

# Resistance detection to *Fusarium oxysporum* by microsatellite markers (SSRs) in carnation



Thank to organizer committee



# **Resistance detection to *Fusarium oxysporum* by microsatellite markers (SSRs) in carnation**

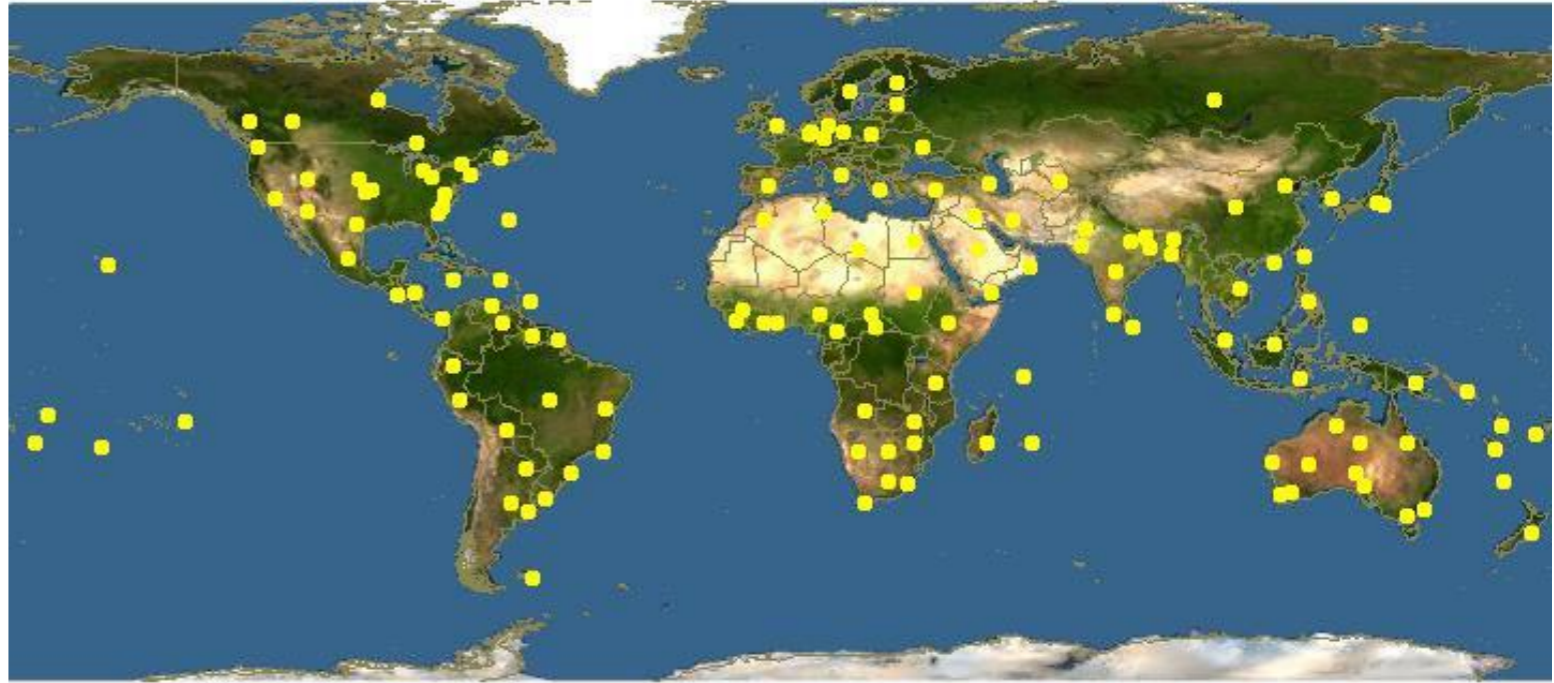
**Juan J. Filgueira, Laura M. Perilla, Diana M. Ríos**

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Campus Nueva Granada, Facultad de Ciencias Básicas Cajica,  
Universidad Militar Nueva Granada [juan.Filgueira@unimilitar.edu.co](mailto:juan.Filgueira@unimilitar.edu.co)

## *Fusarium oxysporum* (FOX)



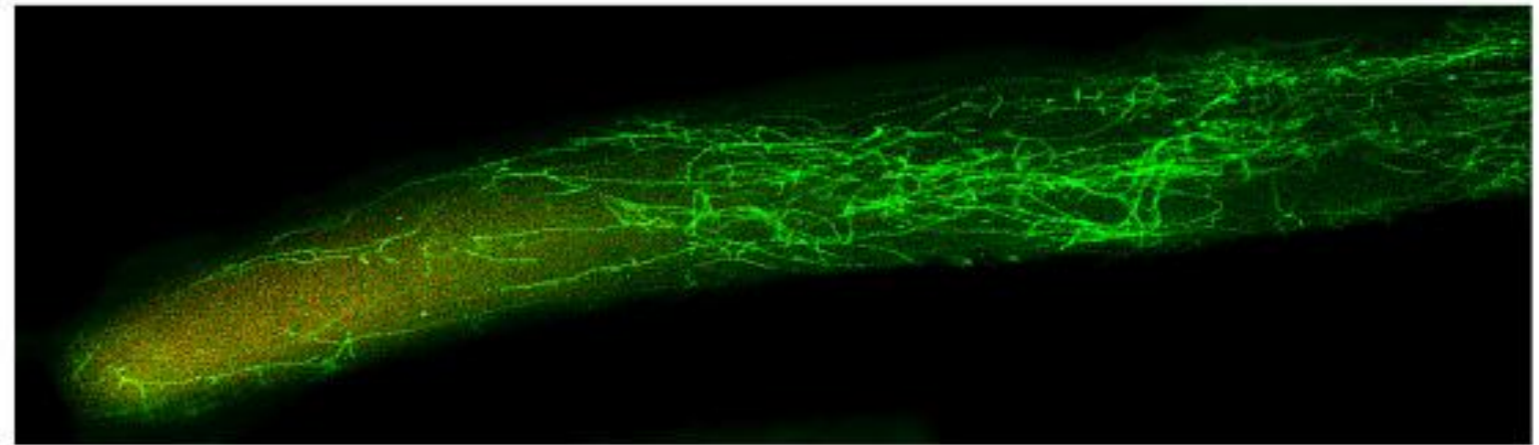
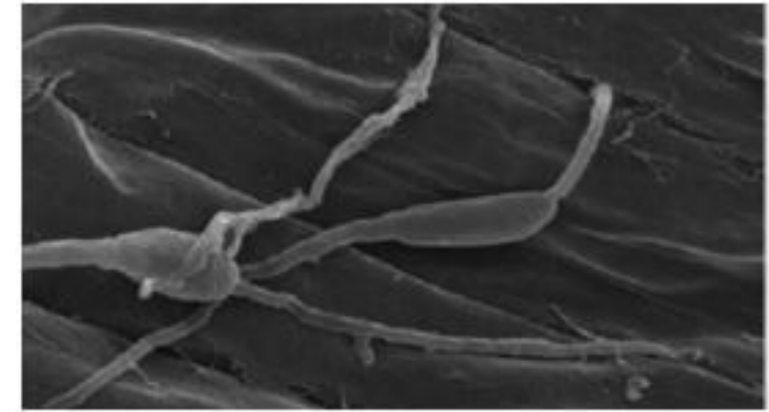
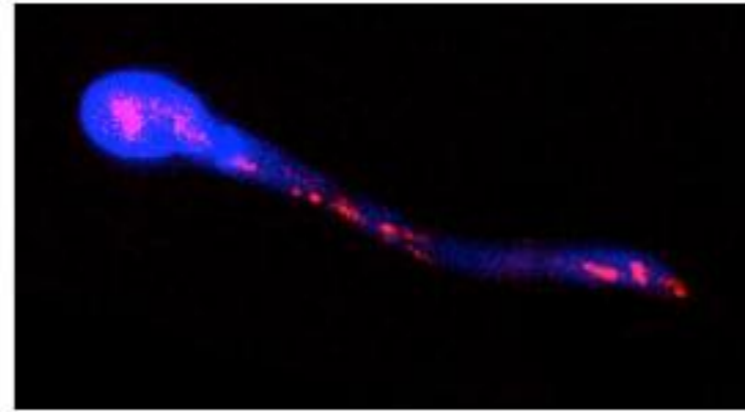
## World distribution



Recent works demonstrate that some regions in the *Fusarium* chromosome suffer permanent reorganization. That suggest sophisticated mechanisms to increase the genetic variability and the virulence mechanisms.

[http://www.uco.es/ingenhongos/invest\\_lineas\\_pietro.php](http://www.uco.es/ingenhongos/invest_lineas_pietro.php)

Señalización y patogénesis en hongos  
Responsable: Antonio Di Pietro



[Genome Biol.](#) 2008; 9(1): R18.

Published online 2008 Jan 24. doi: [10.1186/gb-2008-9-1-r18](https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r18)

PMCID: PMC2395248

**Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi**

Nora Khaldi,<sup>#1</sup> [Jérôme Collemare](#),<sup>#1</sup> [Marc-Henri Lebrun](#),<sup>2</sup> and [Kenneth H Wolfe](#)<sup>1</sup>

## Carnation Fusariosis



In 2016, Colombia exported **225.000 tons** of flowers for **1.100 million of USD** to 90 countries around the world, carnation was the **53%** of this production; this equivalent to more than **600 million of USD** (Asocolflores, 2017).

Filgueira Duarte J.J., 2007. Ataque al clavel. Agricultura de Las Americas 368: 28-33.

Filgueira, J.J.: 2009. Estudio y manejo de la pudrición basal producida por hongos del complejo Fusarium en clavel comercial en la Sabana de Bogotá. Asocolflores 72, p53-54.

Filgueira, J.J.: 2011. Experiencias en mejoramiento de clavel *Dianthus carioophyllus*. 1ª Ed. Bogotá: Universidad Militar Nueva Granada. ISBN 978-959-8403-41-0.

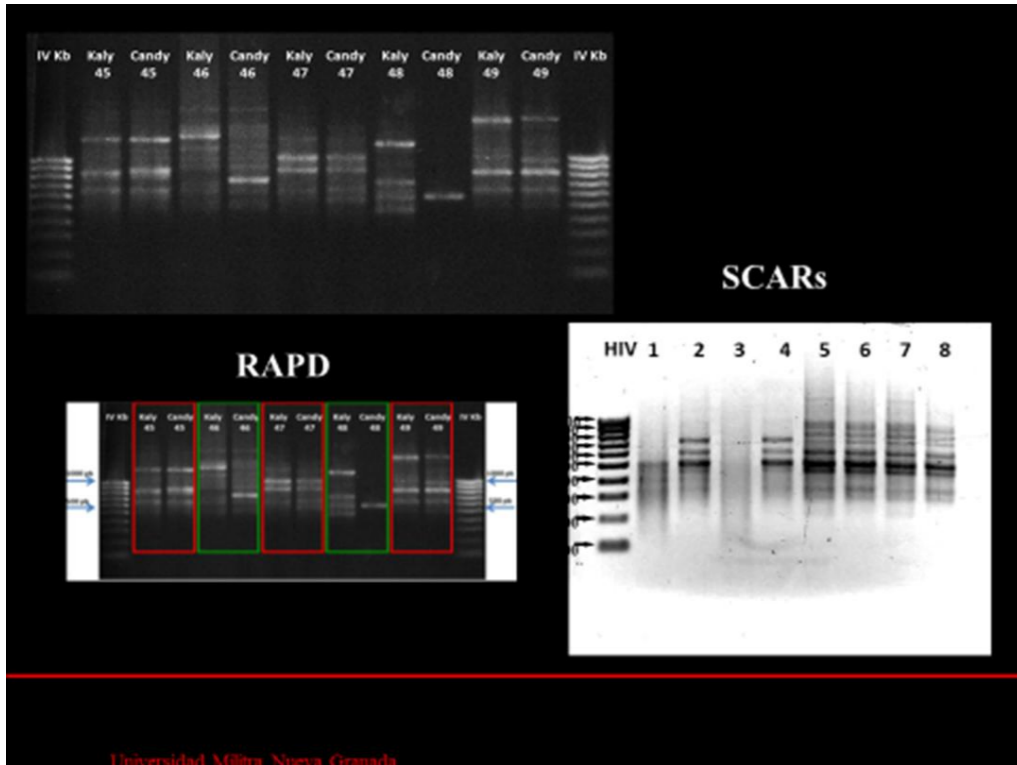
<p><b>UM 787</b></p>  <p>Lp x Ct 22B</p>		<p><b>EVALUACION FLORAL</b></p> <p>Color base: 50B          Color(es) secundarios: 53A          Distribución del color: E, M, P          # pétalos: 28          Borde de pétalos: Aserrado          Forma cáliz: Campanulado          Forma corola en estado 3: Convexa          Diámetro de la corola en estado 3: 6.7          Defectos de la flor: Desteñido          Longitud del tallo al 7º nudo en cm.: 21.5          Peso de tallo en gr.:          Fortaleza: Media          Tipo (Estándar, Miniclavel o Spray): Es</p>	
<p><b>EVALUACION DE RESISTENCIA</b></p>			
<p><b>PLANTULA</b> F. oxysporum: R F. roseum: R</p>	<p><b>ENSAYO DUAL</b> F. oxysporum: R F. roseum: R</p>	<p><b>POTS</b> F. oxysporum: R F. roseum: S</p>	<p><b>TOTAL Rs</b> roseum: RR oxys: RRR</p>
<p><b>LABORATORIO (HISTORIAL)</b>          Fecha de introducción: Nov.11.04          Duración en el lab:          Índice de propagación:          Fecha(s) de reintroducciones al laboratorio:</p>		<p><b>CAMPO (HISTORIAL)</b>          % de supervivencia al transplante de bandeja a suelo: May.29.05: 38%          Jul.29.05: 95%          Fecha(s) y cantidad de plantas sembradas: Jul.12.05; 18          Sep.08.05; 19          # de evaluaciones:</p>	
<p><b>LABORATORIO (ESTADO ACTUAL)</b>          Estado (1,2,3,4)*:          Cantidad:</p>		<p><b>HIBRIDACION</b>          Seleccionada para cruces:          Semillas obtenidas:          Características para la hibridación</p>	
<p><b>Observaciones:</b>          variegado          Quedan las plantas control, el resto fueron infectadas con <i>Fusarium</i>. No hay stock en el lab. Tesis Carol Quinche</p>		<p><b>CAMPO (ESTADO ACTUAL)</b>          Estado (1,2,3,4,5)**:          Cantidad: 2, 3          Ubicación: Cama 1 y 8</p>	



**12.000 Cultivars**

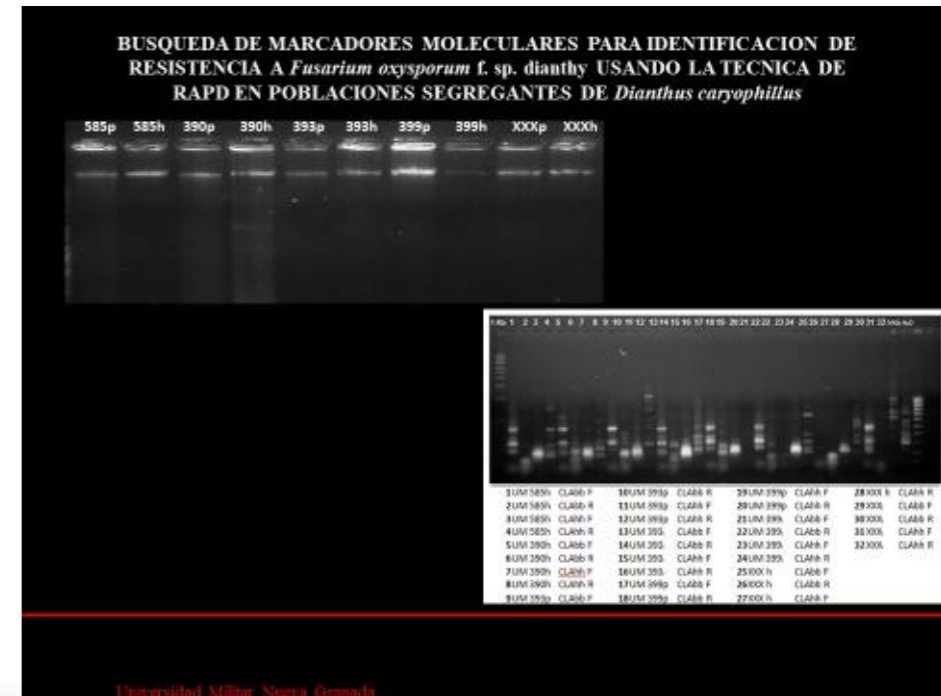
\*1: meristemo; 2: pase a medio sólido; 3: propagación; 4: ambientación  
 \*\*1: plántula; 2: brotación; 3: formación de tallos florales; 4: floración; 5: poda

## Random Amplification of Polymorphic DNA RAPDs



Marcador	RAPDs	#	Secuencia	SCARs	Secuencia	Tamaño esperado
Susceptibilidad	OPB15	35	GGAGGGTGTT	1RSCF	CCTGGCCGATACCCATGGC	448pb
				1RSCR	AGGGGCCAGTGC GCGAATC	
Susceptibilidad	OPT16	396	GGTGAACGCT	2RSCF	CCCTGGCCGATACCCATGG	438pb
				2RSCR	CGCGAAATCCCCGCACT	
Resistencia	OPB10	30	CTGCTGGGAC	1RRCF	TTGAGCACAGGTGCGAG	277pb
				1RRCR	CCTGGCTTTCTAAGATTTGC	
Resistencia	OPM09	249	GTCTTGCGGA	2RRCF	TCGGGCACGGTCGGAC	236pb
				2RRCR	TGCCGGATATAGTGGTGTGATT	
Resistencia	OPM15	255	GACCTACCAC	3RRCF	ATCGGGCACGGTCCGACTCA	254pb
				3RRCR	CCTGGCTTTCTAAGATTTGCCGGAT	

## Sequence-Characterized Amplified Region SCARs

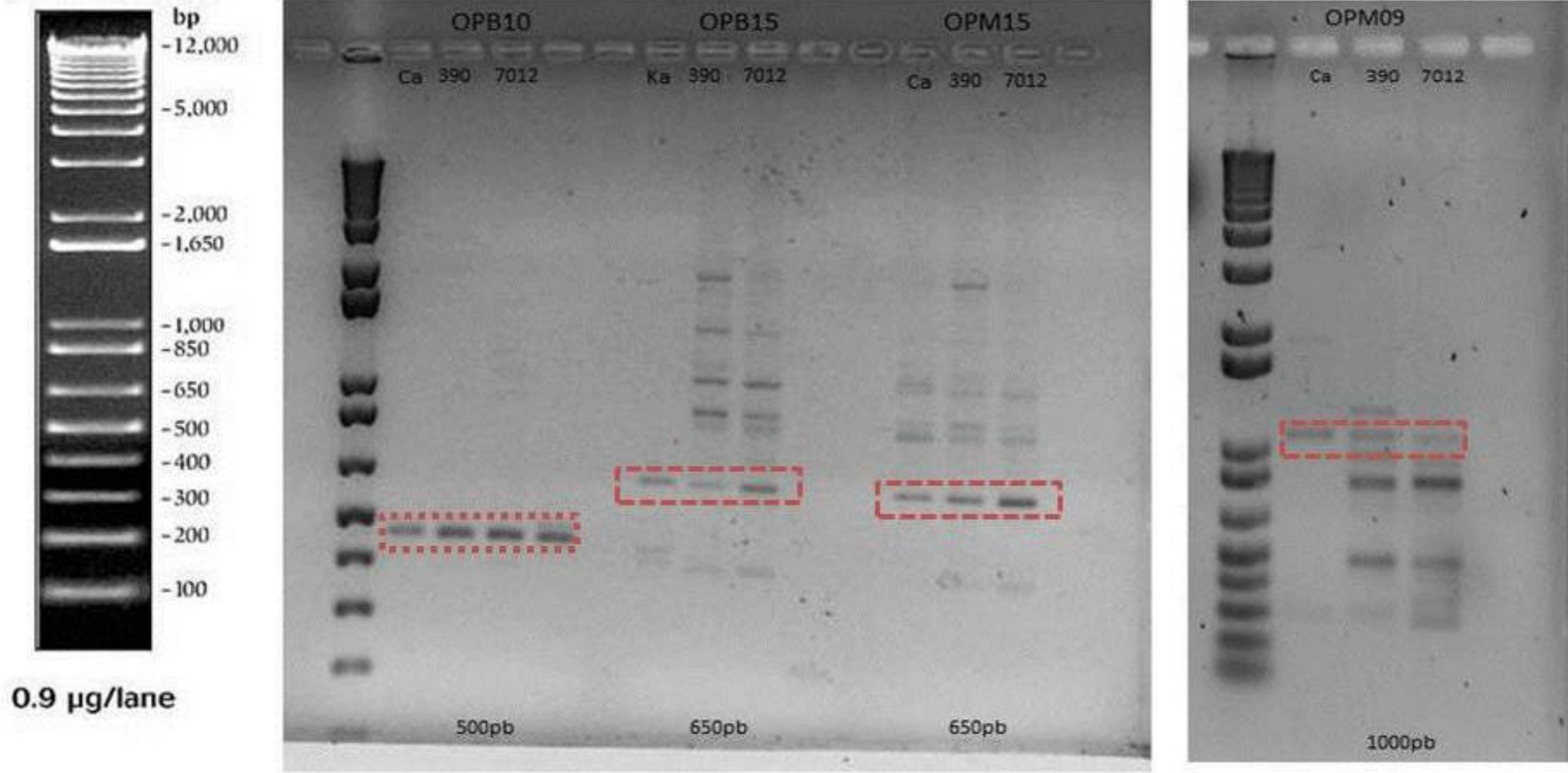


BUSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES DIRIGIDOS A LA RESISTENCIA DE *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthy EN CLAVEL *Dianthus caryophyllus* UTILIZANDO TECNICAS DE RAPD's.

Niño, A<sup>1</sup>., Flores, X<sup>2</sup>., Filgueira, J.J<sup>3</sup>.

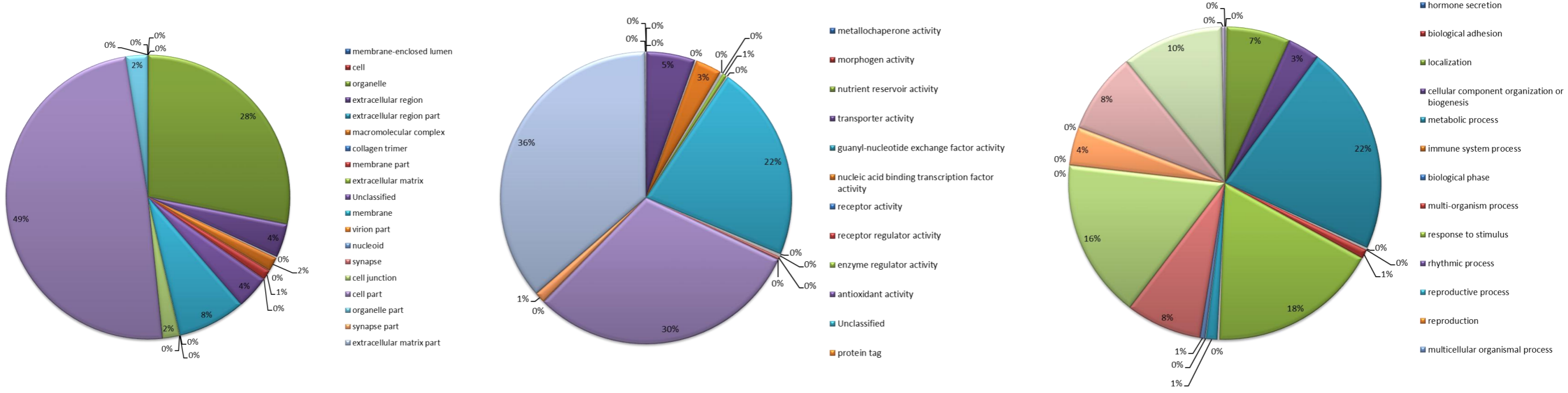
Grupo de Investigación en Fitopatología Molecular, Facultad de Ciencias Básicas y aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada

## Disappearance of polymorphisms in successive generations





# Expressome of resistant varieties



Obtaining of the commercial Carnation (*Dianthus caryophyllus*) transcriptome during the *Fusarium oxysporum* interaction: A new strategy

Filgueira-Duarte, J.J.

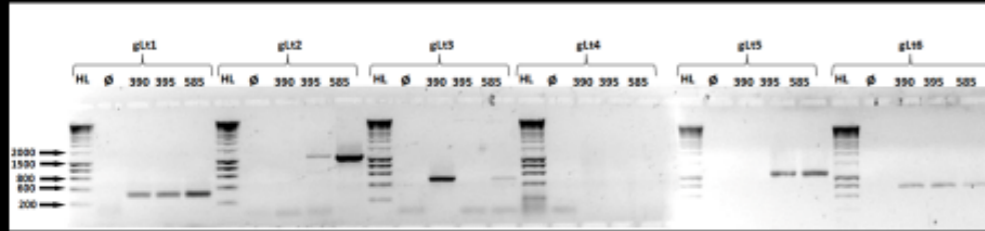
Plant Biotechnology Laboratory, Faculty of Basic and Applied Sciences, Military University Nueva Granada Cajica, Colombia.

Potential genes to Fusarium  
response in carnation

1. Malate dehydrogenases
2. Peroxidases
3.  $\alpha$  and  $\beta$ -amylases
4. Polygalacturonases inhibiting protein
5. Phytoalexines
6. Receptor-Like Kinase
7. Chitinases
8. Glucanases
9. Glucosidase
10. Salicylic acid mediated signaling pathway
11. Jasmonic acid mediated signaling pathway
12. Catalases
13. Aldose 1-epimerase
14. Thaumatin-like protein

## Single-Nucleotide Polymorphism SNPs

Análisis de SNPs como posibles marcadores moleculares de resistencia a *Fusarium oxysporum* en una población de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)



Electroforesis en gel de agarosa 1%. Ensayo de PCR con parejas de primers específicas para el gen glucosil transferasa. HL = marcador de peso molecular; ø = control agua; líneas híbridas de prueba 390, 395 y 585.

Universidad Militar Nueva Granada

#	accesion	Ref. Primer	Gen	asociación a defensa en plantas	Ref. Bibliográfica
1	Z98758.1	ANB	<a href="#">Anthranilato N-benzoiltransferasa</a>	cataliza la reacción comprometida con la biosíntesis de <b>fitoalexinas</b> conocidas como <b>diantramidas y diantalexinas</b> .	Baayen y Niemann. 1985; Yang, et al., 1997
2	E24627.1	Erg	<a href="#">Receptor de Etileno</a>	<b>activación de respuestas</b> como abscisión de hojas, <b>nodulación</b> de raíces, <b>muerte celular</b> programada, la respuesta al <b>estrés</b> y al <b>ataque de patógenos</b>	Guo y Ecker, 2004
3	AB294392.1	gLT	<a href="#">Glucosil Transferasa DcS1G1</a>	<b>transferasa de azúcar</b> glucósido, involucrado en la defensa de la planta para la biosíntesis de <b>flavonoides y de ácido salicílico</b>	Stich, et al., 1992; Song. 2006
4	AB041361.1	Phe	<a href="#">Fenilalanina Amonio Liasa (Dcpal1)</a>	<b>biosíntesis de fenoles</b> por varias vías, activadas por <b>condiciones de estrés</b> y una <b>mayor tolerancia</b> en particular a <b>F. oxysporum</b>	Ardila, et al., 2011
5	U82432.1	Ant	<a href="#">Antocianidina Sintasa (ANS)</a>	en pigmentación y <b>acumulación</b> de 3-deoxiantocianidinas es una <b>rápida respuesta de defensa</b> a la presencia de <b>compuestos fúngicos</b>	Hammerschmidt, 1999; Close y Beadle, 2003; Treutter, 2006
6	DT214807.1	Prx	<a href="#">Homólogo a peroxidasa (Dc850)</a>	proporcionar <b>poder oxidante</b> del peróxido de hidrogeno, reacciones de cross-linking <b>engrosamiento de pared celular</b> , <b>lignificación</b> de la pared vegetal, <b>ácido benzoico</b> dihidrogenasa que aumenta los niveles de <b>ácido salicílico</b> y conduce a la respuesta hipersensible.	Hoeberichts, et al., 2003; Agrios, 2005

BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN UNA POBLACIÓN DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) RESISTENTE A LA ENFERMEDAD VASCULAR CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*

Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias

Maestría en ciencias biológicas

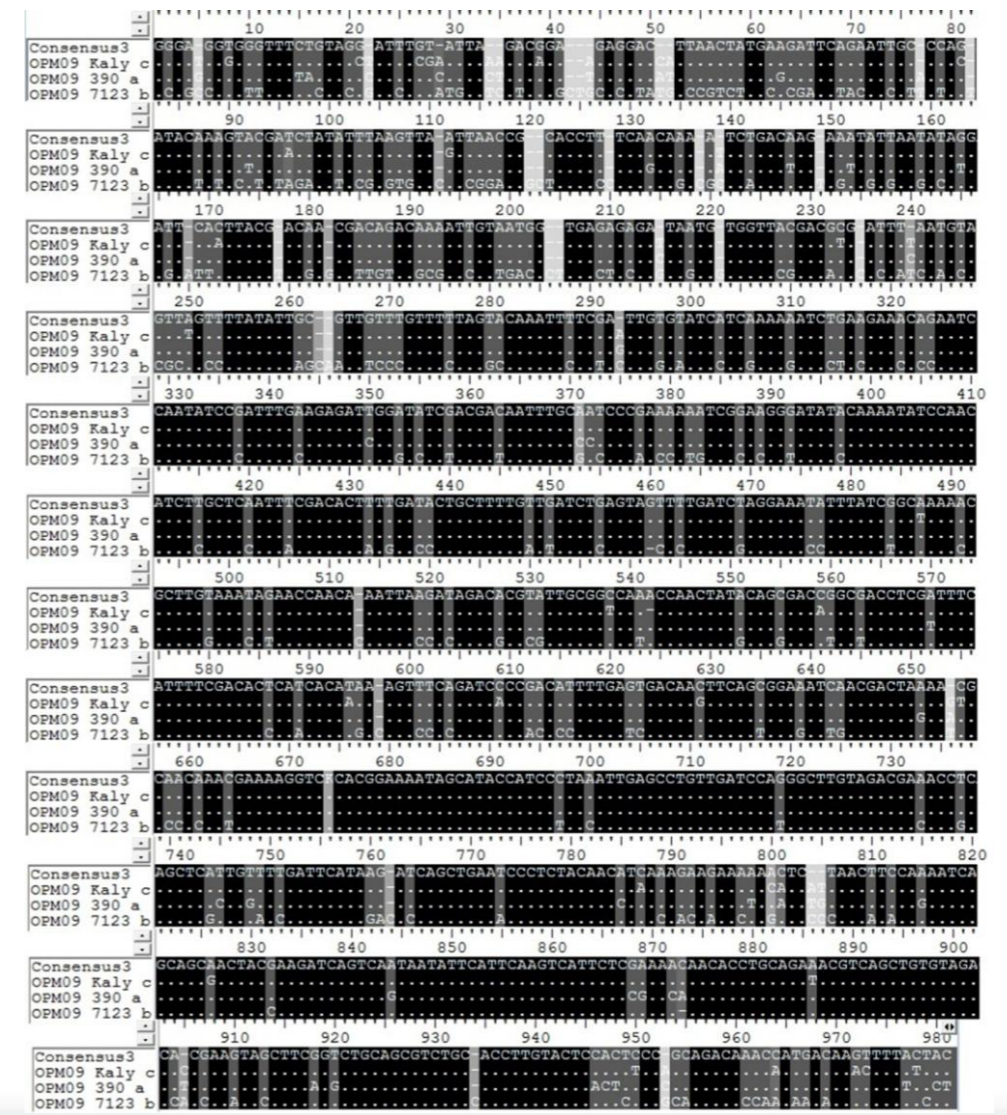
Guillermo Andrés Buraglia Osorio

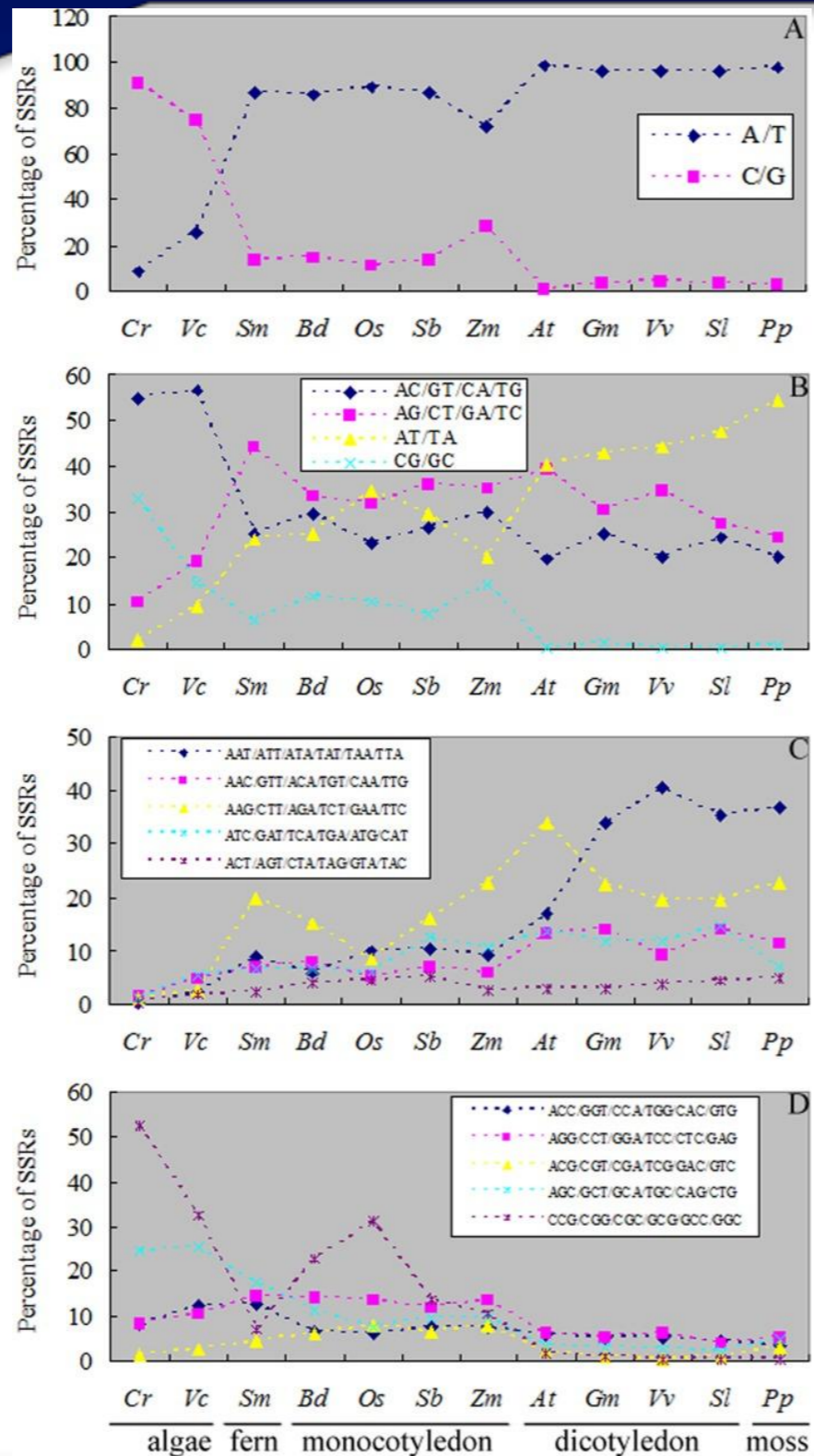
Director: M.Sc. Dr. Sc. Juan José Filgueira



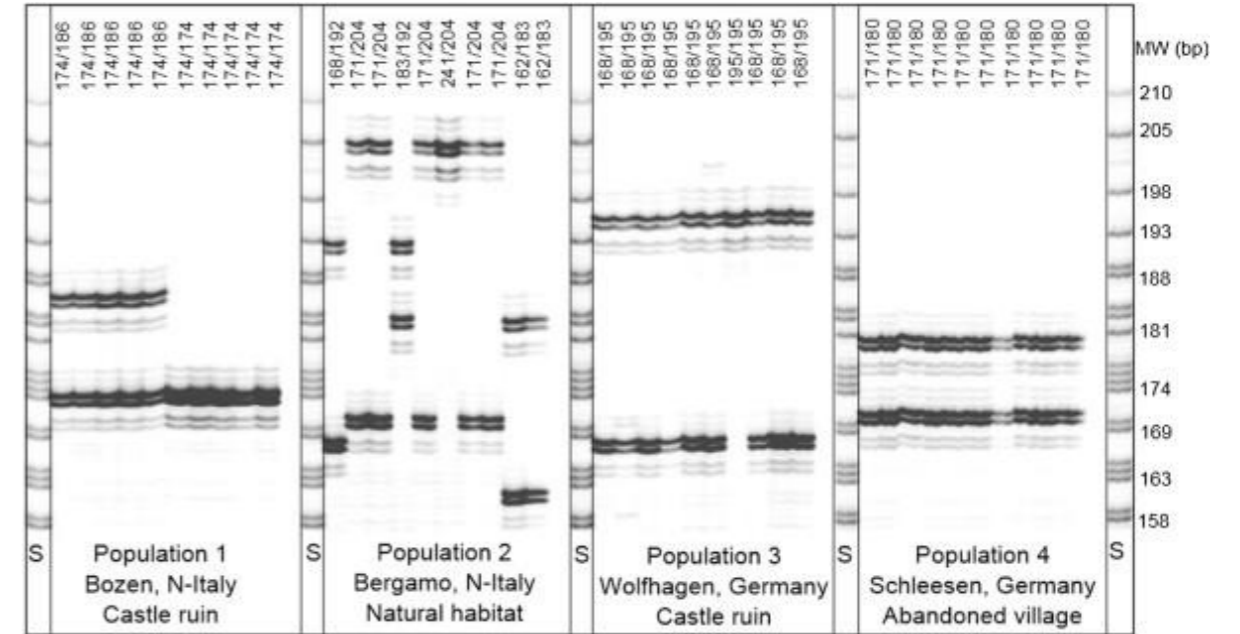
SNP	posición	P <sub>0</sub>		F1					F2					
		Candy (RRR)	Kaly (SSS)	390 (RRR)	393 (RRR)	399 (RRR)	400 (RRR)	385 (SSS)	7123 (RRS)	7152 (RRR)	7020 (RRR)	7010 (RRR)	7045 (RRR)	
GEN 1	1	4	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
	2	20	T/C	T	T	T	T/C	T	T/C	T	T	C	T	T/C
	3	56	A/G	A/G	A/G	A/G	G	A/G	G	G	G	G	A/G	G
	4	209	G/A	G/A	A	A	G	A/G	G	A	A	G	G	G
	5	218	G/A	G/A	A	A	G	A	G	A	G	G	A	G
	6	273	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	7	284	G/A	A/G	G	G/A	A/G	G	A	G	A/G	G	G	A/G
	8	317	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A
GEN 2	N/A	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN 3	1	52	C	A/C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C
	2	81	A	A/C	C	C	C	C	C	A*	C	C	C	A*
	3	219	G	A/G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G*
	4	243	C	T/C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C*
	5	281	C	G/C	G	G	G	G	G	C*	G	G	G	C*
	6	297	A	A/C	C	C	C	C	C	T*	C	C	C	A*
	7	461	C	C/T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C*
	8	540	T	T/A	A	A	A	A	A	T*	A	A	A	T*
	9	554	G	A/G	A	A	A	A	A	A	A*	A	A	G*
	10	578	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	G
GEN 4	1	15	C	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	C
GEN 5	1	25	T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	T	C	T
	2	148	A	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A	C	A
	3	154	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
GEN 6	1	4	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	2	5	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	3	32	C	C/T	C/T	C/T	C	C/T	C/T	C/T	C/T	C	T	C
	4	136	G/T	G	G	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G	G/T	G/T
	5	323	G	G/A	G/A	G/A	G	G/A	G/A	G/A	G/A	G	A	G
	6	332	C	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	C
	7	338	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
	8	341	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A	A
	9	346	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	C	C
	10	350	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A

Gen	# de diferencias	Posibles cambios de nucleótidos		
		Transición	Transversión	
1 ANB	8	A/G; C/T	G/C; A/C	variación
2 Erg	0	-/-	-/-	conservado
3 gLT	10	A/G; C/T	G/C; A/C; A/T	variación
4 Phe	1	-/-	G/C	variación
5 Ant	3	C/T	A/C	variación
6 Prx	9	A/G	A/C; G/T; G/C; A/T	variación





## Simple Sequence Repeat (SSRs)



Yagi, M., Onozaki, T., Taneya, M., Watanabe, H., Yoshimura, T., Yoshinari, T., Ochiai, Y. and Shibata, M.: 2006. Construction of a Genetic Linkage Map for the Carnation by Using RAPD and SSR Markers and Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) for Resistance to Bacterial Wilt Caused by *Burkholderia caryophylli*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75(2), p166–172.

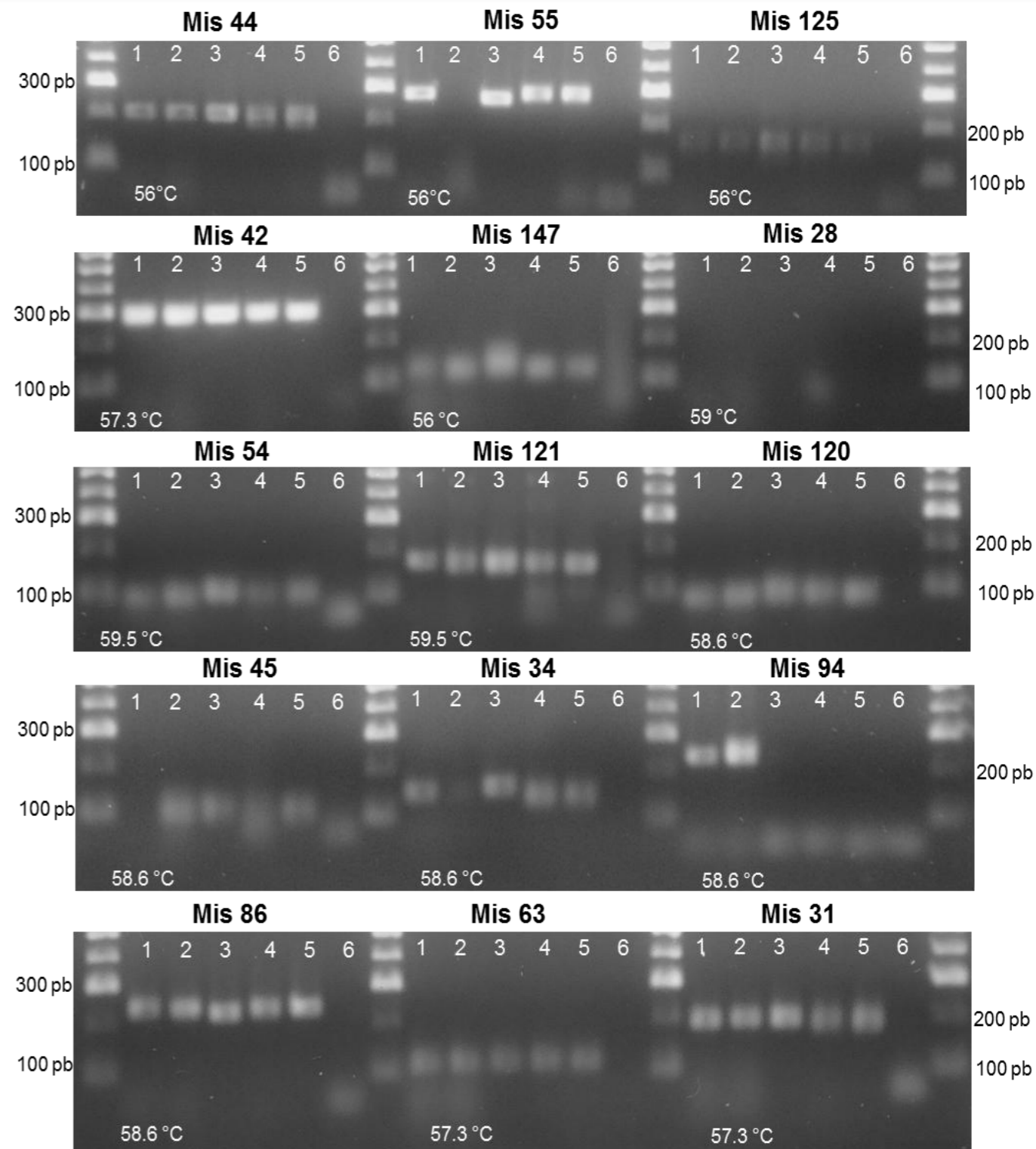
Smulders, M.J., Noordijk, M., Rus-Kortekaas, Y., Bredemeijer, W.M. and Vosman, G.B.: 2003. Microsatellite genotyping of carnation varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106, p1191–1195.



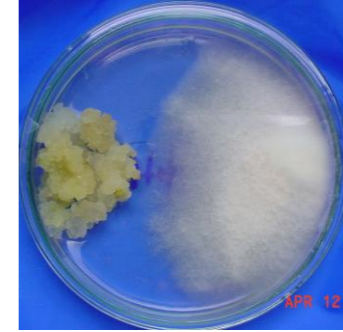
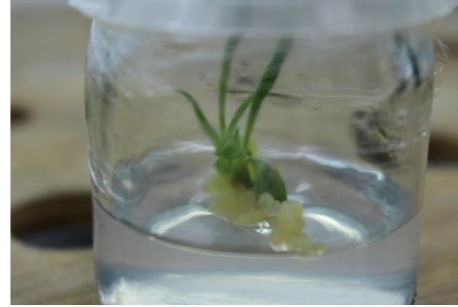
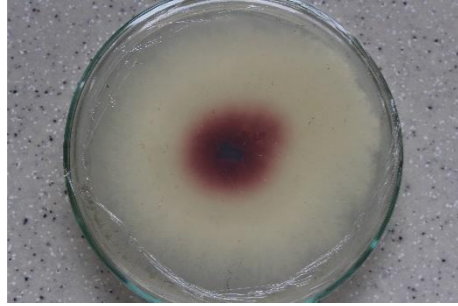
## Sequences of SSRs evaluated in F4, F5 carnation hybrids

Consecutivo LAB UMNG	Nombre (Yagi <i>et al.</i> , 2012)	Tipo de Microsatélite	(Motivo SSR) Numero de repeticiones	Forward primer (5' to 3') Reverse primer (5' to 3')	Tamaño Esperado(pb)
<b>MiS 028</b>	CES1657	ETS-SSR	(ACT)5	GGCGCTCACCTACTTCTGTG CGTTTTCCGTAACGTACCT	202
<b>MiS 031</b>	GS0050	SSR Genómico	(AAG)17	GACATGGAACAGGTGGGAT GCAATTAACAACAACAACAACA	192
<b>MiS 034</b>	GS0311	SSR Genómico	(AAG)11	TGCATCAACCACAACAATAACA AGCTTCGTCTATCACCTGC	144
<b>MiS 042</b>	GS0515	SSR Genómico	(ACT)5	CGCCGAGTTTCAGATGGTTA CCCCTGGAGAAATATGTGTTG	288
<b>MiS 044</b>	CES0738	ETS-SSR	(AACG)4	CAAACATTTTCGAGGGGAAA GAACGCTGGATCTCTGGAAG	191
<b>MiS 045</b>	CES1287	ETS-SSR	(AATG)6	CCTCTACTTTTCTGCTGGC TGCAGGGGAGTTATGAGACA	103
<b>MiS 051</b>	CES1570	ETS-SSR	(AAAG)4	TAAGTCAAGCCGAGATTTT GTCCTCGCTGTTCCCTTC	188
<b>MiS 054</b>	GS0458	SSR Genómico	(AAAC)4	CGGATTATAGCGGTAGTCGT GAGAATATGCTGTGGTGCC	97
<b>MiS 055</b>	CES1789	ETS-SSR	(AATC)5	TCACCCCTAATTCCTCAATCA CATCATCGCAAAGTGAAGA	282
<b>MiS 063</b>	CES2314	ETS-SSR	(AATC)4	TCAGGATTTCTTGTGGCT TGCAGAACAATAAATAGTCGTC	110
<b>MiS 068</b>	DCEST07	ETS-SSR	(CCA)4	GCACGAAAACCGCCTTATAG AGGTGGCGGTGGTATAATA	180
<b>MiS 086</b>	CES2374	ETS-SSR	(AAAC)4	TGGAAGGTTGGTACTACCGC TGTTCTGCCCTTCTTATGC	228
<b>MiS 094</b>	GS0393	SSR Genómico	(GGAT)6	GGAAGAAGAGGAAGGGTTGG AGATGTCCCAGCAAGTGTC	233
<b>MiS 119</b>	CES0004	ETS-SSR	(AAG)11	AGGAAAATGGAGGGAGGAAA TACTCTCGGGGACACACTC	142
<b>MiS 120</b>	CF002	SSR Genómico	(AGAA)5	GGGAATGGATGAAAGAAAGATGG CGCTGGTTGGCTAATGGC	82
<b>MiS 121</b>	GS0333	SSR Genómico	(ACG)8	ACAGCGCAGATACGAGGAGT GCATGAGAGTGGGAAGAAG	162
<b>MiS 125</b>	CB008	SSR Genómico	(GTGA)6	ACTACGAACAAAATGAAGTGACTA TTCCCCCTCATAAATTGC	139
<b>MiS 139</b>	CES1989	ETS-SSR	(ACG)6	GAATCCGCCCTTCTTCTTC TCGACGACGTGTGAGTGAAT	157
<b>MiS 141</b>	GS0473	SSR Genómico	(AT)8	AAAATTATTTATGGGCGATTGAA TTTTGGCCACTGTCTTGTG	252
<b>MiS 147</b>	CES1808	ETS-SSR	(AATG)4	CCAAATCTCCGCCATTAATA GTTCCAGCCGACATTCTGTT	118

## SSRs Amplicons in six different carnation varieties, resistant and susceptible.

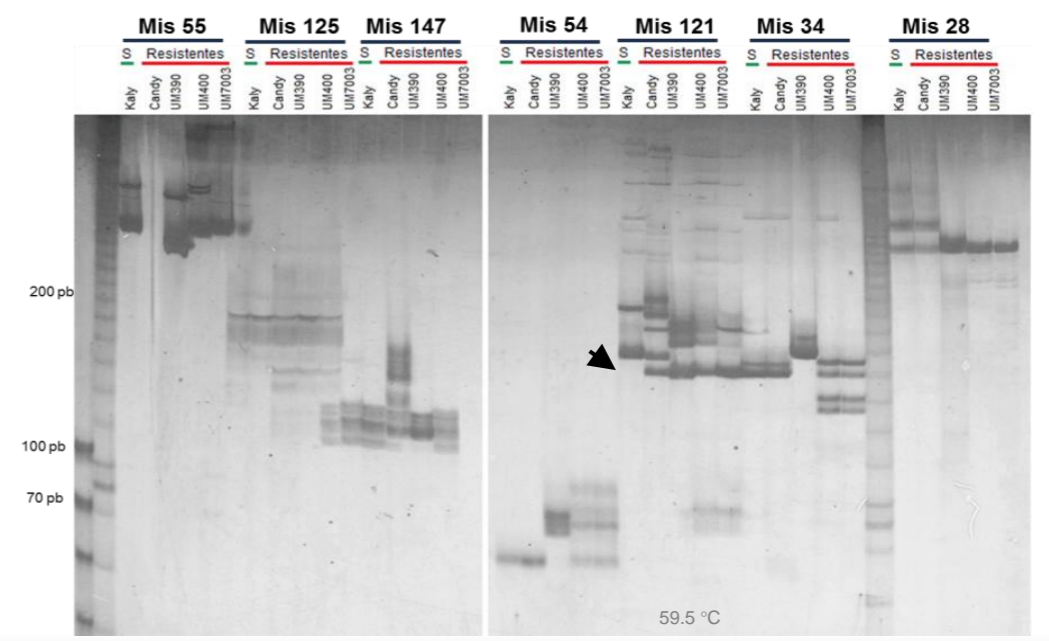
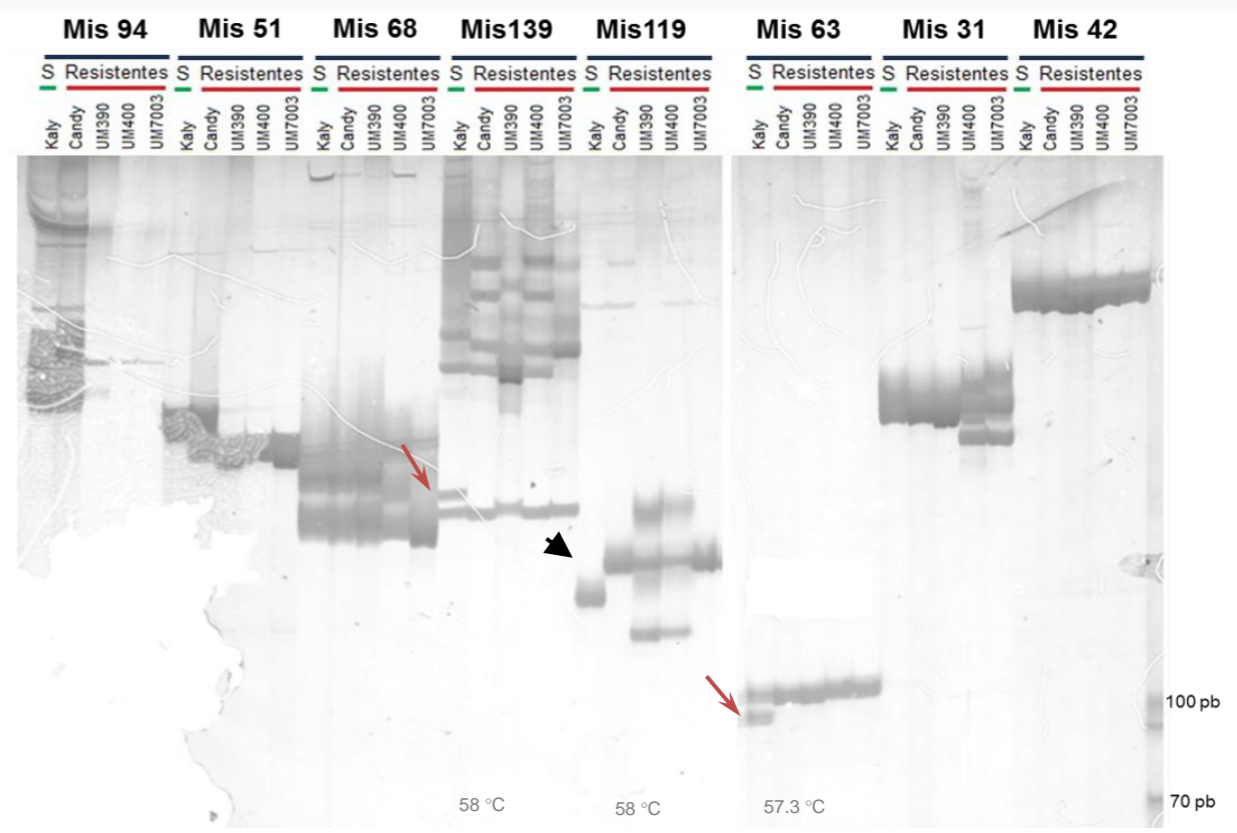


## Evaluation of resistance (RRR)

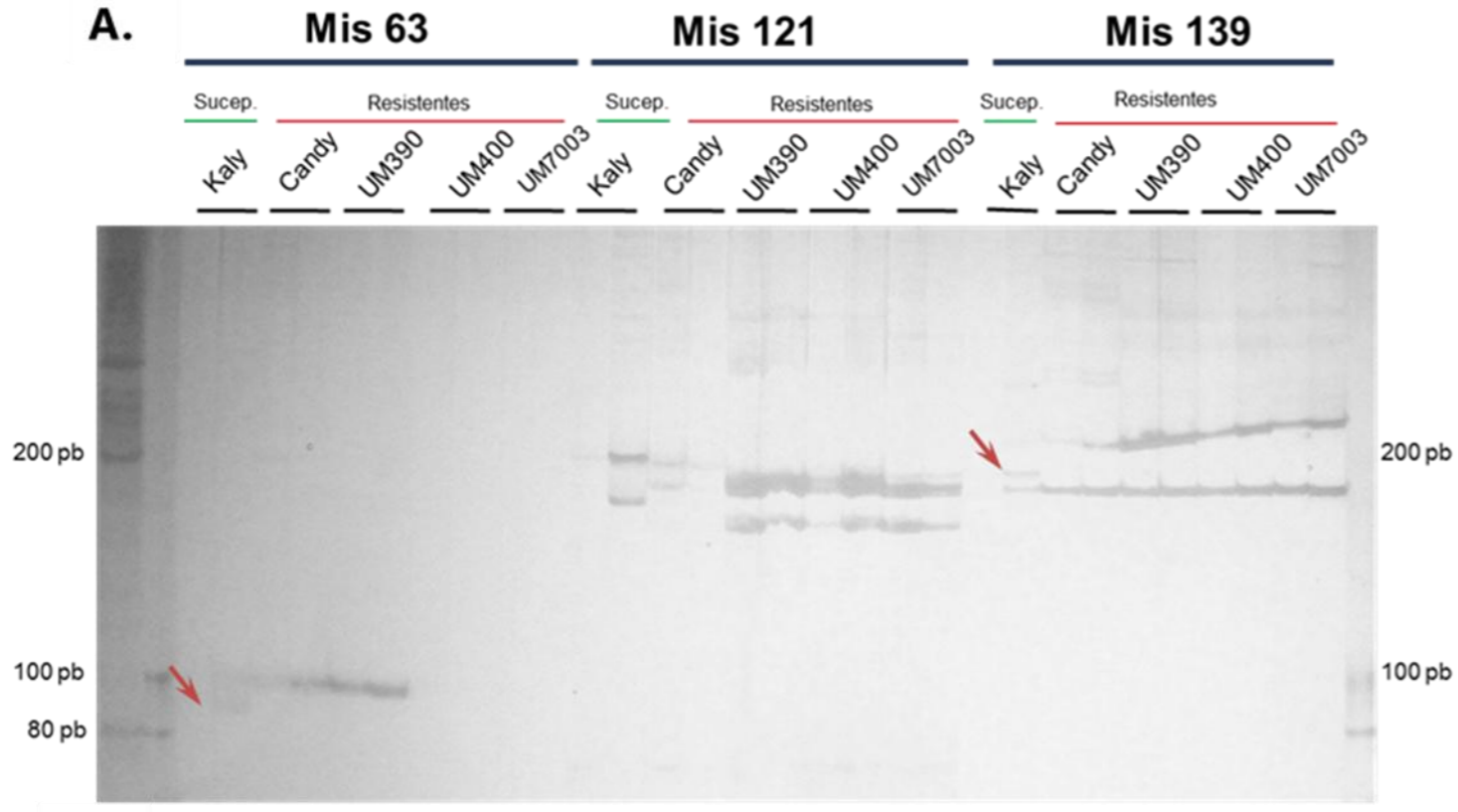




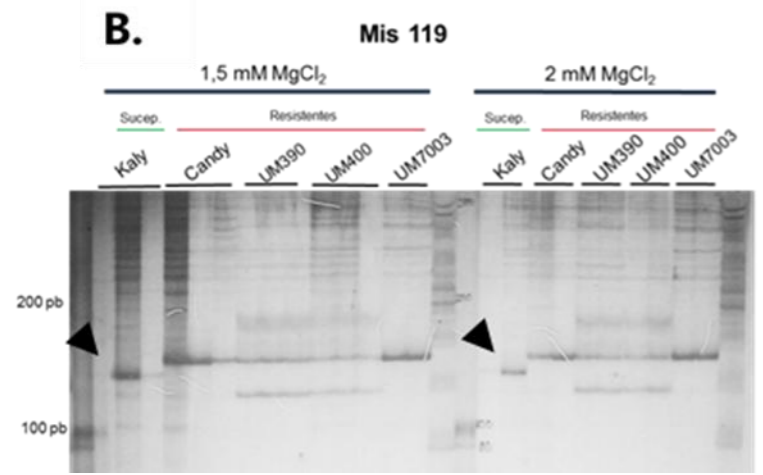
Polymorphisms evaluation in 15 loci.



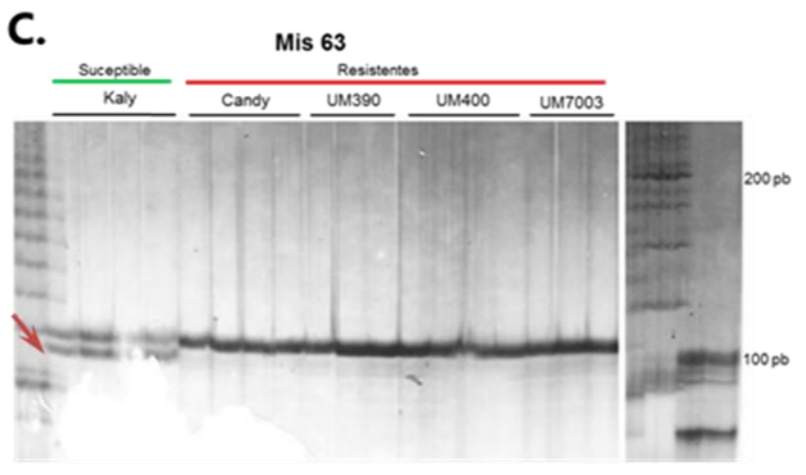
**A.**



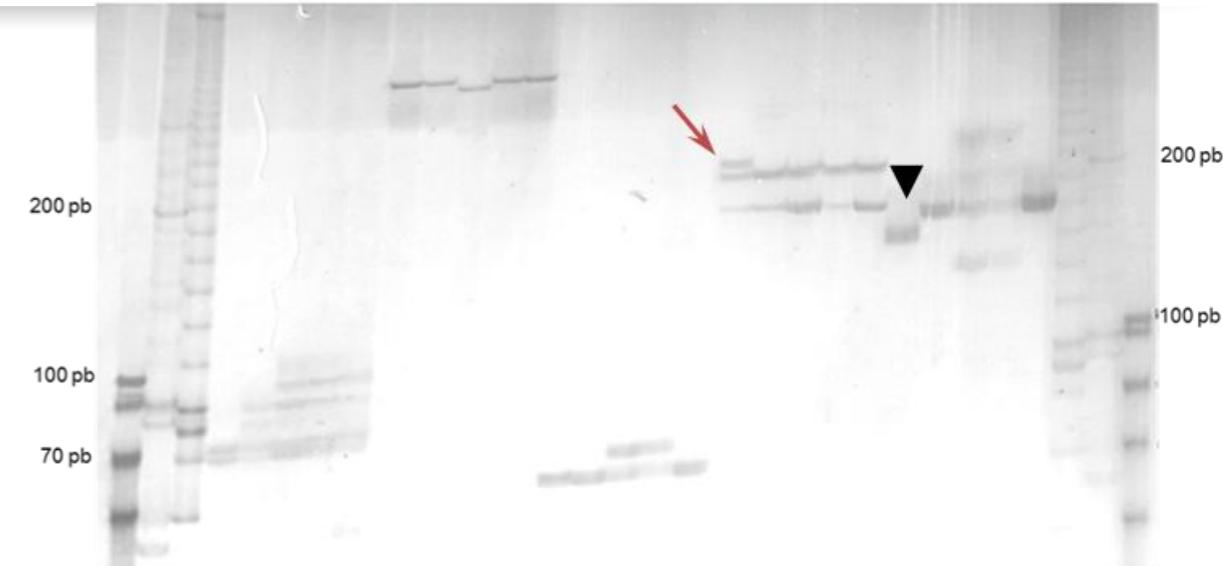
**B.**



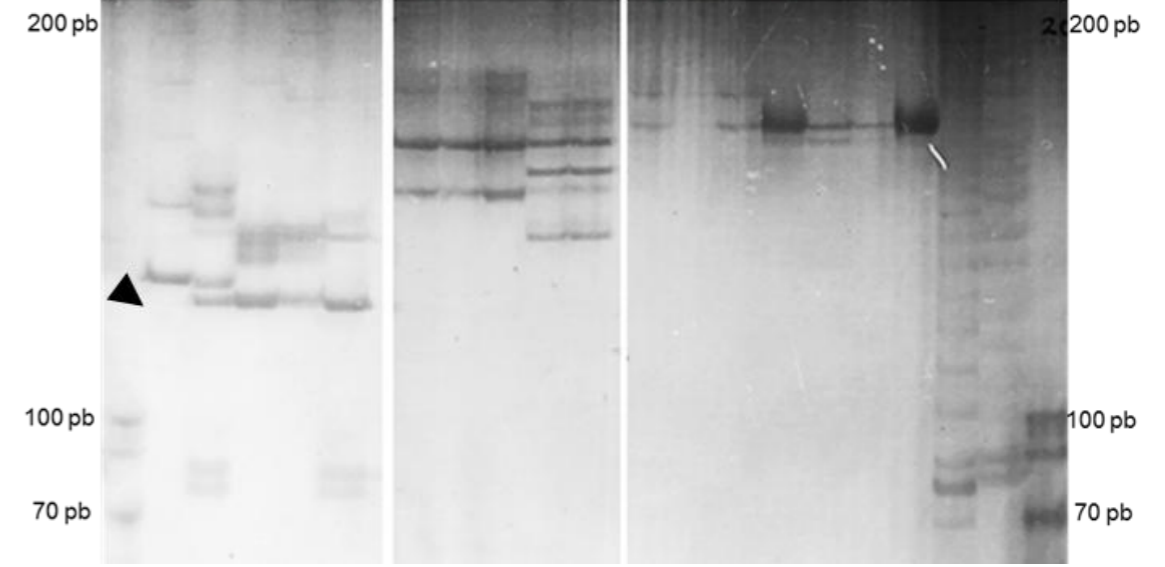
**C.**



Mis 45					Mis 86					Mis120					Mis139					Mis119				
S		Resistentes			S		Resistentes			S		Resistentes			S		Resistentes			S		Resistentes		
Kaly	Candy	UM390	UM400	UM7003	Kaly	Candy	UM390	UM400	UM7003	Kaly	Candy	UM390	UM400	UM7003	Kaly	Candy	UM390	UM400	UM7003	Kaly	Candy	UM390	UM400	UM7003



Mis 121					Mis 44					Mis 141				
S		Resistentes			S		Resistentes			S		Resistentes		
Kaly	Candy	UM390	UM400	UM7003	Kaly	Candy	UM390	UM400	UM7003	Kaly	Candy	UM390	UM400	UM7003



Production of Carnation  
breeding program  
Po, F1, F2, F3, F4, F5



## SSRs related with resistant and susceptible varieties

Consecutivo LAB UMNG	Tipo de Microsatélite	(Motivo SSR) No. Repeticiones	Tamaño Aproximado	Polimorfismo asociado a resistencia (Observado en clavel resistente)	Detección	Temperatura de Annealing [MgCl <sub>2</sub> ]
<b>MiS 063</b>	ETS-SSR	(AATC)4	110 pb	Ausencia de banda de menor peso molecular	Poliacrilamida	57,3°C [1.5 mM]
<b>MiS 119</b>	ETS-SSR	(AAG)11	140 pb	Presencia de banda de mayor peso molecular	Poliacrilamida	58°C [1.5 mM] ó 2mM
<b>MiS 121</b>	SSR Genómico	(ACG)8	150 pb	Presencia de banda de menor peso molecular (105 pb)	Poliacrilamida y Electroforesis Capilar (MultiNA)	59,5°C [1.5 mM]
<b>MiS 139</b>	ETS-SSR	(ACG)6	155 pb	Ausencia de banda de mayor peso molecular	Poliacrilamida	58,6 °C [1.5 mM]



# Thanks

