

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE FOSFITO
DE POTASIO EN LA BIOSÍNTESIS DE
METABOLITOS DURANTE LA INTERACCIÓN
CLAVEL (*Dianthus caryophyllus L.*) -
*Fusarium oxysporum f. sp. dianthi***

Wanner Ernesto Barreto Pulido

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

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE FOSFITO DE POTASIO EN LA BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS DURANTE LA INTERACCIÓN CLAVEL (*Dianthus caryophyllus L.*) - *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*

Wanner Ernesto Barreto Pulido

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Director:

Dr. Sci. Harold Duban Ardila Barrantes

Departamento de Química, Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

Codirector:

Dr. Sci. Ericsson David Coy Barrera

Universidad Militar Nueva Granada, Cajicá

Línea de Investigación:

Bioquímica de las interacciones Hospedero – Patógeno

Grupo de Investigación:

Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2023

A mi papi Ernesto Barreto, a mi mami Clemencia Pulido, a mi hermanita Gaby, a mi prometida Fer y especialmente a mí. Sin ustedes esto no habría podido salir adelante. Gracias infinitas por todo su apoyo

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «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.



Wanner Ernesto Barreto Pulido

Fecha 31/01/2023

Agradecimientos

A mis papás, **Ernesto Barreto** y **Clemencia Pulido** y mi hermana, **Laura Barreto**, sin el apoyo emocional y físico que me brindaron durante mi proceso académico no habría logrado culminar este propósito. Gracias por hacerme seguir adelante cuando más necesitaba esas palabras y hechos de apoyo. Los amo hasta el infinito.

A mi prometida **Fernanda Castiblanco**, quien con su persistencia, dedicación y trabajo duro me ha dado el ejemplo y la motivación para cumplir mis objetivos personales, académicos y profesionales. Gracias por estar ahí para mí, por ayudarme cuando te necesitaba y darme tus consejos. No querría otra mujer para mi vida. Te amo siempre.

A mis compañeros de 4 patas, Tomcito, Silvestre y Harusito quienes con su inocencia hacen parte esencial de mi vida y me acompañan.

A coquito quien siempre está presente en mi mente y mi corazón, el vacío que dejaste me llena de fortaleza y sé que donde quiera que estés, nos acompañas siempre.

A la Universidad Nacional de Colombia por ser mi segundo hogar, quien me ha brindado los mejores años de mi vida y me permitió conocer lo bonito y sufrido de la investigación.

A la Universidad Militar Nueva Granada por permitirme trabajar en sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo.

Al profesor Harold Ardila, quien me ha guiado desde pregrado, que con su paciencia y esfuerzo me ha ayudado a hondar en aspectos académicos, profesionales y personales.

Al profesor Ericsson Coy, quien ha sido parte fundamental de este trabajo, gracias por ser ese consejero que necesité cuando desfallecía. *"La excelencia es fruto de la exigencia"*.

A todos los integrantes del grupo de investigación de Estudio de Actividades Metabólicas, especialmente a Fernanda Castiblanco, Fabiola Santos, José Miguel Esquivel, Santiago

Monroy, Eliana Bustos, Carolina Vega, Germán Morera y Patricia Martínez, quienes estuvieron presentes hasta la entrega de este documento.

Al Grupo Integrado de Investigaciones en Química Bioorganica (InQuiBio) por darme la posibilidad de trabajar con ustedes, un agradecimiento especial a Melba.

A mis amigos de la vida Alejandra Jiménez, Alejandra Muñoz, Diana Cobos, Katherine Fuentes, Luis Puerto, Diego Rodríguez y Santiago Guerrero, quienes me apoyaron emocionalmente y me dieron sus palabras de ánimo cuando las necesité.

A Esteban Garzón, el futuro doctor Carlos Oviedo y Harold Uribe, amigos que me dejó mi *alma mater*, por estar pendientes de mi proceso.

Resumen

Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos durante la interacción clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

En la presente investigación se estudió el efecto que tiene la aplicación de una disolución al 3% de fosfito de potasio en la bioquímica de raíces de clavel durante la inducción de resistencia al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Si bien las disoluciones de fosfito de potasio han sido usadas como fertilizantes, fungicidas sistémicos o activadores de defensa natural, para el caso del cultivo del clavel, su uso ha sido limitado y existen solo algunos reportes recientes sobre su papel como inductor de resistencia. Es por ello que, con el fin de profundizar en los procesos involucrados en la acción de este inductor, en la presente investigación, aplicando herramientas de análisis metabólico no dirigido, se estudiaron los metabolitos que se acumulan en raíces de la planta por acción de este inductor de resistencia y se estudió la expresión de genes asociados con algunos de los metabolitos de interés. Para ello, en una primera etapa se llevó a cabo un ensayo *in vivo* donde se seleccionó la estrategia para la aplicación de la disolución de fosfito en el suelo. Posteriormente, se realizó la obtención del perfil metabólico mediante GC-MS, con previa derivatización con agente sililante; en este punto se identificaron metabolitos diferenciables para los tratamientos estudiados, entre los cuales se destacan algunos aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos, entre otros. Estos resultados indicaron que mecanismos como el metabolismo de aminoácidos, transporte de nitrógeno, metabolismo de carbohidratos y señalización en plantas, son importantes en la inducción de resistencia. Finalmente, en una tercera etapa se estudiaron los niveles transcripcionales de los genes *p5cr* y *npr1*, los cuales participan en la biosíntesis de prolina y en la activación de RSA (Resistencia Sistémica Adquirida), respectivamente. Se encontró que la aplicación del inductor generó un aumento en los niveles transcripcionales de dichos genes en la variedad susceptible, confirmando a nivel molecular la activación de las rutas estudiadas en este fenómeno biológico. Los hallazgos encontrados en esta investigación permiten sugerir que el uso de fosfito de potasio, en su rol de inductor de resistencia, potencializa la síntesis de metabolitos asociados a defensa vegetal, muy probablemente asociada a la activación de RSA dependiente de ácido salicílico.

Palabras clave: *Dianthus caryophyllus* L., *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, fosfito de potasio, metabolómica no dirigida, perfilado metabólico, NPR1, P5CR, SAR

Abstract

Effect of the application of potassium phosphite on the biosynthesis of metabolites during the interaction of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

In the present study, the effect of 3% potassium phosphite solution on the carnation root biochemistry during the resistance induction to the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* was evaluated. Although potassium phosphite solutions have been used as fertilizers, systemic fungicides, or natural defense activators, in the case of carnation cultivation, their use has been limited, and there are only a few recent reports on their role as a resistance inducer. Therefore, to deepen the processes involved in the action of this inducer, in the present investigation, applying untargeted metabolomics-based analysis tools, those metabolites differentially accumulated in plant roots due to the action of this resistance inducer, as well as the expression of genes associated with some of the top-ranked metabolites, were studied. In this regard, the first stage involved an *in vivo* test where the strategy for applying the phosphite solution in the soil was selected. Subsequently, the metabolic profile was obtained by GC-MS, with prior derivatization with a silylating agent. At this point, differentiable metabolites were identified for the studied treatments, among which some amino acids, carbohydrates, and organic acids, among others, were statistically recognized. These results indicated that mechanisms such as amino acid metabolism, nitrogen transport, carbohydrate metabolism, and plant signaling are relevant for resistance induction. Finally, the third stage comprised the evaluation of transcriptional levels of the *p5cr* and *npr1* genes, which participate in proline biosynthesis and ASR (Acquired Systemic Resistance) activation, respectively. It was found that the inducer application generated a transcriptional level increase in the test genes for the susceptible carnation variety, confirming at the molecular level the activation of those pathways studied in this biological phenomenon. The findings in this research suggest that the use of potassium phosphite, in its role as a resistance inducer, potentiates the synthesis of metabolites associated with plant defense, most likely associated with salicylic acid-dependent ASR activation.

Keywords: *Dianthus caryophyllus* L., *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, potassium phosphite, untargeted metabolomics, NPR1, P5CR, SAR

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras	XVII
Lista de tablas	XX
Lista de Símbolos y abreviaturas	XXI
Introducción	1
1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	5
1.1 Modelo de interacción hospedero-patógeno	5
1.1.1 Hospedero: clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	5
1.1.2 Patógeno: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> (Fod).....	6
1.1.2.1 Marchitamiento vascular del clavel.....	7
1.2 Interacción Planta – Microorganismo	8
1.3 Inducción de resistencia.....	11
1.3.1 Tipos de inductores de resistencia.....	13
1.3.2 Inductores de resistencia de origen sintético y hormonas.....	14
1.3.3 Efectos de la aplicación de inductores de resistencia sintéticos en el metabolismo	17
1.4 Metabolómica	20
1.4.1 Metabolómica dirigida.....	21
1.4.2 Metabolómica no dirigida	22
1.4.3 Derivatización por sililación	23
1.5 Análisis transcripcionales de genes inducidos en clavel.....	23
1.5.1 Pirrolina–5–carboxilato reductasa (P5CR, EC 1.5.1.2)	24
1.5.2 Proteína no expresora de genes relacionados con la patogenicia 1 (NPR1)..	25
2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1 Etapa 1: Selección de condiciones de aplicación de la disolución de fosfito de potasio	29
2.1.1 Material biológico.....	30
2.1.2 Ensayo <i>in vivo</i> : Selección de condiciones de aplicación del fosfito de potasio	31
2.1.3 Estimación de la incidencia y severidad de la enfermedad.....	32
2.2 Etapa 2: Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en los perfiles metabólicos de raíces de clavel durante su interacción con <i>Fod</i>	33
2.2.1 Ensayo <i>in vivo</i>	33
2.2.2 Análisis metabolómico del ensayo <i>in vivo</i>	34

2.2.3	Extracción de metabolitos	34
2.2.4	Análisis de metabolitos por GC/MS	35
2.2.5	Análisis estadístico	35
2.2.6	Anotación de metabolitos de interés	36
2.2.7	Análisis de rutas metabólicas	36
2.3	Etapa 3: Evaluación de los niveles transcripcionales de las principales enzimas involucradas en la biosíntesis de los metabolitos de interés	37
2.3.1	Diseño de <i>primers</i>	37
2.3.2	Extracción de ARN	38
2.3.3	Eliminación del DNA presente en el extracto de RNA	38
2.3.4	Síntesis de ADNc	39
2.3.5	Amplificación de los fragmentos de interés	39
2.3.6	Determinación de la expresión de los genes de interés codificantes para enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos	40
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1	Etapa 1: Selección de condiciones para la aplicación en suelo de fosfito de potasio para el control del marchitamiento vascular	41
3.2	Etapa 2: Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en el perfil metabólico de raíces de clavel	45
3.2.1	Fase 1: Ensayo <i>in vivo</i>	45
3.2.2	Fase 2: Análisis por GC-MS de los extractos polares y apolares en raíces de clavel bajo exposición con <i>Fod</i> y fosfito de potasio	50
3.2.2.1	Escenario 1: Efecto de la inoculación con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> en la biosíntesis de metabolitos en raíces de clavel	50
3.2.2.2	Escenario 2: Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos en raíces de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	65
3.2.2.3	Escenario 3: Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos durante la interacción clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) - <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	75
3.3	Etapa 3: Evaluación de los niveles transcripcionales de <i>p5cr</i> y <i>npr1</i>	85
3.3.1	Pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR)	89
3.3.2	Proteína no-expresora de genes relacionadas con la patogénesis 1 (NPR1)	93
4.	CONCLUSIONES	98
5.	RECOMENDACIONES	101
	A. Anexo: Presencia de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> en tratamientos inoculados	102
	B. Anexo: Eficiencia de reacción para los genes evaluados	104
	Bibliografía	105

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1 Flores de clavel (<i>Dianthus caryophyllus L.</i>)	5
Figura 1.2 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> . Diferentes estados de crecimiento del hongo. Fuente: Castiblanco y Esquivel (2023)	6
Figura 1.3 Ciclo de la enfermedad de <i>Fusarium oxysporum</i> (Jangir <i>et al.</i> , 2021).....	7
Figura 1.4 Modelo Zig-Zag.....	11
Figura 1.5 Esquema que muestra la relación entre el metabolismo primario (ahora central) y secundario (actualmente denominado como especializado) en plantas. Tomado de (Ávalos and Elena, 1998).	18
Figura 1.6 Esquema simplificado del flujo metodológico de los dos enfoques generales para abordar estudios en metabolómica: dirigida y no dirigida. Tomado de (Zubiri, 2018).	22
Figura 1.7 Reacción general de grupo hidroxilo con MSTFA (también aplica para los átomos de hidrógeno activos en grupos NH y SH).....	23
Figura 1.8 Esquema de la reacción enzimática catalizada por P5CR.....	24
Figura 1.9 Funciones generales de los receptores AS en la inmunidad de las plantas (Liu <i>et al.</i> , 2020)	26
Figura 2.1 Metodología general llevada a cabo para el desarrollo del estudio.	30
Figura 3.1 A. Efecto de la aplicación del fosfito de potasio sobre la severidad de la enfermedad B. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad de las plantas de clavel de la variedad ' <i>Mizuki</i> ' para la selección del modo de aplicación. Las barras de variación representan el error estándar de la media de tres réplicas biológicas. Las letras sobre las barras representan la diferencia estadísticamente significativa del índice de severidad entre tratamientos y del AUDPC (prueba ANOVA, $p \leq 0,05$).	43
Figura 3.2 Efecto de la aplicación del fosfito de potasio sobre A. la severidad de la enfermedad y B. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad de las plantas de clavel de la variedad ' <i>Mizuki</i> ' para obtener el perfil metabólico.....	46
Figura 3.3 Efecto de fosfito de potasio en la severidad del marchitamiento vascular a la sexta semana. (1. Tratamiento inoculado, 2. Tratamiento con inductor inoculado, 3. Control, 4. Control con inductor).....	47
Figura 3.4 Perfiles cromatográficos sobrepuestos de extractos seleccionados obtenidos de las raíces de las variedades ' <i>Golem</i> ' (Resistente) y ' <i>Mizuki</i> ' (Susceptible) inoculadas con <i>Fod</i> . En Azul, tratamiento control (R). En verde, tratamiento inoculado (R). En rojo, tratamiento control (S). En fucsia, tratamiento inoculado (S).	51
Figura 3.5 Efecto de la inoculación con <i>Fod</i> en los perfiles metabólicos de raíces del clavel, evaluado por PCA y PLS-DA. (A,B) Diagramas de puntajes resultante del análisis	

de componentes principales (PC1 x PC2) para las variedades **A.** 'Golem' **B.** 'Mizuki'. En verde, tratamiento control. En rojo, tratamiento inoculado. Las regiones sombreadas tienen una confianza del 95% ($p < 0.05$). **(C,D)** Diagramas de puntajes VIP (*Variable importance in the projection*) que incluye la selección de metabolitos diferenciales a partir del PLS-DA para las variedades **C.** 'Golem' **D.** 'Mizuki'. Los recuadros coloreados a la derecha indican la relevancia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio (GC = control para la variedad 'Golem' (sin inoculación); GI = 'Golem' inoculado con *Fod*; MC = control para la variedad 'Mizuki' (sin inoculación); MI = 'Mizuki' inoculado con *Fod*). 54

Figura 3.6 Perfiles cromatográficos sobrepuestos de extractos seleccionados obtenidos de las raíces de las variedades 'Golem' (Resistente) y 'Mizuki' (Susceptible) tratadas con fosfito de potasio. En Azul, tratamiento control (R). En turquesa, tratamiento elicitado (R). En rojo, tratamiento control (S). En verde, tratamiento elicitado (S). 66

Figura 3.7 Efecto de la elicitación con disolución de fosfito de potasio (3%) en los perfiles metabólicos de raíces del clavel, evaluado por PCA y PLS-DA. **(A,B)** Diagramas de puntajes resultante del análisis de componentes principales (PC1 x PC2) para las variedades **A.** 'Golem' **B.** 'Mizuki'. En verde, tratamiento control (sin elicitación). En azul, tratamiento elicitado. Las regiones sombreadas tienen una confianza del 95% ($p < 0.05$). **(C,D)** Diagramas de puntajes VIP (*Variable importance in the projection*) que incluye la selección de metabolitos diferenciales a partir del PLS-DA para las variedades **C.** 'Golem' **D.** 'Mizuki'. Los recuadros coloreados a la derecha indican la relevancia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio (GC = control para la variedad 'Golem' (sin elicitación); GE = 'Golem' elicitado; MC = control para la variedad 'Mizuki' (sin elicitación); ME = 'Mizuki' elicitado)..... 68

Figura 3.8 Perfiles cromatográficos sobrepuestos de extractos seleccionados obtenidos de las raíces de las variedades 'Golem' (Resistente) y 'Mizuki' (Susceptible) inoculadas con *Fod*. En Rojo, tratamiento elicitado - inoculado(R). En Azul, tratamiento inoculado (R). En Verde, tratamiento elicitado - inoculado (S). En fucsia, tratamiento inoculado (S). 76

Figura 3.9 Efecto de la elicitación con disolución de fosfito de potasio (3%) en los perfiles metabólicos de raíces del clavel, en la interacción clavel – *Fod*, evaluado por PCA y PLS-DA. **(A,B)** Diagramas de puntajes resultante del análisis de componentes principales (PC1 x PC2) para las variedades **A.** 'Golem' **B.** 'Mizuki'. En morado, tratamiento elicitado inoculado. En rojo, tratamiento inoculado. Las regiones sombreadas tienen una confianza del 95% ($p < 0.05$). **(C,D)** Diagramas de puntajes VIP (*Variable importance in the projection*) que incluye la selección de metabolitos diferenciales a partir del PLS-DA para las variedades **C.** 'Golem' **D.** 'Mizuki'. Los recuadros coloreados a la derecha indican la relevancia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio (GEI = 'Golem' elicitado e inoculado; GI = 'Golem' inoculado; MEI = 'Mizuki' elicitado e inoculado; MI = 'Mizuki' inoculado). 78

Figura 3.10 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR obtenidos usando cDNA de raíces de clavel de la variedad 'Mizuki'. Carril: 1 y 8 (marcador de peso

molecular hyperlader II™ 2000 – 100 pb); 2, 3, 4 (<i>npr1.1-3</i>); 5, 6, 7 (<i>p5cr1-3</i>); 9, 10, 11(<i>asnsyn1-3</i>); 12, 13, 14 (<i>galsyn1-3</i>).	87
Figura 3.11 A. Verificación por RT-qPCR de la expresión de los genes. B. Curvas de fusión obtenidas correspondientes. <i>npr1</i> (azul), <i>asnsyn</i> (rojo), <i>his</i> (verde), <i>p5cr</i> (morado), <i>galsyn</i> (punteada azul) y <i>bcaa</i> (punteada naranja).....	89
Figura 3.12 Relación en los niveles de transcripción de <i>p5cr</i> en raíces de clavel en dos variedades de clavel. ‘Golem’ (morado). ‘Mizuki’ (rosado). A. Tratamiento inoculado / tratamiento control (I/C). B. Tratamiento elicitado / Tratamiento control (E/I). C. Tratamiento elicitado inoculado / tratamiento inoculado (EI/I). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).	92
Figura 3.13 Diagrama del homodímero de NPR1. Tomado de (Kumar <i>et al.</i> , 2022).....	93
Figura 3.14 Relación en los niveles de transcripción de <i>npr1</i> en raíces de clavel en dos variedades de clavel. ‘Golem’ (morado). ‘Mizuki’ (rosado). A. Tratamiento inoculado / tratamiento control (I/C). B. Tratamiento elicitado / Tratamiento control (E/I). C. Tratamiento elicitado inoculado / tratamiento inoculado (EI/I). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).	95
Figura 4.1 Modelos propuesto a partir de los resultados metabolómicos y transcripcionales de la interacción con <i>Fod</i> de la variedad ‘Mizuki’ después del proceso de elicitación	100
Figura 5.1 Verificación por RT-qPCR de la expresión de tub para los tratamientos inoculados. A. Tratamiento inoculado. B. Tratamiento elicitado inoculado.....	103
Figura 5.2 Curvas de fusión obtenidas correspondientes. A. Tratamiento inoculado. B. Tratamiento elicitado noculado.....	103

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2.1 Tratamientos para la selección de condiciones de aplicación de fosfito de potasio.....	31
Tabla 2.2 Características de los primers utilizados para la amplificación de los genes de interés.....	37
Tabla 3.1 Grupos de metabolitos encontrados para las dos variedades estudiadas en los tratamientos control e inoculados.....	51
Tabla 3.2 Metabolitos sobre regulados por el efecto de la inoculación con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> (<i>Fod</i>) en la biosíntesis de metabolitos en raíces de clavel	55
Tabla 3.3 Metabolitos sobre regulados por el efecto de la aplicación de disolución de 3% de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos en raíces de clavel	69
Tabla 3.4 Metabolitos sobre regulados por el efecto de la aplicación de disolución de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos en la interacción clavel - <i>Fod</i>	78
Tabla 5.1 Eficiencia de reacción para los genes <i>p5cr</i> , <i>npr1</i> , <i>his</i> y <i>tub</i>	104

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
AS	Ácido salicílico
AUDPC	Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad
<i>avr</i>	Gen codificante para proteínas de avirulencia
BCAA	<i>Branchedchain amino acids</i>
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
ET	Etileno
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>Effector-triggered susceptibility</i>
<i>Fod</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi</i>
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
hpi	Horas pos-inoculación
HR	Respuesta hipersensible
ISR	Resistencia Sistémica inducida
JA	Ácido jasmónico
LRR	Repetición rica en leucina
MAMPs	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MeJA	Jasmonato de metilo
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(trimetilsilil)trifluoroacetamida
NB	Unión a nucleótidos
NPR1	Proteína no-expresora de genes relacionados con la patogenia
P5CR	Pirrolina-5-carboxilato reductasa
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PAPM	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCA	Análisis de componentes principales
PGRR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
PLS-DA	Análisis de mínimos cuadrados parciales – análisis discriminante

PR	Proteínas de resistencia
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones transmembranales
PTI	<i>Pattern-triggered immunity</i>
<i>R</i>	Gen codificante para proteínas R
RLK	Receptores tipo quinasa
RLP	Receptores tipo proteína
RSA	Resistencia Sistémica Adquirida
SIX	<i>Secreted in xylem protein</i>
spi	Semanas pos-inoculación
TMCS	Trimetilclorosilano
VIP	<i>Variable importance in projection</i>

Introducción

La floricultura es una de las actividades económicas más importantes en Colombia, representando el segundo sector de exportaciones agrícolas. Nuestro país es el segundo exportador mundial de flores, el primer exportador de claveles y el primer proveedor de los Estados Unidos. La cadena de flores cortadas se caracteriza por generar alrededor de 200.000 empleos formales, directos e indirectos. Para 2021, Colombia exportó 302.000 toneladas de flores, siendo los principales destinos de exportación Estados Unidos y Japón, con esquejes, plántulas y flores complementarias para la elaboración de *bouquets*. El clavel es una de las principales especies de flores exportadas en Colombia, considerando que, en el año 2021, se posicionó como la segunda especie más exportada luego de la rosa (Estrada Rudas, 2022)

Sin embargo, la producción de clavel se ve afectada en gran medida por las enfermedades de tipo parasitario, especialmente por el parásito fúngico causante del marchitamiento vascular del clavel, el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod). Fod es un colonizador agresivo y competitivo en comparación con otras especies de hongos filamentosos, cuyo ingreso preferente a la planta se hace por el tejido radicular. Cuando una planta susceptible es infectada, el hongo invade los tejidos xilemáticos y se extiende rápidamente mediante el crecimiento de las hifas y la producción de esporas (Ramirez, 2014). Dadas estas características, su control se convierte en un reto para el floricultor, requiriendo de diversas estrategias para lograrlo.

En este sentido, las medidas adoptadas a la fecha para el control y prevención del marchitamiento vascular en clavel no son siempre efectivas, generando de manera frecuente pérdidas económicas relacionadas con producción (21 – 47%) para el sector floricultor (Vásquez Ramírez and Castaño Zapata, 2017). Tales medidas de control se enfocan principalmente en la prevención de la entrada del patógeno a los cultivos y medidas fitosanitarias, impidiendo la contaminación de esquejes sanos durante las etapas de propagación y producción. Estas medidas de prevención al desarrollo de la enfermedad

se han utilizado en conjunto con planes de manejo integrado, las cuales incluyen estrategias preventivas como plantación de esquejes libres de patógenos, eliminación temprana de plantas enfermas, uso de variedades resistentes, esterilización del sustrato y aplicación de fungicidas de origen sintético como el propineb (un ditiocarbamato), carbendazim (un benzimidazol) o iprodiona (una dicarboximida o hidantoina), entre varios otros. Estos fungicidas a su vez también pueden afectar el medio ambiente debido a su alta toxicidad, contaminando el suelo y las aguas subterráneas; el mal uso de estas sustancias, como exceder la dosis y frecuencia de aplicación, pueden causar resistencia del patógeno y, en consecuencia, aumento en la agresividad de la infección (Quevedo Guerrero, J., Infante Noblecilla, J. C., & García Batista, 2018).

La inducción de resistencia mediante el uso de inductores de baja toxicidad, ya sea de origen biótico o de origen sintético, puede representar una alternativa para el control eficiente de la enfermedad con bajo impacto ambiental. En el marco del uso de inductores de resistencia, nuestro equipo de investigación ha realizado estudios donde se ha encontrado que, la aplicación de compuestos de baja toxicidad como la tiamina y el fosfito de potasio, pueden reducir la severidad de la enfermedad causada por *Fod* en el clavel, postulándose como potenciales inductores de resistencia (Pérez Mora, Melgarejo and Ardila, 2021). Los compuestos a base de fosfito se comercializan principalmente como fertilizantes, fungicidas sistémicos o activadores de defensa natural (Siah *et al.*, 2018). Sin embargo, a la fecha no se conocen cuáles son los mecanismos bioquímicos y moleculares que determinan dicha inducción de resistencia; no se conoce por ejemplo en el caso del fosfito de potasio, si su aplicación en el suelo donde se cultiva el clavel tiene un efecto real de inducción de resistencia o sí, por el contrario, genera un mejor estado nutricional de la planta que le permite estar preparada para la infección.

Es por ello que, con el fin de entender tal inducción de resistencia en términos de la respuesta bioquímica involucrada, se hace necesario realizar estudios sobre la interacción entre el clavel y el patógeno fúngico, determinando por ejemplo, los metabolitos que son sintetizados *in planta* por el efecto de la aplicación en el suelo de disoluciones de fosfito de potasio comercial; esto sin duda permitirá entender este fenómeno y facilitar el desarrollo de una alternativa novedosa para el manejo y el control eficiente de la enfermedad de la planta.

Al respecto, los estudios metabólicos han permitido en los últimos años profundizar en los mecanismos involucrados en las interacciones planta-patógeno (Gerszten and Wang, 2008). Es así como esta aproximación también ha aportado de manera importante en el entendimiento de los procesos de inducción de resistencia (López-Gresa *et al.*, 2019; Iula *et al.*, 2022). Dentro de las herramientas empleadas, la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS), con previa derivatización, ha permitido avanzar en el conocimiento de un amplio rango de metabolitos polares y no polares, que pueden tener un papel protagónico en las plantas; esta información sobre los metabolitos ha permitido entender cuáles son las rutas que eventualmente pueden estar activando y que, por tanto, podrían ser determinantes en dichos procesos de inducción de resistencia

En consecuencia, teniendo en cuenta los resultados obtenidos de literatura y del grupo de investigación, el presente estudio se orientó a identificar aquellos metabolitos producidos y/o acumulados en raíces de clavel durante la interacción con *Fod* que puedan estar involucrados con la inducción de defensa en las plantas debido al tratamiento con el fosfito de potasio. Por lo tanto, se evaluó el efecto que tiene la aplicación del fosfito de potasio, previa a la inoculación con *Fod*, empleando dos variedades de clavel contrastantes a la enfermedad. Se obtuvieron posteriormente los extractos polares y no polares a partir de las raíces de las plantas, y se analizaron los metabolitos presentes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con derivatización pre-columna por sililación. Los metabolitos diferenciales determinados estadísticamente para los tratamientos evaluados fueron relacionados con la influencia del inductor en las vías metabólicas del clavel (e.g., síntesis de aminoácidos, azúcares y derivados de ácido salicílico) frente a la elicitación con fosfito e inoculación con *Fod*. Finalmente, la técnica de RT-qPCR permitió extender el estudio hacia la evaluación de los niveles transcripcionales de *npr1* y *p5cr*, los cuales codifican para la proteína NPR1, marcador de Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) dependiente de ácido salicílico y la enzima pirrolina-5-carboxilato reductasa, involucrada en la biosíntesis de prolina.

Como resultados principales de la investigación, se lograron identificar metabolitos que, en otras especies vegetales, han sido involucrados en la inducción de resistencia vegetal; se confirmó la activación de la transcripción de genes asociados a las rutas de biosíntesis y se determinó el posible papel del fosfito como inductor de resistencia. La investigación se desarrolló en el laboratorio del grupo Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales del

Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, en colaboración científica con el laboratorio perteneciente al Grupo Integrado de Investigaciones en Química Bioorgánica (InQuiBio) de la Universidad Militar Nueva Granada, dentro del proyecto financiado por Minciencias, antes Colciencias titulado: 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 (No. 80740-148-2019).

Como parte de la socialización de resultados se encuentra la presentación en el evento internacional “IV LAMPS meeting, 2022” en la ciudad de Cartagena, como modalidad póster titulado “EFFECT OF POTASSIUM PHOSPHITE APPLICATION ON THE METABOLITE BIOSYNTHESIS DURING THE INTERACTION CARNATION (*Dianthus caryophyllus* L.) - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod)”.

Finalmente, la presente investigación se constituye como el primer estudio que profundiza en los mecanismos bioquímicos involucrados en la aplicación de fosfito de potasio en el suelo de siembra de flores ornamentales y permite aportar de manera importante al entendimiento de la inducción de resistencia en el modelo clavel-*Fod*.

1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Las plantas coexisten estrechamente con un número incontable de microorganismos, mientras que algunos de ellos colonizan endófitamente las raíces de las plantas, siendo beneficiosos, mientras que otros pueden tener carácter patogénico causando enfermedades. Uno de los escenarios en el que se pueden estudiar las interacciones planta – microorganismo es mediante la aplicación de la metabolómica, con la cual se pueden determinar aquellas diferencias en la composición de metabolitos de bajo peso molecular, debido a las diferencias en genotipos, al efecto de la presencia de un microorganismo patógeno o, en algunos casos, al uso de inductores de resistencia. En el siguiente capítulo se presentan algunos de los aspectos que se deben tener en cuenta en el marco del desarrollo de este trabajo de investigación.

1.1 Modelo de interacción hospedero-patógeno

1.1.1 Hospedero: clavel (*Dianthus caryophyllus L.*)



Figura 1.1 Flores de clavel (*Dianthus caryophyllus L.*)

Fuente: Romero y Martínez (2020)

El clavel (*Dianthus caryophyllus L.*) es una planta dicotiledónea que pertenece al género *Dianthus* y la familia *Caryophyllaceae*. Se conocen alrededor de 80 géneros y 3000 especies de esta familia, las cuales se encuentran en el hemisferio norte. En general, el clavel es diploide ($2n=30$), tetraploide ($4n=60$) y algunas especies pueden llegar a ser hexaploides (Agulló-Antón *et al.*, 2013; Yagi *et al.*, 2014; Demers, 2020). Las plantas de clavel crecen hasta 80 cm; los tallos son leñosos en la base, pero poseen ramas herbáceas. Sus hojas son opuestas, lineales, de textura suave y plana; los tallos florales son quebradizos en los nódulos y generalmente están hinchados.

Esta flor es originaria de las regiones mediterráneas de Grecia e Italia y varias especies han sido usadas con fines ornamentales. Su comercialización data del siglo XVIII con una producción a gran escala y teniendo una alta popularidad dentro de las flores cortadas.

Colombia se posiciona como el primer exportador de claveles, junto a Holanda, España, Turquía y China. La planta posee características favorables para su comercialización como lo es su floración durante todo el año; de este modo, las condiciones geográficas y climáticas de Colombia han permitido que la producción de clavel sea una de las más importantes dentro de las flores de exportación (Ramirez, 2014; Demers, 2020).

1.1.2 Patógeno: *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod)

Fusarium oxysporum es un hongo ubicuo, ampliamente distribuido en el mundo, del que se han reportado aislamientos patogénicos que afectan una amplia gama de especies de plantas agrícolas y ornamentales. Este hongo es de reproducción asexual, haploide y con distribución cosmopolita. Sus cepas se clasifican en formas especiales según la especie que infectan (Recorbet *et al.*, 2003). En consecuencia, se ha reportado que el complejo de *F. oxysporum* ha recibido gran atención debido a la afectación de diversos huéspedes y, por consiguiente, las pérdidas económicas que causa. Este fitopatógeno posee 10 razas (1, 2, 4 – 11) (Edel-Hermann and Lecomte, 2019), donde la raza 2 ha sido reportada como la que más afecta a los cultivos en nuestro país (Cevallos, González and Arbelaez, 1990).

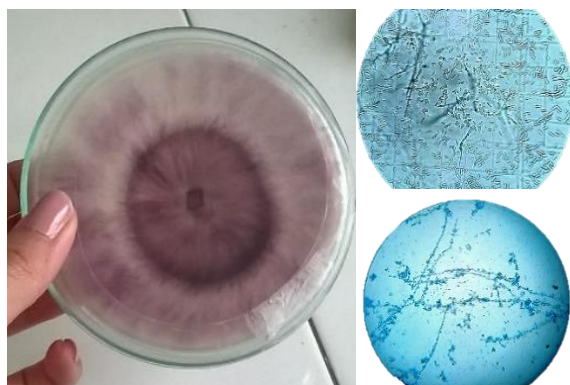


Figura 1.2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Diferentes estados de crecimiento del hongo. Fuente: Castiblanco y Esquivel (2023)

En general, el ciclo de vida del patógeno incluye una etapa donde se encuentra en el suelo en un estado de latencia. Posteriormente ocurre la germinación y crecimiento del hongo debido al aumento de nutrientes en el suelo liberados por las raíces de la planta, penetra en las células de su hospedero y, finalmente, ingresa el xilema de la planta, colonizando

los tejidos vasculares (Figura 1.3) (Gordon and Martyn, 1997). Particularmente, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causa el marchitamiento vascular del clavel (Poli *et al.*, 2013).

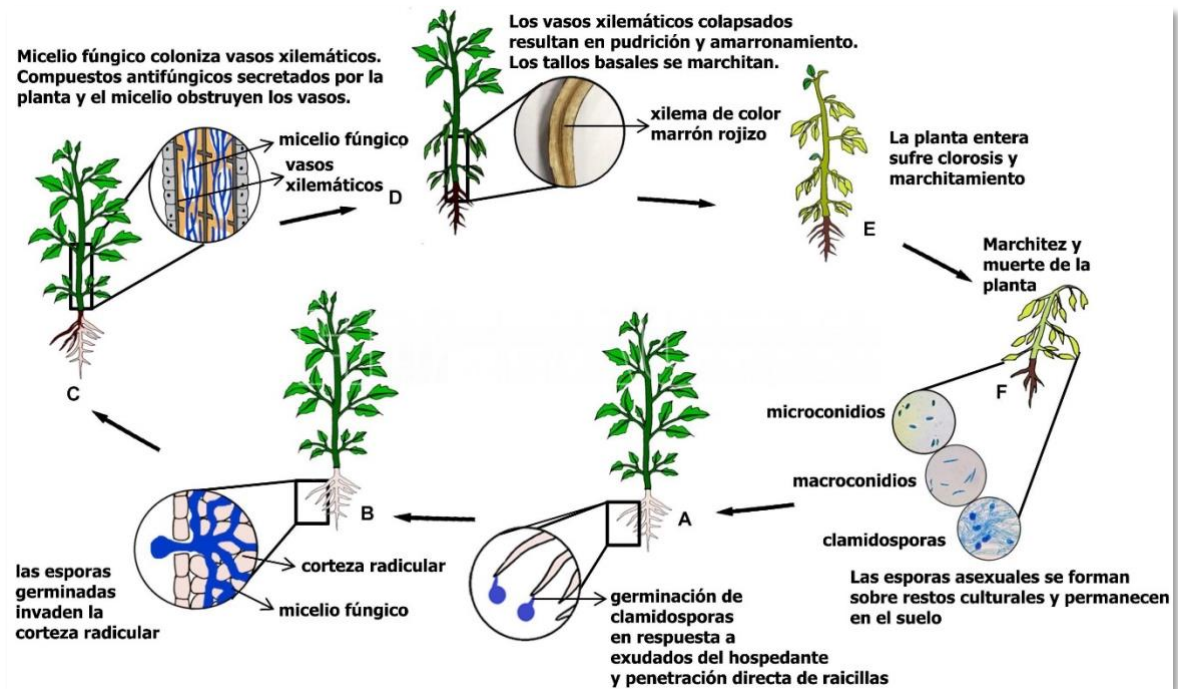


Figura 1.3 Ciclo de la enfermedad de *Fusarium oxysporum* (Jangir *et al.*, 2021).

A. La secreción de exudados de raíces desencadena la germinación de esporas y el desarrollo de hifas de infección que provocan la penetración de la epidermis de la raíz. **B.** Las hifas ingresan intercelularmente a través de las células corticales de la raíz hasta que ingresa al xilema. **C.** El patógeno coloniza los vasos vasculares causando obstrucción y oscurecimiento como resultado del crecimiento excesivo del micelio. **D.** La etapa inicial de la infección muestra síntomas en la base del tallo y avanza lentamente hacia arriba, provocando el marchitamiento de las hojas jóvenes. **E.** Se desarrolla un amarillamiento marginal o clorosis de completa de las hojas maduras. **F.** La progresión de la enfermedad da como resultado el marchitamiento vascular y la muerte de la planta hospedera. Las esporas fúngicas (microconidios, macroconidios y clamidosporas) se forman en el tejido vegetal muerto, permanecen dispersas en el suelo y quedan en estado de latencia hasta una próxima infección

1.1.2.1 Marchitamiento vascular del clavel

El marchitamiento vascular causado por *Fod* ha sido una de las enfermedades que más ha producido pérdidas (entre 21 y 47%) de los cultivos de clavel a nivel mundial (Vásquez Ramírez and Castaño Zapata, 2017). La enfermedad se caracteriza por la apariencia unilateral de los síntomas, amarillamiento parcial de las hojas y el doblamiento de los

brotos hacia el costado de la planta enferma. En el estado inicial de la enfermedad se puede observar una parte de la planta de color amarillo, mientras que el resto, de un color verde normal; las plantas sufren de enanismo y una disminución del crecimiento. Los síntomas de la enfermedad afectan la planta en una dirección ascendente causando el marchitamiento generalizado y muerte de tejidos. La infección se desencadena cuando las hifas de los hongos penetran la epidermis de las raíces, pasan a la corteza para, posteriormente, moverse hacia el tejido vascular por colonización intracelular de los vasos del xilema. La colonización inicial está restringida a los tejidos vasculares y, cuando el hospedero presenta un estado avanzado de enfermedad, el patógeno invade los tejidos adyacentes como la médula, el cambium, el floema y la corteza (Arbeláez, 1993).

1.2 Interacción Planta – Microorganismo

Las plantas están continuamente expuestas a una alta variedad de factores de estrés. Uno de estos corresponde a la interacción con diferentes microorganismos que pueden causar daño e interrupción en el crecimiento o, por otro lado, cooperar con la obtención de nutrientes o superación de algunos escenarios perjudiciales para la planta. En la naturaleza, la supervivencia vegetal bajo las condiciones de estrés requiere un sistema de adaptación y/o acondicionamiento sofisticado relacionado diversamente con la evolución de sus mecanismos de defensa; este ha venido adaptándose a razón de la evolución de los mecanismos de colonización de los microorganismos patógenos (Ranf, 2017).

A diferencia de los mamíferos, las plantas no poseen células defensoras móviles. Por el contrario, se basan en la inmunidad innata de cada célula y en las señales conservadas que se derivan de los sitios de infección (Jones, J.D.G., 2006). La primera línea de defensa de la planta está formada por las barreras físicas, las cuales incluyen cutículas, pared celular y algunos metabolitos antimicrobianos que son producidos constitutivamente. Si en principio, esta defensa pasiva es vulnerada, se despliega la defensa mediada por el sistema inmune innato de la planta. La interacción planta – patógeno está gobernada, en algunos casos, por interacciones específicas entre genes de avirulencia (*avr*) de los patógenos (los cuales codifican para efectores) y aquellos genes que proporcionan resistencia a las enfermedades correspondientes (*R*) (que codifican proteínas *R*). Cuando los genes *R* y *avr* están presentes, tanto en el hospedero como en el patógeno, el resultado

de la interacción es la resistencia a la enfermedad. Por el contrario, si alguno de los dos está ausente, el efecto neto será el desarrollo de la enfermedad. A esta relación se le conoce como la hipótesis Gen por Gen, descrita originalmente por Flor en el año 1942 (Flor, 1971).

Jones y Dangl, en el año 2006, propusieron que muchas de las proteínas R podrían activarse indirectamente por los efectores de patógenos y no por reconocimiento directo. Este modelo, conocido como el modelo del Guardián, permite desencadenar una cascada de eventos de transducción de señales que terminan en la activación de mecanismos de defensa en la planta y la detención del crecimiento del patógeno (Dangl and Jones, 2001). Durante las interacciones incompatibles planta/patógeno, los procesos de reconocimiento principales que permiten la activación de los mecanismos de defensa del hospedero pueden ser clasificados en dos grupos, en función del lugar de la célula donde ocurren. El primero, que se lleva a cabo a nivel apoplástico, es bastante conservado y utiliza receptores de reconocimiento de patrones transmembranales (PRR como acrónimo de *Pattern recognition receptors*) que responden a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs acrónimo de *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) o a patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs del inglés *Microbe-Associated Molecular Patterns*). El segundo es más específico actuando dentro de la célula, el cual utiliza productos proteicos polimórficos NB-LRR que son codificados por la mayoría de los genes R. Estos productos reciben el nombre de sus dominios característicos de unión a nucleótidos (NB *Nucleotide Binding*) y a su repetición rica en leucina (LRR por sus siglas en inglés de *Leucine-rich repeat*). A la fecha, se ha reportado que la resistencia a enfermedades mediada por NB-LRR es eficaz, principalmente, contra patógenos biotróficos o hemibiotróficos, pero no contra patógenos necrotróficos.

El modelo zigzag (Jones, J.D.G., 2006) representa cómo es el funcionamiento del sistema inmune en las plantas. Este modelo incluye cuatro etapas, como se muestra en la figura 1.4: En la primera, se presenta el reconocimiento de PAMPs o MAMPs por parte de los PRRs apoplásticos del hospedero, los cuales son generalmente receptores de tipo quinasa (RLKs por sus siglas en inglés *Receptor-like kinase*) que presentan un dominio quinasa extracelular, transmembranal o citoplasmático, o receptores de tipo proteínas (RLPs como acrónimo del inglés *Receptor-like protein*), los cuales carecen de dominios de señalización extracelular. Éstos activan la respuesta inmune innata llamada PTI (*Pattern-triggered immunity*) como consecuencia del reconocimiento de PAMPs o MAMPs. La PTI se describe

como una respuesta inmune de amplio espectro que controla la colonización microbiana a través de fenómenos que pueden incluir, entre otros, la liberación de compuestos defensivos y la privación de nutrientes, como el transportador de absorción de azúcar (STP13), la cual puede llegar a detener la colonización de los patógenos no adaptados (*non-host*). La segunda fase compromete a los patógenos adaptados, los cuales producen efectores contribuyendo a su virulencia y suprimen la PTI y de esta forma es posible desencadenar la ETS (*Effector-triggered susceptibility*). Los efectores son capaces de alterar algunos procesos de defensa de la planta a nivel de reconocimiento, transducción de señales o mecanismos de defensa.

Durante la coevolución, las plantas han desarrollado proteínas de resistencia para detectar los efectores o su actividad. A la tercera fase se le conoce como ETI (*Effector – Triggered Immunity*). El reconocimiento del efector puede ser directo o indirecto y se da mediante la acción de las proteínas NB-LRR. Las respuestas PTI y ETI están asociadas con la activación de varias respuestas en el tejido infectado primario, como lo puede ser la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*), síntesis de fitoalexinas o reprogramación transcripcional (Klessig, Choi and Dempsey, 2018). Sin embargo, se ha propuesto que la ETI es una PTI acelerada y amplificada, que puede conllevar a una respuesta hipersensible (HR) en el sitio de infección. La cuarta y última fase se basa en la evolución por selección natural, la cual impulsa a los patógenos a evitar la ETI eliminando, modificando o adquiriendo efectores que puedan suprimir esta respuesta.

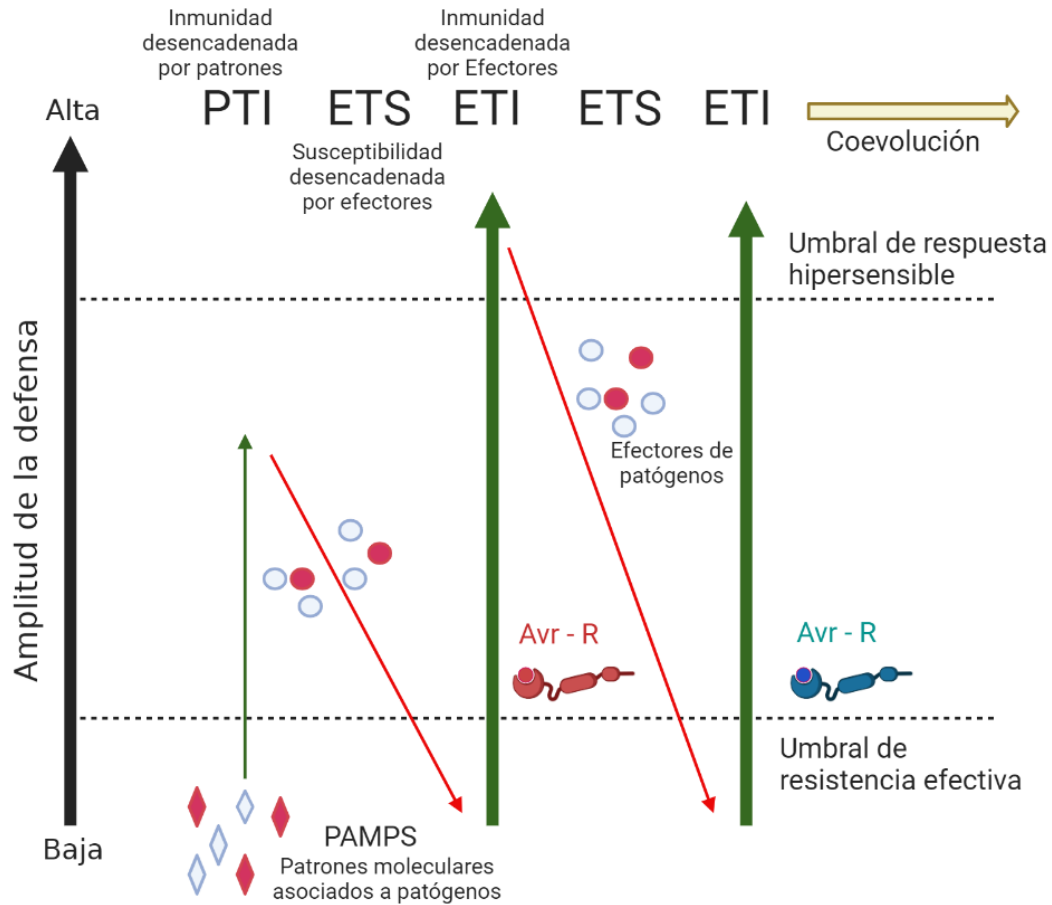


Figura 1.4 Modelo Zig-Zag.

Fase 1. Plantas detectan MAMPs o PAMPs por medio de las PRRs para desencadenar la PTI. **Fase 2.** Los patógenos exitosos liberan efectores que interfieren con la PTI, o que permiten la nutrición y dispersión de patógenos, resultando en la ETS. **Fase 3.** El efector (indicado en rojo) es reconocido por una proteína NB-LRR y activa la ETI, una versión amplificada de PTI; ésta tiene la facultad de inducir la muerte celular hipersensible (HR). **Fase 4.** Se seleccionan los patógenos aislados que han perdido el efector rojo puede que hayan ganado nuevos efectores (color azul), ayudando a los patógenos a suprimir la ETI. Esta selección favorece los nuevos alelos NB-LRR de las plantas para reconocer uno de los efectores adquiridos, resultando en una nueva ETI (Jones, J.D.G., 2006)

1.3 Inducción de resistencia

En las plantas se han descrito dos mecanismos generales para la estimulación de la Resistencia Inducida (IR como acrónimo en inglés de *Induced Resistance*). La primera es denominada como Resistencia Sistémica Adquirida (RSA), también conocida como SAR (por el acrónimo *Systemic acquired resistance*), la cual está basada principalmente en la vía de señalización del ácido salicílico (AS) y ha sido relacionada con infecciones previas

o a la aplicación de diversas sustancias químicas. La segunda es denominada Resistencia Sistémica Inducida (ISR – *Induced Systemic resistance*), y es dependiente de las vías de señalización del ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) y generada por la acción de algunos microorganismos beneficiosos como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGRR) y los hongos micorrízicos.

La IR se caracteriza por la expresión de varios aspectos de la respuesta de defensa molecular y celular que ocurren como respuesta, ya sea al inductor solamente o posterior a la infección con el patógeno, en el tejido previamente estimulado. Se ha determinado que las plantas reconocen varios compuestos de origen microbiano conocidos como MAMPs, los cuales se han encontrado que actúan como activadores de las respuestas de defensa de la planta, protegiéndolas de una amplia gama de patógenos. Entre los principales compuestos se pueden citar los péptidos y proteínas (harpinas (HrpN), flagelina (flg22), factor de elongación Tu (EF-Tu), exopolisacáridos (EPSs), Lipopolisacáridos (LPSs), entre otros (Siah *et al.*, 2018).

Del mismo modo, se ha encontrado algunos péptidos endógenos, en algunas especies de plantas, con función en la inducción de su resistencia, los cuales se liberan principalmente después de una herida o posterior a una infección (Yamaguchi, Pearce and Ryan, 2006; Yamaguchi and Huffaker, 2011). El uso de algunos productos orgánicos como el carbón vegetal, proveniente de la degradación térmica de la biomasa, se asocia al aumento de la resistencia de las plantas de espárragos frente a *Fusarium oxysporum* ff. spp. *Asparagi* y *proliferatum*, incrementando el peso radicular y reduciendo el porcentaje de lesión frente al tratamiento control (Elmer and Pignatello, 2011). Así mismo, el uso exógeno de algunas vitaminas induce la resistencia a enfermedades en varias especies de plantas como la tiamina, riboflavina, bisulfito sódico de menadiona y ácido p-aminobenzoico (vitamina B1, B2, K3 y Bx), entre otros; las cuales ofrecen protección significativa contra diferentes patógenos por medio de la inducción de mecanismos de resistencia innatos de la planta. El uso de compuestos de origen orgánico, como los mencionados anteriormente, se han propuesto como una alternativa limpia al uso de pesticidas sintéticos usados en los sistemas de producción para el control de enfermedades de origen parasitario (Boubakri, 2020).

1.3.1 Tipos de inductores de resistencia

Los mecanismos de defensa de la planta pueden ser inducidos por agentes físicos o químicos; a estos se les denomina elicitores, los cuales inducen cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares en la planta. Un elicitador se puede definir como aquella sustancia que, al aplicarse en pequeñas cantidades a un sistema vivo, regula un conjunto de genes, que incluyen aquellos que codifican proteínas relacionadas con la PR, posteriormente induce o mejora la biosíntesis de compuestos específicos (Naik and Al-Khayri, 2016). Estos compuestos y genes se caracterizan por tener una regulación positiva y tienen un papel importante en el acondicionamiento de las plantas a condiciones de estrés biótico. De este modo, la elicitación se traduce en la regulación inducida o mejorada de genes y a la biosíntesis de metabolitos particularmente importantes en el acondicionamiento, debido a la adición de trazas del elicitador (Baenas, García-Viguera and Moreno, 2014; González, 2015).

En la naturaleza, las moléculas con efectos elicitores pueden ser clasificadas como bióticos y abióticos, dependiendo de la fuente que se use para su obtención. Entre los elicitores de origen biótico, se encuentran algunos polisacáridos como pectina y celulosa, proteínas, extractos de levaduras, preparaciones de origen fúngico y bacteriano. Por su parte, los elicitores de origen abiótico (o sintético) se clasifican en 2 grupos: Algunas hormonas pertenecientes a las vías del ácido salicílico y ácido jasmónico y, por otro lado, se encuentran los elicitores químicos como algunos ácidos orgánicos, compuestos sintéticos y ciertas sales minerales (Naik and Al-Khayri, 2016).

- **Inductores hormonales**

Las hormonas vegetales más estudiadas en este contexto han sido el ácido jasmónico y el ácido salicílico, debido a sus roles en la respuesta de defensa en plantas. El ácido jasmónico y el jasmonato de metilo (MeJA) son moléculas señal que se activan en respuesta a una herida o a un ataque por patógenos, las cuales modulan varias de las respuestas vegetales induciendo la producción de metabolitos secundarios, alterando ciertas rutas de biosíntesis para incrementar o reducir los niveles de ciertos metabolitos especializados, como algunos flavonoides y terpenoides. Se ha demostrado, por ejemplo, que el uso de MeJA exógeno en hojas de *Cabernet sauvignon* permitió el aumento de los niveles de transcripción para genes que codifican PR como la glucanasa, así como enzimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas (fenilalanina amonio liasa (PAL)). En

consecuencia, la acción del MeJA ha sido asociada como inductor de resistencia de *C. sauvignoni* contra el hongo *Erysiphe necator* (Belhadj *et al.*, 2006). Por su parte, el uso de ácido salicílico (AS) induce respuestas de defensa frente a varios patógenos intensificando la producción de algunas moléculas como PAL o ciertas moléculas pertenecientes a la vía del ácido shikímico, las cuales modulan vías de crecimiento y desarrollo vegetal (Naik and Al-Khayri, 2016). Algunos estudios han puesto en evidencia que el uso exógeno de AS mejora el crecimiento y productividad de las plantas, generando así la inducción de RSA y una amplia protección contra estrés biótico, infecciones y ataques de patógenos (Hayat *et al.*, 2010).

1.3.2 Inductores de resistencia de origen sintético y hormonas

De acuerdo con Baenas *et al.*, 2014, en el grupo de los inductores de resistencia, además de aquellos de origen biótico previamente descritos, se pueden encontrar algunos considerados de origen abiótico por ser obtenidos mediante síntesis química, particularmente los inductores hormonales e inductores químicos (Baenas, García-Viguera and Moreno, 2014).

- **Inductores de tipo sintético**

Los inductores químicos como ácidos, sales inorgánicas o iones metálicos pueden alterar la fisiología y la bioquímica de las células vegetales. El uso de estas sustancias es una de las estrategias para aumentar la producción y/o acumulación de productos naturales vegetales estimulando algunas rutas biosintéticas de particular interés. En general, se presume que estas moléculas actúan en algún punto de las vías de señalización implicadas en la resistencia a enfermedades. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la bioquímica implicada en su papel inductor. Entre tales inductores químicos se pueden nombrar el fosetil-aluminio (tris-O-etilfosfonato), ácido β -aminobutírico, acibenzolar-S-metilo (benzo[1,2,3]tiadiazol-7-carbotioato de S-metilo), derivados sintéticos y funcionalizados del quitosano, y algunas sales de fosfato como, fosfato de potasio, sodio o magnesio, y fosfito de potasio (González, 2015).

- **Sales de fosfito**

El fosfito es químicamente similar al fosfato y, dentro de las células, puede tener un rol en diferentes funciones del metabolismo tanto en plantas como en patógenos (Mohammadi *et al.*, 2021). El uso de sales o ácidos pertenecientes a la familia del fosfito (potasio, calcio, cobre, manganeso, aluminio, ácido fosforoso/fosfónico) (Mohammadi *et al.*, 2021) ha evidenciado tener un menor daño al medio ambiente pues tiene una mejor solubilidad y movilidad en el suelo, debido a su poca reacción con el hierro y calcio presente en el ambiente, estando así con una mayor disponibilidad para las raíces de las plantas en comparación al fosfato (Achary *et al.*, 2017). Así mismo, estas sales se han utilizado como fungicidas durante más de 40 años y su uso sigue siendo blanco de estudios en diversos patosistemas, investigando su papel como inductor de resistencia (Silva *et al.*, 2011; Mohammadi *et al.*, 2021).

Se ha encontrado que disoluciones de fosfito de potasio previenen eficazmente algunas enfermedades de plantas causadas por oomicetos como aquellos pertenecientes al género *Peronospora*, *Plasmopora*, *Phytophthora* y *Pythium* (Silva *et al.*, 2011). En este sentido, el fosfito de potasio sobre plantas de *Arabidopsis*, inoculadas con zoosporas de *Phytophthora palmivora* permitieron una respuesta de defensa vegetal como el aumento de la actividad citoplasmática, desarrollo de agregados citoplasmáticos, liberación del ión superóxido, muerte celular localizada y acumulación de compuestos fenólicos alrededor de las células que estaban infectadas, a diferencia con las plántulas infectadas sin tratar previamente con el inductor de resistencia, que evidenciaron una colonización rápida del patógeno antes de las primeras 24 hpi, permitiendo regular algunos mecanismos de defensa de la planta, inhibiendo la patogénesis (Daniel and Guest, 2006). Por ejemplo, el uso de fosfito de potasio puede desencadenar una respuesta hipersensible que es responsable de la resistencia inducida de hojas de papa contra *Phytophthora infestans* (Lim *et al.*, 2013); así mismo, se ha demostrado que puede causar un incremento en la expresión de la proteína similar a la tautomatina (*TLP* por su acrónimo *Thaumatococcus-like protein*) en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) inoculadas con *Pseudoperonospora cubensis* (Ramezani, Rahmani and Dehestani, 2017), evidenciando así un aumento de las actividades de señalización de SAR (Mohammadi *et al.*, 2021).

Evidencias experimentales, en algunos modelos vegetales, han mostrado que la aplicación de sales de fosfito genera una mayor eficiencia en la defensa de la planta aumentando significativamente respuestas bioquímicas asociadas a la resistencia vegetal (Gómez-

Merino and Trejo-Téllez, 2015; Cerqueira *et al.*, 2017; Ramezani, Rahmani and Dehestani, 2017; Trejo-Téllez and Gómez-Merino, 2018; Wu *et al.*, 2019; Gilardi *et al.*, 2020; Vinas, Mendez and Jiménez, 2020; Pérez Mora, Melgarejo and Ardila, 2021). Del mismo modo, en el caso de la interacción *Eucalyptus marginata* – *Phytophthora cinnamomi* (Jackson *et al.*, 2000) demostraron que la acción de las sales de fosfito es dependiente de la concentración; a bajas concentraciones, interactúa con el patógeno en el sitio de entrada para estimular algunas enzimas de defensa del hospedero, mientras que a altas concentraciones, actúa directamente sobre el patógeno para inhibir su crecimiento (Jackson *et al.*, 2000). Estos resultados son comparables con el estudio ejecutado por Cerqueira *et al.*, donde evaluaron parámetros fisiológicos y hormonales de *Pseudotsuga menziesii* en interacción con *Fusarium circinatum* (*Fc*), en el cual la aplicación de sales de fosfito inhibió el crecimiento micelial y retrasó el desarrollo de la enfermedad de manera dependiente de la concentración, sugiriendo la capacidad para el control de la infección por *Fc* (Cerqueira *et al.*, 2017).

La aplicación de disoluciones de sales de fosfito de potasio por aspersión en hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) y posterior inoculación con *Phytophthora infestans*, resultó en cambios significativos en el metaboloma de la hoja de papa, así como una asociación con niveles más altos de componentes de la ruta fenilpropanoide, los cuales son esenciales en la respuesta de defensa vegetal a cualquier tipo de estrés. El tratamiento con disoluciones de sales de fosfito desencadenó una modificación en la concentración de algunos metabolitos primarios pertenecientes al ciclo del ácido cítrico y al metabolismo de carbohidratos (Wu *et al.*, 2019).

El uso de disoluciones de fosfito de potasio se ha estudiado en varios modelos vegetales evidenciando cambios significativos en el perfil metabólico de la planta asociados al uso de esta sal; sin embargo, dentro del grupo de investigación, hasta el momento solo se ha investigado acerca del contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides en la interacción clavel – *Fod*, donde se evidenció una acumulación por efecto del uso de una disolución de fosfito de potasio (Pérez Mora, Melgarejo and Ardila, 2021), es por esto que se hace necesario ahondar en el mecanismo bioquímico y molecular que tiene el efecto de usar este inductor de resistencia en el clavel.

1.3.3 Efectos de la aplicación de inductores de resistencia sintéticos en el metabolismo

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos con el objetivo de sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples o, por el contrario, degradar sustancias complejas para obtener moléculas simples (Figura 1.5). La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes de todas las células, las cuales son necesarias para su correcto funcionamiento y, en sí, para todo el organismo. De manera constitutiva, las plantas producen un conjunto de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos que hacen parte de los procesos básicos celulares. Estos compuestos hacen parte del antes denominado metabolismo primario (conocido ahora como central), que incluye procesos químicos que completan las funciones esenciales para el mantenimiento vital de la planta, como la supervivencia, crecimiento y reproducción (Ávalos and Elena, 1998). Por otro lado, el metabolismo especializado (previamente denominado como metabolismo secundario) se caracteriza por una enorme diversidad química, en donde los metabolitos generados presentan diferenciación restringida entre especies. Éstos productos finales no son esenciales para la vida de la célula, pero tienen un papel importante en la relación con el entorno en el que se encuentren, asegurando las interacciones y la supervivencia del organismo en su ecosistema (Verpoorte R., 2000).

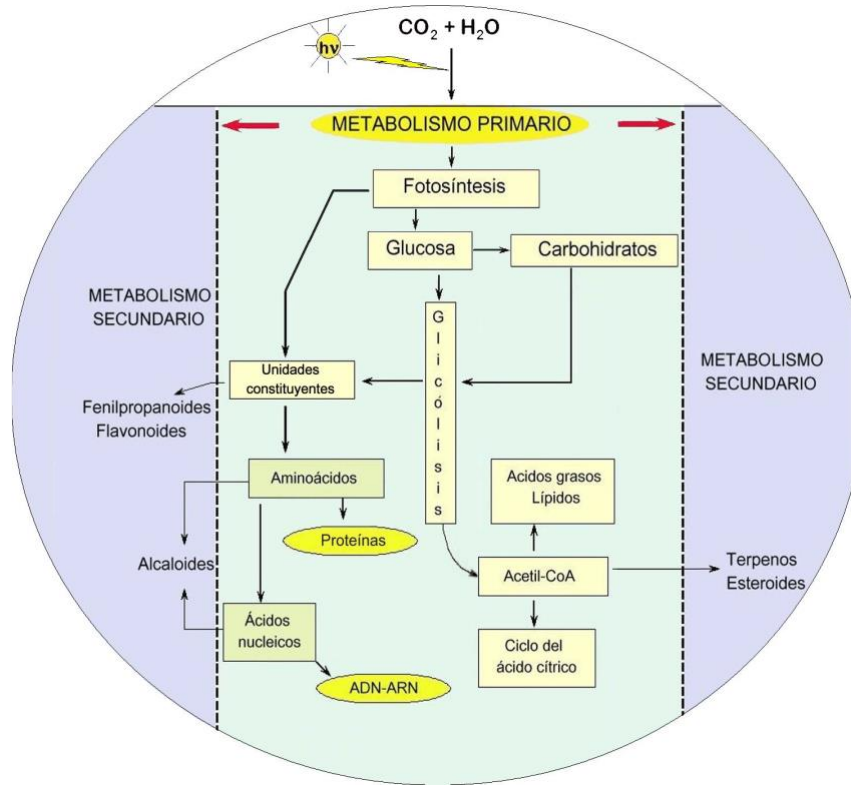


Figura 1.5 Esquema que muestra la relación entre el metabolismo primario (ahora central) y secundario (actualmente denominado como especializado) en plantas. Tomado de (Ávalos and Elena, 1998).

Dentro de este conjunto complejo de compuestos que se producen y consumen, muchos metabolitos participan como moléculas de señalización que generan respuestas de defensa mediante procesos de transducción de señales y reconocimiento de patógenos (Gerszten and Wang, 2008). Durante eventos de desafío con patógenos, el metabolismo de las plantas se ve desfavorecido en la mayoría de los casos, debido a la disminución de la fotosíntesis y al aumento del desarrollo de tejido necrótico y clorótico, modificando la acumulación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Zaynab *et al.*, 2019). Particularmente, el tratamiento con fosfito de potasio sobre hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.), inoculadas con el agente causante del tizón tardío, el oomiceto *Phytophthora infestans*, promovió la acumulación de varios metabolitos, tales como algunos carbohidratos (D-talosa, fructosa, manosa, rafinosa), aminoácidos (prolina, alanina, glutamina), β -alanina (metabolismo de nucleótidos) y algunos compuestos pertenecientes al metabolismo de

lípidos y el ciclo del ácido cítrico (ácido oléico y L-ácido málico). Lo anterior permitió sugerir que las sales de fosfito pueden actuar como un bioestimulante vegetal debido a que pueden inducir aumentos en la biosíntesis de ciertos metabolitos que confieren resistencia a la planta (Wu *et al.*, 2019). En este mismo sentido, un estudio proteómico en este mismo modelo, permitió reconocer algunas proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) y proteínas relacionadas con el metabolismo de la planta, sugiriendo que el uso de fosfito de potasio desencadena una respuesta de defensa contra *Phytophthora infestans* (Lim *et al.*, 2013). Machinandiarena, et al., 2012, demostraron que el uso de fosfito de potasio indujo la producción de peróxido de hidrógeno y el anión superóxido en este mismo patosistema, donde éstos son necesarios para la progresión de varios procesos biológicos, como la proliferación y diferenciación celular; igualmente se demostró un incremento en la deposición de calosa, incrementando la respuesta al daño mecánico o incluso la infección de patógenos. La expresión de los genes codificantes para la proteína relacionada con la patogénesis en papa (*StNPR1*) y el factor de transcripción *StWRKY1* se incrementaron como respuesta al tratamiento de fosfito de potasio, indicando una relación directa con la Resistencia Sistémica Adquirida dependiente del ácido salicílico (Machinandiarena *et al.*, 2012).

En el estudio reportado por Iula *et al.*, 2022, demostraron que el uso de 1 mM de benzotiadiazol (BTH), 10mg/mL de quitosano, 0,01 mM de AS y 0,1 mM de poliaminas (PA), aplicados por aspersión foliar, desencadenan una reprogramación metabólica en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), principalmente relacionada con el metabolismo especializado, los cuales integran compuestos relacionados con estrés como fenilpropanoides y algunas fitoalexinas, lípidos de membranas y alcaloides. Los resultados encontrados demuestran que la acción de los inductores posee efectos específicos propios de su aplicación. Los resultados sugieren que PA, AS y BTH brindan una respuesta relacionada con RSA, mientras que el quitosano provoca una respuesta dependiente de jasmonato como es RSI (Iula *et al.*, 2022).

Gómez *et al.* 2010 demostraron que el uso de MeJA asperjado sobre hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*) incrementaron el transporte de carbono y nitrógeno, en forma de productos fotosintéticos (fotosintatos) y aminoácidos, respectivamente; esta evidencia puede sugiere que el inductor actúa como regulador del estrés biótico al aumentar el potencial de crecimiento y supervivencia del organismo (Gómez *et al.*, 2010). Por su parte el tratamiento con soluciones de sales de fosfito en hojas de *S. tuberosum* inoculadas con

Phytophthora infestans generó un cambio significativo en el perfil metabólico en el momento de la infección (Gao *et al.*, 2018). De una manera análoga, el uso de una disolución al 1% de fosfito resultó en un aumento significativo en algunos aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y alcaloides. Muchos de estos metabolitos se encuentran involucrados en rutas metabólicas relacionados con el mejoramiento de la resistencia a patógenos y a desafíos ambientales (Wu *et al.*, 2019).

Los hallazgos reportados en estos estudios sugieren un modo de acción indirecto eficaz de la aplicación de disoluciones de fosfito de potasio, el cual consiste en alterar los niveles de ciertas moléculas relacionadas con el metabolismo primario, las cuales pueden generar resistencia vegetal frente a patógenos. En esta investigación se identificó cuál es el mecanismo bioquímico y molecular que se activa al momento de hacer uso de fosfito de potasio en el modelo clavel – *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* desde una visión de perfilado metabólico.

1.4 Metabolómica

Los metabolitos son los productos finales de los procesos reguladores celulares y sus niveles se pueden considerar como la última respuesta de los sistemas biológicos a los cambios genéticos o ambientales. Análogamente a los términos transcriptoma y proteoma, el conjunto de metabolitos sintetizados por un sistema biológico constituye su metaboloma (Fiehn, 2002).

La metabolómica se ocupa del análisis dirigido o no dirigido de metabolitos de bajo peso molecular (<1500 Da) de una muestra biológica que representan el fenotipo funcional de una célula, tejido u organismo. Sin embargo, hasta hace un par de décadas, la identificación y cuantificación simultánea y no sesgada de los metabolomas se limitaban a la elaboración de perfiles de ciertas clases de compuestos seleccionados o de algunos cambios metabólicos de señales conservadas; esto sin suficiente resolución analítica para determinar las identidades y los niveles de metabolitos individualmente (Roberts *et al.*, 2012; Zubiri, 2018). El desarrollo de tecnologías analíticas de mayor eficiencia ha permitido la separación e identificación de estas moléculas, entre ellas se incluyen análisis de alta resolución como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (MS)

que, junto a herramientas estadísticas como el Análisis de Componentes Principales (PCA) y Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), se ha logrado la detección de metabolitos y el reconocimiento de patrones en unos pocos minutos. La metabolómica se puede aplicar para definir los metabolitos relacionados con el pronóstico o diagnóstico de enfermedades, proporcionando una mayor comprensión fisiopatológica de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2012).

Wu y colaboradores, en el año 2019, para investigar el efecto de fosfito de potasio sobre hojas de papa (*Solanum lycopersicum*), emplearon cromatografía de gases acoplada a tiempo de vuelo y espectrómetro de masas (GC-TOF-MS), para llevar a cabo un estudio comparativo mediante perfilado metabólico, con el fin de identificar los cambios significativos en los niveles de metabolitos entre el tratamiento control y el tratamiento donde se usó fosfito de potasio. En su estudio obtuvieron y caracterizaron 616 compuestos, los cuales se pueden clasificar dependiendo su regulación diferencial. Muchos de estos metabolitos están involucrados en rutas metabólicas esenciales, así como en procesos relacionados con mayor resistencia a patógenos y desafíos con el medio ambiente. Entre los grupos de metabolitos que mostraron variación por la aplicación del inductor de resistencia, se encontraron componentes esenciales de la respuesta de defensa de las plantas, tales como el ácido cafeico, ácido salicílico y algunos involucrados en la ruta fenilpropanoide, confirmando el rol del fosfito de potasio como bioestimulante de plantas y su eficacia para mitigar algunos efectos de factores de estrés (Wu *et al.*, 2019).

1.4.1 Metabolómica dirigida

También llamada *Targeted metabolomics*. El objetivo de este enfoque es detectar y cuantificar de manera precisa uno o un pequeño conjunto de metabolitos conocidos mediante el uso de estándares internos. La metabolómica dirigida aprovecha la comprensión exhaustiva de una amplia gama de enzimas involucradas en procesos metabólicos, cinética e incluso los productos finales de las vías bioquímicas importantes y que contribuyen al estudio en particular, con el fin de aclarar el contexto de estados fisiológicos altamente específicos.

En el momento de usar este tipo de estrategia, el conocimiento previo de los metabolitos de interés es clave, ya que la preparación de la muestra se puede optimizar reduciendo el predominio de moléculas muy abundantes en los análisis y, dado que todas las especies

analizadas están claramente definidas, los artefactos analíticos no se tienen en cuenta para el estudio actual o posteriores (Roberts *et al.*, 2012).

1.4.2 Metabolómica no dirigida

Es conocida como *Untargeted metabolomics*. Este enfoque permite captar las señales de la mayor cantidad posible de los metabolitos que integran el metaboloma, aunque su cuantificación es menos precisa, la cual suele suministrar niveles semi-cuantitativos basados en abundancias relativas. Sin embargo, es útil a la hora de hacer comparaciones entre individuos o grupos. Además, todas las señales generadas por este tipo de análisis son integradas en bases de datos, donde se debe identificar la molécula y, aunque muchos de los metabolitos detectados no estén registrados en las bases de datos, su correlación con el control puede sugerir un cambio en el fenotipo de estudio, lo cual es de relevancia para el desarrollo de nuevos trabajos para su identificación y estudio de las vías metabólicas donde estén implicadas (Zubiri, 2018).

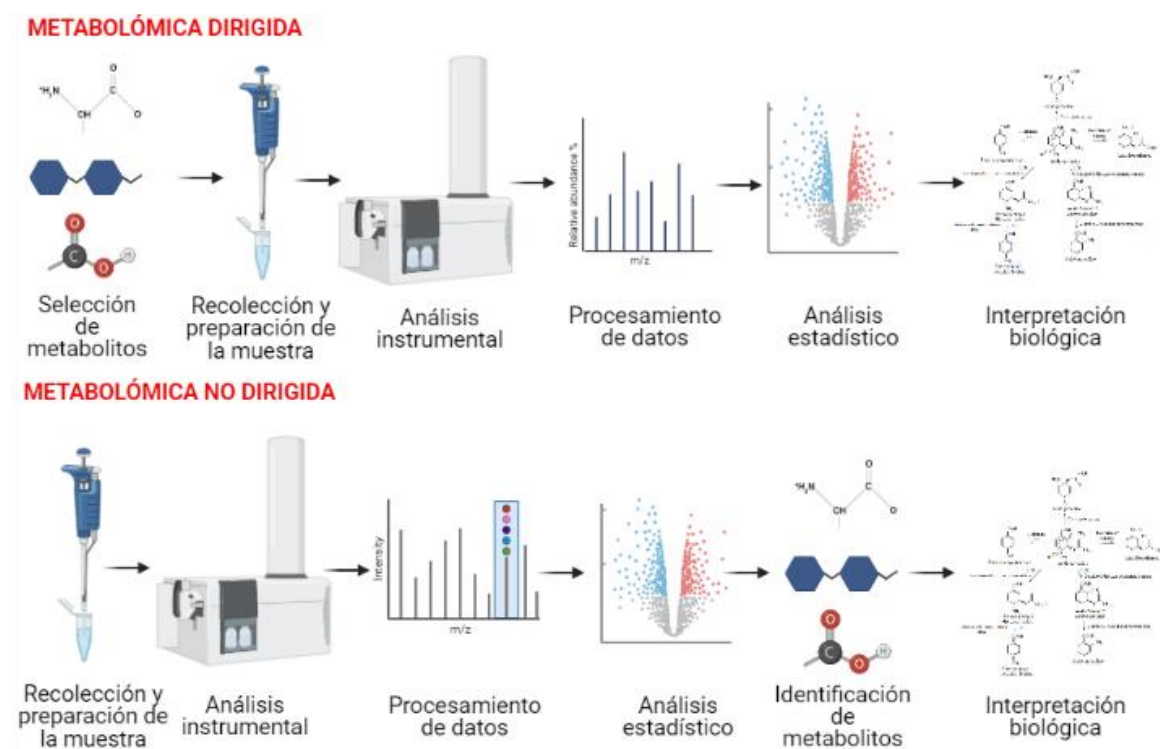


Figura 1.6 Esquema simplificado del flujo metodológico de los dos enfoques generales para abordar estudios en metabolómica: dirigida y no dirigida. Tomado de (Zubiri, 2018).

1.4.3 Derivatización por sililación

La sililación es una herramienta utilizada para aumentar la volatilidad, la estabilidad térmica y la movilidad cromatográfica de compuestos orgánicos polares e inestables. Esta derivatización se basa en la sustitución de átomos de hidrógeno activos en grupos OH (alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, oximas, enoles, entre otros), NH (aminas, amidas, iminas) y SH (tioles, ácidos tiolcarboxílicos) por un grupo sililo, siendo el método más simple, rápido y versátil para el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). El uso de grupos sililo pesados como *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) permite el análisis de compuestos de bajo peso molecular. Así, al tener un aumento en el tiempo de retención, sus derivados aparecen generalmente en la región cromatográfica que está libre de disolventes o productos de hidrólisis de bajo peso molecular. En este sentido, los derivados resultantes se caracterizan por una reducción de la interacción dipolo-dipolo, confiriéndoles una alta volatilidad y excelentes propiedades cromatográficas, donde se obtienen señales cromatográficas bastante estrechas y simétricas. Además, el previo uso de metoxiamina permite la generación de derivados de oxima de compuestos que contienen grupos aldehído o cetona, asegurando una identificación y cuantificación ideal (Horning, Moss and Horning, 1968). A menudo, la sililación se usa en varios análisis cualitativos y/o cuantitativos de moléculas (bio)orgánicas, fármacos, venenos, control de dopaje y metabolitos, donde los analitos están presentes en cantidades de trazas en el material biológico (Halket and Zaikin, 2003).

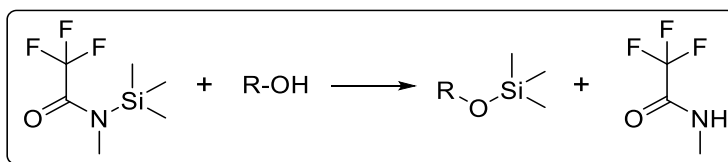


Figura 1.7 Reacción general de grupo hidroxilo con MSTFA (también aplica para los átomos de hidrógeno activos en grupos NH y SH).

1.5 Análisis transcripcionales de genes inducidos en clavel

La evaluación de los niveles transcripcionales por medio de la técnica RT-qPCR ha sido una herramienta esencial para validar los resultados obtenidos a nivel metabólico de

estudios moleculares en interacciones planta – patógeno. Dentro del grupo de investigación los estudios dirigidos con esta técnica se han centrado en profundizar sobre la regulación de diferentes genes específicos que han llegado a ser relacionados con procesos de defensa frente a *Fod*. En el contexto del clavel se han hecho reportes en el estudio sobre la ruta fenilpropanoide, la biosíntesis de flavonoides, la regulación de especies reactivas de oxígeno, fenómenos asociados al apoplasto y a las rutas de biosíntesis de algunas hormonas asociadas a defensa vegetal (Ardila, 2013; Martínez, 2019; Monroy-Mena, 2019; Vanegas, 2019; Rincón, 2020); por su parte, también se han estudiado algunas enzimas sobre el patógeno como son la proteasa, pectato liasa, poligalacturonasa y xilanasas, y proteínas secretadas en el xilema (SIX) (Ramírez, 2014; Castiblanco, 2023). El estudio de niveles usando RT-qPCR es la herramienta más usada en el estudio de regulación génica a nivel transcripcional considerando su rapidez y accesibilidad (Monroy-Mena *et al.*, 2019).

Considerando los resultados de la presente investigación, se presentan a continuación, algunos aspectos importantes de las dos enzimas que fueron evaluadas a nivel transcripcional por efecto de la aplicación de fosfito de potasio en clavel.

1.5.1 Pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR, EC 1.5.1.2)

Las dos rutas para la biosíntesis de prolina en plantas superiores comparten el último paso, la conversión de pirrolina-5-carboxilato (P5C) a prolina, que es catalizada por P5CR con el uso de NAD(P)H como coenzima (Ruszkowski *et al.*, 2015a). Esta enzima hace parte de la familia de las reductasas, actuando sobre el grupo donador HC-NH, usando NAD^+ como aceptor.

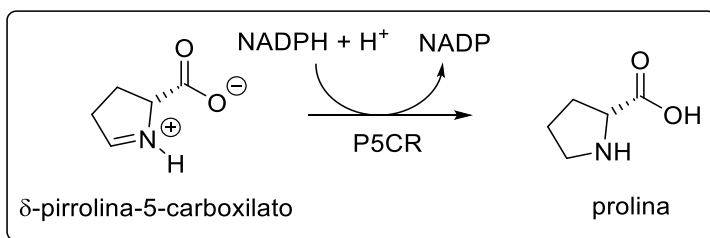


Figura 1.8 Esquema de la reacción enzimática catalizada por P5CR

Estudios realizados sobre hojas de plantas de papa, permitió identificar la sobrerregulación de P5CR como efecto del uso de fosfito y en presencia *Phytophthora infestans*, demostrando que esta enzima es inducible por acción de este inductor de resistencia (Lim, 2012)

1.5.2 Proteína no expresora de genes relacionados con la patogenicidad 1 (NPR1)

NPR1 es una proteína reguladora del transcriptoma de defensa la cual es inducida por el ácido salicílico como señal inmune de la planta. NPR1 es un homodímero con forma de ave que comprende un dominio de complejo amplio, y un dominio BTB (Dominio *Broad-complex*, *Tramtrack* y *Bric-à-brac*), el análisis hecho por Kumar, *et al.* revelaron que la proteína tiene un dedo de zinc único en el dominio BTB para interactuar con las repeticiones de anquirina y media la oligomerización de NPR1; del mismo modo, cuando hay lugar de estimulación de la proteína, se requiere el plegamiento y el acoplamiento inducido por el ácido salicílico del dominio de unión a este ácido denotando un papel directo en la regulación de NPR1 (Kumar *et al.*, 2022). La proteína NPR1 se ha estudiado en muchos aspectos para comprender su función, la cual conlleva a una regulación clave de SAR, la cual es activada por AS activando la expresión de genes *pr*, los cuales codifican proteínas relacionadas con patogénesis (*PRs*). Los cambios redox mediados por ácido salicílico en las células vegetales regulan tanto el funcionamiento de NPR1 como su unión a los factores de transcripción de la familia TGA el cual, como se ha descrito, activan elementos sensibles a ácido salicílico en los promotores de los genes *pr* al unirse con NPR1 (Pieterse and Van Loon, 2004). Además de su papel regulatorio en RSA dentro del núcleo celular, se ha identificado una función citosólica de NPR1, en la intercomunicación cruzada entre las vías de señalización de defensa vegetal dependiente de ácido salicílico – ácido jasmónico, etileno (Dong, 2004).

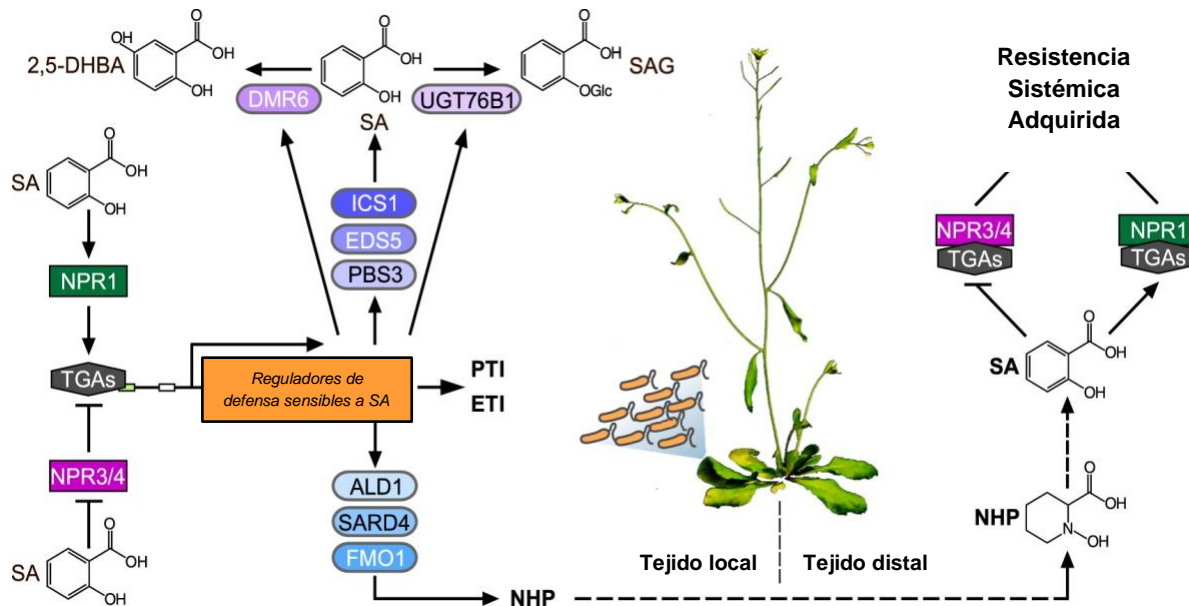


Figura 1.9 Funciones generales de los receptores AS en la inmunidad de las plantas (Liu *et al.*, 2020)

El ácido salicílico es percibido por dos clases de receptores: NPR1 y NPR3/NPR4. La unión de AS suprime la actividad de represión transcripcional de la segunda clase de receptores y mejora la calidad de activación transcripcional de NPR1, dirigiendo a la regulación positiva de los reguladores de defensa sensibles a AS. La inducción de genes biosintéticos de AS (ICS1 – Isocorismato sintasa1, EDS5 - *enhanced disease susceptibility5* y PBS3 - *avrPphB susceptible3*) promueve la producción de AS, mientras que la inducción de UGT76B1 y DMR6 estimula la conversión de AS a ácido 2,5-dihidrobenzoico (2,5-DHBA) y a glicósido de ácido salicílico (SAG), respectivamente. En tejidos locales, la expresión de reguladores de defensa que responden a AS promueve PTI y ETI, también estimula la producción de la señal de SAR, ácido *N*-hidroxipipecólico (NHP) al activar la expresión de genes biosintéticos de NHP. En tejidos distales, NHP promueve la biosíntesis de AS y desencadena SAR.

En la interacción clavel – *Fod*, estudios previos dentro de grupo de investigación, reportan que en simplasto de raíz, se presentó un incremento de las hormonas ácido salicílico y salicilato de metilo, indicando su posible papel en la activación de los mecanismos asociados a la resistencia al patógeno, teniendo una posible vía regulación mediada por SAR (Vanegas, 2019). El uso de fosfito de potasio indujo la expresión de NPR1 en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *Phytophthora infestans* a horas tempranas (48 hpi) en comparación al control, demostrando que el uso del inductor de resistencia permite una preparación de la planta para una respuesta más temprana e intensa a la infección mediada por Ácido salicílico (Machinandiarena *et al.*, 2012); en el mismo sentido,

Eshraghi, *et al.*, demostraron que en las hojas tratadas solo con una disolución de fosfito no solo potencia y/o prepara las respuestas de defensa para una respuesta rápida después del desafío con el patógeno, sino que también induce constitutivamente la expresión del gen *atnpr1* en ausencia *Phytophthora infestans* (Eshraghi *et al.*, 2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades realizadas en esta investigación se dividieron en tres etapas generales: la primera etapa consistió en determinar las condiciones de aplicación de la disolución de fosfito de potasio en esquejes de clavel susceptibles al marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Las condiciones estudiadas fueron la aplicación por medio de adición al sustrato, el cual ha demostrado resultados positivos para la planta en el patosistema estudiado usando un inductor de resistencia de tipo biótico (Santos-Rodríguez, Coy-Barrera and Ardila, 2021) y por el método de *drench* en raíces (Smillie, 1989; Pérez Mora, Melgarejo and Ardila, 2021). Una vez escogido el modo de aplicación de la disolución de fosfito, en la segunda etapa se llevó a cabo la identificación de metabolitos obtenidos de las raíces de clavel por medio de GC-MS con previo tratamiento con agente sililante, con el posterior reconocimiento de aquellos metabolitos diferenciales con relevancia en los tratamientos evaluados. La tercera etapa, finalmente consistió en la evaluación de los niveles transcripcionales de los genes *npr1* y *pc5r* involucrados en la biosíntesis de los metabolitos estadísticamente diferenciables de la etapa anterior.

En la Figura 2.1 se presenta, de manera general mediante un diagrama de flujo, las etapas experimentales planteadas para el desarrollo de la presente propuesta de investigación. Cada una de las etapas será posteriormente descrita de manera detallada, buscando presentar los aspectos más relevantes en cada caso.

2.1 Etapa 1: Selección de condiciones de aplicación de la disolución de fosfito de potasio

El objetivo de esta etapa fue seleccionar la manera de aplicación de la disolución de fosfito de potasio, evaluando la incidencia y severidad de la enfermedad, sobre la variedad susceptible al marchitamiento vascular. Esta primera etapa se desarrolló en el laboratorio de Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

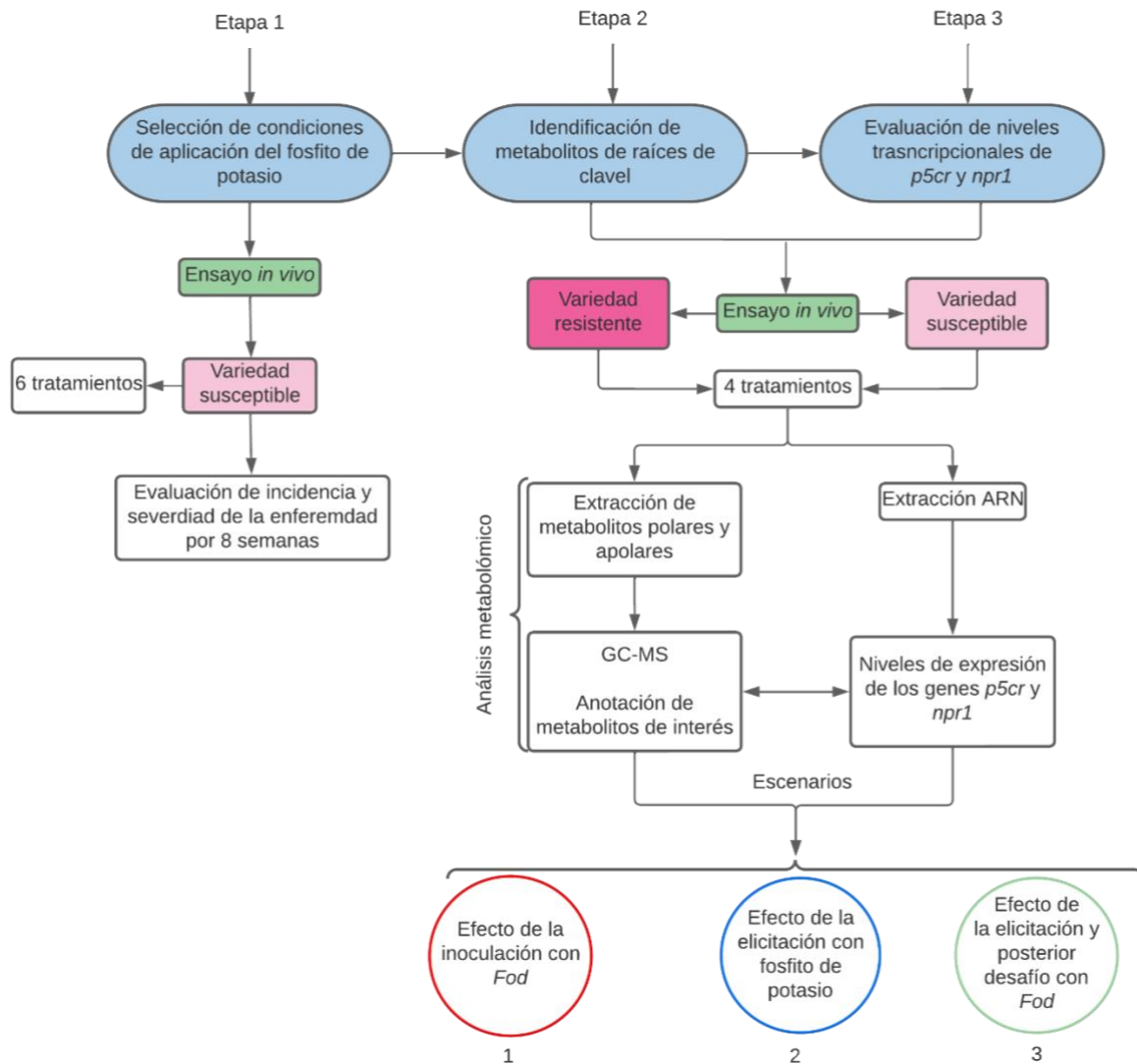


Figura 2.1 Metodología general llevada a cabo para el desarrollo del estudio.

2.1.1 Material biológico

- **Material vegetal**

El material vegetal utilizado en el presente estudio fue donado por la empresa Florval SAS, sede QFC del Grupo Chía, ubicada en el municipio de Gachancipá, Cundinamarca, Colombia. En todos los experimentos se utilizaron esquejes de clavel certificados libres de patógenos que tenían entre 3 a 4 semanas de enraizamiento. Se empleó la variedad 'Mizuki' (susceptible al marchitamiento vascular causado por *Fod*). Esta variedad se

encuentra dentro de las variedades de color rosa, la cual puede alcanzar una altura de 63 cm, dependiendo el uso comercial al que se quiera llegar.

- **Patógeno: *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi***

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2, utilizado en este estudio, fue obtenido a partir de aislamientos del patógeno provenientes de plantas de clavel con síntomas de marchitamiento vascular. Los aislamientos fueron conservados en placas de agar de papa y dextrosa (PDA) a temperatura ambiente (18 – 20 °C), durante siete días. Dentro del grupo de investigación se ha caracterizado el aislamiento usado, a nivel de género y forma especial, haciendo uso de estrategias moleculares (Ramirez, 2014; Castiblanco, 2023)

- **Preparación del inóculo**

La suspensión que se utilizó para la inoculación del material vegetal se preparó a partir de aislamientos del hongo provenientes de plantas de clavel con síntomas de marchitamiento vascular, crecidos en medio PDA a temperatura ambiente hasta saturación superficial. Para la propagación, se transfirió el micelio del hongo a un medio líquido de Czapek-Dox-Broth y se incubó con agitación recíprocante a 25 °C durante 8 días. Posteriormente, el inóculo se filtró en condiciones asépticas y las conidias aisladas se llevaron a una concentración de 1×10^6 conidias/mL (Ramirez, 2014).

2.1.2 Ensayo *in vivo*: Selección de condiciones de aplicación del fosfito de potasio

Se utilizaron esquejes de clavel de la variedad '*Mizuki*' con un periodo de aclimatación de 1 semana. Se realizaron 6 tratamientos en total, como se especifica en la Tabla 1.

Tabla 2.1 Tratamientos para la selección de condiciones de aplicación de fosfito de potasio.

Tratamiento	Descripción
T1	Control
T2	Inoculado
T3	Adición al sustrato-Control
T4	Adición al sustrato-Inoculado
T5	<i>Drench</i> -Control
T6	<i>Drench</i> -Inoculado

Se sembraron 180 esquejes por tratamiento bajo las mismas condiciones de humedad ($65,8 \pm 0,5\%$) y temperatura ($19,3 \pm 0,5$ °C), en recipientes que tenían como sustrato una mezcla 3:1 de suelo de tipo húmifero y vermiculita, previamente esterilizados en autoclave. Así mismo, las plantas se regaron una vez al día por el tiempo que duró el ensayo. Los tratamientos elicitados usaron una concentración de 3% de fosfito (PO_3^{-3}), bajo la formulación comercial ACUAPHYTE, que incluye fósforo asimilable (P_2O_5) a 385 g/L y óxido de potasio (K_2O) a 260 g/L, por esqueje, el cual se aplicó con una anterioridad de 144 h antes del desafío con el patógeno.

Pasado este tiempo, a cada recipiente se le añadieron 100 mL de disolución nutritiva 1X y, a los recipientes con esquejes infectados, la disolución nutritiva se mezcló con el inóculo del patógeno en una concentración de 1×10^3 conidias/mL. Adicionalmente, la mitad de los esquejes se inocularon por inmersión de sus raíces durante 20 segundos en una suspensión de concentración de 1×10^6 conidias/mL para posteriormente sembrarlas, mientras que la otra mitad, sirvió como control, y se sumergieron sus raíces en disolución nutritiva para sembrarlos en el sustrato sin patógeno. El estudio se realizó durante 9 semanas, donde se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad, determinando algunos efectos fenotípicos, como la longitud de las plantas y el amarillamiento de las hojas.

2.1.3 Estimación de la incidencia y severidad de la enfermedad

La incidencia se evaluó por medio del conteo de esquejes que presentaban síntomas del total de plantas inoculadas con *Fod*.

La severidad de la enfermedad fue estimada para cada planta siguiendo lo descrito por Gashaw *et al.* (Gashaw, Alemu and Tesfaye, 2014), usando una escala entre 0 y 5, donde:

0 = Planta sana

1 = Ligero doblamiento del tercio superior de la planta

2 = Marchitamiento de las hojas inferiores (1/3 de la planta)

3 = Marchitamiento de las hojas inferiores y medias (2/3 de la planta)

4 = Marchitamiento completo de la planta

5 = Muerte de la planta

Haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Severidad de la enfermedad} = \frac{\sum nv}{5N} \times 100\% \quad (1)$$

Ecuación 1. Índice de severidad. Donde n es el número de plantas en cada categoría de la escala; v , son los valores numéricos de la categoría de los síntomas; N , es el número total de plantas y 5 es referido al valor máximo de la escala (Higuera, 2001)

El Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (AUDPC por su acrónimo de *Area under the disease progress curve*) se calculó considerando la escala de severidad mencionada anteriormente, a partir de lo descrito por Paraschivu (Paraschivu *et al.*, 2013) como sigue:

$$A.U.D.P.C. = \sum_{i=1}^{n-1} \left[\left\{ \frac{S_i + S_{(i+1)}}{2} \right\} \times (t_{(i+1)} - t_i) \right] \quad (2)$$

Ecuación 2. Cálculo del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (AUDPC). Donde t es el tiempo de cada lectura medida en semanas, S es la severidad estimada y n es el número de lecturas.

2.2 Etapa 2: Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en los perfiles metabólicos de raíces de clavel durante su interacción con *Fod*

2.2.1 Ensayo *in vivo*

Se utilizaron plantas de clavel de las variedades '*Golem*' y '*Mizuki*', variedad resistente y susceptible a *Fod*, respectivamente. Se evaluaron 8 tratamientos en total; para cada una de las variedades de manera independiente se incluyó un control sin inocular y sin elicitar, un tratamiento inoculado con *Fod* sin elicitar, un tratamiento elicitado sin inocular y finalmente un tratamiento elicitado inoculado con *Fod*. Se sembraron 180 esquejes por tratamiento, bajo las mismas condiciones de humedad ($40 \pm 1\%$) y temperatura ($26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$), en recipientes que tenían como sustrato una mezcla 3:1 de suelo de tipo húmifero y vermiculita previamente esterilizados en autoclave. Así mismo, las plantas se regaron una vez al día por el tiempo que duró el ensayo. A cada recipiente se le añadirán 100 mL de disolución nutritiva 1X. Las raíces se sumergieron en disolución nutritiva para sembrarlos en el sustrato sin patógeno. El muestreo se realizó a las 0, 12, 24, 48 y 96

horas. Para cada uno de estos tiempos, se tomaron al azar 3 réplicas biológicas de cada uno de tratamientos. Las raíces se lavaron y se almacenaron a -80 °C.

Los tratamientos elicitados usaron una concentración de 3% de fosfito (PO_3^{-3}) bajo la formulación comercial ACUAPHYTE, que incluye fósforo asimilable (P_2O_5) a 385 g/L y óxido de potasio (K_2O) a 260 g/L, por esqueje, el cual se aplicó por el método anteriormente seleccionado, 144 h previas al desafío con el patógeno.

La incidencia se evaluó como se presentó en el apartado 2.1.3. para la variedad 'Mizuki'

2.2.2 Análisis metabolómico del ensayo *in vivo*

2.2.3 Extracción de metabolitos

La extracción de metabolitos se realizó teniendo en cuenta el protocolo reportado por Yang, et al., 2007. A partir de raíces colectadas a los tiempos indicados, previamente liofilizadas y maceradas con nitrógeno líquido, se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL y se agregó una mezcla de metanol/agua/cloroformo (4:1:2 v/v/v). Se adicionaron 40 μL de triacontano (1 mg/mL) como estándar no polar y se dejaron incubar a 50 °C por 1 hora. Luego de enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 900 μL de agua con 20 μL de ribitol (2 mg/mL en agua) como estándar polar interno. El empleo de los estándares se usó con el fin de comprobar la efectividad de la extracción de los metabolitos, evaluada por su presencia y contenido en cada uno de los perfiles obtenidos por GC-MS. Las mezclas se dejaron incubar por 1 h. Se centrifugaron a 2900 $\times g$ por 30 min a 4 °C. Se recolectaron las dos fases separadamente y se secaron los solventes con ayuda de un *SpeedVac*, siguiendo las especificaciones del fabricante (Yang & Bernards, 2007).

- **Extracto no polar**

El extracto no polar se disolvió directamente en 50 μL de piridina y 50 μL de *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS) a 50 °C por 1 h. La muestra se dejó equilibrar a temperatura ambiente.

- **Extracto polar**

El extracto polar se disolvió en 50 μL de clorhidrato de metoxiamina (20 mg/mL en piridina) a 50°C hasta total redisolución. Se agregó luego 50 μL de MSTFA + 1% TMCS y dejar a 50 °C por 1 h. La muestra se dejó equilibrar a temperatura ambiente.

2.2.4 Análisis de metabolitos por GC/MS

Esta parte de la segunda etapa se desarrolló en el laboratorio de Química Bioorgánica del Grupo Integrado de Investigaciones en Química Bioorgánica de la Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Militar Nueva Granada, Sede Campus Nueva Granada, Cajicá. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases ThermoTrace 1300, acoplado a un espectrómetro de masas Thermo ISQ, con analizador cuadrupolar y ionización por impacto electrónico (IE) a 70 eV. Se usó helio de alta pureza como gas de arrastre, con un flujo de 1 mL/min. El horno del inyector y la línea estuvieron a 250 °C. La inyección fue de 1 μL en modo *splitless* en una columna de bajo sangrado Rxi-Sil 5ms (60 m x 0,25 mm, 0,25 μm) siguiendo el siguiente programa de temperatura: Acondicionamiento de la columna a 40 °C por un minuto, incrementar la temperatura a 150 °C con una rampa de 20°C min⁻¹ dejar esta temperatura por 3 minutos, aumentar la temperatura hasta 220 °C con una rampa de 15°C min⁻¹ manteniendo 4 minutos, finalizar con una rampa hasta 300 °C con una rampa de 10°C min⁻¹ y mantener por 12 minutos.

2.2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo para todas las variables estudiadas en los tratamientos evaluados por triplicado de los ensayos *in vivo*. Se realizó un análisis de varianza y de mínima diferencia significativa o LSD (*least significant difference*) con el 95% de confianza utilizando el software StatGraphics Centurion XVI.

Para los perfiles metabólicos, luego de que los datos obtenidos en los cromatogramas de iones totales (TIC) fueron procesados con MZmine 2.53, para filtrar, alinear y escalar las señales (i.e., intensidad) y así construir la matriz de intensidad de las señales [observaciones (muestras) x variables (señales)]. Posteriormente, esta matriz se empleó, utilizando la herramienta MetaboAnalyst 5.0, para hacer una comparación basada en reducción de dimensiones a través de análisis de componentes principales (PCA) (como estrategia exploratoria), seguido de un análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) (como abordaje supervisado). El análisis por PLS permitió reconocer los metabolitos

mayoritariamente discriminantes mediante puntajes VIP (*variable importance in projection*), y así seleccionar los metabolitos con acumulación diferencial entre controles y tratamientos (VIP > 1).

2.2.6 Anotación de metabolitos de interés

Las señales que fueron clasificadas con mayor influencia en la discriminación, según los diagramas de carga (*loadings plots*) luego del análisis de mínimos cuadrados parciales – análisis discriminante (PLS-DA), fueron anotadas de acuerdo con los valores *m/z* obtenidos de los respectivos espectros de masas. Tal identidad de los compuestos se logró por comparación de los espectros de masas obtenidos con las bases de datos NIST18 y *The Golm Metabolome Database* (GMD) (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de>), con posterior comparación con el diccionario de productos naturales (<http://dnp.chemnetbase.com>) y PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), logrando de este modo la anotación correspondiente de cada metabolito.

El cálculo de los índices de retención (IR) permitió apoyar la anotación con mayor nivel de precisión según los parámetros de la *Metabolomics Standard Initiative* (MSI), descrito por Sumner (Sumner *et al.*, 2007). Este cálculo se realizó teniendo en cuenta la ecuación de los índices de retención de Van den Dool y Kratz descrita en 1962 (Van Den Dool and Kratz, 1963) (Ecuación 3), la cual permite la identificación de compuestos volátiles que se están estudiando mediante análisis por cromatografía de gases con programa de temperatura.

$$IR = 100n + 100 \left[\frac{t_r x - t_r n}{t_r n + 1 - t_r n} \right] \quad (3)$$

Ecuación 3. Índice de retención para una cromatografía programada. IR, Índice de retención. *t_r*, tiempo de retención. *x*, analito. *n*, alcano con número de átomos de carbono más pequeño. *n+1*, alcano con número de carbonos más grande.

2.2.7 Análisis de rutas metabólicas

Para el análisis de rutas se usó la matriz de intensidades del análisis estadístico de los perfiles metabólicos. Ésta se introdujo en el módulo *Pathway Analysis* en la herramienta MetaboAnalyst 5.0. El programa permitió visualizar las rutas enriquecidas por

concentración usando la librería de una planta modelo (i.e., *Arabidopsis thaliana*) para todos los metabolitos encontrados. El análisis de las rutas de aquellos metabolitos diferenciables se hizo de manera manual teniendo en cuenta las posibles vías en las que estaban involucradas estas moléculas y confirmando con ayuda de la librería KEGG.

2.3 Etapa 3: Evaluación de los niveles transcripcionales de las principales enzimas involucradas en la biosíntesis de los metabolitos de interés

Posterior a la identificación de metabolitos, se evaluaron los niveles transcripcionales de dos genes codificantes para proteínas relevantes en la biosíntesis de los metabolitos estadísticamente seleccionados en el paso anterior.

2.3.1 Diseño de *primers*

Las secuencias de los genes que codifican para las proteínas de interés se obtuvieron a partir de secuencias reportadas en la base de datos de clavel (<http://carnation.kazusa.or.jp/>) y en la base de datos del GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente, se diseñaron los primers utilizando las herramientas primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) y Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) teniendo en cuenta los siguientes criterios: tamaño de los primers no mayor a 25 nt, contenido de GC de 40 a 60%, especificidad y complementariedad de los primers, temperatura de fusión cercana o igual y en el rango de 55 a 65 °C. En la tabla 2.2, se encuentran las secuencias de los primers diseñados para que se utilizaron para la amplificación de los genes de estudio. El uso de *his* y *tub*, radica en que son genes de referencia para el clavel y *Fod*, respectivamente; por lo tanto no presentan cambios significativos en sus niveles transcripcionales (expresión a nivel constitutivo) para los tratamientos estudiados o las horas de cosecha (Taylor *et al.*, 2016; Monroy-Mena *et al.*, 2019)

Tabla 2.2 Características de los primers utilizados para la amplificación de los genes de interés.

ID reportado en la base de datos	Pareja de <i>primers</i>	Secuencia <i>primers</i> Directo/Reverso	Tamaño esperado (pb)	Temperatura de fusión (°C)
--	--------------------------------	--	----------------------------	----------------------------------

	<i>npr1.1</i>	GCTCCGCCTTCTTCAAGTCT / ACAAACACCTTTTCGGCAACG	236	59.97
Dca4929.1	<i>npr1.2</i>	CGAACAGGGAGAAGGAGAGG / ACACAAACACCTTTTCGGCAA	172	59.00
	<i>npr1.3</i>	TCCGCCTTCTTCAAGTCTCT / ACGCCCTAACTTTACCGCTA	217	58.59
	<i>p5cr1</i>	GGCTTAGTGGAAGTGGTCCC / GAATGCCAGCGATTGTCGTC	213	60.00
Dca3864.1	<i>p5cr2</i>	CAATTGGGAAGGTTTGGAGA / AAATCCGCCTTTCTCCAGTT	287	59.99
	<i>p5cr3</i>	TTCAATCTTTTCGGCGTTACC / GCAACGACTGATACCAGCAA	157	59.97
	<i>asnsyn1</i>	GAAGGTGGTACAACCCACCA / GTCAGCAACCTCCCTAGCAG	287	59.82
Dca2825.1	<i>asnsyn2</i>	TACCGGCAGAAAGAGCAGTT / TGCTGCATCCCCTCTACTG	264	60.02
	<i>asnsyn3</i>	GATGGGTCCATATGGTTTGC / CAATGGCAGCAACAAGAGAA	280	60.01
	<i>galsyn1</i>	AGATCTCAAGGGTGTCCGGT / AGCTGGTACTGTGGTGTGTG	266	60.07
Dca15195.1	<i>galsyn2</i>	CGAACCGCCTAACCTATGAA / TCTTCCCTCTCCATGTTTGG	259	60.07
	<i>galsyn3</i>	ACAAACCCATCCCACCAGTA / TCTTCCCTCTCCATGTTTGG	157	60.07
Dca5219.1	<i>his</i>	CACAGGTACCGTCCTGGAAC / GTGCCAACACAGCATGACTC	160	60.00
	<i>tub</i>	GGCCAAGGAAGACTCACCTC / ATAACAAGGCGACCGAGTGC	236	60.39

2.3.2 Extracción de ARN

La extracción del RNA total de las raíces de las plantas de clavel se realizó utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen). Las raíces se lavaron y maceraron con nitrógeno líquido y, a 0.4 g del material vegetal, se le añadió 1 mL de TRIzol®. La mezcla se agitó durante 15 segundos con vórtex y se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a 6 °C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó en vórtex, la mezcla se dejó en reposo durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000xg durante 15 minutos a 6 °C. Se retiró la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo, donde se mezcló con 500 µL de isopropanol, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000xg por 10 minutos a 6 °C. Al pellet se le agregó 1 mL de etanol al 75%, se mezcló en vórtex y se centrifugó a 7500xg durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet se dejó secar para posteriormente disolverlo en 30 µL de agua estéril e incubarlo a 55 °C durante 10 minutos. Por último, se leyó la absorbancia a 260 y 280 nm con el fin de verificar la pureza y realizar la cuantificación del RNA obtenido.

2.3.3 Eliminación del DNA presente en el extracto de RNA

Con el fin de eliminar el DNA contaminante presente en los extractos de RNA, se utilizó la enzima Deoxyribonuclease I, Amplification Grade® de Invitrogen. En un tubo, se mezclaron 1 µg de la muestra de RNA, 1 µL del buffer de reacción DNase I 10X y 1 µL de la enzima

DNase I, Amp Grade, 1U/mL y se completó a 10 μ L con agua estéril. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se le añadirá 1 μ L de una SAR EDTA 25 mM y se calentará durante 10 minutos a 65°C, con el fin de inactivar la enzima.

2.3.4 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó empleando la enzima M-MLV Reverse Transcriptase® de Invitrogen, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En un tubo libre de nucleasas, se mezclaron: 1 μ L de Oligo (dT) (500 μ g/mL), de 1 a 5 ng del RNA total o 1 a 500 ng de mRNA, 1 μ L de la mezcla de dNTPs 10 mM (correspondiente a 10 mM de dATP, 10 mM de dGTP, 10 mM de dCTP y 10 mM dTTP) y se completó a 12 μ L con agua estéril. La mezcla se calentó a 65 °C por 5 minutos, inmediatamente se enfriará en hielo. Posteriormente se adicionaron 4 μ L del buffer de reacción 5X (250mM Tris-HCl pH 8.30, 375 mM KCl, 15mM MgCl₂) y 2 μ L de DTT 0.1 M. El contenido se mezcló y se incubó a 37°C durante 2 minutos; se añadió 1 μ L de la enzima M-MLV RT (200 U), se mezcló y se incubó a 37 °C durante 50 minutos. Finalmente, la mezcla se calentó a 70 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima, el ADNc obtenido se cuantificó por fluorescencia (Qubit® Invitrogen) y se almacenó a -20 °C.

2.3.5 Amplificación de los fragmentos de interés

La amplificación de los genes se realizó utilizando la enzima Taq polimerasa de Invitrogen® siguiendo las recomendaciones del fabricante; añadiendo 50 ng de DNA y obteniéndose una concentración final de 0.5 μ M para cada primer, el volumen total de reacción será de 20 μ L. Las condiciones de reacción para la amplificación de los genes fueron: 1 ciclo de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a la temperatura de anillamiento adecuada según cada pareja de primers y 30 s a 72 °C; y un ciclo a 72 °C durante 5 minutos, por último, enfriamiento a 4°C. Los productos obtenidos a partir de la amplificación fueron sometidos a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 3% en buffer TAE 1X y la tinción se realizará con el reactivo SYBR® Safe de Invitrogen. La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit de purificación de Invitrogen y se cuantificó por fluorescencia utilizando Qubit y el reactivo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen).

Con el objetivo de hacer un seguimiento de la presencia del patógeno en los diferentes tiempos del ensayo, se tomó 1 muestra por cada tiempo de muestreo. La caracterización

molecular del hongo se realizó por qPCR del gen codificante para β -Tubulina (TUB2). Los resultados se muestran en el Anexo A.

2.3.6 Determinación de la expresión de los genes de interés codificantes para enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos.

Para verificar la expresión de los genes de interés, se realizó una RT-PCR en tiempo real utilizando el equipo C1000Thermalcycle acoplado a un CFX96 Biorad y Master Mix para qPCR SYBR Green Biorad®, siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando una concentración de primers final de 0.5 μ M. Las condiciones de reacción fueron: un ciclo de 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 58.8 °C (para *npr1*) o 61.4 °C (para *p5cr*) durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos y un ciclo de 65 °C durante 5 segundos. Con el fin de confirmar que solo se formó un producto de PCR se realizó una curva de fusión desde 65 °C hasta 95 °C. Las muestras se analizaron por duplicado. Los niveles de expresión de los genes se cuantificaron de manera relativa, utilizando el gen *his* como gen de referencia (Monroy-Mena *et al.*, 2019).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Etapa 1: Selección de condiciones para la aplicación en suelo de fosfito de potasio para el control del marchitamiento vascular

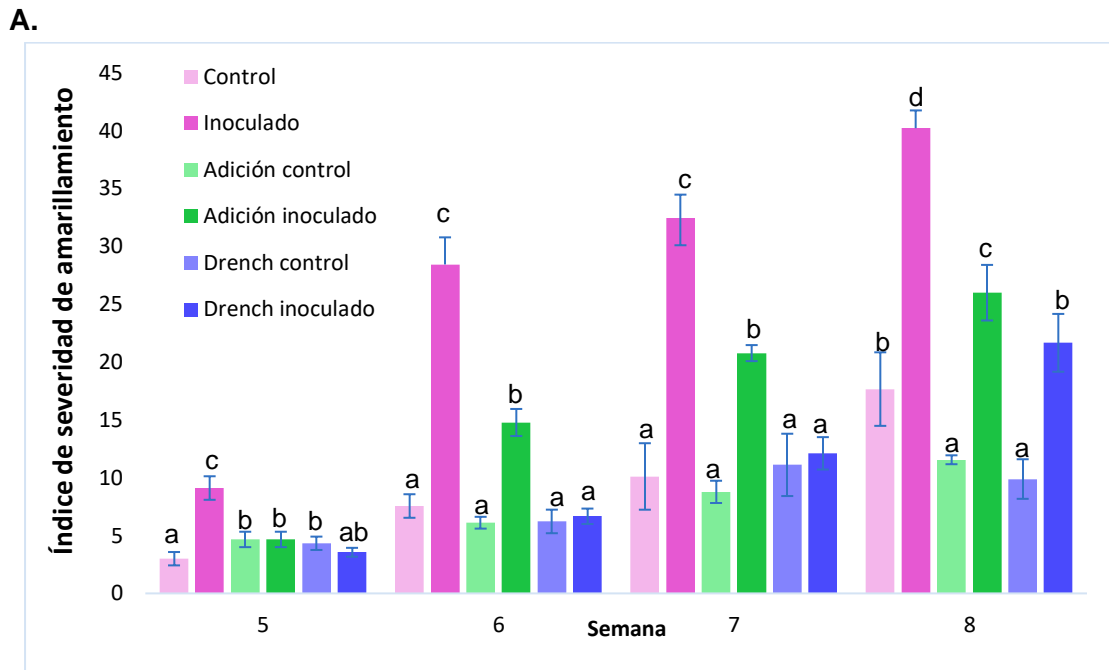
En la presente investigación se presentan los resultados del estudio de los cambios bioquímicos asociados a la inducción de resistencia generada por la aplicación de fosfito de potasio en el sustrato usado para el cultivo del clavel. La aplicación de inductores de resistencia directamente en el sustrato de siembra, se constituye como una estrategia que puede ser implementada de manera más práctica en cultivos hidropónicos. Al respecto, específicamente en el caso del clavel, se ha reportado que la aplicación de la dispersión del micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*) al sustrato de cultivo, genera la disminución de la severidad del marchitamiento vascular causado por *Fod*; esta inducción de resistencia estuvo acompañada de la acumulación de compuestos fenólicos a nivel de la raíz (Santos-Rodríguez, Coy-Barrera and Ardila, 2021). Del mismo modo, se ha descrito que la aplicación por el método de *drench* de fosfito de potasio tiene un efecto significativo en el control de los síntomas del marchitamiento vascular (Smillie, 1989; Achary *et al.*, 2017; Pérez Mora, Melgarejo and Ardila, 2021).

Considerando las referencias consultadas, existen dos estrategias principales de aplicación de inductores en el suelo, el *drench* y la incorporación en el sustrato previa a la siembra. Es por ello que, con el propósito de determinar que estrategia era la más eficiente para la aplicación de la disolución de fosfito de potasio, se realizó un ensayo *in vivo* con una variedad susceptible al patógeno y se evaluó el efecto de la aplicación de este inductor de resistencia, tanto por la adición al sustrato como por medio de aplicación por *drench* en el área circundante a la raíz.

Tal y como se describió en la metodología, este ensayo *in vivo* se realizó usando 6 tratamientos que diferían en el método de aplicación del fosfito (control, control inoculado, adición al sustrato control, adición al sustrato inoculado, *drench* control y *drench* inoculado). Como resultado principal se encontró que todas las plantas inoculadas, que no fueron sometidas a tratamiento previo con el inductor presentaron síntomas de

marchitamiento vascular desde las 5 semanas, empezando con una coloración amarilla en las hojas y tallos de la zona basal de la planta. Por otro lado, las plantas que fueron previamente tratadas con el inductor de resistencia por los dos métodos de aplicación y posteriormente expuestas ante el desafío del patógeno, mostraron niveles significativos menores de severidad de la enfermedad. Se observó que la aplicación de la disolución de fosfito de potasio disminuye la severidad de la enfermedad a partir de la semana 6 con un 48 y 76% de reducción de los síntomas para los dos métodos de adición y *drench* inoculados, respectivamente (Figura No. 3.1A).

Se evidenció que durante el ensayo existe un amarillamiento en el tercio inferior de algunas de las plantas del ensayo incluyendo los controles. Este comportamiento se ha observado en algunos de los experimentos realizados en el grupo de investigación y confirma la importancia que tiene el uso de controles sin inoculación a lo largo del tiempo.



B.

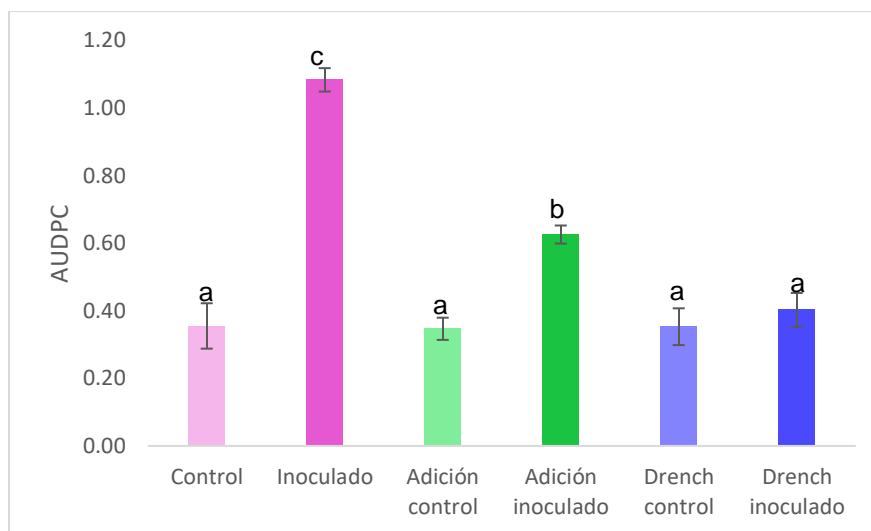


Figura 3.1 A. Efecto de la aplicación del fosfito de potasio sobre la severidad de la enfermedad **B.** Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad de las plantas de clavel de la variedad 'Mizuki' para la selección del modo de aplicación. Las barras de variación representan el error estándar de la media de tres réplicas biológicas. Las letras sobre las barras representan la diferencia estadísticamente significativa del índice de severidad entre tratamientos y del AUDPC (prueba ANOVA, $p \leq 0,05$).

Se evidencia que en los tratamientos donde se aplicó el inductor de resistencia se presentan diferencias con respecto a los tratamientos inoculados; en la octava semana, se observa una reducción del 46% de la enfermedad por el método de *drench*, en contraste

con la aplicación por medio de adición al sustrato que presentó un 36% de reducción de los síntomas. En la figura 3.1B se encuentran los valores calculados para el AUDPC en la semana 8 pos-inoculación, lo cual permite demostrar que ambos métodos de aplicación disminuyen significativamente el progreso de la enfermedad; siendo de un 42% y 63% para la adición al sustrato y *drench*, respectivamente. Es posible que el efecto del *drench* sea mucho más efectivo, pues su incorporación al sustrato puede ser más concentrado, permitiendo que el fosfito tenga un mayor contacto directo en las raíces con la posibilidad de tener concentraciones reproducibles en cada esqueje. Sin embargo, no se debe olvidar que la aplicación de inductores en el suelo debe ser realizada desde el inicio del ensayo, pues requieren de tiempo para ser absorbidas (Landscape Management, 2016).

En estudios sobre el patosistema realizados en nuestro grupo de investigación, se ha reportado una disminución en la severidad del marchitamiento vascular de clavel causado por *Fod* cuando se ha usado fosfito de potasio, aumentando significativamente el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides (Pérez Mora, Melgarejo and Ardila, 2021). Para otras especies vegetales se ha encontrado un retraso en la progresión del chancro resinoso en plantas de pino (*Pinus radiata*) causado por *Fusarium circinatum*, cuando se usó a una concentración del 1% de esta sal (Cerqueira *et al.*, 2017). Es interesante evidenciar que Lobato *et al.* estudiaron el efecto del fosfito de potasio aplicado sobre plantas de papa por medio de aspersión, encontrando que la protección resultante del tratamiento con este inductor de resistencia fue alta contra el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, intermedia contra *Fusarium solani* y baja contra *Rhizoctonia solani*, otros patógenos que afectan la producción de este tubérculo (Lobato *et al.*, 2008; Machinandiarena *et al.*, 2012). Lo anterior indica que la aspersión foliar en algunos casos de este inductor podría tener un efecto sistémico y podría ser usado para el control de varias enfermedades. Sin embargo, en el caso del clavel, la aplicación foliar no presentó buenos resultados, generando un amarillamiento en las hojas aplicadas (Pérez Mora, Melgarejo and Ardila, 2021). Se evidencia que es fundamental realizar este tipo de estudios en cada modelo, para evaluar la especificidad del inductor y otros parámetros de importancia dentro del contexto de la producción hortícola, teniendo en cuenta los patosistemas involucrados.

En consecuencia, los resultados presentados sugirieron el uso de *drench* como el método seleccionado para la aplicación del fosfito de potasio y, por ende, determinar la respuesta bioquímica objeto de estudio en la presente investigación.

3.2 Etapa 2: Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en el perfil metabólico de raíces de clavel

3.2.1 Fase 1: Ensayo *in vivo*

Basados en los resultados del primer ensayo (Figura 3.1), se seleccionó el método de *drench* con el objetivo de determinar el efecto que tiene la aplicación del fosfito de potasio frente al marchitamiento vascular de clavel causado por *Fod* en las condiciones ambientales específicas de este ensayo. Con el fin de realizar el análisis a nivel metabólico, se realizó un segundo ensayo *in vivo* en donde se presentaron resultados similares a los encontrados en el apartado anterior (Figura 3.2), lo cual permite apreciar una respuesta consistente. En este orden de ideas, a la novena semana, las plantas que fueron inoculadas, con previo tratamiento con fosfito de potasio, demostraron a nivel fenotípico una disminución en la severidad de los síntomas de marchitamiento vascular, presentando similitud estadística con el tratamiento control ($p \leq 0,05$).

En el caso de la presente investigación, para este ensayo *in vivo* se evidenció a las 9 semanas pos-inoculación (spi), para las plantas inoculadas, la presencia de sintomatología típica de marchitamiento vascular (Arbeláez, 1993), que incluye una disminución del tamaño, un marchitamiento de la primera mitad de la planta y, en algunos casos, su muerte.

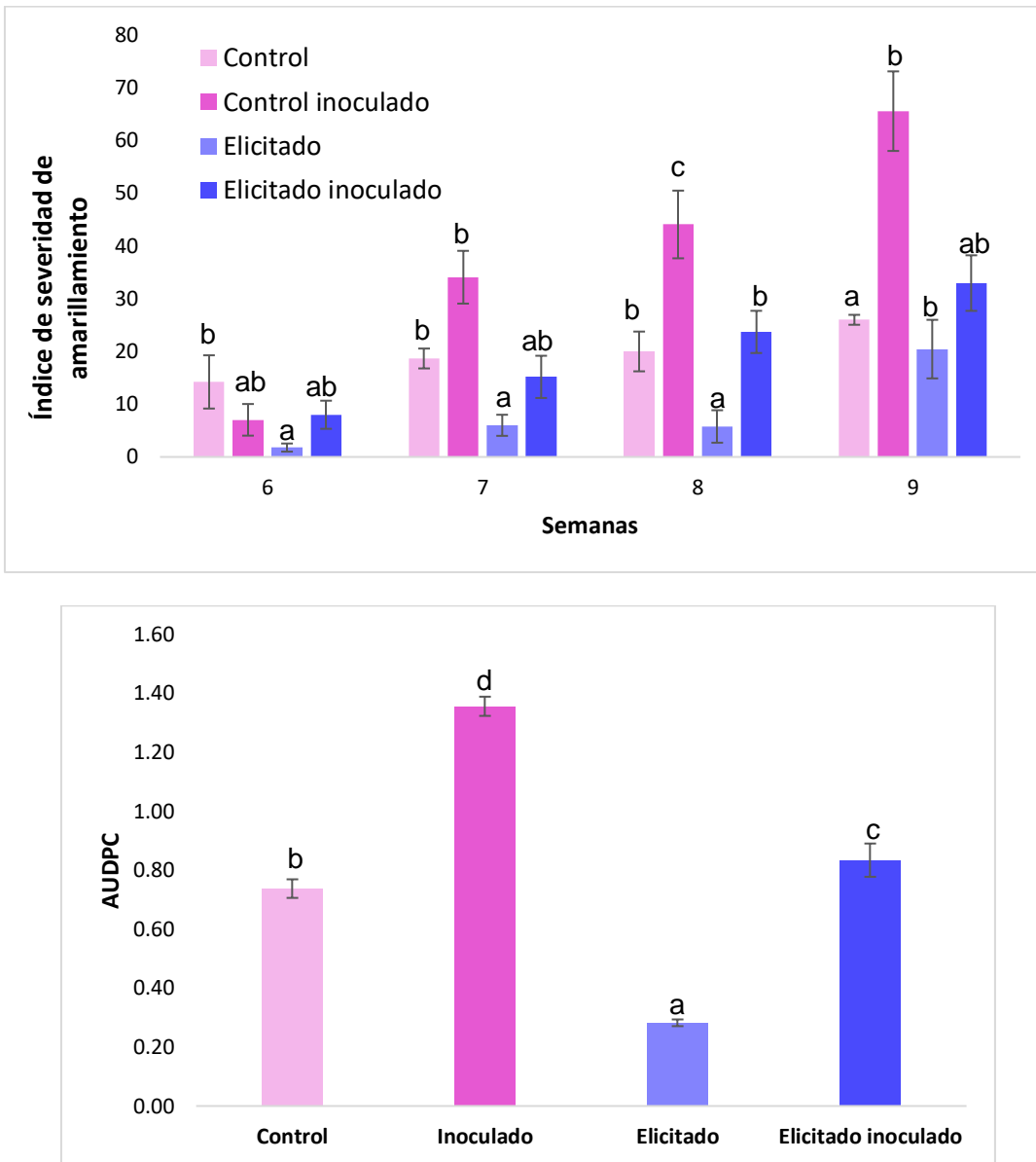


Figura 3.2 Efecto de la aplicación del fosfito de potasio sobre **A.** la severidad de la enfermedad y **B.** Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad de las plantas de clavel de la variedad 'Mizuki' para obtener el perfil metabólico.

Las barras de variación representan el error estándar de la media de tres réplicas biológicas. Las letras sobre las barras representan la diferencia estadísticamente significativa del índice de severidad y del AUDPC entre tratamientos (prueba ANOVA, $p \leq 0,05$).

Para la novena semana, el uso de la disolución de fosfito con posterior desafío con *Fod* en el sustrato permitió reducir la sintomatología hasta en un 50% con respecto al tratamiento inoculado; así mismo, el cálculo del AUDPC permite evidenciar que el tratamiento tratado

con el inductor y posterior inoculación tiene una disminución del 38% de los síntomas de la enfermedad, asemejándose al primer experimento realizado en esta investigación. Es de importancia destacar que, para este ensayo, la aplicación del inductor generó un menor amarillamiento en todas las plantas tratadas (incluso controles), indicando que es posible que este inductor pudiese estar aumentando la tolerancia a factores ambientales. Sin embargo, esta propuesta debe ser evaluada en otros estudios. El uso de fosfito de potasio por el método de *drench* ha demostrado reducir la sintomatología de la enfermedad causada por *Phytophthora cinnamomi*, *P. nicotianae*, y *P. palmivora*, en plantas de lupino, tabaco y papaya, donde se evidenció una disminución del tamaño de la lesión luego de la inoculación (Smillie, 1989).

Dentro de los hallazgos de la presente investigación, se encontró que la aplicación del fosfito de potasio mejoró la respuesta al patógeno comparando el pardeamiento que se evidencia en el control inoculado; es posible que la planta previamente tratada con el inductor responda de manera más efectiva desde el inicio de la infección, generando menos cambios fenotípicos en las plantas (Figura 3.3-1 y 2). El registro fotográfico evidencia de manera preliminar dicho comportamiento, pues las plantas inoculadas sin tratamiento con el inductor presentan un amarillamiento en la base y el primer tercio de la planta. Además de lo descrito, el uso del inductor de resistencia generó al parecer, una leve disminución en el tamaño del tallo, pero mantuvo el volumen del tejido radicular. Se sugiere en próximas investigaciones realizar un estudio detallado del efecto de esta sustancia en parámetros fisiológicos como el crecimiento y producción de biomasa.



Figura 3.3 Efecto de fosfito de potasio en la severidad del marchitamiento vascular a la sexta semana. (1. Tratamiento inoculado, 2. Tratamiento con inductor inoculado, 3. Control, 4. Control con inductor)

De acuerdo con diferentes estudios, se ha reportado el efecto positivo que tiene la aplicación de fosfito de potasio en los cultivos y que los cambios en el metabolismo varían en función de la especie vegetal objeto de estudio. Por ejemplo, el uso de fosfito puede aumentar la calidad de las plantas ornamentales activando la síntesis de metabolitos antioxidantes, destacándose también como un agente con efecto biocida contra oomicetos y bacterias; en este sentido también se ha reportado que este inductor de resistencia puede llegar a tener efectos fisiológicos adicionales en la planta, entre otros, el aumento de la producción de flores y frutos, así como una respuesta más rápida y robusta a estímulos ambientales y agentes de estrés (Gómez-Merino and Trejo-Téllez, 2015). Förster *et al.* encontraron que el uso de formulaciones comerciales de fosfito como fuente de fósforo, disminuía la incidencia de plantas de pimiento a la pudrición de la raíz y la corona por *Phytophthora capsici* (Förster *et al.*, 1998). En otro reporte, se demostró que este inductor es eficaz para controlar la pudrición del cuero de la fresa causada por *Phytophthora cactorum*, disminuyendo la incidencia de la enfermedad (Rebollar-Alviter and Ellis, 2005; Estrada-Ortiz *et al.*, 2012). Además del papel fertilizante que tiene el fosfito, se ha descrito que puede llegar a poseer propiedades estimulantes para el crecimiento vegetal; se han identificado algunos incrementos en rendimiento, tamaño y calidad del fruto dependiendo del tiempo de exposición del fosfito. Se ha propuesto que algunas respuestas fisiológicas de la planta a la aplicación de disoluciones de fosfito, pueden estar determinadas por su efecto en el metabolismo de azúcar, estimulación del ácido shiquímico o cambios a nivel hormonal (Lovatt and Mikkelsen, 2006). Estos reportes hacen evidente que los efectos del fosfito pueden ser dependientes de cada especie vegetal y del patógeno involucrado en cada enfermedad

Con respecto a los cambios bioquímicos que genera este inductor en las plantas, se ha determinado, por ejemplo, en el estudio sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con zoosporas de *Phytophthora palmivora* y tratadas con fosfito de potasio a una concentración de 0.1 g/L, que este tratamiento genera un rápido aumento de la actividad citoplasmática permitiendo la liberación de peróxido. Este fenómeno desencadena una muerte celular localizada y una mayor acumulación de compuestos fenólicos alrededor de la célula infectada, en comparación con las plantas que fueron únicamente inoculadas, observándose así que el patógeno disminuye su velocidad de colonización de los tejidos

de las plántulas. De esta manera se determinó que disoluciones de esta sal protege las plantas contra los patógenos oomicetos, induciendo respuestas de defensa rápidas y localizadas en las raíces de plantas como la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides, así como liberación de superóxido (Daniel and Guest, 2006).

Por otro lado, algunos reportes han descrito que el uso de fosfito de potasio incrementa, de manera generalizada, la biosíntesis de enzimas pertenecientes a la vía fenilpropanoide y estimula la acumulación de fitoalexinas y compuestos fenólicos (Yáñez-Juárez *et al.*, 2017; Mohammadi *et al.*, 2019). En estudios recientes dentro del grupo de investigación, Pérez *et al.* 2021, encontraron que la aplicación de 1.8% de fosfito de potasio por el método de *drench* en las raíces de clavel inoculadas con *Fod*, aumentaron 18% y 11% el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, respectivamente, en comparación a las plantas inoculadas sin tratar con el elicitador (Pérez Mora, Melgarejo and Ardila, 2021). La acumulación de compuestos fenólicos es una respuesta común en tejidos vegetales durante diferentes tipos de estrés biótico y su aumento puede estar ligada a la respuesta basal en plantas y estar determinado por el reconocimiento de diferentes tipos de moléculas elicitoras involucradas en la interacción planta-patógeno (Ardila, 2013). Dentro de este tipo de metabolitos, se ha encontrado que los flavonoides tienen un papel protagónico. En plantas de clavel, Romero *et al.* 2020, encontró que el uso de un inductor de origen biótico permitió incrementar la biosíntesis de este tipo de moléculas en un 33% con respecto al tratamiento control favoreciendo la activación de la respuestas de defensa vegetal (Rincón, 2020)

Si bien se han realizado algunos estudios en clavel sobre el efecto de inductores de resistencia en el metabolismo, hasta el momento no se conocen los mecanismos moleculares y bioquímicos que participan específicamente en la inducción de resistencia en clavel por efecto de la aplicación de fosfito de potasio. Vale la pena recordar que los efectos particulares en cada especie deben ser determinados de manera específica, considerando el tipo de patógeno y enfermedad involucrada. Con el ánimo de investigar el efecto que tiene la aplicación de disoluciones de esta sal sobre la acumulación de productos del metabolismo en las raíces de las plantas y su relación con la inducción de resistencia, en la presente investigación se aplicarán herramientas propias de la metabolómica no dirigida usando los datos obtenidos por análisis con GC-MS, comparados bajo estadística multivariada.

3.2.2 Fase 2: Análisis por GC-MS de los extractos polares y apolares en raíces de clavel bajo exposición con *Fod* y fosfito de potasio

Las variaciones del perfil metabólico de las raíces del clavel se estudiaron en los tres escenarios descritos a continuación (i.e., inoculación con *Fod*, elicitación con fosfito de potasio al 3% y, finalmente, elicitación con fosfito de potasio al 3% con posterior inoculación con *Fod*). Esto permitió la exploración de las rutas metabólicas involucradas en la regulación o síntesis de los metabolitos diferencialmente acumulados que puedan estar asociadas a la respuesta de defensa vegetal en cada caso. Para ello, la biblioteca KEGG (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) permitió clasificar y examinar las rutas biosintéticas de algunas moléculas que fueron sobrerreguladas, entre las cuales se encuentran los aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos que pueden llegar a ser responsables de posibles respuestas de las plantas de clavel por efecto de los tratamientos estudiados.

3.2.2.1 Escenario 1: Efecto de la inoculación con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en la biosíntesis de metabolitos en raíces de clavel

Para este primer escenario se examinó el efecto de la presencia de *Fod* sobre los perfiles metabólicos de las raíces del clavel. En este caso, los respectivos extractos polares y apolares fueron preparados siguiendo la metodología descrita en la sección [2.2.3](#), para luego derivatizarlos por sililación con el posterior análisis por GC-MS. Las muestras para este escenario fueron colectadas luego del ensayo *in vivo*, donde se evaluó el efecto de la inoculación con *Fod* en las dos variedades 'Golem' (resistente) y 'Mizuki' (susceptible), comparados con los correspondientes controles (sin inoculación con *Fod*).

El objetivo de esta comparación entre controles e inoculados era determinar aquellos compuestos involucrados con la resistencia de las plantas de clavel. Los respectivos perfiles cromatográficos resultantes presentaron algunas variaciones dependiendo de la variedad estudiada y del tratamiento estudiado en este escenario. En la figura 3.4 se muestra una comparación de los perfiles obtenidos para el tratamiento control e inoculado

para ambas variedades; se evidencia que existe una diferenciación en abundancia y presencia de algunas señales, lo que indica que hay una acumulación diferencial en algunos metabolitos por efecto de la inoculación.

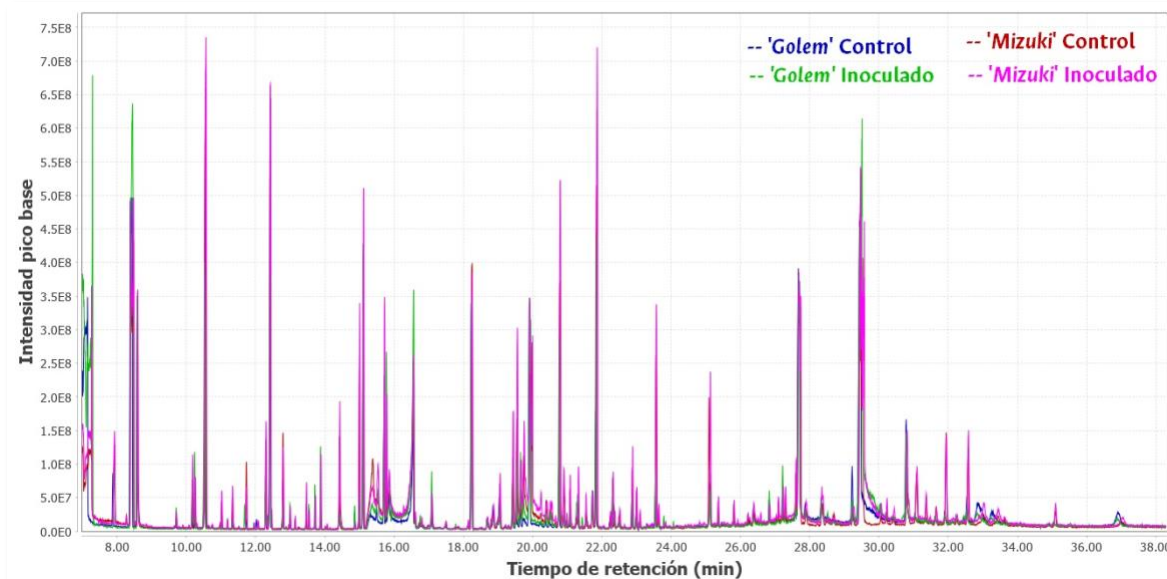


Figura 3.4 Perfiles cromatográficos sobrepuestos de extractos seleccionados obtenidos de las raíces de las variedades 'Golem' (Resistente) y 'Mizuki' (Susceptible) inoculadas con *Fod*. En Azul, tratamiento control (R). En verde, tratamiento inoculado (R). En rojo, tratamiento control (S). En fucsia, tratamiento inoculado (S).

Un total de 101 señales fueron detectadas para la variedad 'Golem' en los tratamientos control e inoculado usando GC-MS. Entre ellas se identificaron 73 metabolitos luego de su debida normalización, anotación y abundancia (>0.05%). Por su parte, se detectaron 119 señales para la variedad 'Mizuki' para los tratamientos equivalentes, de los cuales fueron diferenciados e identificados 70 metabolitos. Estos metabolitos representan un conjunto de compuestos acumulados en la raíz que se pueden separar en 4 clases: aminoácidos y derivados, ácidos orgánicos, azúcares y polialcoholes, y flavonoides (Tabla 3.1)

Tabla 3.1 Grupos de metabolitos encontrados para las dos variedades estudiadas en los tratamientos control e inoculados

Clase	Metabolito
Aminoácidos y derivados	Glicina, valina, alanina, leucina, isoleucina, cistationina, canavanina, serina, citrulina, treonina, homocitrulina, L-5-oxoprolina, glutamina, fenilalanina, asparagina, prolina, lisina, tirosina, triptófano

Ácidos orgánicos	Oxálico, 4-hidroxibutanoico, benzoico, butanedioico, glicérico, metilmalónico, itacónico, aspártico, aspártico, citramálico, kójico, málico, piroglutámico, 4-aminobutanoico, glutámico, tartárico, vanílico, ribónico, cítrico, glucónico, quínico, galactónico, galactárico, ferúlico
Azúcares y polialcoholes	Fructofuranosa, fructosa, pinitol, glucosa, glucitol, lactulosa, talopiranososa, salicina, celobiosa, trehalosa, sacarosa, swerosido, galactinol, aucubina, manobiosa
Flavonoides	Afzelequina, catequina, quercetina

Estos resultados guardan coincidencia con el alcance obtenido en algunos estudios donde se han reportado los perfiles metabólicos en otras especies vegetales. Por ejemplo, en plantas de papa, usando la técnica GC-MS con previa derivatización, se obtuvo información relevante mediante la adquisición de datos metabólicos, encontrándose aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y polialcoholes en diferentes tejidos de esa planta (Shepherd *et al.*, 2007). En otro estudio, el perfilado metabólico en hojas de papa y posterior inoculación con *Phytophthora infestans*, permitió la detección de 106 señales consistentes, de las cuales se identificaron tentativamente 95 compuestos. Entre ellos, se pudieron distinguir 14 aminoácidos, 21 ácidos grasos, 24 ácidos orgánicos y 19 azúcares (Abu-Nada *et al.*, 2007). Por otro lado, la aplicación de metabolómica no dirigida (LC-MS), en la interacción entre dos variedades de garbanzo que diferían en la susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, reveló la acumulación o producción de ciertos grupos de metabolitos en las raíces de las plantas como aminoácidos, azúcares, flavonoides, isoflavonoides y alcaloides (Kumar *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta lo anterior, es evidente que los datos del perfilado metabólico obtenidos en la presente investigación en plantas de clavel inoculadas con *Fod*, son consistentes con lo reportado en otros estudios para otras especies vegetales; esta información es importante pues permitió determinar la acumulación tanto de metabolitos primarios como especializados, en procesos conservados en varias especies del reino vegetal.

Para encontrar aquellos patrones relevantes en los perfiles metabólicos que permiten el reconocimiento de metabolitos con abundancia diferencial por efecto de la inoculación con

Fod, el análisis multivariado es una herramienta muy útil pues permite reducir la dimensionalidad de los datos para su fácil interpretación y reconocimiento de patrones. Por lo tanto, en primera instancia, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), el cual permitió explicar las diferencias mediante la comparación global de los perfiles metabólicos de las dos variedades para los tratamientos estudiados, reconociendo así aquellos patrones basados en similitudes o diferencias en la composición de los metabolitos extraídos de raíces de clavel. El modelo estadístico basado en el PCA explicó el 37.5% y 41.4% de la varianza explicada (VE) total para la variedad '*Golem*' y '*Mizuki*', respectivamente. Por lo tanto, la gráfica de puntajes PC1 x PC2 resultante (Figura 3.5A-B), muestra que PC1 discriminan los tiempos de cosecha (12, 24, 48 y 96 hpi), mientras que PC2 permite la separación de los tratamientos estudiados. Este patrón indicó que los tratamientos inoculados y control, para cada variedad, tiene diferencias relevantes en el perfil metabólico, como se observó en la comparación directa de los perfiles cromatográficos (Figura 3.4).



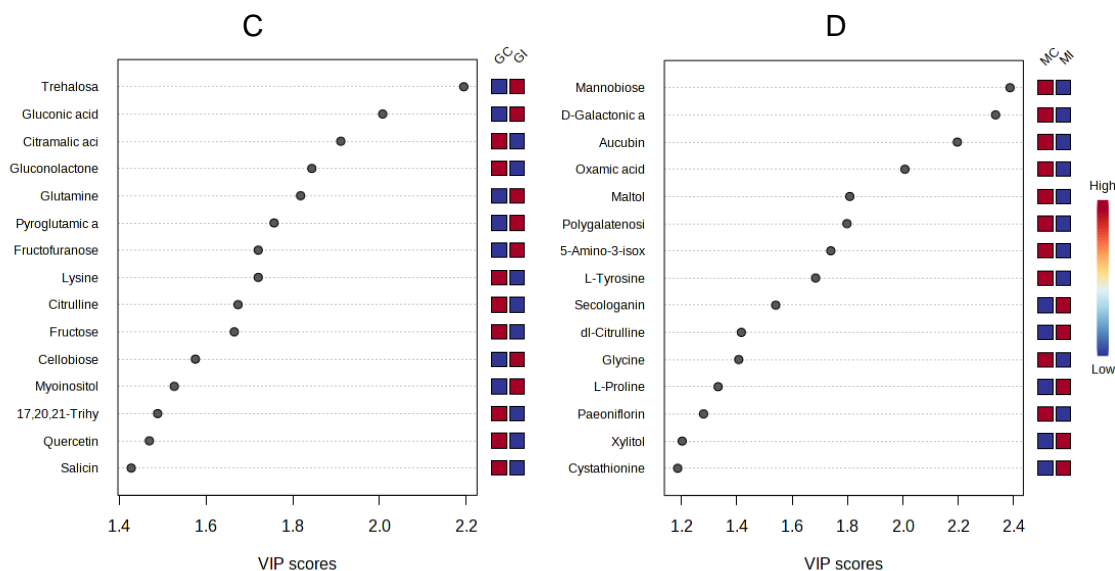
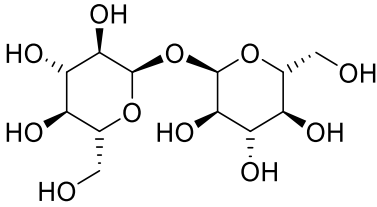
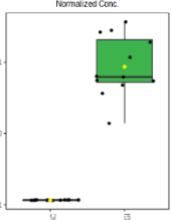
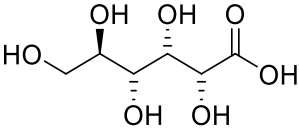
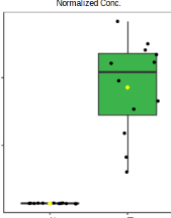
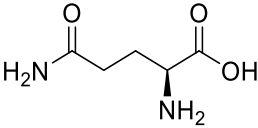
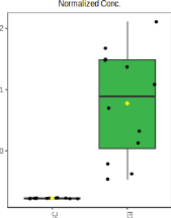
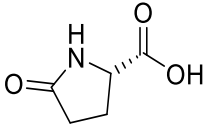
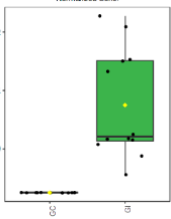
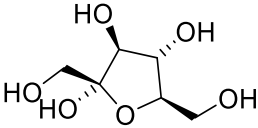
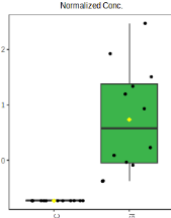


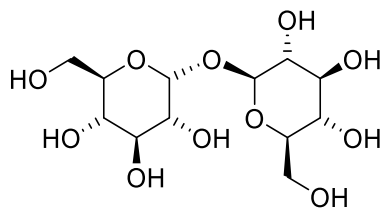
Figura 3.5 Efecto de la inoculación con *Fod* en los perfiles metabólicos de raíces del clavel, evaluado por PCA y PLS-DA. (A,B) Diagramas de puntajes resultante del análisis de componentes principales (PC1 x PC2) para las variedades A. 'Golem' B. 'Mizuki'. En verde, tratamiento control. En rojo, tratamiento inoculado. Las regiones sombreadas tienen una confianza del 95% ($p < 0.05$). (C,D) Diagramas de puntajes VIP (*Variable importance in the projection*) que incluye la selección de metabolitos diferenciales a partir del PLS-DA para las variedades C. 'Golem' D. 'Mizuki'. Los recuadros coloreados a la derecha indican la relevancia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio (GC = control para la variedad 'Golem' (sin inoculación); GI = 'Golem' inoculado con *Fod*; MC = control para la variedad 'Mizuki' (sin inoculación); MI = 'Mizuki' inoculado con *Fod*).

El análisis discriminante con mínimos cuadrados (PLS-DA) muestra en mayor detalle la influencia de los metabolitos diferenciales sobre la separación de los factores mediante PCA. Así, el gráfico de puntajes VIP señala aquellos metabolitos principales que tienen relevancia estadística en la discriminación de los dos tratamientos ($VIP > 1.2$). Para la variedad 'Golem' (R) se destacaron trehalosa, ácido glucónico, glutamina, ácido piroglutámico, fructofuranosa, celobiosa y mioinositol como metabolitos con abundancia diferencial por efecto de la inoculación con *Fod*. Por su parte, la variedad 'Mizuki' (S) tuvo una mayor acumulación de secologanina, citrulina, prolina, xilitol y cistationina, metabolitos diferenciales para el tratamiento inoculado (Figura 3.5 C-D).

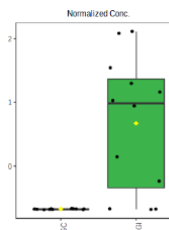
Tabla 3.2 Metabolitos sobrerregulados por el efecto de la inoculación con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*) en la biosíntesis de metabolitos en raíces de clavel

Metabolito ¹	Estructura	Índice de retención lineal ¹	Abundancia diferencial ²
Variedad 'Golem' (Resistente)			
Trehalosa		2732	
Ácido glucónico		1986	
Glutamina		1773	
Ácido piroglutámico		1503	
Fructofuranosa		1791	

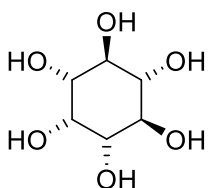
Celobiosa



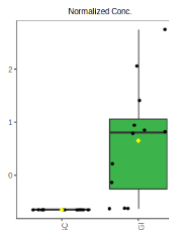
2633



Mioinositol

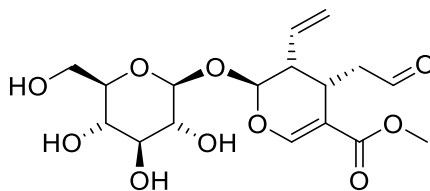


2083

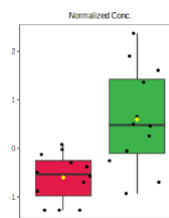


Variedad 'Mizuki' (Susceptible)

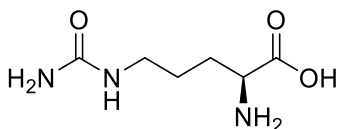
Secologanina



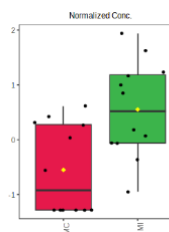
2415



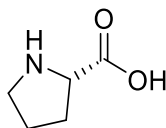
Citrulina



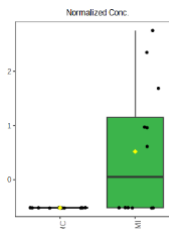
2103



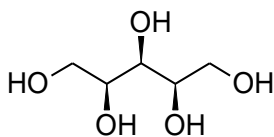
Prolina



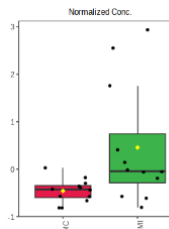
1278



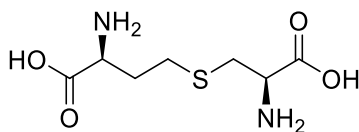
Xilitol



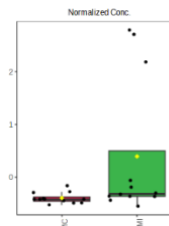
1698



Cistationina



1592



¹ La identificación o anotación de los metabolitos a nivel 2 (estructura probable por coincidencia de fragmentación con base de datos NIST y *The Golm Metabolome Database* (GMD), incluyendo coincidencia con el índice de retención lineal (IRL) (Schymanski *et al.*, 2014).

² Los recuadros coloreados a la derecha indican la diferencia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio. Verde: Inoculado. Rojo; Control.

En general, un aumento de los niveles de carbohidratos de tipo monosacárido y disacárido, se ha asociado a la resistencia vegetal debido a que son fuente de energía rápida para dar respuesta a la presencia de patógenos. Específicamente, la trehalosa tiene diversas funciones y juega un papel esencial en varias etapas del desarrollo como, por ejemplo, la formación del embrión y la floración (Iturriaga, Suárez and Nova-Franco, 2009). Otros estudios también indican que este disacárido puede llegar a estar involucrado en la regulación del metabolismo del carbono y la fotosíntesis (Paul, Pellny and Goddijn, 2001); así como en las interacciones planta-microorganismo (Iturriaga, Suárez and Nova-Franco, 2009). Al respecto, se han encontrado algunos efectos de la alteración de la vía de la trehalosa sobre el metabolismo y el desarrollo vegetal, donde se sugiere que, los cambios en el contenido de trehalosa-6-fosfato afectan entre otros, la división celular y síntesis de la pared celular, la tolerancia a estreses abióticos y metabolismo de almidón (Wingler *et al.*, 2000). Con respecto a la defensa vegetal, se ha reportado que las raíces de *Arabidopsis thaliana* presentan alto contenido de trehalosa debido a la inoculación con *Plasmodiophora brassicae*, indicando que la síntesis de este disacárido hace parte de las respuestas de defensa de las plantas infectadas (Brodmann *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2008). En el caso específico de enfermedades vasculares, se ha encontrado que este disacárido puede ser usado como potencial osmoprotectante y molécula señal; es posible que su papel esté relacionado con la mitigación del estrés hídrico que presume la presencia del patógeno en los tejidos de la planta (MacIntyre *et al.*, 2022).

Diferentes estudios han demostrado que las fuentes de carbono, como la trehalosa, tienen una alta demanda cuando un tejido vegetal requiere defenderse, representando un costo metabólico significativo en términos de biosíntesis, almacenamiento y posibles impactos en fisiología de la planta. (Louis, Singh and Shah, 2013; Schultz *et al.*, 2013). Es por ello que, en el caso del clavel, es posible que su papel esté relacionado como osmolito

protectante en las primeras etapas del estrés hídrico y no como fuente energética. Sin embargo, se requieren de estudios adicionales que permitan plantear esta hipótesis

Del mismo modo, la celobiosa es un disacárido que consta de dos unidades de β -D-glucosa, y hace parte del metabolismo de la celulosa (Sharpe, 2018), dando lugar a la glucosa como producto final en su degradación por acción de la enzima β -glucosidasa (Parisutham *et al.*, 2017). En este orden de ideas, es posible relacionar este disacárido con la producción de energía, actuando como requisito previo para el crecimiento y desarrollo de la planta (Sami, Siddiqui and Hayat, 2019). Además, es posible que, durante la interacción con el patógeno, el aumento de este disacárido este por tanto asociado a la producción de glucosa y a la generación de energía. Sin embargo, no se puede descartar la acción de celulasas vegetales sobre la pared celular del patógeno que pueden actuar sobre la celulosa y aumentar dicho disacárido. Al igual que en el caso de la trehalosa, se requieren estudios que permitan profundizar sobre su papel en la respuesta bioquímica de la variedad resistente.

De acuerdo con el estudio de vías metabólicas realizado en el presente estudio, la acumulación diferencial de trehalosa y celobiosa presentada en la variedad resistente, hacen parte de cambios en el metabolismo de almidón y sacarosa (<https://www.kegg.jp/entry/ath00500>). Esto indicaría un papel central energético; sin embargo, tal y como se mencionó previamente, no se puede descartar que el papel de la trehalosa este determinado por su acción como potencial osmoprotectante en las condiciones de estrés hídrico que se pueden generar por efecto de este patógeno vascular (Iturriaga, Suárez and Nova-Franco, 2009). Se requieren de estudios adicionales que permitan profundizar en estos fenómenos y determinar si este cambio metabólico en el clavel está relacionado con la producción energética o con otras funciones que permitan mitigar el estrés biótico.

En el contexto de las interacciones planta-patógeno, el papel del inositol es versátil participando principalmente como molécula señal clave en algunos procesos de transducción de la señal. Por ejemplo, en el trabajo de Gillaspay, 2011, se estudió la participación de este monosacárido en señalización, encontrando específicamente que los patógenos oomicetos usan proteínas efectoras que se transfieren al citoplasma de las

células del hospedero a través de endocitosis mediada por balsas lipídicas, para suprimir las defensas de éste; se ha establecido que los efectores se logran unir a los fosfatos de los fosfoinosítidos monofosforilados (forma fosforilada del inositol) afectando la señalización. De este modo, el bloqueo de la entrada del efector por moléculas exógenas afecta la efectividad del patógeno (Kale *et al.*, 2010; Gillaspay, 2011). Por otro lado, plantas tratadas con ácido β -aminobutírico (BABA) inducen la hidrólisis de los fosfatos de fosfoinosítidos que pueden ser necesarios para el tráfico vesicular y/o reordenamientos del citoesqueleto en la célula vegetal durante la infección por patógenos. Estos cambios estructurales podrían dirigir las vesículas secretoras a los sitios de ataque del patógeno y mediar en el suministro de los componentes necesarios para la producción de calosa, permitiendo que la planta desarrolle una activación de los mecanismos de defensa específicos del estrés (Ton and Jakab, 2007). Se requieren estudios adicionales que permitan profundizar si el papel de este monosacárido en el caso de la variedad resistente de clavel objeto de estudio, también está relacionado con la señalización de la respuesta de defensa.

En las plantas es bien conocido el papel de la fructosa en diferentes procesos bioquímicos relacionados, entre otros, con la producción de energía y la biosíntesis de sacarosa. El producto de la fijación del carbono fotosintético (D-gliceraldehído-3-fosfato) es transportado desde el cloroplasto al citoplasma, allí tiene la posibilidad de transformarse en β -D-fructofuranosa-6-fosfato mediante enzimas presentes en la vía de la gluconeogénesis; este azúcar fosforilado es usado para sintetizar sacarosa, la cual proporciona sustratos para glucósidos de almacenamiento en plantas o, por otro lado energía, para su propio crecimiento (Winter and Huber, 2000). Un aumento de los niveles de la fructofuranosa, por tanto, nos habla de un metabolismo más activo a nivel biosintético en las raíces de las plantas resistentes de clavel que han sido atacadas con el patógeno

Por otro lado, el ácido glucónico hace parte de la vía de las pentosas-fosfato, uno de los principales sistemas de defensa celular antioxidante, responsable de proveer poder reductor y ribosa a la célula. Esta vía produce NADPH como poder reductor a partir de glucosa-6P en una fase oxidativa citosólica; este poder reductor es usado para la generación de antioxidantes que se requieren para el buen funcionamiento celular. Por su parte, en la fase no oxidativa reversible se generan pentosas usadas para la generación de nucleótidos e histidina a partir de pirofosfato de fosforibosilo (<https://www.kegg.jp/pathway/ath00030>) (Kruger and Von Schaewen, 2003; Riganti *et al.*,

2012). En general esta respuesta está de acuerdo con el papel central reportado para los mecanismos antioxidante en la interacción clavel *Fod*; se ha reportado que la acumulación de flavonoides antioxidantes puede aportar en la regulación de EROs en los primeros momentos de la interacción y jugar un papel central en la resistencia (Ardila, Martínez and Higuera, 2013; Ardila *et al.*, 2014).

Con base en lo anterior, es posible proponer que en la variedad '*Golem*', la resistencia a *Fod* podría estar asociada a su respuesta en el metabolismo energético y de carbohidratos, representando un aumento en los niveles de moléculas que son fuente de energía, señalización y poder reductor (fructofuranosa, mioinositol y ácido glucónico); así como en la osmorregulación y el metabolismo de almidón y sacarosa (trehalosa y celobiosa). Estos resultados se encuentran de acuerdo a los estudios realizados dentro del grupo de investigación, en los cuales con uso de herramientas proteómicas se observó que la resistencia al marchitamiento vascular está asociada al aumento de proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos (Ardila, 2013; Santos, 2023)

Por otro lado, algunos aminoácidos como aspartato, glutamina, alanina y fenilalanina aumentaron sus niveles a horas tempranas de la inoculación, indicando una respuesta de defensa primaria contra el ataque del patógeno. Es posible que los aminoácidos, además de la síntesis de proteínas, participen en diversos procesos como la obtención de energía, la biosíntesis y el transporte, entre otros. Por ejemplo, la acumulación positiva de glutamina en la variedad resistente, puede estar determinada por un aumento en la fijación de amonio, siendo clave para la asimilación y reciclaje de nitrógeno; este aminoácido es la principal forma de nitrógeno orgánico para el transporte en el floema del arroz y en el xilema del álamo (Sauter and van Cleve, 1992). Es posible que, en nuestro modelo, la glutamina permita aumentar el flujo de nitrógeno a los diferentes tejidos que requieren este nutriente para su funcionamiento durante el estrés generado por el patógeno. Particularmente, Tavernier *et al.*, 2007, demostraron que la glutamina tenía una sobrerregulación como respuesta a cepas de hongos patógenos y no patógenos en hojas de *Phaseolus vulgaris*, implicando que pueda tener algún papel en la respuesta de la planta al estrés biótico (Tavernier *et al.*, 2007). El estudio del perfil metabólico de la infección por *Fusarium graminearum* del nódulo del raquis del trigo identificó un cambio en la composición de metabolitos para la percepción y señalización general del estrés, el metabolismo de

especies reactivas de oxígeno (EROs), la composición de la pared celular, el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y el derivado del ácido γ -aminobutírico, así como alcoholes de azúcar, aminoácidos (incluyendo fenilalanina y triptófano) y carbohidratos de almacenamiento (Bönnighausen *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que estos cambios a nivel de metabolitos podrían ser, en parte, conservados ante la presencia de patógenos del género *Fusarium*.

En la presente investigación, uno de los derivados de aminoácidos que se acumuló por efecto de la inoculación fue el ácido piroglutámico, para el cual Bilska *et al.*, han reportado un posible papel en defensa al tener actividad antifúngica. En este estudio, se encontró que este compuesto desempeña un papel en la respuesta de la cebada (*Hordeum vulgare*) a diversas cepas de *Fusarium*, considerando que su presencia se relacionó con la disminución de tricotecenos de los hongos, lo que sugiere una función directa sobre el patógeno (Bilska *et al.*, 2018). Es posible que la acumulación en la variedad resistente del clavel, reportada en nuestra investigación, también esté relacionada con esta actividad. Sin embargo, se requieren de estudios específicos que permitan corroborar dicha hipótesis.

Como se presenta en la tabla 3.2, existen diferencias significativas en la acumulación de metabolitos dependiendo la variedad que se esté estudiando. Por ejemplo, dentro de las vías involucradas en la variedad 'Mizuki' por efecto de la inoculación, uno de los metabolitos que se identificó fue la citrulina, la cual está relacionada con el metabolismo de arginina; a partir de este último aminoácido y por acción de las enzimas óxido nítrico sintasas se puede generar óxido nítrico (NO) en condiciones de estrés liberando citrulina. Es por ello que se ha reportado que estos compuestos, pueden mediar procesos de defensa vegetal. Considerando que dentro de las cucurbitáceas, la citrulina constituye un componente de la defensa antioxidante, eliminando radicales hidroxilo con alta eficiencia, su síntesis a partir ya sea de carbamoil-P y ornitina en el ciclo de la urea (Crawford, 2006; Joshi and Fernie, 2017), o desde el ciclo del citrato (Walz *et al.*, 2004) pueden jugar un papel importante en defensa vegetal.

La inoculación con *Fod* en plantas de clavel de la variedad susceptible permitieron establecer una activación del metabolismo de arginina, pues se acumulan metabolitos involucrados en diferentes puntos de la ruta como son la citrulina y la prolina (<https://www.kegg.jp/entry/map01230>, <https://www.kegg.jp/entry/ath00220>,

<https://www.kegg.jp/entry/map00330>). En general estos metabolitos se han encontrado ampliamente como marcadores de estrés abiótico como es el caso del estrés hídrico; esto es de esperarse considerando que en esta variedad se inicia de manera temprana un taponamiento de los haces vasculares que puede generar estrés hídrico en la planta. En otras especies, por ejemplo, en sandía silvestre (*Citrullus lanatus*) tolerante a la sequía, el análisis por HPLC-MS evidencian que acumula altos niveles de citrulina en las hojas como respuesta al estrés hídrico; se reportaron al menos, 4 productos principales de la reacción entre la citrulina y radicales hidroxilo, lo que indica que este aminoácido puede jugar un papel importante en la tolerancia al estrés hídrico debido a sus características antioxidantes. (Akashi, Miyake and Yokota, 2001). Se ha demostrado que también algunos aminoácidos son acumulados en plantas superiores bajo estrés de salinidad, que incluyen alanina, arginina, glicina, serina, leucina, valina y prolina, así como aminoácidos no proteicos como la citrulina y ornitina (Ashraf and Harris, 2004; Winter *et al.*, 2015)

Por su parte, la prolina es un aminoácido multifuncional que confiere tolerancia a las plantas frente a diferentes tipos de estrés abiótico y de acuerdo con diferentes reportes en varias especies vegetales, con defensa contra patógenos (Verslues and Sharma, 2010). La prolina y su metabolismo se distinguen de otros aminoácidos de distintas formas, esta regula la acumulación de nitrógeno utilizable, contribuyendo a la estabilidad de la membrana y mitiga el efecto salino en la alteración de la membrana celular (Ashraf and Harris, 2004). Fabro *et al.* sugieren que la acumulación de prolina libre es una respuesta de estrés típica provocada por estrés osmótico en plantas y microorganismos; del mismo modo, demuestran que en *Arabidopsis thaliana*, la biosíntesis de este aminoácido puede activarse mediante interacciones planta-patógeno desencadenando una respuesta hipersensible y pudiéndose acumular en el tejido foliar tratado con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Fabro *et al.*, 2004). En nuestro grupo de investigación se determinó que, durante la interacción con *Fod*, las plantas de clavel presentan acumulación de prolina a nivel del apoplasto de tallos y raíces, siendo esta más significativa en la variedad susceptible (Cuervo Plata, 2018). Se propuso por tanto que la prolina juega un papel como osmolito que se acumula en los tiempos tempranos cuando inician las primeras señales de estrés hídrico, que tienden a ser más importantes en la variedad susceptible.

Con respecto a la cistationina, acumulado diferencialmente también en la variedad susceptible, es importante citar que es un precursor de la metionina, uno de los aminoácidos azufrados más abundantes en la naturaleza. La metionina es el precursor de varios metabolitos que regulan el crecimiento de las plantas y las respuestas al medio ambiente (<https://www.kegg.jp/pathway/map00270>); su producción es catalizada a partir de cistationina en una ruta biosintética que incluye, entre otras, la enzima cistationina γ -sintasa (Amir, Hacham and Galili, 2002). En general el metabolismo de azufre en las plantas juega un papel bastante diverso a nivel fisiológico, incluyendo respuesta a estrés; es posible que esta acumulación en la variedad susceptible pueda estar asociada también, a una respuesta al estrés hídrico incipiente a horas tempranas. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales que permitan profundizar en esta respuesta bioquímica

En el caso del compuesto secologanina, encontrado en raíces de la variedad susceptible, vale la pena mencionar que es el primer reporte de un secoiridoide en plantas de clavel, aunque los iridooides y secoiridooides están ampliamente distribuidos en plantas, pues se producen a partir del pirofosfato de geranilo en la vía del mevalonato, también muy conservada en plantas (Otero *et al.*, 2021). Como es bien sabido, ciertos compuestos de naturaleza especializada como terpenoides, compuestos fenólicos y flavonoides, tienen un papel importante dentro de la defensa de la planta. Dentro de estos, los terpenoides, al tener estructuras diversificadas, derivan compuestos biológicamente activos que afectan a los patógenos, siendo de importancia para la respuesta de defensa (Nguyen and O'Connor, 2020). En el caso del clavel, es posible que la acumulación de este compuesto este asociado a una respuesta de estrés específica ante la presencia del patógeno agresor, el cual puede tener un efecto directo o ser precursor de otros terpenoides que no fueron detectados en este estudio por GC-MS. En este sentido, se deben realizar estudios más detallados de las implicaciones de la activación de este tipo de metabolitos en clavel.

La acumulación de xilitol en las raíces infectadas de la variedad susceptible evidencia posiblemente, la acción de las enzimas de degradación de la pared celular del hongo patógeno. En el contexto de los azúcares de alcohol, el xilitol es el primer intermediario común de las vías catabólicas fúngicas interconectadas de L-arabinosa y D-xilosa que, además de la glucosa, son los monosacáridos más importantes que componen la pared celular (Meng *et al.*, 2022); la D-xilosa es introducida en esta vía después de su reducción a xilitol por la D-xilosa reductasa dependiente de NADPH. Posteriormente, el xilitol puede

oxidarse aún más a D-xilulosa por la xilitol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ que luego puede ingresar a la vía de las pentosa fosfato (Chroumpi *et al.*, 2021), permitiendo la oxidación completa de glucosa y producción de NADPH y CO₂ o, por otro lado, proporcionar precursores de ribosa para la síntesis de nucleótidos (Bender *et al.*, 2023). Es posible que la degradación completa o parcial de la xilosa presente en la pared celular vegetal se lleve a cabo de manera más efectiva en el genotipo susceptible; esto estaría de acuerdo con lo encontrado en este tipo de enfermedades, donde las xilanasas pueden jugar un papel central (Roncero *et al.*, 2000).

Dentro de la presente investigación, se encontró que la acumulación de citrulina y prolina se presenta de manera simultánea en la respuesta de defensa contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, por parte de las plantas de la variedad 'Mizuki'. Estos hallazgos demuestran una regulación de las respuestas de defensa mediadas por la síntesis de aminoácidos por efecto de la inoculación en esta variedad. Sin embargo, vale la pena recordar que la acumulación de aminoácidos también se presentó en la variedad resistente; esto indica que la acumulación de esta familia de metabolitos es parte de una respuesta de defensa posiblemente conservada en la especie como parte de los mecanismos que son parte de la PTI. Sin embargo, es claro que existen algunas diversificaciones puntuales para cada genotipo que deben ser estudiados con mayor detalle.

Es claro que la acumulación de carbohidratos también hace parte de la respuesta de defensa conservada en los dos genotipos muy posiblemente asociada a la obtención y acumulación de energía. Sin embargo, los azúcares regulados debido a la inoculación con *Fod* entre variedades tienen estructuras diferenciales, pues la variedad resistente presenta carbohidratos con estructuras más desarrolladas (monosacáridos y disacáridos), mientras que la variedad susceptible presenta el polialcohol xilitol, precursor de xilosa, permitiendo establecer una relación con el desarrollo de la pared celular por efecto del reto con el patógeno.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente y aunque hasta el momento no se conocen a profundidad los mecanismos bioquímicos involucrados, los anteriores resultados sugieren que la presencia de este patógeno estaría activando mecanismos de defensa en el clavel que pueden estar relacionados con acumulación de metabolitos

primarios, donde los aminoácidos y azúcares tienen un rol importante. Esta evidencia experimental coincide con los resultados obtenidos en estudios realizados sobre metabolitos sobrerregulados en los patosistemas anteriormente descritos. Cabe recalcar que los metabolitos relevantes son distintos entre variedades, presentándose un mayor número de metabolitos acumulados en la variedad resistente, lo cual sugiere que factores genéticos relacionados con resistencia a la enfermedad estarían marcando una diferencia en la respuesta bioquímica del clavel frente al patógeno, principalmente relacionado con metabolismo de azúcares y acumulación de energía.

3.2.2.2 Escenario 2: Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos en raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

Con el fin de explorar el efecto de la aplicación del fosfito en los perfiles metabólicos de las raíces del clavel (escenario 2), se abordó un esquema similar al caso anterior (inoculación, escenario 1). Para ello, se prepararon, derivatizaron y analizaron por GC-MS los respectivos extractos polares y apolares de muestras de raíces del clavel, colectadas luego del ensayo *in vivo*, donde se evaluó el efecto de la aplicación del fosfito por el método *drench* en las dos variedades 'Golem' (resistente) y 'Mizuki' (susceptible), comparados con los correspondientes controles (sin aplicación de fosfito). Para este escenario, los perfiles cromatográficos resultantes presentaron variaciones dependiendo de la variedad estudiada y del tratamiento aplicado. En la Figura 3.6 se muestran perfiles representativos obtenidos para ambas variedades en el tratamiento control y elicitado con la disolución de fosfito de potasio usada; se evidencia que existe una diferenciación marcada por la intensidad (asociado a la abundancia relativa) y presencia/ausencia de algunas señales

cromatográficas, infiriendo que hay variaciones plausibles en la biosíntesis de metabolitos como efecto de la aplicación de fosfito de potasio.

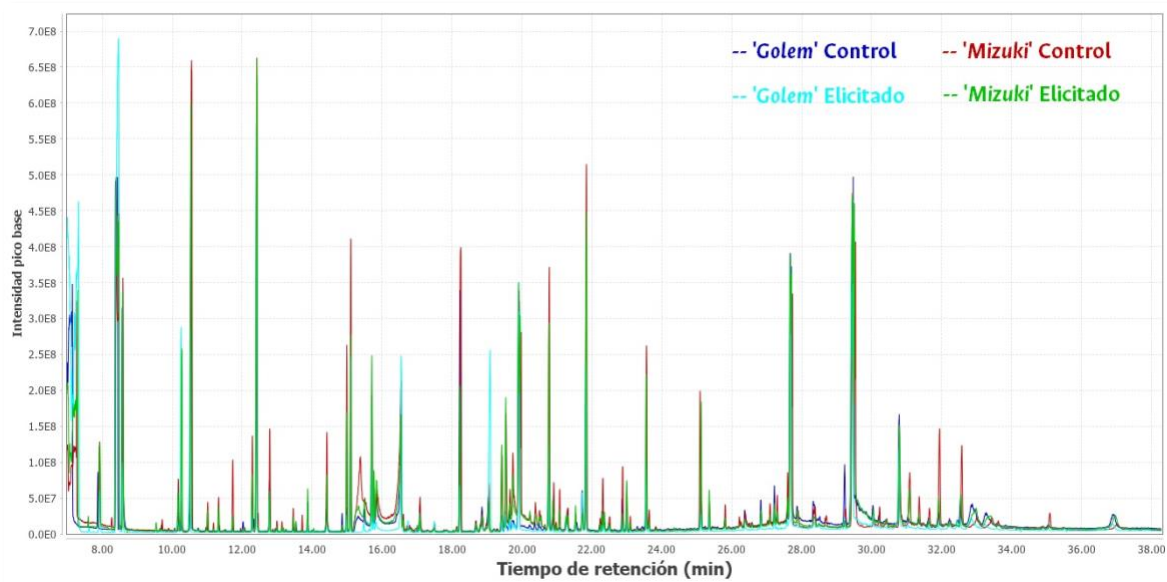
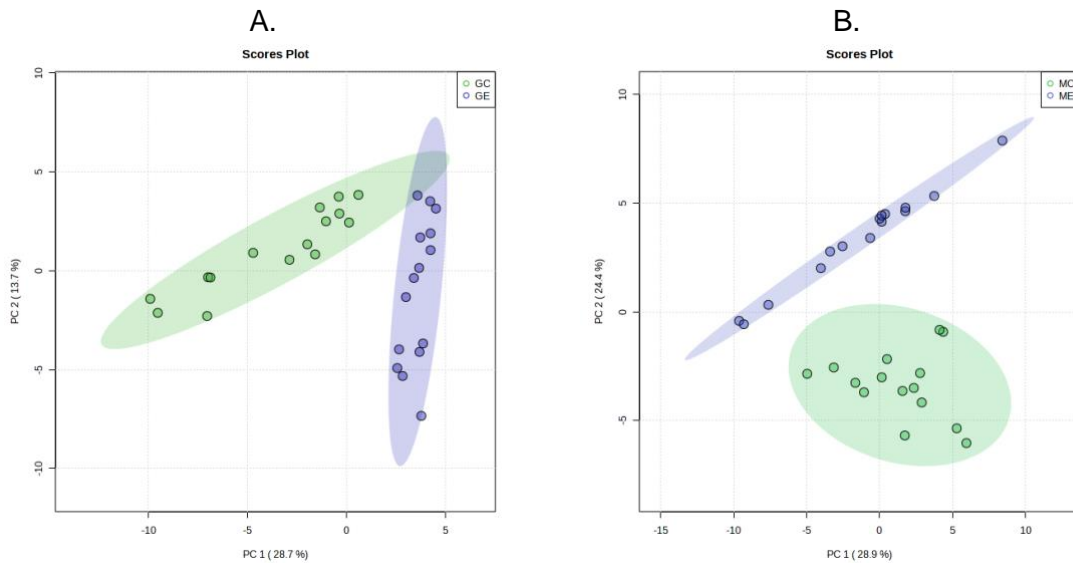


Figura 3.6 Perfiles cromatográficos superpuestos de extractos seleccionados obtenidos de las raíces de las variedades 'Golem' (Resistente) y 'Mizuki' (Susceptible) tratadas con fosfito de potasio. En Azul, tratamiento control (R). En turquesa, tratamiento elicitado (R). En rojo, tratamiento control (S). En verde, tratamiento elicitado (S).

Bajo las condiciones del análisis se pudieron detectar 103 señales cromatográficas para la variedad 'Golem' incluyendo los tratamientos estudiados, los cuales, bajo el minucioso proceso de deconvolución, normalización y anotación, y teniendo en cuenta la abundancia (>0.05%), llevó a la identificación de 69 metabolitos, mientras que para la variedad 'Mizuki' se detectaron 108 señales que involucró la identificación de 73 para todos los tiempos de trabajo. Entre estos metabolitos detectados se destacan algunos aminoácidos (glicina, valina, leucina, isoleucina, treonina, serina) y ciertos derivados (cistationina, oxoprolina, citrulina), carbohidratos (glucosa, manobiosa, fructosa), polioles (xilitol), ácidos orgánicos (ácido vanílico, ribónico, butanedioico, 5-(metiltio)salicílico, glucónico, láctico), flavonoides (afzelequina, quercetina), entre otros.

Los metabolitos encontrados coinciden con la red metabólica de plantas, la cual es más extensa que en la mayoría de otros organismos (Aharoni and Galili, 2011). Ciertos compuestos presentan una distribución ubicua en el reino vegetal y otros organismos, los

cuales son generalmente esenciales para el desarrollo, reproducción y crecimiento, incluyendo principalmente los componentes básicos universales y esenciales como azúcares, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, y lípidos. Estos intermediarios o precursores biosintéticos luego se ensamblan en metabolitos más complejos que pueden dar estructura y función biológica a las plantas (Aharoni and Galili, 2011). De este modo, se espera que los factores externos, como la elicitación, puedan influir en la producción y/o acumulación de estos compuestos esenciales y tengan algún efecto sobre el desarrollo de la planta frente a escenarios de estrés biótico, abiótico o, incluso, en procesos de senescencia. Entre las principales vías que desencadenan procesos de desarrollo vegetal se encuentran la glicólisis, el ciclo del citrato (TCA), los aminoácidos alifáticos, la vía de la pentosa fosfato, los aminoácidos aromáticos (AAA) y las vías derivadas de los aminoácidos (Drew and Demain, 1977; Aharoni and Galili, 2011).



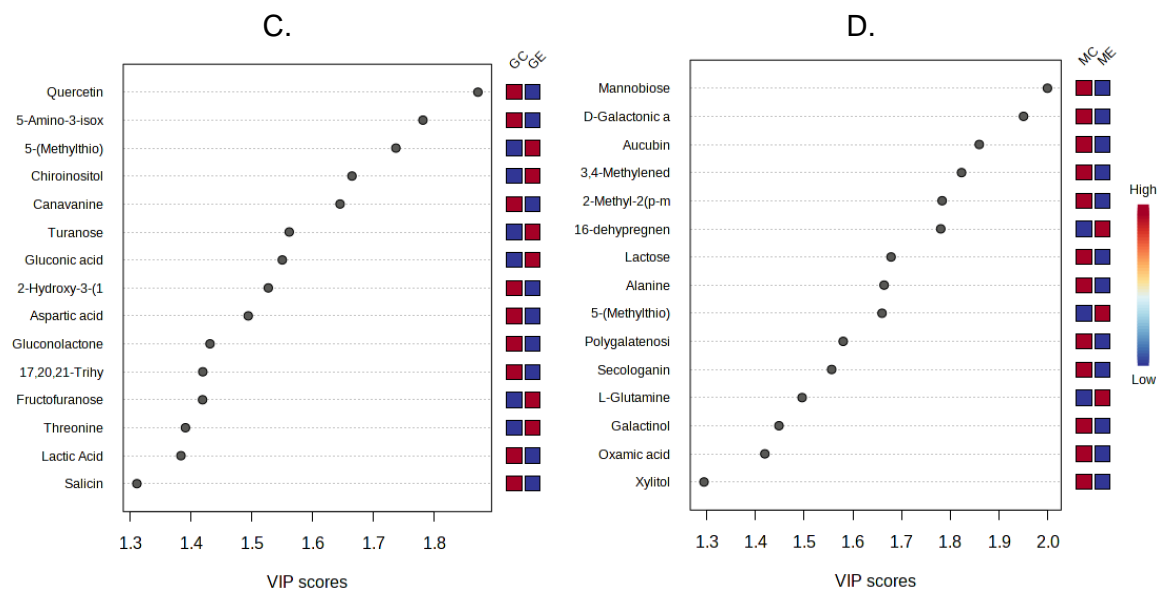


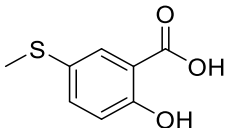
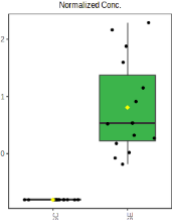
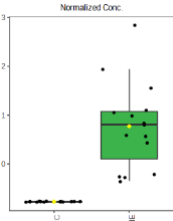
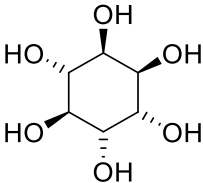
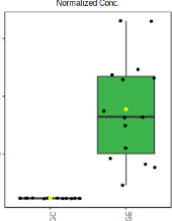
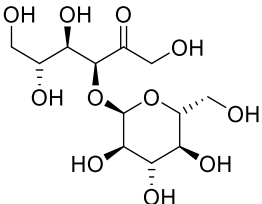
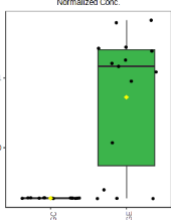
Figura 3.7 Efecto de la elicitación con disolución de fosfito de potasio (3%) en los perfiles metabólicos de raíces del clavel, evaluado por PCA y PLS-DA. (A,B) Diagramas de puntajes resultante del análisis de componentes principales (PC1 x PC2) para las variedades A. 'Golem' B. 'Mizuki'. En verde, tratamiento control (sin elicitación). En azul, tratamiento elicitado. Las regiones sombreadas tienen una confianza del 95% ($p < 0.05$). (C,D) Diagramas de puntajes VIP (*Variable importance in the projection*) que incluye la selección de metabolitos diferenciales a partir del PLS-DA para las variedades C. 'Golem' D. 'Mizuki'. Los recuadros coloreados a la derecha indican la relevancia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio (GC = control para la variedad 'Golem' (sin elicitación); GE = 'Golem' elicitado; MC = control para la variedad 'Mizuki' (sin elicitación); ME = 'Mizuki' elicitado).

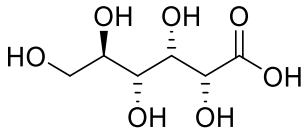
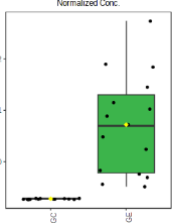
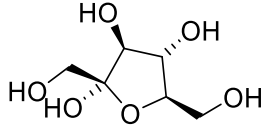
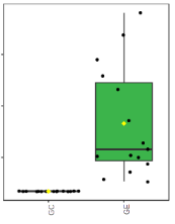
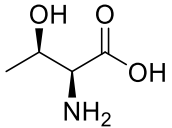
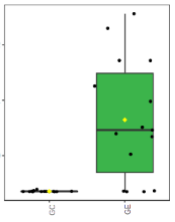
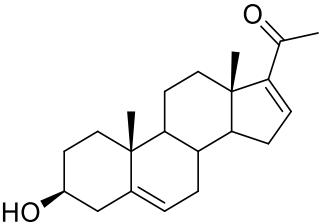
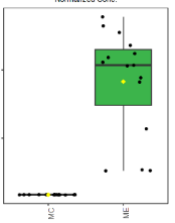
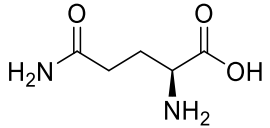
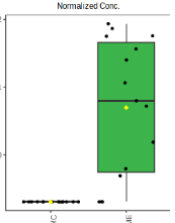
El análisis de componentes principales (PCA) explicó el 42.4% y el 53.3% de la varianza total usando los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) para la variedad 'Golem' y 'Mizuki', respectivamente. La Figura 3.7A-B muestra que el PC1 discriminó el 28.7% de la varianza para la variedad resistente y 24.4% para la variedad susceptible. Por su parte PC2 separó los tratamientos evaluados con un 13.7% y 28.9% para las variedades 'Golem' y 'Mizuki', respectivamente. Este patrón indicó que los tratamientos elicitado y control tienen diferencias en el perfil metabólico en las dos variedades, así como se pudo apreciar en la comparación directa de los perfiles cromatográficos.

Por medio del análisis discriminante de mínimos cuadrados (PLS-DA) se logró clasificar con mayor detalle los metabolitos que tienen mayor relevancia en las comparaciones observadas por el PCA. De esta manera, los diagramas de puntajes VIP revelaron aquellos metabolitos que influyen significativamente en la discriminación de los dos tratamientos

para ambas variedades, con puntajes VIP > 1.3. Esta selección permitió reconocer 6 metabolitos diferenciales por efecto de la elicitación para la variedad resistente y 3 para la susceptible. Entre estos se encuentran un derivado del ácido salicílico, identificado como ácido 5-(metiltio)-salicílico, el cual se sobrerreguló en ambas variedades. En la variedad 'Golem', además del metabolito mencionado anteriormente, se identificaron el chiroinositol, turanosa, ácido glucónico, fructofuranosa y treonina. Por otro lado, en la variedad 'Mizuki' se observó una regulación positiva para 16-dehidropegnenolona y glutamina.

Tabla 3.3 Metabolitos sobrerregulados por el efecto de la aplicación de disolución de 3% de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos en raíces de clavel

Metabolito ¹	Estructura	Índice de retención lineal ¹	Abundancia diferencial ²
Ácido 5-(metiltio) salicílico		1901	
			
Variedad 'Golem' (resistente)			
Chiroinositol		1944	
Turanosa		2819	

Ácido glucónico		1986	
Fructofuranosa		1791	
Treonina		1285	
Variedad 'Mizuki' (susceptible)			
16-dehidropregnenolona		1216	
Glutamina		1773	

¹ La identificación o anotación de los metabolitos a nivel 2 (estructura probable por coincidencia de fragmentación con base de datos NIST y *The Golm Metabolome Database* (GMD), incluyendo coincidencia con el índice de retención lineal (IRL) (Schymanski *et al.*, 2014)

² Los recuadros coloreados a la derecha indican la diferencia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio. Verde: Elicitado. Rojo: Control.

De acuerdo con estos resultados, se evidencia que la aplicación de la disolución de fosfito al 3% permitió la sobre-regulación de ácido 5-(metiltio)salicílico, un derivado tiometilado del ácido salicílico (AS) en las dos variedades de clavel. Examinando la librería KEGG se encontró que el AS, y algunos de sus derivados, están presentes en la vía de transducción

de señales de hormonas vegetales (<https://www.kegg.jp/pathway/map=ath04075>), como un producto final del metabolismo de fenilalanina. El AS es una hormona vegetal importante mayormente conocida por mediar en las respuestas del hospedero ante la infección por patógenos. Se ha considerado que AS se produce a través de dos vías biosintéticas, i.e., la vía del isocorismato sintasa (ICS) y fenilalanina amonio liasa (PAL), ambas rutas a partir de corismato. Sin embargo, la importancia de estas vías para la biosíntesis varía dependiendo la especie vegetal, debido a factores genéticos (Lefevre, Bauters and Gheysen, 2020). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la vía del ICS es la más importante, mientras que, en el arroz, la PAL parece ser más importante para la acumulación de AS, pero en soya ambas vías contribuyen por igual. Se ha reportado que, además de la biosíntesis, su acumulación también es diferencial a escala temporal y espacial, como es el caso de las plantas de arroz, las cuales tienen una mayor acumulación en el tallo que en raíces (Lefevre, Bauters and Gheysen, 2020). Así como la mayoría de los metabolitos, el AS puede sufrir varias modificaciones químicas para producir derivados importantes. En tales modificaciones hay una influencia en las propiedades y, por ende, en su función y/o rol, como es el caso de la metilación que aumenta la permeabilidad en la membrana y llega a ser más volátil; por tanto, el salicilato de metilo ha sido ampliamente estudiado y tiene un papel de señalización en las interacciones planta-insecto (Snoeren *et al.*, 2010). Asimismo, la hidroxilación y glicosilación pueden resultar en la formación final de ácidos dihidroxibenzóicos y la transformación de salicilato de metilo en glucósido del salicilato metilo (MeSAG), respectivamente (Dempsey *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2019). Dentro de la resistencia vegetal, el AS tiene un papel importante, el cual se requiere para la resistencia basal contra patógenos, así como para el mecanismo de defensa inducible y la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Osei *et al.*, 2021). Dentro de la señalización del AS está documentado que la acumulación de la proteína reguladora NPR1 es el principal componente para activar RSA (Chaturvedi and Shah, 2007).

Se ha encontrado que la aspersión foliar de fosfito de potasio en plántulas de *Arabidopsis thaliana* activa la expresión de genes relacionados, tanto con las vías metabólicas del AS (PR1 y PR5), como con las del ácido jasmónico/etileno, cuando se infecta con *Phytophthora cinnamomi* un día después de la aplicación del inductor (Eshraghi *et al.*, 2011). Del mismo modo, otros estudios sugieren que la vía metabólica del ácido salicílico es la principal mediadora en la respuesta de las plantas a la aplicación de fosfito (Vinas, Mendez and Jiménez, 2020). Existe evidencia que sugiere que el AS es esencial, no solo para

establecer la defensa local en la planta, sino también para proteger los tejidos vecinos sanos durante una infección; esto se logra mediante la transmisión de señales de las partes infectadas, debida a la acumulación de AS. (Vinod and Sabah, 2018; Osei *et al.*, 2021). De acuerdo a los resultados de la presente investigación, es posible que ese mismo proceso de señalización este ocurriendo por acción del fosfito de potasio en el caso del clavel; la generación del grupo tiometilado, debe ser sujeta a próximos estudios, ya que es posible que este cambio estructural le aporte propiedades fisicoquímicas apropiadas (e.g., mejorar su volatilidad y transporte desde la raíz) y así su papel sistémico; sin embargo, se requieren nuevos estudios que permitan profundizar al respecto.

Además de la acumulación del derivado de AS, en el caso de la variedad resistente, el uso del inductor de resistencia también permitió la acumulación de algunos azúcares, estimulando el metabolismo de carbohidratos, especialmente el metabolismo de inositol fosfato (<https://www.kegg.jp/pathway/map=ath00562>) y la glicólisis (<https://www.kegg.jp/pathway/map=ath00010>). Este es el caso del derivado de inositol (Chiroinositol), el ácido glucónico y la fructofuranosa, los cuales tuvieron una regulación positiva tanto por acción de la elicitación, como por la infección con el patógeno, presentado en el escenario 1. Es posible entonces que la elicitación genere un aumento en los procesos de señalización, antioxidantes y de obtención de energía, en alguna medida similares a la infección, permitiendo posiblemente que la planta se encuentre más preparada para el momento del ataque del patógeno. Asimismo, dentro del conjunto de azúcares acumulados, se identificó la turanosa, la cual es un isómero estructural de la sacarosa, el cual se ha asociado a procesos de defensa vegetal (Han, Lee and Yoo, 2021). Por ejemplo, en el estudio reportado sobre plantas de arroz cuando se usó la rizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* (SN13) promotora del crecimiento en plantas, se mejoró la respuesta inmune contra *Rhizoctonia solani*, mediante la señalización que involucra la acumulación de turanosa y MAPKs, generando la acumulación de metabolitos asociados a defensa como terpenos y quinazolina (Srivastava *et al.*, 2016). La activación de los mecanismos de defensa vegetales es un proceso que requiere altas cantidades de energía por lo que debe estar equilibrado con otros procesos necesarios para el buen funcionamiento celular, para no afectar aspectos como el crecimiento. Se ha encontrado que durante la percepción de algunos patógenos, hay un aumento en la actividad de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, logrando proporcionar la energía

adicional necesaria para la reprogramación celular global para activar los mecanismos de defensa (Henry *et al.*, 2015).

En el caso específico de la variedad susceptible, se encontró que la aplicación del inductor generó la acumulación del metabolito 16-dehidropregnenolona. Dentro del metabolismo de las plantas es posible encontrar la síntesis de pregnanos, derivados de la progesterona, la cual, aunque no se ha reconocido plenamente como una hormona vegetal, al parecer tiene una función similar, dado que interviene en el desarrollo y crecimiento vegetal, así como en la regulación de las respuestas al estrés biótico y abiótico (Li *et al.*, 2022). En este orden de ideas, se ha reportado que el pretratamiento de las hojas de *Arabidopsis thaliana* con progesterona promueve la disminución de los síntomas necróticos y la fuga de electrolitos causada por la bacteria *Pseudomonas* (Janeczko *et al.*, 2013). Aunque el metabolito detectado en el presente estudio derivado de los pregnanos, i.e., la 16-dehidropregnenolona, no tiene reportes a la fecha como regulador/estimulante vegetal, si es conocido que la pregnenolona (biosintetizada a partir de fitoesteroles) es precursora de la progesterona en plantas (Lindemann and Luckner, 1997). Adicionalmente, se conoce que la 16-dehidropregnenolona, aislada de *Solanum lyratum*, es biológicamente activa, dado que ha demostrado tener actividad citotóxica (Sun *et al.*, 2006). Por tanto, su acumulación diferencial por efecto de la elicitación en la variedad susceptible podría suponer una participación en el proceso de estimulación vegetal con roles en defensa que merece ser examinado y esclarecido en futuros estudios enfocados a conocer el papel de este metabolito y otros pregnanos en la inducción de resistencia en clavel.

Con respecto a la acumulación de aminoácidos en la variedad susceptible, es importante mencionar que, como se mencionó previamente, en muchas plantas superiores la glutamina (Gln) y asparagina (Asn) representan intermediarios centrales en el metabolismo del nitrógeno y contribuyen a su transporte (<https://www.kegg.jp/pathway/map=ath00250>). Hwang *et al.* reportan que la glutamina, junto a la asparagina, participan en el transporte de nitrógeno hacia los tejidos infectados de plantas de ají (*Capsicum annuum*) durante la interacción con *Pseudomonas syringae*, siendo así estos dos aminoácidos un blanco de estudio para la resistencia vegetal. Particularmente, la expresión de asparagina sintetasa de *Capsicum annuum* (CaAS1) influyó en las respuestas de defensa tempranas en las hojas enfermas, incluyendo el aumento de la fuga de electrolitos, así como las especies reactivas de oxígeno y una acumulación de óxido nítrico (NO) (Hwang, An and Hwang, 2011). De acuerdo con los resultados de la presente investigación, es posible que la

acumulación de estos aminoácidos en raíces de las plantas susceptibles de clavel por efecto de la elicitación, genere una mayor capacidad de transporte de nitrógeno en los tejidos elicitados; esto podría ser una ventaja que le permita a las plantas responder mejor a la interacción con el patógeno *Fod*.

Los resultados presentados en esta investigación indican que la aplicación de la disolución de fosfito en las plantas de clavel, les permite activar diferentes rutas que les permite estar preparadas para el ataque del patógeno. Han *et al.*, descubrieron que algunos mecanismos moleculares asociados a la aplicación de fosfito pueden estar involucrados a su papel como bioestimulante, afectando el crecimiento vegetal. La secuenciación de ARN de las plantas tratadas con una disolución al 1% de fosfito de potasio reveló varios cambios en la expresión de genes, sugiriendo una influencia en múltiples rutas del metabolismo primario y especializado tales como biosíntesis de flavonoides, metabolismo de almidón y sacarosa, y biosíntesis de la ruta fenilpropanoide. El análisis de enriquecimiento con *Gene ontology* y la librería KEGG revelaron que el efecto del fosfito sobre las plantas se puede asociar a respuestas de defensa, demostrando un papel como bioestimulante vegetal permitiendo que la planta tenga un mejor funcionamiento frente a ataques de tipo biótico y abiótico. Dentro de las rutas metabólicas encontradas, se identificaron vías de biosíntesis de metabolitos especializados, metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, vitaminas y cofactores, determinando así un efecto generalizado como resultado del tratamiento con fosfito. (Han *et al.*, 2021).

En otros estudios se ha encontrado que el uso de fosfito en plantas de tomate y papa puede mejorar la intensidad floral y aumentar el rendimiento y la calidad de los productos finales (Lovatt and Mikkelsen, 2006). Estas respuestas son atribuidas al efecto que tiene el uso del inductor en el metabolismo de azúcares, cambios en los niveles de fitohormonas y metabolitos especializados, así como la inducción de la vía del ácido shiquímico, siendo esta última de gran importancia puesto que de ella se derivan los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, tirosina y triptófano. Además de ser componentes esenciales de la síntesis de proteínas, también sirven como precursores de una amplia gama de metabolitos especializados como pigmentos, compuestos fenólicos, alcaloides, hormonas y componentes de pared celular (Trejo-Téllez and Gómez-Merino, 2018). El uso de fosfito induce respuestas de defensa asociadas con un mayor contenido y actividad de poligalacturonasa, quitinasa y proteinasa, las cuales son proteínas relacionadas con la

patogénesis y se sabe que están involucradas en la inhibición de proteasas de los patógenos o en la degradación de la pared fúngica (Olivieri *et al.*, 2012).

En ese orden de ideas, los resultados del presente estudio, coinciden con lo reportado para otras especies vegetales; se ha demostrado que la aplicación de disoluciones de fosfito de potasio puede estimular un mecanismo de resistencia a patógenos, desempeñando un rol importante como agente iniciador de respuestas de defensa en plantas, lo cual permite preparar a las plantas para una respuesta de defensa más rápida y robusta contra hongos y oomicetos, como *Phytophthora*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*, entre otros (Lobato *et al.*, 2008). Así mismo, el efecto que tiene el uso de una disolución de fosfito de potasio sobre el clavel permite considerar la activación de la RSA, dependiente de AS, como un proceso conservado debido a la acumulación de el ácido 5-(metiltio)salicílico en las dos variedades usadas en esta investigación. En resumen, los resultados del escenario 2, evidenciaron algunos de los aspectos bioquímicos más significativos involucrados en la inducción de resistencia por fosfito de potasio. Los cambios asociados a la aplicación del inductor pueden ser centrales en el proceso de inducción de resistencia. Sin embargo, en el siguiente escenario se complementará esta información al incluir el efecto combinado de la infección con el patógeno.

3.2.2.3 Escenario 3: Efecto de la aplicación de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos durante la interacción clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

En el tercer escenario se exploró el efecto que tiene el uso del inductor de resistencia previa a la inoculación con *Fod* en la acumulación de metabolitos presentes en raíces de las variedades contrastantes en resistencia al marchitamiento vascular. Así como en los escenarios anteriores, los extractos obtenidos de raíces se derivatizaron y se usó GC-MS como plataforma analítica para separar e identificar aquellos metabolitos en cada variedad por efecto de los tratamientos y, posteriormente, por estadística multivariada, reconocer aquellos que tenían una acumulación diferencial. Para esta parte del estudio se compararon los tratamientos elicitados inoculados (uso de una disolución de fosfito y posterior inoculación) con los controles inoculados, con el fin de evaluar cuáles eran aquellos metabolitos que variaban como efecto único de la aplicación de la disolución de

fosfito de potasio en raíces de clavel. Los resultados del análisis cromatográfico permitieron detectar 103 señales para los tratamientos estudiados en este escenario para la variedad 'Golem' y 112 en la variedad 'Mizuki'. Entre ellos, se pudo dar identidad a 61 y 69 metabolitos, respectivamente. Estas moléculas se pueden comparar con las mencionadas anteriormente en los escenarios 1 y 2; esto se puede evidenciar en los cromatogramas sobrepuestos de la figura 3.8, donde se presentan diferencias cualitativas y cuantitativas entre los tratamientos estudiados.

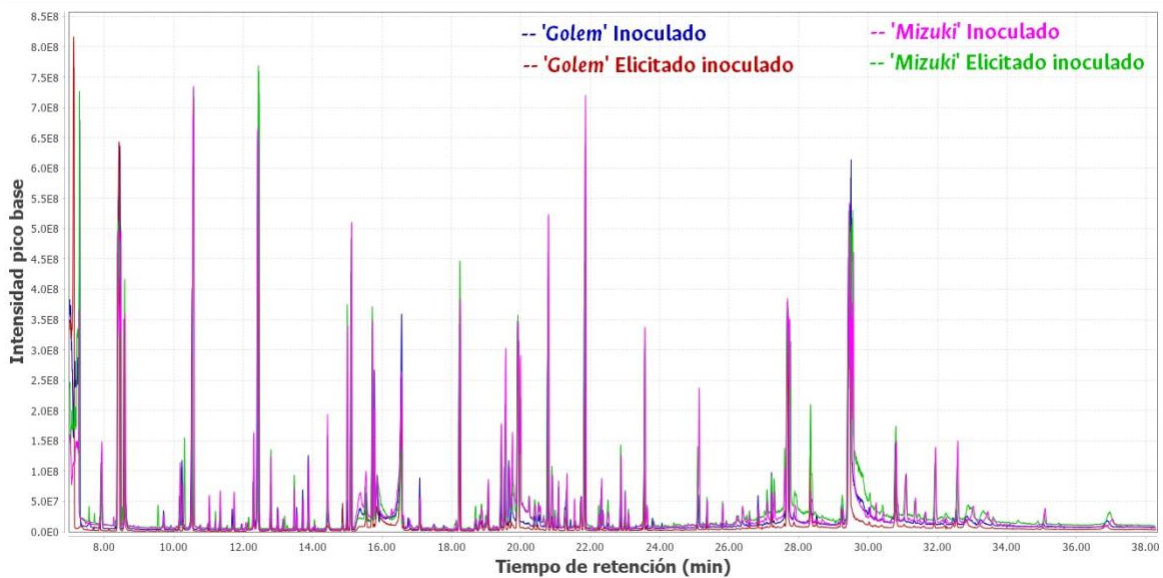


Figura 3.8 Perfiles cromatográficos sobrepuestos de extractos seleccionados obtenidos de las raíces de las variedades 'Golem' (Resistente) y 'Mizuki' (Susceptible) inoculadas con *Fod*. En Rojo, tratamiento elicitado - inoculado (R). En Azul, tratamiento inoculado (R). En Verde, tratamiento elicitado - inoculado (S). En fucsia, tratamiento inoculado (S).

El análisis por medio del diagrama de puntajes, derivado del análisis de componentes principales (PC1 x PC2) (Figura 3.9A-B), evidenció una dispersión alta de las muestras de la variedad 'Golem' inoculadas con *Fod*, lo cual puede estar explicado por las variaciones inherentes a cada tiempo de muestreo (12, 24, 48 y 96 h), lo cual sugiere variaciones temporales en la respuesta del clavel contra *Fod*, en comparación con la respuesta promovida por la elicitación con posterior reto con *Fod*, la cual se muestra más conservada (menos dispersión). No obstante, los dos grupos de tratamientos (i.e., elicitado-inoculado versus inoculado) presentan una separación notoria luego del PCA. El diagrama de puntajes de la figura 3.9A explica el 51.2% de la varianza total, donde PC1 explica el 31.8%

de la varianza y permite diferenciar la regulación de los metabolitos en los tratamientos estudiados, mientras que PC2 explica el 19.4%, mostrando diferencias en los tiempos estudiados. Para el caso de la variedad ‘Mizuki’, el gráfico de PCA explica el 56% de la variedad total, demostrando también una variación en la acumulación de metabolitos en los tratamientos elicitado-inoculado e inoculado. El componente principal 1 explica la diferenciación entre sistemas obteniéndose una explicación de 34.1%, mientras que el PC2 explica en un 21.9% los tiempos de muestreo. Aunque se obtuvo una mayor dispersión en la agrupación de los tratamientos analizados, esta se encuentra dentro de las regiones de confianza, por lo tanto, son estadísticamente diferenciables por el análisis de PCA.

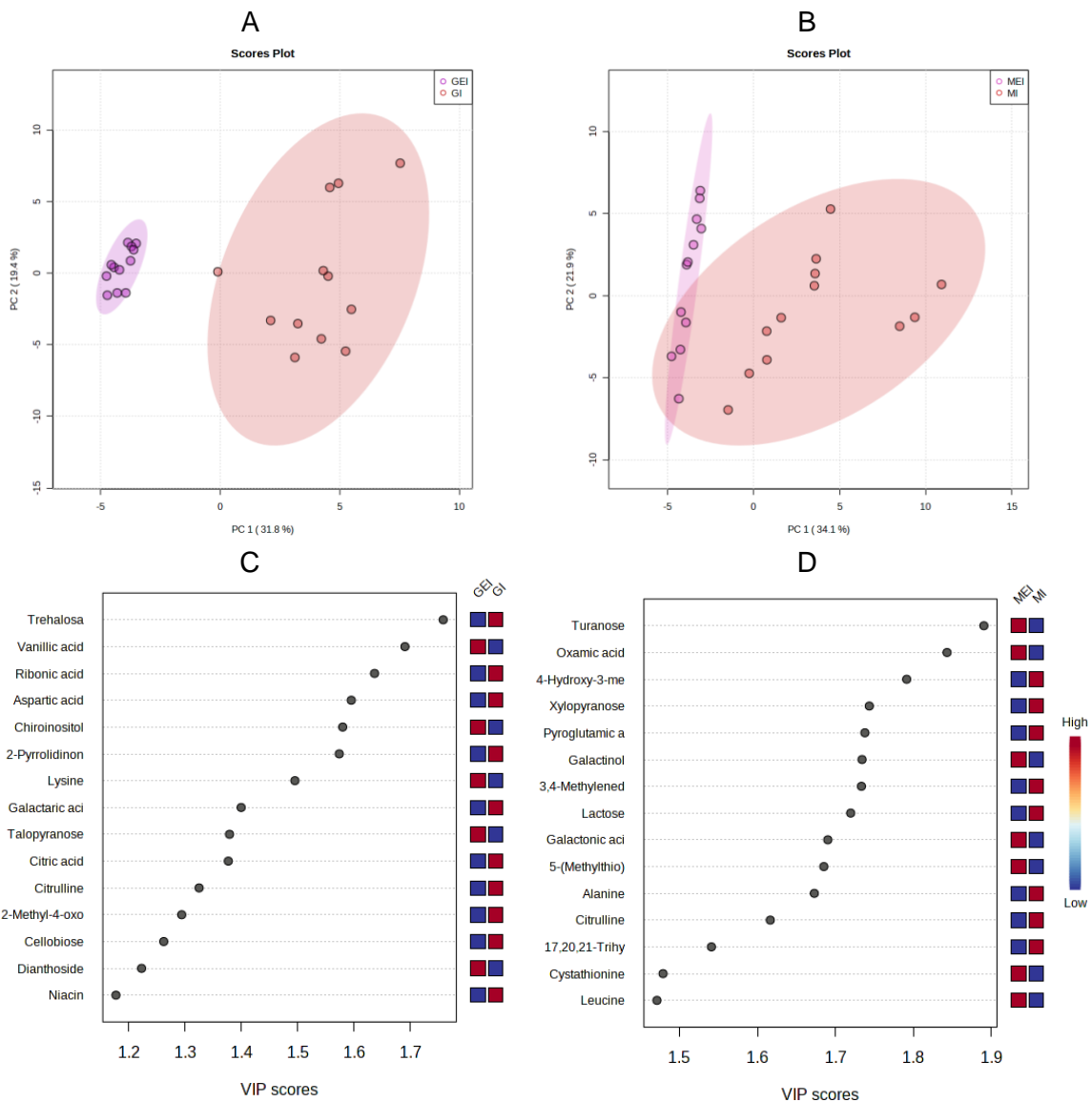
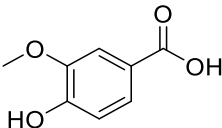
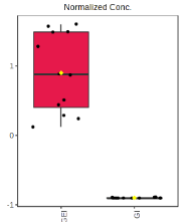
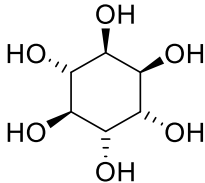
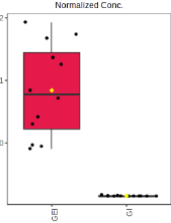


Figura 3.9 Efecto de la elicitación con disolución de fosfito de potasio (3%) en los perfiles metabólicos de raíces del clavel, en la interacción clavel – *Fod*, evaluado por PCA y PLS-DA. (A,B) Diagramas de puntajes resultante del análisis de componentes principales (PC1 x PC2) para las variedades A. ‘*Golem*’ B. ‘*Mizuki*’. En morado, tratamiento elicitado inoculado. En rojo, tratamiento inoculado. Las regiones sombreadas tienen una confianza del 95% ($p < 0.05$). (C,D) Diagramas de puntajes VIP (*Variable importance in the projection*) que incluye la selección de metabolitos diferenciales a partir del PLS-DA para las variedades C. ‘*Golem*’ D. ‘*Mizuki*’. Los recuadros coloreados a la derecha indican la relevancia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio (GEI = ‘*Golem*’ elicitado e inoculado; GI = ‘*Golem*’ inoculado; MEI = ‘*Mizuki*’ elicitado e inoculado; MI = ‘*Mizuki*’ inoculado).

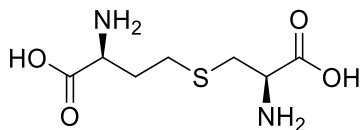
El PLS-DA señaló que el efecto de la elicitación en la interacción clavel – *Fod* influye significativamente en la biosíntesis o acumulación de 12 metabolitos. El ácido vanílico, chiroinositol, lisina y talopiranososa fueron los metabolitos identificados que se mostraron sobrerregulados identificadas para la variedad ‘*Golem*’ con un valor VIP > 1.2. El efecto que tuvo el fosfito de potasio sobre la interacción de la variedad ‘*Mizuki*’ – *Fod* regula positivamente el disacárido turanosa, 2 ácidos orgánicos (ácido galactónico y ácido 5-(metiltio) salicílico), galactinol y dos aminoácidos (Cistationina y leucina), el cual tuvo un puntaje VIP > 1.4.

Tabla 3.4 Metabolitos sobrerregulados por el efecto de la aplicación de disolución de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos en la interacción clavel - *Fod*

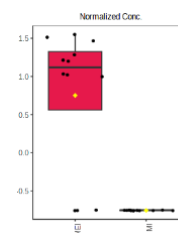
Metabolito ¹	Estructura	Índice de retención lineal ¹	Abundancia diferencial ²
Variedad ‘<i>Golem</i>’ (resistente)			
Ácido vanílico		1756	
Chiroinositol		1944	

Lisina	<chem>NC(CCCCN)C(=O)O</chem>	1849	
Talopiranososa	<chem>O[C@H]1[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](CO)O1</chem>	1952	
Variedad 'Mizuki' (susceptible)			
Turanosa	<chem>OC[C@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)C(=O)O</chem>	2819	
Galactinol	<chem>O[C@H]1[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]1O[C@@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)O2</chem>	2979	
Ácido galactónico	<chem>OC[C@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)C(=O)O</chem>	1988	
Ácido 5-(metiltio) salicílico	<chem>CS1=CC=C(C=C1C(=O)O)O</chem>	1901	

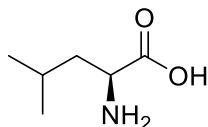
Cistationina



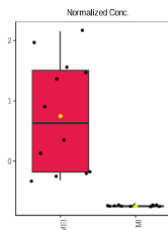
1592



Leucina



1151



¹ La identificación o anotación de los metabolitos a nivel 2 (estructura probable por coincidencia de fragmentación con base de datos NIST y *The Golm Metabolome Database* (GMD), incluyendo coincidencia con el índice de retención lineal (IRL) (Schymanski *et al.*, 2014)

² Los recuadros coloreados a la derecha indican la diferencia estadísticamente significativa de la abundancia del metabolito asociada a cada grupo en estudio. Rojo: Elicitado-inoculado. Verde: Inoculado

La aplicación del inductor de resistencia en plantas de clavel de la variedad '*Golem*' y posterior inoculación con *Fod* sobrerreguló chiro-inositol, el cual está presente en la vía del metabolismo de inositol fosfato, tal y como se mostró anteriormente en los otros escenarios. Esto evidencia que este compuesto es importante en la señalización de la respuesta de defensa que se potencializa por la aplicación previa del inductor. Es así como un aumento en este metabolito podría estar relacionado con unas vías de traducción de la señal más activas; es evidente que se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

Como se ha mencionado a lo largo de este estudio, los metabolitos primarios son esenciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas (Bolton, 2009). Del mismo modo, los azúcares, polialcoholes y sus derivados tienen un rol importante de la conversión de energía, pero también pueden llegar a estar implicados en la defensa a la infección por patógenos (Escenario 1 y 2). De acuerdo con los resultados de la presente investigación, el escenario 3 no es la excepción. Es así como la acción previa del inductor genera durante la inoculación, un aumento de diferentes carbohidratos como la talopiranososa, la turanososa y el galactinol. Bajo el estrés por *Dothiorella gregaria*, causante del cancro en plantas del género *Populus*, se encontró que algunos azúcares y alcoholes tuvieron un cambio significativo bajo el estrés por el patógeno. Algunas de las vías metabólicas

sobrerreguladas fueron la glucólisis y gluconeogénesis, el ciclo del citrato y el metabolismo de galactosa; para esta última vía, los metabolitos que tuvieron un aumento fueron el ácido glucónico, ribosa, mioinositol y glicerol. Se sabe que la galactosa, derivada del ácido galactónico se usa para la biosíntesis de vitamina C, la cual se considera un compuesto importante de la resistencia a las enfermedades de las plantas (Wu *et al.*, 2015). Es posible que en el caso del clavel la aplicación fosfito de potasio y posterior infección con el patógeno genere la acumulación de algunos de estos metabolitos y tengan ese efecto asociado a una mejor respuesta al patógeno.

En este sentido, la aplicación del inductor de resistencia permitió activar el metabolismo de galactosa en la variedad susceptible, regulando positivamente galactinol. Algunos estudios han reportado que la colonización de raíces de plantas de pepino inoculadas con *Pseudomonas chlororaphis* induce la expresión de galactinol sintasa, la cual confiere resistencia sistémica contra el patógeno; del mismo modo, la infección de *Arabidopsis* con *Botrytis cinerea* promovió la expresión de genes codificantes para galactinol sintasa de *Arabidopsis* (*AtGolS1*) en respuesta a la colonización, mediada a través de la vía dependiente de jasmonato, estimulando una resistencia sistémica inducida en este patosistema (Cho *et al.*, 2010). Es por ello que estos resultados son particularmente relevantes, ya que es posible que el aumento en la resistencia descrito en la evaluación fenotípica en la variedad susceptible de clavel, este relacionada con la acumulación de estos metabolitos diferenciales; la acumulación de este metabolito podría activar en la variedad Mizuki fenómenos asociados con el aumento de resistencia

Con respecto a los aminoácidos, hubo una acumulación diferencial de lisina, la cual puede tener un papel importante en la activación RSA en algunas plantas (Bernsdorff *et al.*, 2016; Hartmann and Zeier, 2018). La lisina es un aminoácido esencial nutricionalmente importante cuyo nivel en las plantas está regulado en gran parte por la velocidad de su síntesis, así como otros aminoácidos, en algunos tejidos vegetales y bajo algunas condiciones de estrés. Este aminoácido se cataboliza eficientemente en glutamato y varios metabolitos relacionados con el estrés mediante nuevos mecanismos de regulación metabólica (Arruda and Barreto, 2020). Las plantas, al igual que los animales superiores, poseen homólogos de receptores de glutamato, por esta razón puede que el catabolismo de lisina también regule varios procesos de la planta a través de ellos (Galili *et al.*, 2001). La biosíntesis de lisina procede de la regulación de aspartato por medio del metabolismo

de alanina, aspartato y glutamato o, por otro lado, mediada por el homocitrato, producto del ciclo del citrato, glicolisis y metabolismo de piruvato (<https://www.kegg.jp/pathway/map=ath00300>). Por su parte, la degradación permite volver al ciclo del citrato (<https://www.kegg.jp/pathway/ath00310>); por lo tanto, la lisina puede estar presente en el metabolismo de aminoácidos o, indirectamente, en el metabolismo de carbohidratos. En otros estudios se ha reportado a la lisina como precursora de ciertas vías metabólicas como la ruta de la sacaropina a α -aminoadipato y la descarboxilación de lisina a cadaverina. Dentro de esta vía, la proteína de respuesta similar a la aminotransferasa AGD2 (ALD1), actúa sobre lisina y genera intermediarios dehidropipecólicos cíclicos, que posteriormente son reducidos a ácido pipecólico (Pip) por acción de la enzima reductasa SAR-deficiente 4 (SARD4). Pip puede transformarse al ácido *N*-hidroxipipecólico que tiene la capacidad de activar la RSA a causa de la regulación de monooxigenasa dependiente de flavina1 (FMO1) (Figura 1.9) (Hartmann and Zeier, 2018). Análogamente, Návarová, *et al.* demostraron que el ácido pipecólico, como derivado del catabolismo de lisina, puede regular una defensa inducible y RSA a través de una amplificación de defensa; en este sentido, la acumulación de Pip y lisina después del ataque de la bacteria *Pseudomonas syringae* indica que la biosíntesis y catabolismo de este aminoácido son eventos desencadenados como resultado de la interacción con patógenos (Návarová *et al.*, 2013). La activación de este tipo de rutas en las plantas de clavel tratadas con la disolución de fosfito de potasio, debe ser sujeta a un estudio más profundo; es posible que la inducción de resistencia a *Fod*, involucre más de una hormona de señalización y pueda ser un fenómeno complejo asociado a la misma resistencia multigénica reportada a la enfermedad.

Como parte de la respuesta potencializada en la variedad resistente, se encuentra la acumulación del ácido vanílico, el cual es un compuesto fenólico involucrado en diferentes procesos biosintéticos de plantas. En un estudio sobre plantas de arroz, se examinaron algunos cambios cuantitativos y cualitativos en el perfil bioquímico de carbohidratos, compuestos fenólicos y proteínas, así como cambios enzimáticos que ocurren cuando se enfrentan a plagas como *Scirpophaga incertulas*, *Cnaphalocrosis medinalis* y *Nilaparvata lugens*. En éste se encontró que la cantidad de proteínas, compuestos fenólicos como ácido vanílico, ácido sirínigico, ácido cinámico y ácido *p*-cumárico, y carbohidratos aumentaron por efecto del estrés biótico, definiendo estos compuestos como componentes

en la defensa de plantas de arroz (Rani and Jyothsna, 2010). En general la acumulación de compuestos fenólicos ha sido reportada como uno de los fenómenos más tempranos asociados con la resistencia a *Fod* en el clavel (Rincón, 2020). Por lo tanto, era de esperarse que la aplicación del fosfito de potasio afectara este metabolismo; es posible que si la herramienta analítica usada para el presente estudio hubiese estado enfocada para el estudio de este tipo de metabolitos (e.g., HPLC-MS), la respuesta encontrada al respecto hubiese sido mucho mayor.

La aplicación de la disolución de fosfito de potasio en la variedad 'Mizuki' por el método de *drench* y posterior inoculación con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* permitió reconocer algunos patrones relevantes de algunos metabolitos que son parte de ciertas vías importantes. De este modo, la acumulación de leucina y los otros dos aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina y valina) (BCAA como acrónimo de *branchedchain amino acids*) comparten cuatro enzimas comunes en sus rutas de biosíntesis y, por lo tanto, están regulados de manera coordinada. Existen reportes donde se cree que la inducción de aminoácidos libres como osmolitos en respuesta al estrés abiótico puede desempeñar un papel en la tolerancia al estrés generalizado (Joshi *et al.*, 2010). Tanto la regulación de leucina, como parte de los BCAAs, y del derivado de AS, permite suponer una activación de RSA. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Corredor *et al.*, donde indicaron que la regulación de los BCAAs es esencial para superar la susceptibilidad a la roya del trigo, y crucial para la activación de RSA (Corredor-Moreno *et al.*, 2021). Dentro de la biblioteca KEGG, la leucina hace parte del metabolismo de aminoácidos estando presente en la biosíntesis y degradación de valina, leucina e isoleucina (BCAAs) (<https://www.kegg.jp/pathway/ath00290>, <https://www.kegg.jp/pathway/ath00280>). En este sentido, el estudio de ARN-seq de 68 variedades de trigo infectadas con patógenos, se pudo descubrir que la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (*TaBCAT1*) actúa como reguladora positiva de la susceptibilidad a la roya del trigo, permitiendo establecer que el aumento en los niveles constitutivos de leucina puede activar la expresión génica de la RSA y proteínas relacionadas con patogénesis dependientes de ácido salicílico (Corredor-Moreno *et al.*, 2021). Considerando la acumulación del aminoácido cistationina en la variedad susceptible, tal y como se describió anteriormente en el escenario 1, es posible que su acumulación esté asociada con la generación de metionina y la respuesta a las condiciones de estrés generadas. Es probable que este mecanismo

sea potencializado en las plantas susceptibles tratadas con el inductor y les permita responder mejor a la presencia del patógeno.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, los resultados indican que la aplicación del inductor de resistencia permite que las plantas de clavel inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* puedan producir/acumular ciertos metabolitos que estarían cumpliendo un papel importante en la defensa contra el marchitamiento vascular. La elicitación con posterior reto en ambas variedades genera una sobrerregulación de azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos que tienen un rol dentro de la defensa del clavel, permitiendo así una mejor respuesta al patógeno. Esto está de acuerdo con otros estudios en otras plantas, Por ejemplo, Mohammadi *et al.*, 2020, demostraron que la aplicación de fosfito de potasio sobre tubérculos de papa estimula una respuesta rápida y vigorosa contra la infección de *Phytophthora infestans*, a través de la activación de respuestas de defensa, como síntesis de algunas moléculas de defensa, enzimas relacionadas con la patogénesis y actividades enzimáticas antioxidantes (Mohammadi *et al.*, 2019); asimismo, con el fin de descubrir algunas moléculas de raíces de lupino azul (*Lupinus angustifolius* L.) inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*, previamente tratadas con fosfito, Gunning, et al., realizaron un estudio de los perfiles metabólicos donde encontraron que la aplicación a las hojas de este tratamiento permitió que el patógeno no pudiera colonizar los tejidos radiculares y causar enfermedades. El estudio se extendió con análisis por MS y ³¹P-RMN, los cuales indicaron una sobrerregulación de flavonoides y compuestos derivados fenólicos (Gunning *et al.*, 2013).

Los compuestos a base de fosfito se comercializan principalmente como fertilizantes, fungicidas sistémicos o activadores de defensa natural. Por ejemplo, el fosfito puede llegar a estimular las respuestas de defensa de *Arabidopsis* activando la producción de calosa y acumulación de peróxido de hidrógeno y, del mismo modo, induciendo la expresión de genes de defensa contra *Phytophthora cinanmoni* (Siah *et al.*, 2018). Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento de plantas de papa con un producto comercial que contiene fosfito (Confine™) tuvo la capacidad de inducir resistencia contra *Phytophthora infestans* y desencadenó respuestas de defensa dependientes de ácido salicílico, vías dependientes de EROs y calcio, así como una inducción de respuesta hipersensible y formación de calosa después de la inoculación (Siah *et al.*, 2018). De igual forma, se ha demostrado que

la vía del AS es importante en la resistencia inducida por fosfito en *Arabidopsis* contra *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Massoud *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013). De acuerdo con la presente investigación, este mismo fenómeno estaría también ocurriendo en el clavel, donde la aplicación del fosfito de potasio está generando la inducción de resistencia asociada a la activación de rutas de señalización y defensa.

Es de importancia saber que las plantas tienen la capacidad de responder a la infección a través de varios mecanismos, los cuales pueden llegar a incluir la inducción de resistencia, así como cambios en el metabolismo, lo que implica también una mejoría en el crecimiento y rendimiento de la planta. El metabolismo alterado implica algunos cambios a nivel fisiológico y bioquímico, como por ejemplo el rendimiento fotosintético o el metabolismo de carbohidratos y nitrógeno. Entre otros, algunos señalizadores de defensa involucrados en la inducción de la resistencia incluyen el ácido jasmónico, ácido salicílico y el ácido abscísico (Cerqueira *et al.*, 2017).

Hasta el momento no se conoce con certeza el mecanismo por el cual el fosfito de potasio puede inducir resistencia en plantas de clavel como método de defensa contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Sin embargo, los resultados expuestos en este trabajo de investigación sugieren que el uso de una disolución de fosfito de potasio, previo al desafío con el patógeno, puede llegar a producir una acumulación de metabolitos presentes en el metabolismo de carbohidratos y de algunos aminoácidos asociados a defensa mediada por RSA para las variedades 'Golem' y 'Mizuki'. En la siguiente etapa se estudiarán a nivel molecular algunas de las rutas que son de interés para el presente modelo y que, de acuerdo con los resultados del presente estudio, pueden estar asociadas a la activación de la resistencia inducida en el clavel por aplicación de fosfito de potasio

3.3 Etapa 3: Evaluación de los niveles transcripcionales de *p5cr* y *npr1*

La presente investigación se extendió hacia la evaluación de los niveles transcripcionales de genes seleccionados a partir de la información proporcionada por las variaciones de los perfiles metabólicos de las raíces del clavel bajo los tratamientos evaluados. Por tanto, esta sección presenta la evaluación de la expresión diferencial de los genes seleccionados durante los tratamientos estudiados, usando la técnica RT-qPCR con una aproximación relativa a genes de referencia, tal como lo indica Livak *et al.* (Livak and Schmittgen, 2001):

La selección de los genes se realizó analizando la información del análisis metabolómico previo, proponiendo aquellas rutas metabólicas que involucrarán metabolitos con importancia en respuesta de la planta para los tratamientos inoculados, elicitados y elicitados con posterior desafío con el patógeno, los cuales están relacionados en el apartado [3.2](#). Los genes codificantes para las proteínas escogidas se analizaron, en primera instancia, por medio de un análisis electroforético obtenido por RT-PCR, utilizando los pares de *primers* diseñados para los genes *npr1*, *p5cr*, *asnsyn*, y *galsyn* (sección [2.3.1](#)). Estos genes codifican proteínas involucradas en las rutas de algunos metabolitos de interés seleccionados dentro de este estudio. Dentro de estos, la proteína NPR1 se ha reportado ampliamente su papel en la inducción de RSA regulando el transcriptoma de defensa inducido por AS (Kumar *et al.*, 2022); La enzima P5CR, es una reductasa que reduce pirrolina-5-carboxilato a prolina siendo determinante en los niveles de este aminoácido (Ruszkowski *et al.*, 2015b). Por otro lado, la asparagina sintetasa (AsnSyn) promueve la síntesis de asparagina desde ácido aspártico (Pant and Yang, 2020) y, por último, la enzima galactinol sintasa (GalSyn) es una enzima necesaria para producir galactinol (dos Santos and Vieira, 2020)

En esta aproximación molecular, los genes a evaluar fueron seleccionados considerando criterios experimentales. En este sentido, se tuvo en cuenta la concordancia entre el tamaño del amplímero diseñado y el obtenido, la selectividad de la amplificación (presencia de una única banda) y la intensidad de los productos de PCR mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Si bien todos los genes son de interés para la presente investigación, para efectos de esta tesis, el estudio de los niveles transcripcionales se orientó hacia la evaluación de al menos dos de ellos. Para ello, se examinó la obtención de productos de amplificación esperados para los genes codificantes de las proteínas seleccionadas.

A.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

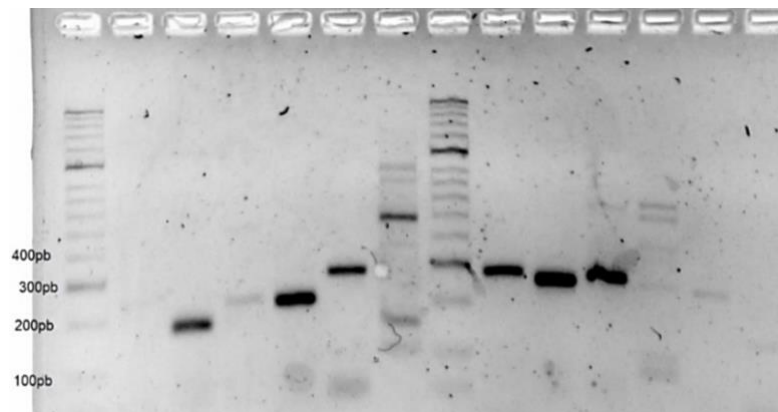
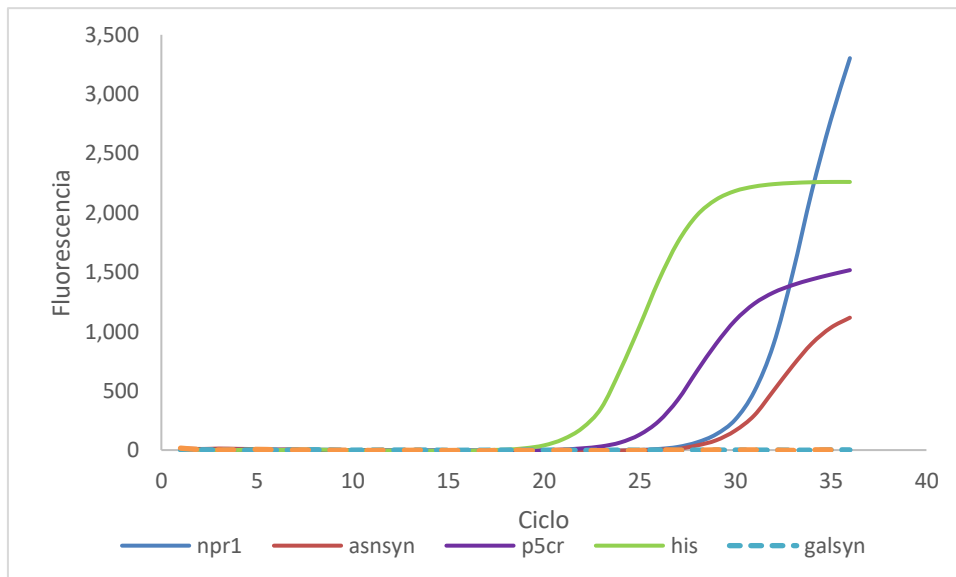


Figura 3.10 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR obtenidos usando cDNA de raíces de clavel de la variedad 'Mizuki'. Carril: 1 y 8 (marcador de peso molecular hyperlader II™ 2000 – 100 pb); 2, 3, 4 (*npr1.1-3*); 5, 6, 7 (*p5cr1-3*); 9, 10, 11(*asnsyn1-3*); 12, 13, 14 (*galsyn1-3*).

En la figura 3.10 se observa el análisis electroforético obtenido por RT-PCR utilizando los *primers* de la tabla 2.2, donde se obtuvieron productos específicos y del tamaño esperado para los genes codificantes para las proteínas NPR1.2; P5CR1,2 y AsnSyn1-3. Para los genes que codifican para la proteína GalSyn, se observan bandas de baja intensidad en los carriles 13 de la Figura 3.10. En este sentido, bajo los criterios anteriormente mencionados, se escogieron en este punto los genes de la Figura 3.10, los carriles 3 (*npr1.2*), 5 (*p5cr1*), 9 (*asnsyn1*) y 13 (*galsyn1*).

Con el objetivo de confirmar lo observado por medio del análisis electroforético, usando cDNA los *primers* seleccionados se analizaron por RT-qPCR, evaluando su amplificación y la posibilidad de formación de dímeros directamente de las curvas de fusión de los amplímeros. En la figura 3.11A se presentan los resultados obtenidos para la amplificación de los *primers* seleccionados que pueden ser estudiados a través de esta técnica; por su parte, la gráfica 3.11B ilustra las temperaturas de fusión (T_m) para los productos de PCR obtenidos a partir de las secuencias escogidas, entre 84 y 88°C, sin la presencia de inespecificidades, para los genes *npr1*, *asnsyn*, *p5cr* e *his*; este último como gen de referencia estudiado previamente en el grupo de investigación (Monroy-Mena *et al.*, 2019). Por otro lado, fue evidente que los genes codificantes para las enzimas GalSyn no amplificaron por medio de PCR en tiempo real, de este modo se prosiguió a calcular la eficiencia de aquellos genes candidatos por medio de PCR en tiempo real; sin embargo, a las condiciones de estudio solo fueron viables las expresiones de los genes *p5cr* y *npr1* (Anexo B)

A.**B.**

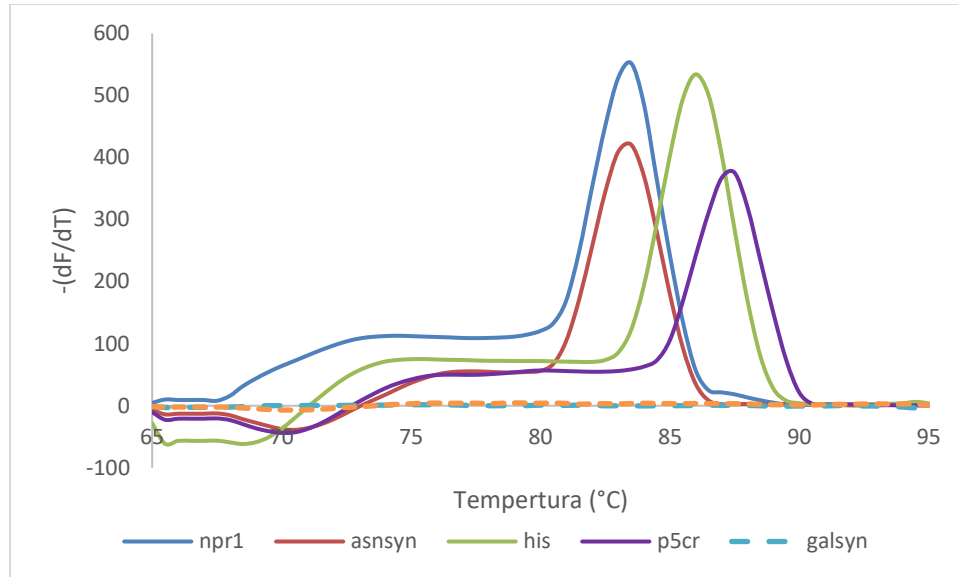


Figura 3.11 A. Verificación por RT-qPCR de la expresión de los genes. **B.** Curvas de fusión obtenidas correspondientes. *npr1* (azul), *asnsyn* (rojo), *his* (verde), *p5cr* (morado), *galsyn* (punteada azul) y *bcaa* (punteada naranja).

En consecuencia, en esta sección se presentan los niveles transcripcionales de genes codificantes para la proteína reguladora NPR1, componente importante en la señalización de defensa vegetal mediada por ácido salicílico (Vinod and Sabah, 2018) y la enzima P5CR, la cual permite convertir la pirrolina-5-carboxilato a prolina (Verslues and Sharma, 2010). Los estudios fueron llevados a cabo a las 0, 12, 24, 48 y 96 hpi en raíces de clavel usando una aproximación relativa a *his* y, además, empleando las respectivas relaciones matemáticas entre los valores de los tratamientos inoculado/control (I/C), elicitado/control (E/C) y elicitado inoculado/inoculado (EI/I), con el fin de evaluar los cambios que se presentan por efecto específico de la inoculación, elicitación y elicitación previa al desafío con el patógeno, respectivamente para las dos variedades. Estas relaciones matemáticas han sido empleadas en otros estudios del grupo para descontar el efecto de los controles y tener mayor claridad sobre la respuesta transcripcional objeto de estudio (Romero-Rincón *et al.*, 2021)

3.3.1 Pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR)

Como se aprecia en la Figura 1.8, la pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR) es la enzima final en el metabolismo de prolina y desencadena la biosíntesis de este aminoácido (Chen

et al., 2021). Estudios han reportado que existen dos vías de biosíntesis de prolina en plantas bajo estrés biótico y abiótico; dentro de la ruta del glutamato, el ácido glutámico es transformado por la pirrolina-5-carboxilato sintasa para formar glutamil semialdehído (GSA), ciclándose automáticamente a ácido 5-pirrolina carboxílico (P5C) y, por último, se reduce a prolina bajo la acción de P5CR. Homólogamente, la ornitina aminotransferasa (OAT) media la transaminación de ornitina a GSA/P5C (Chen *et al.*, 2021). La pirrolina-5-carboxilato se sintetiza en las mitocondrias durante el catabolismo de la prolina y, también se sintetiza en el citosol y el cloroplasto, partiendo del glutamato y convertido a prolina por la enzima pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR) (Qamar, Mysore and Senthil-Kumar, 2015).

Los niveles transcripcionales en la aproximación relativa a *his* para la enzima P5CR se muestran en la Figura 3.12 A-C. Con base en las gráficas de expresión relativa a *his*, se puede observar que la inoculación con *Fod* aumenta significativamente la expresión de *p5cr* a las 48 y 96 hpi para ambas variedades (Figura 3.12A), observándose un cambio importante en la tasa de expresión en la variedad 'Golem' a las 48 y 96 horas, siendo de 1.75 y 2.25 veces con respecto al control. Por otro lado, 'Mizuki', a las horas de estudio por efecto de la inoculación, mostró tendencia de regular la expresión de este gen. Por su parte, la Figura 3.12B muestra el efecto que tiene la elicitación en la expresión de *p5cr*, la cual tiene un efecto diferencial a lo largo del tiempo para la variedad susceptible. Si bien la expresión disminuye con respecto al control a tiempo cero, los valores a 12 y 24 horas son cercanos a la unidad. En 'Golem', los niveles transcripcionales disminuyen progresivamente, llegando a un nivel del 40% del valor inicial a las 96 hpi. De manera muy interesante, la elicitación y posterior presencia del patógeno generó un aumento significativo de la transcripción de este gen a las 48 y 96 hpi en el caso de la variedad resistente 'Golem', los valores tienden a la disminución a excepción de las 12 hpi donde se llega nuevamente al valor basal. Estos resultados evidencian que la elicitación favorece la transcripción del gen *p5cr* en presencia del patógeno para la variedad susceptible y sugieren que puede ser de los fenómenos claves en la inducción de resistencia; un aumento en los niveles de prolina, presumen una mayor capacidad de respuesta al estrés generado por el patógeno. Estudios previos han reportado que la infección con algunos patógenos induce la expresión de *p5cr*, demostrando ser una pieza clave para la respuesta de defensa provocando inmunidad activada por efectores (ETI) y respuesta hipersensible

(Monteoliva *et al.*, 2014). Asimismo, la inoculación de plantas de *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae* sobrerreguló los genes biosintéticos para la producción de prolina, particularmente *AtP5CS* y *AtP5CR*, demostrando que la expresión del gen estudiado estaría regulado bajo la infección por patógenos y afecta la resistencia de las plantas (Qamar and Senthil-Kumar, 2019).

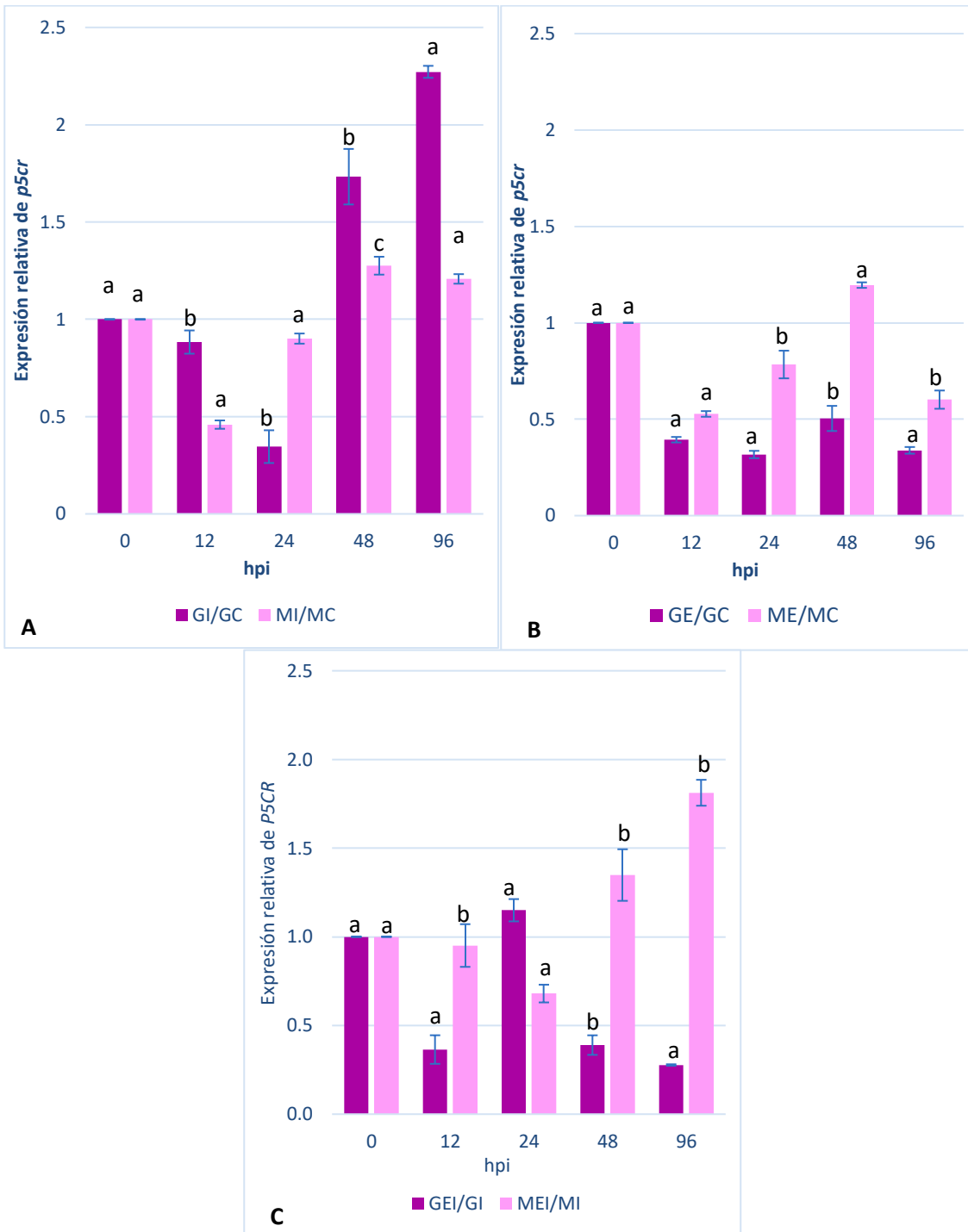


Figura 3.12 Relación en los niveles de transcripción de *p5cr* en raíces de clavel en dos variedades de clavel. 'Golem' (morado). 'Mizuki' (rosado). **A.** Tratamiento inoculado / tratamiento control (I/C). **B.** Tratamiento elicitado / Tratamiento control (E/I). **C.** Tratamiento elicitado inoculado / tratamiento inoculado (EI/I). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Específicamente para el clavel, es posible que la expresión de este gen durante la interacción genere el aumento de los niveles de proteína y, por tanto, la activación de la ruta de la biosíntesis de este aminoácido, lo cual coincide con los valores encontrados en el presente estudio, donde se evidenció la tendencia en el aumento de este metabolito por efecto del inductor y la inoculación. Es claro que el aumento descrito de la prolina, tal y como se citó previamente, puede ser respuesta a las condiciones de estrés hídrico y jugar un papel como osmolito. Sin embargo, se requieren de estudios adicionales que permitan determinar cómo el proceso de aplicación del inductor puede aumentar estos mecanismos de respuesta a este tipo de estrés y si dicho proceso se presenta únicamente en la variedad susceptible, donde las señales de estrés hídrico inician de manera temprana (Cuervo Plata, 2018). Así mismo, es necesario contrastar estos resultados con los niveles de proteína, pues los mecanismos de regulación postranscripcional pueden determinar finalmente la respuesta final.

3.3.2 Proteína no-expresora de genes relacionadas con la patogenicidad 1 (NPR1)

NPR1 es una proteína reguladora del transcriptoma de defensa la cual es inducida por el ácido salicílico como señal inmune de la planta. NPR1 es un homodímero con forma de ave que comprende un dominio de complejo amplio, y un dominio BTB (Dominio *Broad-complex*, *Tramtrack* y *Bric-à-brac*) (Figura 3.13) (Kumar *et al.*, 2022).

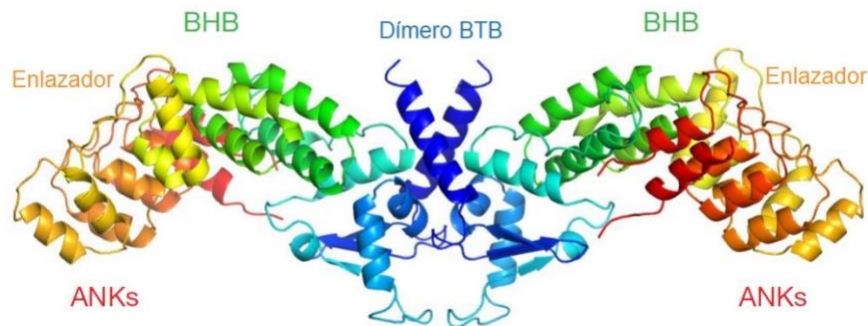
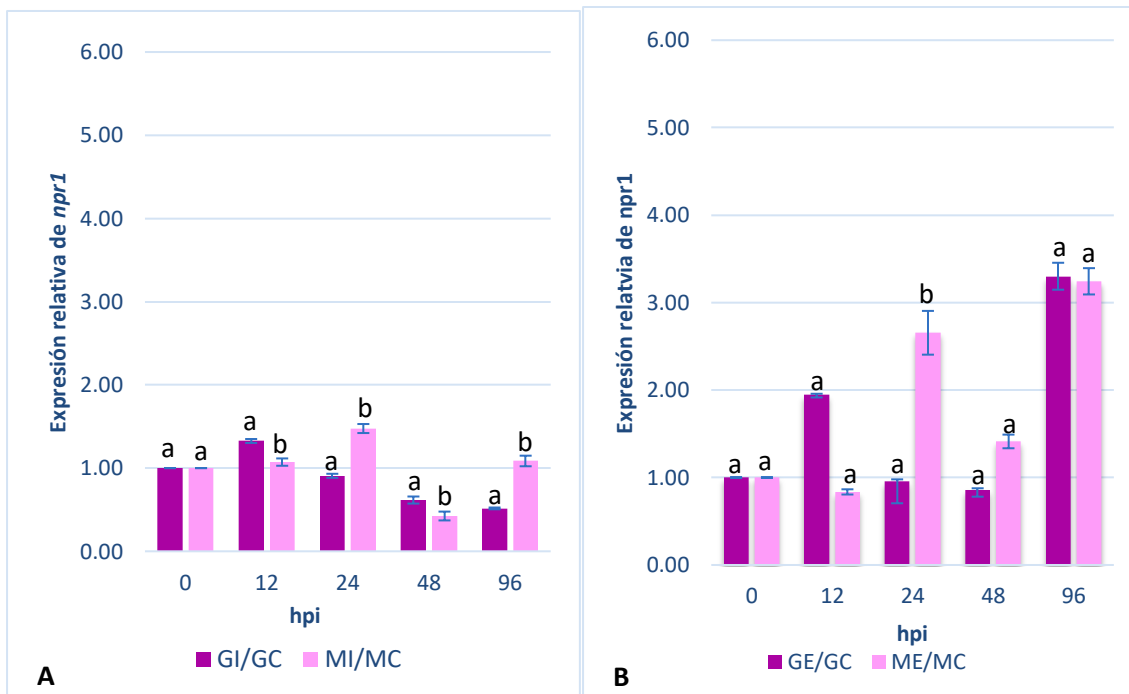


Figura 3.13 Diagrama del homodímero de NPR1. Tomado de (Kumar *et al.*, 2022)

El estudio en los niveles transcripcionales del gen *npr1* se presentan en la Figura 3.14 A-C. En las gráficas se aprecia una expresión diferencial dependiente de tratamiento, tiempo de análisis y variedad. Particularmente, el efecto de la inoculación (Figura 3.14A) permite apreciar una sobreexpresión del gen a las 12 h en la variedad resistente, pero en un curso temporal, se registró una disminución de su expresión. Esta observación es de interés puesto que la presencia del patógeno potencializa la expresión de *npr1* a tiempos tempranos. Del mismo modo, la variedad susceptible a *Fod*, tiene una sobreexpresión máxima de la expresión del gen a las 24 hpi, a las 48 horas disminuye la transcripción y, a las 96 hpi su expresión se ve ligeramente activada. En contraste a lo anterior, el uso de fosfito de potasio permite una regulación positiva en la expresión de *npr1*, obteniéndose diferencias significativas entre los tiempos de estudio. Es evidente que, a las 96 horas, el tratamiento con la disolución de fosfito de potasio induce una expresión significativamente mayor del gen con respecto a los otros tiempos de estudio. El tratamiento con el inductor de resistencia previo a la inoculación permitió una expresión del *npr1* en la mayoría de los tiempos estudiados para las dos variedades, siendo las 48 y 96 hpi los tiempos más importantes en la respuesta de defensa de la planta en la variedad susceptible y resistente, respectivamente. Indicando que la presencia del inductor genera la activación transcripcional del gen y, por tanto, activación probable de la RSA.



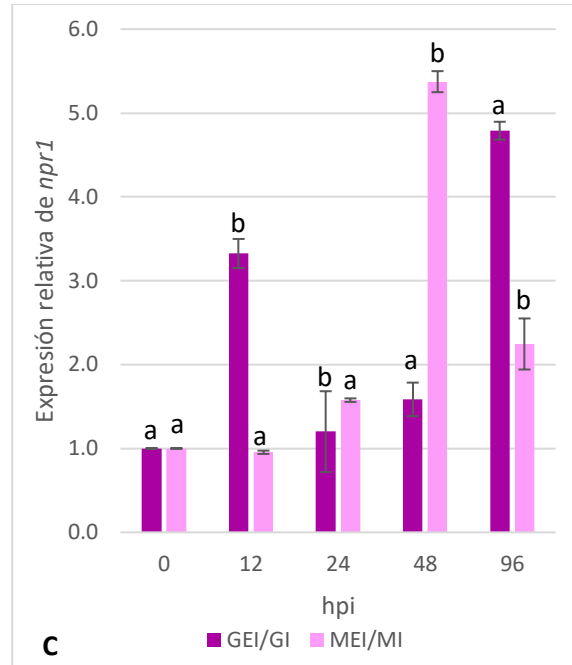


Figura 3.14 Relación en los niveles de transcripción de *npr1* en raíces de clavel en dos variedades de clavel. 'Golem' (morado). 'Mizuki' (rosado). **A.** Tratamiento inoculado / tratamiento control (I/C). **B.** Tratamiento elicitado / Tratamiento control (E/I). **C.** Tratamiento elicitado inoculado / tratamiento inoculado (EI/I). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

La activación de la RSA está asociada con el mayor nivel de expresión de las proteínas relacionadas con la patogénesis. En tal caso, la proteína no expresora de genes relacionadas con la patogénesis 1 (NPR1), es un componente importante en la señalización de ácido salicílico en *Arabidopsis*. Sin embargo, NPR1 proporciona un vínculo importante entre diferentes mecanismos de defensa que no son dependientes de AS, por lo tanto puede haber una comunicación cruzada con otras vías de señalización de defensa (Chaturvedi and Shah, 2007). NPR1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tipos de células y permanece mayormente inactiva en el citosol en forma oligomérica hasta que el huésped es infectado por un patógeno. Luego de la infección, la planta produce más AS y altera el potencial redox de la planta resultando en la generación de monómeros NPR1 biológicamente activos (Vinod and Sabah, 2018). Es posible que un mayor nivel de estas proteínas, por un aumento en la transcripción génica, permite tener una mayor cantidad de estructuras oligoméricas para potencializar la respuesta al patógeno

Los resultados obtenidos en esta investigación son comparables con otros estudios reportados. Por ejemplo, el tratamiento con fosfito de potasio asperjado sobre hojas de papa y posterior infección con *Phytophthora infestans*, permitió la expresión de *StNPR1*, factor de transcripción relacionado con la vía del AS, demostrando que el inductor puede llegar a preparar la planta para una respuesta más temprana y robusta frente a la infección y que el AS podría mediar esta respuesta (Machinandiarena *et al.*, 2012). Del mismo modo, estudios en el grupo de investigación determinaron que, a nivel de simplasto de raíz, se presenta una acumulación de ácido salicílico y salicilato de metilo a las 24 y 48 hpi, respectivamente, como efecto de la inoculación de plantas de clavel con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Vanegas, 2019).

De acuerdo con al presente estudio, el uso de fosfito de potasio induce mecanismos de defensa regulados por ácido salicílico y un aumento en los niveles transcripcionales del gen *npr1*; lo cual sugieren que el aumento en la resistencia frente a *Fod* está mediada por la documentada Resistencia Sistémica Adquirida (RSA). Esto es determinante para entender el papel de este inductor y proponer su uso en los cultivos comerciales de clavel.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos dentro de esta investigación son la primera aproximación metabolómica en la determinación del efecto de la aplicación de una disolución de fosfito de potasio en la interacción clavel (*Dianthus caryophyllus* L) – *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

El uso del inductor de resistencia de origen sintético potenció los mecanismos de defensa de la variedad 'Mizuki', susceptible al marchitamiento vascular, lo cual fue observable de manera fenotípica en la disminución de la severidad de la enfermedad de marchitamiento vascular causado por *Fod*. Estos hallazgos fueron reproducibles en los dos ensayos *in vivo* que se llevaron a cabo dentro de este estudio.

La inoculación tuvo como consecuencia la síntesis o acumulación de metabolitos presentes en el metabolismo de aminoácidos, ácidos orgánicos y carbohidratos, representando una respuesta del metabolismo energético asociada a la presencia del patógeno.

La elicitación con fosfito de potasio, por medio de *drench* sobre raíces de clavel, desencadenó la acumulación de ácido 5-(metiltio)salicílico, un derivado tiometilado del AS para las dos variedades de clavel contrastantes en su resistencia al marchitamiento vascular. Este hallazgo representa una parte fundamental en el entendimiento de la respuesta de defensa del clavel, pues otros estudios han reportado que los derivados de ácido salicílico pueden llegar a desencadenar RSA.

La acumulación de los metabolitos por efecto del patógeno, entre variedades, fueron diferenciales, pues la variedad 'Golem' (R) posee una reprogramación celular global hacia la defensa mediada por vías de acumulación de energía; mientras que la respuesta de la variedad susceptible permite reconocer el metabolismo de glutamina y asparagina, representando el transporte de nitrógeno dentro de la planta.

Dos metabolitos que mostraron ser estadísticamente relevantes entre tratamientos de inoculación y elicitación fueron la prolina y el ácido 5-(metiltio)salicílico. Debido a su conocida participación en roles de defensa vegetal de ellos o sus precursores, el estudio

se extendió hacia una tercera etapa orientada a la evaluación de los niveles transcripcionales de los genes codificantes para las proteínas pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR) y proteína no expresora de genes relacionados con patogenia (NPR1). Para esta etapa del estudio, la evaluación de los niveles transcripcionales de *p5cr* y *npr1* reveló que el uso de fosfito de potasio en las raíces de clavel potencia la expresión de *p5cr* y *npr1*, actuando como inductor positivo.

En aquellas plantas que se trataron con fosfito de potasio se observó una inducción del gen *p5cr*. Estos resultados permiten indicar que el uso de fosfito de potasio por el método de *drench* inducen la expresión de *p5cr*, el cual se puede modular a horas tardías de estudio sugiriendo que cumple un papel de defensa en clavel frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Por su parte, la elicitación indujo la expresión de *npr1*, donde los máximos de expresión se observaron a las 96 hpi para las dos variedades estudiadas. Por lo tanto, es posible indicar que la expresión de este gen es clave para la activación de defensa vegetal mediada por RSA, lo cual coincide con la literatura referenciada.

La acumulación de los metabolitos diferenciales y la modulación de los niveles transcripcionales de *p5cr* y *npr1*, por efecto de una disolución de fosfito de potasio por el método de *drench* en raíces de clavel, evidencian que esta sal afecta significativamente los mecanismos de defensa contra el patógeno. Sin embargo, se requieren realizar más estudios que permitan comprender el modo de acción de esta regulación y profundizar en la maquinaria que conlleva a los mecanismos de defensa de clavel contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

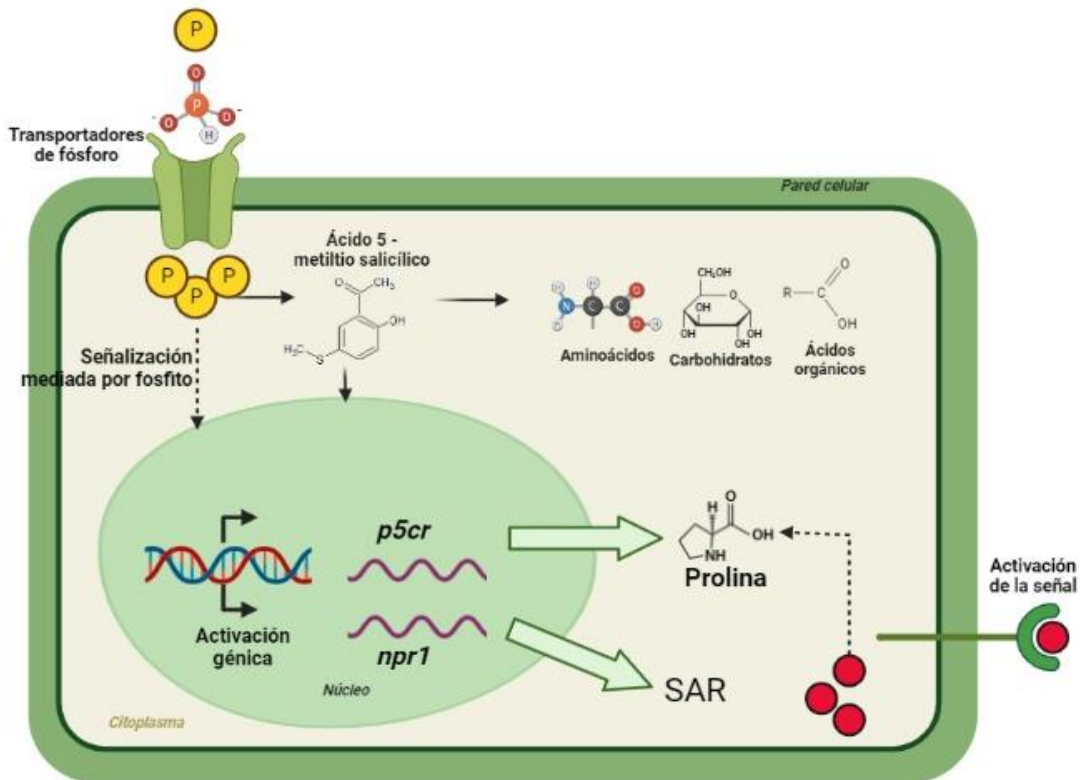


Figura 4.1 Modelos propuesto a partir de los resultados metabolómicos y transcripcionales de la interacción con *Fod* de la variedad 'Mizuki' después del proceso de elicitación

La presente investigación representa el primer trabajo, a nivel metabolómico, realizado en raíz de clavel, sobre el efecto del uso de un inductor de resistencia de origen sintético, el cual permitió realizar una primera aproximación de manera importante en el conocimiento de los mecanismos que puedan estar relacionados con el aumento de la resistencia en la variedad susceptible al marchitamiento vascular causado por *Fod*. La Figura 4.1 es una representación gráfica del efecto de la aplicación de fosfito de potasio en la biosíntesis de metabolitos durante la interacción que tiene la variedad de clavel susceptible contra *Fod*. Luego de haber aplicado la disolución de fosfito de potasio en las raíces de clavel por el método de *drench*, se desencadena una señalización que prepara a la planta para el desafío contra el patógeno. El fosfito entra a la célula por medio de transportadores de fósforo (Achary *et al.*, 2017), iniciando la acumulación de algunos aminoácidos (leucina y glutamina), carbohidratos (xilitol, galactinol y turanosa) y ácidos orgánicos (ácido 5-(metiltio)salicílico). Particularmente, durante la producción del derivado de AS, se promueve la síntesis de la proteína NPR1, la cual es un marcador de defensa vegetal

mediada por RSA. El uso del inductor de resistencia también potencializa la expresión de *p5cr*, generando un posible aumento en la síntesis de prolina.

5. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta la primera aproximación a nivel metabólico, se recomienda estudiar a nivel transcripcional otro grupo de genes que puedan estar involucrados en la defensa vegetal por efecto del fosfito de potasio, para poder confirmar la sobrerregulación de los metabolitos diferenciales.

Con el fin de determinar la traslocación del fosfito de potasio, se recomienda medir la concentración de este anión en órganos de la planta locales y distales.

Se sugiere realizar evaluaciones del efecto de la disolución de fosfito de potasio sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Se recomienda estudiar el efecto a nivel fenotípico del uso del inductor de resistencia en campo para esclarecer la reproducibilidad de los resultados obtenidos dentro de este trabajo de investigación.

A. Anexo: Presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en tratamientos inoculados

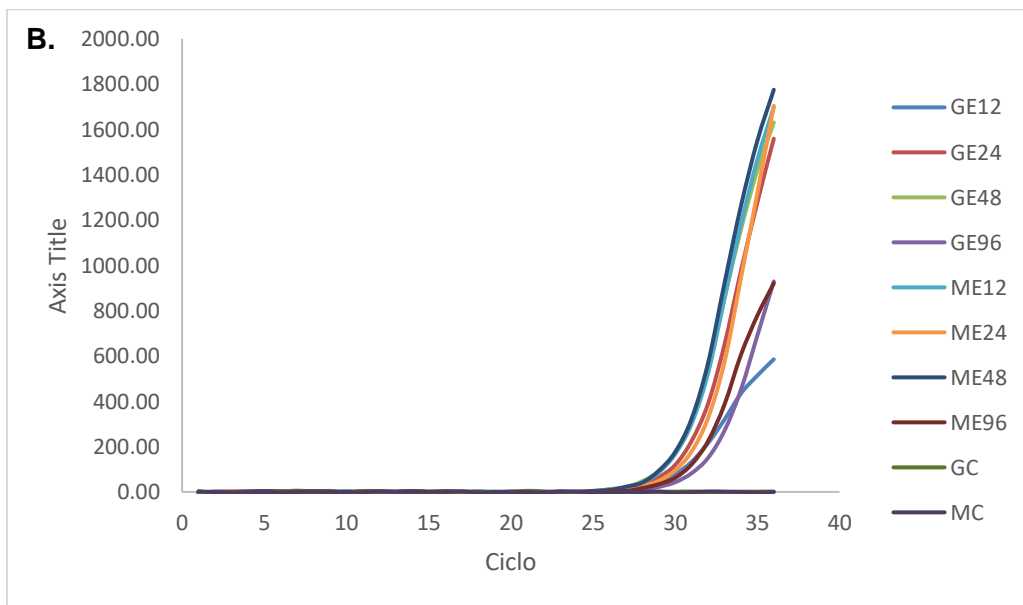
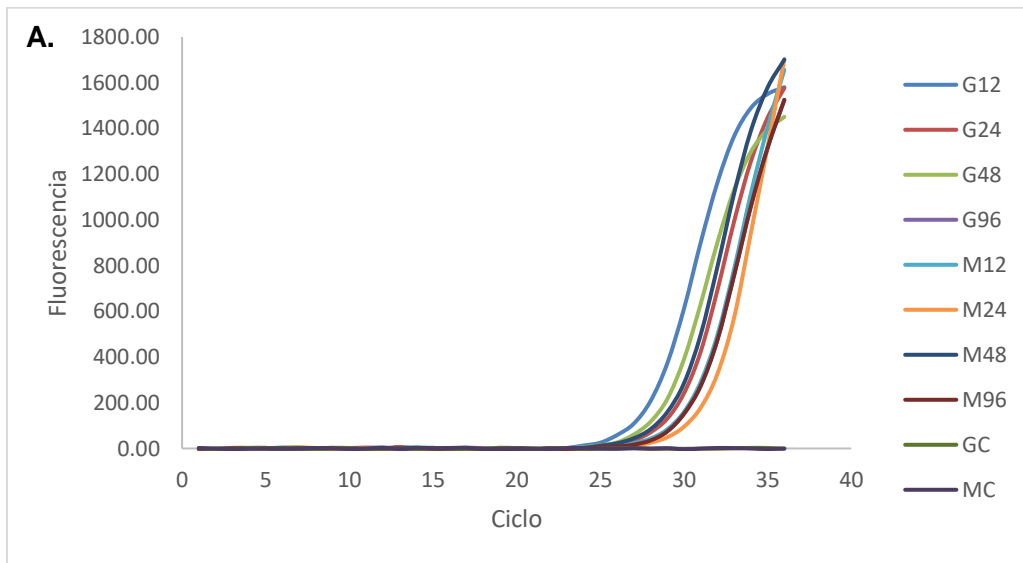


Figura 5.1 Verificación por RT-qPCR de la expresión de tub para los tratamientos inoculados. **A.** Tratamiento inoculado. **B.** Tratamiento elicitado inoculado

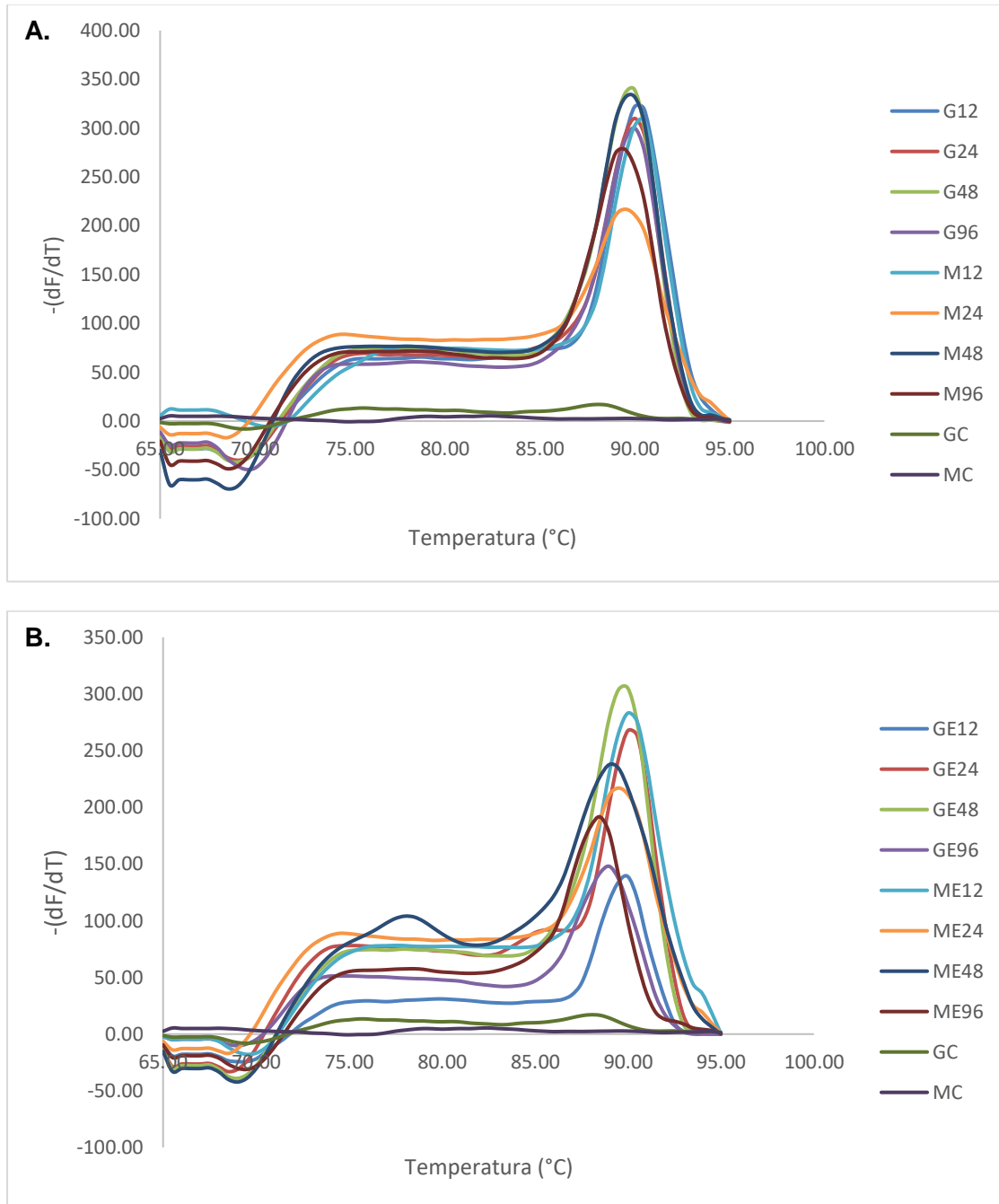


Figura 5.2 Curvas de fusión obtenidas correspondientes. **A.** Tratamiento inoculado. **B.** Tratamiento elicitado inoculado

B. Anexo: Eficiencia de reacción para los genes evaluados

Tabla 5.1 Eficiencia de reacción para los genes *p5cr*, *npr1*, *his* y *tub*

Gen	Eficiencia
<i>p5cr</i>	2.25
<i>npr1</i>	2.15
<i>His</i>	2.07
<i>Tub</i>	2.12

Bibliografía

Abu-Nada, Y. *et al.* (2007) 'Temporal dynamics of pathogenesis-related metabolites and their plausible pathways of induction in potato leaves following inoculation with *Phytophthora infestans*', *European Journal of Plant Pathology*, 118(4), pp. 375–391. doi: 10.1007/s10658-007-9150-8.

Achary, V. M. M. *et al.* (2017) 'Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control', *Plant Biotechnology Journal*, 15(12), pp. 1493–1508. doi: 10.1111/pbi.12803.

Agulló-Antón, M. ángeles *et al.* (2013) 'Evaluation of ploidy level and endoreduplication in carnation (*Dianthus spp.*)', *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd, 201–202(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.11.006.

Aharoni, A. and Galili, G. (2011) 'Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 22(2), pp. 239–244. doi: 10.1016/j.copbio.2010.11.004.

Akashi, K., Miyake, C. and Yokota, A. (2001) 'Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger', *FEBS Letters*, 508(3), pp. 438–442. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03123-4.

Amir, R., Hacham, Y. and Galili, G. (2002) 'Cystathionine γ -synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants', *Trends in Plant Science*. Elsevier Current Trends, 7(4), pp. 153–156. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02227-6.

Arbeláez, G. (1993) 'Las enfermedades vasculares del clavel en Colombia y en el mundo', *Agronomía Colombiana*, 10(1), pp. 12–18.

Ardila, H. (2013) *Contribución al estudio de algunos mecanismos bioquímicos y moleculares de la resistencia del clavel a *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* raza 2*, Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

Ardila, H. D. *et al.* (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*. Academic Press, 85, pp. 42–52. doi: 10.1016/J.PMPP.2014.01.003.

Ardila, H. D., Martínez, S. T. and 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*. Polish Academy of Sciences, Institute of Slavic Studies, 35(4), pp. 1233–1245. doi: 10.1007/S11738-012-1162-0/METRICS.

Arruda, P. and Barreto, P. (2020) 'Lysine Catabolism Through the Saccharopine Pathway: Enzymes and Intermediates Involved in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stress', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media SA, 11. doi: 10.3389/FPLS.2020.00587.

Ashraf, M. and Harris, P. J. C. (2004) 'Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants', *Plant Science*, 166(1), pp. 3–16. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.024.

Ávalos, A. and Elena, G. (1998) 'Metabolismo secundario de plantas', *Hidrobiológica*, 8(2), pp. 125–132.

Baenas, N., García-Viguera, C. and Moreno, D. A. (2014) 'molecules Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods', *Molecules*, 19, pp. 13541–13563. doi: 10.3390/molecules190913541.

Belhadj, A. *et al.* (2006) 'Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 54(24), pp. 9119–9125. doi: 10.1021/jf0618022.

Bender, D. A. *et al.* (2023) 'CAPÍTULO 20: La vía de la pentosa fosfato y otras vías del metabolismo de hexosas', in *Bioquímica ilustrada*, pp. 1–12.

Bernsdorff, F. *et al.* (2016) 'Pipelicolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and -independent pathways', *Plant Cell*, 28(1), pp. 102–129. doi: 10.1105/tpc.15.00496.

Bilska, K. *et al.* (2018) 'Resistance-Related L-Pyrroglutamic Acid Affects the Biosynthesis of Trichothecenes and Phenylpropanoids by *F. graminearum* Sensu Stricto', *Toxins 2018, Vol. 10, Page 492*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 10(12), p. 492. doi:

10.3390/TOXINS10120492.

Bolton, M. D. (2009) 'Current review: Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), pp. 487–497. doi: 10.1094/MPMI-22-5-0487.

Bönnighausen, J. *et al.* (2019) 'Metabolic profiling of wheat rachis node infection by *Fusarium graminearum* – decoding deoxynivalenol-dependent susceptibility', *New Phytologist*, 221(1), pp. 459–469. doi: 10.1111/nph.15377.

Boubakri, H. (2020) *Induced resistance to biotic stress in plants by natural compounds: Possible mechanisms, Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-817892-8.00005-2.

Brodmann, D. *et al.* (2002) 'Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(7), pp. 693–700. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.7.693.

Castiblanco, N. F. (2023) *EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE INDUCTORES DE RESISTENCIA EN EL CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L) SOBRE LA EXPRESIÓN *in vivo* DE GENES CODIFICANTES PARA CANDIDATOS A FACTORES DE VIRULENCIA DEL PATÓGENO *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi**. Universidad Nacional de Colombia.

Cerqueira, A. *et al.* (2017) 'Phosphite shifts physiological and hormonal profile of Monterey pine and delays *Fusarium circinatum* progression', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 114, pp. 88–99. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.02.020.

Cevallos, J. F., González, D. and Arbelaez, G. (1990) 'Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en clavel en la sabana de bogotá'. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Centro Editorial, 7, pp. 40–46. Available at: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/33839> (Accessed: 25 January 2023).

Chaturvedi, R. and Shah, J. (2007) 'Salicylic acid in plant disease resistance', *Salicylic Acid: A Plant Hormone*, (Figure 1), pp. 335–370. doi: 10.1007/1-4020-5184-0_12.

Chen, C. *et al.* (2021) 'Expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) gene

from the wild grapevine *Vitis yeshanensis* promotes drought resistance in transgenic *Arabidopsis*', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 168(June), pp. 188–201. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.10.004.

Chen, L. *et al.* (2019) 'Methyl salicylate glucosylation regulates plant defense signaling and systemic acquired resistance', *Plant Physiology*, 180(4), pp. 2167–2181. doi: 10.1104/pp.19.00091.

Cho, S. M. *et al.* (2010) 'Jasmonate-dependent expression of a galactinol synthase gene is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*', *Botany*, 88(5), pp. 452–461. doi: 10.1139/B10-009.

Chroumpi, T. *et al.* (2021) 'Revisiting a "simple" fungal metabolic pathway reveals redundancy, complexity and diversity', *Microbial Biotechnology*. John Wiley and Sons Ltd, 14(6), pp. 2525–2537. doi: 10.1111/1751-7915.13790.

Corredor-Moreno, P. *et al.* (2021) 'The branched-chain amino acid aminotransferase TaBCAT1 modulates amino acid metabolism and positively regulates wheat rust susceptibility', *Plant Cell*, 33(5), pp. 1728–1747. doi: 10.1093/plcell/koab049.

Crawford, N. M. (2006) 'Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants', *Journal of Experimental Botany*, 57(3), pp. 471–478. doi: 10.1093/jxb/erj050.

Cuervo Plata, D. C. (2018) '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*', *Tesis de Maestría*, p. 192.

Dangl, J. L. and Jones, J. D. G. (2001) 'Plant pathogens and integrated defence responses to infection', *Nature*, 411(6839), pp. 826–833. doi: 10.1038/35081161.

Daniel, R. and Guest, D. (2006) 'Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3–5), pp. 194–201. doi: 10.1016/j.pmpp.2006.01.003.

Demers, J. (2020) 'The Biology of *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation)', (February).

Dempsey, D. A. *et al.* (2011) 'Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism', *The Arabidopsis*

Book, 9(9), p. e0156. doi: 10.1199/tab.0156.

Dong, X. (2004) 'NPR1, all things considered', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Current Trends, 7(5), pp. 547–552. doi: 10.1016/J.PBI.2004.07.005.

Van Den Dool, H. and Kratz, P. (1963) 'A GENERALIZATION OF THE RETENTION INDEX SYSTEM INCLUDING LINEAR TEMPERATURE PROGRAMMED GAS-LIQUID PARTITION CHROMATOGRAPHY', *Journal of Chromatography*, pp. 463–471. doi: 10.1007/978-3-319-70262-9_7.

Drew, S. W. and Demain, A. L. (1977) 'Effect of primary metabolites on secondary metabolism.', *Annual review of microbiology*, 31, pp. 343–356. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.002015.

Edel-Hermann, V. and Lecomte, C. (2019) 'Current status of fusarium oxysporum formae speciales and races', *Phytopathology*. American Phytopathological Society, 109(4), pp. 512–530. doi: 10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-08-18-0320-RVW_T3.JPEG.

Elmer, W. H. and Pignatello, J. J. (2011) 'Effect of biochar amendments on mycorrhizal associations and Fusarium crown and root rot of asparagus in replant soils', *Plant Disease*, 95(8), pp. 960–966. doi: 10.1094/PDIS-10-10-0741.

Eshraghi, L. *et al.* (2011) 'Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in Arabidopsis thaliana infected with Phytophthora cinnamomi', *Plant Pathology*, 60(6), pp. 1086–1095. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02471.x.

Estrada-Ortiz, E. *et al.* (2012) 'Phosphite on growth and fruit quality in strawberry', *Acta Horticulturae*, 947, pp. 277–282. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.947.35.

Estrada Rudas, C. (2022) *Flores colombianas generan 200.000 empleos y son exportadas a más de 100 países*. Available at: <https://www.agronegocios.co/agricultura/flores-colombianas-generan-200-000-empleos-y-son-exportadas-a-mas-de-100-paises-3425195>.

Fabro, G. *et al.* (2004) 'Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis', *Molecular Plant-Microbe*

Interactions, 17(4), pp. 343–350. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.4.343.

Fiehn, O. (2002) 'Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes', *Plant Molecular Biology*, 48(1–2), pp. 155–171. doi: 10.1023/A:1013713905833.

Flor, H. H. (1971) 'Current status of the gene-for-gene concept', pp. 275–296.

Förster, H. *et al.* (1998) 'Effect of Phosphite on Tomato and Pepper Plants and on Susceptibility of Pepper to Phytophthora Root and Crown Rot in Hydroponic Culture', (D).

Galili, G. *et al.* (2001) 'Lysine catabolism: A stress and development super-regulated metabolic pathway', *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), pp. 261–266. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00170-9.

Gao, X. *et al.* (2018) 'Metabolomics Profile of Potato Tubers after Phosphite Treatment', *American Journal of Plant Sciences*, 09(04), pp. 845–864. doi: 10.4236/ajps.2018.94065.

Gashaw, G., Alemu, T. and Tesfaye, K. (2014) 'Evaluation of disease incidence and severity and yield loss of finger millet varieties and mycelial growth inhibition of *Pyricularia grisea* isolates using biological antagonists and fungicides in vitro condition .', *Journal of Applied Biosciences*, 73, pp. 5883–5901.

Gerszten, R. E. and Wang, T. J. (2008) 'The search for new cardiovascular biomarkers', *Nature*, 451(7181), pp. 949–952. doi: 10.1038/nature06802.

Gilardi, G. *et al.* (2020) 'Effect of biocontrol agents and potassium phosphite against *Phytophthora crown rot*, caused by *Phytophthora capsici*, on zucchini in a closed soilless system', *Scientia Horticulturae*, 265(December 2019). doi: 10.1016/j.scienta.2020.109207.

Gillaspy, G. . (2011) 'The cellular language of myo-inositol signaling', *New Phytologist*, 192(4), pp. 823–839. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03939.x>.

Gómez-Merino, F. C. and Trejo-Téllez, L. I. (2015) 'Biostimulant activity of phosphite in horticulture', *Scientia Horticulturae*, 196, pp. 82–90. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.035.

Gómez, S. *et al.* (2010) 'Methyl jasmonate elicits rapid changes in carbon and nitrogen dynamics in tomato', *New Phytologist*, 188(3), pp. 835–844. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03414.x.

González, E. (2015) 'Agentes bióticos y abióticos como inductores de resistencia a enfermedades en el cultivo de papa', *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*, (3), pp. 373–379.

Gordon, T. R. and Martyn, R. D. (1997) 'The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*', *Annual Review of Phytopathology*, 35(August), pp. 111–128. doi: 10.1146/annurev.phyto.35.1.111.

Gunning, T. K. *et al.* (2013) 'Profiling of secondary metabolites in blue lupin inoculated with *Phytophthora cinnamomi* following phosphite treatment', *Functional Plant Biology*, 40(11), pp. 1089–1097. doi: 10.1071/FP13023.

Halket, J. M. and Zaikin, V. G. (2003) 'Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation', *European Journal of Mass Spectrometry*, 9(1), pp. 1–21. doi: 10.1255/ejms.527.

Han, D. J., Lee, B. H. and Yoo, S. H. (2021) 'Physicochemical properties of turanose and its potential applications as a sucrose substitute', *Food Science and Biotechnology*. The Korean Society of Food Science and Technology, 30(3), pp. 433–441. doi: 10.1007/S10068-021-00876-1/METRICS.

Han, X. *et al.* (2021) 'Effects of phosphite as a plant biostimulant on metabolism and stress response for better plant performance in *Solanum tuberosum*', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 210, p. 111873. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111873.

Hartmann, M. and Zeier, J. (2018) 'l-lysine metabolism to N-hydroxypipicolinic acid: an integral immune-activating pathway in plants', *Plant Journal*, 96(1), pp. 5–21. doi: 10.1111/tpj.14037.

Hayat, Q. *et al.* (2010) 'Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review', *Environmental and Experimental Botany*, pp. 14–25. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.08.005.

Henry, E. *et al.* (2015) 'Beyond Glycolysis: GAPDHs Are Multi-functional Enzymes Involved in Regulation of ROS, Autophagy, and Plant Immune Responses', *PLoS Genetics*, 11(4), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.pgen.1005199.

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*.', *Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.*, p. 2001.

Horning, M. G., Moss, A. M. and Horning, E. C. (1968) 'Formation and gas-liquid chromatographic behavior of isometric steroid ketone methoxime derivatives', *Analytical Biochemistry*. Academic Press, 22(2), pp. 284–294. doi: 10.1016/0003-2697(68)90318-7.

Hwang, I. S., An, S. H. and Hwang, B. K. (2011) 'Pepper asparagine synthetase 1 (CaAS1) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens', *Plant Journal*, 67(5), pp. 749–762. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04622.x.

Iturriaga, G., Suárez, R. and Nova-Franco, B. (2009) 'Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling', *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), pp. 3793–3810. doi: 10.3390/ijms10093793.

Iula, G. *et al.* (2022) 'The Complex Metabolomics Crosstalk Triggered by Four Molecular Elicitors in Tomato', *Plants*, 11(5). doi: 10.3390/plants11050678.

Jackson, T. J. *et al.* (2000) 'Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*', *Plant Pathology*, 49(1), pp. 147–154. doi: 10.1046/j.1365-3059.2000.00422.x.

Janeczko, A. *et al.* (2013) 'Progesterone moderates damage in *Arabidopsis thaliana* caused by infection with *Pseudomonas syringae* or *P. fluorescens*', *Biologia plantarum*. *Biologia plantarum*, 57(1), pp. 169–173. doi: 10.1007/s10535-012-0142-y.

Jangir, P. *et al.* (2021) 'Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*', *Frontiers in Plant Science*, 12(April), pp. 1–17. doi: 10.3389/fpls.2021.628611.

Jones, J.D.G., D. J. L. (2006) 'The plant immune system', *Nature*, 444, pp. 323–329.

Joshi, V. *et al.* (2010) 'Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: Accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress', *Amino Acids*, 39(4), pp. 933–947. doi: 10.1007/s00726-010-0505-7.

Joshi, V. and Fernie, A. R. (2017) 'Citrulline metabolism in plants', *Amino Acids*. Springer

Vienna, 49(9), pp. 1543–1559. doi: 10.1007/s00726-017-2468-4.

Kale, S. D. *et al.* (2010) 'External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells', *Cell*. Elsevier Inc., 142(2), pp. 284–295. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.008.

Klessig, D. F., Choi, H. W. and Dempsey, D. A. (2018) 'Systemic acquired resistance and salicylic acid: Past, present, and future', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(9), pp. 871–888. doi: 10.1094/MPMI-03-18-0067-CR.

Kruger, N. J. and Von Schaewen, A. (2003) 'The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation', *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), pp. 236–246. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00039-6.

Kumar, S. *et al.* (2022) 'Structural basis of NPR1 in activating plant immunity', *Nature*. Springer US, 605(7910), pp. 561–566. doi: 10.1038/s41586-022-04699-w.

Kumar, Y. *et al.* (2015) 'Metabolic profiling of chickpea-Fusarium interaction identifies differential modulation of disease resistance pathways', *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, 116(1), pp. 120–129. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.04.001.

Landscape Management (2016) *Step by Step: Apply a soil drench to trees : Landscape Management*. Available at: <https://www.landscapemanagement.net/step-by-step-apply-a-soil-drench-to-trees/> (Accessed: 3 February 2023).

Lefevre, H., Bauters, L. and Gheysen, G. (2020) 'Salicylic Acid Biosynthesis in Plants', *Frontiers in Plant Science*, 11(April), pp. 1–7. doi: 10.3389/fpls.2020.00338.

Li, H. *et al.* (2022) 'The Role of Plant Progesterone in Regulating Growth , Development , and Biotic / Abiotic Stress Responses'.

Lim, S. (2012) *Analysis of Changes in the Potato Leaf Proteome Triggered by Phosphite Reveals Functions Associated with Induced Resistance Against Phytophthora infestans*. Dalhousie University. Available at: <https://dalspace.library.dal.ca/handle/10222/15859> (Accessed: 26 January 2023).

Lim, S. *et al.* (2013) *Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato*

leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against Phytophthora infestans, *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jprot.2013.03.010.

Lindemann, P. and Luckner, M. (1997) 'Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*', *Phytochemistry*. Pergamon, 46(3), pp. 507–513. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00315-4.

Liu, Y. *et al.* (2020) 'Diverse Roles of the Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Plant Immunity', *The Plant Cell*. Oxford Academic, 32(12), pp. 4002–4016. doi: 10.1105/TPC.20.00499.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lobato, M. C. *et al.* (2008) 'Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage', *European Journal of Plant Pathology*, 122(3), pp. 349–358. doi: 10.1007/s10658-008-9299-9.

López-Gresa, M. P. *et al.* (2019) 'Effect of Benzothiadiazole on the Metabolome of Tomato Plants Infected by Citrus Exocortis Viroid', *Viruses* 2019, Vol. 11, Page 437. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 11(5), p. 437. doi: 10.3390/V11050437.

Louis, J., Singh, V. and Shah, J. (2013) 'Arabidopsis thaliana—Myzus persicae interaction: shaping the understanding of plant defense against phloem-feeding aphids', *Frontiers in Plant Science*, 4. doi: 10.1199/tab.0159.

Lovatt, B. C. J. and Mikkelsen, R. L. (2006) 'Phosphite Fertilizers: What Are They? Can You Use Them? What Can They Do?', *Better Crops*, 90(4), pp. 11–13.

Machinandiarena, M. F. *et al.* (2012) 'Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*', *Journal of Plant Physiology*, 169(14), pp. 1417–1424. doi: 10.1016/j.jplph.2012.05.005.

MacIntyre, A. M. *et al.* (2022) *Trehalose increases tomato drought tolerance, induces defenses, and increases resistance to bacterial wilt disease*, *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0266254.

Martínez, A. (2019) 'Contribución al estudio de los fenómenos bioquímicos y moleculares del apoplasto de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*'. Available at: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77033> (Accessed: 26 January 2023).

Massoud, K. *et al.* (2012) 'Dissecting Phosphite-induced priming in *Arabidopsis* infected with *Hyaloperonospora Arabidopsisidis*', *Plant Physiology*, 159(1), pp. 286–298. doi: 10.1104/pp.112.194647.

Meng, J. *et al.* (2022) 'Xylitol production from plant biomass by *Aspergillus niger* through metabolic engineering', *Bioresource Technology*. Elsevier, 344, p. 126199. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.126199.

Mohammadi, M. A. *et al.* (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), pp. 4499–4514. Available at: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1702_44994514.

Mohammadi, M. A. *et al.* (2021) 'ROS and Oxidative Response Systems in Plants Under Biotic and Abiotic Stresses: Revisiting the Crucial Role of Phosphite Triggered Plants Defense Response', *Frontiers in Microbiology*, 12(July), pp. 1–21. doi: 10.3389/fmicb.2021.631318.

Monroy-Mena, S. (2019) *EFEECTO DE ELICITORES DE ORIGEN BIÓTICO EN LA TRANSCRIPCIÓN DE ALGUNOS GENES INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL CLAVEL *Dianthus caryophyllus* L. AL PATÓGENO *Fusarium oxysporum* f sp *dianthi**. Available at: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77930>.

Monroy-Mena, S. *et al.* (2019) 'Selección de genes de referencia para análisis transcripcionales en el modelo clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*', *Revista Colombiana de Química*. Universidad Nacional de Colombia, 48(2), pp. 5–14. doi: 10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.72771.

Monteoliva, M. I. *et al.* (2014) 'Context of action of Proline Dehydrogenase (ProDH) in the Hypersensitive Response of *Arabidopsis*', *BMC Plant Biology*. BioMed Central, 14(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2229-14-21/FIGURES/4.

Naik, P. M. and Al-Khayri, J. M. (2016) 'Abiotic and Biotic Elicitors—Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants', *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. doi: 10.5772/61442.

Návarová, H. *et al.* (2013) 'Pipelicolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity', *Plant Cell*, 24(12), pp. 5123–5141. doi: 10.1105/tpc.112.103564.

Nguyen, T. D. and O'Connor, S. E. (2020) 'The Progesterone 5 β -Reductase/Iridoid Synthase Family: A Catalytic Reservoir for Specialized Metabolism across Land Plants', *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society, 15(7), pp. 1780–1787. doi: 10.1021/ACSCHEMBIO.0C00220/ASSET/IMAGES/LARGE/CB0C00220_0003.JPEG.

Olivieri, F. P. *et al.* (2012) 'Phosphite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm and cortex that enhance resistance to pathogens', *Crop Protection*. Elsevier Ltd, 32, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.cropro.2011.08.025.

Osei, R. *et al.* (2021) 'Role of Salicylic Acid in Plants Defense Mechanisms Against Pathogens', 4(6).

Otero, D. M. *et al.* (2021) 'Leaves of *Olea europaea* L. as a source of oleuropein: characteristics and biological aspects', *Research, Society and Development*. Research, Society and Development, 10(13), pp. e185101321130–e185101321130. doi: 10.33448/RSD-V10I13.21130.

Pant, A. and Yang, Z. (2020) 'Asparagine: An Achilles Heel of Virus Replication?', *ACS Infectious Diseases*. American Chemical Society, 6(9), pp. 2301–2303. doi: 10.1021/ACSINFECDIS.0C00504/ASSET/IMAGES/LARGE/ID0C00504_0001.JPEG.

Paraschivu, M. *et al.* (2013) 'The use of the area under the disease progress curve (AUDPC) to assess the epidemics of septoria tritici in winter wheat', 45(1), pp. 193–201.

Parisutham, V. *et al.* (2017) 'Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries', *Bioresource Technology*, 239, pp. 496–506. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.001.

Paul, M. J. *et al.* (2008) 'Trehalose metabolism and signaling', *Annual Review of Plant*

Biology, 59, pp. 417–441. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092945.

Paul, M., Pellny, T. and Goddijn, O. (2001) 'Enhancing photosynthesis with sugar signals', *Trends in Plant Science*. Elsevier, 6(5), pp. 197–200. doi: 10.1016/S1360-1385(01)01920-3.

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

Pieterse, C. M. J. and Van Loon, L. C. (2004) 'NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Current Trends, 7(4), pp. 456–464. doi: 10.1016/J.PBI.2004.05.006.

Poli, A. *et al.* (2013) 'Characterization and identification of Colombian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*', *Journal of Plant Pathology*, 95(2), pp. 255–263. doi: 10.4454/JPP.V95I2.024.

Qamar, A., Mysore, K. S. and Senthil-Kumar, M. (2015) 'Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens', *Frontiers in Plant Science*, 6(JULY), pp. 1–9. doi: 10.3389/fpls.2015.00503.

Qamar, A. and Senthil-Kumar, M. (2019) 'Arabidopsis exhibits differential response in basal immunity and proline metabolism during defense against host and nonhost pathogen infection', *Plant Physiology Reports*. Springer, 24(4), pp. 496–506. doi: 10.1007/S40502-019-00480-W/METRICS.

Quevedo Guerrero, J., Infante Noblecilla, J. C., & García Batista, R. M. (2018) 'Efecto del uso predominante de fungicidas sistémicos para el control de *Sigatoka negra* (*Mycosphaerella Fijiensis* Morelet) en el área foliar del banano.', *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(1), pp. 128–136.

Ramezani, M., Rahmani, F. and Dehestani, A. (2017) 'The effect of potassium phosphite on PR genes expression and the phenylpropanoid pathway in cucumber (*Cucumis sativus*) plants inoculated with *Pseudoperonospora cubensis*', *Scientia Horticulturae*, 225(July), pp.

366–372. doi: 10.1016/j.scienta.2017.07.022.

Ramirez, E. (2014) 'Evaluación de los niveles de actividad y transcripcionales in vivo de algunas enzimas hidrolíticas secretadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en su interacción con el clavel *Dianthus caryophyllus* L', p. 174. Available at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/46176/>.

Ranf, S. (2017) 'Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 38, pp. 68–77. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.011.

Rani, P. U. and Jyothsna, Y. (2010) 'Biochemical and enzymatic changes in rice plants as a mechanism of defense', *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(4), pp. 695–701. doi: 10.1007/s11738-009-0449-2.

Rebollar-Alviter, A. and Ellis, M. A. (2005) 'Efficacy of Azoxystrobin, Pyraclostrobin, Potassium Phosphite, and Mefenoxam for Control of Strawberry Leather Rot Caused by *Phytophthora cactorum*', *Plant Health Progress*, 6(1). doi: 10.1094/php-2005-0107-01-rs.

Recorbet, G. *et al.* (2003) 'Wanted: Pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*', *New Phytologist*, 159(1), pp. 73–92. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00795.x.

Riganti, C. *et al.* (2012) 'The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 53(3), pp. 421–436. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.006.

Rincón, A. E. R. (2020) *Efecto de la Aplicación de Elicidores de Origen Biótico en la Biosíntesis de Flavonoides en Clavel (Dianthus caryophyllus L) Durante la Interacción con Fusarium oxysporum f sp. dianthi* Ana, Universidad Nacional de Colombia.

Roberts, L. D. *et al.* (2012) 'Targeted metabolomics', *Current Protocols in Molecular Biology*, 1(SUPPL.98), pp. 1–24. doi: 10.1002/0471142727.mb3002s98.

Romero-Rincón, A. *et al.* (2021) 'Flavonoid biosynthesis in *Dianthus caryophyllus* L. is early regulated during interaction with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*', *Phytochemistry*. Pergamon, 192, p. 112933. doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2021.112933.

Roncero, M. I. *et al.* (2000) 'Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporum*.', *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(1), pp. S47-53. Available at: <https://europepmc.org/article/med/15762782> (Accessed: 15 February 2023).

Ruszkowski, M. *et al.* (2015a) 'The structure of *Medicago truncatula* δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase provides new insights into regulation of proline biosynthesis in plants', *Frontiers in Plant Science*, 6(October), pp. 1–17. doi: 10.3389/fpls.2015.00869.

Ruszkowski, M. *et al.* (2015b) 'The structure of *Medicago truncatula* δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase provides new insights into regulation of proline biosynthesis in plants', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation, 6(October), p. 869. doi: 10.3389/FPLS.2015.00869/BIBTEX.

Sami, F., Siddiqui, H. and Hayat, S. (2019) 'Interaction of glucose and phytohormone signaling in plants', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson, 135, pp. 119–126. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2018.11.005.

Santos-Rodríguez, J., Coy-Barrera, E. and 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*. doi: 10.3390/plants10071447.

Santos, F. (2023) *Contribución al estudio de la respuesta bioquímica de resistencia inducida mediante el uso de elicitores de origen biótico en la interacción Fusarium oxysporum f. sp. dianthi raza 2 - clavel (Dianthus caryophyllus L.)*. Universidad Nacional de Colombia.

dos Santos, T. B. and Vieira, L. G. E. (2020) 'Involvement of the galactinol synthase gene in abiotic and biotic stress responses: A review on current knowledge', *Plant Gene*. Elsevier, 24, p. 100258. doi: 10.1016/J.PLGENE.2020.100258.

Sauter, J. J. and van Cleve, B. (1992) 'Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of "Populus x canadensis" and its relation to protein body mobilization', *Trees*. Springer-Verlag, 7(1), pp. 26–32. doi: 10.1007/BF00225228/METRICS.

Schultz, J. C. *et al.* (2013) 'Flexible resource allocation during plant defense responses', *Frontiers in Plant Science*, 4(AUG), pp. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2013.00324.

Schymanski, E. L. *et al.* (2014) 'Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence', *Environmental Science and Technology*, 48(4), pp. 2097–2098. doi: 10.1021/es5002105.

Sharpe, P. (2018) *Nutritional value of pasture plants for horses*, *Horse Pasture Management*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-812919-7.00003-2.

Shepherd, T. *et al.* (2007) 'Potato metabolomics by GC-MS: What are the limiting factors?', *Metabolomics*, 3(4), pp. 475–488. doi: 10.1007/s11306-007-0058-2.

Siah, A. *et al.* (2018) *Natural Agents Inducing Plant Resistance Against Pests and Diseases*. doi: 10.1007/978-3-319-67045-4_6.

Silva, O. C. *et al.* (2011) 'Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean', *Crop Protection*. Elsevier Ltd, 30(6), pp. 598–604. doi: 10.1016/j.cropro.2011.02.015.

Smillie, R. (1989) 'The Mode of Action of Phosphite: Evidence for Both Direct and Indirect Modes of Action on Three Phytophthora spp. in Plants', *Phytopathology*, 79(9), p. 921. doi: 10.1094/phyto-79-921.

Snoeren, T. A. L. *et al.* (2010) 'The herbivore-induced plant volatile methyl salicylate negatively affects attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum*', *Journal of Chemical Ecology*, 36(5), pp. 479–489. doi: 10.1007/s10886-010-9787-1.

Srivastava, Suchi *et al.* (2016) 'Unraveling aspects of *Bacillus amyloliquefaciens* mediated enhanced production of rice under biotic stress of *Rhizoctonia solani*', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A., 7(MAY2016), p. 587. doi: 10.3389/FPLS.2016.00587/XML/NLM.

Sumner, L. W. *et al.* (2007) 'Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI)', *Metabolomics*, 3(3), pp. 211–221. doi: 10.1007/s11306-007-0082-2.

Sun, L. X. *et al.* (2006) 'Cytotoxic constituents from *Solanum Lyratum*', *Archives of Pharmacal Research*, 29(2), pp. 135–139. doi: 10.1007/BF02974274.

Tavernier, V. *et al.* (2007) 'The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum*

lindemuthianum in Phaseolus leaves depends on fungus pathogenicity', *Journal of Experimental Botany*, 58(12), pp. 3351–3360. doi: 10.1093/jxb/erm182.

Taylor, A. *et al.* (2016) 'Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa*', *Molecular plant pathology*, 17(7), pp. 1032–1047. doi: 10.1111/mpp.12346.

Ton, J. and Jakab, G. (2007) 'Dissecting the b -Aminobutyric Acid – Induced Priming Phenomenon in *Arabidopsis*', *The Plant Cell*, 17(March 2005), pp. 987–999. doi: 10.1105/tpc.104.029728.2.

Trejo-Téllez, L. I. and Gómez-Merino, F. C. (2018) 'Phosphite as an inductor of adaptive responses to stress and stimulator of better plant performance', in *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Singapore: Springer Singapore, pp. 203–238. doi: 10.1007/978-981-10-9029-5_8.

Vanegas, L. (2019) *APROXIMACIÓN BIOQUÍMICA AL ESTUDIO DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA DEL CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) AL PATÓGENO *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi**.

Vásquez Ramírez, L. M. and Castaño Zapata, J. (2017) 'Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión', *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), pp. 363–374. doi: 10.31910/rudca.v20.n2.2017.394.

Verpoorte R. (2000) 'Secondary metabolism', *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*, pp. 1–29.

Verslues, P. and Sharma, S. (2010) 'Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction', *The Arabidopsis Book*, 27(4). doi: 10.1088/1674-1056/27/4/043101.

Vinas, M., Mendez, J. C. and Jiménez, V. M. (2020) 'Effect of foliar applications of phosphites on growth, nutritional status and defense responses in tomato plants', *Scientia Horticulturae*, 265(November 2019). doi: 10.1016/j.scienta.2020.109200.

Vinod, K. and Sabah, A. (2018) 'Plant defense against pathogens: The role of salicylic acid', *Research Journal of Biotechnology*, 13(12), pp. 97–103.

Walz, C. *et al.* (2004) 'Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins', *Phytochemistry*, 65(12), pp. 1795–1804. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.04.006.

Wingler, A. *et al.* (2000) 'Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 124(1), pp. 105–114. doi: 10.1104/pp.124.1.105.

Winter, G. *et al.* (2015) 'Physiological implications of arginine metabolism in plants', *Frontiers in Plant Science*, 6(JULY), pp. 1–14. doi: 10.3389/fpls.2015.00534.

Winter, H. and Huber, S. C. (2000) 'Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes', *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 35(4), pp. 253–289. doi: 10.1080/10409230008984165.

Wu, L. *et al.* (2019) 'Biostimulant and fungicidal effects of phosphite assessed by GC-TOF-MS analysis of potato leaf metabolome', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106(December 2018), pp. 49–56. doi: 10.1016/j.pmpp.2018.12.001.

Wu, Q. *et al.* (2015) 'Metabolite profiles of Populus in response to pathogen stress', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 465(3), pp. 421–426. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.025.

Yagi, M. *et al.* (2014) 'Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)', *DNA Research*, 21(3), pp. 231–241. doi: 10.1093/dnares/dst053.

Yamaguchi, Y. and Huffaker, A. (2011) 'Endogenous peptide elicitors in higher plants', *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), pp. 351–357. doi: 10.1016/j.pbi.2011.05.001.

Yamaguchi, Y., Pearce, G. and Ryan, C. A. (2006) 'The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), pp. 10104–10109. doi: 10.1073/pnas.0603729103.

Yáñez-Juárez, M. *et al.* (2017) 'Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems', *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), pp. 79–94. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-7.

Zaynab, M. *et al.* (2019) 'Role of primary metabolites in plant defense against pathogens', *Microbial Pathogenesis*. Elsevier Ltd, 137(September), p. 103728. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103728.

Zhang, A. *et al.* (2012) 'Modern analytical techniques in metabolomics analysis', *Analyst*, 137(2), pp. 293–300. doi: 10.1039/c1an15605e.

Zubiri, A. (2018) 'Análisis metabolómico no dirigido en dos líneas de conejos seleccionados de forma divergente para grasa intramuscular', p. 74.