientos específicos sobre su eficacia y modo de acción. Estudios previos en el patosistema clavel-*Fod* han demostrado que la resistencia al patógeno en la mayoría de los cultivares comerciales es cuantitativa y se basa en una respuesta bioquímica compleja (Ardila, 2013; Soto-Sedano et al., 2012). Sin embargo, la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados todavía está lejos de comprenderse por completo y, aunque en esta interacción planta-patógeno se reporta de manera reciente la inducción de resistencia con un elicitor de origen biótico (Micelio de *Fod*) (Santos-Rodríguez et al., 2021), no se informan estudios sobre la inducción de resistencia con sustancias inductoras de resistencia.

A la fecha del inicio del proyecto, no existían reportes sobre el uso de inductores de resistencia sintéticos y su efecto en el contenido de marcadores bioquímicos de resistencia para este patosistema. Por esta razón, en esta primera fase del proyecto se evaluaron diferentes inductores de resistencia (ácido ascórbico, ácido salicílico, tiamina y fosfito de potasio), utilizando como parámetros fenotípicos, la incidencia y severidad de la enfermedad y, como marcadores bioquímicos, el contenido total de fenoles y flavonoides (Ardila 2013). Es importante complementar que los niveles constitutivos e inducibles de flavonoides a nivel de la raíz se han asociado con un aumento en la actividad inhibitoria contra hongos en el tejido del clavel y ha sido considerada como un biomarcador preliminar de resistencia en la interacción clavel-*Fod* (Ardila, 2013; Clematis et al., 2011; Pérez Mora et al., 2021). Por tanto, en el presente estudio, la indagación sobre su acumulación diferencial como indicador bioquímico permite, combinado con la respuesta fenotípica, explorar el efecto plausible de los inductores evaluados en el clavel.

2.2 Materiales y métodos

En la figura 2-1, se muestran cada una de las etapas seguidas para la selección del potencial inductor de resistencia en clavel contra *Fod*, y las condiciones de aplicación de este. La metodología utilizada para la obtención del aislamiento fúngico, la preparación del inóculo de *Fod* y la inoculación de las plantas con *Fod*, son procedimientos comunes a todos los ensayos y se detallan en el numeral 2.2.1. En los siguientes apartados se darán los detalles experimentales particulares de cada una de las etapas de trabajo.

Figura 2-1: Diagrama de flujo general de trabajo.
Los parámetros en color verde corresponden a los seleccionados durante el proceso.



2.2.1 Material vegetal y microorganismo

El hospedero: Plantas de clavel

Para los diferentes ensayos realizados se utilizaron esquejes de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), de los cultivares comerciales ‘Solex’, ‘Mizuki’, ‘Brisa’, ‘Vorágine’ y ‘Golem’, con óptimas condiciones nutricionales y con tres semanas de enraizamiento, certificados como libre de patógenos. Los cultivares, con excepción del cultivar ‘Golem’, fueron reportados como susceptible al marchitamiento vascular causada por *Fod*, por la empresa Florval S.A.S—QFC (Gachancipá—Cundinamarca, Colombia), quienes donaron los esquejes utilizados durante el desarrollo de este proyecto.

El patógeno: Aislamiento fúngico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

El inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2, utilizado en los diferentes ensayos, fue previamente aislado de raíces de plantas del cultivar 'Mizuki' de clavel, con síntomas típicos de marchitez vascular. Esta cepa fue previamente caracterizada: a nivel de especie, se verificó mediante la amplificación por PCR a la región específica del género ITS descrita previamente (Abd-elsalam et al., 2003) y a nivel de raza se verificó mediante PCR y la distribución diferencial de transposones informada previamente (Chiocchetti et al., 1999).

Preparación del inóculo de *Fod*

El cultivo del patógeno se realizó en medio PDA (Papa Dextrosa Agar, Merck) durante cinco días. Un cm² del medio colonizado por el hongo se transfirió a medio líquido Czapek-Dox-Broth (Fluka) (Ardila, 2013). La suspensión resultante permaneció en agitación durante cinco días a 200 rpm y 25 °C, para ser filtrada en condiciones asépticas con el fin de retirar el micelio del sobrenadante. Se prepararon dos suspensiones de conidias, una con concentración $1,0 \times 10^6$ conidias/mL (por conteo con el hematocitómetro) con fines de inoculación de las raíces del material vegetal, y otra de $1,0 \times 10^3$ conidias/mL para inoculación del sustrato, para aquellos tratamientos que se inocularon con *Fod*.

Inoculación de plántulas de clavel y del sustrato

La inoculación de esquejes de clavel con *Fod* para cada uno de los ensayos descritos a continuación, se realizó de acuerdo con las condiciones reportadas previamente en el grupo de investigación (Ardila, 2014; Higuera, 2001; Pérez Mora et al., 2021). El procedimiento consiste en la inmersión durante 20 segundos de las raíces de los individuos que de acuerdo con el tratamiento requerían inoculación, en una suspensión de $1,0 \times 10^6$ conidias/mL. A continuación, las plantas inoculadas se sembraron en el sustrato contenido en las bandejas plásticas. Este sustrato fue enriquecido previamente con una disolución nutritiva que contenía microconidias en una concentración de $1,0 \times 10^3$ conidias/mL. Las plantas de los tratamientos no inoculados se sometieron a un proceso similar, en el que se reemplazó la suspensión de microconidias por agua destilada estéril y para el sustrato se adicionó solamente disolución nutritiva.

2.2.2 Selección del potencial inductor de resistencia al marchitamiento vascular en clavel

Se realizó un primer ensayo *in vivo* para evaluar el efecto de 4 inductores previamente reportados en otras interacciones planta-patógeno, con el fin de determinar su posible efectividad para la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por *Fod* en clavel. Esquejes del cultivar comercial 'Solex' con tres semanas de enraizamiento fueron sembrados en un sustrato (tierra negra:vermiculita, en una proporción de 75:25) que previamente fue esterilizado a 18 PSI durante una hora, dos veces.

Los esquejes de clavel fueron mantenidos durante 1 semana en las condiciones ambientales del ensayo con fines de aclimatación. Después de esto, disoluciones de cada inductor de resistencia: ácido ascórbico 1mmol L⁻¹ "AA" (Sigma-Aldrich) (P. Singh et al., 2020), ácido salicílico 1mmol L⁻¹ "AS" (Sigma-Aldrich) (F. Yang et al., 2022), tiamina 1 mmol L⁻¹ "B1" (Sigma-Aldrich) (Ahmed et al., 2016; Vinchesi et al., 2017) y fosfito de potasio 150 mmol L⁻¹ "F" (Acuaphyte—grupo Sys) (Sanabria et al., 2020), se aplicaron por dos métodos: aspersión foliar (tres aplicaciones a los 5, 3 y 1 día antes de la inoculación de *Fod*, 1 mL de disolución inductora/planta para cada aplicación) y por *drench* (una aplicación en la superficie del suelo circundante a la raíz con ayuda de una jeringa, 5 días antes de la inoculación de *Fod*, 3mL de solución inductora/planta). La inoculación de las plantas se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el numeral 2.2.1. (Ardila et al., 2014; Higuera, 2001; Pérez Mora et al., 2021).

Para cada inductor se trabajaron cuatro tratamientos de acuerdo con la tabla 2-1, además de un tratamiento control e inoculado sin inductores de resistencia para hacer las respectivas comparaciones. La unidad experimental fue de 10 esquejes con 3 repeticiones por tratamiento. Los 18 tratamientos empleados, con sus respectivas réplicas (54 bandejas en total), fueron dispuestos en condiciones de invernadero siguiendo un diseño completamente aleatorio.

Para la medición de compuestos fenólicos y flavonoides fue cosechado de cada réplica y tratamiento un esqueje a los tiempos 0 y 12 horas postinoculación, teniendo en cuenta que reportes previos del grupo de investigación indican respuestas tempranas a nivel de raíz (Ardila et al., 2007, 2013). Durante el ensayo, los esquejes se mantuvieron en condiciones óptimas de temperatura (19,3 °C en promedio), humedad (65,8% en promedio) y radiación

fotosintéticamente activa (PAR) ($4,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en promedio) y nutrición, con el fin de realizar las diferentes mediciones; así como la incidencia y severidad de la enfermedad. El riego con agua se realizó dos veces por semana, manteniendo el sustrato a capacidad de campo.

Tabla 2-1: Tratamientos del ensayo del efecto de cuatro sustancias comerciales en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en el cultivar ‘Solex’ de clavel

Tratamiento	Agente inductor	Método de aplicación del agente inductor	Inoculación con Fod
Control	No aplica	No aplica	No
Fod	No aplica	No aplica	Si
AA drench	Ácido ascórbico $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Incorporación en el suelo (<i>drench</i>)	No
AA drench + Fod			Si
AA aspersión		Aspersión en las hojas	No
AA aspersión + Fod			Si
AS drench	Ácido salicílico $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Incorporación en el suelo (<i>drench</i>)	No
AS drench + Fod			Si
AS aspersión		Aspersión en las hojas	No
AS aspersión + Fod			Si
B1 drench	Tiamina $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Incorporación en el suelo (<i>drench</i>)	No
B1 drench + Fod			Si
B1 aspersión		Aspersión en las hojas	No
B1 aspersión + Fod			Si
F drench	Fosfito de potasio $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Incorporación en el suelo (<i>drench</i>)	No
F drench + Fod			Si
F aspersión		Aspersión en las hojas	No
F aspersión + Fod			Si

Posteriormente, se realizó un segundo experimento en las mismas condiciones que el descrito anteriormente, pero evaluando el efecto de los dos inductores de resistencia que mejores resultados arrojaron en el primer experimento: ácido salicílico (AS) y tiamina (B1). Para cada inductor se trabajaron cuatro tratamientos de acuerdo con la tabla 2-2, además de un tratamiento control e inoculado sin inductores de resistencia para hacer las comparaciones de interés. La unidad experimental fue de 10 esquejes con 4 repeticiones por tratamiento. Los 10 tratamientos empleados, con sus respectivas réplicas (40 bandejas en total), fueron dispuestos en condiciones de invernadero siguiendo un diseño completamente aleatorio.

Tabla 2-2: Tratamientos del ensayo del efecto de cuatro sustancias comerciales en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en el cultivar ‘Solex’ de clavel

Tratamiento	Agente inductor	Método de aplicación del agente inductor	Inoculación con Fod
Control	No aplica	No aplica	No
Fod	No aplica	No aplica	Si
AS drench	Ácido salicílico 1,0 mmol*L ⁻¹	Incorporación en el suelo (<i>drench</i>)	No
AS drench + Fod			Si
AS aspersión		Aspersión en las hojas	No
AS aspersión + Fod			Si
B1 drench	Tiamina 1,0 mmol*L ⁻¹	Incorporación en el suelo (<i>drench</i>)	No
B1 drench + Fod			Si
B1 aspersión		Aspersión en las hojas	No
B1 aspersión + Fod			Si

2.2.3 Efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en clavel

De acuerdo con los resultados de los ensayos anteriores, se seleccionó la aplicación por aspersión foliar de la tiamina como potencial estrategia para la inducción de resistencia en la interacción planta - patógeno de estudio. Por esta razón, se realizó un tercer ensayo *in vivo* para evaluar el efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en clavel. Para esto, esquejes del cultivar 'Solex' de clavel, de tres semanas de enraizamiento fueron sembrados en un sustrato (tierra negra: vermiculita, en una proporción de 75:25) previamente esterilizado a 18 PSI durante una hora, dos veces.

Los esquejes de clavel fueron mantenidos durante 2 semanas en las condiciones ambientales del ensayo con fines de aclimatación. Después de este tiempo, soluciones de tiamina (Sigma-Aldrich), en concentraciones 0,1 mmol L⁻¹, 1,0 mmol L⁻¹, 10,0 mmol L⁻¹ y 50 mmol L⁻¹ fueron aplicadas por aspersión a las hojas, con tres aplicaciones de 1mL del respectivo tratamiento por planta a los 5, 3 y 1 día antes de la inoculación con *Fod* (Pérez Mora et al., 2021).

Los tratamientos analizados se observan en la tabla 2-3. La unidad experimental fue de 12 esquejes con 3 repeticiones por tratamiento (n=3). Los 10 tratamientos empleados, con sus respectivas unidades experimentales (treinta bandejas en total), fueron dispuestos en condiciones de invernadero siguiendo un diseño completamente aleatorio.

La inoculación de esquejes de clavel con *Fod* se realizó de acuerdo con lo descrito en el numeral 2.2.1. (Ardila et al., 2014; Higuera, 2001; Pérez Mora et al., 2021).

Para la medición de compuestos fenólicos y flavonoides fue cosechado de cada unidad experimental y tratamiento un esqueje a los tiempos 0 y 12 horas postinoculación, de acuerdo con lo reportado previamente (Ardila et al., 2007, 2013). Durante el ensayo, Todos los esquejes (con y sin la adición del inductor) se mantuvieron en óptimas condiciones de humedad (promedio de 60,2%), temperatura (promedio de 19,1°C), radiación fotosintéticamente activa ($4.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en promedio) y nutrición, y se determinó incidencia y severidad de la enfermedad. El riego con agua se realizó dos veces por semana, manteniendo el sustrato a capacidad de campo.

Tabla 2-3: Tratamientos del ensayo del efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en clavel

Tratamiento	Cultivar de clavel	Condiciones
Control	'Solex' (Susceptible al marchitamiento vascular)	Control
B1 0,1mM		Aplicación de tiamina $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
B1 1mM		Aplicación de tiamina $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
B1 10 mM		Aplicación de tiamina $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
B1 50 mM		Aplicación de tiamina $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
Fod		Inoculación con <i>Fod</i>
B1 0,1mM + Fod		Aplicación de tiamina $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + inoculación con <i>Fod</i>
B1 1mM + Fod		Aplicación de tiamina $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + inoculación con <i>Fod</i>
B1 10 mM + Fod		Aplicación de tiamina $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + inoculación con <i>Fod</i>
B1 50 mM + Fod		Aplicación de tiamina $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + inoculación con <i>Fod</i>

2.2.4 Efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en diferentes cultivares susceptibles de clavel

Se realizó un cuarto ensayo *in vivo* para evaluar el efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en diferentes cultivares susceptibles de clavel. Para esto, esquejes de los cultivares 'Mizuki', 'Brisa' y 'Vorágine' de clavel (reportadas como susceptibles a *Fod* por el sector productivo), de tres semanas de enraizamiento fueron sembrados en un sustrato (tierra negra: vermiculita, en una proporción de 75:25) que previamente fue esterilizado a 18 PSI durante una hora, dos veces.

Los esquejes de clavel fueron mantenidos durante 2 semanas en las condiciones ambientales del ensayo con fines de aclimatación. Después de este tiempo, una solución de tiamina (Sigma-Aldrich), en 1,0 mmol L⁻¹ fue aplicada por aspersión a las hojas, con tres aplicaciones de 1mL del respectivo tratamiento por planta a los 5, 3 y 1 día antes de la inoculación con *Fod* (Pérez Mora et al., 2021).

Los tratamientos analizados se observan en la tabla 2-4. La unidad experimental fue de 12 esquejes con 3 repeticiones por tratamiento. Para cada cultivar se trabajaron cuatro tratamientos. Los doce tratamientos empleados, con sus respectivas unidades experimentales (36 bandejas en total), fueron dispuestos en condiciones de invernadero siguiendo un diseño por grupos simples completamente aleatorio. La inoculación de esquejes de clavel con *Fod* se realizó de acuerdo con las condiciones reportadas previamente en el grupo de investigación en el numeral 2.2.1 (Ardila et al., 2014; Higuera, 2001; Pérez Mora et al., 2021).

Para la medición de compuestos fenólicos y flavonoides fue cosechado de cada unidad experimental y tratamiento un esqueje a los tiempos 0 y 12 horas postinoculación, de acuerdo con lo reportado previamente (Ardila et al., 2007, 2013). Durante el ensayo, todos los esquejes (con y sin la adición del inductor) se mantuvieron en óptimas condiciones de humedad (promedio de 58,1%), temperatura (promedio de 19,7°C), radiación fotosintéticamente activa y nutrición, con el fin de realizar las mediciones de incidencia y severidad de la enfermedad. El riego con agua se realizó dos veces por semana, manteniendo el sustrato a capacidad de campo.

Tabla 2-4: Tratamientos del ensayo del efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en diferentes cultivares susceptibles de clavel

Tratamiento	cultivar de clavel	Condiciones
Control	'Brisa'	Control
B1		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹
Fod		Inoculación con <i>Fod</i>
B1 + Fod		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹ + Inoculación con <i>Fod</i>
Control	'Mizuki'	Control
B1		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹
Fod		Inoculación con <i>Fod</i>
B1 + Fod		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹ + Inoculación con <i>Fod</i>
Control	'Vorágine'	Control
B1		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹

<i>Fod</i>		Inoculación con <i>Fod</i>
B1 + <i>Fod</i>		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹ + Inoculación con <i>Fod</i>

2.2.5 Ensayo *in vivo* para la obtención de muestras para análisis proteómico y metabolómico en las condiciones de trabajo determinadas

Se realizó un quinto ensayo *in vivo* en las condiciones determinadas previamente en el grupo de investigación y en los ensayos previos de este proyecto. Se emplearon esquejes indexados de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), certificados libres de patógenos, con tres semanas de enraizamiento, de los cultivares comerciales ‘Mizuki’ y ‘Golem’, que se han reportado como susceptible y resistente, respectivamente, al marchitamiento vascular causado por *Fusarium*. Estos fueron sembrados en un sustrato (tierra negra: vermiculita, en una proporción de 75:25) que previamente fue esterilizado a 18 PSI durante una hora, dos veces.

Los esquejes de clavel fueron mantenidos durante 2 semanas en las condiciones ambientales del ensayo con fines de aclimatación. Después de este tiempo, una solución de tiamina (Sigma-Aldrich), en 1,0 mmol L⁻¹ fue aplicada por aspersion a las hojas (tres aplicaciones de 1mL del respectivo tratamiento por planta a los 5, 3 y 1 día antes de la inoculación con *Fod* (Pérez Mora et al., 2021)).

Los tratamientos analizados se observan en la tabla 2-5. La unidad experimental fue de 40 esquejes con 3 repeticiones por tratamiento. Para cada cultivar se trabajaron cuatro tratamientos. Los ocho tratamientos empleados, con sus respectivas unidades experimentales (24 bandejas en total), fueron dispuestos en condiciones de invernadero siguiendo un diseño por grupos simples completamente aleatorio. La inoculación de esquejes de clavel con *Fod* se realizó de acuerdo con las condiciones reportadas previamente en el grupo de investigación (Ardila et al., 2014; Higuera, 2001; Pérez Mora et al., 2021).

Para la medición de compuestos fenólicos y flavonoides, análisis metabolómico y análisis proteómico fueron cosechados de cada unidad experimental y tratamiento 6 esquejes que se procesaron de manera conjunta constituyendo una muestra representativa para los respectivos análisis, a los tiempos 0, 12, 24, 48 y 96 horas postinoculación, de acuerdo con lo reportado previamente (Ardila et al., 2007, 2013). Durante el ensayo, los

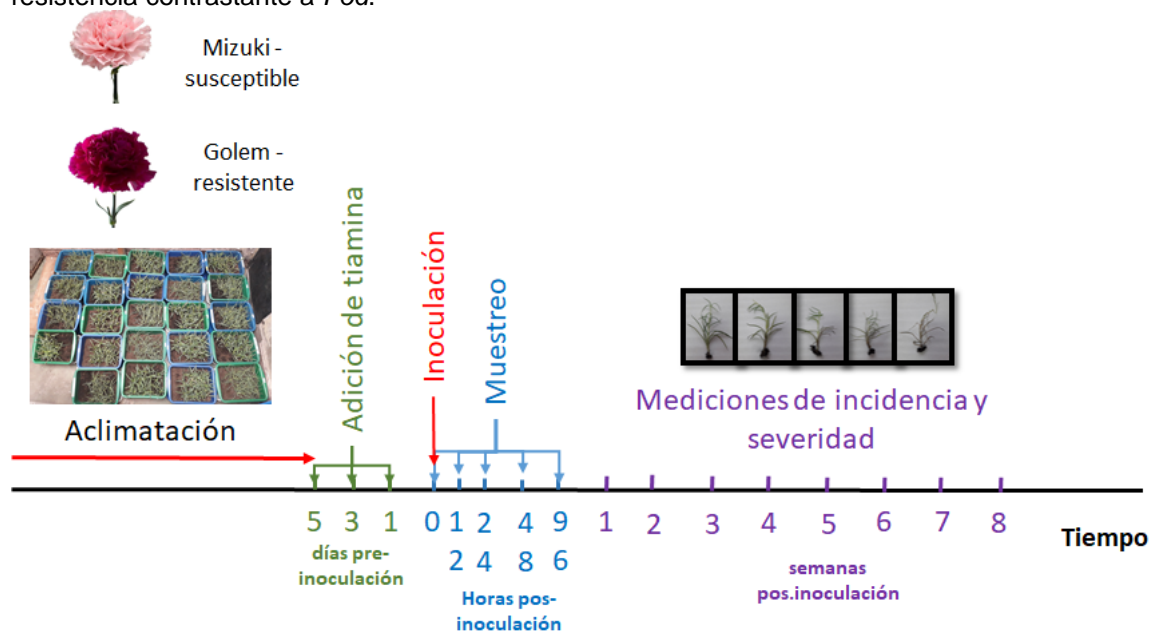
esquejes restantes (con y sin la adición del inductor) se mantuvieron en óptimas condiciones de humedad (promedio de 56,5%), temperatura (promedio de 18,6°C), radiación fotosintéticamente activa y nutrición, con el fin de realizar las mediciones de incidencia y severidad de la enfermedad. El riego con agua se realizó dos veces por semana, manteniendo el sustrato a capacidad de campo. El esquema general del ensayo se puede observar en la figura 2.2.

Tabla 2-5: Tratamientos del ensayo del efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por *Fod*, en cultivares contrastantes de resistencia.

Tratamiento	Cultivar de clavel	Condiciones
Control	'Golem' (Resistente)	Control
B1		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹
<i>Fod</i>		Inoculación con <i>Fod</i>
B1 + <i>Fod</i>		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹ + inoculación con <i>Fod</i>
Control	'Mizuki' (Susceptible)	Control
B1		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹
<i>Fod</i>		Inoculación con <i>Fod</i>
B1 + <i>Fod</i>		Aplicación de tiamina 1,0 mmol L ⁻¹ + inoculación con <i>Fod</i>

Figura 2-2: Esquema general del ensayo de obtención de muestras para análisis metabolómicos y proteómicos.

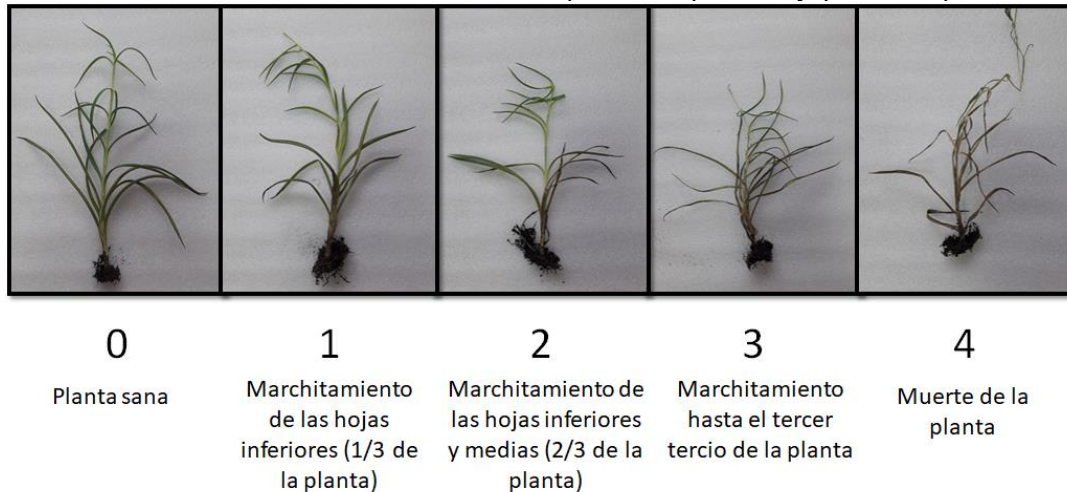
El objetivo del ensayo fue evaluar el efecto de la aplicación de tiamina, en dos cultivares con resistencia contrastante a *Fod*.



2.2.6 Estimación de la incidencia y severidad de la enfermedad

Para los diferentes tratamientos, la evaluación de síntomas típicos de marchitamiento vascular se llevó a cabo mediante la evaluación visual de las plantas en el periodo de 2 a 8 semanas (Ardila 2014; Pérez Mora et al., 2021). Se determinó la incidencia contando el número de plantas que mostraban amarillamiento de hojas respecto al total de plantas, expresando dicha relación como porcentaje. Por otro lado, se estimó la severidad de la enfermedad para cada una de las plantas de cada uno de los tratamientos, usando una escala descriptiva de 0 a 4 (Figura 2-3), adaptada de Higuera (2001):

Figura 2-3: Escala descriptiva de severidad empleada para medir el progreso de la enfermedad del marchitamiento vascular del clavel producido por *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.



La severidad de cada tratamiento se evaluó como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad AUDPC en relación con la escala de severidad, de acuerdo con la ecuación (1):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n \left(\frac{S_i + S_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i) \quad (1)$$

Donde “t” es el tiempo de cada lectura medido en semanas, “S” es la severidad estimada de acuerdo con la escala anteriormente mencionada, y “n” el número de lecturas (Paraschivu et al., 2013; Pérez Mora et al., 2021).

2.2.7 Procesamiento de muestras

Los esquejes cosechados en los tiempos de muestreo fueron lavados con agua para eliminar el exceso de sustrato. Se eliminaron las hojas y el tallo, y las raíces fueron almacenadas a -70 °C. El conjunto de muestras fue liofilizado durante 48 horas. El tejido

liofilizado, fue macerado con nitrógeno líquido y, posteriormente, fue almacenado en tubos tipo Eppendorff que se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento de su análisis.

2.2.8 Medición de fenoles y flavonoides

La extracción de compuestos fenólicos y flavonoides se realizó con base en lo descrito previamente en el grupo de investigación (Pérez Mora et al., 2021). Se pesaron 20 mg (peso seco) de raíces de clavel para cada tratamiento, y se adicionó 1 mL de metanol. Se realizó una extracción asistida por ultrasonido (42 Hz y 100 W) durante 15 minutos. Se centrifugó a 12000 g, durante 15 min y 4°C , y el sobrenadante se almacenó en oscuridad a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

El contenido total de compuestos fenólicos se midió utilizando el método de Folin-Ciocalteu reportado previamente (Martínez-González et al., 2022; Pérez Mora et al., 2021). La mezcla de reacción contenía 50 μL del respectivo extracto en metanol, 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y 100 μL de H_2O destilada-desionizada. Después de 5 min se adicionaron 200 μL de Na_2CO_3 7% y 200 μL de agua destilada-desionizada. Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 764 nm de la mezcla de reacción (espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV, Madison, Wisconsin, USA). Se construyó una curva de calibración usando ácido gálico (Sigma ®) como patrón. Los resultados de fenoles totales fueron reportados como mg de equivalentes de ácido gálico por g de tejido seco.

El contenido de flavonoides se determinó utilizando el método colorimétrico reportado previamente (Martínez-González et al., 2022; Pérez Mora et al., 2021). La mezcla de reacción contenía 100 μL de extracto de raíces de clavel, 30 μL de solución de NaNO_2 5% y 100 μL de agua desionizada, después de 5 min se adicionaron 60 μL de solución de AlCl_3 al 10%. Luego de incubar a temperatura ambiente por 6 min, se adicionaron 100 μL de NaOH $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y se midió la absorbancia a 510 nm. Se construyó una curva de calibración usando catequina (+) (Sigma®) como patrón y los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina por g de tejido seco.

2.2.9 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron utilizando tres unidades experimentales para cada tratamiento, cada una de ellas compuesta por 10 esquejes de clavel enraizados sanos. Los datos se reportan como la media \pm la desviación estándar. El análisis de la varianza (ANOVA de una vía) y las diferencias significativas entre las medias (prueba de Tukey), el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de jerarquización por clústeres se realizaron con la versión de prueba del software Minitab versión 19.

2.3 Resultados y discusión

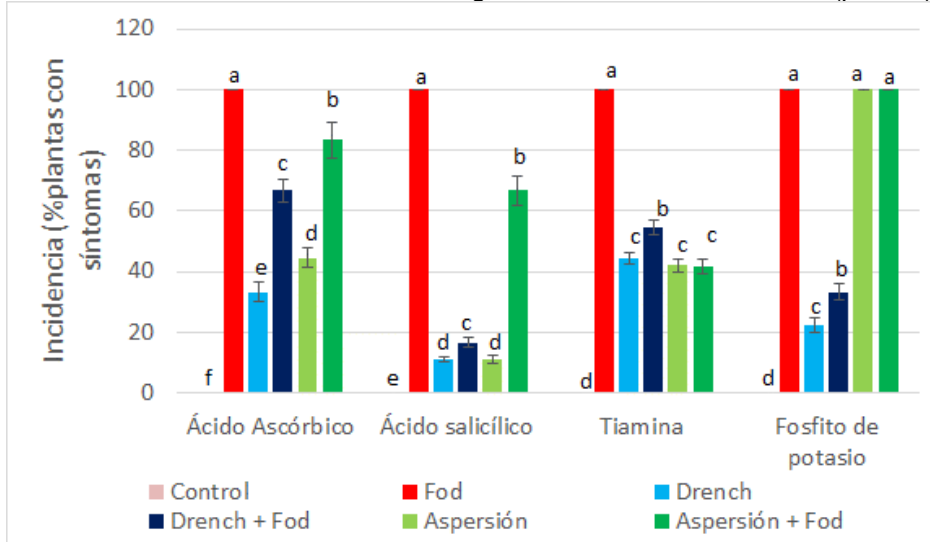
2.3.1 Selección del potencial inductor de resistencia al marchitamiento vascular en clavel

En una primera etapa del proyecto de investigación se tenía como objetivo evaluar el potencial como inductor de resistencia, en el modelo clavel – *Fod*, diferentes sustancias reportadas con dicha actividad en otras interacciones planta patógeno: Ácido ascórbico (P. Singh et al., 2020), ácido salicílico (Devi et al., 2020), tiamina (2021; Sathiyabama et al., 2019; Vinchesi et al., 2017), y fosfito de potasio (Sanabria et al., 2020).

Durante la evaluación del efecto de los 4 potenciales inductores aplicados por aspersión foliar o por incorporación en el suelo (*drench*), se determinó que a las 4 semanas posinoculación con *Fod*, todas las plantas sin tratamiento previo con el respectivo inductor y que fueron inoculadas (control con inóculo (*Fod*)), presentaron un proceso de marchitamiento, con inclinación del tallo y amarillamiento de las hojas del tercio inferior; este tratamiento es un punto de referencia en la comparación de los tratamientos con aplicación de inductores de resistencia ya que corresponde a un valor de incidencia del 100% (Figura 2-4). A este mismo tiempo, se empezó a evidenciar el efecto del tratamiento previo con los inductores; las plantas que habían sido previamente tratadas y posteriormente inoculadas presentaron menores niveles de incidencia de la enfermedad cuando se compararon con las del control de inoculación *Fod*, exceptuando al tratamiento con aplicación de fosfito de potasio por aspersión. Al respecto, es posible que la aplicación foliar de fosfito de potasio esté generando un efecto adverso ya que tanto las plantas inoculadas como las que no mostraron incidencias al amarillamiento del 100%.

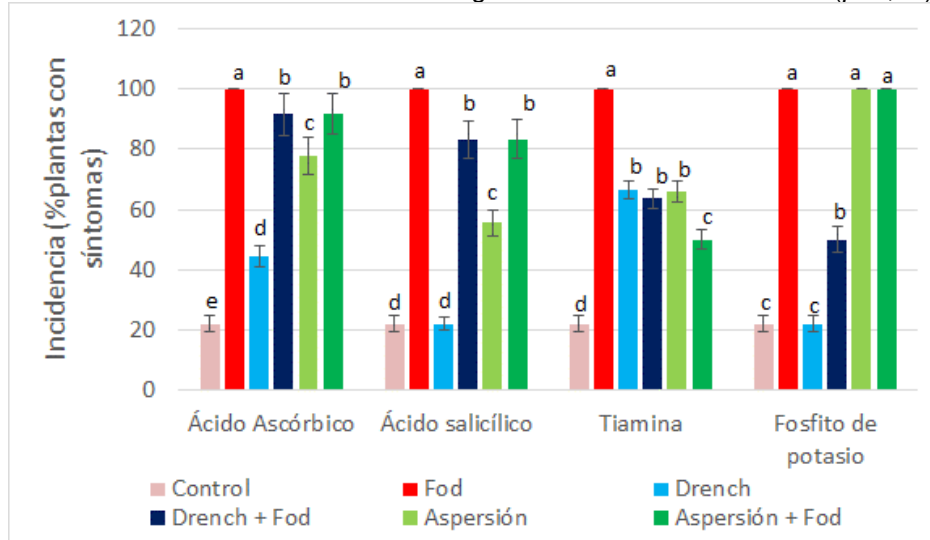
Figura 2-4: Efecto de cuatro inductores de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en clavel en la semana 4.

Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=3$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0,05$).



En la evaluación a las 8 semanas (Figura 2.5), para las plantas control (sin tratamientos con inductores, ni inoculación con el patógeno), un 20% de los esquejes presentaron algún tipo de amarillamiento leve en sus hojas debido a las condiciones ambientales propias del ensayo. Además, el efecto positivo presentado para los tratamientos con inductores se mantuvo. Respecto al ácido ascórbico, se evidenció que hay un retraso en la sintomatología por la aplicación del inductor en los tratamientos con presencia del patógeno; sin embargo, al finalizar el ensayo los resultados son cercanos al tratamiento inoculado sin inductor. Para el ácido salicílico, el comportamiento es similar al caso anterior, pero con una disminución, al final del ensayo, del 20 % en la incidencia en los tratamientos con el inductor y el patógeno. Se determinó también que las plantas tratadas con tiamina por aspersión (sin o con inoculación con *Fod*), y por *drench* (sin o con inoculación con *Fod*) presentaron un porcentaje de incidencia menor frente a la enfermedad comparado con el tratamiento sin inductores inoculado con *Fod*, lo cual sugiere que se tiene un efecto importante en la inducción de resistencia. Es de resaltar que los porcentajes de incidencia en las plantas que fueron sometidas a tratamiento con tiamina y que fueron posteriormente inoculadas, fueron significativamente menores cuando se compararon con los otros tratamientos sometidos al reto con el patógeno. Otros tratamientos como la aplicación por *drench* de fosfito de sodio, también presentaron un efecto significativo en la inducción de resistencia.

Figura 2-5: Efecto de cuatro inductores de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en clavel en la semana 8. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=3$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0,05$).

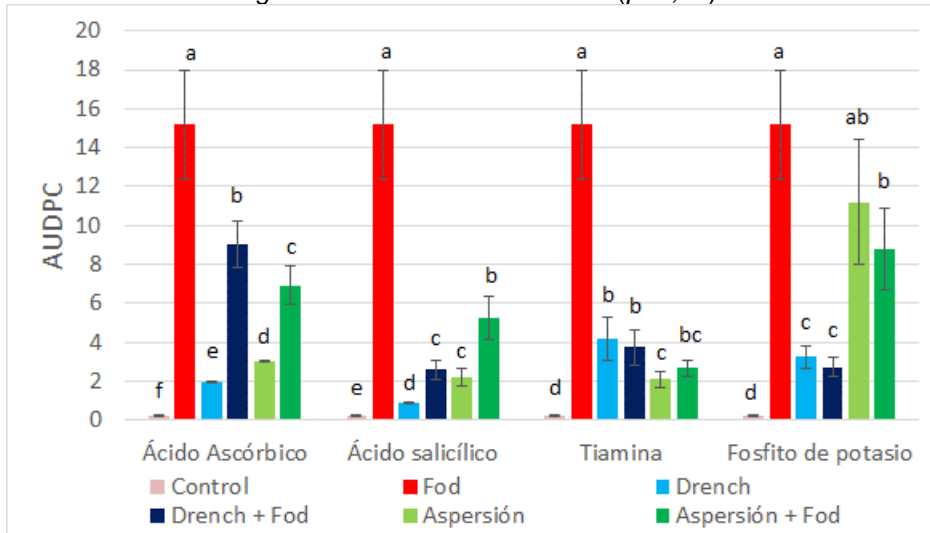


En la figura 2-6 se observa que la severidad medida como el AUDPC disminuyó en todos los tratamientos por efecto de la sustancia comercial aplicada, excepto para el tratamiento con fosfito de potasio aplicado por aspersión; en este caso se encontró un marchitamiento prematuro y acelerado de las hojas, incluso para el tratamiento sin inocular con *Fod*, esto debido posiblemente a que en la concentración aplicada se tiene un efecto tóxico en las hojas. Esta disminución oscila entre el 40,6 % y el 82,3% dependiendo del inductor aplicado y del método de aplicación del inductor. La aplicación de ácido ascórbico mostró la disminución en severidad más bajas respecto a los demás inductores. Por otro lado, los mejores resultados se observaron para el ácido salicílico y el fosfito de potasio aplicados por el método de incorporación en el suelo por *drench* y para la tiamina aplicada por aspersión foliar, con disminución en la severidad de más del 80% al final del ensayo.

En general, se determinó que los tratamientos con tiamina no presentaron diferencias significativas cuando se compararon entre no inoculados e inoculados para cada tipo de aplicación. En los demás casos, a excepción del tratamiento con fosfito de sodio por *drench*, se evidenció un aumento significativo en la severidad cuando las plantas son inoculadas con el patógeno.

Figura 2-6: Efecto de cuatro inductores de resistencia en la severidad del marchitamiento vascular del clavel.

Los resultados se reportan como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC), y se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=3$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0,05$).



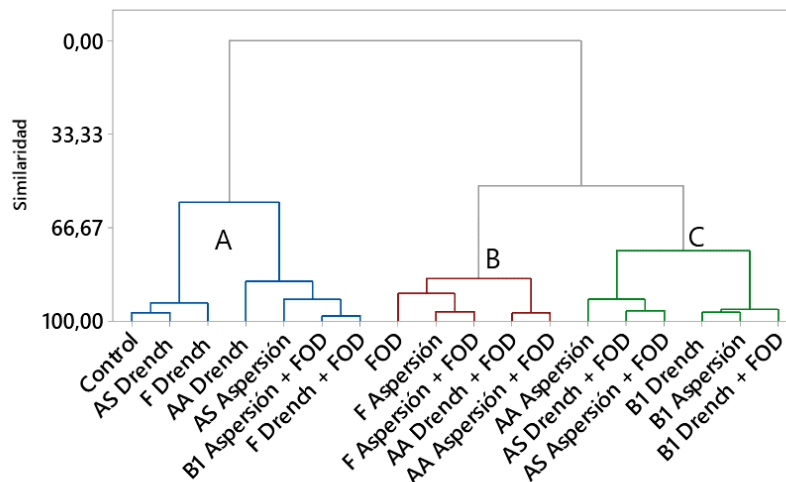
En la tabla 2-6 se presentan los resultados de contenido en raíz de fenoles y flavonoides, para cada uno de los tratamientos en el ensayo 1. Se encontró que la aplicación de tiamina por aspersión foliar aumenta los niveles constitutivos de fenoles en raíces, siendo estos mayores significativamente si se comparan con los tratamientos sin adición de inductores de resistencia. Para el caso de los flavonoides se encontró que la aplicación de los inductores usados en clavel, aumentó significativamente las concentraciones de esta familia de compuestos medidos como equivalentes de catequina, comparando con las plantas sin aplicación de inductor, lo cual se puede asociar a un fenómeno de sensibilización que le permitirá a la planta responder de manera más eficiente ante el posterior reto con un patógeno (Overbeek et al., 2022).

Tabla 2-6: Efecto de cuatro inductores de resistencia en el contenido en raíces de compuestos fenólicos y flavonoides. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un n=3. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Contenido de fenoles (mg de ácido tánico / g raíz seca)								
Inductor	Ácido ascórbico		Ácido salicílico		Tiamina		Fosfito de Potasio	
tiempo	0h	12 h	0h	12 h	0h	12 h	0h	12 h
Control	4,56 \pm 0,20 ^a	4,65 \pm 0,29 ^{bc}	4,56 \pm 0,20 ^a	4,65 \pm 0,29 ^b	4,56 \pm 0,20 ^b	4,65 \pm 0,29 ^{bc}	4,56 \pm 0,20 ^b	4,65 \pm 0,29 ^c
<i>Fod</i>		5,78 \pm 0,38 ^a		5,78 \pm 0,38 ^a		5,78 \pm 0,38 ^a		
<i>Drench</i>	4,42 \pm 0,37 ^a	4,39 \pm 0,18 ^c	4,92 \pm 0,51 ^a	4,15 \pm 0,43 ^b	4,80 \pm 0,33 ^b	4,98 \pm 0,31 ^b	5,83 \pm 0,04 ^a	4,85 \pm 0,25 ^c
<i>Drench + Fod</i>		5,13 \pm 0,48 ^{ab}		4,75 \pm 0,27 ^b		4,71 \pm 0,56 ^{bc}		6,48 \pm 0,48 ^a
Aspersión	4,67 \pm 0,78 ^a	4,73 \pm 0,08 ^b	4,63 \pm 0,33 ^a	4,90 \pm 0,43 ^b	5,44 \pm 0,27 ^a	4,42 \pm 0,21 ^c	4,50 \pm 0,19 ^b	5,74 \pm 0,34 ^{ab}
Aspersión + <i>Fod</i>		4,65 \pm 0,38 ^{bc}		5,42 \pm 0,16 ^a		5,24 \pm 0,38 ^{ab}		5,39 \pm 0,18 ^b
Contenido de flavonoides (mg catequina/ g raíz seca)								
Inductor	Ácido ascórbico		Ácido salicílico		Tiamina		Fosfito de Potasio	
tiempo	0h	12 h	0h	12 h	0h	12 h	0h	12 h
Control	0,136 \pm 0,024 ^b	0,253 \pm 0,051 ^d	0,136 \pm 0,024 ^a	0,253 \pm 0,051 ^c	0,136 \pm 0,024 ^b	0,253 \pm 0,051 ^c	0,136 \pm 0,024 ^a	0,253 \pm 0,051 ^{bc}
<i>Fod</i>		0,463 \pm 0,099 ^{bc}		0,463 \pm 0,099 ^b		0,463 \pm 0,099 ^a		
<i>Drench</i>	0,463 \pm 0,057 ^a	0,517 \pm 0,073 ^b	0,131 \pm 0,022 ^a	0,426 \pm 0,067 ^{ab}	0,140 \pm 0,021 ^b	0,459 \pm 0,010 ^b	0,121 \pm 0,021 ^a	0,349 \pm 0,022 ^b
<i>Drench + Fod</i>		0,637 \pm 0,041 ^a		0,467 \pm 0,028 ^{ab}		0,501 \pm 0,054 ^b		0,517 \pm 0,098 ^a
Aspersión	0,399 \pm 0,063 ^a	0,389 \pm 0,046 ^c	0,140 \pm 0,022 ^a	0,528 \pm 0,042 ^a	0,192 \pm 0,020 ^a	0,590 \pm 0,067 ^a	0,130 \pm 0,012 ^a	0,401 \pm 0,099 ^{ab}
Aspersión + <i>Fod</i>		0,513 \pm 0,016 ^b		0,591 \pm 0,099 ^a		0,461 \pm 0,068 ^b		0,336 \pm 0,048 ^b

Un análisis de jerarquización por clústeres agrupó los tratamientos en tres grupos (Figura 2-7), un primer grupo (A azul) que incluyó principalmente a tratamientos control sin patógeno; también agrupó al tratamiento de inoculación con el patógeno *Fod* pero que había sido previamente tratado por aspersion con tiamina, indicando que la adición del agente inductor logra que las plantas tengan un comportamiento similar a plantas no inoculadas. Un segundo grupo (B rojo) que agrupó a varios de los tratamientos inoculados incluyendo también al que no le fue adicionado ningún inductor; en este grupo se encuentran las plantas en donde la enfermedad fue más severa, indicando que los tratamientos con adición de ácido ascórbico y el tratamiento con adición foliar de fosfito de sodio no tienen el efecto esperado en la inducción de respuestas a la planta que le permitan resistir la interacción con *Fod*. Y un tercer grupo (C verde) que agrupó a tratamientos con comportamientos intermedios en cuanto al efecto de la inoculación con el patógeno como fueron aquellos que incluían ácido salicílico por los dos métodos de aplicación y en la aplicación de tiamina por *drench*.

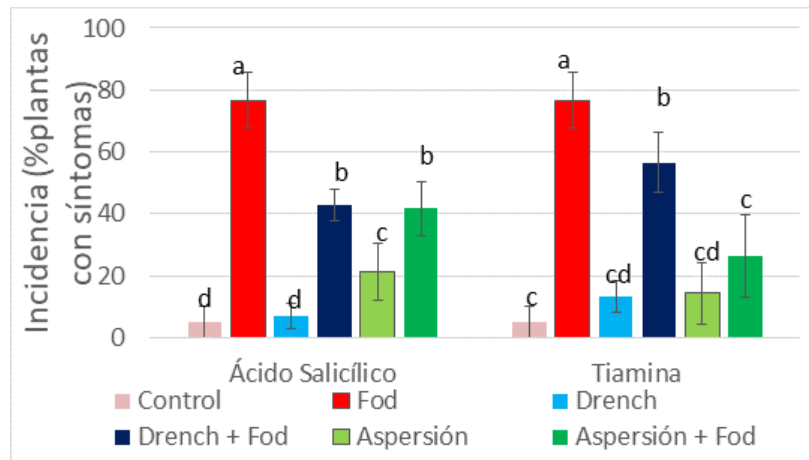
Figura 2-7: Gráfico de jerarquización por clúster del efecto de cuatro inductores de resistencia al marchitamiento vascular del clavel. (AA: Ácido ascórbico; AS: Ácido salicílico; B1: Tiamina; F: Fosfito de Potasio).



Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron los tratamientos con tiamina y ácido salicílico para una réplica del ensayo, en la cual, se observaron resultados similares a los presentados anteriormente para la incidencia de la enfermedad. En la cuarta semana del ensayo (Figura 2-8) las plantas tratadas con tiamina por aspersion, tanto las no inoculadas como las inoculadas, fueron estadísticamente similares al control

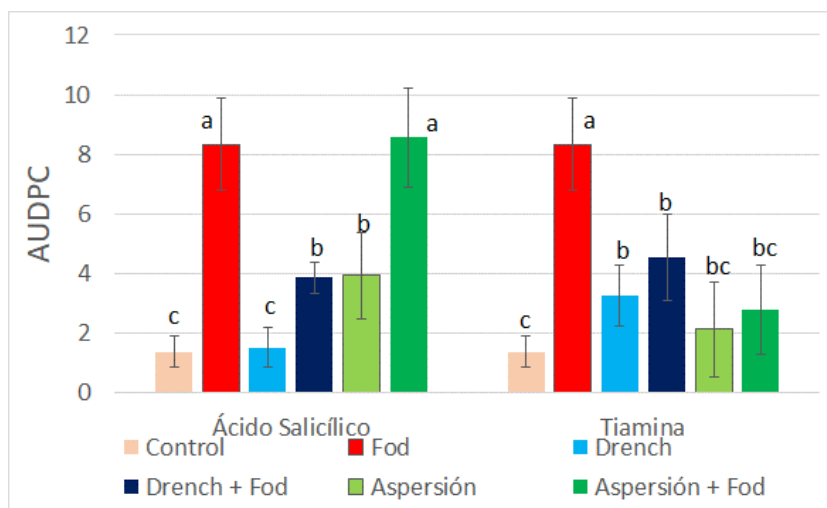
($p < 0.05$), mostrando una efectividad en la inducción de resistencia en el clavel en su interacción con *F. oxysporum*.

Figura 2-8: Efecto del ácido salicílico y la tiamina como inductores de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en clavel. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=4$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).



Respecto a la severidad de la enfermedad se encontró que los resultados para los tratamientos con tiamina son consistentes con lo encontrado en el primer ensayo, presentando AUDPC similares estadísticamente a las plantas control para el tratamiento con aspersión, con y sin reto del patógeno (Figura 2-9); mientras que, en el caso del ácido salicílico, no se encontró un efecto significativo en la disminución de la severidad aplicando el inductor por aspersión.

Figura 2-9: Efecto del ácido salicílico y la tiamina como inductores de resistencia en la severidad del marchitamiento vascular del clavel. Los resultados se reportan como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC), y se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=4$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).



En la tabla 2-7 se pueden observar los resultados para la medición de compuestos fenólicos y flavonoides. Estos resultados son consistentes con lo encontrado en el primer ensayo presentado. Se observa que los contenidos de los compuestos fenólicos y flavonoides previos al proceso de inoculación aumentaron por efecto de la aplicación de tiamina por aspersión; adicionalmente, los dos parámetros aumentaron estadísticamente ($p < 0,05$) en el tratamiento con inductor y adición de inóculo del patógeno.

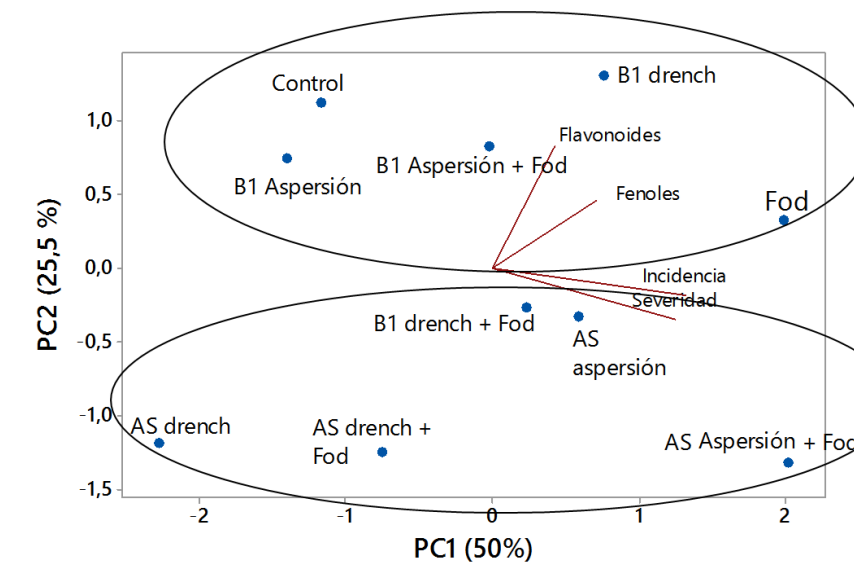
Tabla 2-7: Efecto del ácido salicílico y la tiamina como inductores de resistencia en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=3$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Contenido de fenoles (mg de ácido tánico / g raíz seca)				
Inductor	Tiamina		Ácido salicílico	
	0h	12 h	0h	12 h
Control	$3,93 \pm 0,31^b$	$3,79 \pm 0,17^{ab}$	$3,93 \pm 0,31^a$	$3,79 \pm 0,17^{bc}$
Fod		$3,55 \pm 0,16^b$		$3,55 \pm 0,16^c$
Drench	$3,51 \pm 0,39^b$	$4,00 \pm 0,22^a$	$3,77 \pm 0,20^a$	$3,29 \pm 0,16^{cd}$
Drench + Fod		$3,87 \pm 0,31^{ab}$		$3,08 \pm 0,22^d$
Aspersión	$5,01 \pm 0,45^a$	$3,73 \pm 0,12^b$	$3,64 \pm 0,18^a$	$3,83 \pm 0,13^b$
Aspersión + Fod		$4,06 \pm 0,20^a$		$4,12 \pm 0,05^a$
Contenido de flavonoides (mg catequina/ g raíz seca)				
Inductor	Tiamina		Ácido salicílico	
	0h	12 h	0h	12 h
Control	$0,570 \pm 0,093^a$	$0,700 \pm 0,022^c$	$0,570 \pm 0,093^a$	$0,700 \pm 0,022^b$
Fod		$0,880 \pm 0,062^a$		$0,880 \pm 0,062^a$

<i>Drench</i>	0,583± 0,085 ^a	0,798 ± 0,075 ^{ab}	0,659 ± 0,12 ^a	0,342 ± 0,041 ^d
<i>Drench + Fod</i>		0,515 ± 0,048 ^d		0,511 ± 0,016 ^c
Aspersión	0,598± 0,085 ^a	0,516 ± 0,068 ^d	0,562 ± 0,071 ^a	0,526 ± 0,072 ^c
Aspersión + <i>Fod</i>		0,635 ± 0,071 ^{bc}		0,373 ± 0,077 ^d

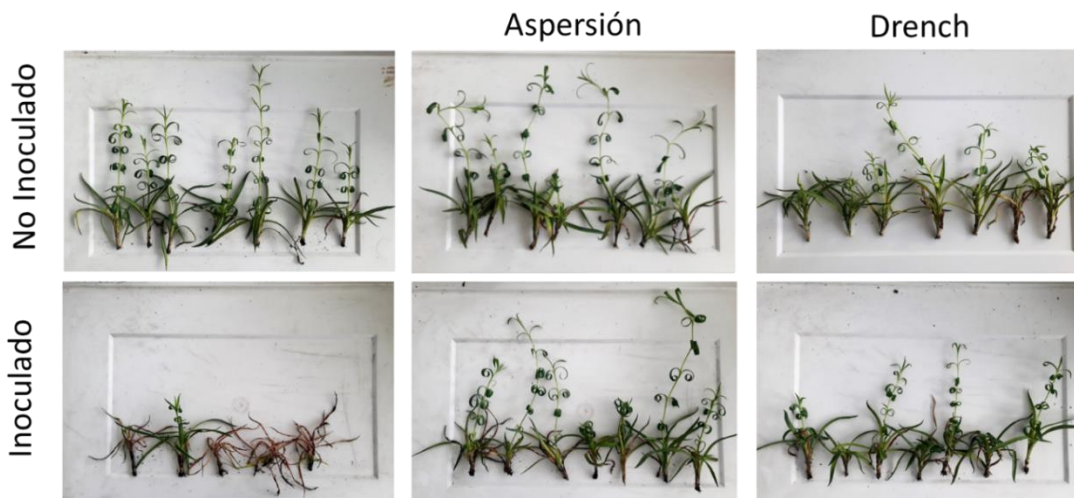
Al realizar el análisis multivariado (análisis de componentes principales, figura 2-10), se encontró que los dos primeros componentes explican el 75,5% de la varianza. El primer componente (50% de la varianza) clasificó a los tratamientos por la incidencia y la severidad de la enfermedad, teniendo a la izquierda el tratamiento control y al lado opuesto los tratamientos inoculados más afectados por la interacción con el patógeno; mientras que el segundo componente clasificó a los tratamientos de acuerdo con el inductor de resistencia usado (tiamina en la parte positiva del eje junto con los tratamientos control e inoculado sin inductores; y ácido salicílico en la parte negativa del eje). Se observa que el segundo componente está influenciado positivamente por el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, indicando que los tratamientos con tiamina presentan los mayores valores para estos parámetros, reportados por estudios previos del grupo de investigación como importantes en la resistencia a la enfermedad (Ardila et al., 2013; Pérez Mora et al., 2021; Santos-Rodríguez et al., 2021).

Figura 2-10: Diagrama biplot del análisis de componentes principales para el efecto de la tiamina (B1) y ácido salicílico (AS) como inductores de resistencia al marchitamiento vascular del clavel.



El registro fotográfico (Figura 2-11) evidencia que las plantas previamente tratadas con tiamina y posteriormente inoculadas con el patógeno, presentan mejores características morfológicas (vigor, color de las hojas y altura) comparado con las plantas inoculadas que no fueron tratadas con el inductor.

Figura 2-11: Efecto de la tiamina en las plantas de clavel a las 8 semanas post inoculación.



El análisis cualitativo y cuantitativo de los niveles de flavonoides se ha propuesto como una herramienta para la clasificación de cultivares de clavel (Galeotti et al., 2008), sugiriendo que un aumento en los niveles de estos compuestos puede ser un indicador de la activación de los mecanismos de defensa de la planta. Se ha reportado que los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y tienen un amplio rango de funciones fisiológicas como son la coloración en flores, señalización, transporte de auxinas, antioxidante frente a especies reactivas de oxígeno y respuesta al estrés incluyendo las interacciones planta-patógeno (Ardila, 2013; Mierziak et al., 2014). Al respecto de esta última función, se ha propuesto que podrían estar asociados a la resistencia a enfermedades actuando a nivel constitutivo como fitoanticipinas o inducible como fitoalexinas (Ibraheem et al., 2010). Aunque las medidas de incidencia y severidad se realizan mediante la determinación de la sintomatología en tiempos posteriores a los seleccionados para las determinaciones de fenoles y flavonoides, las mediciones tempranas de estos compuestos se realizaron teniendo en cuenta que han sido asociados con la resistencia de la planta al patógeno (Ardila, 2013).

En general, se evidenció que el contenido de compuestos fenólicos constitutivos (previo a la inoculación con *Fod*) aumentó significativamente por efecto de la aplicación de tiamina por aspersion, en dos ensayos independientes en el tiempo, resultados que presentan la misma tendencia con lo reportado para adiciones de tiamina en diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Ramos et al., 2017) y en orégano (*Origanum vulgare*) (Darwesh Hadeer et al., 2015). Por otro lado, en la mayoría de los casos, los otros inductores utilizados también aumentaron significativamente los contenidos de flavonoides respecto a los controles no tratados, lo cual concuerda con lo reportado en otras especies como en trigo (*Triticum aestivum* L.) y en *Abelmoschus esculentus* contra el patógeno *Erysiphe cichoracearum* para el caso del ácido salicílico (Vimala & Suriachandraselvan, 2009); en papa (*Solanum tuberosum* L.) inoculada con *Phytophthora infestans* (Mohammadi et al., 2019) y en uva inoculada con (*Plasmopara viticola*) (Pinto et al., 2012) para el inductor fosfito de potasio; en cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) y su patógeno *Fusarium verticillioides* para el ácido ascórbico (Ahmed et al., 2016). Es probable que, bajo dichas condiciones, las plantas de clavel tratadas tengan ventajas durante la respuesta al patógeno al tener mayores niveles de flavonoides considerando su capacidad antioxidante y antifúngica reportada (Ardila, 2013; Boubakri et al., 2013).

A las 12 horas después de la inoculación, se observó que los tratamientos que incluyeron ácido salicílico y tiamina como inductores (con y sin inoculación de *Fod*) mostraron un aumento en los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides en comparación con el control tratado con agua. Estos hallazgos se pueden comparar con lo informado por Romero y colaboradores (2013), que evaluaron el efecto de la inoculación con *Fod* sin la adición de inductores de resistencia, en clavel. En su estudio, se observó que para un cultivar susceptible no se producían aumentos en los niveles de estos compuestos tras la inoculación con *Fod*, mientras que para un cultivar resistente sí se producía un aumento. Por lo tanto, la adición de inductores en un cultivar susceptible, como en el presente estudio, parece tener un efecto inductor en la acumulación de estos compuestos, lo cual podría ser responsable de la mejora observada a nivel fenotípico en el cultivar analizado, comparable a la respuesta de cultivares resistentes tras la inoculación.

Al respecto, se ha reportado que adiciones de tiamina aumentan, entre otros efectos, las cantidades de enzimas y genes relacionados con la ruta biosintética de los flavonoides, como la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) y la expresión del gen PAL1 (Ahn et al., 2007; Goyer, 2010; Yin et al., 2012), así con la del gen CHS1 (Chalcona sintasa) (Boubakri et al.,

2013), a las 12 horas post inoculación (mismo tiempo al reportado en este trabajo). Además, se ha encontrado una correlación con el aumento en el contenido de compuestos de tipo fenólico, particularmente flavonoides (Boubakri et al., 2013; Llorens et al., 2017; Yin et al., 2012).

Finalmente, los ensayos analizados permitieron evaluar el efecto de 4 inductores de resistencia sobre la incidencia y severidad del marchitamiento vascular del clavel causado por *Fusarium oxysporum*, así como el efecto que tiene la adición de los inductores y posterior inoculación con el patógeno en el contenido de fenoles y flavonoides. De acuerdo con los resultados encontrados, se seleccionó a la tiamina (vitamina B1) como potencial inductor de resistencia frente a la enfermedad en este modelo planta-patógeno, para la cual se encontró una disminución en los efectos de la enfermedad evaluados con medidas de incidencia y severidad, así como un aumento en los contenidos de fenoles y flavonoides. Sustancias como la tiamina son componentes esenciales en el funcionamiento de las plantas, importantes en procesos como la fotosíntesis, la generación de energía, el metabolismo redox, y como cofactor enzimático en vías metabólicas (Kheyri et al., 2022; Llorens et al., 2017; M. Sathiyabama et al., 2022). Adicionalmente se ha reportado que adiciones de tiamina pueden mejorar la resistencia de las plantas durante el estrés biótico (Ahn et al., 2005, 2007; Afaf M Hamada & Jonsson, 2013; Yong-hong et al., 2017) y abiótico (Tunc-ozdemir et al., 2009). Se demostró que la aspersion con tiamina incrementó la resistencia a infecciones fúngicas, bacterianas y virales en *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*), pepino (*Cucumis sativus*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*), activando resistencia sistémica adquirida frente a patógenos biotróficos y hemibiotróficos, a través de vías de señalización como la del ácido salicílico y las vías dependientes de canales de Calcio (Ahn et al., 2005, 2007). Se ha reportado que la eficiencia de estas respuestas bioquímicas depende de la concentración del inductor aplicado, es por eso por lo que en la siguiente etapa se evaluó dicho efecto en la incidencia de la enfermedad.

2.3.2 Efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en clavel

De acuerdo con los resultados de los ensayos previamente presentados, se encontró que la tiamina aplicada por aspersion sobre las hojas presenta un efecto que sugiere un potencial

para su uso como inductor de resistencia al marchitamiento vascular del clavel causado por *Fod*. Teniendo en cuenta esto, en un posterior ensayo *in vivo*, se analizó el efecto de la concentración de la tiamina como sustancia inductora. Es importante aclarar que determinar la concentración más baja con efectos significativos como inductor, es importante para evitar desperdicio de producto y optimizar el proceso desde el punto de vista económico y ambiental.

En la figura 2-12 se observa el efecto de la concentración de tiamina sobre la incidencia de la enfermedad. Se determinó que todas las concentraciones de tiamina aplicadas disminuyeron la incidencia del marchitamiento vascular en clavel. De igual forma se encontró que la severidad de la enfermedad también disminuye por la aplicación del inductor en sus diferentes concentraciones (Figura 2-13). Al respecto, se observa que las menores concentraciones de tiamina tienen una menor desviación estándar en el resultado, aunque estadísticamente, cualquier concentración de tiamina de las que se utilizaron en el ensayo, presentan el mismo efecto en la disminución de la severidad de la enfermedad.

Figura 2-12: Incidencia del marchitamiento vascular del clavel causado por *Fusarium oxysporum* en relación con la concentración de tiamina.

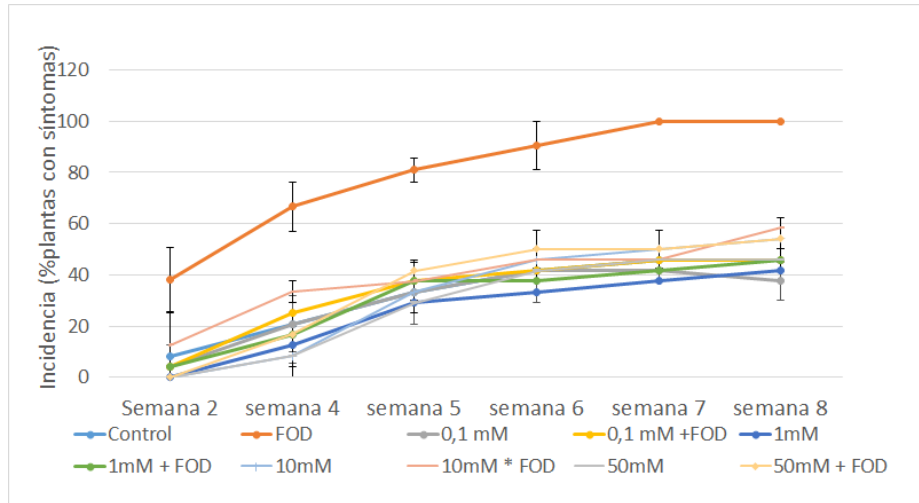
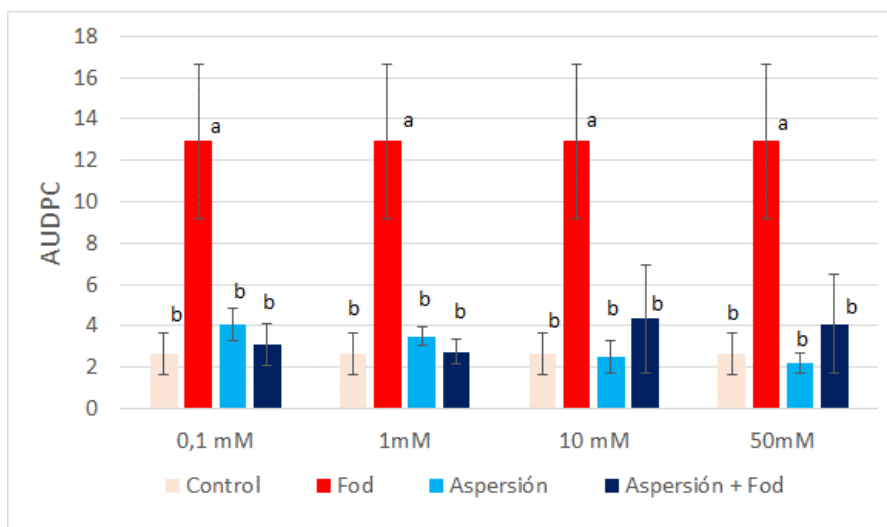


Figura 2-13: Índice de severidad del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum*, en relación con la concentración de tiamina.

Los resultados se reportan como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC), y se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=4$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).



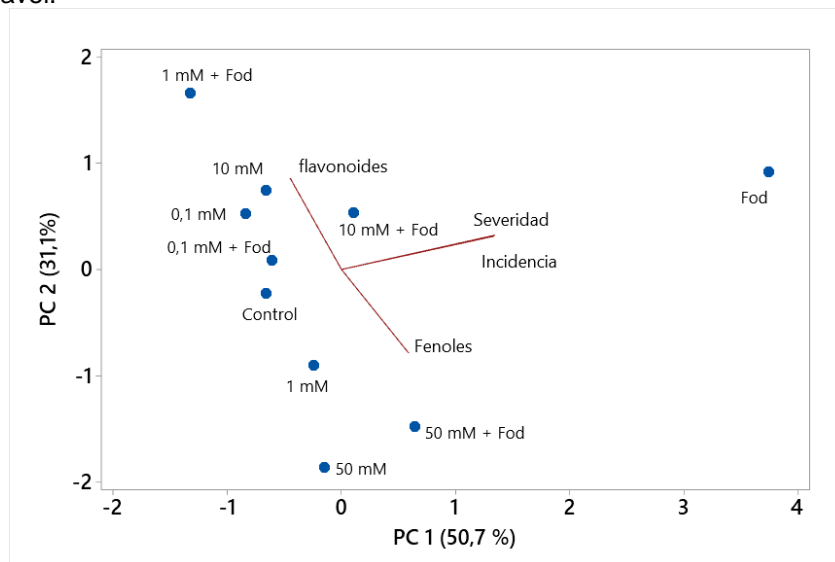
Respecto al contenido de flavonoides (Tabla 2-8), se observa que hay una disminución por la aplicación del inductor de resistencia antes de la inoculación con el patógeno. Sin embargo, al someter las plantas al reto con el patógeno se encuentra que a las 12 horas hay un aumento significativo en los tratamientos de aplicación de tiamina en concentraciones 1 mmol L⁻¹ y 50 mmol L⁻¹, en comparación con el tratamiento de la misma concentración sin adición del inóculo. Resultados similares se han reportado para pera asiática contra *Alternaria alternata* (Yin et al., 2012), y en melón contra *T. roseum* y *A. alternata* (Yong-hong et al., 2017). Los compuestos fenólicos y los flavonoides son considerados marcadores moleculares de resistencia a enfermedades en otros sistemas por su posible papel como fitolaexinas y su capacidad antioxidante (Boubakri et al., 2013). Considerando que en el sistema clavel-*Fusarium oxysporum* estos compuestos se han asociado con resistencia a la enfermedad (Ardila et al., 2013; Romero-Rincón et al., 2021; Santos-Rodríguez et al., 2021), el aumento en el contenido de estos compuestos debidos al reto con el patógeno es una respuesta esperada en procesos de *priming* (Mauch-Mani et al., 2017). Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de tiamina como inductor tiene el efecto esperado de preparar a la planta a la interacción con el patógeno.

Tabla 2-8: Contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides en raíces de clavel del cultivar 'Solex' por efecto de la aplicación de tiamina en diferentes concentraciones y retos con el patógeno. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para n=3. En la misma columna y para cada cultivar, letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Tratamiento	Contenido de compuestos fenólicos (mg ácido gálico/ g raíz seca):		Contenido de flavonoides (mg catequina/ g raíz seca)	
	0 h	12h	0 h	12h
Control	13,7 ± 0,7 ^b	13,8 ± 0,1 ^c	0,540 ± 0,067 ^a	0,394 ± 0,017 ^c
<i>Fod</i>		15,3 ± 0,2 ^b		0,422 ± 0,046 ^{bc}
0,1 mmol * L ⁻¹	12,3 ± 0,8 ^b	15,1 ± 0,6 ^{ab}	0,315 ± 0,097 ^b	0,605 ± 0,086 ^a
0,1 mmol * L ⁻¹ + <i>Fod</i>		14,4 ± 1,0 ^{ab}		0,480 ± 0,015 ^b
1 mmol * L ⁻¹	15,4 ± 0,4 ^a	16,6 ± 0,5 ^a	0,368 ± 0,083 ^b	0,476 ± 0,018 ^b
1 mmol * L ⁻¹ + <i>Fod</i>		12,3 ± 0,2 ^d		0,587 ± 0,060 ^a
10 mmol * L ⁻¹	13,7 ± 1,2 ^{ab}	13,9 ± 0,6 ^c	0,252 ± 0,096 ^b	0,535 ± 0,057 ^a
10 mmol * L ⁻¹ + <i>Fod</i>		15,3 ± 0,6 ^{ab}		0,567 ± 0,099 ^a
50 mmol * L ⁻¹	15,6 ± 1,2 ^a	15,3 ± 1,2 ^a	0,155 ± 0,022 ^c	0,243 ± 0,099 ^d
50 mmol * L ⁻¹ + <i>Fod</i>		17,4 ± 3,0 ^a		0,403 ± 0,041 ^c

La figura 2-14 muestra el diagrama de doble proyección del análisis de componentes principales. El componente principal 1 influenciado positivamente por la incidencia y severidad de la enfermedad y que explica el 50,1% de la varianza, separa claramente al tratamiento inoculado sin inductor (*Fod*) de todos los demás tratamientos, los cuales se agrupan con el tratamiento control.

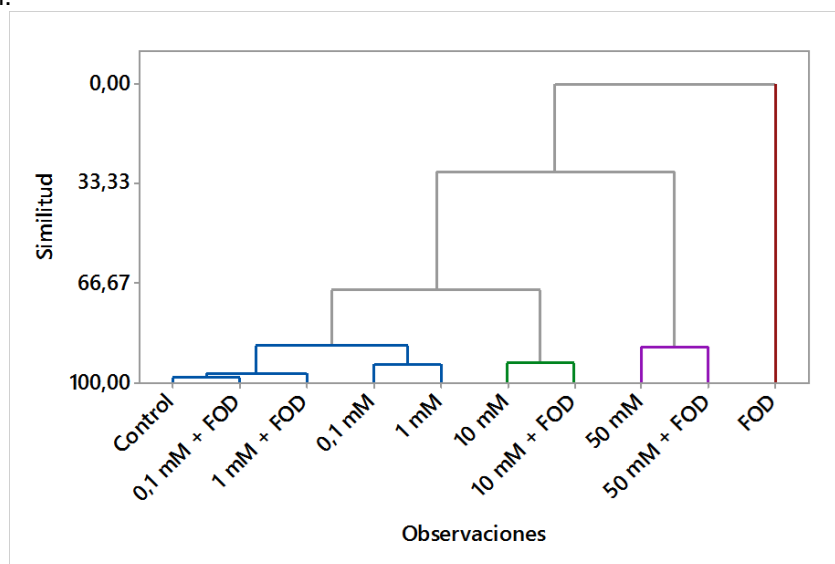
Figura 2-14: Diagrama de doble proyección del análisis de componentes principales del efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por *Fod* en clavel.



La gráfica de jerarquización por clústers (Figura 2-15) divide los tratamientos en 4 grupos, separando claramente todos los tratamientos donde se agregó alguna cantidad de tiamina del tratamiento donde se realizó la inoculación sin inductor de resistencia,

confirmando lo obtenido en el análisis de componentes principales. Además, se encuentra que las menores concentraciones de tiamina, 0,1 mmol L⁻¹ y 1,0 mmol L⁻¹ se agrupan en el mismo clúster con el tratamiento control, con y sin adición de inóculo, lo que sugiere que las menores concentraciones de tiamina tienen un mejor efecto en la inducción de resistencia.

Figura 2-15: Dendograma del análisis de jerarquización por clústers del efecto de la concentración de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por *Fod* en clavel.



La tiamina se ha usado en diferentes concentraciones como inductor de resistencia mostrando efectos significativos en la respuesta a diferentes enfermedades causadas por la interacción con patógenos. En plantas de *Capsicum annum* contra el virus del mosaico del tabaco, tratadas con tiamina en un rango de concentraciones entre 0,25 mmol L⁻¹ y 15 mmol L⁻¹, se encontró que el efecto inductor aumentó y alcanzó su máximo a una concentración de 4 mmol L⁻¹ y que mayores concentraciones aunque continuaban proporcionando una respuesta favorable, no aumentaban el efecto (Torky, 2016). En el mismo sentido, en plantas de *A. thaliana* asperjadas con tiamina en el rango de 1 mmol L⁻¹ a 50 mmol L⁻¹ mostraron protección ante una enfermedad bacteriana, desde concentración de 5 mmol L⁻¹, alcanzando el máximo de protección a una concentración de 10 mmol L⁻¹ (Ahn et al., 2007). En el caso del presente estudio este máximo de protección no fue evidente ya que las concentraciones evaluadas en el rango de 0,1 mmol L⁻¹ y 50 mmol L⁻¹ presentaron el mismo efecto de disminución de la incidencia y severidad del marchitamiento vascular causado por el patógeno usado en esta investigación, lo cual

sugiere que trabajar a concentraciones menores de tiamina es igualmente eficiente que trabajar a concentraciones elevadas, por lo cual se seleccionó la concentración de 1 mmol L⁻¹ para continuar con las etapas posteriores del trabajo. Esta concentración de tiamina además de tener un efecto en la inducción de resistencia permitió mantener unos niveles altos de flavonoides en el momento de la inoculación; sin duda, niveles altos de este marcador bioquímico, permite asegurar que el conjunto de respuestas bioquímicas de la planta esté potencializado ante la presencia del patógeno agresor.

2.3.3 Efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular en diferentes cultivares de clavel

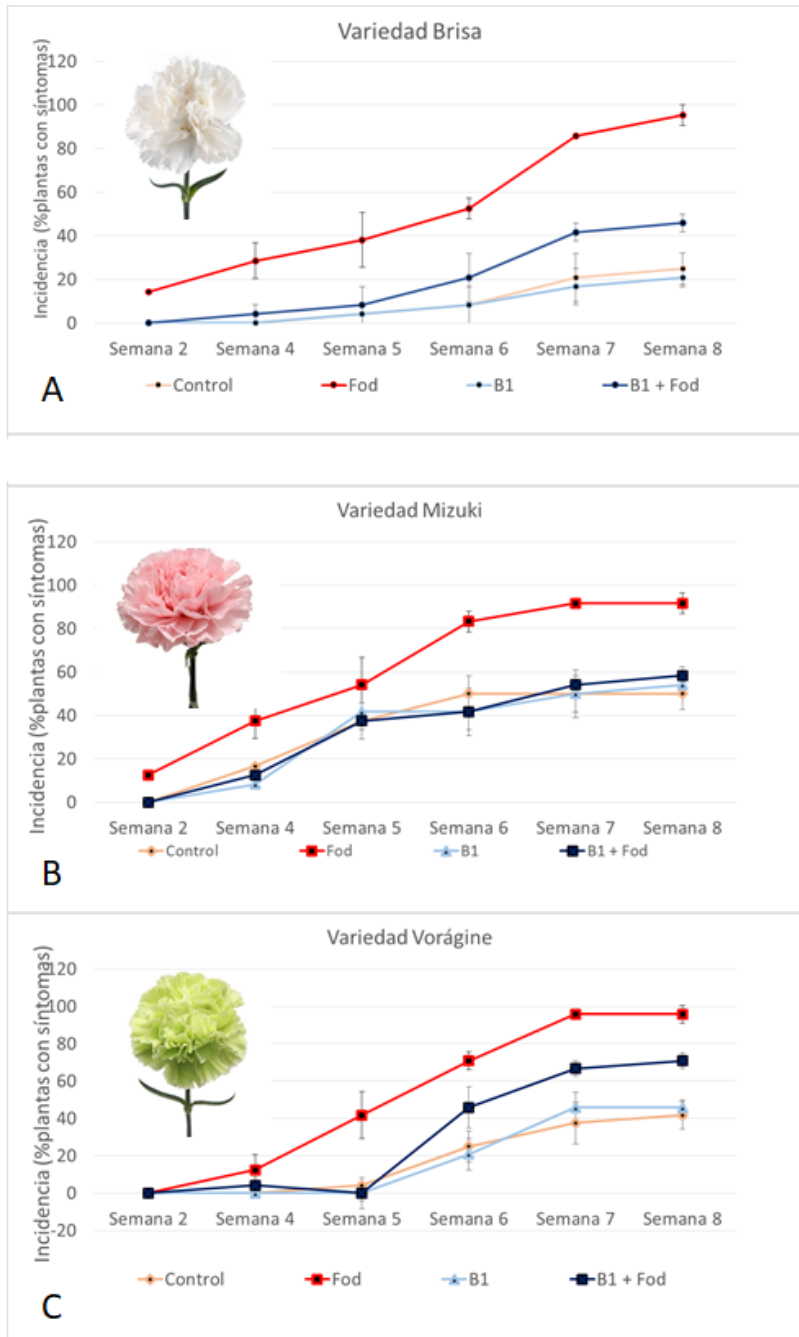
De acuerdo con los resultados encontrados, se identificó que la tiamina agregada por aspersión sobre las hojas de esquejes de clavel, en concentración 1 mmol L⁻¹, proporciona un efecto de aliviar los síntomas del marchitamiento vascular causado por *Fod* en el cultivar comercial 'Solex'. Para verificar este efecto y sugerir a la tiamina como potencial inductor de resistencia a la enfermedad en el patosistema de estudio, se analizó el efecto de aplicar esta sustancia en diferentes cultivares de clavel reportadas como susceptibles por el sector productivo ('Brisa', 'Mizuki' y 'Vorágine').

En la figura 2.16, se puede observar el efecto de la aplicación de la tiamina en la incidencia del marchitamiento vascular causado por *Fod* en diferentes cultivares de clavel. Nuevamente, similar a los ensayos analizados anteriormente, se observa un efecto positivo en los tres cultivares evaluados, a causa de la aplicación del inductor, evidenciado en la disminución estadísticamente significativa del número de plantas que presentan síntomas de la enfermedad comparando el tratamiento inoculado (*Fod*) y el tratamiento inoculado al que previamente se le adicionó la tiamina (B1 + *Fod*). En el caso del cultivar 'Mizuki' (Figura 2-16B), el resultado de la incidencia para este tratamiento es incluso similar estadísticamente al tratamiento control del ensayo.

Figura 2-16: Efecto de la aplicación foliar de tiamina como inductor de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en cultivares susceptibles de clavel en el tiempo.

A: cultivar 'Brisa'. B: cultivar 'Mizuki'. C: cultivar 'Vorágine'.

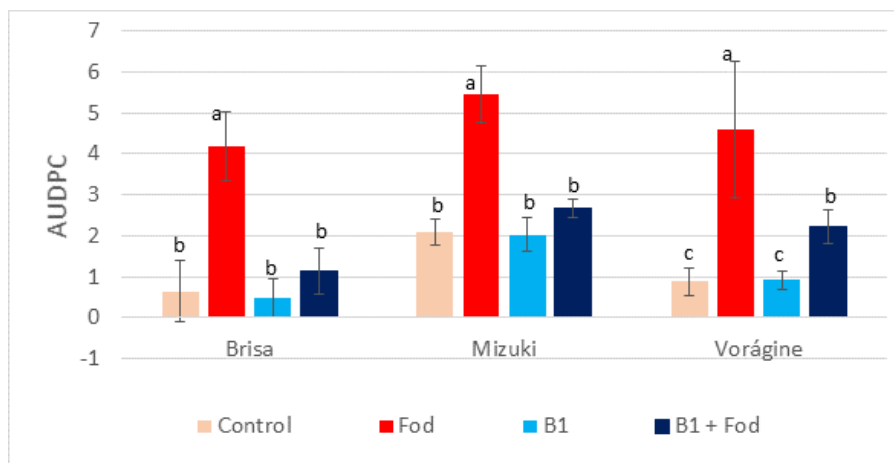
Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un n=3. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).



La severidad se midió como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) (Figura 2-17), obteniendo que los tratamientos inoculados (*Fod* – columnas rojas en la gráfica), para los tres cultivares no presentaron diferencia significativa, lo cual sugiere que los tres cultivares presentan un nivel similar de susceptibilidad a la enfermedad. La figura también nos permite concluir un efecto positivo de la aplicación de

tiamina 1 mmol L^{-1} por aspersión en el retraso de la enfermedad causada por *Fod* (B1+ *Fod* – columna azul oscura en la figura 2-17), que se puede verificar por la disminución en la severidad (AUDPC) respecto a los tratamientos inoculados (*Fod*). En el cultivar ‘Brisa’, se obtiene que este tratamiento es similar estadísticamente a los controles. Igual tendencia se presenta para el cultivar ‘Mizuki’; sin embargo, los controles en este cultivar presentan una severidad (AUDPC) inesperadamente elevada, lo que sugiere que el cultivar ‘Mizuki’ presenta un mayor efecto de las condiciones de trabajo. Aunque, el cultivar ‘Vorágine’ presentó también una menor severidad por la aplicación de tiamina, se encontró que se obtuvo un efecto de la interacción con *Fod* (B1 + *Fod*), mayor respecto al tratamiento control y al tratamiento con aplicación de tiamina sin inoculación (B1).

Figura 2-17: Índice de severidad del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en diferentes cultivares susceptibles de clavel (‘Brisa’, ‘Mizuki’ y ‘Vorágine’). Los resultados se reportan como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC), y se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=3$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0,05$).



Como se mencionó previamente, el contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides se ha asociado con resistencia a la enfermedad. Se encuentra que por la aplicación de tiamina el contenido de compuestos fenólicos aumenta significativamente previo a la inoculación, al igual que el contenido de flavonoides, excepto para el cultivar ‘Vorágine’ de clavel (Tabla 2-9). Después de la inoculación los resultados son más variables y dependen del cultivar. Sin embargo, para la mayoría de los casos, el contenido de fenólicos y flavonoides es mayor en los tratamientos a los que se aplicó tiamina, con y sin inoculación de *Fod*.

Tabla 2-9: Contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides en raíces de clavel por efecto de la aplicación de tiamina y retos con el patógeno en diferentes cultivares susceptibles de clavel.

Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para $n=3$. En la misma columna y para cada cultivar, letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0.05$).

Cultivar	Tratamiento	Contenido de compuestos fenólicos (mg ácido gálico/g raíz seca)		Contenido de flavonoides (mg catequina/ g raíz seca)	
		0 h	12h	0 h	12h
'Brisa'	Control	$11,6 \pm 0,5^b$	$11,6 \pm 0,4^b$	$0,44 \pm 0,05^b$	$0,36 \pm 0,06^{ab}$
	<i>Fod</i>		$13,9 \pm 1,4^a$		$0,36 \pm 0,02^b$
	B1	$12,7 \pm 0,4^a$	$10,1 \pm 0,2^c$	$0,53 \pm 0,03^a$	$0,32 \pm 0,05^b$
	B1 + <i>Fod</i>		$10,9 \pm 0,7^b$		$0,41 \pm 0,03^a$
'Mizuki'	Control	$8,2 \pm 0,9^b$	$7,1 \pm 0,6^d$	$0,28 \pm 0,03^b$	$0,30 \pm 0,07^c$
	<i>Fod</i>		$9,1 \pm 0,2^c$		$0,54 \pm 0,03^b$
	B1	$11,3 \pm 1,0^a$	$13,8 \pm 0,7^a$	$0,41 \pm 0,06^a$	$0,74 \pm 0,11^a$
	B1 + <i>Fod</i>		$10,0 \pm 0,9^b$		$0,51 \pm 0,03^b$
'Vorágine'	Control	$6,3 \pm 0,3^b$	$5,5 \pm 0,7^c$	$0,50 \pm 0,02^a$	$0,34 \pm 0,01^b$
	<i>Fod</i>		$6,4 \pm 0,2^c$		$0,36 \pm 0,04^b$
	B1	$7,0 \pm 0,2^a$	$7,4 \pm 0,4^b$	$0,41 \pm 0,04^b$	$0,47 \pm 0,05^a$
	B1 + <i>Fod</i>		$9,4 \pm 0,3^a$		$0,49 \pm 0,04^a$

El análisis multivariado confirma lo mencionado previamente. El análisis de componentes principales (Figura 2-18), muestra que los dos primeros componentes explican el 84,5% de la varianza. El primer componente (51.0%) influenciado positivamente por las mediciones de incidencia y severidad separa los tratamientos no inoculados (control y B1), de los tratamientos inoculados (B1 + *Fod* y *Fod*). A su vez, los tratamientos inoculados con *Fod* están separados por el primer componente, indicando una diferencia debida al tratamiento con tiamina y demostrando un efecto positivo por la aplicación de esta. Estos resultados son confirmados por el análisis de jerarquización por clusters (Figura 2-19) donde se pueden hacer las mismas apreciaciones.

El efecto de la tiamina en diferentes variedades de la misma especie también fue reportado en *Brassica napus*, en donde una variedad susceptible y una parcialmente resistente a *Sclerotinia* mostraron una mejor respuesta frente al patógeno, en cuanto a la disminución de la severidad, comparado contra controles (J. Zhou et al., 2013). Teniendo en cuenta esto, los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de tiamina podría tener un efecto positivo en cualquier cultivar de clavel en la que se aplique. Es posible que se presenten diferencias en la respuesta a este inductor entre cultivares debido a la

conocida resistencia multigénica a la enfermedad (Ardila 2013), pero al parecer el efecto protector se mantiene, tal y como se presentó en esta etapa de la investigación.

Figura 2-18: Diagrama de doble proyección del análisis de componentes principales del efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por *Fod* en los cultivares susceptibles de clavel ‘Brisa’, ‘Mizuki’ y ‘Vorágine’.

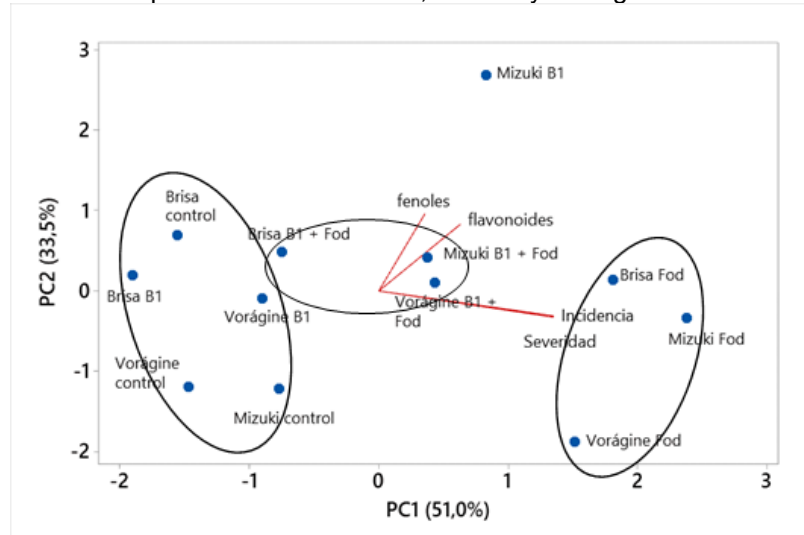
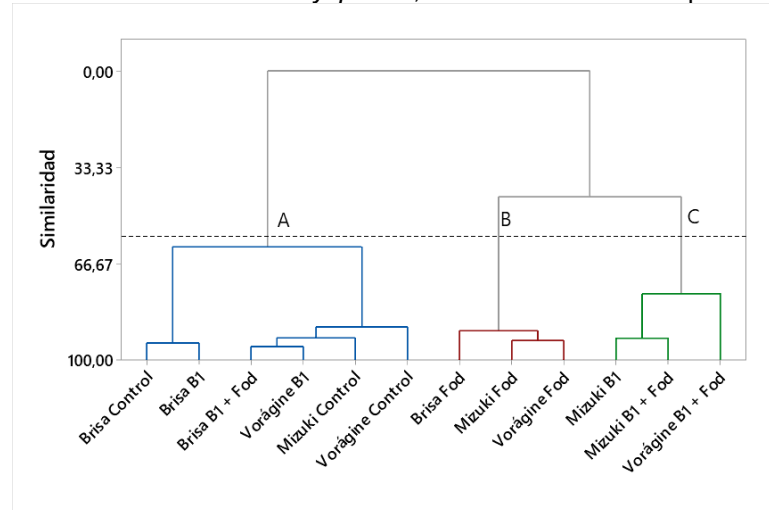


Figura 2-19: Dendrograma del análisis de jerarquización por clústers del efecto de la aplicación de tiamina en la inducción de resistencia al marchitamiento vascular causado por *Fod* en los cultivares susceptibles de clavel ‘Brisa’, ‘Mizuki’ y ‘Vorágine’.

(*Fod*: tratamientos con inoculación de *F. oxysporum*, B1: tratamientos con aplicación de tiamina)



Finalmente, los resultados obtenidos de los ensayos discutidos permitieron seleccionar un potencial inductor de resistencia y unas condiciones de aplicación. Es bien sabido que en cada patosistema los mecanismos de acción pueden ser diferentes, considerando la naturaleza de la enfermedad, el patógeno y la especie vegetal objeto de estudio; es por esta

razón que, en próximos capítulos, en esta tesis se desarrollarán los efectos de la aplicación de la tiamina en la inducción de resistencia de clavel a *Fod* a nivel de proteínas y metabolitos, lo que permitirá profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la inducción de resistencia.

2.3.4 Ensayo *in vivo* para la obtención de muestras para análisis proteómico y metabolómico en las condiciones de trabajo determinadas

Ensayos anteriores permitieron seleccionar la aplicación de tiamina por aspersión sobre las hojas en concentración 1mmol L⁻¹, como condiciones de estudio para evaluar el posible mecanismo de inducción de resistencia en plantas de clavel a *Fod* a nivel de metabolitos y proteínas. De acuerdo con esto, el ensayo que se analiza a continuación tuvo como objetivo recolectar muestras para análisis de proteómica y metabolómica evaluando el efecto de la aplicación de tiamina en las condiciones descritas en dos cultivares contrastantes en resistencia al marchitamiento vascular: 'Mizuki' (susceptible) y 'Golem' (resistente). La comparación entre dos cultivares con diferencias contrastantes en la resistencia a la enfermedad permite no solo determinar el efecto de la tiamina en la bioquímica de la inducción de resistencia, sino que además permitirá aportar en el conocimiento de algunas respuestas determinantes de la resistencia de la enfermedad.

En la figura 2-20 se observan los efectos de los tratamientos sobre la incidencia de la enfermedad en el tiempo del ensayo. Los tratamientos con tiamina e inoculados (B1 + *Fod*) para los dos cultivares, presentan menores valores de incidencia en el tiempo. Con resultados sin diferencias estadísticas comparado con el control, en el caso del cultivar 'Golem', indicando un efecto positivo por la aplicación de tiamina y comparando contra el tratamiento inoculado sin aplicación de tiamina (*Fod*). Además, una menor incidencia en los tratamientos inoculados con *Fod* fue observada en la variedad resistente 'Golem' respecto al cultivar susceptible 'Mizuki', corroborando experimentalmente las diferencias en cuanto al nivel de resistencia de los dos cultivares.

También se realizaron mediciones de severidad del marchitamiento vascular causado por *Fod* en diferentes tiempos. La severidad se reporta como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) (Figura 2-21), obteniendo que los tratamientos inoculados (*Fod* – columnas rojas en la gráfica), confirman que el cultivar 'Mizuki' tiene una mayor

susceptibilidad respecto al cultivar ‘Golem’. Además, los resultados también sugieren un efecto positivo de la aplicación de tiamina (barras azules en la gráfica), ya que se evidencia una disminución en la severidad, que es comparable con los resultados obtenidos para el control.

Figura 2-20: Efecto de la aplicación foliar de tiamina como inductor de resistencia en la incidencia del marchitamiento vascular en cultivares susceptibles de clavel en el tiempo. A: cultivar ‘Mizuki’. B: cultivar ‘Golem’. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un n=3.

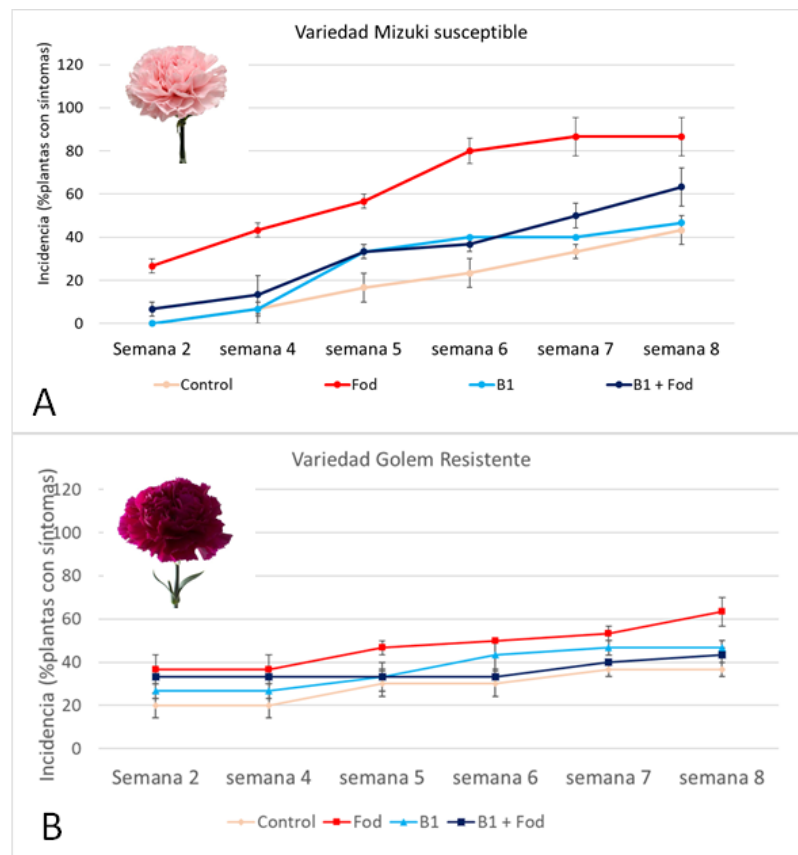
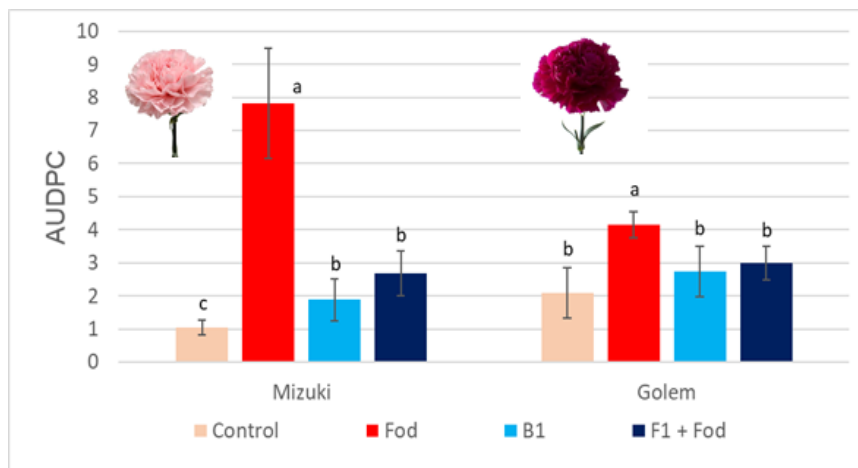


Figura 2-21: Índice de severidad del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en cultivares con niveles de resistencia contrastantes clavel (‘Mizuki’ y ‘Golem’). Los resultados se reportan como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC), y se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un n=3. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).



Los resultados de este ensayo se discutirán con profundidad en los siguientes capítulos.

2.4 Conclusiones

La protección contra diferentes patógenos mediante la inducción de los mecanismos de defensa innatos de la planta aplicando compuestos de bajo costo y seguros ambientalmente como la tiamina, han sido de interés en investigaciones en fitopatología recientemente. Sin embargo, es necesario analizar cada patosistema para evaluar la posible inducción de resistencia y su mecanismo de acción. En una primera etapa de este estudio, se analizó el efecto de cuatro inductores de resistencia contra la marchitez vascular del clavel causada por *Fod*. Los datos aquí presentados indican que una solución de tiamina aplicada por aspersión foliar disminuyó la incidencia y severidad de la enfermedad a niveles estadísticamente similares a los controles no inoculados, provocando además un aumento en el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos, parámetros bioquímicos que se han asociado con resistencia a enfermedades en este patosistema. En una segunda etapa se encontró que la tiamina en un rango de concentraciones entre 0.1 mmol L⁻¹ y 50 mmol L⁻¹, disminuye la incidencia y severidad del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en clavel y se sugieren las menores concentraciones teniendo en cuenta la menor variabilidad en la respuesta. Además, en una tercera etapa se encontró que, la aplicación de tiamina en concentración 1 mmol L⁻¹ generó una respuesta de inducción de resistencia en diferentes cultivares de clavel, lo cual sugiere a este compuesto en las condiciones de trabajo, como potencial agente inductor de resistencia a la enfermedad en clavel. Se requiere profundizar en el estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares en los cuáles se fundamenta esta inducción de resistencia, esto con el fin de tener herramientas que nos permitan

entender el proceso y poder aplicarlo finalmente en sistemas productivos; por esta razón se realizó un último ensayo en el que se analizaron cultivares con resistencia contrastante a *Fod* y en los capítulos posteriores se analizará el mecanismo de acción de la tiamina en la inducción de resistencia a *Fod* a nivel de proteínas y metabolitos.

3.Efecto de la aplicación de tiamina y el reto con el patógeno en el perfil de proteínas de dos cultivares de clavel

Resumen

La elucidación de los mecanismos bioquímicos implicados en el modo de acción de la tiamina como inductor de resistencia al marchitamiento vascular causado por *Fod*, permitirá plantear su aplicación en campo. Es por ello que el objetivo de la presente etapa del trabajo fue investigar el mecanismo de la resistencia inducida por tiamina mediante el análisis de cambios en el perfil de proteínas de la raíz. Para ello se realizó un experimento de invernadero con dos cultivares, evaluando los siguientes tratamientos: control, plantas inoculadas con *Fod*, aplicación foliar de tiamina, y aplicación de tiamina con posterior inoculación de *Fod*. A partir de extractos de las raíces, se realizó un análisis proteómico de shotgun (nLC-MS/MS) a las 96 h después de la inoculación. La aplicación del inductor tiamina causó un proceso de sensibilización en las plantas incrementando la abundancia de 50 proteínas en el cultivar susceptible ('Mizuki') y 39 en el resistente ('Golem'); mientras que la aplicación del inductor y posterior inoculación con *Fod*, incrementó la abundancia de 42 y 65 proteínas en los cultivares susceptible y resistente, respectivamente. Estas proteínas pertenecen a diferentes grupos funcionales, incluida la síntesis y degradación de proteínas, la homeostasis redox, el transporte, la organización celular, el estrés y la defensa. Dichas proteínas pueden estar relacionadas con procesos de *priming*, y con eventos de inducción de resistencia. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con tiamina previo a la inoculación de *Fod* permite la activación temprana de mecanismos de defensa que protegen a la planta frente al patógeno. Estos resultados refuerzan el conocimiento del uso de tiamina como agente bioestimulante en plantas y su modo de acción a nivel de proteínas contra patógenos.

Abstract

The elucidation of the biochemical mechanisms involved in the thiamine mode of action as an inducer of resistance to vascular wilt caused by *Fod* will pave the way for its field application. Therefore, the objective of this stage of the study was to investigate the mechanism of thiamine-induced resistance by analyzing changes in the root protein profile. An experiment was conducted under greenhouse conditions with two cultivars, evaluating the following treatments: control, plants inoculated with *Fod*, foliar application of thiamine, and thiamine application followed by *Fod* inoculation. Root extracts were subjected to shotgun proteomic analysis (nLC-MS/MS) at 96 hours after inoculation. Thiamine induction triggered a sensitization process in the plants, increasing the abundance of 50 proteins in the susceptible cultivar ('Mizuki') and 39 in the resistant one ('Golem'). Meanwhile, thiamine induction followed by *Fod* inoculation increased the abundance of 42 and 65 proteins in the susceptible and resistant cultivars, respectively. These proteins belong to different functional groups, including protein synthesis and degradation, redox homeostasis, transport, cellular organization, stress, and defense. These proteins may be associated with *priming* processes and induction of resistance events. The results suggest that thiamine treatment prior to *Fod* inoculation allows for the early activation of defense mechanisms that protect the plant against the pathogen. These findings reinforce the understanding of thiamine as a biostimulant agent in plants and its protein-level mode of action against pathogens.

3.1 Introducción

Los estudios proteómicos en plantas han permitido conocer los procesos bioquímicos principales involucrados en fenómenos como la inducción de resistencia. Los resultados presentados en etapas previas de esta investigación evidenciaron que la aplicación foliar de tiamina disminuye la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en cuatro cultivares susceptibles, además que modula los contenidos de compuestos fenólicos. Sin embargo, no existían estudios que permitieran profundizar en su modo de acción en el clavel. En ese contexto, el análisis proteómico de la resistencia inducida por tiamina puede ser una herramienta que permita analizar el posible mecanismo de acción, previo a sugerir su uso a nivel agrícola.

La resistencia inducida es un estado fisiológico relacionado con una mayor capacidad de defensa de la planta, asociado a mayores niveles de especies moleculares, incluidas las proteínas; y es una estrategia de optimización de la aptitud de la planta para lograr un equilibrio entre el proceso de crecimiento y la respuesta de defensa a condiciones adversas como el reto con un patógeno (Lin et al., 2020). Los cambios en las abundancias de proteínas por efecto de la aplicación de un inductor de resistencia en comparación con el control sugieren un proceso de sensibilización de la planta (*priming*), intrínseco en el evento de resistencia inducida (Lin et al., 2020; Mauch-Mani et al., 2017). Estas proteínas podrían estar involucradas en la activación de los mecanismos de defensa que se dan en estos procesos de inducción de resistencia, convirtiéndose en temas de investigación en el mejoramiento de la resistencia a enfermedades en plantas (Lin et al., 2020). Estos cambios pueden ser medidos utilizando las estrategias metodológicas de la proteómica comparativa, y validados por otras técnicas de la biología molecular.

En este sentido, la proteómica se ha utilizado como herramienta para explorar las proteínas involucradas en procesos biológicos complejos como la interacción planta patógeno. Estudios de proteómica han permitido investigar el efecto de diferentes elicitores/inductores en fenómenos de resistencia inducida, obteniendo como resultados información sobre los mecanismos de inducción de estas sustancias en las interacciones planta - patógeno analizadas. Algunas sustancias reportadas como inductores de resistencia a partir de la evidencia generada por análisis proteómicos son oligosacáridos de quitosán en la interacción *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae* pv. tomate DC3000 (Jia et al., 2020), ácido β -aminobutírico en la interacción mijo perla - *S. graminícola* (Anup et al., 2015), β -1,3 glucano (laminarin) en la interacción uva - *Plasmopara viticola* (Lemaître-Guillier et al., 2017), entre otros. Así, en la presente investigación se llevó a cabo un análisis de proteómica comparativa, como una aproximación para conocer el medio de acción al mecanismo por el cual la tiamina induce resistencia al marchitamiento vascular en dos cultivares de clavel cultivados en nuestro país. Estos resultados fueron publicados en la revista *Scientia Horticulturae* (Pérez Mora et al., 2024).

3.2 Materiales y métodos

Se analizaron las diferencias cualitativas y cuantitativas que se presentaron a nivel de proteínas en dos cultivares de clavel con diferencias contrastantes en la respuesta al

marchitamiento vascular ('Golem' – Resistente; 'Mizuki' - Susceptible), por efecto de la interacción con *Fod*, la aplicación de tiamina y el efecto combinado. La determinación de estos efectos se realizó por medio de la técnica de pre-fraccionamiento en gel, seguido por la técnica analítica de cromatografía líquida acoplada a un sistema de espectrometría de masas en tándem (GeLC-Orbitrap/MS análisis) de acuerdo con Valledor & Weckwerth (2014). El procedimiento general para la obtención de los resultados se describe a continuación:

- Obtención del material biológico mediante un ensayo *in vivo*.
- Preparación de las muestras a evaluar (extracción de proteínas, limpieza del extracto mediante la técnica de electroforesis y la obtención del extracto tríptico de las proteínas).
- Análisis de muestras por medio de nLC-MS/MS.
- Identificación de las proteínas detectadas usando bases de datos.
- Análisis estadístico de los datos, para detectar proteínas que se regularon de manera significativa por efecto de la interacción con *Fod*, la aplicación de tiamina y el efecto combinado (elicitación + inoculación).
- Clasificación funcional de las proteínas reguladas por efecto de la interacción con *Fod*, la aplicación de tiamina y el efecto combinado (elicitación + inoculación).
- Interpretación biológica de la respuesta observada en cada tratamiento.

3.2.1 Material vegetal y microorganismo

La preparación del inóculo del patógeno *Fod*, el alistamiento del material vegetal, el tratamiento con el inductor, la inoculación con *Fod* y la obtención de muestras, se puede consultar en el capítulo 2.

3.2.2 Preparación de la muestra

Para realizar el análisis proteómico, se analizaron 3 unidades experimentales, consistiendo cada una a partir de las raíces de 6 plantas, esto para cada tiempo (0, 12, 24, 48 y 96 horas) después de la inoculación. Los esquejes fueron lavados con agua para eliminar el exceso de sustrato. Se eliminaron las hojas y el tallo, y las raíces fueron almacenadas a -70 °C y posteriormente liofilizadas durante 48 horas. El tejido liofilizado, fue macerado con nitrógeno líquido y posteriormente almacenado en tubos tipo Eppendorff que se conservaron a -20 °C, hasta el momento de su análisis.

❖ *Extracción y cuantificación de proteínas*

Se realizó la extracción de proteínas de acuerdo con el procedimiento reportado para raíces de clavel por Ardila y colaboradores (Ardila et al., 2014). El método consiste en la precipitación de las proteínas, con una posterior extracción con fenol. Las raíces muestreadas para cada tratamiento fueron liofilizadas y trituradas en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se pesaron 0,025g de las muestras y se transfirieron a un mortero. Se adicionó 1mL de una solución de ácido tricloroacético en acetona y se trituró en un mortero. El homogeneizado fue transferido a un tubo tipo Eppendorf de 2 mL, centrifugado a 14000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y sobre el pellet se adicionó 1 mL de acetato de amonio 0,1M en metanol al 80% y posteriormente 1 mL de acetona al 80%, realizando centrifugaciones en cada caso a 14000 g por 10 minutos a 4°C. El pellet se secó a temperatura ambiente y se le adicionó 1 mL de una mezcla (1:1) de fenol saturado y buffer de lisis (sacarosa 30 % p/v, SDS 2% p/v, β-mercaptoetanol 5% y tris-HCl 0,1 M pH 8). Se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó 5 minutos a 4°C. La mezcla se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos a 4°C. La fase fenólica (superior) se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL y se le adicionó acetato de amonio 0,1M en metanol. Posteriormente, se incubó a -20°C durante toda la noche para permitir el proceso de precipitación de las proteínas extraídas. La mezcla se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La proteína precipitada se lavó con metanol al 100% y posteriormente con acetona al 80%, realizando centrifugaciones en cada caso a 14000 g durante 10 minutos a 4°C, descartando los sobrenadantes. El pellet obtenido se secó a temperatura ambiente para eliminar los residuos de acetona. Finalmente, el pellet se disolvió en 200µL del buffer de solubilización para *shotgun* (urea 8M, HEPES 50mM pH 7,8) y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

La cuantificación de las proteínas extraídas se hizo mediante el método de Bradford, incluyendo la modificación que emplea el reactivo Bradford BIO-RAD (Ramagli & Rodriguez, 1985). La lectura de la absorbancia a 595 nm se hizo en un espectrofotómetro (Genesys UV 10, ThermoFisher, USA), en el cual se midieron tres réplicas analíticas, por cada unidad experimental evaluada. La curva de calibración se hizo empleando BSA (por sus siglas en inglés, Bovine serum albumin) como referencia de proteína.

❖ *Electroforesis en geles de poliacrilamida*

Se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de 20 cm x 20 cm, usando el sistema PROTEAN II XL Cell (Biorad). El sistema de separación consistió en un gel de poliacrilamida al 4% (p/v) para la concentración de las proteínas y uno de 11% para la separación de las proteínas. En cada pozo se colocaron 100 µg de proteína previamente cuantificados y la separación se desarrolló a un voltaje constante de 50 V en el gel de concentración y de 80V en el gel de separación. La asignación de pesos moleculares se realizó mediante comparación con el marcador preteñido SDS-PAGE Standards 10-260 KDa. Los geles fueron teñidos con azul de Comassie y digitalizados usando el densitómetro calibrado GS-800 (Biorad). El análisis de los geles se realizó usando el software Image Lab (Biorad).

❖ *Pre-fraccionamiento de la muestra mediante SDS-PAGE*

Muestras que contenían 100 µg de proteína equivalentes a BSA, de acuerdo con la comparación con la curva de calibración fueron cargadas en un gel de poliacrilamida. Una corriente de 80V fue aplicada para permitir que entraran un cm dentro del gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes del 12%. Los geles fueron fijados y teñidos con 0,1% de azul de Commasie R-250 en metanol/ácido acético/agua (40/10/50, v/v) por 1 hora y desteñidos con metanol/agua (40/60, v/v). Las bandas de proteínas fueron removidas del gel, y cortadas en pequeños trozos que fueron mantenidos en agua hasta su posterior digestión (Valledor & Weckwerth, 2014).

❖ *Digestión de proteínas*

La digestión de proteínas se realizó de acuerdo con lo reportado por Valledor y Weckwerth (2014). Los trozos de gel fueron desteñidos en una mezcla de proporción 1:1 de bicarbonato de amonio 200 mM y acetonitrilo durante 15 minutos, seguido de un lavado con acetonitrilo al 100%, durante 5 min. Las proteínas fueron reducidas por reacción con ditiotretitol 20 mM, en bicarbonato de amonio 25 mM, estas fueron incubadas durante 20 minutos, a una temperatura de 55 °C. Después de este proceso, la muestra se enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el proceso de alquilación de los grupos tiol libres, por reacción con yodoacetamida 40 mM en bicarbonato de amonio 25 mM en un cuarto oscuro, por un periodo de 20 min. Posteriormente, los trozos de gel fueron lavados dos veces en una solución de bicarbonato de amonio 25mM y paso seguido, las proteínas fueron digeridas con tripsina

(Promega) a una concentración de 12,5 ng/ μ L de la enzima en una solución de bicarbonato 25 mM, e incubadas a 37 °C durante la noche. El proceso de digestión de proteínas fue detenido mediante la adición de TCA a una concentración final del 1%; las muestras de proteínas digeridas fueron secadas en un *speedvac* y disueltas en una mezcla de acetonitrilo 2% (ACN) y 0,05% de ácido trifluoroacético.

3.2.3 Análisis de proteínas

El procesamiento de las muestras obtenidas en el paso anterior se realizó en el Servicio central de apoyo a la investigación SCAI, de la Universidad de Córdoba en España. La mezcla de péptidos de cada tratamiento, obtenidos por la digestión triptica, fue separada por cromatografía líquida (nano-LC), empleando un equipo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA), con una columna C18, de 75 μ m \times 50 cm, Acclaim Pepmam (Thermo Fisher Scientific, USA). Los péptidos fueron previamente concentrados y limpiados en una precolumna de 300 μ m \times 5 mm Acclaim Pepmcon (Thermo Fisher Scientific, USA) durante 5 min, a un flujo de elución de 5 μ L/min. La separación de los péptidos se realizó a una temperatura de 40 °C. Las fases móviles empleadas fueron: Fase A, ácido fórmico (0,1%); Fase B, ácido fórmico en acetonitrilo (0,1%). La velocidad de elución fue de 300 nL/min.

La detección de los péptidos se realizó con un espectrómetro de masas, trihíbrido Thermo Orbitrap Fusion (Thermo Scientific, USA) en modo positivo, equipado con una fuente de nanoelectrospray de ionización (nESI). El Orbitrap se ajustó a una resolución de 120 K (a 200 m/z) con espectros de exploración completa en el rango 400-1500 m/z, y un umbral de 4×10^5 recuento de iones. Los iones precursores con un estado de carga entre 2-5 fueron filtrados para evaluación de MS/MS, en un cuadrupolo con una ventana de aislamiento de 1,2 Da. Los iones precursores monoisotópicos se fragmentaron mediante disociación inducida por colisión (CID), configurado bajo control automático de ganancia de 2×10^3 ; un tiempo máximo de inyección de 300 ms; y 35 % de energía de colisión normalizada. Se estableció un tiempo de exclusión dinámica de 15 s y una tolerancia de 10 ppm del precursor seleccionado y sus isótopos para evitar fragmentaciones redundantes.

3.2.4 Identificación de proteínas

Los datos obtenidos fueron analizados para identificar las proteínas con el software Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific, USA). Los espectros MS/MS se buscaron empleando el algoritmo SEQUEST contra archivos FASTA de proteínas compilado de la base de datos para la familia de plantas familia *Caryophyllales* presente en el NCBI (marzo 2022). La lista de péptidos *in silico* fue generada mediante digestión tríptica teórica, permitiendo una escisión omitida, carbamidometilación completa de los residuos de cisteína y oxidación parcial de los residuos de metionina. La tolerancia de masa del precursor fue de 10 ppm y los iones del producto se buscaron con una tolerancia de 0,1 Da. Las coincidencias del espectro de péptidos (PSM) se validaron utilizando el algoritmo Percolator, que está incluido en el software Proteome Discoverer. La confianza de identificación se estableció con un FDR del 1%. Para la identificación, los péptidos se agruparon en proteínas de acuerdo con la ley de la parsimonia y se filtraron a FDR = 1 % y XCorr \geq 2. El análisis cuantitativo de los péptidos se realizó respecto al área bajo la curva de la señal. Las proteínas identificadas fueron filtradas de acuerdo con los siguientes parámetros: al menos dos péptidos identificados, con una cobertura de al menos un 10 % de los aminoácidos de la proteína y que se encuentre en al menos dos réplicas del tratamiento analizado (Bheri et al., 2019; Mariá Ángeles Castillejo et al., 2020).

3.2.5 Anotación funcional de proteínas

La anotación funcional de cada proteína identificada se hizo empleando las herramientas de clasificación UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) y Mercator 4 v.5.0 (<https://www.plabipd.de/portal/web/guest/mercator4>). La búsqueda se realizó con el número de acceso de la proteína y el formato FASTA de la secuencia de la proteína. Adicionalmente, se evaluó la red hipotética de interacciones entre las proteínas que aumentaron de manera significativa por efecto de los tratamientos aplicados, empleando la herramienta en línea STRING 11 (<http://string-db.org>). Las redes de interacción de proteínas fueron desarrolladas empleando proteínas homólogas de *Arabidopsis thaliana* obtenidas a partir de la secuencia de TAIR BLAST 2.9.0+ (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>), y la red se reporta con una confianza \geq 0,7 (Jia et al., 2020; Szklarczyk et al., 2019).

3.2.6 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron utilizando tres réplicas biológicas para cada tratamiento. Cada unidad experimental estaba compuesta por al menos 10 esquejes de clavel enraizados sanos. Los datos se reportan como la media más o menos la desviación estándar. El análisis de la varianza (ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías) y las diferencias significativas entre las medias (prueba de Tukey), se realizaron con la versión de prueba del software Minitab versión 19. Previo al análisis de proteínas, se hizo la normalización de los datos mediante suma. Los criterios usados para considerar que una proteína se reguló por efecto de los tratamientos fueron los siguientes:

- Las proteínas deberían estar presentes en las tres repeticiones de un tratamiento.
- Al menos dos péptidos identificados y una cobertura de la secuencia mayor al 10%.
- Que la proteína presente una diferencia estadísticamente significativa en su abundancia, con respecto al tratamiento control (t-test, valor de $p \leq 0,05$).
- Que su abundancia fuera 1,5 o 0,5 veces lo encontrado para el tratamiento control.

El Análisis de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (PLS-DA), se realizó con la herramienta gratuita en línea Metaboanalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>).

3.3 Resultados y discusión

De acuerdo con los resultados analizados en el capítulo 2, se encontró que la aplicación de tiamina tiene un efecto positivo en plantas de clavel sometidas al reto con el patógeno *Fod*, causante del marchitamiento vascular. Para analizar el efecto a nivel de proteínas que se presenta en dos cultivares de clavel con niveles contrastantes de resistencia a *Fod*, por acción de los tratamientos, se realizaron electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (1D SDS PAGE) en los diferentes tiempos de muestreo del ensayo, con el fin de seleccionar el tiempo de mayores diferencias para llevar a cabo el análisis proteómico. En cada gel se cargaron las tres réplicas de los cuatro tratamientos evaluados en un tiempo específico (*i.e.*, 0, 12, 24, 48 o 96 hpi) y cada cultivar se dispuso en un gel independiente, para un total de cinco geles para el cultivar resistente – ‘Golem’ (geles digitalizados en la Figura 3-1), y cinco geles para el cultivar susceptible – ‘Mizuki’ (geles digitalizados en la Figura 3-2). En los geles se detectaron 25 bandas

consistentes en todos los tratamientos y réplicas que se analizaron cuantitativamente de acuerdo con su densidad óptica normalizada para cada carril. En la tabla 3-1 se presenta el número de bandas con diferencia significativa comparadas contra el control (ANOVA de dos vías, valor de $p \leq 0.05$).

Tabla 3-1: Bandas que presentan diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos respecto al control.

B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*; hpi: horas postinoculación; RG: cultivar resistente 'Golem'; R-M: cultivar susceptible 'Mizuki'.

Tiempo (hpi)		0		12		24		48		96	
Cultivar		RG	SM	RG	SM	RG	SM	RG	SM	RG	SM
Tratamiento	<i>Fod</i>			4	1	4	4	2	8	4	12
	B1	6	6	5	7	6	7	8	7	8	8
	B1 + <i>Fod</i>			3	6	6	3	8	5	9	6

De acuerdo con esto se seleccionó el tiempo de muestreo de 96 horas postinoculación para el análisis de proteómica, ya que fue el tiempo en que se presentaron el mayor número de cambios a nivel cuantitativo (*i.e.*, densidad óptica normalizada de las bandas). De manera preliminar se puede inferir que la aplicación de tiamina está modulando el perfil de proteínas en los dos cultivares, teniendo los principales cambios al tiempo seleccionado para el siguiente paso.

Figura 3-1: Electroforesis unidimensional para el cultivar resistente 'Golem' en diferentes tiempos de muestreo.

A, B, C, D y E corresponden a 0h, 12h, 24h, 48h y 96h, respectivamente. Para el gel en A- Patrón de pesos moleculares (carriles 1 y 8), tratamiento control (carriles 2, 3 y 4), tratamiento con aplicación de tiamina – B1 (carriles 5, 6 y 7). Para los geles en B, C, D y E- Patrón de pesos moleculares (carriles 1 y 14), tratamiento Control (carriles 2, 3 y 4), tratamiento inoculado - *Fod* (carriles 5, 6 y 7), tratamiento con aplicación de tiamina – B1 (carriles 8, 9 y 10) y tratamiento con aplicación de tiamina inoculado – B1 + *Fod* (carriles 11, 12 y 13).

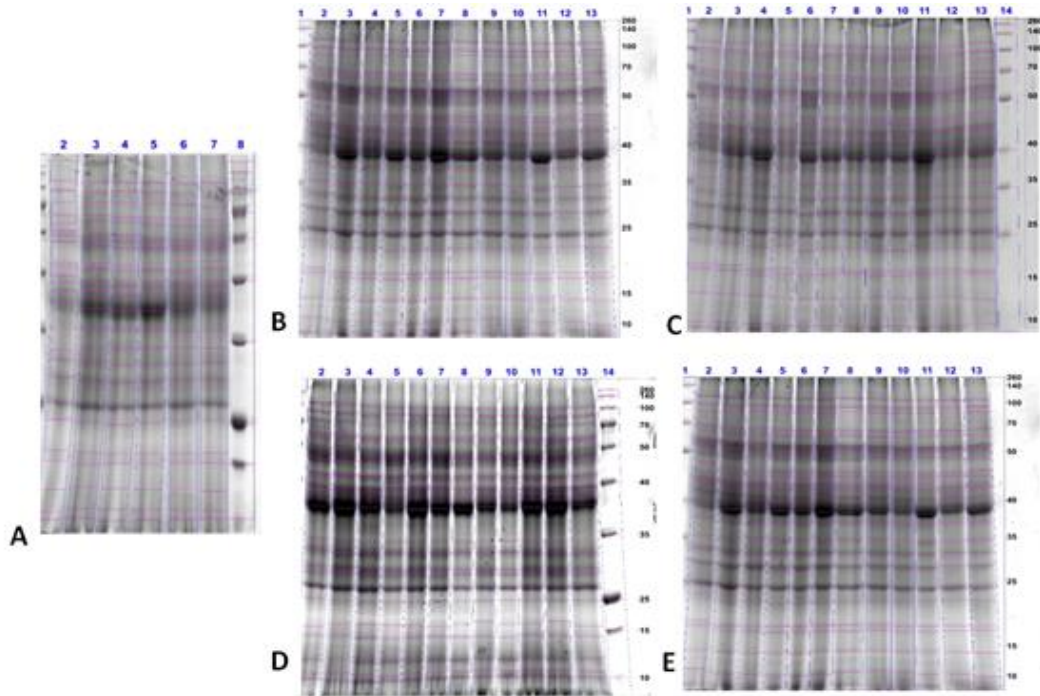
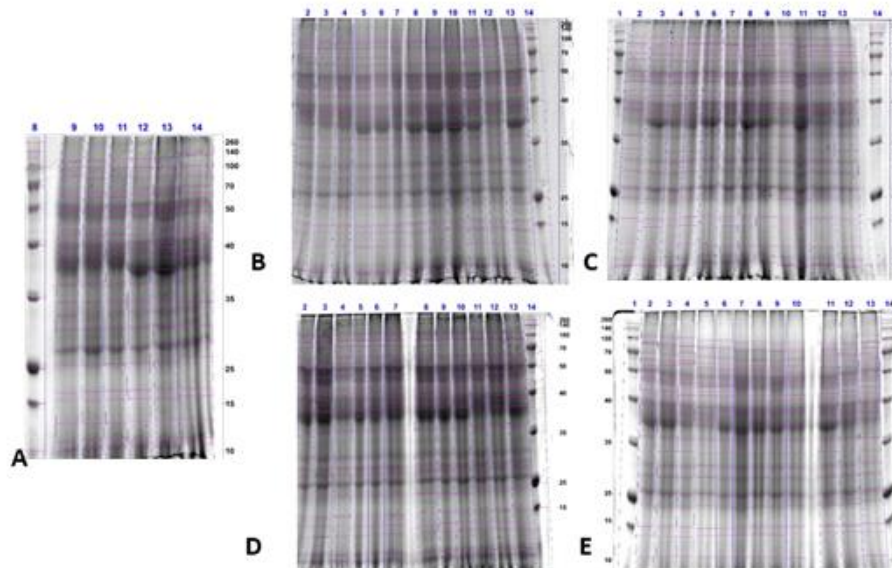


Figura 3-2: Electroforesis unidimensional para el cultivar susceptible ‘Mizuki’ en diferentes tiempos de muestreo.

A, B, C, D y E corresponden a 0h, 12h, 24h, 48h y 96h, respectivamente. Para el gel en A- Patrón de pesos moleculares (carril 8), tratamiento control (carriles 9, 10 y 11), tratamiento con aplicación de tiamina – B1 (carriles 12, 13 y 14). Para los geles en B, C, D y E- Patrón de pesos moleculares (carriles 1 y 14), tratamiento Control (carriles 2, 3 y 4), tratamiento inoculado - *Fod* (carriles 5, 6 y 7), tratamiento con aplicación de tiamina – B1 (carriles 8, 9 y 10) y tratamiento con aplicación de tiamina inoculado – B1 + *Fod* (carriles 11, 12 y 13).



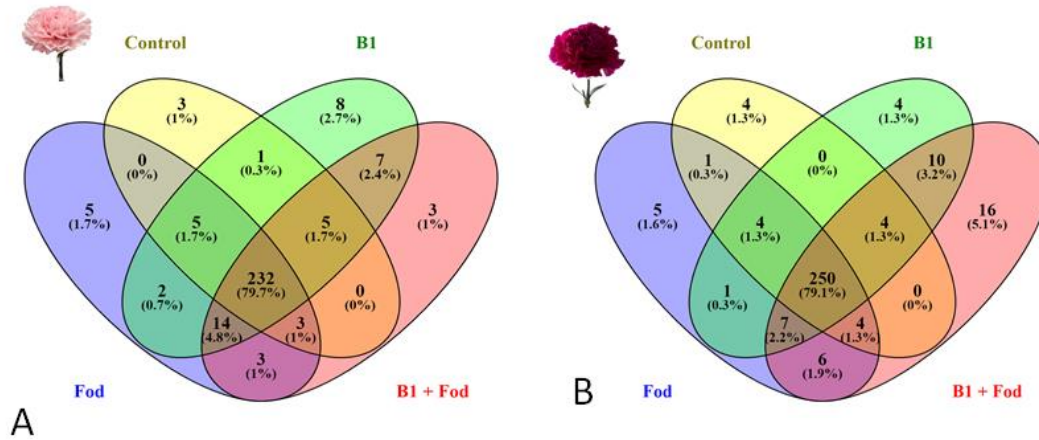
Después de la identificación masiva de proteínas por HPLC-MS, se identificaron entre 1357 y 1435 proteínas. Las proteínas que difieren entre cultivares y/o tratamientos se resumen en la Tabla 3-2. En general, se identificaron más proteínas en los tratamientos del cultivar resistente 'Golem' (RG). Con el tratamiento B1 + *Fod* se produjo la mayor cantidad de proteínas en ambos cultivares. Al filtrar el conjunto de datos original provisto para el efecto de los tratamientos, se obtuvieron entre 249 y 274 proteínas para el cultivar susceptible 'Mizuki' (SM) (Figura 3-3A), y entre 267 y 297 proteínas para RG (Figura 3-3B). El conjunto de datos original se redujo aún más a través del análisis estadístico de proteínas, lo que resultó en la selección final de proteínas acumuladas.

Tabla 3-2: Resumen de proteínas identificadas por el análisis *shotgun*-MS/MS en dos cultivares de clavel con resistencia contrastada a la marchitez vascular, por efecto de los diferentes tratamientos. (B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*).

	'Mizuki' - cultivar susceptible				'Golem' - cultivar resistente				
	Control	<i>Fod</i>	B1	B1 + <i>Fod</i>	Control	<i>Fod</i>	B1	B1 + <i>Fod</i>	
Datos sin procesar	1357	1382	1359	1426	1379	1387	1407	1435	
Parámetros de confianza (≥ 2 Péptidos, cobertura $\geq 10\%$)	283	295	295	300	289	295	302	306	
Proteínas consistentes	249	264	274	267	267	278	280	297	
Estadísticamente significativas comparadas contra el control ($p \leq 0.05$)	↑	-----	39	50	42	-----	36	39	65
	↓	-----	5	11	15	-----	10	11	17

De los diagramas de Venn (Figura 3-3), se puede analizar que la mayoría de las proteínas están presentes en los cuatro tratamientos, y su efecto en el evento analizado dependerá de las diferencias estadísticas que se encuentren. También se encuentran proteínas que están exclusivamente en los tratamientos con aplicación de tiamina, las cuales podrían estar implicadas en el proceso de sensibilización de la planta que le permite responder de mejor manera el posterior ataque del patógeno. Así como también, proteínas que están exclusivamente en el tratamiento B1 + *Fod*, que podrían estar implicadas en la respuesta aumentada que se da por efecto de la aplicación del inductor y que le permiten resistir el reto con el hongo.

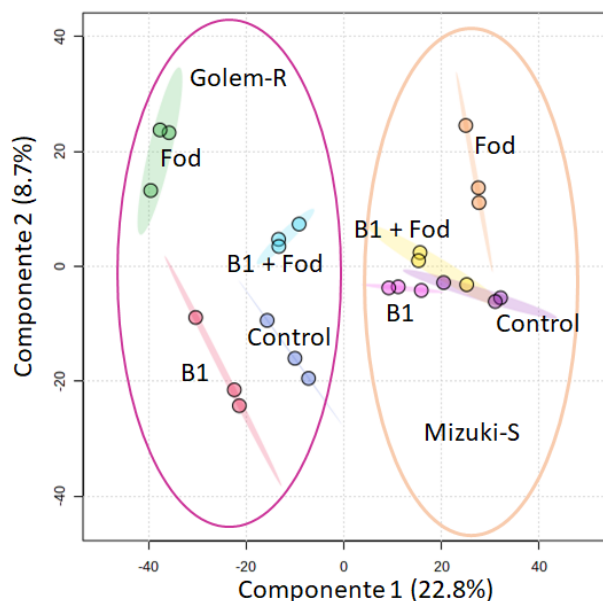
Figura 3-3: Diagrama de Venn del total de proteínas identificadas en cada uno de los tratamientos en los cultivares de clavel A: Susceptible-'Mizuki' y B: Resistente-'Golem'. Tratamientos: Control (C), Inoculado (*Fod*), Aplicación de tiamina (B1), Aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod* (B1 + *Fod*).



El análisis multivariado discriminante (PLS-DA) de todas las proteínas detectadas de cada tratamiento en comparación con el control, muestra que el componente principal uno, que explica el 22,8% de la varianza, separa el cultivar susceptible del resistente. Esto indica que hay una diferencia en los perfiles de proteínas en cada cultivar, lo que puede en parte, explicar su respuesta diferencial en cuanto a la resistencia *Fod*. Por otro lado, en el componente principal dos, que explica el 8,7% de la varianza, se separan los tratamientos control de cada uno de los tratamientos analizados (figura 3-4), sugiriendo que en cada cultivar hay diferencias en el perfil de proteínas causadas por la inoculación, por la aplicación de tiamina y la aplicación del inductor y posterior inoculación.

Figura 3-4: Análisis discriminante del conjunto de proteínas detectadas en dos cultivares de clavel con resistencia contrastante al marchitamiento vascular, por efecto de los diferentes tratamientos.

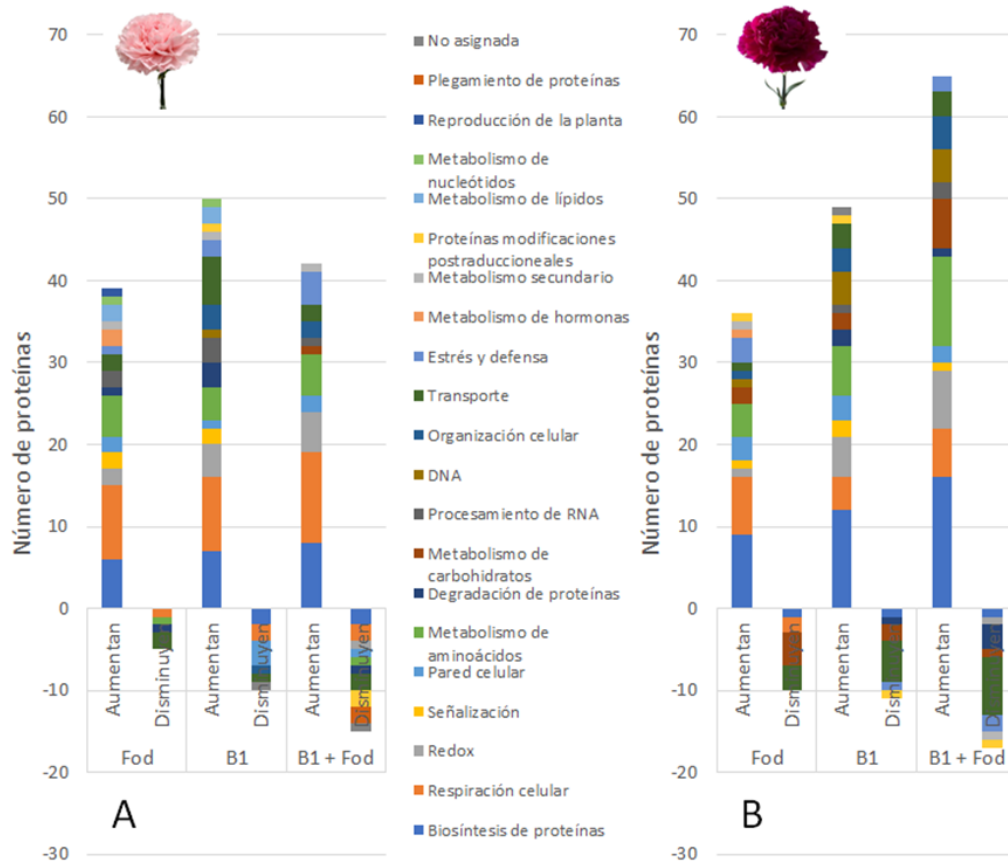
Análisis de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (PLS-DA). La discriminación de los cultivares es resaltada a lo largo de la componente principal 1 (PC1) por un óvalo rosado ('Mizuki') y un óvalo fucsia ('Golem'). La distancia observada entre muestras en el espacio de las componentes refleja similitud entre los perfiles de abundancia de proteínas. B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*.



Las proteínas con variación estadísticamente significativa se clasificaron en términos funcionales utilizando MERCATOR, estableciéndose 21 grupos relacionados con los términos de la ontología génica (Figura 3-5). Además, se construyó una red de interacciones proteína-proteína (Figura 3-6). La biosíntesis y degradación de proteínas, la respiración celular y metabolismo energético, el metabolismo de aminoácidos y el transporte, fueron las categorías funcionales que más agruparon las proteínas en los tratamientos de los dos cultivares. Los cambios en las proteínas del metabolismo primario se informan con frecuencia como estimulados por eventos de interacción planta-patógeno e inducción de resistencia (Anup et al., 2015; Rojas et al., 2014). En ese contexto, se encontró que la aplicación de tiamina causó la modulación de procesos relacionados con el metabolismo primario como la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la ruta de las pentosas fosfato, La biosíntesis y degradación de proteínas, la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la biosíntesis de aminoácidos. Se ha reportado que el tratamiento con patógenos virulentos y avirulentos, y con inductores de resistencia afectan al alza estos procesos, que están involucrados en la producción de energía (Lemaître-Guillier et al., 2017; Rojas et al., 2014; Schwachtje et al., 2018). Se ha sugerido que el papel del metabolismo primario durante las interacciones planta-patógeno es apoyar los requerimientos de energía celular para las respuestas de defensa de las plantas; sin embargo, como complemento a esta respuesta, se propone que la regulación positiva del metabolismo primario modula las cascadas de transducción de señales que conducen a las

respuestas de defensa de las plantas (e.g. proteínas como la hexoquinasa y la piruvato descarboxilasa se han asociado a la generación de ROS y la activación de proteínas PR que conducen a respuesta hipersensible) (Rojas et al., 2014). Por otro lado, la tiamina es un cofactor enzimático de estos procesos (Goyer, 2010), por ejemplo la piruvato deshidrogenasa aumentó su actividad en el tratamiento B1, y su proceso enzimático requiere como cofactor tiamina pirofosfato.

Figura 3-5: Clasificación funcional de proteínas reguladas en raíz de clavel por efecto de los tratamientos: A. Cultivar susceptible ‘Mizuki’. B. Cultivar resistente ‘Golem’. Categorías funcionales de las proteínas que variaron en su abundancia de manera significativa (t-test múltiple, valor de p ajustado con un $FDR \leq 0.05$) después de 96 horas postinoculación. (B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*).



Además, el pretratamiento con tiamina provocó diferencias en los procesos relacionados con la respuesta al estímulo, la respuesta de defensa, la respuesta al estrés, la homeostasis redox, la señalización, la regulación de la transcripción, el metabolismo secundario y otros.

❖ Efecto de la inoculación con *Fod*

Dado que la resistencia del clavel a *Fod* está determinada por múltiples genes, y no existe una relación isogénica entre los cultivares analizados; pueden existir variaciones en los perfiles de proteínas entre los cultivares resistentes y susceptibles que no están directamente relacionados con la resistencia. Así, la mayor parte de las proteínas acumuladas en los tratamientos inoculados (*Fod*) estuvieron asociadas en gran medida al metabolismo primario; sin embargo, se observaron diferencias en el perfil proteico entre los cultivares RG y SM relacionadas con la resistencia a patógenos. En particular, la proteína relacionada con el estrés locus 8 de resistencia a los rayos UV (A0A5C1IXZ3), el factor de elongación Tu (EF-tu) (A0A0K9R4P8), la proteína relacionada con la homeóstasis redox 2-Cys peroxirredoxina BAS1 (O24364), la proteína similar a la germina (A0A803MXD5), la fosfomanomutasa (PMM) (T1DFP6), MAPquinasa (A0A0S2C4B6); la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) (A0A7C9CM45), la peroxidasa (A0A803KYJ6) y la fenilalanina amonio liasa (PAL) (Q5QRU8), se han reportado en otros estudios por su papel en la preparación o respuesta de defensa (Abdul Hasseb et al., 2022; Ardila et al., 2014; Boubakri et al., 2013; Lemaître-Guillier et al., 2017; Torky, 2016). Estos hallazgos sugieren que estas proteínas pueden desempeñar un papel en la resistencia de los claveles a *Fod* en el cultivar resistente. Se deben plantear estudios adicionales que permitan validar si altos niveles de estas proteínas se mantienen en otros cultivares resistentes, con el fin de plantear su papel como posibles marcadores constitutivos de resistencia a la enfermedad.

❖ Efecto de la aplicación de tiamina (B1) y aplicación de tiamina con posterior inoculación con *Fod*

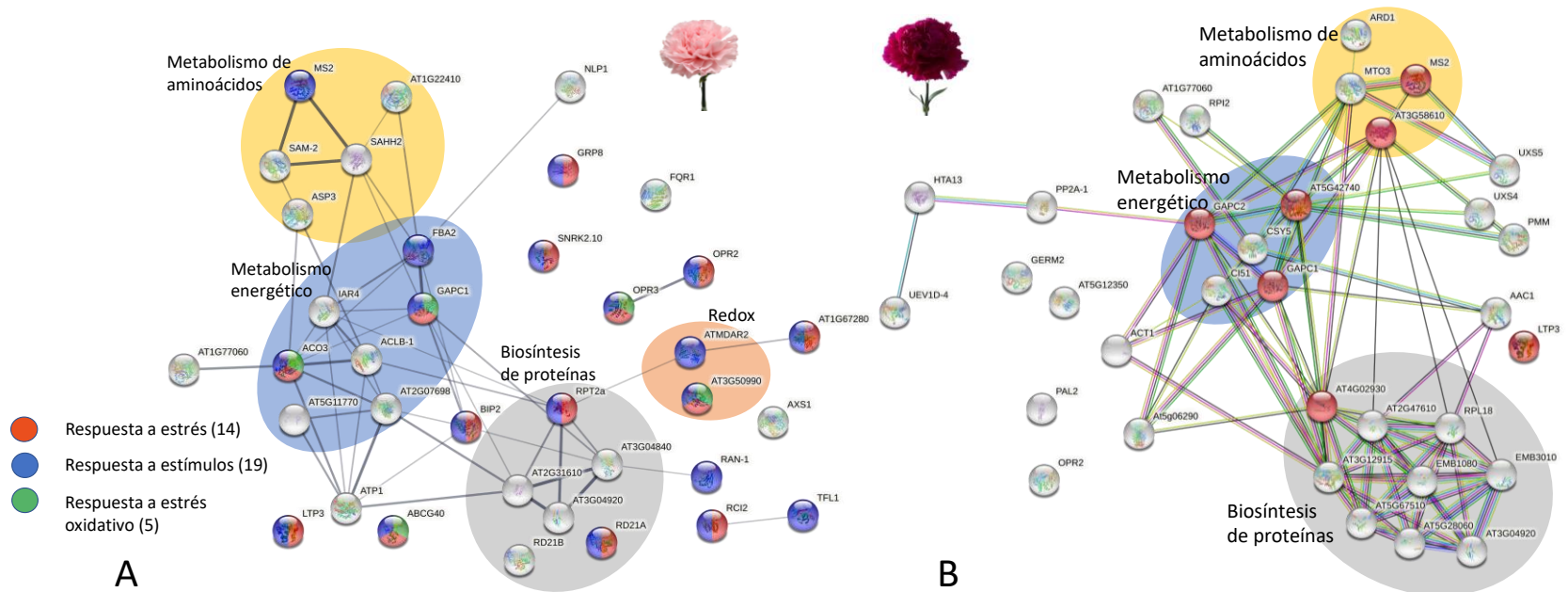
De manera interesante, se observó el efecto protector de la tiamina en el cultivar susceptible a nivel fenotípico y a nivel proteómico, mostrando un aumento en la abundancia de proteínas relacionadas con la resistencia, mucho más evidente en SM que en RG. La aplicación de tiamina (tratamientos B1 y B1 + *Fod*) incrementó proteínas específicas (EF-Tu, PMM, MAPquinasa, PAL, E2, peroxidasa) en el cultivar susceptible de manera similar a la inoculación en RG, lo que sugiere la estimulación de la respuesta defensa innata. Sin embargo, el mecanismo de respuesta a la tiamina SM también incluye otras proteínas (proteína de choque térmico A0A411F6V6, proteína que contiene el dominio 14_3_3 A0A7C9DJ95, factor de despolimerización de actina G5DXK5, glutatión transferasa

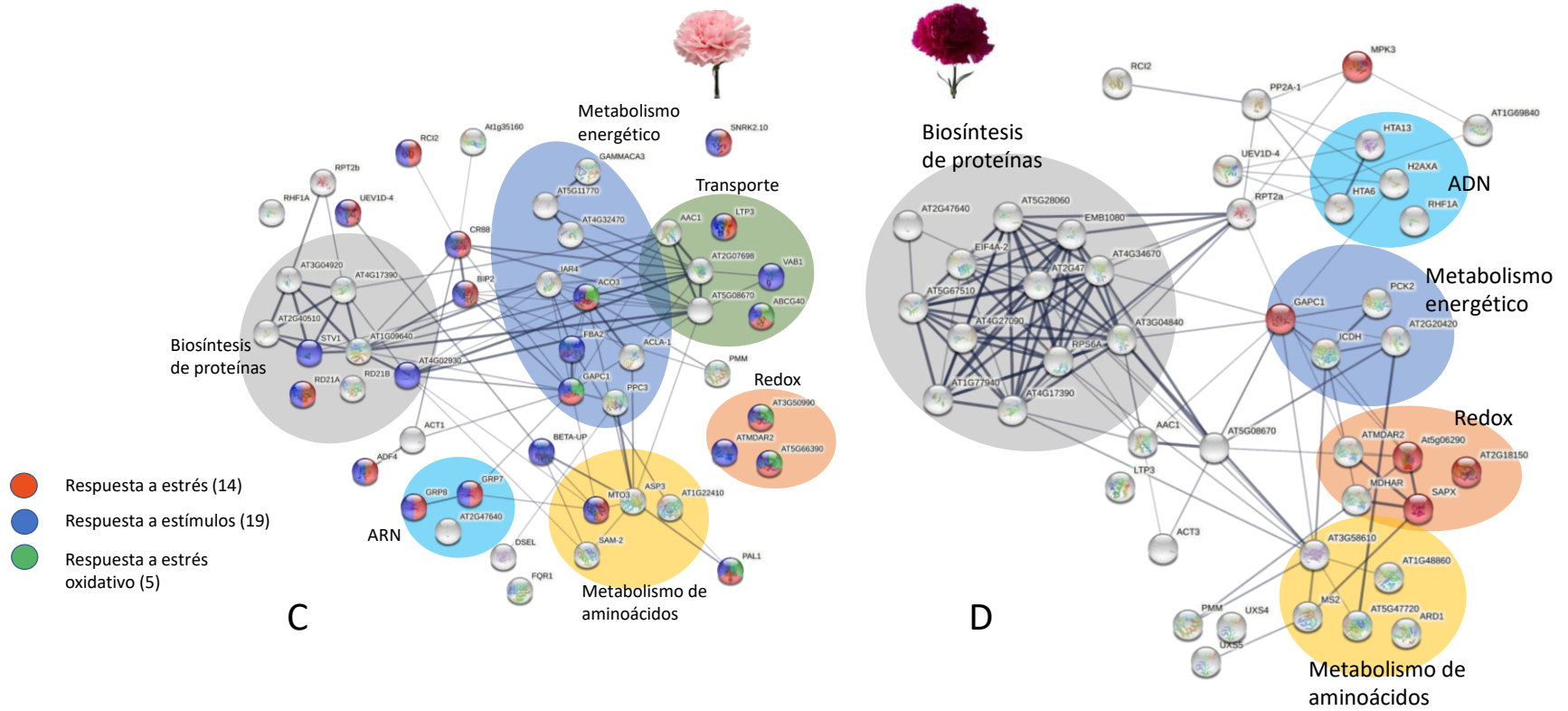
A0A7C8Z698, S-adenosilmetionina sintasa 2 (MTO) Q6F3F0, MAPKinase A0A0S2C 4B6, y antranilato sintasa A0A7C9AN11) relacionadas con la respuesta a patógenos (Jia et al., 2020; Li et al., 2022; Ngou et al., 2022; Poór et al., 2019; Sadeghi et al., 2022; Santos-Rodríguez et al. , 2021). Estas proteínas están incluidas en el diagrama de Venn (Figura 3-3A) que muestra ocho proteínas exclusivas sobrerreguladas por el tratamiento B1, siete proteínas sobrerreguladas por la adición de tiamina (tratamientos B1 y B1 + *Fod*) y tres proteínas exclusivamente en inoculados. plantas previamente asperjadas con tiamina (B1 + *Fod*). El diagrama de Venn para RGC (Figura 3-3B) revela que la aplicación de tiamina también modula diferencialmente ciertas proteínas, lo que podría estar asociado al efecto protector del bioestimulante. Específicamente, el diagrama muestra cuatro proteínas exclusivas que fueron reguladas al alza por el tratamiento B1, diez proteínas que fueron reguladas al alza por la adición de tiamina (tratamientos B1 y B1 + *Fod*), y dieciséis proteínas que se encontraron exclusivamente en plantas inoculadas que fueron previamente asperjadas con tiamina (B1 + *Fod*). Algunas de estas proteínas, como las enzimas antranilato sintasa, glutatión transferasa y S-adenosilmetionina sintasa 2, también fueron moduladas en SMC. Otros, sin embargo, estaban regulados al alza exclusivamente en RGC, incluida las enzimas ascorbato peroxidasa (A0A7C8Z0L6 y A0A0K9RD46) y monodehidroascorbato reductasa (A0A7C9D101). Estas proteínas, junto con otras de interés (Tabla 3-3), serán analizadas más a fondo en función de sus categorías funcionales y su papel potencial en la inducción de resistencia provocada por la aplicación de tiamina en el cultivar susceptible ('Mizuki').

Figura 3-6: Análisis de interacción de redes proteicas de homólogos de *A. thaliana* inducidas en las raíces de dos cultivares de clavel con resistencia contrastada a la marchitez vascular, por efecto de los diferentes tratamientos.

A. Efecto de la inoculación con *Fod* en el cultivar susceptible-'Mizuki'; B. Efecto de la inoculación con *Fod* en el cultivar Resistente-'Golem'; C. Efecto de la aplicación foliar de tiamina sobre el cultivar susceptible-'Mizuki'; D. Efecto de la aplicación foliar de tiamina sobre el cultivar resistente-'Golem'; E. Efecto de la aplicación foliar de tiamina y posterior inoculación con *Fod* sobre el cultivar susceptible-'Mizuki'; D. Efecto de la aplicación foliar de tiamina y posterior inoculación con *Fod* sobre el cultivar resistente-'Golem'

Las proteínas se agrupan según el proceso biológico anotado. El análisis se realizó mediante la herramienta STRING 11 con una confianza de interacción $\geq 0,7$. Las asociaciones más fuertes están representadas por líneas más gruesas.





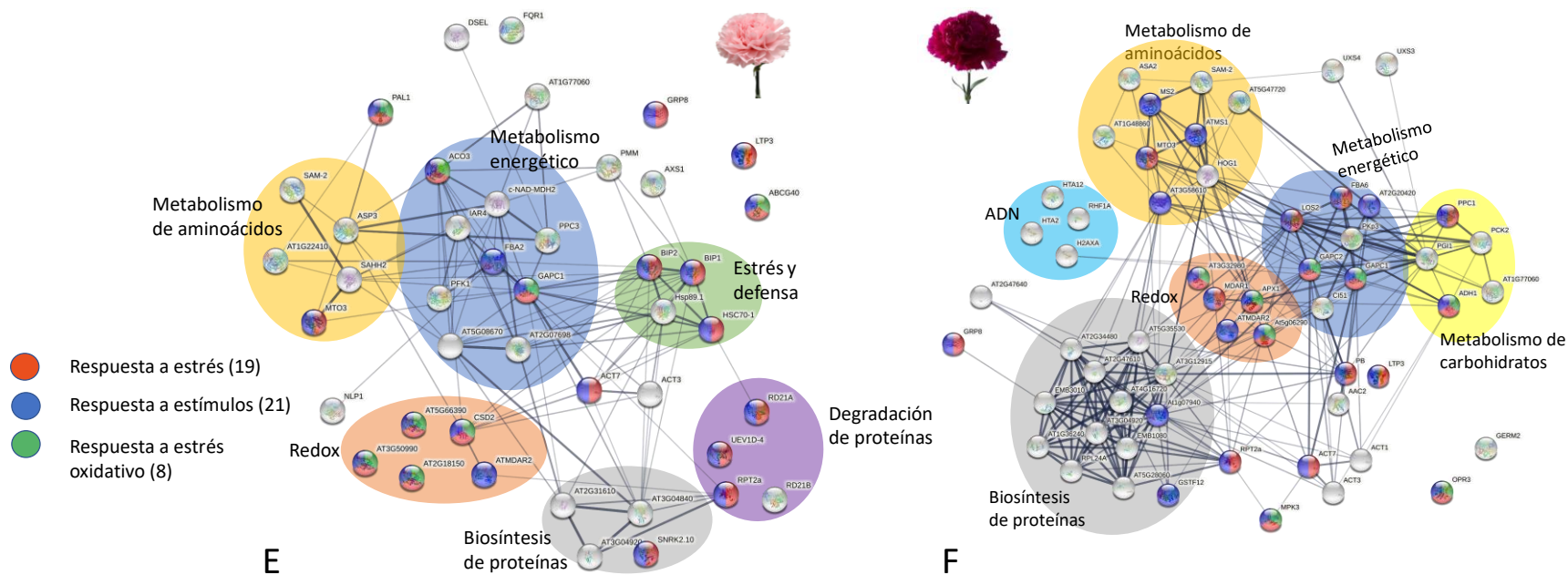


Tabla 3-3: Listado de proteínas que se han reportado en eventos de estrés y aumentaron en los tratamientos evaluados. Se excluyen proteínas del metabolismo primario. (B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*)

Número de acceso	Proteína	Categoría funcional	Cobertura	# Péptidos	PM [kDa]	PI	Score Sequest HT	'Mizuki' (Abundancia relativa)				'Golem' (Abundancia relativa)			
								Control	Fod	B1	B1+Fod	Control	Fod	B1	B1+Fod
A0A803MEG4 RCI2	Proteína que contiene el dominio 14_3_3	Señalización	12,8	3	28,35	4,9	131								

Número de acceso	Proteína	Categoría funcional	Cobertura	# Péptidos	PM [kDa]	PI	Score Sequest HT	'Mizuki' (Abundancia relativa)				'Golem' (Abundancia relativa)			
								Control	Fod	B1	B1+Fod	Control	Fod	B1	B1+Fod
A0A7C9DJ95 AT1G35160.1	Proteína que contiene el dominio 14_3_3	Señalización	23,4	4	23,94	5,2	314								
A0A411F6V6 CR88	Proteína de choque térmico 90-5	Estrés	13,1	7	90,92	5,1	42								
Q42434 BIP2	Proteína de unión luminal (proteína de choque térmico 70)	Estrés	20,2	15	73,55	5,1	1219								
A0A7C8YE0 BiP1	Adenosintrifosfatasa	Estrés y defensa	21,6	16	73,40	5,2	1210								
N0DLM6 SNRK2.10	Subfamilia 2 de proteína quinasa relacionada con SNF1	Proteínas - Modificaciones	10,0	3	41,51	6	58								
D4QD75 LTP3	Proteína no específica de transferencia de lípidos	Transporte	26,8	3	11,89	8,6	93								

Número de acceso	Proteína	Categoría funcional	Cobertura	# Péptidos	PM [kDa]	PI	Score Sequest HT	'Mizuki' (Abundancia relativa)				'Golem' (Abundancia relativa)			
								Control	Fod	B1	B1+Fod	Control	Fod	B1	B1+Fod
Q43423 RD21A	Cisteína proteinasa	Proteínas - Degradación	35,8	8	46,69	5,8	1009								
Q75NB3 RD21B	Cisteína proteinasa	Proteínas - Degradación	26,1	9	50,43	5,1	612								
A0A7C9EB87 ABCG40	Transportador dependiente de ATP ABCG40	Transporte	32	3	14,37	6,2	52,3								
A0A803LP61 GRP7	Proteína que contiene el motivo de reconocimiento de ARN (RRM)	RNA	13,9	2	16,11	5,7	278								
Q08187 GRP8	Proteína de unión a ARN rica en glicina, putativa	RNA	82,2	12	16,01	5,7	893								
G5DXK5 ADF4	Factor de despolimerización de actina	Organización celular	25,4	2	15,78	5,4	19								

Número de acceso	Proteína	Categoría funcional	Cobertura	# Péptidos	PM [kDa]	PI	Score Sequest HT	'Mizuki' (Abundancia relativa)				'Golem' (Abundancia relativa)			
								Control	Fod	B1	B1+Fod	Control	Fod	B1	B1+Fod
AT3G17390 MTO3	S-adenosilmetionina sintasa 3	Metabolismo de aminoácidos	14,4	5	43,11	5,9	180								
Q5QRU8 PAL1	Fenilalanina amonio liasa	Metabolismo secundario	10,1	5	77,81	6,3	299								
A0A803KYJ6 AT5G66390.1	Peroxidasa	Redox	12,6	3	37,27	8,5	259								
A0A0K9RJK4	Peroxidasa	Redox	10,4	4	37,12	9,1	260								
A0A803KYJ7	Peroxidasa	Redox	11,6	3	37,10	9,5	262								
ATMDAR2	Proteína que contiene el dominio Pyr Redox 2	Redox	12,7	6	47,13	5,9	579								

Número de acceso	Proteína	Categoría funcional	Cobertura	# Péptidos	PM [kDa]	PI	Score Sequest HT	'Mizuki' (Abundancia relativa)				'Golem' (Abundancia relativa)			
								Control	Fod	B1	B1+Fod	Control	Fod	B1	B1+Fod
H9BQP7	Superóxido dismutasa	Redox	25	5	15,14	5,9	774								
A0A1I9TK83 HSC70-1	Proteína de choque térmico 70	Estrés	31,8	21	71,34	5,2	2353								
F2YL83 ACT7	Actina 7	Organización celular	48,8	6	19,09	5,4	421								
G5DWW7 GAMMACA3	Anhidrasa carbónica gama	Metabolismo energético	31.6	5	29,43	6,5	546								
A0A7C9AN11 ASA2	Antranilato sintasa	Metabolismo de aminoácidos	10.0	2	66.87	7.1	21.3								
A0A2Z1Z6A7 TFL1	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina	Desarrollo	19,5	2	19,47	8,8	32								

Número de acceso	Proteína	Categoría funcional	Cobertura	# Péptidos	PM [kDa]	PI	Score Sequest HT	'Mizuki' (Abundancia relativa)				'Golem' (Abundancia relativa)			
								Control	Fod	B1	B1+Fod	Control	Fod	B1	B1+Fod
A0A7C9DQN6 OPR3	12-oxofitodienoato reductasa	Metabolismo de hormonas	10,0	2	42,23	6,3	22,8								
A0A0K9RA29 OPR2	Proteína que contiene el dominio Oxireded_FMN	Metabolismo de hormonas	28,1	4	44,27	8,1	203								
A0A7C9DYY4 AT1G67280.1	Lactoilglutación liasa	Metabolismo secundario	10,0	2	32,47	5,6	76								
A0A0K9R796 RAN1	Proteína nuclear de unión a GTP Ran-1 (proteína G)	Señalización	22,1	4	25,22	6,7	91								
AT3G45640.1 MPK3	Proteína quinasa activada por mitógeno	Señalización	10	3	45,14	5,8	41								
A0A0K9RD46 APX	L ascorbato peroxidasa	Redox	14,8	2	27,48	5,8	14								

❖ *Proteínas relacionadas con la homeóstasis redox de la planta*

Las proteínas relacionadas con la homeóstasis redox se acumularon principalmente en los tratamientos con aplicación del agente inductor, destacando a las enzimas de la familia de las peroxidasas (POD). Se ha reportado que las POD son esenciales para la activación de especies reactivas de oxígeno durante la inmunidad desencadenada por PAMP (PTI), y además se conoce que su acumulación es de las primeras respuestas de defensa de la planta ante el reto con un patógeno, ya que tiene un papel preponderante en el reforzamiento de la pared celular y la tolerancia al estrés oxidativo que la interacción genera (Abdul Hasseb et al., 2022). A partir de los resultados encontrados, se encontró que la inoculación con *Fod* aumentó la expresión de una peroxidasa en el cultivar susceptible 'Mizuki' (SM), mientras que en el cultivar resistente 'Golem' (RG) no hubo diferencias significativas. En contraste, la aplicación de tiamina aumentó la expresión de 3 peroxidasas en SM y una en RG, que también se vieron aumentadas en el tratamiento con inductor y posteriormente inoculado. Este hallazgo permite sugerir que las enzimas de la familia de las peroxidasas podrían ser importantes en el mecanismo de inducción de resistencia por la aplicación de tiamina en el clavel, y particularmente en el cultivar susceptible, teniendo en cuenta que se ha reportado que la peroxidasa clase III ha sido relacionada con la resistencia a *Fod* a nivel bioquímico y molecular en una variedad resistente de clavel (Ardila, et al., 2014)

Además, las otras proteínas relacionadas con la actividad de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la homeóstasis redox de la célula, fueron relevantes en la inducción de resistencia por la aplicación de tiamina, teniendo en cuenta que en SM por la inoculación con *Fod* aumentaron dos proteínas de esta categoría mientras que en B1 fueron 4 proteínas y en B1+ *Fod* 5 proteínas. Igual caso se observa en RG, donde por la inoculación con *Fod* aumentó 1 proteína mientras que en B1 fueron 5 y en el tratamiento B1 + *Fod* fueron 7 proteínas. Es interesante que de estas proteínas en RG la mayoría están implicadas en el ciclo ascorbato-glutación (dos ascorbato peroxidasas y una monodehidroascorbato reductasa), del cual se ha evidenciado desempeña un papel fundamental en la estrategia de respuesta de las células vegetales a la infección con patógenos en relación con la actividad antioxidante, y los procesos de señalización redox y la regulación de la expresión génica de defensa (Kuźniak, 2010). Mientras que en M-S se identificaron 3 enzimas de la familia de las peroxidasas y una enzima superóxido dismutasa (SOD). Se ha reportado que el aumento de la actividad de SOD está

correlacionado con la resistencia en plantas de cebada al patógeno hemibiotrófico *Pyrenophora teres* (Lightfoot et al., 2017), lo cual puede ser un indicio de una posible inducción de resistencia por aplicación de tiamina en el clavel.

❖ *Proteínas relacionadas con la patogénesis*

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) son componentes del sistema de inmunidad innato en las plantas, que se expresan y acumulan en procesos de inducción de resistencia local y de resistencia sistémica adquirida (Poór et al., 2019). Las PR desempeñan un papel importante en la defensa de las plantas contra los patógenos. Se subdividen en diferentes familias, de las cuales en este estudio se encontraron las peroxidasas clase III (PR-9), que ya se discutieron previamente, y la proteína de transporte de lípidos (LTP3) (PR-14). LTP3 está asociada a tolerancia a diferentes tipos de estrés tanto abióticos como bióticos, de acuerdo con estudios transcripcionales y de sobreexpresión en mutantes a través de la activación de procesos de resistencia sistémica adquirida (siendo regulador de la expresión de ácido salicílico, y actuando como transportador de señales de larga distancia de SAR, mediado por MPK3) y como inhibidora del crecimiento de hongos y bacterias (Finkina et al., 2017; Gao, Ma, Ji, Pan, & Zhou, 2022). Las LTP se encuentran generalmente asociadas a la pared celular y podrían también relacionarse con el transporte de los monómeros necesarios para la formación de ceras y cutículas que servirán como barrera contra los patógenos, manteniendo la integridad de la célula (Gao, Ma, Ji, Pan, & Zhou, 2022; Jia et al., 2020). De acuerdo con los resultados, aunque la proteína está presente en los dos cultivares en los tratamientos inoculados, hay un aumento significativo en la acumulación de estas por efecto de la aplicación de la tiamina en mayor cantidad en el cultivar SM.

❖ *Proteínas relacionadas con procesos de señalización*

Las proteínas relacionadas con los procesos de señalización como MAPKinasas 3 (MPK3) y 14-3-3 se acumularon en respuesta a la aplicación de tiamina en SMC y RGC. La vía de señalización que involucra esta MAPK tiene un papel importante en la respuesta de PTI de la planta a través de varias formas; induce genes relacionados con la inmunidad de las plantas aguas abajo, regula la síntesis de fitoalexinas de las plantas, interviene en el engrosamiento de la pared celular, activa la hipersensibilidad de las plantas, promueve el cierre de estomas y participa en la síntesis de hormonas relacionadas con la resistencia a

enfermedades de las plantas (Lin Li et al., 2022; Pastor-Fernández et al., 2022; Xie et al., 2022). Al igual que la tiamina, otros inductores han evidenciado señalización con MAPK, Se ha reportado que el aumento en la fosforilación de MAPK es parte de los elementos de señalización desencadenados por la aplicación del inductor de resistencia sistemina después de unirse a su receptor de membrana en las plantas de tomate (Pastor-Fernández et al., 2022), por la aplicación de melatonina en plantas de lirio contra *Botrytis elliptica* (Xie et al., 2022).

Por otro lado, en los dos cultivares se presentaron aumentos significativos en proteínas de señalización tipo 14-3-3 (dos en SM y una en RG) que no se detectaron en los controles. Estas proteínas se han reportado en diferentes eventos fisiológicos, incluido el estrés, evento en que se sugiere que se unen a efectores secretados por patógenos, actuando principalmente como receptor de toxinas producidas por hongos (Castillejo et al., 2020). Además, se ha indicado que tienen un papel importante en la señalización de las vías de transducción de hormonas (Camoni et al., 2018), destacando a la hormona ácido salicílico y su papel en la señalización de SAR. Se reporta que plantas de arroz transgénicas con el gen NPR1 de *A. thaliana* (atNPR1 – biomarcador de SAR), aumentan su resistencia al hongo *Rhizoctonia solani*, y dentro de las respuestas que se destacan a nivel de proteínas es el aumento en una proteína 14-3-3 (Karmakar et al., 2019). Mientras que, por doble híbrido de levadura se encontró que proteínas 14-3-3 interactúan con el producto del gen RPW8.2 de *A. thaliana*, un receptor R que media la resistencia dependiente de ácido salicílico contra hongos patógenos biotróficos de la familia *Golovinomyces*, encontrando que una línea de sobreexpresión respectiva muestra muerte celular similar a HR y resistencia mejorada (Camoni et al., 2018; Lozano-Durán & Robatzek, 2015). Además, también se ha encontrado que efectores de diferentes patógenos tienen como blanco proteínas de tipo 14-3-3, encontrando que la interacción causó promoción de la virulencia en *A. thaliana*, tabaco y tomate, y supresión de ETI en tomate (Lozano-Durán & Robatzek, 2015), lo cual resalta el importante papel de este tipo de proteínas en eventos de resistencia a patógenos.

En el análisis de interacción de las proteínas moduladas positivamente por la aplicación de tiamina en SM (Figura 3-6C), se encuentra que estas proteínas interactúan con la proteína de choque térmico 90 HSP90 (CR88 en la figura), que a su vez interactúa con la

proteína de choque térmico 70 (BiP2 en la figura), proteínas relacionadas con estrés y defensa, las cuales se analizan a continuación.

❖ *Proteínas relacionadas con respuesta a estrés y defensa*

La aplicación de tiamina reguló al alza las proteínas HSP90, BiP1 y BiP2 en el cultivar SM. Esta familia de proteínas hacen parte del mecanismo de señalización intracelular de respuesta de proteínas no plegadas (UPR), que tiene como tarea restaurar la función y mantener la homeóstasis en el retículo endoplasmático (RE), en respuesta a diferentes tipos de estrés que acumulan proteínas desplegadas en el lumen del RE (Manghwar & Li, 2022; Poór et al., 2019). En ese sentido están implicadas en el plegamiento de proteínas y sirven como chaperonas moleculares en las células para evitar que la planta sufra reacciones adversas a causa de los niveles de ROS en la célula.

Se ha reportado que la HSP90 es uno de los múltiples componentes genéticos necesarios para la inmunidad mediada por NLR (proteína con dominio de unión a nucleótidos y repetición rica en leucina), el cual es un tipo de receptor PRR en la activación de la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Ngou et al., 2022). Por otro lado, las proteínas BiP1/2 (HSP70), se han reportado también como activadores de la inmunidad innata en plantas y además como promotores en el establecimiento de SAR mediada por ácido salicílico el cual tiene un papel en la inducción de varios genes codificantes de chaperonas, como BiP2 y BiP3 en *A. thaliana* (Carvalho et al., 2014; Poór et al., 2019). Estudios en plantas de *A. thaliana* tratadas con análogos de ácido salicílico como inductores de resistencia y con silenciamiento de BiP2, han encontrado una atenuación en la secreción de PR1, un marcador de SAR, teniendo como efecto una reducción en la resistencia contra patógenos bacterianos, mientras que la sobreexpresión de BiP indujo la señalización de muerte celular mediada por NRP (*N-rich protein*), activado por la señalización del ácido salicílico (Carvalho et al., 2014; Verchot & Pajeroska-Mukhtar, 2021).

Las proteínas de choque térmico se han asociado a la resistencia al hongo *Alternaria alternata* en tomate en un cultivar resistente comparada con un cultivar susceptible (Sadeghi et al., 2022), y en uva contra el oomiceto *Plasmopara vitícola* con la adición de un inductor de resistencia (Lemaître-Guillier et al., 2017). En el clavel se encontró que estas proteínas interactúan con los grupos funcionales mayoritarios como biosíntesis de proteínas, metabolismo energético y homeóstasis Redox tanto en el tratamiento B1

(Figura 3-6C), como en el tratamiento B1 + *Fod* (Figura 3-6D), lo cual sugiere que estas proteínas podrían ser importantes en la inducción de resistencia debida a la aplicación de tiamina en el cultivar susceptible, y además que podría estar mediado por la hormona ácido salicílico teniendo en cuenta los reportes analizados para esta familia de proteínas.

❖ *Proteínas relacionadas con la regulación de la transcripción*

En el análisis realizado se encontró que dos proteínas de unión a ARN ricas en glicina (GRP) se modularon por la aplicación de tiamina (tratamiento B1). Una proteína homóloga de GRP7 aumentó por la aplicación del inductor de manera significativa en comparación con los demás tratamientos en el cultivar SM; mientras que GRP8 aumentó significativamente respecto al control en los tratamientos B1 y B1 + *Fod* en el cultivar SM y en el tratamiento B1 + *Fod* en el cultivar RG. La familia de proteínas GRP, y en particular GRP7, son proteínas vegetales altamente conservadas involucradas en el procesamiento del ARN y están implicadas tanto en respuestas tempranas como tardías de PTI (Sukarta et al., 2022) y en la resistencia sistémica inducida por ácido salicílico (Lin et al., 2020). En lirio se encontró que en plantas silenciadas en GRP1, se redujo la deposición de calosa y la acumulación temprana de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta al reto con el hongo *Botrytis elliptica* lo que aumenta la susceptibilidad de la planta y reduce la activación de defensa desencadenada por el patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) (PTI). Por el contrario, plantas de *A. thaliana* con el gen GRP1 de lirio tuvieron un efecto contrastante aumentando la deposición de calosa, y activando la PTI, demostrando que GRP es importante en la resistencia al hongo (Lin et al., 2020).

Por otro lado, Wang y colaboradores encontraron por ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H) que tanto GRP7 como GRP8 interactúan con FERONINA (FER), un receptor-like kinasa (RLK) objetivo potencial para la mejora y protección de cultivos debido a sus funciones en la respuesta a múltiples tipos de estrés, que a su vez interactúa con el factor de alcalinización rápida (RALF1). Esta vía de interacción desencadena cambios rápidos y globales en los programas de empalme alternativo del RNA modulando el transcriptoma de la planta en respuesta a diferentes estímulos (Long Wang et al., 2020). El papel de esta vía en la respuesta de la planta es importante en la respuesta a patógenos, tanto así que se ha reportado que *Fusarium oxysporum* secreta péptidos F-RALF que secuestran la vía

RALF-FERGRP7, lo que facilita potencialmente la infección del huésped (Zhang et al., 2020).

También se reporta que GRP7 está asociada a la inmunidad desencadenada por efectores. Sukarta y colaboradores reportan evidencia molecular de que GRP7 de tabaco es un componente proinmunidad en las respuestas inmunitarias inducidas por los efectores Gpa2 y Rx1, proteínas de resistencia de tipo NB-LRR (Proteína con Dominio de Unión a Nucleótidos y Repetición Rica en Leucina). En esta función es clave la unión de GRP7 a ARN, ya que una mutación en el motivo de reconocimiento de ARN (RMN) de la proteína, compromete la inmunidad por ETI en tabaco (Sukarta et al., 2022). En ese sentido, el aumento encontrado en GRP por la aplicación de tiamina podría asociarse a una mejor respuesta al patógeno teniendo en cuenta estos estudios previos.

❖ Respuesta de defensa en el citoesqueleto vegetal y procesos de transporte

En la categoría de organización celular, se encuentra que diferentes proteínas de la familia de las actinas o relacionadas con esta, se modulan por respuesta de los tratamientos analizados. Tres actinas que no se detectaron en el tratamiento *Fod*, se modulan positivamente por aplicación de tiamina en el cultivar SM. Una actina en el tratamiento B1, β -actina 1 en el tratamiento B1 + *Fod*, y actina 1 en los dos tratamientos. Se ha demostrado que durante la interacción con patógenos hay una regulación de la dinámica de los filamentos de actina que incluye efectores del patógeno que tienen como objetivo afectar el citoesqueleto, el cual se remodela rápidamente al detectar ataques de patógenos, coordinando una respuesta compleja que incluye regulación en la producción de ROS, movimiento y reorganización de organelos, el transporte de compuestos de defensa y activación de vías de señalización del ácido salicílico (J. Wang et al., 2022). Al respecto se ha reportado que la acción de BIK1 y BAK1 (componentes de la PTI), requieren de una mayor densidad de microfilamentos, que son biosintetizados por proteínas de la familia de las actinas (Lin Li et al., 2022).

Otra proteína relacionada es el factor de depolimerización de la actina (ADF4), la cual se induce por la aplicación de tiamina en el cultivar susceptible. Esta proteína está encargada de la renovación de microfilamentos de actina y se ha reportado con un rol importante en la percepción de patógenos, la activación de la defensa a nivel de PTI y ETI, la transcripción de genes relacionados con la defensa y la organización del citoesqueleto en *A. thaliana* contra

la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomate DC3000 (Lin Li et al., 2022; Porter et al., 2012; J. Wang et al., 2022). Se reporta que la expresión de una proteína de resistencia (RPS5) decrece en mutantes *adf4*, así como la expresión de FRK1 (Flg22-Induced Receptor Kinase 1), gen de respuesta a la inmunidad activada por PAMP (PTI), y la señalización de MAPK (MAPK3 y MAPK6) (proteína quinasa activada por mitógenos) se reduce significativamente (Porter et al., 2012; Z. Wang et al., 2020).

En la categoría de proteínas relacionadas con el transporte en la célula, se encontró la proteína ABCG40, que está asociada al movimiento de hormonas como el ácido salicílico, el metil jasmonato y el ácido abscísico (Ji et al., 2014), y con el transporte de metabolitos glicosilados (Banasiak et al., 2013; J. Zhao, 2015); y reportada en eventos de resistencia de *A. thaliana* a la bacteria *Pseudomonas syringae*. (J. Zhao, 2015). La proteína podría tener un papel relevante en la inducción de resistencia en SM, ya que no se encuentra en el control, pero si es inducida por la aplicación de tiamina, así como por el patógeno.

Varias proteínas ABCG juegan un papel en la respuesta al estrés biótico, especialmente de manera no específica, lo que confiere protección contra un amplio grupo de patógenos. Dentro de su función, se describió que los transportadores de cassette de unión a ATP (ABC) están involucrados en el transporte de flavonoides (Banasiak et al., 2013; Lanxiang Wang et al., 2022). Al respecto, se observó que el silenciamiento del gen MtABCG10 en *Medicago truncatula* aumentó la susceptibilidad a la infección por el patógeno radicular *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Este hallazgo sugiere que el transporte de isoflavonoides mediado por la proteína MtABCG10 podría tener un papel fundamental en la defensa de la planta contra patógenos (Banasiak et al., 2013). En el mismo estudio se reportó, además, que la expresión de MtABCG10 fue aumentada por la aplicación de un elicitor fúngico y se asoció a procesos de inducción de resistencia sistémica.

Por otro lado, algunos estudios sugirieron que la glutatión S-transferasa (GST) es importante para el tráfico de vesículas y el transporte de flavonoides mediado por membrana (Lanxiang Wang et al., 2022). GST cataliza la conjugación entre diferentes sustratos con centros electrofílicos y el compuesto nucleofílico glutatión en su forma reducida, siendo esta reacción necesaria para el reconocimiento de los transportadores

celulares (Gullner et al., 2018); no obstante, también se ha sugerido que GST se une físicamente a los flavonoides y actúen como proteínas transportadoras de estos metabolitos, facilitando el transporte de estos compuestos desde el citoplasma a la vacuola. Los flavonoides pueden unirse a GST y luego formar un complejo con la membrana de la vesícula para moverse hacia los alrededores de la vacuola, lo que facilita el transporte a esta mediante transportadores o la fusión con la vacuola central. (J. Zhao, 2015). El papel de GST se ha reportado previamente para la bioestimulación por tiamina, encontrando que se aumentó la transcripción del gen GST en uva demostrando el potencial de tiamina como elicitador (Boubakri et al., 2012).

❖ Proteínas del metabolismo especializado o secundario

En el metabolismo especializado, por la aplicación de tiamina se presentó en SM un aumento en los niveles de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual ha sido ampliamente reportada en eventos de resistencia a patógenos, incluso en la interacción clavel-*Fod*. PAL hace parte de la ruta biosintética de los flavonoides, familia de compuestos que se ha reportado como marcador de resistencia en diferentes interacciones planta patógeno (Ardila et al., 2013; Pérez Mora et al., 2021; Santos-Rodríguez et al., 2021). El aumento en la actividad enzimática de PAL y la modulación de los genes *PAL*, han sido reportados previamente como uno de los efectos más comunes asociados a la aplicación de tiamina como agente inductor de resistencia en plantas. Por ejemplo, en garbanzo contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* la actividad de PAL fue máxima en las plantas expuestas al hongo y tratadas con tiamina microencapsulada (M. Sathiyabama & Indhumathi, 2022). De forma similar, la aplicación de tiamina y posterior exposición al tomate con *P. syringae* desencadenó la expresión del gen *PAL1* (Ahn et al., 2007). El tratamiento con tiamina y la posterior inoculación con nemátodos, aumentaron la transcripción del gen *OsPAL1* en arroz (Huang et al., 2016). Y por último, en plantas de soya contra *Macrophomina phaseolina* se observó también el aumento de la actividad enzimática PAL por la inducción con tiamina (Abdel Monaim, 2011).

Estudios también han demostrado la importancia de PAL en eventos de resistencia sistémica adquirida (SAR), en donde se propone que PAL tiene como una de sus funciones principales la producción de precursores de ácido salicílico (SA) en proceso de resistencia a patógenos. En plantas de tabaco transgénico con supresión de PAL no se desarrolla

SAR, lo cual se relaciona con la reducción de los niveles de ácido salicílico (SA) tanto en las hojas inoculadas como en las no inoculadas con el virus del mosaico del tabaco. Un efecto similar se reporta en plantas de pimiento silenciadas en CaPAL1, que exhibieron una mayor susceptibilidad a la infección por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, se redujo la expresión del gen CaPR1 dependiente de SA, también comprometió la acumulación de SA, el estallido oxidativo y la muerte celular durante la infección, por lo cual CaPAL1 se propone como un regulador positivo de la inmunidad innata de la planta (Kim & Hwang, 2014).

Adicionalmente, la aplicación de tiamina aumentó el contenido de la enzima fosfo-2-dehidro-3-desoxiheptonato aldolasa (DAHP sintasa). Esta enzima hace parte de la ruta del shikimato y cataliza el primero de los 7 pasos en la biosíntesis de corismato. Este compuesto se transforma en antranilato por acción de la enzima antranilato sintasa (ASA2) que también se indujo por la aplicación de tiamina y la inoculación con *Fod*. El antranilato se conjuga en el resto benzoílo formado a partir del cinamato proveniente de la ruta fenilpropanoide (Matern, 1994). Transformaciones posteriores producen la biosíntesis de una amplia gama de compuestos que se han relacionado a resistencia al marchitamiento vascular en variedades resistentes como la diantramida y la diantalexina, (Baayen & Niemann, 1989; Santos-Rodríguez et al., 2021). Por lo tanto, la regulación al alza de la antranilato sintasa puede ser un mecanismo importante para mejorar la defensa de la planta contra el patógeno a nivel de metabolitos. El papel de los metabolitos nitrogenados derivados del ácido antranílico han sido de particular interés en este modelo planta patógeno (Baayen & Niemann, 1989; Higuera, 2001), lo que permite proponer un posible papel en la inducción de resistencia mediante la aplicación foliar de tiamina.

3.4 Conclusiones

La protección contra diferentes patógenos vía inducción de los mecanismos de defensa innatos de la planta aplicando compuestos de bajo costo y seguros ambientalmente como la tiamina, han sido de interés en investigaciones en fitopatología recientemente. Sin embargo, es necesario analizar cada patosistema para evaluar la posible inducción de resistencia y su mecanismo de acción. En esta etapa del estudio se encontró que la tiamina a nivel fenotípico disminuye la incidencia y severidad del marchitamiento vascular causado por *Fod*, mientras que, a nivel de proteínas se encuentra que la aplicación de tiamina promueve cambios en el

perfil de proteínas comparable con la modulación debida a la inoculación con *Fod*, además de otras proteínas relacionadas con eventos de resistencia e inducción de resistencia, como proteínas relacionadas con la homeóstasis redox, el estrés, la defensa, la señalización, y el metabolismo secundario, destacando a las proteínas peroxidasa (PR9), SOD, PAL, ADF4, ABCG-40, LTP3 que corresponde con una PR14, proteínas de choque térmico, proteína 14-3-3, entre otras. Los resultados sugieren que la tiamina promueve una sensibilización mediante un complejo mecanismo que incluye diferentes proteínas, que le permite tanto al cultivar susceptible como al resistente, tener una respuesta más efectiva a nivel inmune al reto con el patógeno en un evento de resistencia inducida, posiblemente del tipo RSA (Resistencia Sistémica Adquirida).

4. Efecto de la aplicación de tiamina y el reto con el patógeno en el perfil de metabolitos de dos cultivares de clavel

Resumen

La metabolómica se ha convertido en una herramienta importante para estudiar los mecanismos bioquímicos implicados en la acción de inductores de resistencia en plantas. En la presente etapa de la investigación, usando herramientas propias de la metabolómica, se estudió el efecto de la aplicación foliar de la tiamina en los perfiles de metabolitos fenólicos en extractos de raíces de clavel. Para ello se realizó un experimento bajo condiciones de invernadero con dos cultivares, evaluando los siguientes tratamientos: control, plantas inoculadas con *Fod*, aplicación foliar de tiamina, y aplicación de tiamina con posterior inoculación de *Fod*. A partir de extractos de las raíces, se realizó un análisis cromatográfico mediante HPLC-DAD-MS, i.e., cromatografía de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y espectrómetro de masas con analizador cuadrupolar simple (Q^s), como una táctica de primera línea para reconocer patrones y seleccionar aquellos metabolitos de tipo fenólico que presentaban diferencias significativas entre tratamientos. Esta exploración se complementó con un segundo análisis mediante HPLC-MS con analizador dual de tipo cuadrupolar con trampa de iones orbital (Q-Orbitrap), el cual permitió enriquecer la anotación, a través de las mediciones de masa exacta, de aquellos metabolitos de interés asociados con la inducción de resistencia. La aplicación de tiamina generó un proceso de sensibilización en las plantas incrementando la abundancia de 6 metabolitos en el cultivar susceptible ('Mizuki') y 21 en el resistente ('Golem'); mientras que la aplicación del inductor y posterior inoculación con *Fod*, incrementó la abundancia de 18 y 29 metabolitos en los cultivares susceptible y resistente, respectivamente. Los metabolitos diferenciales se anotaron a un nivel 3 de identificación, los cuales involucraron metabolitos pertenecientes

a la familia de los flavonoides, algunos glicosilados o metilados, y a compuestos derivados del ácido antranílico, los cuales se han reportado previamente con actividad antioxidante, antifúngica y, además, se han relacionado con resistencia y respuesta de defensa a patógenos en clavel y otros patosistemas. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con tiamina estimula la acumulación de compuestos fenólicos que le permiten a las plantas de clavel aumentar la resistencia frente al patógeno causante del marchitamiento vascular. Estos resultados aportan al conocimiento del uso de tiamina como agente bioestimulante en plantas y a su modo de acción contra patógenos, desde el punto de vista de los metabolitos fenólicos involucrados.

Abstract

Metabolomics has emerged as a vital tool for exploring the biochemical mechanisms underlying the action of resistance inducers in plants. In this stage of our research, metabolomics tools were employed to investigate the effect of foliar application of thiamine on the LC-MS-based profiles of phenolic metabolites in carnation root extracts. The experiment was conducted under greenhouse conditions, involving two cultivars, and various treatments were evaluated: control, *Fod*-inoculated plants, foliar application of thiamine, and thiamine application followed by *Fod* inoculation. Starting from the root extracts, a chromatographic analysis using HPLC-DAD-MS, i.e., high performance chromatography coupled with a photodiode array (PDA) detector and a mass spectrometer with a single quadrupole (Q^s) analyzer, was carried out to pattern recognition and identify phenolic-type metabolites showing significant differences between treatments. Subsequently, a HPLC-MS analysis with dual quadrupole-orbital ion trap (Q-Orbitrap) analyzer led to enhance the annotation, through exact mass measurements, of those metabolites associated with the induction of resistance. Thiamine application induced a sensitization process in the plants, leading to an increase in the abundance of 6 metabolites in the susceptible cultivar ('Mizuki') and 21 metabolites in the resistant one ('Golem'). Furthermore, thiamine application followed by *Fod* inoculation resulted in an increased abundance of 18 and 29 metabolites in the susceptible and resistant cultivars, respectively. These metabolites were annotated at level 3, comprising glycosylated or methylated flavonoids, as well as compounds derived from anthranilic acid. These metabolites have previously been reported for their antioxidant and antifungal activities, and they are linked to resistance and defense responses against pathogens in carnation and

other pathosystems. The results strongly suggest that thiamine treatment stimulates the accumulation of certain phenolic compounds, empowering carnation plants to enhance their resistance against the causal pathogen of vascular wilt. These findings significantly contribute to our understanding of thiamine as a potent bio-stimulant agent in plants and shed light on its mode of action against pathogens, particularly through the regulation and involvement of specific phenolic metabolites.

4.1 Introducción

Las plantas se defienden contra los patógenos con una respuesta inmune que presenta varios niveles; estos incluyen barreras físicas estructurales y una respuesta inducida por el reconocimiento del patógeno. Esta respuesta puede prevenir o atenuar la invasión de posibles atacantes. Sin embargo, algunos patógenos pueden superar estas defensas y causar daños a las plantas. Para combatir estas enfermedades, la industria agrícola ha utilizado agroquímicos; pero estos productos químicos tienen un impacto negativo en el medio ambiente (Mhlongo et al., 2016; Pastor-Fernández et al., 2022). Como alternativa a este método, es actualmente de interés la aplicación de sustancias inductoras de resistencia que estimulan los sistemas de defensa natural de la planta, lo que implica el manejo de su propio sistema inmunológico permitiendo una respuesta de defensa más rápida y fuerte, proceso denominado *priming* (Overbeek et al., 2022).

Los resultados discutidos previamente demostraron que la aplicación foliar de tiamina actúa como bioestimulante en la planta, lo cual disminuye la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en cuatro cultivares susceptibles (Capítulo 2). Además, se encontró que se modulan los contenidos de algunas proteínas en dos cultivares con respuesta contrastante a *Fod* (Capítulo 3), lo que sugiere la activación de este proceso de inducción de resistencia. Estas proteínas moduladas incluyen, entre otras, a las enzimas PAL y antranilato sintasa, que están relacionadas con la producción de metabolitos de tipo fenilpropanoide y alcaloides, lo cual sugiere la activación del metabolismo especializado de la planta, especialmente los de tipo fenólico. Si bien estos metabolitos no son esenciales para el crecimiento, el desarrollo o la reproducción de la planta; son importantes para defenderla y limitar el daño causado por patógenos, actuando como moléculas de señalización, precursores del fortalecimiento de la pared celular, y compuestos antimicrobianos (fitoanticipinas y fitoalexinas) (Mhlongo et al., 2016; Tugizimana et al., 2018).

La infección con patógenos, así como los compuestos bioestimulantes o inductores de resistencia, pueden causar cambios en la producción de metabolitos en las plantas, los cuales pueden ser detectados y cuantificados mediante técnicas cromatográficas. En este contexto, el uso de herramientas de la metabolómica comparativa, han ganado bastante interés en el estudio de las interacciones planta patógeno. Teniendo en cuenta esto, a nivel metabólico en eventos de resistencia inducida, se han reportado como metabolitos implicados en la resistencia a patógenos compuestos terpenoides, benzoatos, flavonoides, alcaloides, glucosinolatos, ácidos grasos, fenilpropanoides, entre otros (Katam et al., 2022; Mhlongo et al., 2016; Overbeek et al., 2022; Shen et al., 2023). Los mecanismos de inducción de resistencia pueden variar de una especie a otra con diferentes resultados para diferentes agentes inductores.

Según la información disponible a la fecha en este modelo planta-patógeno, en los cultivares de clavel resistentes a *Fod* se producen diversos compuestos fenólicos antifúngicos que actúan como potenciales protectores contra la infección del patógeno. Se han reportado componentes fenólicos constitutivos en claveles no infectados, fitoanticipinas, que mostraron actividad en la restricción del desarrollo de patógenos fúngicos como un kaempferido triglicósido (Curir et al., 2001), tres derivados del ácido benzoico, un glucósido flavanol peltatósido, y la flavona datiscetina (Curir et al., 2003); y fitoalexinas derivadas del ácido antranílico como las diantalexinas y diantramidas (Baayen & Niemann, 1989). En un estudio reciente, Romero-Rincón y colaboradores (2021) encontraron un aumento significativo en los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides en el cultivar resistente ('Golem') entre las 48 y 96 horas después de la inoculación, demostrando que los flavonoides predominantes eran glucósidos de flavanol, específicamente agliconas de quercetina y kaempferol, según el análisis por LC-MS. Por otro lado, Martínez y colaboradores (2022) evaluaron a nivel de apoplasto de clavel los niveles de compuestos relacionados con la resistencia a *Fod* en un cultivar resistente, identificando compuestos diferenciales cuyas estructuras básicas incluyen flavonoides del tipo (iso)pradol, kaempférido, kaempferol, quercetina y miricetina. Finalmente, Santos-Rodríguez y colaboradores (2021), estudiaron la respuesta inducida en clavel usando un elicitador de origen biótico proveniente de micelio de *Fod*, encontrando que un cultivar susceptible redujo significativamente el progreso del marchitamiento vascular y

aumentando los niveles de compuestos fenólicos como ácidos benzoicos conjugados, flavonoles glicosilados y derivados de antranilato.

Considerando estos antecedentes, en esta etapa del proyecto, se realizó un análisis con aproximación basada en metabolómica dirigida, para determinar posibles metabolitos de tipo fenólicos implicados en la posible inducción de resistencia por la aplicación de tiamina contra el marchitamiento vascular causado por *Fod* en clavel. El análisis metabolómico en plantas inoculadas y/o elicitadas, puede proporcionar información importante sobre la respuesta del clavel a *Fod*, y el efecto de la aplicación exógena de tiamina. Como se presentará a continuación, esta aproximación experimental permitió estudiar los mecanismos asociados a la posible inducción de resistencia a *Fod* por aplicación de tiamina y el papel que en ellos presentan los compuestos fenólicos.

4.2 Materiales y métodos

En la presente etapa de investigación, se analizaron las diferencias cualitativas y semi-cuantitativas que se presentan a nivel de metabolitos fenólicos en dos cultivares de clavel ('Mizuki' y 'Golem') con diferencias contrastantes en la respuesta al marchitamiento vascular, por efecto de la interacción con *Fod*, la aplicación de tiamina y el efecto combinado. La determinación de estas diferencias metabólicas se realizó inicialmente por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detectores DAD y de espectrometría de masas con analizador cuadrupolar simple (Q^s) (HPLC-DAD-MS). El procedimiento general para la obtención e interpretación de los resultados se describe a continuación:

- Obtención del material biológico mediante un ensayo *in vivo*.
- Extracción de los metabolitos de las muestras biológicas.
- Análisis instrumental usando HPLC-DAD-MS con analizador Q^s y HPLC-MS con analizador dual cuadrupolo-trampa de iones orbital (Q-Orbitrap).
- Procesamiento de los datos crudos para eliminar ruido y artefactos.
- Análisis estadístico de los datos procesados para el reconocimiento de patrones y la selección de metabolitos que difieren significativamente entre grupos de muestras.
- Asignación de identidades a los metabolitos detectados (proceso de anotación utilizando bases de datos) e interpretación biológica para entender cómo los

cambios en los metabolitos están relacionados con los procesos biológicos de interés.

4.2.1 Material vegetal y microorganismo

La preparación del inóculo del microorganismo, el alistamiento del material vegetal, el tratamiento con el inductor, la inoculación con *Fod* y la obtención de muestras, se siguieron las condiciones reportadas previamente (capítulo 2).

4.2.2 Obtención de la muestra y extracción de metabolitos

Para realizar el análisis metabolómico, de cada réplica y tratamiento, se cosecharon 6 plantas que se procesaron de manera conjunta constituyendo una réplica biológica, a los tiempos 0 y 12, 24, 48 y 96 horas postinoculación.

Los esquejes de cada réplica fueron lavados con agua para eliminar el exceso de sustrato. Se eliminaron las hojas y el tallo; las raíces fueron almacenadas a -70 °C, para luego liofilizar durante 48 horas. El tejido liofilizado, fue macerado en presencia de nitrógeno líquido y posteriormente almacenado en microtubos (Eppendorff ®) que se conservaron a -20 °C, hasta el momento de su análisis.

❖ Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides

La extracción de compuestos fenólicos y flavonoides se realizó con base en lo descrito previamente en el grupo de investigación (Pérez Mora et al., 2021). Para cada tratamiento, se pesaron 20 mg (peso seco) de raíces de clavel previamente liofilizadas y trituradas con nitrógeno líquido, y se adicionó 1 mL de metanol. Se realizó una extracción asistida por ultrasonido (42 Hz y 100 W) durante 15 minutos. Se centrifugó a 12000 g, durante 15 min y 4°C, y el sobrenadante se almacenó en oscuridad a -70 °C para su posterior análisis.

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu y el contenido total de compuestos flavonoides por el método del tricloruro de aluminio de acuerdo con lo descrito previamente en el capítulo 2 (Martínez-González et al., 2022; Pérez Mora et al., 2021). Para el análisis por cromatografía, el disolvente residual de los extractos se evaporó con un concentrador de vacío – SpeedVac™. El

extracto seco obtenido se resuspendió en 200 μL de una mezcla acetonitrilo/metanol/agua (1:1:12 v/v/v) y se filtró a través de una membrana PTFE (politetrafluoroetileno) de 0,2 μm y se colectó en un vial color ámbar. Cada tratamiento incluyó tres repeticiones biológicas.

4.2.3 Análisis de metabolitos

Cada extracto fue analizado por medio de un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia de fase reversa acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray y analizador cuadrupolar simple (RP-HPLC-PDA-ESI-MS), usando un equipo Shimadzu Prominence LCMS2020 del laboratorio de Química Bioorgánica de la Universidad Militar Nueva Granada (Cajicá, Cundinamarca). Para la separación de los componentes del extracto de metabolitos se empleó una columna Phenomenex Luna C-18 (4,6 x 150 mm, 5 μm partícula). Se usaron dos fases móviles de acuerdo con lo reportado previamente (Fase A: ácido fórmico 1% en agua; Fase B: ácido fórmico 1% en acetonitrilo) (Romero-Rincón et al., 2021; Santos-rodríguez et al., 2021). El flujo fue de 0,7 mL/min y la temperatura de la columna fue 35 °C. Para el análisis cromatográfico se estableció un gradiente de elución de la siguiente manera: 0% de la fase B en los primeros 2 minutos; segundo, un aumento en la proporción de B del 0 al 60% hasta el minuto 25; tercero, 60% de B hasta el minuto 27; cuarto, un aumento en la proporción de B del 60 al 100% hasta el minuto 33; Quinto, 100% de la fase B hasta el minuto 37; sexto, una disminución de B del 100 % al 0% hasta el minuto 41, y finalmente 0% de la fase B hasta el minuto 44. La detección de los metabolitos se hizo en el espectrómetro de masas a un voltaje de 0,3 kV, simultáneamente en modo negativo y positivo, en un rango de 150-1200 relación masa/carga (m/z). Así mismo, con el fin de enriquecer la anotación de los metabolitos diferenciales a través de medidas de masa exacta (monoisotópica), el análisis espectral se extendió al registro de perfiles metabólicos mediante un cromatógrafo Vanquish UHPLC (Thermo Scientific™) con un analizador de masas dual de alta resolución (HRMS) Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Scientific™), a un voltaje de 0,3 kV en modo positivo, en un rango de 150-1200 m/z , utilizando las misma columna y condiciones de elución mencionadas.

4.2.4 Procesamiento de datos y análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado para examinar el comportamiento de los perfiles metabólicos dependiendo de los tratamientos en comparación con el grupo control fue de tipo multivariado, empleando una regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (PLS-DA). Para ello, en primera instancia, se registraron perfiles en modo de detección dual por HPLC-PDA-MS, dado que la detección por absorción ultravioleta (UV) permitió filtrar y garantizar señales que absorben a 270 nm, lo cual corresponde a una absorción típica de compuestos fenólicos (Santos-Rodríguez et al., 2021) y, una vez filtrados, se exportaron las áreas bajo la curva (abundancia) de cada señal m/z que quedó registrada en cada uno de los cromatogramas de iones totales (TIC), los cuales se tomaron como rasgos espectrales (i.e., *features*) para asociarse a la detección de un metabolito. Tales valores de abundancia, ligados a sus respectivos pares tiempo de retención(t_R)- m/z , se obtuvieron mediante el procesamiento de todos los TIC crudos utilizando el software MzMine 2.53, que incluyó los pasos de normalización, detección de señales, deconvolución, deisotopización, filtrado, alineación y *gap-filling* (Pluskal et al., 2010). A partir de ese procesamiento, se construyó una matriz de datos en la que las observaciones correspondían a las diferentes muestras y las variables a las áreas de los metabolitos detectados. De esta manera, se generó un archivo en formato .csv con los resultados del procesamiento de las áreas de cada metabolito, la cual se terminó de depurar manualmente eliminando ruido y señales repetidas. La matriz de metabolitos se cargó en la plataforma de MetaboAnalyst 5.0, una herramienta en línea para análisis de datos metabolómicos (<http://www.metaboanalyst.ca>). Antes de llevar a cabo el análisis estadístico, se realizó un pre-procesamiento de los datos que incluyó la normalización de las señales en las muestras respecto a la suma total para compensar las diferencias entre muestras, y el autoescalado de los datos para lograr que las características individuales sean más comparables y para reducir la influencia de metabolitos con alta varianza. Este pre-procesamiento es esencial para garantizar la precisión y confiabilidad del análisis estadístico posterior (Romero-Rincón 2020).

Las señales que fueron clasificadas con mayor influencia en la discriminación, según los diagramas de carga (*loadings plots*) luego del análisis PLS-DA, y las señales que presentaron diferencias significativas en la comparación de cada tratamiento contra el control a partir de la herramienta gráfica de análisis *volcano plot* ($-\log_{10}(p\text{-valor})$ vs.

$\log_2\text{FoldChange}$), fueron anotadas de acuerdo con los valores de m/z obtenidos de los respectivos espectros de masas de alta resolución como mediciones de masa monoisotópica.

4.2.5 Anotación de metabolitos

La anotación de las señales se realizó a nivel 3 de acuerdo con los parámetros para comunicar la identidad de metabolitos analizados por HRMS de la Metabolomics Standard Initiative (MSI) (Schymanski et al., 2014). El proceso de anotación de señales se inició con la determinación de la fórmula molecular a partir de la masa exacta asociada al valor m/z del ión *quasi*-molecular en modo positivo ($[M+H]^+$), obtenidos de los espectros de masas de alta resolución, utilizando la herramienta ChemCalc (<https://www.chemcalc.org/>). La estimación de los errores más bajos (en ppm), soportado de filtrado filogenético y comportamiento cromatográfico, y posteriormente, bajo comparación con el diccionario de productos naturales (<http://dnp.chemnetbase.com>), las bases de datos online KNApSACk (<http://www.knapsackfamily.com>), chEBI (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>) y PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), permitió la correspondiente anotación de cada metabolito.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Efecto en el contenido total de fenoles y flavonoides de la raíz del clavel

Los datos presentados en las figuras 4-1 y 4-2 muestran el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides, respectivamente, en dos cultivares de clavel, Resistente-‘Golem’ (RG) (Figuras 4-1A y 4-2A) y Susceptible-‘Mizuki’ (SM) (Figura 4-1B y 4-2B), que difieren en su resistencia al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. El tiempo de muestreo cero horas postinoculación (que corresponde a 120 horas postelicitación), muestra que la aplicación de tiamina causa un aumento, tanto en el contenido de compuestos fenólicos, como en el contenido de flavonoides previo a la inoculación, tanto en RG como en SM, encontrando los niveles más altos para la variedad resistente, lo cual puede estar relacionado con la respuesta contrastante a *Fod*, teniendo en cuenta los reportes previos que indican que los niveles de flavonoides están relacionados con la respuesta a

patógenos (Ardila 2013; Boubakri et al., 2012; Romero-Rincón et al., 2021; Santos-Rodríguez et al., 2021).

Después de la inoculación, se observó una disminución en los niveles de ambos compuestos en RG debido a la infección por *Fod*, en comparación con el control. Sin embargo, la aplicación de tiamina dependiendo del tiempo postinoculación, mantuvo los niveles de flavonoides en el tratamiento B1 + *Fod* en ambos cultivares en comparación con el control. Esto sugiere que el inductor de resistencia tiene un efecto regulador positivo sobre los niveles de estos compuestos, lo cual podría estar relacionado con la respuesta fenotípica observada en las plantas.

En vista de estos resultados, se llevó a cabo un análisis de metabolómica comparativa (perfilado metabólico) con el fin de estudiar aquellos compuestos fenólicos, que podrían estar implicados en el fenómeno de inducción de resistencia por la aplicación de tiamina.

Figura 4-1: Contenido total de compuestos fenólicos en cultivares de clavel con niveles de resistencia contrastantes al marchitamiento vascular causado por *Fod* (Susceptible-'Mizuki' y Resistente-'Golem').

B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=3$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0,05$).

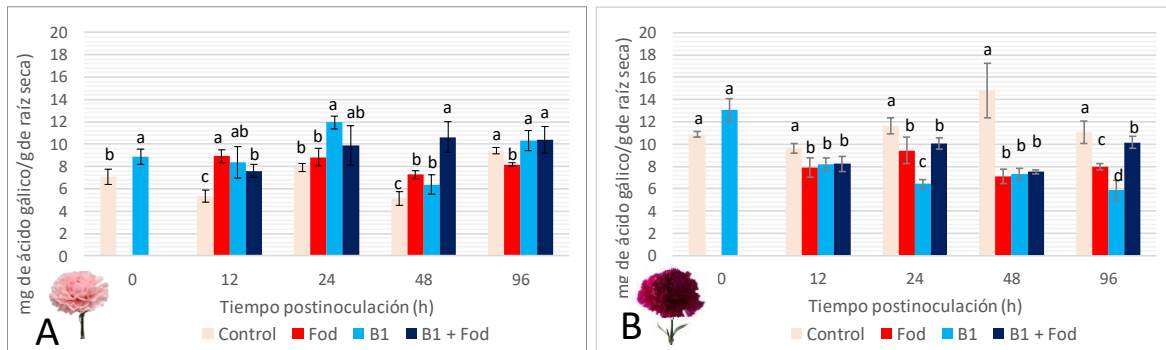
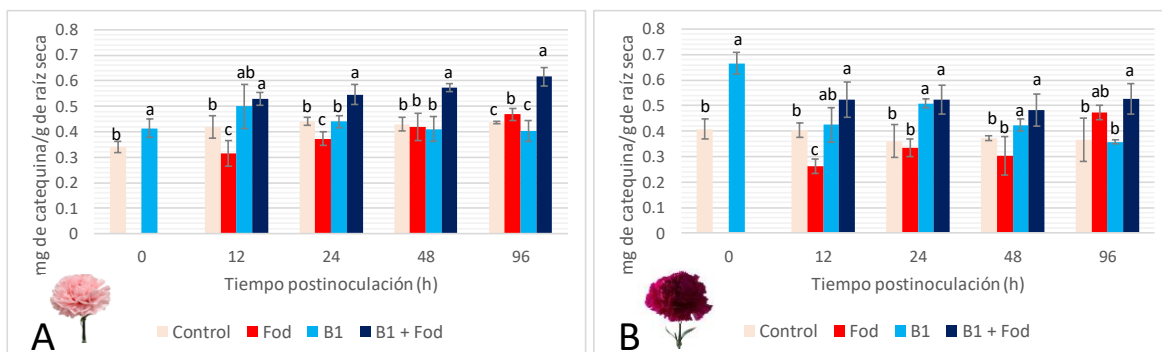


Figura 4-2: Contenido total de flavonoides en cultivares de clavel con niveles de resistencia contrastantes al marchitamiento vascular causado por *Fod* (Susceptible-'Mizuki' y Resistente-'Golem').

B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para un $n=3$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0,05$).

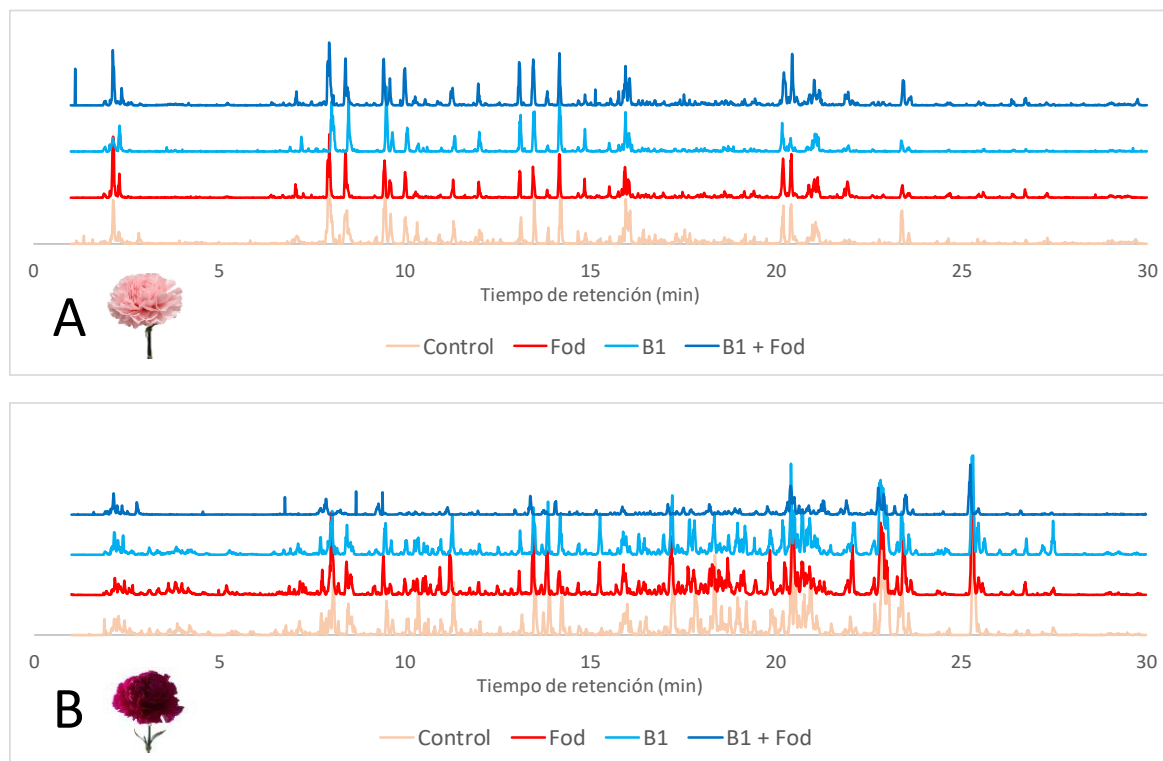


4.3.2 Efecto en los perfiles de metabolitos fenólicos de la raíz de clavel

Con el fin de explorar los cambios mediante perfilado metabólico, se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los metabolitos fenólicos presentes en estos extractos de raíces de clavel en los diferentes tratamientos aplicados a los cultivares SM (Figura 4-3A) y RG (Figura 4-3B). Para ello se usaron las condiciones de análisis previamente aplicadas por nuestro equipo de trabajo y que permiten hacer un seguimiento de compuestos fenólicos mediante el seguimiento de los perfiles bajo absorción al ultravioleta (270nm) y tiempos de retención de compuestos previamente reportados; esas condiciones han permitido realizar diversas publicaciones en revistas especializadas (Martínez-González et al., 2022; Romero-Rincón et al., 2021; Santos-Rodríguez et al., 2021). Los cromatogramas de los diversos extractos mostraron diferencias entre tratamientos comparando contra el control, lo cual es indicativo de que la inoculación, la aplicación de tiamina, y la combinación de los tratamientos anteriores, causaron una alteración del metabolismo especializado, dando como resultado cambios metabólicos que se pueden analizar estadísticamente con el fin de estudiar el fenómeno biológico objeto de estudio.

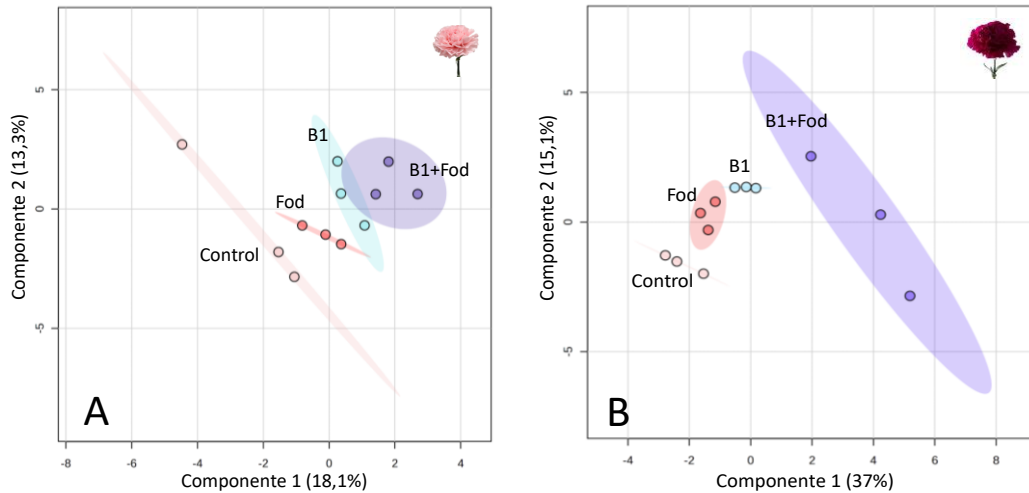
Figura 4-3: Perfiles cromatográficos de iones totales (TIC) de los extractos metanólicos de raíces de clavel: A: cultivar susceptible – ‘Mizuki’ (SM) 48 hpi; B: cultivar resistente – ‘Golem’ (RG)96 hpi.

B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*. La distancia observada entre muestras en el espacio de las componentes refleja similitud entre los perfiles de abundancia de metabolitos. En las figuras solo se presenta una réplica de los tratamientos.



A partir de los perfiles de metabolitos detectados se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), que evidenció una clara separación de los grupos en el gráfico de dispersión en función de los tratamientos aplicados en el cultivar susceptible - 'Mizuki' (Figura 4-4A) y el cultivar resistente - 'Golem' (Figura 4-4B). Esto corrobora que existe una diferencia en el perfil de metabolitos para cada tratamiento en comparación con el control que podría estar relacionada con la respuesta fenotípica observada. La identificación de estos metabolitos diferenciales podría proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de respuesta asociados con el efecto que tiene cada tratamiento en el clavel.

Figura 4-4: Análisis discriminante de los metabolitos de naturaleza fenólica detectados por medio de cromatografía líquida de alta resolución que evaluó el efecto de los diferentes tratamientos: A: cultivar susceptible - 'Mizuki' (SM); B: cultivar resistente - 'Golem' (RG). B1: aplicación de tiamina; *Fod*: inoculación con *Fod*; B1+ *Fod*: aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod*. La distancia observada entre muestras en el espacio de las componentes refleja similitud entre los perfiles de abundancia de metabolitos.



Esta diferencia en los perfiles es debida a los metabolitos que se encuentran regulados por efecto del tratamiento particular. Aquellos metabolitos con diferencias estadísticas se seleccionaron a partir de un análisis univariado empleando una visualización intuitiva a través de un gráfico volcán (*volcano plot*) en el cual se comparó cada tratamiento contra el control. Para su construcción, se realizó primero un análisis estadístico de *t-student* ($p \leq 0.1$); segundo, se calculó la tasa de cambio (*fold change* (FC)) para las abundancias relativas de cada metabolito; y finalmente, se relacionaron en un gráfico con \log_2FC en el eje x, y $-\log_{10}(p\text{-valor})$ en el eje y. La línea de corte para señalar los valores significativos fue de un p-valor de 0,1 y un \log_2FC de 1 (que corresponde a un FC de 2, para los metabolitos que aumentaron), o -1 (que corresponde a un FC de 0,5 para los metabolitos que disminuyeron). Las variables que están por encima de la línea de corte son las que tienen una significancia estadística y biológica en la comparación entre los grupos.

De acuerdo con esto, se encontró que los tiempos a los cuales los perfiles de metabolitos presentan mayores diferencias en los tratamientos comparados con el control son 48 y 96 horas (tablas 4-1 y 4-2). Particularmente, el cultivar susceptible – ‘Mizuki’ presenta la mayor cantidad de cambios a las 48 horas y el cultivar resistente – ‘Golem’ a las 96 horas. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente para el modelo clavel-*Fod*, en el que la bioestimulación con un elicitador de origen biótico acumuló mayoritariamente metabolitos en los mismos tiempos encontrados en este trabajo para los mismos cultivares (Romero Rincón, 2020). Teniendo en cuenta esto, los análisis posteriores se presentarán a estos tiempos de acumulación mayoritaria de metabolitos.

Tabla 4-1: Metabolitos regulados en los diferentes tratamientos a dos tiempos de análisis en el cultivar susceptible – ‘Mizuki’ (SM).

(*Fod*: tratamientos con aplicación del inóculo de *F. oxysporum*; B1: tratamientos con aplicación de tiamina; B1 + *Fod*: tratamientos con aplicación de tiamina y posteriormente inoculado con *F. oxysporum*); ↑ = número de metabolitos que aumentaron su abundancia en la comparación; ↓ = número de metabolitos que disminuyeron su abundancia en la comparación.

Tiempo	<i>Fod</i> /Control		B1/Control		B1 + <i>Fod</i> /Control	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓
48 horas	12	8	6	7	18	9
96 horas	8	9	5	7	10	12

Tabla 4-2: Metabolitos regulados en los diferentes tratamientos a dos tiempos de análisis en el cultivar Resistente – ‘Golem’ (RG).

(*Fod*: tratamientos con aplicación del inóculo de *F. oxysporum*; B1: tratamientos con aplicación de tiamina; B1 + *Fod*: tratamientos con aplicación de tiamina y posteriormente inoculado con *F. oxysporum*); ↑ = número de metabolitos que aumentaron su abundancia en la comparación; ↓ = número de metabolitos que disminuyeron su abundancia en la comparación.

Tiempo	<i>Fod</i> /Control		B1/Control		B1 + <i>Fod</i> /Control	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓
48 horas	19	6	6	1	26	20
96 horas	16	10	21	8	29	33

El estudio comparativo de las abundancias relativas de metabolitos regulados de manera significativa por la inoculación con *Fod* y/o la aplicación de tiamina sugiere que se estimulan diversos procesos biológicos cuando las raíces de clavel se exponen a cada tratamiento, y que el tipo de respuesta puede variar cualitativa y cuantitativamente entre los cultivares. Para verificar las masas de los compuestos y así enriquecer la anotación de los metabolitos, se realizó la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución al tiempo 48h para SM y 96 horas para RM.

Una de las limitaciones de la metabolómica vegetal está en la disponibilidad limitada de bases de datos y bibliotecas, con solo alrededor de 50000 metabolitos registrados de 20741 especies en la base de datos de metabolitos de plantas más extensa, KNApSACk (aproximadamente un 5% de los metabolitos estimados en plantas). Además, las bibliotecas públicas de espectros de masas permiten la identificación de miles de metabolitos, que no están específicamente dirigidas a metabolitos de plantas (Katam et al., 2022). Sin embargo, al inspeccionar detalladamente los espectros de masas de los metabolitos que aumentaron significativamente debido a los tratamientos, fue posible

anotar algunos metabolitos con un nivel de identificación tres (candidatos tentativos), según lo propuesto por la *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) (Schymanski et al., 2014). Los resultados se presentan en las tablas 4-3, 4-4, 4-5 y 4.6. Los isómeros (regio y estereoisómeros) correctos quedaron sujetos a confirmación posterior utilizando otra técnica o mediante co-análisis con patrones estandarizados, siguiendo lo sugerido por la MSI. Es interesante comentar que algunos de los compuestos acá presentados, habían sido reportados previamente en nuestro grupo de investigación, bajo estas condiciones de análisis; esto confirma la reproducibilidad de estos análisis en esta especie vegetal.

Tabla 4-3: Anotación de metabolitos que se regulan positivamente respecto al control por efecto de los tratamientos en el cultivar susceptible – ‘Mizuki’ (SM) a las 48 horas.

(*Fod*: tratamiento con aplicación del inóculo de *F. oxysporum*; B1: tratamiento con aplicación de tiamina; B1 + *Fod*: tratamiento con aplicación de tiamina y posteriormente inoculado con *F. oxysporum*).

*Nivel de identificación 3 correspondiente al candidato tentativo (los isómeros (regio y estereoisómeros) correctos quedaron sujetos a confirmación posterior).

	RT	[M+H] ⁺ Masa isotópica Error (ppm)	Anotación*	Fórmula	Control Fod B1 B1+Fod
S1	20,4	331.0797 330.0738 -9,30	di-O-metilquercetina (flavonol metilado)	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	
S2	20,8	821,2114 820,2062 -3,20	quercetina tri-O- acetiramnopiranosil-di-O- acetilgalactopiranosido (flavonol glicosilado)	C ₃₇ H ₄₀ O ₂₁	
S3	20,9	274,0702 273,0637 -4,92	hidroxidiantramida S (derivado del antranilato)	C ₁₄ H ₁₁ NO ₅	

	RT	[M+H] ⁺ Masa isotópica Error (ppm)	Anotación*	Fórmula	Control Fod B1 B1+Fod
S4	19,5	258,0742 257,0688 -9,43	hidroxidiantramida B (derivado del antranilato)	C ₁₄ H ₁₁ NO ₄	
S5	26,3	318,0992 317,0899 4,21	metoxidiantramida M (derivado del antranilato)	C ₁₆ H ₁₅ NO ₆	
S6	25,6	317,0633 316,0583 -8,92	isorhamnetina (flavonol metilado)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	
S7	19,4	329,0909 328,0821 2,93	avenantramida B (derivado del antranilato)	C ₁₇ H ₁₄ NO ₆	
S8	3,6	347,0754 346,0689 -3,72	tetrahidroxi – dimetioxi flavona (flavona)	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	
S9	18,4	536,1136 535,1088 -5,61	kaempferol malonilglucósido (flavonol glicosilado)	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄	

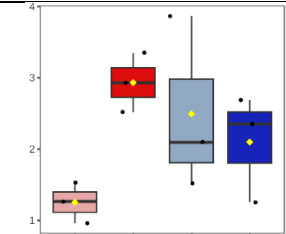
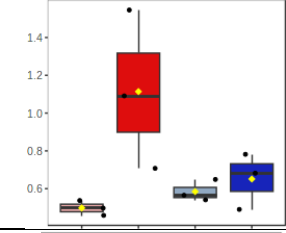
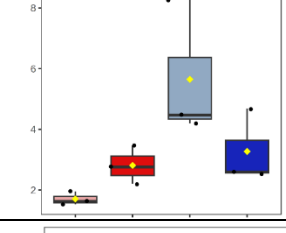
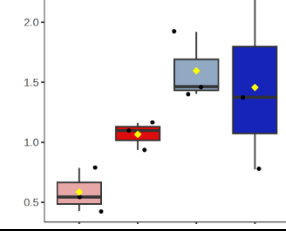
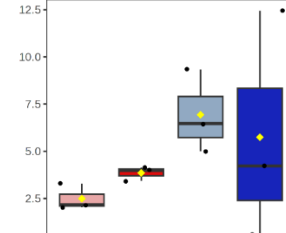
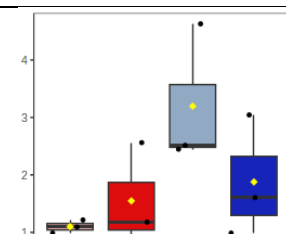
	RT	[M+H] ⁺ Masa isotópica Error (ppm)	Anotación*	Fórmula	Control Fod B1 B1+Fod
S10	19,9	566,1202 565,1194 -2,31	isorhamnetina malonilglucósido) (flavonol metilado y glicosilado)	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₅	
S11	4,1	291.0634 290.0579 -8.02	Pongaroteno	C ₁₈ H ₁₀ O ₄	
S12	23,7	256.0589 255.0532 -8,13	hidroxidiantalexina S (derivado del antranilato)	C ₁₄ H ₉ NO ₄	
S13	22,1	274,0702 273,0637 -4,90	diantramida R (derivado del antranilato)	C ₁₄ H ₁₁ NO ₅	
S14	20,9	503,1529 502,1475 -4,84	di-O-metilkaempferol O- acetilramnósido (flavonol metilado y glicosilado)	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₁	

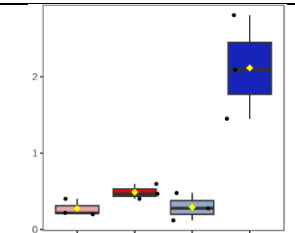
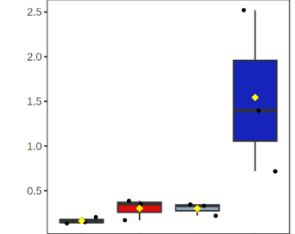
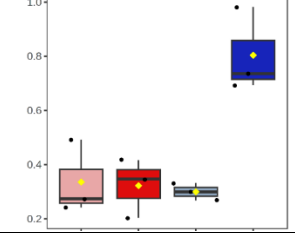
Tabla 4-4: Anotación de metabolitos que se regulan positivamente respecto al control por efecto de los tratamientos en el cultivar resistente – ‘Golem’ a las 96 horas.

(*Fod*: tratamiento con aplicación del inóculo de *F. oxysporum*; B1: tratamiento con aplicación de tiamina; B1 + *Fod*: tratamiento con aplicación de tiamina y posteriormente inoculado con *F. oxysporum*).

*Nivel de identificación 3 correspondiente al candidato tentativo (los isómeros (regio y estereoisómeros) correctos quedaron sujetos a confirmación posterior).

	RT	[M+H] ⁺ Masa isotópica Error (ppm)	Anotación*	Fórmula	Control Fod B1 B1+Fod
R1	20,9	274,0702 273,0637 -4,92	hidroxidiantramida S (derivado del antranilato)	C ₁₄ H ₁₁ NO ₅	
R2	19,9	566,1202 565,1194 -2,31	isorhamnetina malonilglucósido (flavonol metilado y glicosilado)	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₅	
R3	27,4	597.1514 596,1377 9,78	quercetina arabinopiranosil- glucopiránosido] (flavonol glicosilado)	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	
R4	20,1	288,0852 287,0794 -6,93	metoxidiantramida S (derivado del antranilato)	C ₁₅ H ₁₃ NO ₅	
R5	18,4	536,1136 535,1088 -5,61	kaempferol malonilglucósido (flavonol glicosilado)	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄	
R6	7,5	587,1379 586,1323 -3,71	trihidroxi flavanona O- galoilglucósido (flavanona glicosilada)	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₄	

	RT	[M+H] ⁺ Masa isotópica Error (ppm)	Anotación*	Fórmula	Control Fod B1 B1+Fod
R7	22,7	447,1294 446,1213 0,62	metilapigenina glucósido (flavona metilada y glicosilada)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	
R8	20,1	465,1033 464,0955 -8,82	Isoquercetina (flavonol)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	
R9	22,6	240,0643 239,0582 -7,37	diantalexina (derivado del antranilato)	C ₁₄ H ₉ NO ₃	
R10	23,7	256.0589 255.0532 -8,13	hidroxidiantalexina S (derivado del antranilato)	C ₁₄ H ₉ NO ₄	
R11	25,5	287,0527 286,0477 -9,97	kaempferol (flavonol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	
R12	22,9	304,0851 303,0742 9,83	metoxidiantramida R (derivado del antranilato)	C ₁₅ H ₁₃ NO ₆	

	RT	[M+H] ⁺ Masa isotópica Error (ppm)	Anotación*	Fórmula	Control Fod B1 B1+Fod
R13	15,9	290,0640 289,0586 -8,49	hidroxidiantramida R (derivado del antranilato)	C ₁₄ H ₁₁ NO ₆	
R14	23,5	583,1308 582,1221 1,53	miricetina dixilósido (flavonol glicosilado)	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₆	
R15	13,5	611,1638 610,1534 4,24	kaempferol glucósido (flavonol glicosilado)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	

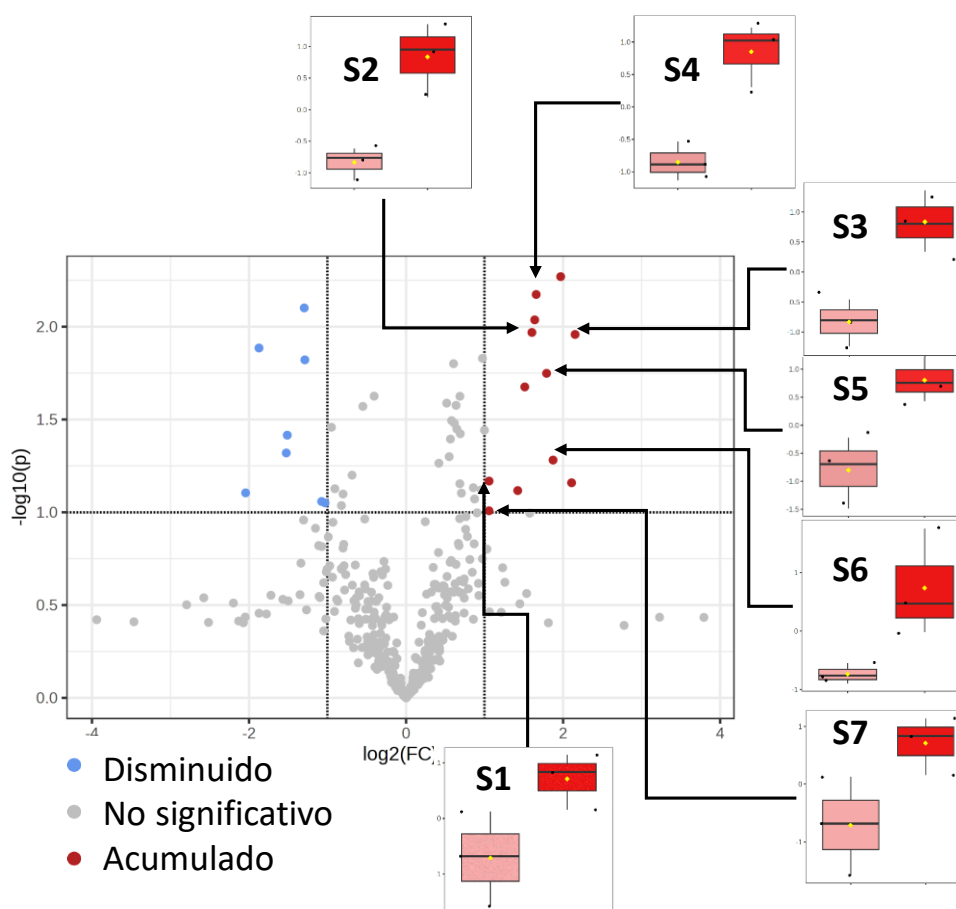
4.3.3 Efecto de la inoculación en el perfil de metabolitos

La capacidad del clavel para resistir a *Fod* depende de múltiples genes y, dado que no hay una relación isogénica entre los cultivares analizados, es posible que las diferencias constitutivas en los perfiles de metabolitos entre los cultivares resistentes y susceptibles no estén directamente relacionadas con la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, después de realizar la inoculación y comparar con los controles no inoculados en cada cultivar, se pueden encontrar algunas diferencias en los metabolitos que podrían estar asociadas a las diferencias fenotípicas en la respuesta contrastante a la interacción con *Fod*.

La sola presencia o las variaciones en la concentración de un compuesto en el cultivar resistente no garantiza su papel en la resistencia, ya que puede tener relación con otras redes bioquímicas y características fenotípicas y fisiológicas que diferencian a los dos cultivares (Katam et al., 2022). A pesar de esto, la evaluación de metabolitos diferenciales ha sido usada de manera tradicional como una primera aproximación para estudiar compuestos con potencial papel en la resistencia en el clavel (Ardila, 2013; Martínez González, 2019; Romero-Rincón et al., 2021).

En ese contexto, el preprocesamiento de datos de LC-MS y el posterior análisis estadístico resultó en la identificación de 12 metabolitos aumentados diferencialmente por efecto de la inoculación con *Fod*, y la anotación a nivel 3 de 7 de estos metabolitos en el cultivar susceptible 'Mizuki' (SM) (Figura 4-5). Tres flavonoides derivados de la quercetina (S1, S2 y S6), y cuatro alcaloides fenólicos derivados del ácido antranílico (S3, S4, S5, y S7).

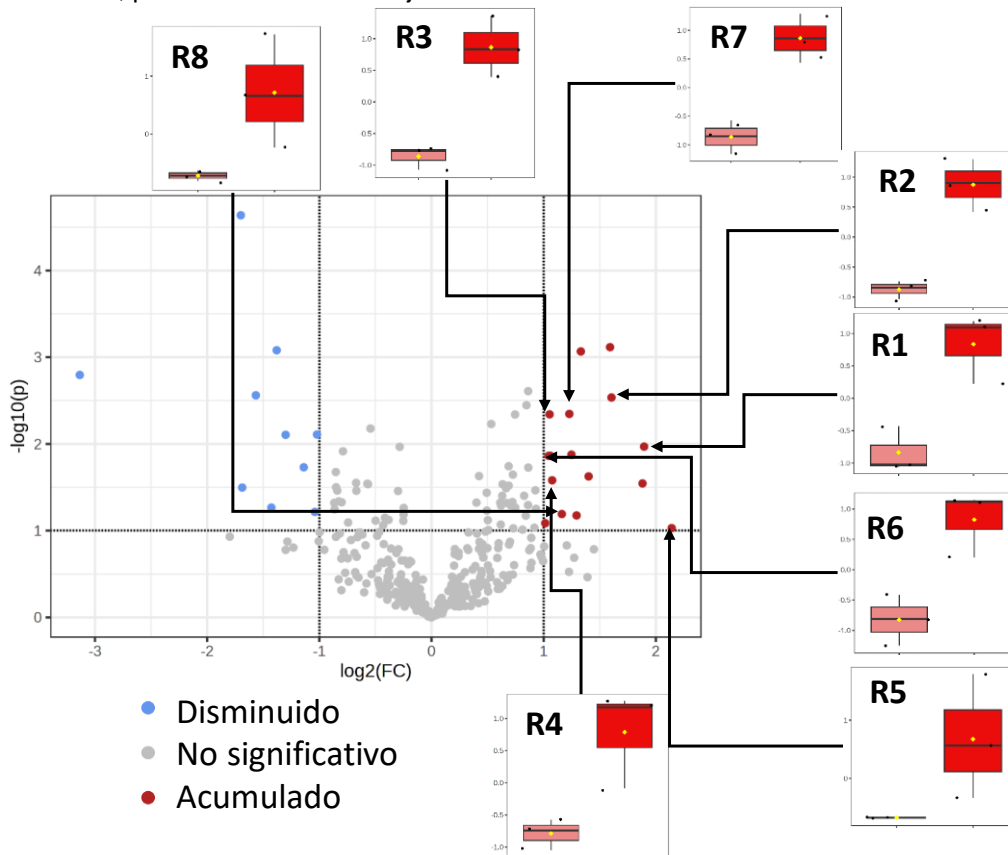
Figura 4-5: Diagrama *Volcano plot* e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la inoculación con *Fod* en el cultivar susceptible de clavel – 'Mizuki' (SM). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – rojo.



Por otro lado, para el cultivar resistente – 'Golem', se identificaron 16 metabolitos que aumentaron significativamente, de los cuales 8 fueron anotados (Figura 4-6); estos corresponden dos derivados del ácido antranílico (R1 y R4), una flavona (apigenina) glicosilada (R7), un flavonol glicosido de la quercetina (R3), dos flavonoles

(Isorhamnetina, y kaempferol) malonilglicosilados (R2 y R5), el flavonol isoquercetina (R8), y una flavanona glicosilada (R6).

Figura 4-6: Diagrama *Volcano plot* e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la inoculación con *Fod* en el cultivar resistente de clavel – ‘Golem’ (RG). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – rojo.



De acuerdo con el análisis de esta etapa del ensayo, aunque los metabolitos significativos estadísticamente encontrados en los dos cultivares se han relacionado con actividad antifúngica, como las diantramidas y los compuestos fenólicos (Baayen & Niemann, 1989), las principales diferencias encontradas entre SM y RG, y que podrían estar relacionadas con la respuesta contrastante a *Fod* de cada cultivar, son el aumento diferencial de derivados del antranilato y diversos flavonoides, sumado a las modificaciones biosintéticas (glicosilación, metilación y malonilglicosilación) que se presenta en los compuestos del cultivar RM.

Al respecto, se ha reportado el papel de diantramidas, flavonas, flavanonas y flavonoles en la resistencia a patógenos. Se demostró que líneas transgénicas de sorgo que sobreexpresan el gen de la enzima flavanona 3-hidroxilasa, aumentan la producción de apigenina y de flavonoles, lo que se asoció a una mejora en la resistencia contra el patógeno hemibiotrófico *Colletotrichum sublineola* (Lanxiang Wang et al., 2020). También, en plantas de transgénicas de lino que sobre expresan proteínas de la ruta fenilpropanoide, se encontró que aumentan los contenidos de falvanonas, apigenina, quercetina y kaempferol, y a su vez presentan una menor incidencia a la infección por los patógenos vasculares *Fusarium oxysporum* y *Fusarium culmorum* (Lorenc-Kukula et al., 2007). Para corroborar estos resultados será necesario realizar mediciones de este tipo de compuestos específicamente, para identificarlos y verificar su papel en la defensa contra *Fod* en plantas de clavel.

Por otro lado, también se encuentra que la mayoría de los compuestos acumulados por efecto de *Fod* en RG se encuentran glicosilados (dos de ellos malonilglicosilados), lo que resultó ser menor para SM. Las plantas enfrentan un desafío significativo en la producción y almacenamiento de moléculas de la ruta fenilpropanoide ya que son necesarias, tanto para su desarrollo como para su defensa, pero también muchas de ellas pueden ser tóxicas. Por lo tanto, es esencial que las plantas gestionen eficazmente la producción y almacenamiento de estas moléculas potencialmente peligrosas en el evento del estrés (Behr et al., 2020; Le Roy et al., 2016). Para lograr esta homeóstasis, la planta usa como mecanismos la glicosilación de metabolitos mediada por las enzimas glicosiltransferasas dependientes de difosfato (UGT) y glucósido hidrolasas, que transfieren azúcares desde moléculas donantes a moléculas aceptoras específicas (agliconas), incluyendo fenilpropanoides; y la esterificación con ácido malónico (malonización) de los residuos de azúcar de los metabolitos glicosilados mediado por enzimas maloniltransferasas (Ahmad et al., 2017; Behr et al., 2020; Le Roy et al., 2016; M. Zhao et al., 2019). La glicosilación y/o la malonización aumenta la diversidad estructural de los fenilpropanoides, así como sus propiedades. Se ha reportado que la sustitución del azúcar modifica directamente el potencial antioxidante, mostrando un efecto que depende de la molécula modificada. De forma general, las agliconas flavonoides se consideran más eficaces antioxidantes que sus glucósidos (Behr et al., 2020), aunque también se ha reportado que los productos de glicosilación de kaempferol y quercetina tienen una mayor actividad de eliminación de ROS (FRAP, DPPH y ABTS) que sus correspondientes agliconas (M. Zhao et al., 2019). Para confirmar el posible papel de la

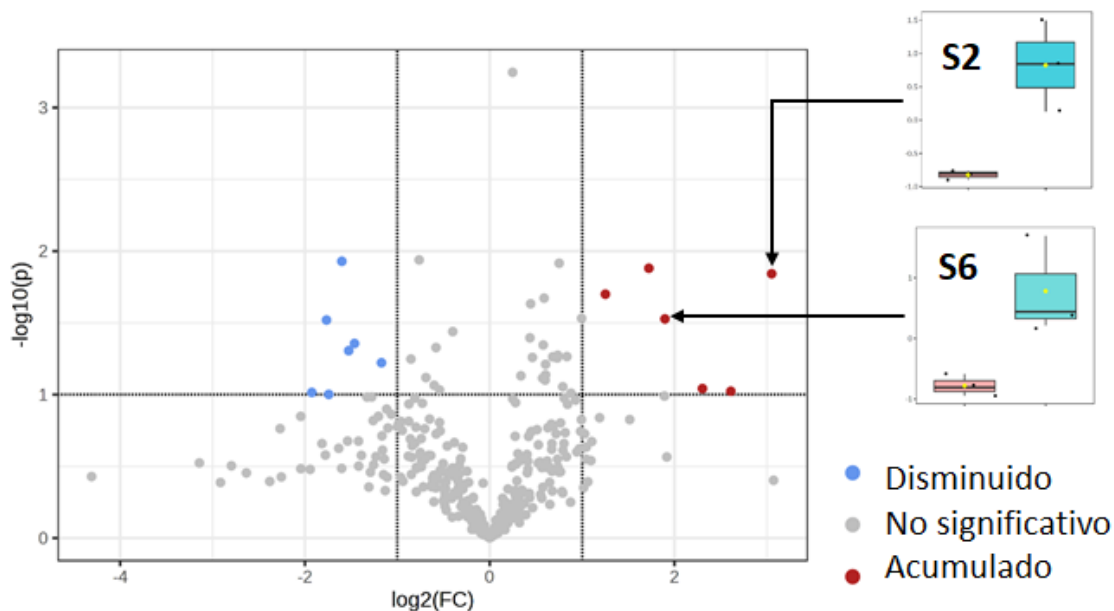
glicosilación y/o malonización de metabolitos en los niveles de resistencia y la respuesta de defensa en cultivares de clavel, se requieren de estudios adicionales que permitan profundizar al respecto.

Las modificaciones biosintéticas de metabolitos no solo pueden prevenir la toxicidad de las agliconas en la planta, sino que también puede contribuir a la producción de moléculas protectoras como mecanismo de regulación de la vía biosintética correspondiente. La glicosilación y la malonización en los flavonoles por ejemplo, da como resultado su almacenamiento en la vacuola, lo que reduce la inhibición por retroalimentación del producto sobre PAL y aumenta el contenido total de estos compuestos (Ahmad et al., 2017; Behr et al., 2020). Complementariamente, la glicosilación también facilita el transporte desde el sitio de biosíntesis de los flavonoides (retículo endoplásmico), favoreciendo el reparto celular y tisular de estos metabolitos, así como su almacenamiento (Behr et al., 2020; M. Zhao et al., 2019). A pesar de la importancia de esta deducción, para verificar la relación entre la resistencia vegetal y los niveles de glicosilación en este patosistema se requiere de estudios adicionales que permitan una comprensión más profunda y confirmación de esta idea.

4.3.4 Efecto de la aplicación de tiamina en el perfil de metabolitos

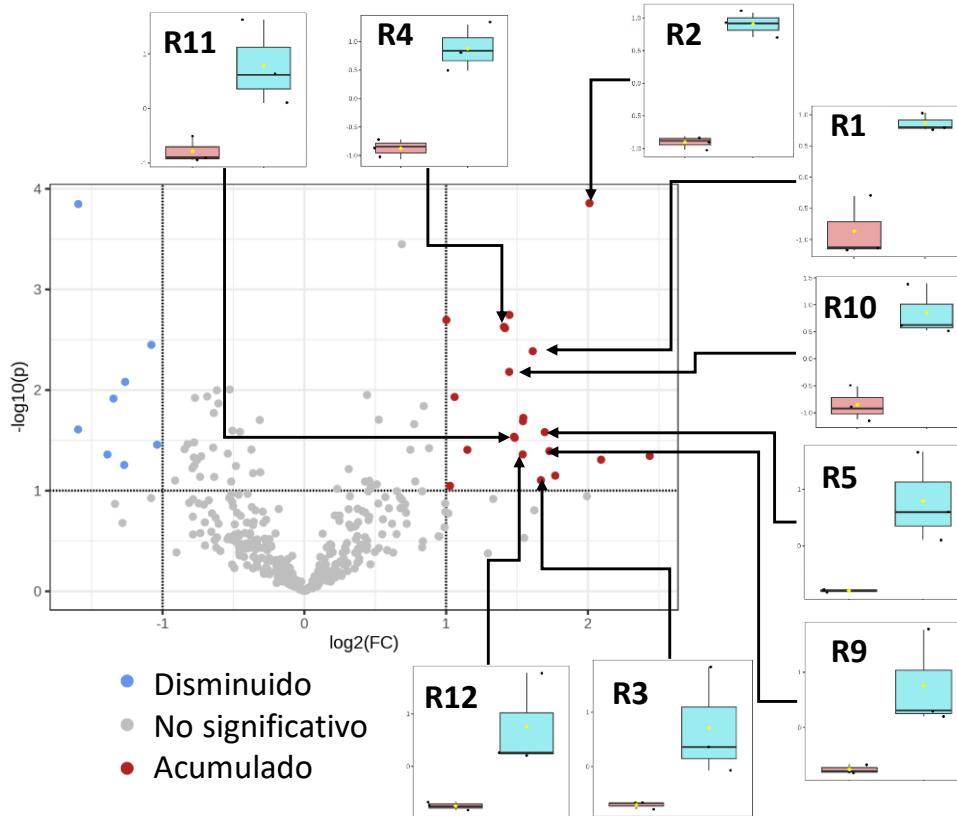
El preprocesamiento de datos de LC-MS y el posterior análisis estadístico resultó en la identificación de 6 metabolitos aumentados diferencialmente por efecto de la aplicación de tiamina, y la anotación a nivel 3 de dos de estos metabolitos en el cultivar susceptible 'Mizuki' (SM) (Figura 4-7). El flavonoide derivado de la quercetina, isorhamnetina (S6), y la quercetina glicosilada (S2). Los dos metabolitos también fueron inducidos por efecto de la inoculación con el patógeno *Fod*.

Figura 4-7: Diagrama *Volcano plot* e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la aplicación de tiamina en el cultivar susceptible de clavel – 'Mizuki' (SM). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – azul claro.



En contraste, la aplicación del agente inductor en el cultivar resistente 'Golem' tuvo un efecto mayor en el número de metabolitos significativamente aumentados, con un total de 21 señales identificadas, de las cuales se lograron anotar 9 metabolitos en un nivel 3 (Figura 4-8), 5 derivados del ácido antranílico (R1, R4, R9, R10, R12), y cuatro flavonoles: Isorhamnetina (R2) y kaempferol (R5) malonilglicosilados, quercetina glicosilada (R3), y el kaempferol (R11).

Figura 4-8: Diagrama *Volcano plot* e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la aplicación de tiamina en el cultivar resistente de clavel – 'Golem' (RG). Plantas control – rosado; plantas con tiamina – azul claro.



Se ha reportado que diversos compuestos, como las vitaminas, activan la resiliencia intrínseca de la planta (Overbeek et al., 2022). Los mecanismos de bioestimulación y *priming* pueden variar de una especie a otra con diferentes resultados para diferentes agentes inductores (Mhlongo et al., 2016), por lo tanto, se hace necesario analizar la respuesta al inductor en el patosistema específico. La aplicación de estos compuestos bioestimulantes puede ser reconocida por las plantas y, como consecuencia, activan respuestas asociadas a defensa, de tipo bioquímico, fisiológico y/o morfológico (Santos-Rodríguez et al., 2021), que pueden ser medidos y caracterizados, obteniendo similitudes, para algunos casos, a la respuesta generada por el patógeno. En nuestro caso, un metabolito encontrado en SM por la aplicación de tiamina también aumentó sus niveles por causa de la interacción con el patógeno; mientras que en RG fueron 5 los metabolitos comunes en los tratamientos *Fod* y B1.

Las plantas de clavel responden a la infección por *Fod* produciendo varias diantramidas y otros compuestos fenólicos que son fungistáticos contra el patógeno (Baayen & Niemann, 1989; Santos-Rodríguez et al., 2021). Dichas investigaciones están de acuerdo con lo

encontrado en este estudio (numeral 4.3.1). Teniendo en cuenta que la aplicación de tiamina induce la acumulación de estos compuestos en los cultivares de clavel, se puede sugerir que el inductor de resistencia tiamina está sensibilizando a la planta, preactivando la respuesta de defensa a nivel de metabolitos, específicamente en las vías fenilpropanoide y del ácido shikímico, lo que le permitiría eventualmente tener una mejor respuesta inmune al reto con *Fod*.

Una característica de algunos de estos compuestos descritos es que se encuentran metilados (R4, R7, R12, S1). En varias especies de plantas se ha descrito que la metilación de metabolitos estaría asociada a la protección contra patógenos, incluyendo al clavel (Curir et al., 2003; Romero Rincón, 2020). La metilación permite que los metabolitos presenten cambios en la polaridad, lo que modifica sus características químicas y actividad biológica (Behr et al., 2020). En el clavel, este proceso está mediado por enzimas O-metiltransferasas, las cuales se han reportado en cultivares resistentes de clavel (Curir et al., 2003).

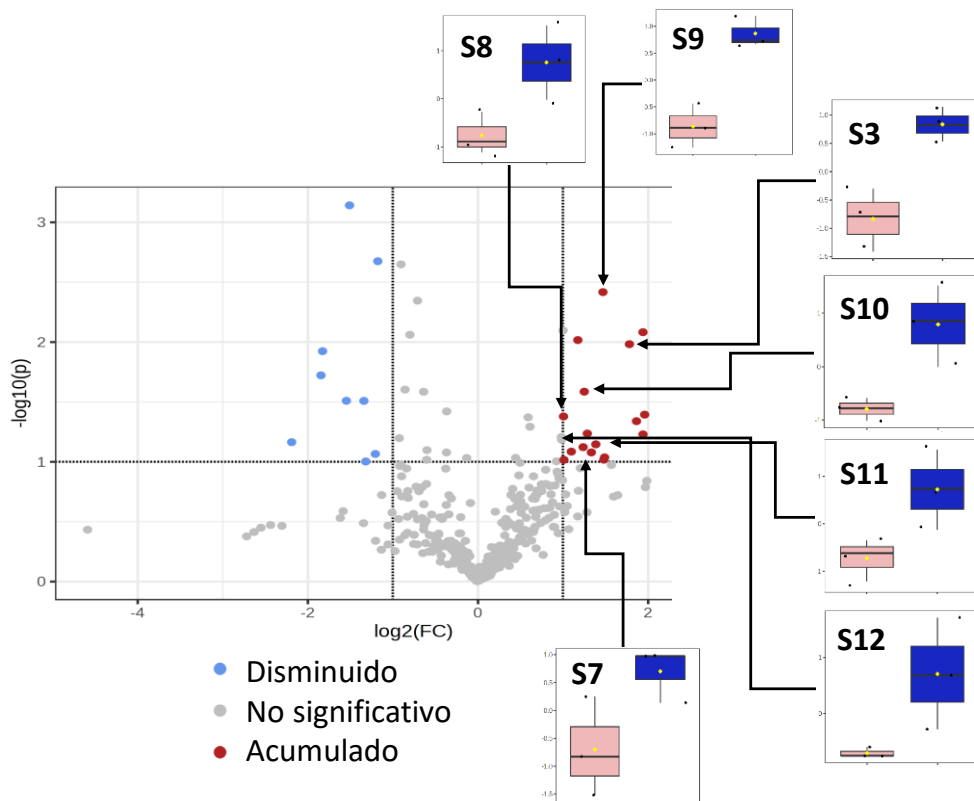
La aplicación de tiamina parece preparar la planta para mejorar los procesos antioxidantes y aumentar los niveles de compuestos con actividad antifúngica, especialmente en el cultivar resistente. Los efectos antimicrobianos de flavonoides de clavel contra *Fod* han sido ampliamente reportados (Galeotti et al., 2008; Santos-Rodríguez et al., 2021). Teniendo en cuenta esto, la presencia de compuestos de tipo kaempferol, encontrado en RM, y quercetina, encontrados en los dos cultivares, podría estar relacionada con la mencionada actividad contra este patógeno. De hecho, esta respuesta se ha estudiado en otros patosistemas, lo que sugiere que la acumulación de flavonoides está asociada con la activación de procesos de bioestimulación y *priming*. Por ejemplo, en el tabaco, se ha informado que la aplicación de acibenzolar-SMetilo, ácido azeláico, riboflavina, ácido abscísico, ácido salicílico y jasmonato de metilo conduce a cambios en los perfiles metabólicos de flavonoides, lo que resulta en un estado de sensibilización de la planta. Esto sugiere que la acumulación y almacenamiento de derivados de la ruta fenilpropanoide, como derivados hidroxilados del ácido cinámico, derivados del ácido shikímico y quínico, además de compuestos poliaminados, permiten a las células vegetales liberar estos metabolitos para participar en vías metabólicas para la biosíntesis de fitoalexinas y ligninas cuando se percibe la presencia de un agente patógeno (Mhlongo et al., 2016).

Por otro lado, en plantas de tomate, se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS), el cual confirmó que algunos compuestos precursores de la vía fenilpropenoide como L-fenilalanina, ácido cinámico, ácido benzoico, ácido cafeico y ácido salicílico, aumentaron distintivamente en las plantas que se sensibilizan con ácido fenilacético y se sugiere que pueden estar asociados en la respuesta mejorada de las plantas a *Fusarium oxysporum lycopersici* (Akram et al., 2016). Otro estudio bajo análisis no dirigido de las respuestas subyacentes a la resistencia inducida por *Systemin1*, una fitocitoquina de tomate, mostró que los compuestos fenólicos e indólicos eran los grupos más representativos en la huella metabólica inducida en plantas de *A. thaliana* (Pastor-Fernández et al., 2022). Por último, específicamente en clavel, la adición de un elicitador de origen biótico preparado con micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, promovió la acumulación de metabolitos relacionados con la ruta del shikimato/fenilpropanoide tanto en un cultivar susceptible como en uno resistente (Santos-Rodríguez et al., 2021), de manera similar a lo observado en este estudio. En general, los resultados de esta etapa evidencian que la aplicación de la tiamina permite la acumulación de metabolitos fenólicos como parte posiblemente de la preparación de los tejidos de la planta para tener una respuesta más eficiente ante el patógeno.

4.3.5 Efecto de la aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod* en el perfil de metabolitos

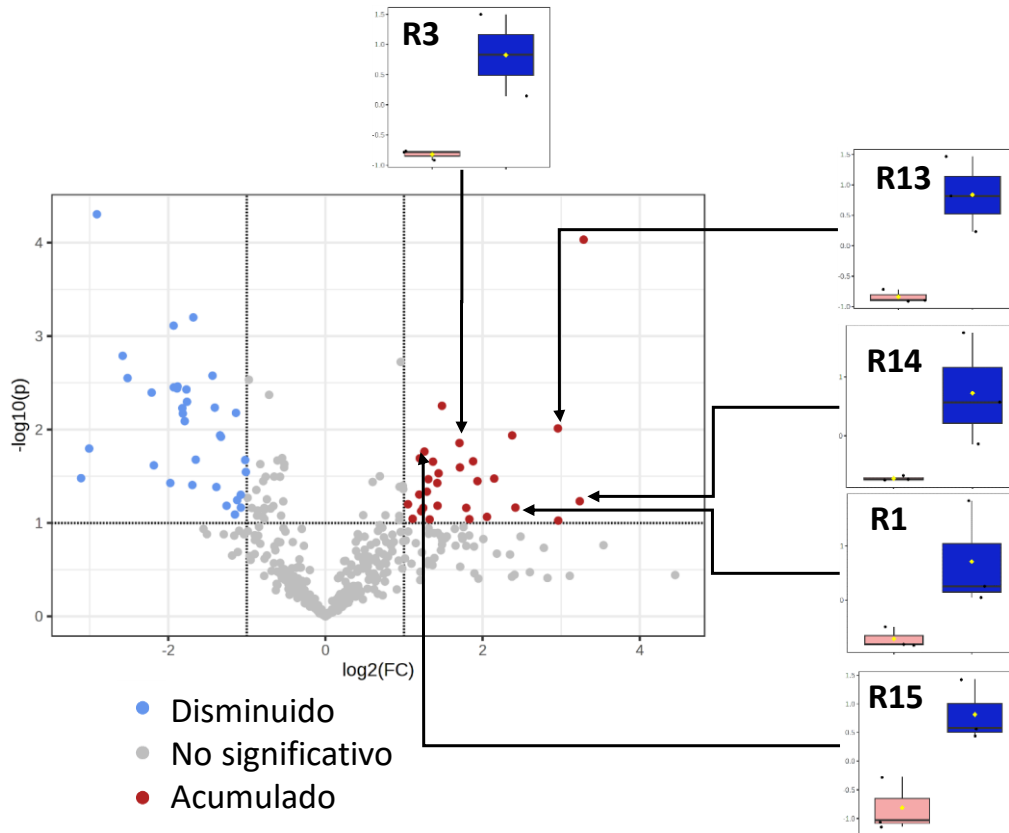
El preprocesamiento de datos de LC-MS y el posterior análisis estadístico resultó en la identificación de 18 metabolitos aumentados diferencialmente por efecto de la aplicación de tiamina y posterior inoculación con *Fod* (tratamiento B1 + *Fod*), y la anotación a nivel 3 de 7 de estos metabolitos en el cultivar susceptible 'Mizuki' (SM) (Figura 4-9). Los compuestos encontrados correspondieron a tres derivados del ácido antranílico (S3, S7 y S12), una flavona metoxilada (S8), dos flavonoles malonilglicosilados (S9 y S10) y un flavonol (S11).

Figura 4-9: Diagrama *Volcano plot* e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la aplicación de tiamina y posterior inoculación en el cultivar susceptible de clavel – 'Mizuki' (SM). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – azul oscuro.



En contraste, el tratamiento B1 + *Fod* en el cultivar resistente ‘Golem’ causó la acumulación de 29 metabolitos, de los cuales 5 fueron anotados a nivel 3. De estos analitos, dos son derivados del ácido antranílico (R1 y R13) y tres flavonoides glicosilados derivados de la quercetina (R3), de miricetina (R14) y de kaempferol (R15).

Figura 4-10: Diagrama *Volcano plot* e identificación de Metabolitos anotados que se indujeron por efecto de la aplicación de tiamina y posterior inoculación en el cultivar resistente de clavel – ‘Golem’ (RG). Plantas control – rosado; plantas inoculadas – azul oscuro.



Las familias de compuestos encontradas en este análisis corresponden a metabolitos previamente reportados como antioxidantes y antifúngicos (Baayen & Niemann, 1989; Curir et al., 2001, 2003; Romero-Rincón et al., 2021; Santos-Rodríguez et al., 2021), lo cual podría estar relacionado con la disminución de la incidencia y la severidad de la enfermedad observadas en los dos cultivares en el ensayo. La posible correlación entre la acumulación de metabolitos y la inducción de resistencia de la tiamina al marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum* en clavel, sugieren que los metabolitos fungitóxicos encontrados, de tipo diantramida y flavonoide (principalmente flavonoles) desempeñan un papel en el mecanismo de defensa de las plantas de clavel contra el patógeno. Al respecto cabe resaltar que en el tratamiento B1 + *Fod*, SM está acumulando compuestos flavonoles malonilglicosilados, S9 y S10, que corresponden a los acumuladas en RG por efecto de la inoculación con *Fod*, R2 y R5, que podrían estar implicadas en la respuesta contrastante al patógeno entre los dos cultivares. Se ha reportado que malonil-flavonoides se almacenan en la vacuola con propósito de defensa por causa de la bioestimulación con un elicitador fúngico y por la aplicación de jasmonato de metilo como inductor de resistencia (Ahmad et al., 2017) y, por lo tanto, este hallazgo

podría ser indicativo de que la aplicación de tiamina está induciendo metabolitos que podrían estar implicados en la mejor respuesta del cultivar SM a *Fod*. Otras evidencias que apoyan este análisis son, por ejemplo, que el flavonol pongaroteno (S11), del cual se encontró que su nivel aumentó en SM, se reportó previamente como un metabolito inducido por causa de la inoculación con *Fod* en un cultivar resistente de clavel a los 14 días postinoculación (Martínez González, 2019), y el aumento de compuestos derivados del ácido antranílico que se han asociado a la resistencia de cultivares de clavel a *Fod* (Baayen & Niemann, 1989; Higuera, 2001).

Respecto a este último grupo de compuestos nitrogenados, en diversos estudios se ha propuesto su papel protagónico en resistencia; esto se estudió inicialmente usando plantas de clavel del cultivar 'Novada', representativa en el modelo por sus altos niveles de resistencia a la enfermedad (Niemann & Baayen, 1988; Baayen & Niemann, 1989; Niemann et al., 1992). En dichos estudios se reportó, por ejemplo, que después de la interacción con *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, se presenta la acumulación de estos compuestos, que al presentar actividad antifúngica contra el patógeno y presentar síntesis *de novo*, fueron clasificados como fitoalexinas (Niemann et al., 1992). Estas moléculas han sido identificadas como diantalexinas y diantramidas y se ha reportado ampliamente su papel en la resistencia de clavel a nivel de tallo (Niemann & Baayen, 1988) y a nivel de raíz (Santos-Rodríguez et al., 2021).

Estudios previos de inducción de resistencia y bioestimulación de plantas, reportaron resultados que coinciden con lo encontrado. Por ejemplo, se reportó que después de la sensibilización con un elicitor de origen biótico y la posterior inoculación con *Fod* en plantas de clavel, que la clase de metabolitos predominante estaba relacionada con los compuestos producidos por la ruta de los fenilpropanoides, particularmente derivados del ácido benzoico, derivados de policétido y flavonoles glicosilados que contenían quercetina como aglicona (Santos-Rodríguez et al., 2021). De la misma manera, se ha reportado que la acumulación de derivados del antranilato de tipo fitoalexina a nivel de tallo, también es una característica que se correlaciona con la resistencia a esta enfermedad (Niemann & Baayen, 1988). En lirio bioestimulado con melatonina, se encontró que las vías de los fenilpropanoides y los flavonoides se ven estimulada aumentando la resistencia contra el hongo *Botrytis elliptica* (Xie et al., 2022).

En general, los resultados de la presente etapa de la investigación confirman el papel protagónico de los compuestos fenólicos en la resistencia del clavel y confirman que la aplicación de inductores de resistencia, específicamente de tiamina, tiene un efecto positivo en el metabolismo especializado de las raíces del clavel.

4.4 Conclusiones

Durante esta fase del estudio se observaron cambios en el perfil de metabolitos en los dos cultivares estudiados tras la aplicación de tiamina. Estos cambios sugieren que la aplicación de tiamina está estimulando procesos de defensa en el clavel, especialmente en la variedad susceptible, lo que puede mejorar su respuesta frente al patógeno. En particular, los metabolitos que se han encontrado relacionados con la respuesta de defensa son flavonoides (principalmente flavonoles) y derivados del ácido antranílico; los cuales también presentan modificaciones biosintéticas como la metilación, glicosilación y malonilglicosilación, lo cual podría contribuir en el transporte y acumulación de estos metabolitos, lo que estaría relacionado con la mejora en la capacidad de la planta para resistir el ataque de patógenos. Estos compuestos y sus derivados han sido previamente relacionados con la resistencia en diferentes interacciones planta-patógeno, incluyendo clavel-*Fod*, de acuerdo con su acción como antifúngicos y su reportada actividad antioxidante.

Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para verificar el papel específico de estos metabolitos y sus modificaciones biosintéticas en la interacción del clavel con *Fod*. Es importante identificar los metabolitos a nivel 1 y profundizar en su conocimiento y posible papel en la inducción de resistencia causada por la aplicación de tiamina frente al patógeno. Esto permitirá el desarrollo de estrategias efectivas de manejo de la enfermedad y así lograr un impacto positivo en el sector productivo.

5. Discusión general

El propósito de esta investigación fue estudiar el efecto de la aplicación de un inductor de resistencia en los procesos bioquímicos y moleculares relacionados con la resistencia del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. En la primera fase de este estudio, se seleccionó la tiamina entre cuatro compuestos previamente reportados como un potencial inductor. Además, se demostró que la aplicación de la tiamina mediante aspersion foliar, a diferentes concentraciones, redujo los niveles de incidencia y la severidad del marchitamiento vascular causado por *Fod* a nivel fenotípico. De acuerdo con estos resultados, se eligió una concentración de 1 mmol L⁻¹ como inductor, y, posteriormente, se demostró que la respuesta observada a nivel fenotípico es consistente en diferentes cultivares susceptibles de clavel. Esto sugiere que la tiamina actúa como un inductor de resistencia (**Capítulo 2**). Sin embargo, para comprender mejor el posible mecanismo de esta respuesta, era necesario identificar proteínas y metabolitos implicados en el proceso de sensibilización causado por el inductor y la respuesta posterior al desafío con el patógeno.

El efecto protector causado por tiamina frente a patógenos en plantas ha sido reportado previamente (Ahn et al., 2007; Boubakri et al., 2012; A. M. Hamada et al., 2017; Pérez Mora et al., 2021; Pushpalatha et al., 2011; M. Sathiyabama & Indhumathi, 2022; Muthukrishnan Sathiyabama et al., 2019; Torky, 2016); sin embargo, se debe resaltar que esta respuesta varía de una especie a otra debido a su naturaleza química o física del inductor y a las características propias de la interacción planta patógeno (Akram et al., 2016). Por lo tanto, cada sistema en particular debe ser analizado de manera independiente.

Para ello, usando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas como plataforma analítica de detección e identificación, se llevó a cabo una segunda etapa donde se analizaron los cambios en el proteoma (**Capítulo 3**), y una tercera etapa donde se analizaron los cambios en el metaboloma (**Capítulo 4**) en las condiciones de análisis,

debidos al efecto de los tratamientos aplicados. Esto permitió determinar qué respuestas activadas por tiamina, solo o en combinación con el patógeno, pueden estar involucradas en la defensa de cultivares de clavel contra el hongo patógeno *F. oxysporum*, y sugerir su posible participación en la respuesta mejorada del clavel observada en la primera etapa del estudio en un evento de inducción de resistencia. A continuación, se presentará la aproximación al mecanismo de acción de la aplicación de la tiamina como agente inductor de acuerdo con los resultados encontrados, con énfasis en el cultivar susceptible analizado. Estos resultados permiten proponer a la tiamina como potencial inductor de resistencia que, con estudios complementarios, podría usarse para el control y manejo de esta enfermedad en condiciones de cultivo a escala agroindustrial. Este análisis se plasma de forma gráfica en la Figura 5-1.

La aplicación de tiamina induce procesos de señalización: El contraste fenotípico entre cultivares resistentes y susceptibles a una enfermedad fúngica a menudo se puede atribuir a una disponibilidad temprana o constitutiva de determinados compuestos (i.e. proteínas y metabolitos) en los tejidos infectados, que conduce a una respuesta de defensa eficiente (Ramaroson et al., 2022). A nivel inducible, este proceso depende de la capacidad de la planta para percibir estímulos que permitan regular la respuesta inmune de las plantas de manera eficiente para hacer frente al reto con el patógeno en varios niveles (Lozano-Durán & Robatzek, 2015). En esta investigación doctoral se encontró que la tiamina y la inoculación con el patógeno (tratamientos B1 y B1 + *Fod*) inducen proteínas con esta función de señalización, incluyendo una enzima MAP-Kinasa y proteínas 14-3-3 (**Capítulo 3**), lo que podría estar relacionado con la respuesta mejorada del cultivar susceptible observada a nivel fenotípico. La coevolución entre las plantas y los patógenos microbianos potenciales como un modelo en zig-zag ha sido descrito previamente (Ngou et al., 2022) y también se puede aplicar para deducir la actividad biológica de los agentes inductores de resistencia. De acuerdo con el modelo, la respuesta inducible de la planta es desencadenada por la percepción de elicitores químicos (PAMPS), provenientes del patógeno por parte de receptores presentes en la membrana plasmática. En ese sentido, se ha propuesto que posiblemente estos receptores podrían también detectar agentes inductores (e.g., tiamina) (Wiesel et al., 2014) y, como consecuencia, se genera una respuesta de señalización que produce respuestas como aumento en especies reactivas de oxígeno, y activación de proteínas quinasas, lo que corrientes abajo conduce a la producción de proteínas (e.g., proteínas relacionadas con la patogénesis) y metabolitos

(e.g., fitoalexinas), que preparan a la planta para minimizar el efecto del estrés causado por la interacción futura con un patógeno (Naeem Bajwa et al., 2021; Ngou et al., 2022; Wiesel et al., 2014).

La aplicación de tiamina induce proteínas relacionadas con el estrés y la defensa: La aplicación de tiamina indujo la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), como la PR14 (LTP3 - proteína de transferencia de lípidos), y PR9 (peroxidasas) las cuales se han reportado como regulador positivo en la defensa contra patógenos en plantas asociadas a SAR, además de tener un papel importante en la producción de ceras, cutículas y lignina (Gao, Ma, Ji, Pan, & Zhou, 2022; Jia et al., 2020). Por otro lado, la adición foliar de tiamina indujo proteínas relacionadas con el estrés: proteína de choque térmico de 90kDa (HSP90), y las proteínas de unión luminal (BiP1 y BiP2). Estas proteínas son la respuesta de la planta para evitar el estrés en el retículo endoplasmático, mejorando la síntesis de chaperonas, la capacidad de plegamiento de proteínas y la degradación de proteínas mal plegadas, proceso activado por la vía de la hormona ácido salicílico e importantes en el establecimiento de SAR (Poór et al., 2019; Verchot & Pajerowska-Mukhtar, 2021).

La aplicación de tiamina induce el metabolismo de compuestos fenólicos: Dentro de los mecanismos bioquímicos y moleculares encontrados por la aplicación de tiamina, tiene particular relevancia el relacionado con los metabolitos de tipo fenólico. Este trabajo de investigación encontró que la aplicación de tiamina y la posterior inoculación con el patógeno (B1 + *Fod*) aumentó significativamente proteínas relacionadas con la ruta fenilpropanoide (PAL), la cual ha sido asociada a resistencia de cultivares de clavel a *Fod* (Ardila et al., 2007); y con la vía del shikimato (DAHP2, ASA2), lo cual sugiere la activación de estas vías biosintéticas (**Capítulo 3**). Además se evidenció la acumulación de los metabolitos de estas rutas (**Capítulo 4**), incluyendo compuestos fungitóxicos derivados del antranilato, flavonas y flavonoles, compuestos que han sido asociados a respuesta de defensa de la planta, incluyendo trabajos previos en clavel (Ramaroson et al., 2022; M. Zhao et al., 2019; Romero-Rincón et al., 2021; M. Sathiyabama & Indhumathi, 2022).

En este estudio se encontró que algunos de los flavonoides identificados están glicosilados o metilados (o ambos) o malonilglicosilados. Se cree que estas modificaciones biosintéticas podrían estar implicadas en la respuesta favorable de la

planta ante patógenos (Behr et al., 2020; Romero Rincón, 2020; M. Zhao et al., 2019), y podrían ser importantes para los procesos de transporte de estas moléculas y mantener su homeostasis en el citosol (Behr et al., 2020). Los mecanismos más importantes de transporte de estos compuestos en la planta están mediados por transportadores tipo ABC, los cuales se encontraron aumentados o inducidos por la aplicación de tiamina en el cultivar susceptible en este estudio (**Capítulo 3**). Los transportadores tipo ABC ubicados en el plasma y las membranas vacuolares muestran afinidades diferenciales hacia las moléculas glicosiladas y no glicosiladas, controlando así la compartimentación subcelular, incluyendo glucósidos fenólicos, lo cual se ha reportado previamente para clavel (Le Roy et al., 2016), y podría asociarse a lo encontrado en este estudio teniendo en cuenta que algunos de los metabolitos diferenciales encontrados están modificados (glicosilados, malonilglicosilados y metilados), y a que se encontraron proteínas con actividad glicosiltransferasa, maloniltransferasa y metiltransferasa que aunque no se acumularon diferencialmente, estarían implicadas en este importante proceso.

Por otro lado, la acumulación de flavonoides y la activación de enzimas relacionadas con la síntesis de lignina, como PAL (que produce metabolitos precursores de lignina), S-adenosilmetionina sintasa MTO3 (involucrado en la biosíntesis de las ligninas de guayacil y siringil en las plantas vasculares (Y. Li et al., 2022)) y peroxidasa (implicada en la reacción de polimerización de los monómeros de lignina (Q. Yang et al., 2022), sugiere la activación de este proceso, lo cual ha sido reportado como parte de los mecanismos asociados a defensa contra *Fod* en cultivares resistentes de clavel (Cuervo et al., 2009), y en otros patosistemas al usar tiamina como agente inductor. Por ejemplo, la aplicación de tiamina en pera aumentó los contenidos de lignina y sugirió la activación de SAR (Yin et al., 2012); el tratamiento poscosecha con tiamina en melón también aumentó significativamente la lignina (Yong-hong et al., 2017); y en arroz contra el nemátodo *Meloidogyne graminícola* se encontró una respuesta similar (Huang et al., 2016).

La aplicación de tiamina induce procesos para mantener la homeóstasis redox: En eventos de estrés, se activan procesos de señalización mediados por especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, un desbalance entre su producción y eliminación podría causar estrés oxidativo, por lo que las plantas deben mantener una adecuada homeostasis redox. La aplicación de tiamina y la posterior inoculación con *Fod* indujeron la acumulación de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), pyr redox 2

con actividad monodehidroascorbato reductasa (ATMDAR2) y 3 enzimas de la familia de las peroxidasas (POD) (**Capítulo 3**).

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han mostrado una acumulación de H_2O_2 como respuesta a la interacción con *Fod* durante su fase biotrófica inicial, relacionándola con resistencia al marchitamiento vascular en clavel (Ardila, 2013; Cuervo, 2017). A nivel de apoplasto de raíces de clavel, se reportó que la acumulación de peróxido de hidrógeno está asociada con la acumulación de SOD (Cuervo, 2017). SOD cataliza la dismutación del anión radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Estas especies reactivas de oxígeno, particularmente H_2O_2 , están involucradas en procesos de señalización en respuesta hipersensible asociada a la interacción con patógenos (Lightfoot et al., 2017) y su producción está relacionada con SOD. En eventos de resistencia, se ha reportado un aumento en la actividad enzimática relacionada con la bioestimulación con tiamina (Bahuguna et al., 2012; Lightfoot et al., 2017; Yin et al., 2012) lo cual se puede relacionar con lo encontrado en este estudio.

Las peroxidasas, por otro lado, están relacionadas con la detoxificación del peróxido de hidrógeno, por su reacción de reducción a agua, usando compuestos fenólicos como donores de electrones. Por lo tanto, estas enzimas tienen un rol importante en el control de peróxido de hidrógeno acumulado por procesos relacionados con interacción con patógenos y en eventos de resistencia inducida. Por ejemplo, el rol de las peroxidasas se ha reportado previamente en clavel, asociada a aumentos en los contenidos de H_2O_2 en cultivares resistentes (Ardila et al., 2014; Cuervo et al., 2009; Vanegas-Cano et al., 2022). Además, también se ha reportado el aumento en los transcritos de *pod* y en la actividad enzimática POD por la aplicación de tiamina en diferentes interacciones planta patógeno, asociando lo observado a activación de procesos de inducción de resistencia (Abdel Monaim, 2011; Bahuguna et al., 2012; Muthukrishnan Sathiyabama et al., 2019; Yin et al., 2012; Yong-hong et al., 2017). Por último, múltiples enzimas GST también poseen actividades de glutatión peroxidasa, por lo que estas GST pueden participar en la defensa antioxidante (Gullner et al., 2018).

Consistente con lo encontrado a nivel de proteínas, además del control enzimático, existen varios compuestos químicos a nivel celular que pueden reducir los niveles de compuestos altamente reactivos, los cuales tienen la capacidad de reaccionar con ROS y disminuir su

toxicidad. Los compuestos encontrados de tipo fenólico como los flavonoides y los derivados del antranilato (**Capítulo 4**) han sido reportados con actividad antioxidante en clavel (Ardila, 2013; Baayen & Niemann, 1989; Curir et al., 2003; Niemann & Baayen, 1988) y en otros patosistemas (M. I. Mhlongo et al., 2017; Msizi I. Mhlongo et al., 2016; Pastor-Fernández et al., 2022).

Consideraciones finales

El presente trabajo de tesis doctoral profundizó sobre algunos mecanismos que, a nivel de proteínas y metabolitos, están relacionados con respuestas de inducción de resistencia en el clavel (*Dianthus caryophyllus* L) al patógeno que causa el marchitamiento vascular, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2, debida a la aplicación de tiamina. La capacidad de la tiamina para activar la acumulación de proteínas y metabolitos relacionados con la defensa, en ausencia de la inoculación con el patógeno, sugiere que la aplicación de este inductor está promoviendo un estado de sensibilización de la planta (*priming*) a nivel bioquímico, lo cual demuestra el papel de la tiamina como bioestimulante, si se compara contra el tratamiento control. Además, se encontró un efecto similar en plantas sensibilizadas y posteriormente inoculadas con el patógeno, respuesta que se correlaciona con la disminución de síntomas observados en la evaluación fenotípica, y que demuestra el papel como inductor de resistencia. Estos resultados apoyan lo encontrado previamente en estudios de otros patosistemas donde se reporta la inducción de *priming* debida a la aplicación de tiamina (Ahn et al., 2007; Boubakri et al., 2012; Huang et al., 2016; Kheyri et al., 2022) (Boubakri 2012).

Adicionalmente, teniendo en cuenta que la aplicación de la tiamina se realizó en las hojas y el análisis se hizo en raíz, algunos de los resultados encontrados se pueden asociar a la activación del mecanismo de resistencia sistémica adquirida mediada por ácido salicílico, aunque para futuros trabajos se sugiere analizar marcadores específicos de SAR como PR1, NPR1, y el contenido de ácido salicílico y salicilato de metilo. Cabe resaltar que la aplicación de tiamina como inductor de resistencia se ha asociado a un evento de SAR en diferentes tipos de interacciones planta patógeno (Ahn et al., 2005, 2007; Bahuguna et al., 2012; Afaf M Hamada & Jonsson, 2013; M. Sathiyabama & Indhumathi, 2022).

Estos resultados sugieren que la aplicación de tiamina activa la respuesta inmune innata del clavel contra *Fod* a través de la estimulación de los procesos previamente analizados lo que confirma el potencial de la tiamina como alternativa al control de la infección del patógeno. El conocimiento generado durante el desarrollo de este trabajo se requiere para el desarrollo de nuevas alternativas de control al marchitamiento vascular, que tengan un mínimo impacto a nivel medioambiental, y que estén alineados con los objetivos mundiales de desarrollo sostenible, permitiendo un fortalecimiento del sector productivo del clavel.

Figura 5-1 Aproximación al mecanismo asociado a la sensibilización e inducción de resistencia mediante el uso de tiamina aplicada por aspersión foliar en clavel (*Dianthus caryophyllus* L), para el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

A. Cambios en el metabolismo primario, algunos de estos procesos suceden teniendo como cofactor el pirofosfato de tiamina (TCA: ciclo de los ácidos tricarbónicos; PPP: Vía de las pentosas fosfato; ETC: cadena de transporte de electrones). **B.** Posible reconocimiento de la tiamina que causa una cascada de señalización para activar la respuesta innata. **C.** Activación de rutas de señalización asociadas a especies reactivas de oxígeno (ROS), proteínas quininas asociadas a mitógenos (MPK3) y proteínas 14-3-3. Esta señalización activa la transcripción de genes y traducción a proteínas asociadas entre otros procesos a: **D.** Defensa como las proteínas PR donde se destaca a la proteína de transporte de lípidos no específica (LTP3) que podría estar asociada a señalización de resistencia sistémica adquirida (SAR) y la producción de ceras y cutícula, y **E.** Proteínas relacionadas con respuesta a estrés en donde se destacan a proteínas del retículo endoplasmático (RE) para prevenir el estrés en RE por proteínas desplegadas o mal plegadas. **F.** La ruta fenilpropanoide se activa a nivel de algunas proteínas y de metabolitos; Igualmente **G.** La ruta del ácido shikímico se activa a nivel de proteínas y metabolitos. El transporte de metabolitos se realiza por interacción con **H.** Glutación S transferasa (GST) y por los **I.** Cassettes de proteínas dependientes de ATP (ABC) en las membranas. Estos procesos de transporte se realizan al apoplasto y a todos los organelos celulares para mantener la homeóstasis redox y el proceso se ve favorecido por modificaciones como glicosilación (GT: Glicosiltransferasa), malonilación (MalT: Maloniltransferasa) y metilación (MetT: metiltransferasa). **J.** La producción y transporte de estos metabolitos puede favorecer procesos de lignificación con intermediación de proteínas como la S-adenosilmetionina sintasa (MTO3) y peroxidasa (POD). **K.** La homeóstasis redox se regula por mecanismo enzimático asociado a proteínas como superóxido dismutasa (SOD), pyr redox 2 con actividad monodehidroascorbato reductasa (ATMDAR2), POD y GST, y por mecanismo no enzimático asociado a metabolitos (i.e. flavonoides y derivados del antranilato). **L.** La adición del agente inductor también modula la dinámica del citoesqueleto, incluyendo proteínas como el factor de depolimerización de actina (ADF4) que ha sido asociado a respuestas de Inmunidad desencadenada por patrones (PTI) y por efectores (ETI).

B1: tratamiento de aplicación de tiamina, B1 + *Fod*: Aplicación de tiamina y posterior inoculación con Fod

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Este estudio demostró que la tiamina aplicada por aspersion foliar y a una concentración de 1 mmol L⁻¹ disminuye la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum* en diferentes cultivares susceptibles de clavel ('Solex', 'Brisa', 'Vorágine' y 'Mizuki'), en condiciones de invernadero. Teniendo en cuenta esto, se realizaron análisis de proteómica y metabolómica, encontrando que en un cultivar susceptible de clavel ('Mizuki'), la aplicación de tiamina por aspersion foliar y en concentración 1 mmol L⁻¹ promueve la acumulación de proteínas de diversos procesos biológicos en la raíz, que han sido previamente vinculados a la defensa en vegetal. Además, también promueve la acumulación de metabolitos de tipo flavonoide y derivados del antranilato, que han sido relacionados a cultivares de clavel resistentes a *Fod*. Esto sugiere que la adición del bioestimulante está causando la sensibilización de la planta (*priming*). Resultados similares se obtienen en un cultivar resistente ('Golem').

Adicionalmente, la aplicación foliar de tiamina en las mismas condiciones, y la posterior inoculación con el patógeno, permitió encontrar resultados similares (es decir, respuestas asociadas a defensa vegetal), a nivel de proteínas y metabolitos, respuesta que se puede correlacionar con la disminución de síntomas observados en la evaluación fenotípica en los dos cultivares de clavel. Estos resultados confirman el papel de la tiamina como inductor de resistencia al marchitamiento vascular causado por *Fod* en clavel.

Finalmente, los resultados de esta tesis doctoral aportan de manera significativa a la comprensión del fenómeno por el cual la aplicación de tiamina induce resistencia en el clavel. Con una exploración complementaria, la aplicación de tiamina podrá sugerirse como una alternativa sostenible del control del marchitamiento vascular en clavel que tendrá un impacto positivo en el sector productivo.

6.2 Recomendaciones

El estudio realizado sugiere la activación de procesos de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), lo cual se podría verificar a través del análisis de marcadores específicos de esta ruta como las proteínas PR1 y NPR1, y la medición de metabolitos como ácido salicílico y salicilato de metilo, además de la verificación de los resultados encontrados a nivel de proteómica que se podría realizar por otras técnicas como la evaluación de los niveles transcripcionales e incluso transcriptómica. Además, dado que el efecto de la aplicación de tiamina llevó a la sobrerregulación de flavonoides con diversas modificaciones estructurales, el estudio de los niveles transcripcionales de genes codificantes de enzimas relevantes para estas modificaciones e incluso en pasos claves de la ruta biosintética, aportaría información relevante para la profundización sobre el rol de esos procesos en la inducción mediada por tiamina.

Teniendo en cuenta que los metabolitos regulados por los tratamientos incluyen bioquímicos involucrados en el metabolismo primario y secundario, una posibilidad para ampliar la información a nivel del metaboloma es hacer un análisis de metabolómica no dirigida, con los correspondientes sistemas de extracción, y la aplicación de otras técnicas de identificación como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o la resonancia magnética nuclear. Esto permitiría la identificación de una mayor cantidad de metabolitos y su cuantificación, lo que ayudaría a comprender mejor la respuesta de la planta a los tratamientos, las rutas metabólicas afectadas, y a descubrir otros metabolitos implicados en la inducción de resistencia por tiamina al marchitamiento vascular del clavel.

Para continuar con el proyecto, sería ideal realizar un análisis en campo de la aplicación de los inductores de resistencia. Sin embargo, debido a que liberar el patógeno en condiciones de producción conllevaría un riesgo potencial de propagación de este, lo cual afectaría negativamente al sector productivo, esta exploración debe orientarse bajo un diseño estrictamente controlado que puede tener limitaciones prácticas. En este sentido, se podría considerar la realización del estudio en locaciones donde se ha reportado incidencia de la enfermedad. Además, se podría evaluar el efecto de la aplicación del inductor sin la inoculación del patógeno, a fin de observar la respuesta y la posible identificación de marcadores de activación del sistema inmune innato de la planta. Para esto, se podrían considerar algunas proteínas o metabolitos encontrados en este estudio que han

demostrado tener un papel importante en la respuesta de la planta a la enfermedad. De esta forma, se podría obtener información relevante sobre el efecto de los inductores de resistencia en las plantas, sin comprometer la seguridad del sector productivo.

En la actualidad, se está investigando el uso de nanopartículas como una posible solución para la aplicación de inductores de resistencia en diversas especies vegetales. Ya se ha reportado el uso de nanopartículas para la aplicación de tiamina en garbanzos contra *Fusarium oxysporum* con resultados positivos, lo que sugiere una posible vía para la aplicación de esta sustancia en otras plantas. En este sentido, como una futura investigación para el clavel, se podría explorar la posibilidad de utilizar nanopartículas cargadas con tiamina para la aplicación de inductores de resistencia en esta especie.

Bibliografía

- Abd-elsalam, K. A., Aly, I. N., Abdel-satar, M. A., Khalil, M. S., & Verreet, J. A. (2003). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*, 2(4), 82–85. <https://doi.org/10.4314/ajb.v2i4.14830>
- Abdel Monaim, M. F. (2011). Role of riboflavin and thiamine in induced resistance against charcoal rot disease of soybean. *African Journal of Biotechnology*, 10(53), 10842–10855. <https://doi.org/10.5897/ajb11.253>
- Abdul Hasseb, H., Zhang, J., Guo, Y. shuang, Gao, M. xu, & Guo, W. (2022). Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from maize stem apoplast triggered by *Fusarium verticillioides*. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(2), 446–459. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(21\)63657-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63657-2)
- Ahmad, M. Z., Li, P., Wang, J., Rehman, N. U., & Zhao, J. (2017). Isoflavone malonyltransferases GmiMaT1 and GmiMaT3 differently modify isoflavone glucosides in soybean (*Glycine max*) under various stresses. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00735>
- Ahmed, A. M. H., Sayed, S. A., Farghaly, F. A., & Radi, A. A. F. (2016). Induction of resistance in Safflower plant against root rot and wilt diseases by certain inducers. *Journal of Phytopathology and Pest Management*, 3(3), 24–34.
- Ahn, I., Kim, S., & Lee, Y. H. (2005). Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiology*, 138, 1505–1515. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058693.cytosolic>
- Ahn, I., Kim, S., Lee, Y. H., & Suh, S. C. (2007). Vitamin B1-induced *priming* is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in arabidopsis. *Plant Physiology*, 143, 838–848. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092627>
- Akram, W., Anjum, T., & Ali, B. (2016). Phenylacetic acid is ISR determinant produced by *Bacillus fortis* IAGS162, which involves extensive re-modulation in metabolomics of tomato to protect against *Fusarium* wilt. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00498>
- Aleandri, M. P., Reda, R., Tagliavento, V., Magro, P., & Chilosi, G. (2010). Effect of chemical resistance inducers on the control of *Monosporascus* root rot and vine decline of melon. *Phytopathologia Mediterranea*, 49(1), 18–26. https://doi.org/10.14601/phytopathol_mediterr-3117
- Alexandersson, E., Mulugeta, T., Lankinen, Å., & Liljeroth, E. (2016). Plant Resistance Inducers against

- Pathogens in Solanaceae Species — From Molecular Mechanisms to Field Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1673. <https://doi.org/10.3390/ijms17101673>
- Anup, C. P., Melvin, P., Shilpa, N., Gandhi, M. N., Jadhav, M., Ali, H., & Kini, K. R. (2015). Proteomic analysis of elicitation of downy mildew disease resistance in pearl millet by seed priming with β -aminobutyric acid and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Proteomics*, 120, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.013>
- Arbelaez G. y Calderon O.L. (1991). Determinacion de las razas fisiologicas de *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 8(2), 243–247.
- Ardila, Harold Duban, Baquero, B., & Martínez, S. (2007). Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* raza 2. *Revista Colombiana de Química*, 36(2), 151–167.
- Ardila, Harold Duban, & Higuera, B. L. (2005). Inducción diferencial de polifenoloxidasas y B-1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biologica Colombiana*, 10(2), 61–74.
- Ardila, Harold Duban, Martínez, S. T., & Higuera, B. L. (2013). Levels of constitutive flavonoid biosynthetic enzymes in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars with differential response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1233–1245. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1162-0>
- Ardila, Harold Duban, Raquel, G. F., Higuera, B. L., Redondo, I., & Martínez, S. T. (2014). Protein extraction and gel-based separation methods to analyze responses to pathogens in carnation (*Dianthus caryophyllus* L). In J. V. Jorrín-Novo, S. Komatsu, W. Weckwerth, & S. Wienkoop (Eds.), *Plant Proteomics: Methods and Protocols* (2nd ed., Vol. 1072, pp. 573–591). Humana Press - Springer Protocols. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3_39
- Ardila, Harold Duban, Torres, A. M., Martínez, S. T., & Higuera, B. L. (2014). Biochemical and molecular evidence for the role of class III peroxidases in the resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 85, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.01.003>
- Ardila, Harold Duban. (2013). *Contribución al estudio de algunos componentes bioquímicos y moleculares de la resistencia del clavel (Dianthus caryophyllus L) al patógeno Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. Universidad Nacional de Colombia.
- Asensi-Fabado, M., & Munné-Bosch, S. (2010). Vitamins in plants: Occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends in Plant Science*, 15(10), 582–592. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.07.003>
- Baayen, R. P., & Niemann, G. J. (1989). Correlations between Accumulation of Dianthramides, Dianthalexin and Unknown Compounds, and Partial Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Eleven Carnation Cultivars. *Journal of Phytopathology*, 126(4), 281–292. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1989.tb04491.x>
- Bahuguna, R. N., Joshi, R., Shukla, A., Pandey, M., & Kumar, J. (2012). Thiamine primed defense

- provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.003>
- Banasiak, J., Biała, W., Staszów, A., Swarcewicz, B., Kępczyńska, E., Figlerowicz, M., & Jasiński, M. (2013). A *Medicago truncatula* ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. *Journal of Experimental Botany*, 64(4), 1005–1015. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers380>
- Basallote-Ureba, M. J., Vela-Delgado, M. D., Capote, N., Melero-Vara, J. M., López-Herrera, C. J., Prados-Ligero, A. M., & Talavera-Rubia, M. F. (2016). Control of *Fusarium* wilt of carnation using organic amendments combined with soil solarization, and report of associated *Fusarium* species in southern Spain. *Crop Protection*, 89, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.013>
- Behr, M., Neutelings, G., El Jaziri, M., & Baucher, M. (2020). You Want it Sweeter: How Glycosylation Affects Plant Response to Oxidative Stress. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.571399>
- Bertini, L., Palazzi, L., Proietti, S., Pollastri, S., Arrigoni, G., de Laureto, P. P., & Caruso, C. (2019). Proteomic analysis of MeJa-induced defense responses in rice against wounding. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2025), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms20102525>
- Bheri, M., M. Bhosle, S., & Makandar, R. (2019). Shotgun proteomics provides an insight into pathogenesis-related proteins using anamorphic stage of the biotroph, *Erysiphe pisi* pathogen of garden pea. *Microbiological Research*, 222, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.006>
- Boubakri, H. (2017). The Role of Ascorbic Acid in Plant – Pathogen Interactions The Role of Ascorbic Acid in Plant – Pathogen Interactions. In Hossain, M, S. Munné-Bosch, D. Burritt, P. Diaz-Vivancos, M. Fujita, & A. Lorence (Eds.), *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance* (Issue January, pp. 255–271). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74057-7>
- Boubakri, H. (2020). Induced resistance to biotic stress in plants by natural compounds : Possible mechanisms. In M. A. Hossain, F. Liu, D. J. Burritt, M. Fujita, & B. Huang (Eds.), *Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants*. Academic Press Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817892-8.00005-2>
- Boubakri, H., Gargouri, M., Mliki, A., Brini, F., Chong, J., & Jbara, M. (2016). Vitamins for enhancing plant resistance. *Planta*, 244(3), 529–543. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2552-0>
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M. A., Clayeux, C., Baltenweck-guyot, R., Steyer, D., Marcic, C., Mliki, A., & Soustre-gacougnolle, I. (2013). Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-31>
- Boubakri, H., Wahab, M., Chong, J., Bertsch, C., Mliki, A., & Soustre, I. (2012). Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defense responses, including HR like-cell death.

- Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.016>
- Camoni, L., Visconti, S., Aducci, P., & Marra, M. (2018). 14-3-3 proteins in plant hormone signaling: Doing several things at once. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00297>
- Carvalho, H. H., Silva, P. A., Mendes, G. C., Brustolini, O. J. B., Pimenta, M. R., Gouveia, B. C., Valente, M. A. S., Ramos, H. J. O., Soares-Ramos, J. R. L., & Fontes, E. P. B. (2014). The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiology*, 164(2), 654–670. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231928>
- Castillejo, María Ángeles, Bani, M., & Rubiales, D. (2015). Understanding pea resistance mechanisms in response to *Fusarium oxysporum* through proteomic analysis. *Phytochemistry*, 115(1), 44–58. <https://doi.org/10.1210/endo-22-1-92>
- Castillejo, Mariá Ángeles, Fondevilla, S., Fuentes, C., & Rubiales, D. (2020). Quantitative Analysis of Target Peptides Related to Resistance against Ascochyta Blight (*Peyronellaea pinodes*) in Pea. *Journal of Proteome Research*, 19(3), 1000–1012. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00365>
- Chandrasekhar, B., Umesha, S., & Naveen Kumar, H. N. (2017). Proteomic analysis of salicylic acid enhanced disease resistance in bacterial wilt affected chilli (*Capsicum annuum*) crop. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 98, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.04.002>
- 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.12.1169>
- Clematis, F., Tedeschini, J., Dolci, M., Lanzotti, V., & Cangelosi, B. (2011). Phenol Composition and Susceptibility to *Fusarium oxysporum Dianthi* in Carnation. *Journal of Life Sciences*, 5, 921–925.
- Cuervo, D. C. (2017). *Estudio bioquímico y molecular de algunas enzimas asociadas al estrés oxidativo en apoplasto de clavel (Dianthus caryophyllus L.) durante su interacción con Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*. Universidad Nacional de Colombia.
- Cuervo, D., Martínez, S., Ardila, H., & Higuera, B. (2009). Differential Induction of Peroxidase Enzyme and Its relationship with lignification in carnation defense (*dianthus caryophyllus* l.) mechanism against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Revista Colombiana de Química*, 38(3), 379–393.
- Cueto-Ginzo, A. I., Serrano, L., Bostock, R. M., Ferrio, J. P., Rodríguez, R., Arcal, L., Achon, M. Á., Falcioni, T., Luzuriaga, W. P., & Medina, V. (2016). Salicylic acid mitigates physiological and proteomic changes induced by the SPCP1 strain of Potato virus X in tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 93, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.11.003>
- Curir, P., Dolci, M., Dolci, P., Lanzotti, V., & De Cooman, L. (2003). Fungitoxic phenols from carnation (*Dianthus caryophyllus*) effective against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytochemical Analysis*, 14(1), 8–12. <https://doi.org/10.1002/pca.672>
- Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V., & Tagliatela-Scafati, O. (2001). Kaempferide triglycoside: A possible factor of resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus*) to *Fusarium oxysporum* f.

- sp. *dianthi*. *Phytochemistry*, 56(7), 717–721. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00488-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00488-X)
- Darwesh, Y., Nour El-deen, A., & Fayad Eman, M. (2015). In-Vitro Investigation for Improving Secondary Metabolites in Origanum Vulgare Plants Using Tissue Culture Technique at Taif Governorate, KSA. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1117), 1117–1122.
- de Borba, M., Velho, A., Maia-Grondard, A., Baltenweck, R., Magnin, M., Randoux, B., Holvoet, M., Hilbert, J., Flahaut, C., Reignault, P., Huguene, P., Stadnik, M., & Siah, A. (2021). The Algal Polysaccharide Ulvan Induces Resistance in Wheat Against *Zymoseptoria tritici* Without Major Alteration of Leaf Metabolome. *Frontiers in Plant Science*, 12, 703712. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.703712>
- Dehestani, M., Gholamnezhad, J., Alizadeh, S., Meftahizadeh, H., & Ghorbanpour, M. (2022). Salicylic acid and herbal extracts prolong vase life and improve quality of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flower. *South African Journal of Botany*, 150, 1192–1204. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.028>
- Devi, B., Singh, G., Dash, A. K., & Gupta, S. K. (2020). Chemically induced systemic acquired resistance in the inhibition of French bean rust. *Current Plant Biology*, 23, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100151>
- Días Puentes, L. N. (2012). Systemic Acquired Resistance Induced By Salicylic Acid Resistência Sistêmica Adquirida. *Biocología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 257–267.
- Dong, W., Stockwell, V. O., & Goyer, A. (2015). Enhancement of Thiamin Content in Arabidopsis thaliana by Metabolic Engineering. *Plant & Cell Physiology*, 56(12), 2285–2296. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv148>
- El Kasmi, F., Chung, E. H., Anderson, R. G., Li, J., Wan, L., Eitas, T. K., Gao, Z., & Dangl, J. L. (2017). Signaling from the plasma-membrane localized plant immune receptor RPM1 requires self-association of the full-length protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(35), E7385–E7394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708288114>
- Fernandes, L. B., & Ghag, S. B. (2022). Molecular insights into the jasmonate signaling and associated defense responses against wilt caused by *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 174(January), 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.01.032>
- Fernández-Cabanás, V. M., Borrero, C., Cozzolino, D., & Avilés, M. (2022). Feasibility of near infrared spectroscopy for estimating suppressiveness of carnation (*Dianthus carioophyllus* L.) fusarium wilt in different plant growth media. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 280, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121528>
- Finkina, E. I., Melnikova, D. N., Bogdanov, I. V., & Ovchinnikova, T. V. (2017). Plant Pathogenesis-Related Proteins PR-10 and PR-14 as Components of Innate Immunity System and Ubiquitous Allergens. *Current Medicinal Chemistry*, 24, 1772–1787. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161026154111>
- Galeotti, F., Barile, E., Lanzotti, V., Dolci, M., & Curir, P. (2008). Quantification of Major Flavonoids in Carnation Tissues. *Z Naturforsch*, 63, 161–168.
- Gao, H., Ma, K., Ji, G., Pan, L., Wang, Z., Cui, M., & Zhou, Q. (2022). Protein glycosylation

- changes during systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 212, 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.126>
- Gao, H., Ma, K., Ji, G., Pan, L., & Zhou, Q. (2022). Lipid transfer proteins involved in plant–pathogen interactions and their molecular mechanisms. *Molecular Plant Pathology*, 23(12), 1815–1829. <https://doi.org/10.1111/mpp.13264>
- Goellner, K., & Conrath, U. (2008). Priming: It's all the world to induced disease resistance. *Sustainable Disease Management in a European Context*, 121, 233–242. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8780-6_3
- Gómez García, L., & Martínez, S. T. (2005). Inducción de dos enzimas pectolíticas en el modelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* - clavel. *Revista Colombiana de Química*, 34(1), 25–34.
- González-Bosch, C. (2018). Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.028>
- Goyer, A. (2010). Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, 71(14–15), 1615–1624. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.022>
- Gullino, M. L., Daughtrey, M. L., Garibaldi, A., & Elmer, W. H. (2015). Fusarium wilts of ornamental crops and their management. *Crop Protection*, 73, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.003>
- Gullner, G., Komives, T., Király, L., & Schröder, P. (2018). Glutathione S-transferase enzymes in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 871, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01836>
- Hamada, A. M., Fatehi, J., & Jonsson, L. M. V. (2017). Seed treatments with thiamine reduce the performance of generalist and specialist aphids on crop plants. *Bulletin of Entomological Research*, 108(1), 84–92. <https://doi.org/10.1017/S0007485317000529>
- Hamada, Afaf M, & Jonsson, L. M. V. (2013). Thiamine treatments alleviate aphid infestations in barley and pea. *Phytochemistry*, 94, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.012>
- Higuera, B. L. (2001). *Contribución al estudio de la participación de los compuestos fenólicos en los mecanismos de la interacción Clavel Dianthus caryophyllus L. - Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. Universidad Nacional de Colombia.
- Hirakawa, H. (2020). Draft genome sequence. In T. Onozaki & M. Yagi (Eds.), *The carnation genome. Compendium of Plant Genomes* (pp. 1–12). Springer Nature.
- Hönig, M., Roeber, V. M., Schmülling, T., & Cortleven, A. (2023). Chemical priming of plant defense responses to pathogen attacks. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1146577>
- Hosseinii Zarandi, M. M., Yali, M. P., & Ahmadi, K. (2022). Induction of Resistance to *Macrosiphum rosae* by Foliar Application of Salicylic Acid and Potassium Sulfate in Rose Plant. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 9(2), 227–236. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2021.305196.378>
- Huang, W. K., Ji, H. L., Gheysen, G., & Kyndt, T. (2016). Thiamine-induced priming against root-knot nematode infection in rice involves lignification and hydrogen peroxide generation. *Molecular Plant Pathology*, 17(4), 614–624. <https://doi.org/10.1111/mpp.12316>

- Ibraheem, F., Gaffoor, I., & Chopra, S. (2010). Flavonoid phytoalexin-dependent resistance to anthracnose leaf blight requires a functional yellow seed1 in *Sorghum bicolor*. *Genetics*, *184*(4), 915–926. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.111831>
- International Trade Center. (2022). *Lista de los mercados importadores para un producto exportado por Colombia en 2021 Producto : 060312 "Claveles" "flores y capullos" "cortados para ramos o adornos, frescos"*. Trade Map: Estadísticas Del Comercio Para El Desarrollo Internacional de Las Empresas. <https://www.trademap.org>
- Jain, A., Singh, H. B., & Das, S. (2021). Deciphering plant-microbe crosstalk through proteomics studies. *Microbiological Research*, *242*, 126590. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126590>
- Jawaharlal, M., Ganga, M., Padmadevi, K., Jegadeeswari, V., & Karthikeyan, S. (2010). *A technical guide on carnation*. College and Research Institute Tamil Nadu Agricultural University.
- Ji, H., Peng, Y., Meckes, N., Allen, S., Stewart, C. N., & Traw, M. B. (2014). ATP-dependent binding cassette transporter G family member 16 increases plant tolerance to abscisic acid and assists in basal resistance against *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiology*, *166*(2), 879–888. <https://doi.org/10.1104/pp.114.248153>
- Jia, X., Qin, H., Bose, S. K., Liu, T., He, J., Xie, S., Ye, M., & Yin, H. (2020). Proteomics analysis reveals the defense priming effect of chitosan oligosaccharides in Arabidopsis-Pst DC3000 interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, *149*, 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.037>
- Jorrín-novo, J. V., Maldonado, A. M., Echevarría-zomeño, S., Valledor, L., Castillejo, M. A., Curto, M., Valero, J., Sghaier, B., Donoso, G., & Redondo, I. (2009). Plant proteomics update (2007 – 2008): Second-generation proteomic techniques , an appropriate experimental design , and data analysis to fulfill MIAPE standards , increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of Proteomics*, *72*(3), 285–314. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.026>
- Joshi, S. M., De Britto, S., & Jogaiah, S. (2021). Myco-engineered selenium nanoparticles elicit resistance against tomato late blight disease by regulating differential expression of cellular, biochemical and defense responsive genes. *Journal of Biotechnology*, *325*, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.023>
- Kamarudin, A. N., Lai, K. S., Lamasudin, D. U., Idris, A. S., & Balia Yusof, Z. N. (2017). Enhancement of thiamine biosynthesis in oil palm seedlings by colonization of endophytic fungus *hendersonia toruloidea*. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01799>
- Karmakar, S., Datta, K., Molla, K. A., Gayen, D., Das, K., Sarkar, S. N., & Datta, S. K. (2019). Proteo-metabolomic investigation of transgenic rice unravels metabolic alterations and accumulation of novel proteins potentially involved in defence against *Rhizoctonia solani*. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46885-3>
- Katam, R., Lin, C., Grant, K., Katam, C. S., & Chen, S. (2022). Advances in Plant Metabolomics

- and Its Applications in Stress and Single-Cell Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 1–35. <https://doi.org/10.3390/ijms23136985>
- Kheyri, F., Taheri, P., & Jafarinejad-Farsangi, S. (2022). Thiamine and Piriformospora indica induce bean resistance against *Rhizoctonia solani*: The role of polyamines in association with iron and reactive oxygen species. *Biological Control*, 172, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104955>
- Kim, D. S., & Hwang, B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2295–2306. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru109>
- Kumar, Y., Dholakia, B. B., Panigrahi, P., Kadoo, N. Y., Giri, A. P., & Gupta, V. S. (2015). Metabolic profiling of chickpea-Fusarium interaction identifies differential modulation of disease resistance pathways. *Phytochemistry*, 116(1), 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.04.001>
- Kuźniak, E. (2010). The Ascorbate–Glutathione cycle and related redox signals in plant–pathogen interactions. In N. A. Anjum, S. Umar, & M. T. Chan (Eds.), *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants* (1st ed., pp. 115–136). Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9404-9>
- Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., & Neutelings, G. (2016). Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(735), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00735>
- Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., & Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control*, 101, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.004>
- Lee, I., Seo, Y., Coltrane, D., Hwang, S., Oh, T., & Marcotte, E. M. (2011). Genetic dissection of the biotic stress response using a genome-scale gene network for rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18548–18553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110384108>
- Lemaître-Guillier, C., Hovasse, A., Schaeffer-Reiss, C., Recorbet, G., Poinssot, B., Trouvelot, S., Daire, X., Adrian, M., & Héloir, M. C. (2017). Proteomics towards the understanding of elicitor induced resistance of grapevine against downy mildew. *Journal of Proteomics*, 156, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.01.016>
- Li, Lin, Zhu, X. M., Zhang, Y. R., Cai, Y. Y., Wang, J. Y., Liu, M. Y., Wang, J. Y., Bao, J. D., & Lin, F. C. (2022). Research on the Molecular Interaction Mechanism between Plants and Pathogenic Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23094658>
- Li, Linlin, Guo, P., Jin, H., & Li, T. (2016). Different Proteomics of Ca²⁺ on SA-induced Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato. *Horticultural Plant Journal*, 2(3), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2016.08.004>
- Li, X., Bai, T., Li, Y., Ruan, X., & Li, H. (2013). Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4-inoculated response to Fusarium wilts in the banana root cells. *Proteome Science*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-11-41>
- Li, Y., Xiong, W., He, F., Qi, T., Sun, Z., Liu, Y., Bai, S., Wang, H., Wu, Z., & Fu, C. (2022). Down-

- regulation of PvSAMS impairs S-adenosyl-L-methionine and lignin biosynthesis, and improves cell wall digestibility in switchgrass. *Journal of Experimental Botany*, 73(12), 4157–4169. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac147>
- Lightfoot, D. J., Mcgrann, G., & Able, A. J. (2017). The role of a cytosolic superoxide dismutase in barley–pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 323–335. <https://doi.org/10.1111/mpp.12399>
- Lim, S., Borza, T., Peters, R. D., Coffin, R. H., Al-Mughrabi, K. I., Pinto, D. M., & Wang-Pruski, G. (2013). Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. In *Journal of Proteomics* (Vol. 93). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.010>
- Lin, C. H., Pan, Y., Ye, N., Shih, Y., Liu, F. W., & Chen, C. Y. (2020). LsGRP1, a class II glycine-rich protein of *Lilium*, confers plant resistance via mediating innate immune activation and inducing fungal programmed cell death. *Molecular Plant Pathology*, 21(9), 1149–1166. <https://doi.org/10.1111/mpp.12968>
- Liu, B., Stevens-Green, R., Johal, D., Buchanan, R., & GeddeSMcAlister, J. (2022). Fungal pathogens of cereal crops: Proteomic insights into fungal pathogenesis, host defense, and resistance. *Journal of Plant Physiology*, 269, 153593. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153593>
- Liu, Z., Zhang, M., Chen, P., Harnly, J. M., & Sun, J. (2022). Mass Spectrometry-Based Nontargeted and Targeted Analytical Approaches in Fingerprinting and Metabolomics of Food and Agricultural Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(36), 11138–11153. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01878>
- Llorens, E., García-Agustín, P., & Lapeña, L. (2017). Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Scientia Agricola*, 74(1), 90–100. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0012>
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Campos, L., Rodrigo, I., Rambla, J. L., Granell, A., Conejero, V., & Bellés, J. M. (2017). A Non-targeted Metabolomics Approach Unravels the VOCs Associated with the Tomato Immune Response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01188>
- Lorenc-Kukuła, K., Wróbel-Kwiatkowska, M., Starzycki, M., & Szopa, J. (2007). Engineering flax with increased flavonoid content and thus Fusarium resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70(1–3), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.05.005>
- Lozano-Durán, R., & Robatzek, S. (2015). 14-3-3 Proteins in plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(5), 511–518. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0322-CR>
- MADR, A.-. (2022). *Asocolflores y el éxito de la floricultura colombiana en los mercados internacionales*. Agronet. <https://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Asocolflores-y-el-exito-de-la-floricultura-colombiana-en-loSMercados-internacionales.aspx>
- Maldonado Alconada, M. A., Castillejo, M. Á., Rey, M. D., Labella, M., Tienda Parrilla, M., Hernández

- Lao, T., Honrubia, I., Ramírez, J., Guerrero, V., López, C., Valledor, L., Navarro, R., & Jorriñovo, J. V. (2022). Multiomics Molecular Research into the Recalcitrant and Orphan Quercus ilex Tree Species: Why, What for and How. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9980), 1–26.
- Manghwar, H., & Li, J. (2022). Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response Signaling in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020828>
- Martínez-González, A. P., Coy-barrera, E., & Ardila, H. D. (2022). Extraction and analysis of apoplastic phenolic metabolites in carnation roots and stems (*Dianthus caryophyllus* L). *Revista Colombiana de Química*, 51(1), 3–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v51n1.99258>
- Martínez González, A. P. (2019). *Contribución al estudio de los fenómenos bioquímicos y fenómenos bioquímicos y moleculares del apoplasto de clavel moleculares del apoplasto de clavel (Dianthus caryophyllus L) durante su interacción con Fusarium*. Universidad Nacional de Colombia.
- Matern, U. (1994). *Dianthus* Species (Carnation): In Vitro Culture and the Biosynthesis of Dianthalexin and Other Secondary Metabolites. In Y. Bajaj (Ed.), *Medicinal and Aromatic Plants* (pp. 170–184). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-662-30369-6_12
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Mehta, C. M., Palni, U., Franke-Whittle, I. H., & Sharma, A. K. (2014). Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Management*, 34(3), 607–622. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.012>
- Melero-Vara, J. M., López-Herrera, C. J., Prados-Ligero, A. M., Vela-Delgado, M. D., Navas-Becerra, J. A., & Basallote-Ureba, M. J. (2011). Effects of soil amendment with poultry manure on carnation Fusarium wilt in greenhouses in southwest Spain. *Crop Protection*, 30(8), 970–976.
- Mhlongo, M. I., Tugizimana, F., Piater, L. A., Steenkamp, P. A., Madala, N. E., & Dubery, I. A. (2017). Untargeted metabolomics analysis reveals dynamic changes in azelaic acid- and salicylic acid derivatives in LPS-treated *Nicotiana tabacum* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 1498–1503. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.063>
- Mhlongo, Msizi I., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., Madala, N. E., & Dubery, I. A. (2016). Profiling of altered metabolomic states in *Nicotiana tabacum* cells induced by priming agents. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01527>
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). *Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment*. 16240–16265. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
- Mohammadi, M. A., Zhang, Z., Xi, Y., Han, H., Lan, F., Zhang, B., & Wang-Pruski, G. (2019). Effects of potassium phosphite on biochemical contents and enzymatic activities of chinese potatoes inoculated

- by *phytophthora infestans*. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(2), 4499–4514.
- Morkunas, I., Formela, M., Floryszak-Wieczorek, J., Marczak, Ł., Narozna, D., Nowak, W., & Bednarski, W. (2013). Cross-talk interactions of exogenous nitric oxide and sucrose modulates phenylpropanoid metabolism in yellow lupine embryo axes infected with *Fusarium oxysporum*. *Plant Science*, 211, 102–121. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.007>
- Moya-Elizondo, E. A., & Jacobsen, B. J. (2016). Integrated management of *Fusarium* crown rot of wheat using fungicide seed treatment, cultivar resistance, and induction of systemic acquired resistance (SAR). *Biological Control*, 92, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.006>
- Naeem Bajwa, M., Bibi, A., Zaeem Idrees, M., Zaman, G., Farooq, U., & Tufail Bhatti, T. (2021). Elicitation, A Mechanistic Approach to Change the Metabolic Pathway of Plants to Produce Pharmacological Important Compounds in In-vitro Cell Cultures. *Global Journal of Engineering Sciences*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.33552/gjes.2021.08.000678>
- Nakkeeran, S., Vinodkumar, S., Dheepa, R., & Renukadevi, P. (2018). Diseases of Carnation and their management. In V. Devappa, D. Singh, & S. Jahagirdar (Eds.), *Diseases of Ornamental Crops* (pp. 99–130). Indian Phytopathological Society.
- Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell*, 34, 1447–1478. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>
- Niemann, G. J., & Baayen, R. P. (1988). Involvement of phenol metabolism in resistance of *Dianthus caryophyllus* to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94(6), 289–301. <https://doi.org/10.1007/BF01998054>
- OMS. (2019). *Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación* (Organización Mundial de la salud (ed.)).
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Fadiji, A. E., Babalola, O. O., & Santoyo, G. (2023). Bacterial elicitors of the plant immune system: An overview and the way forward. *Plant Stress*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100138>
- Overbeek, L. van, Leiss, K., Bac-Molenaar, J., Duhamel, M., & Mouden, S. (2022). *Plant resilience - role of chemical and microbial elicitors on metabolome and microbiome* (Issue WPR-1043). <https://doi.org/10.18174/566561>
- Paraschivu, M., Simnic-craiova, D. S., Timisoara, V. M., Faculty, H., & County, D. (2013). The use of the area under the disease progress curve (AUDPC) to assess the epidemics of septoria tritici in winter wheat. *Research Journal of Agricultural Science*, 45(1), 193–201.
- Pastor-Fernández, J., Sánchez-Bel, P., Gamir, J., Pastor, V., Sanmartín, N., Cerezo, M., Andrés-Moreno, S., & Flors, V. (2022). Tomato Systemin induces resistance against *Plectosphaerella cucumerina* in Arabidopsis through the induction of phenolic compounds and priming of tryptophan derivatives. *Plant Science*, 321, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111321>

- Pérez-Mora, W., Jorrin-Novo, J. V., & Melgarejo, L. M. (2018). Substantial equivalence analysis in fruits from three *Theobroma* species through chemical composition and protein profiling. *Food Chemistry*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.128>
- Pérez Mora, W., Melgarejo, L. M., & Ardila, H. D. (2021). Effectiveness of some resistance inducers for controlling carnation vascular wilting caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(13–14), 886–902. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1868734>
- Pérez Mora, W., Castillejo, M. Á., Jorrín Novo, J., Melgarejo, L. M., & Ardila, H. D. (2024). Thiamine-induced resistance in carnation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and mode of action studies based on the proteomics analysis of root tissue. *Scientia Horticulturae*, 323, 112549. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112549>
- Pinto, K. M. S., Cordeiro, L., de Souza Gomes, H., da Silva, H. F., & Miranda, J. dos reis. (2012). Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 745–754. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0050-1>
- Pizano de M, M. (2000). *Clavel (Dianthus caryophyllus L)* (E. Hortitecnia (ed.)).
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11(395), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Poli, A., Bertetti, D., Rapetti, S., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2013). Characterization and identification of Colombian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Journal of Plant Pathology*, 95(2), 255–263.
- Poór, P., Czékus, Z., Tari, I., & Ördög, A. (2019). The multifaceted roles of plant hormone salicylic acid in endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235842>
- Porter, K., Shimono, M., Tian, M., & Day, B. (2012). Arabidopsis Actin-Depolymerizing Factor-4 Links Pathogen Perception, Defense Activation and Transcription to Cytoskeletal Dynamics. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1003006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003006>
- Pushpalatha, H. G., Sudisha, J., Geetha, N. P., Amruthesh, K. N., & Shetty, H. S. (2011). Thiamine seed treatment enhances LOX expression, promotes growth and induces downy mildew disease resistance in pearl millet. *Biologia Plantarum*, 55(3), 522–527. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0118-3>
- Ramagli, L. S., & Rodriguez, L. V. (1985). Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis*, 6(11), 559–563. <https://doi.org/10.1002/elps.1150061109>
- Ramaroson, M. L., Koutouan, C., Helesbeux, J. J., Le Clerc, V., Hamama, L., Geoffriau, E., & Briard, M. (2022). Role of Phenylpropanoids and Flavonoids in Plant Resistance to Pests and Diseases. *Molecules*, 27(8371), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules27238371>

- Ramos, O., Smith, M., Fritz, A. K., & Madl, R. L. (2017). Salicylic Acid-Mediated Synthetic Elicitors of Systemic Acquired Resistance Administered to Wheat Plants at Jointing Stage Induced Phenolics in Mature Grains. *Crop Science*, 3128, 3122–3128. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.11.0697>
- Riaz, T., Khan, S. N., & Javaid, A. (2009). Effect of co-cultivation and crop rotation on corm rot disease of Gladiolus. *Scientia Horticulturae*, 121(2), 218–222. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.041>
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., & Mysore, K. S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00017>
- Romanazzi, G., Sanzani, S. M., Bi, Y., Tian, S., Gutiérrez Martínez, P., & Alkan, N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.003>
- Romero-Cuervo, W. A., Pinzon-Sandoval, E. H., & Luis-Ayala, M. A. (2021). Phenology and growth flower of *Dianthus caryophyllus* L. cv. 'MOON LIGHT' under greenhouse. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 39(1), 7–15. <https://doi.org/10.22267/rcia.223901.167>
- Romero-Rincón, A., Martínez, S. T., Higuera, B. L., Coy-Barrera, E., & Ardila, H. D. (2021). Flavonoid biosynthesis in *Dianthus caryophyllus* L. is early regulated during interaction with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytochemistry*, 192, 112933. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112933>
- Romero Rincón, A. E. (2020). *Efecto de la Aplicación de Elicitores de Origen Biótico en la Biosíntesis de Flavonoides en Clavel (Dianthus caryophyllus L) Durante la Interacción con Fusarium oxysporum f sp. dianthi*. Universidad Nacional de Colombia.
- Sadeghi, B., Mirzaei, S., & Fatehi, F. (2022). The proteomic analysis of the resistance responses in tomato during interaction with *Alternaria alternate*. *Scientia Horticulturae*, 304, 111295. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111295>
- Saikia, R., Yadav, M., Varghese, S., Singh, B. P., Gogoi, D. K., Kumar, R., & Arora, D. K. (2006). Role of riboflavin in induced resistance against Fusarium wilt and charcoal rot diseases of chickpea. *Plant Pathology Journal*, 22(4), 339–347. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2006.22.4.339>
- Sanabria, K., Pérez, W., & Andrade, J. L. (2020). Effectiveness of resistance inductors for potato late blight management in Peru. *Crop Protection*, 137, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105241>
- Sant, D., Casanova, E., Segarra, G., Avilés, M., Reis, M., & Trillas, M. I. (2010). Effect of Trichoderma asperellum strain T34 on Fusarium wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. *Biological Control*, 53(3), 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.01.012>
- Santos-Rodríguez, J., Coy, E., & Ardila, H. D. (2021). Mycelium Dispersion from *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Elicits a Reduction of Wilt Severity and Influences Phenolic Profiles of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Roots. *Plants*, 10(1447), 1–20. <https://doi.org/10.3390/plants10071447>
- Sathiyabama, M., Gandhi, M., & Indhumathi, M. (2022). Suppression of dry root rot disease caused by *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler in chickpea plants by application of thiamine loaded chitosan

- nanoparticles. *Microbial Pathogenesis*, 173(PB), 105893. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105893>
- Sathiyabama, M., & Indhumathi, M. (2022). Chitosan thiamine nanoparticles intervene innate immunomodulation during Chickpea-Fusarium interaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 198, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.105>
- Sathiyabama, Muthukrishnan, Indhumathi, M., & Muthukumar, S. (2019). Chitosan nanoparticles loaded with thiamine stimulate growth and enhances protection against wilt disease in Chickpea. *Carbohydrate Polymers*, 212, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.037>
- Schwachtje, J., Fischer, A., Erban, A., & Kopka, J. (2018). Primed primary metabolism in systemic leaves: A functional systems analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18397-5>
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environmental Science and Technology*, 48(4), 2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>
- Shen, S., Zhan, C., Yang, C., Fernie, A. R., & Luo, J. (2023). Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: past decade and future perspectives. *Molecular Plant*, 16(1), 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.09.007>
- Singh, K. S., van der Hooft, J. J. J., van Wees, S. C. M., & Medema, M. H. (2022). Integrative omics approaches for biosynthetic pathway discovery in plants. *Natural Product Reports*, 39(9), 1876–1896. <https://doi.org/10.1039/d2np00032f>
- Singh, P., Singh, J., Ray, S., Rajput, R. S., Vaishnav, A., Singh, R. K., & Singh, H. B. (2020). Seed biopriming with antagonistic microbes and ascorbic acid induce resistance in tomato against Fusarium wilt. *Microbiological Research*, 237, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126482>
- Soto-Sedano, J. C., Clavijo-Ortiz, M. J., & Filgueira-Duarte, J. J. (2012). Phenotypic evaluation of the resistance in F1 carnation populations to vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana*, 30(2), 172–178. <http://redalyc.org/articulo.oa?id=180325300002>
- Soto-sedano, J., & Filgueira-Duarte, J. J. (2012). Evaluation or 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.
- Soto, C. J., Pabón, F., & Filgueria, J. (2009). Relación Entre El Color De La Flor Y La Tolerancia a Patógenos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 5(1), 116–129.
- Sukarta, O. C. A., Zheng, Q., Slootweg, E. J., Mekken, M., Mendel, M., Putker, V., Bertran, A., Brand, A., Overmars, H., Pomp, R., Roosien, J., Boeren, S., Smant, G., & Goverse, A. (2022). Glycine-rich rna-binding protein 7 potentiates effector-triggered immunity through an RNA recognition motif. *Plant Physiology*, 189(2), 972–987. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac081>
- Suprakash Ojha, N. C. C. (2012). Induction of Resistance in Tomato Plants Against Through Salicylic Acid and *Trichoderma Harzianum*. *Journal of Plant Protection Research*, 52(2), 220–225. <https://doi.org/10.2478/v10045-012-0034-3>

- Szklarczyk, D., Gable, A., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), 607–613. doi.org/10.1093/nar/gky1131
- Ton, J., Van Der Ent, S., Van Hulten, M., Pozo, M., Van Oosten, V., van Loon, L., Mauch-Mani, B., Turlings, T. C. J., & Pieterse, C. M. J. (2009). *Priming* as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress. *IOBC Wprs Bull*, *44*, 3–13.
- Torky, Z. A. (2016). Vitamin B Mediated *Priming* of Disease Resistance and Defense Responses to Tobacco Mosaic Virus in *Capsicum annuum* L. Plants. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals*, *8*(2), 35–53. https://doi.org/10.4172/jaa.1000133
- Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance - Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*, *17*, 48–59. https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002
- Tugizimana, F., Mhlongo, M., Piater, L., & Dubery, I. A. (2018). Metabolomics in plant *priming* research: The way forward? *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1–18. https://doi.org/10.3390/ijms19061759
- Tunc-ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., Misra, A. N., Mittler, R., & Shintani, D. (2009). Thiamin Confers Enhanced Tolerance to Oxidative Stress, *Plant Physiology* *151* (1), 421–432. https://doi.org/10.1104/pp.109.140046
- Valledor, L., & Weckwerth, W. (2014). An Improved Detergent-Compatible Gel-Fractionation LC-LTQ-Orbitrap-MS Workflow for Plant and Microbial Proteomics. In J. V. Jorrín-Novo, S. Komatsu, W. Weckwerth, & S. Wienkoop (Eds.), *Plant Proteomics: Methods and Protocols* (2nd ed., Vol. 1072, pp. 347–358). Humana Press - Springer Protocols. https://doi.org/10.7551/mitpress/1247.003.0039
- Vanegas-Cano, L. J., Martínez-Peralta, S. T., Coy-Barrera, E., & Ardila-Barrantes, H. D. (2022). Plant hormones accumulation and its relationship with symplastic peroxidases expression during carnation-*Fusarium oxysporum* interaction. *Ornamental Horticulture*, *28*(1), 49–59. https://doi.org/10.1590/2447-536X.V28I1.2412
- Verchot, J., & Pajeroska, K. M. (2021). UPR signaling at the nexus of plant viral, bacterial, and fungal defenses. *Current Opinion in Virology*, *47*, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.11.001
- Vimala, R., & Suriachandraselvan, M. (2009). Induced resistance in bhendi against powdery mildew by foliar application of salicylic acid. *Journal of Biopesticides*, *2*(1), 111–114.
- Vinchesi, A. C., Rondon, S., & Goyer, A. (2017). *Priming* Potato with Thiamin to Control Potato Virus Y. *American Journal of Potato Research*, *94*, 120–128. https://doi.org/10.1007/s12230-016-9552-2
- Wang, J., Lian, N., Zhang, Y., Man, Y., Chen, L., Yang, H., Lin, J., & Jing, Y. (2022). The Cytoskeleton in Plant Immunity: Dynamics, Regulation, and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24). https://doi.org/10.3390/ijms232415553
- Wang, Lanxiang, Chen, M., Lam, P. Y., Dini-Andreote, F., Dai, L., & Wei, Z. (2022). Multifaceted

- roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01420-x>
- Wang, Lanxiang, Lui, A. C. W., Lam, P. Y., Liu, G., Godwin, I. D., & Lo, C. (2020). Transgenic expression of flavanone 3-hydroxylase redirects flavonoid biosynthesis and alleviates anthracnose susceptibility in sorghum. *Plant Biotechnology Journal*, 18(11), 2170–2172. <https://doi.org/10.1111/pbi.13397>
- Wang, Long, Wang, L., Yang, T., Wang, B., Lin, Q., Zhu, S., Li, C., Ma, Y., Tang, J., Xing, J., Li, X., Liao, H., Staiger, D., Hu, Z., Yu, F., & Yu, F. (2020). RALF1-FERONIA complex affects splicing dynamics to modulate stress responses and growth in plants. *Science Advances*, 6(21), 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1622>
- Wang, Y., Wei, X., Jing, X., Chang, Y., Hu, C., Wang, X., & Chen, K. (2016). The Fundamental Role of NOX Family Proteins in Plant Immunity and Their Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 2–18. <https://doi.org/10.3390/ijms17060805>
- Wang, Z., Song, Q., Shuai, L., Htun, R., Malviya, M. K., Li, Y., Liang, Q., Zhang, G., Zhang, M., & Zhou, F. (2020). Metabolic and proteomic analysis of nitrogen metabolism mechanisms involved in the sugarcane – *Fusarium verticillioides* interaction. *Journal of Plant Physiology*, 251, 153207. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153207>
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R. J., & Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>
- Wolcan, S. M., Malbrán, I., Mourellos, C. A., Sisterna, M. N., González, M. del P., Alippi, A. M., Nico, A., & Lori, G. A. (2018). Diseases of Carnation. In R. . McGovern & W. H. Elmer (Eds.), *Handbook of Plant Disease Management* (pp. 317–378). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5_14
- Xie, X., Han, Y., Yuan, X., Zhang, M., Li, P., Ding, A., Wang, J., Cheng, T., & Zhang, Q. (2022). Transcriptome Analysis Reveals that Exogenous Melatonin Confers Liliium Disease Resistance to *Botrytis elliptica*. *Frontiers in Genetics*, 13, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.892674>
- Yáñez-Juárez, M. G., López-Orona, C. A., Ayala-Tafoya, F., Partida Ruvalcaba, L., Velázquez-Alcaraz, T. de J., & Medina-López, R. (2018). Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems Los fosfitos como alternativa para el manejo de problemas fitopatológicos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 79–94. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-7>
- Yang, F., Wu, C., Zhu, G., Yang, Q., Wang, K., & Li, Y. (2022). An integrated transcriptomic and metabolomic analysis for changes in rose plant induced by rose powdery mildew and exogenous salicylic acid. *Genomics*, 114(6), 110516. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110516>
- Yang, Q., Li, J., Sun, J., & Cui, X. (2022). Comparative transcriptomic and proteomic analyses to determine the lignin synthesis pathway involved in the fungal stress response in *Panax notoginseng*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 119, 101814. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101814>

- Yin, Y., Bi, Y., Li, Y., Wang, Y., & Wang, D. (2012). Use of thiamine for controlling *Alternaria alternata* postharvest rot in Asian pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. *Zaosu*). *International Journal of Food Science and Technology*, *47*(10), 2190–2197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03088.x>
- Yong-hong, G. E., Can-ying, L. I., Jing-yi, L., & Dan-shi, Z. (2017). Effects of thiamine on *Trichothecium* and *Alternaria* rots of muskmelon fruit and the possible mechanisms involved. *Journal of Integrative Agriculture*, *16*(11), 2623–2631. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61584-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61584-8)
- Zhang, X., Yang, Z., Wu, D., & Yu, F. (2020). RALF–FERONIA Signaling: Linking Plant Immune response with cell growth. *Plant Communications*, *1*(4), 100084. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100084>
- Zhao, J. (2015). Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends in Plant Science*, *20*(9), 576–585. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.007>
- Zhao, M., Jin, J., Gao, T., Zhang, N., Jing, T., Wang, J., Ban, Q., Schwab, W., & Song, C. (2019). Glucosyltransferase CsUGT78A14 Regulates Flavonols Accumulation and Reactive Oxygen Species Scavenging in Response to Cold Stress in *Camellia sinensis*. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01675>
- Zheng, X., Gong, M., Zhang, Q., Tan, H., Li, L., Tang, Y., Li, Z., Peng, M., & Deng, W. (2022). Metabolism and Regulation of Ascorbic Acid in Fruits. *Plants*, *11*(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/plants11121602>
- Zhou, J., Sun, A., & Xing, D. (2013). Modulation of cellular redox status by thiamine-activated NADPH oxidase confers Arabidopsis resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Experimental Botany*, *64*(11), 3261–3272. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert166>
- Zhou, Y., Lambrides, C. J., & Fukai, S. (2013). Drought resistance of bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes collected from different climatic zones. *Environmental and Experimental Botany*, *85*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.07.008>