

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS AL SISTEMA DE DEFENSA DE DOS  
VARIEDADES DE CAFÉ (*COFFEA ARABICA*) MEDIANTE EL USO DE  
INDUCTORES DE RESISTENCIA CONTRA EL PATÓGENO DE LA ROYA  
(*HEMILEIA VASTATRIX*)

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en  
Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en  
Genética y Biología Molecular

DYAN MORALES SAMUELS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica  
2022

## **Dedicatoria y Agradecimientos**

A mi madre, Xinia Samuels Ramírez, quién me brindó incondicionalmente muchos años de su vida, plasmados a través de esfuerzo, horas de trabajo, cariño y apoyo para poder convertirme en el profesional que ella anheló y soñó. Sin importar las muchas adversidades que tuvimos, siempre estuvo al pie del cañón dando su mejor versión y preocupándose en cada segundo para que un servidor pudiera culminar los estudios que ella siempre ha querido dejar como legado.

También dedico esta tesis a mi esposa, Catalina Quirós Martínez, mujer valiente y entregada a creer en nosotros como proyecto de vida, donde en ocasiones uno de los integrantes de un equipo inquebrantable mantiene a flote el barco que los llevará a un puerto más seguro. No tengo duda que el desarrollo de este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin tenerla a mi lado desde el día uno.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Mónica Blanco Meneses por creer en esta investigación y formarme no solo de manera académica, sino también en el campo profesional y humano. Por darme la apertura a las unidades del Centro de Investigaciones de Protección a los Cultivos de la Universidad de Costa Rica, donde realicé gran parte del trabajo y tuve el apoyo de cada uno de los colaboradores e integrantes.

De igual manera, mi agradecimiento sincero y especial hacia el Dr. Federico Albertazzi Castro a quien le debo respeto y admiración, por la paciencia, disposición y ganas de que un servidor pudiera avanzar a paso firme a lo largo de todo el desarrollo de esta tesis. El conocimiento que obtuve gracias a su tutela siempre será irremplazable.

Las gracias a Don Miguel Barquero Miranda y al Instituto del Café de Costa Rica por formar parte del equipo que me brindó los conocimientos que formaron parte de los cimientos de esta tesis.

Finalmente, agradezco a los integrantes del Posgrado de Biología, al Sistema de Estudios de Posgrado y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por siempre mostrar interés en formar profesionales que reflejen los pilares éticos y profesionales que caracterizan a nuestra institución. Gracias por extenderme desde el apoyo académico hasta el económico para que este trabajo de investigación culminara con éxito.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular”



---

Dr. Andrés Gatica Arias  
**Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado**



---

Dra. Mónica Blanco Meneses  
**Profesora Guía**



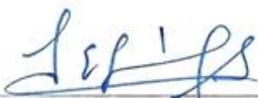
---

Dr. rer. nat. Federico Albertazzi Castro  
**Lector**



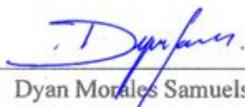
---

M.Sc. Miguel Barquero Miranda  
**Lector**



---

Dr. Luis Gómez Alpízar  
**Representante del Director  
del Programa de Posgrado en Biología**



---

Dyan Morales Samuels  
**Sustentante**

## Tabla de Contenido

Dedicatoria y Agradecimientos.....	ii
Hoja de Aprobación.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla de Contenido .....	iv
Lista de Cuadros .....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Abreviaturas .....	viii
Prefacio .....	1
Artículo Científico .....	6
Resumen .....	6
Introducción.....	6
Objetivo general .....	9
Objetivos específicos .....	9
Metodología.....	9
Sitio experimental.....	9
Material vegetal .....	9
Obtención, germinación e infección del inóculo de Roya ( <i>Hemileia vastatrix</i> ). .....	10
Diseño experimental de plantas <i>in vivo</i> .....	11
Cuantificación y determinación del tiempo de expresión de los genes asociados a la dinámica defensiva de dos variedades de café. ....	13
Resultados.....	17
Expresión de genes asociados a la dinámica defensiva de dos variedades de café .....	17
<i>CaPR1b</i> .....	18
<i>CaPR10</i> .....	19
<i>CaR111</i> .....	21
<i>CaWRKY1</i> .....	23
<i>CaRLK</i> .....	25
<i>CaGT</i> .....	27
Discusión .....	30
Conclusiones .....	34
Referencias bibliográficas .....	35

## Lista de Cuadros

Cuadro I. Genes relacionados al sistema de defensa de *Hemileia vastatrix* bajo la infección del patógeno de roya, número de accesión y secuencia de imprimadores utilizados para qPCR-RT

Cuadro II. Lista de reactivos y sus respectivas concentraciones utilizados para la preparación de 100 mL de buffer de extracción.

Cuadro III. Esquema organizacional de los tiempos y procedimientos realizados en los tratamientos de la investigación “Expresión de genes relacionados al sistema de defensa de dos variedades de café (*Coffea arabica*) mediante el uso de inductores de resistencia contra el patógeno de la roya (*Hemileia vastatrix*)”.

Cuadro IV. Expresión relativa acumulada-promedio de 6 genes relacionados con la dinámica defensiva cuantificados en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obata (Oba) después de 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

## Lista de Figuras

Figura 1. Discos de hojas de plantas var. Obatá y Caturra inoculados con una solución de esporas de *H. vastatrix* utilizando el método de Eskes (1982).

Figura 2. Esquema organizacional de las unidades experimentales. \*El ejemplo desarrollado con el tratamiento de ácido salicílico fue el mismo utilizado en fosfito de potasio y ambos tratamientos se realizaron también en la variedad Caturra. Var: Variedad, T: Tratamiento, ST: Sub-tratamiento, Rep: Repetición.

Figura 3. Cámara de germinación casera construida con madera, malla anti-áfidos y recubierta con plástico negro para introducir plantas de cafeto durante el período de inoculación de roya.

Figura 4. Sobre de aluminio empleado para el almacenamiento de las hojas de cafeto de los tratamientos en cada momento de muestreo, posterior a la adición de nitrógeno líquido para su conservación.

Figura 5. Análisis de expresión relativa del gen *CaPR1b* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

Figura 6. Análisis de expresión relativa del gen *CaPR10* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

Figura 7. Análisis de expresión relativa del gen *CaR111* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

Figura 8. Análisis de expresión relativa del gen *CaWRKY1* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

Figura 9. Análisis de expresión relativa del gen *CaR111* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

Figura 10. Análisis de expresión relativa del gen *CaGT* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

## Lista de Abreviaturas

IR(s): Inductor(es) de Resistencia

HV: *Hemileia vastatrix*

Hai: Horas antes de la inoculación con HV

Hdi: Horas después de la inoculación con HV.

Cat: Caturra.

Oba: Obatá.

AS: Acido salicílico.

FP: Fosfito de potasio.

ST1: Testigo absoluto: sin aplicaciones de IR o inoculación de *Hemileia vastatrix*.

ST2: +HV: plantas inoculadas con *H. vastatrix*.

ST3: +IR: plantas aplicadas con el inductor de resistencia.

ST4: +IR (12D) /+HV: plantas aplicadas con el inductor de resistencia, 12 horas después de la inoculación con *H. vastatrix*.

ST5: +IR (12A) /+HV: plantas aplicadas con el inductor de resistencia, 12 horas antes de la inoculación con *H. vastatrix*.



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Dyan Morales Samuels, con cédula de identidad 702110943, en mi condición de autor del TFG titulado Expresión de genes relacionados al sistema de defensa de las variedades de café (Coffea arabica) mediante el uso de inductores de resistencia contra el patógeno de la roya (Hemileia vastatrix).

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## Prefacio

La planta de café (*Coffea arabica*) de la familia Rubiaceae, originaria del sureste de Etiopía por la hibridación natural de dos especies ancestrales más antiguas (*C. canephora* y *C. eugenioides*), se caracteriza por ser un arbusto pequeño y leñoso con la capacidad de desarrollarse en las zonas tropicales del mundo en alturas que van desde los 1300 a los 2000 m.s.n.m o superior. El potencial óptimo de producción de este cultivo se alcanza posterior a los 3 años, cuando las cerezas extraídas de las bandolas, sistema de ramas posicionadas en estratos de manera vertical principalmente, permiten extraer los granos que formarán parte del producto final al cual el consumidor tiene acceso (Krishnan, 2017).

A través de los años, los países con grandes áreas de producción cafetalera (más de 50 involucrados en toda la cadena de producción cafetalera) han posicionado al cultivo de café como uno de los principales en el sector agroalimentario, puesto que es la bebida no alcohólica de mayor consumo a nivel mundial y que alcanza un flujo económico cercano de los 10 billones de dólares anuales en los mercados (Krishnan, 2017; Prabhakaran, 2020).

Para países como Costa Rica el cultivo de café con las variedades Caturra y Catuai, representa en la historia la construcción de una socioeconomía más próspera y con mayor exposición a países del área centroamericana y nivel mundial. Hoy en día, la producción del “grano de oro” sigue siendo de suma importancia para la economía del país y esto se ve reflejado a través de las exportaciones de más de 1 611 932 sacos de 46 Kg durante el período 2019-2020, cantidad que representa un aproximado de 332 456 millones de dólares (ICAFE, 2020).

Dentro del manejo agronómico del cultivo de café, la roya (*Hemileia vastatrix* Berk & Broome) representa una de las enfermedades que provoca limitantes en su producción. Es un hongo fitopatógeno reportado por primera vez en Sri Lanka, perteneciente a la familia Pucciniaceae y con la capacidad de producir vastas cantidades de uredinosporas que se diseminan a través de las plantaciones y provocan la pérdida del follaje de las plantas y por ende de su potencial fotosintético para el llenado de las cerezas (35% de la cosecha) (Talhinhas *et al*, 2016).

Esta enfermedad tiene un proceso de penetración único que se rige por etapas específicas para el desarrollo de estructuras (hifas, haustorios, etc) que le permiten colonizar paso a paso el interior de las plantas, método que vuelve al hongo un organismo eficiente para colonizar los tejidos de sus hospederos y así completar su ciclo de vida que finalizará en la generación de nuevas esporas que serán diseminadas a otros sectores de la misma planta u otros nuevos hospederos (Ramiro *et al*, 2009).

La roya del café se ha ubicado en la mayoría de las regiones productoras de café en todo el mundo y su ciclo de vida sumado a su capacidad de adaptación a diferentes ambientes, le ha permitido mutar constantemente para sobrepasar las barreras de defensa de las plantas y las estrategias de fito-protección diseñadas por los productores. En la actualidad más de 50 razas de roya han sido caracterizadas en el Centro de Investigación de la Roya (Coffee Rust Research Centre) en Brasil, donde la que más resalta por su prevalencia en diferentes zonas es la raza II (Zambolim, 2016).

El control de la enfermedad de la roya ha sido abarcado desde varias perspectivas (sobre la planta, el patógeno, el ambiente y las prácticas agronómicas) que le permitan al productor mantener bajos o nulos niveles de inóculo, todo con el objetivo de proteger el área foliar de las plantas que producen los asimilados. Ejemplos de varios de estos ejes de acción para el control del hongo son la poda y remoción de brotes jóvenes para permitir la penetración de la radiación solar y disminuir la humedad relativa en el interior de la planta, condiciones que desfavorecen el crecimiento del patógeno. Además, la fertilización juega un papel importante en el estatus nutricional de la planta que influye sobre el vigor y funcionalidad fisiológica de las plantas. Por otro lado, históricamente el manejo y control directo del inóculo de roya sobre las plantaciones ha sido atribuido al uso de agroquímicos sistémicos y protectantes, específicamente a los pertenecientes al grupo de los triazoles y estrobirulinas (Virginio & Domian, 2019).

A pesar de lo anterior, los programas de mejoramiento genético han sido implementados como otra herramienta proporcionada al sector productivo de café para disminuir la carga química aplicada contra la roya, además de favorecer la duración de las plantaciones con un alto potencial de producción. Según do Céu Silva y otros (2006) desde 1950 entidades involucradas en la investigación cafetalera han utilizado las plantas del híbrido de Timor (hibridación inter-específica natural entre *C. arabica* y *C. canephora*) como el padre donador de la resistencia contra la roya en los entrecruzamientos con plantas de interés agronómico y de gran bagaje en los países productores de café. Como resultado de esta estrategia, los materiales genéticos provenientes de las introgresiones con híbridos de Timor son conocidos como Catimores y Sarchimores y se han empleado como alternativas a las variedades convencionales cultivadas por los caficultores, debido a su potencial para superar características como el potencial productivo y más importante por su resistencia al ataque del patógeno de roya (Berlingeri *et al*, 2007).

Paradójicamente, la coevolución entre las plantas de café y la roya ha causado que el hongo busque la manera de sobrepasar las barreras naturales obtenidas como resultado del mejoramiento genético, causando por consecuencia que la resistencia no sea duradera por períodos prolongados y los productores tengan que acudir nuevamente a los antiguos y conocidos métodos de control (Neves *et al*, 2019).

Cabe destacar que la relación entre las distintas razas del patógeno de roya y las diferentes y múltiples variedades de café (provenientes de los programas de mejoramiento) dependen principalmente de la composición genética que ambos poseen. El factor que gobierna las reacciones compatibles (infección sobre la planta) y no compatibles (no-infección sobre la planta) entre ambos organismos está relacionada con la presencia o ausencia de genes de virulencia ( $v1-9$ ) y resistencia ( $S_H1-9$ ) en las razas del hongo y las variedades de café, respectivamente (Gichuru *et al*, 2012).

Lo mencionado anteriormente, permite entender que la dinámica de la roya como factor causante de la disminución de la productividad del cultivo del café siempre dependerá de las variedades cultivadas en zonas o países específicos, puesto que estos generarán una presión de selección sobre las razas de roya predominantes en esa área que buscarán sobrepasar la resistencia en las plantas que les impide completar su ciclo de vida donde el resultado final es la producción de más inóculo que perpetúe su estancia en las plantaciones.

Ante la necesidad de continuar la búsqueda de otros métodos de control de la roya, que además favorezcan el ambiente mediante el uso mínimo de fungicidas, se abre la puerta a la implementación de los inductores de resistencia.

Los Inductores de resistencia (IRs) son compuestos extraídos y sintetizados a partir de plantas, microorganismos y/o animales (Fernandes *et al*, 2014), los cuales estimulan el sistema de defensa de las plantas a través de elicitores o moléculas que imitan el ataque de un patógeno (Burketova *et al*, 2015). La base de su funcionalidad recae sobre el mismo principio de activación de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR por sus siglas en inglés) o la Resistencia Sistémica Inducida (ISR por sus siglas en inglés) una vez que las plantas están bajo el ataque de un patógeno o insecto con ciclo de vida específico (necrotrófico, hemi-biotrófico, biotrófico, etc) (Llorens *et al*, 2017).

De manera general, cabe resaltar que el SAR se ha caracterizado por la señal endógena que ocurre dentro de la planta gracias al aumento de la disponibilidad de ácido salicílico, que posteriormente incide sobre acumulación de genes PR y la cascada de reacciones como la respuesta hipersensitiva (Pathogenesis Related por sus siglas en inglés) (Kamle *et al*, 2020; Shine *et al*, 2019)

El uso de los inductores en el cultivo del café ha sido implementado como una estrategia para el control de roya. Por ejemplo, la aplicación de ácido salicílico y fosfito de potasio como IRs ha sido incorporada en programas de control de este patógeno, ya que tienen la capacidad de inducir la Resistencia Sistémica Adquirida (Groves *et al*, 2015), mismo mecanismo de defensa que activa respuestas hipersensitivas producto del ataque de este tipo de hongos hemi-biotróficos (Couttolen *et al*, 2020). Otras investigaciones que involucran las aplicaciones exógenas de ácido salicílico y fosfito de potasio han demostrado

también ser efectivas para el control de la enfermedad de roya y otras relacionadas a través de la activación del SAR (Alemu *et al*, 2018; Lim *et al*, 2020; Ogoshi *et al*, 2013).

Una arista más dentro de la investigación que se ha empleado para corroborar, identificar y caracterizar la activación del sistema de defensa SAR en las plantas de café una vez que son atacadas por el patógeno de roya o cuando se realizan aplicaciones exógenas de inductores de resistencia son las herramientas biotecnológicas. El uso de técnicas como el diseño de librerías de ADNc copia proveniente de hojas de café bajo la infección del hongo, permitió identificar y clasificar secuencias de genes que posteriormente fueron utilizados en otras investigaciones más a fondo (Fernández *et al*, 2004; Guzzo *et al*, 2009; Alvarenga *et al*, 2011).

Además, la implementación de qPCR en tiempo final o real permite corroborar o cuantificar genes ya caracterizados e involucrados en la activación de la defensa. Ejemplo de esto es la investigación de Ramiro y otros (2009) en la cual se cuantificaron las expresiones de varios genes de defensa en dos variedades de café (susceptible y resistente) a través de diferentes momentos de evaluación, posterior a la inoculación con esporas de roya. Una investigación similar fue desarrollada por Diniz y otros (2012) en el cual se realizaron análisis moleculares para cuantificar la expresión de los genes *CaRLK*, *CaWRKY1*, *CaGT*, *CaPR1*, *CaPR10* y otros en plantas de café que también fueron inoculadas con uredósporas de roya. Por otro lado, el monitoreo de la respuesta de resistencia con la infección por *H. vastatrix* también se ha realizado una vez se apliquen inductores de resistencia, como el realizado por Ganesh y otro (2006) en el cual la aplicación mediante infiltración de ácido salicílico a 0.5 mM, mostró aumento de la expresión de tres genes asociados a la defensa contra el patógeno de roya.

Es necesario entender que aún con el avance constante de las investigaciones en el campo de la fito-protección del café contra el patógeno de roya en las cuales se pueden utilizar de manera conjunta las estrategias de mejoramiento genético, uso de inductores de resistencia y biología molecular, no es posible generar un conocimiento único y aplicable para todos los cultivares y zonas cafetaleras del mundo. Lo anterior, principalmente por la co-evolución existente entre ambos organismos que genera que el hongo de manera acelerada mute para sobrepasar la resistencia de las plantas y por otra parte, por la variedad de cultivares existentes y utilizados en las diferentes zonas cafetaleras del mundo. La disponibilidad de tantas variedades de plantas para cultivar que unos caficultores prefieren y otros no, causa que la dinámica roya-cafeto sea periódicamente cambiante y ante este escenario es imperante mantener la investigación que aumente el conocimiento sobre nuevas maneras para el control de una enfermedad que puede mermar o acabar con la producción completa de países productores.

En nuestro país, el Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE) ente encargado directamente del desarrollo del cultivo introdujo en el 2001 la variedad Obatá, híbrido Sarchimor

proveniente de Brasil como resultado del entrecruzamiento de Villa Sarchí e Híbrido de Timor, sin embargo, fue hasta el 2014 cuando fue puesta a disposición del productor (ICAFE, 2014). El interés por esta variedad recayó por su resistencia a la roya y su potencial de producción en nuestro país. Como consecuencia de esta introducción productores de café se interesaron por el nuevo material genético e iniciaron con la siembra y sustitución de variedades tradicionales como Caturra y Catuaí (con alta susceptibilidad a la roya) que durante muchos años figuraron como las más productivas y exitosas. Sin embargo, posterior a las pruebas realizadas por el ICAFE recomiendan y resaltan con gran importancia que es una variedad altamente demandante en nutrición y sensible a períodos prolongados de sequía (ICAFE, 2014) factores que están directamente relacionados con el estatus de la planta para tener un buen desempeño contra el ataque de la roya.

Es por todo lo expuesto con anterioridad, que ante la situación en la cual los productores de nuestro país cultivan varios materiales con diferentes niveles de resistencia contra el patógeno de roya, se planteó esta tesis de investigación con el objetivo de analizar la dinámica defensiva de las variedades Caturra y Obatá sometidas a la aplicación de ácido salicílico y fosfito de potasio como inductores de resistencia contra la roya del café.

Generar esta información tiene el potencial de entender más a fondo el comportamiento de las variedades que los caficultores tienen a disposición para seguir produciendo y haciendo crecer la industria que trae tantos réditos a la economía del país. Aunado a esto, entender más a fondo y detallado el efecto de la aplicación de alternativas para la protección contra el patógeno de roya como lo son los inductores de resistencia, puede ser de gran utilidad para otorgarle a la operatividad y mantenimiento del cultivo una herramienta que favorezca el medio ambiente por la disminución del uso de compuestos químicos, además de ser una estrategia apegada a los nuevos estándares de calidad que los mercados extranjeros y locales exigen con mayor frecuencia en pro de ofrecer a sus clientes productos finales libres de trazas de compuestos nocivos para la salud..

## Artículo Científico

### **Expresión de genes relacionados al sistema de defensa de dos variedades de café (*Coffea arabica*) mediante el uso de inductores de resistencia contra el patógeno de la roya (*Hemileia vastatrix*)**

Dyan Alberto Morales Samuels<sup>1</sup>, Mónica Blanco Meneses<sup>2</sup>, Federico Albertazzi Castro<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Biología Molecular y Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica

#### **Resumen**

El objetivo de esta investigación fue analizar la expresión 6 genes relacionados con el sistema de defensa café (*Coffea arabica* L.) contra el patógeno de la roya (*Hemileia vastatrix*) al aplicar AS y FP en plantas var. Obatá (reacción incompatible) y Caturra (reacción compatible). Análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR fueron realizados en 5 momentos distintos, posterior a las aplicaciones con los inductores de resistencia e inoculación con el hongo. Producto de la inoculación, niveles de expresión significativos del gen *CaPR1b* se cuantificaron 8 Hdi en ambas variedades, mientras que la mayor acumulación de transcritos en los genes *CaPR10*, *CaR111*, *CaRLK* y *CaGT* en la var. Caturra ocurrió 8 Hdi y en Obatá 12 Hdi. Las aplicaciones individuales de IRs provocaron la expresión de todos los genes, no al mismo nivel causado por la inoculación, sin embargo, su aplicación 12 Hdi tuvo un efecto potenciador de la expresión al elevar los niveles de expresión 24 y 72 Hdi de genes como el *CaWRKY1* en la var. Obatá por acción del FP. Aplicaciones de IRs 12 Hai no evidenciaron de manera contundente favorecer un aumento en la expresión de los genes, únicamente la cuantificación de casos aislados como los genes *CaR111* por la aplicación con FP y *CaRLK* por efecto del AS mostraron tener un efecto preparador (*priming*). Los resultados obtenidos en esta investigación muestran como los niveles y duración de la expresión en plantas de café varían de acuerdo con el tipo de reacción con el patógeno de roya, así como la aplicación exógena en un momento específico de moléculas inductoras de la resistencia, puede favorecer al aumento de la expresión de genes relacionados al sistema de defensa.

#### **Introducción**

La roya del café (*Hemileia vastatrix*) es un hongo fitopatógeno localizado en todas las regiones del mundo dedicadas a la producción cafetalera (Romero *et al*, 2010; Fernández *et al*, 2004). Su incidencia y severidad descontrolada, sobre las plantaciones es el mayor factor limitante para la producción y por ende la causa principal de la pérdida de millones de dólares anuales (Talhinhas *et al*, 2017) en países como Costa Rica, donde la producción representa aproximadamente un 3,5 por ciento del total de exportaciones y más del 27 por ciento de todas las exportaciones agropecuarias (ICAFFE, 2016). Ejemplo de esto fueron las crisis sufridas por países latinoamericanos como Colombia y Costa Rica, durante 1987-88 y los períodos 1989-90 y 2013 respectivamente, cuando los precios del café alcanzaron un precio muy bajo (50-75 dólares/46 Kg de café) (Avelino *et al*, 2015, La Gaceta, 2013).

El combate y la prevención de la propagación del hongo en las plantaciones se realiza mediante prácticas agrícolas como el monitoreo, la poda, el combate de malezas que alberguen esporas del hongo, el sombreado con árboles, el control biológico con hongos hiperparásitos, la aplicación de fungicidas preventivos y sistémicos que evitan la germinación de las esporas (Arneson, 2000; ICAFE, 2011; Zambolin, 2016; Rolz & Cifuentes, 2016) y programas de hibridación (mejoramiento genético) para obtener individuos resistentes a la roya (do Céu Silva *et al*, 2006; Greigh de Brito *et al*, 2010).

De forma específica, el uso de la biotecnología y los programas de mejoramiento genético han sido herramientas empleadas para el desarrollo de plantas de café con características de mayor productividad o resistencia a patógenos (van der Vossen *et al*, 2015). Debido a la reducida variabilidad genética de las plantas de la especie arábica, se implementó el uso de plantas de Híbridos de Timor (HdT), hibridación interespecífica con *C. canephora*, como fuente o material para la generación de nuevos individuos introgresivos como los Catimores o Sarchimores, estos dos últimos con características de resistencia al ataque de roya (Herrera & Lambot, 2017). Ejemplo de lo anterior es la variedad Obatá Rojo, introgresión Sarchimor generada a partir del retrocruzamiento entre el cultivar Villa Sarchí CIFC 971/10 (*Coffea arabica* L. del grupo Borbón) y el HdT CIFC 832/2 (Fazuoli *et al*, 2018). Su desarrollo inició en 1967 en el CIFC de Portugal y continuó en Brasil en el Instituto Agronómico de Campiñas, mientras que su introducción a Costa Rica ocurrió en el 2014. Esta variedad se caracteriza por tener una alta productividad (35 quintales/Ha en 6 años) y calidad de tasa y cuando se compara con plantas de la variedad Caturra de muy alta capacidad productiva (64 quintales/Ha) (ANACAFE, 2019), la primera tiene ventaja por su alta resistencia contra el patógeno de roya, por lo cual se vuelve ideal para cultivarse en ambientes donde la mayoría de los materiales vegetativos han perdido gradualmente su capacidad para defenderse contra el hongo.

A pesar de lo anterior, Várzea *et al*. (2009) mencionan que existen distintos niveles de introgresión en las poblaciones de sarchimores, lo que permite entender que la resistencia a la roya de estos cultivares en una región específica, no es un indicador de resistencia global. Esto último subraya la necesidad de continuar realizando investigaciones y experimentos que permitan corroborar el nivel de resistencia de este tipo de cultivares en diferentes zonas, donde el factor ambiental puede jugar un papel importante en la dinámica genética, tanto de la roya como de las plantas que se pretenden introducir para usos comerciales.

Además, de los métodos de protección ya explicados, existe otro recurso ampliamente utilizado en cultivos como las hortalizas, la aplicación de inductores de resistencia (IRs). Los IRs son compuestos extraídos de organismos vivos como plantas y/o animales, o formulaciones sintéticas (Fernandes *et al*, 2014) con la capacidad de actuar directamente contra el patógeno o de activar la dinámica defensiva de la planta a través de respuestas bioquímicas (Hammerschmidt, 2014) además, provee una alternativa al uso de agroquímicos para favorecer la protección ambiental y humana (Reglinski *et al*, 2014; Fernandes *et al*, 2014).

Compuestos empleados como IRs son el ácido salicílico y las sales inorgánicas de potasio derivadas del ácido fosfórico (Gozzo & Faoro, 2013). El ácido salicílico (AS) es una hormona inducida por el estrés y es uno de los componentes principales de la vía de defensa conocida como

Resistencia Sistémica Adquirida (SAR por sus siglas en inglés) contra patógenos (Groves *et al*, 2015). En el cultivo de café, análisis proteómicos de fluidos apoplásticos extraídos de hojas, bajo interacciones compatibles e incompatibles contra *H. vastatrix*, mostraron la regulación y desregulación de quitinasas y osmotina, proteínas relacionadas a patógenos, ambas de la vía SAR (Guerra-Guimarães *et al*, 2015). En la planta modelo *A. thaliana* se identificaron 4 genes codificantes de proteínas receptoras de quinasas (RLK por sus siglas en inglés), los cuales poseen en sus regiones promotoras elementos que son reconocidos por proteínas WRKY, todo esto una vez que la planta se encuentra bajo el ataque de patógenos y la síntesis de AS (Du & Chen, 2000).

Por otra parte, el fosfito de potasio (FP) ha sido caracterizado por su efecto fungicida sobre hongos del grupo de los oomicetos en cultivos como el eucalipto y como elicitador de la vía de defensa SAR (Jackson *et al*, 2000). La investigación de Monteiro *et al*. (2014) menciona que la aplicación de fosfitos involucra cambios en actividades enzimáticas de las plantas (compuestos fenólicos y especies reactivas del oxígeno), mientras que Eshraghi *et al*. (2011) demostró que plantas de *A. thaliana* expresaron mayores niveles de transcripción de los genes PR1 y PR5 de la vía del AS.

Lo anterior, permite entender que ambos compuestos se caracterizan por la activación de genes relacionados con la Resistencia Sistémica Adquirida, resistencia autónoma de todas las plantas. Es por ende que bajo esta premisa, investigadores han realizado estudios donde se aplican IRs en plantas de café, con el objetivo de entender su efecto sobre la expresión de genes de defensa a través de metodologías de análisis moleculares (Fernandes *et al*, 2014; Monteiro *et al*, 2016). Ejemplo de esto, fue el análisis de expresión de genes de defensa contra la roya (qPCR-RT) en la variedad Caturra, en el cual se concluyó que los genes codificantes de proteínas *CaNDR1* y *CaR111* y el factor de transcripción *CaWRKY1* son activados en diferentes momentos de la infección de roya y en distinto grado dependiendo del tipo de reacción sobre la planta hospedera (compatible o incompatible) (Ganesh *et al*, 2006). Así mismo, Fernández *et al* (2004) desarrollaron una biblioteca de genes involucrados en las vías de defensa, donde resaltan *CaGT*, gen involucrado en el proceso de glucosilación del AS, *CaRLK*, gen codificante de la proteína-receptor del tipo quinasa para la identificación de elicitores que arriban a las células y *CaPR10* que forma parte de la gran familia PR caracterizada por responder a la patogénesis en las plantas, todos estos expresados en períodos y prolongaciones distintas, una vez que el patógeno de roya infecta la planta y estudiados con mayor detenimiento en los trabajos de Ramiro *et al* (2009), Diola *et al* (2011) y Prakash *et al* (2004).

A pesar de todo lo ya expuesto, en los países cafetaleros existen diferentes cultivares que son utilizados debido a su productividad y su grado de resistencia contra la roya, razón por la cual permanece aún sin investigarse la expresión de genes de defensa de todas las variedades e híbridos. Así mismo, la gran cantidad de materiales genéticos utilizados por la industria cafetalera provoca que existan vacíos de conocimiento sobre el efecto de la aplicación de los inductores de resistencia, los cuales poseen el potencial para activar la defensa contra *H. vastatrix*, característica que incidiría en su rol para ser incorporados en las estrategias de fitoprotección para el sector productor de café.

Es por ende, que esta investigación plantea utilizar dos variedades de café, Caturra de uso común en Costa Rica, porte enano, buen potencial de rendimiento y alta susceptibilidad a la roya según la escala desarrollada por World Coffee Research (2018), y Obatá que desde el 2014 fue

colocada a disposición de los productores por parte del Instituto del Café de Costa Rica, debido a su característica de resistencia contra el mismo hongo. Ambas variedades serán evaluadas en a través del tiempo con el objetivo de observar la acción del fosfito de potasio y ácido salicílico, sobre la expresión de varios genes involucrados en la defensa de la planta contra la roya.

## **Objetivo general**

Analizar la expresión de genes del sistema de defensa de dos variedades de café (*Coffea arabica* L.) contra el patógeno de la roya (*Hemileia vastatrix*) al aplicar dos inductores de resistencia.

## **Objetivos específicos**

1. Analizar la expresión de genes asociados a la inducción de la defensa en plantas de dos variedades de *Coffea arabica* L. al aplicar dos inductores de resistencia.
2. Determinar la duración del período de inducción de la defensa de dos variedades de la planta *Coffea arabica* L. posterior a las aplicaciones de dos inductores de resistencia.

## **Metodología**

### **Sitio experimental**

Los objetivos experimentales planteados en este trabajo fueron realizados en los invernaderos y Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección del Centro de Investigación en Protección de los Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica.

### **Material vegetal**

Las plantas utilizadas para esta investigación correspondieron a *Coffea arabica* L. de las variedades Caturra (*C. arabica* L. del grupo Borbón) y Obatá, introgresión Sarchimor proveniente del cruce Villa Sarchí CIFC 971/10 (*Coffea arabica* L. del grupo Borbón) y el HdT CIFC 832/2 (Fazuoli et al, 2018). Ambas variedades fueron adquiridas a través del Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE). Para la siembra, 1 Kg de semilla de cada variedad fue tratado con Captan 80 WG (Adama Agricultural Solutions Ltd.) para evitar la infección de hongos y fueron distribuidas en 1 m<sup>2</sup> y cubiertas de hojas secas para el proceso de germinación. Una vez finalizado el proceso de germinación (8 semanas), se seleccionaron por criterio visual plántulas vigorosas con tallos verdes y rectos, y radículas saludables de color blanco.

Las plántulas fueron trasplantadas en bolsas plásticas de color negro, con una medida de 15,2cm x 20,32cm (con huecos para el drenaje de agua) con sustrato conformado por suelo autoclavado, abono orgánico y granza de arroz en una proporción porcentual 50-25-25, respectivamente (ICAFFE, 2011).

Una vez que las plántulas desarrollaron el primer par de hojas verdaderas, se iniciaron las aplicaciones mensuales de fertilizantes: 2 g/bolsa de fertilizante fórmula 10-30-10 colocado en una

sola aplicación, en los meses 1 y 2 después del trasplante y 2 g/bolsa de 10-50-0 aplicado una única vez al inicio de los meses subsecuentes. Con el objetivo de evitar el desarrollo de la enfermedad de mal de talluelo (*Rhizoctonia solani*, *Pythium spp.* o *Fusarium spp.*) antes del trasplante, se realizó sobre el sustrato, una sola aplicación antes del trasplante del fungicida *Rizolex* de la casa comercial Kenogard (i.a: metil-tolclofos) en una proporción de 40 g/galón/m<sup>2</sup> (ICAFE, 2011).

El proceso de trasplante y crecimiento hasta los 6 meses de edad fue llevado a cabo en las casas de mayas del ICAFE y posteriormente, 30 plantas de cada variedad fueron trasladadas a los invernaderos del CIPROC en la Sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica y se mantuvieron en este ambiente hasta la culminación de las pruebas experimentales.

### **Obtención, germinación e infección del inóculo de Roya (*Hemileia vastatrix*).**

La recolección del inóculo de roya (*H. vastatrix*) siguió el protocolo ICAFE- IR-01, en el cual esporas del hongo se recolectaron en las fincas del ICAFE de plantas de la variedad Caturra, portadora del gen de resistencia SH5 y susceptible a la roya raza II de roya (Silva *et al.* 2002). Hojas con abundante roya esporulada, sin presencia del hongo antagonista *Lecanicilium lecanii* y tampoco aplicaciones de fungicidas en dos meses anteriores fueron recolectadas de manera manual, almacenadas en bolsas plásticas herméticas y trasladadas al laboratorio donde se rasparon con un bisturí estéril. Una vez obtenido el inóculo, se almacenó en tubos de centrifuga de 50 mL sellados con algodón y parafilm. Luego estos fueron colocados dentro de un desecador de vidrio que contenía una solución de ácido sulfúrico al 30% y refrigerados a una temperatura entre 5-10°C (Cabral *et al.*, 2009) para asegurar su viabilidad hasta el inicio de las pruebas.

Por otra parte, con el fin de evaluar la viabilidad del inóculo recolectado, se realizó una suspensión con 1 mg de esporas por cada 1 mL de agua destilada (concentración final de 8x10<sup>4</sup> uredinosporas/mL de agua) en un tubo Falcon<sup>TM</sup>. Posteriormente, el tubo fue envuelto con papel aluminio, suspendido en un beaker con agua hirviendo durante 20 min y luego agitado por 5 min, ambos procesos con el objetivo de promover la activación de las uredósporas y generar una solución homogénea (Rojas *et al.*, 1993).

Una vez obtenida la suspensión de esporas, se siguió el método de inoculaciones en discos de hojas (Eskes, 1982) para el cual se colectaron hojas durante las primeras horas de la mañana (6:00-8:00 am). Usando un cortador metálico circular de 1,8 cm de diámetro se obtuvieron 50 discos de cada variedad y se colocaron (con el envés hacia arriba) en cajas plásticas (48x64x10 cm) que contenían una malla metálica y papel toalla humedecido con agua (Figura 1). Seguidamente, con un spray los discos fueron humedecidos con agua y con una pipeta graduada sobre los mismos, se colocó una gota de 25 µL de la suspensión de roya, la cual uniformemente se esparció por todo el disco debido al humedecimiento previo con agua. Finalmente, la caja fue cubierta con plástico transparente y ubicada en una incubadora YIDHER LE-509D durante 48 horas en oscuridad a 22 ± 2°C. Cumplido el tiempo de incubación, la caja se extrajo de la incubadora y el plástico fue removido durante 1 hora para permitir que los discos de hoja se secan levemente (para prevenir el desarrollo de otros microorganismos perjudiciales). Finalizado este período, se verificó el estado de humedad

del papel toalla y nuevamente, la caja fue hermetizada con papel plástico y colocada en un régimen de luz natural durante 25-30 días para favorecer el desarrollo de *H. vastatrix*.



Figura 1. Discos de hojas de plantas var. Obatá y Caturra inoculados con una solución de esporas de *H. vastatrix* utilizando el método de Eskes (1982).

Dado que el plástico que cubría la caja era transparente, los discos eran vigilados diariamente y luego de 30 días, se cuantificaron de manera visual el número de discos con la esporulación típica anaranjada del hongo. Un porcentaje superior al 80% de discos esporulados fue indicativo de un inóculo sano y adecuado para emplear en las pruebas *in vivo* posteriores. Cuando discos de hojas fueron observados con otro tipo de esporulación (particularmente blanca por el hongo antagonista) el inóculo fue desechado y por ende, una nueva recolección y prueba de germinación era iniciada.

### Diseño experimental de plantas *in vivo*

Una vez que todas las plantas desarrollaron abundante follaje (6-8 meses de edad) se dividieron según la variedad y se colocaron sobre mesas de invernadero. Con el objetivo de mantener las plantas en condiciones de desarrollo óptimas, un sarán fue colocado sobre el techo del invernadero para brindar sombra de manera uniforme, mientras que platos hondos llenos de agua aseguraron la hidratación del suelo mediante absorción por capilaridad y 2 aspersiones diarias (8:00 am y 4:00 pm) mantuvo hidratado el follaje.

Cada grupo de plantas (anteriormente separadas por variedad) fue etiquetado según el tratamiento con inductores de resistencia (IRs), ácido salicílico puro y fosfito de potasio (Fosfo-K Extra de la casa comercial Greenplants®). Así mismo, cada tratamiento fue segregado en los siguientes sub-tratamientos, que variaron de acuerdo con la inoculación con *Hemileia vastatrix* (HV) o momento de aplicación del IR:

1. [ST1] Testigo absoluto: sin aplicaciones de IR o inoculación de *Hemileia vastatrix*.
2. [ST2] +HV: plantas inoculadas con *H. vastatrix*.
3. [ST3] +IR: plantas aplicadas con el inductor de resistencia.
4. [ST4] +IR (12D) /+HV: plantas aplicadas con el inductor de resistencia, 12 horas después de la inoculación con *H. vastatrix*.
5. [ST5] +IR (12A) /+HV: plantas aplicadas con el inductor de resistencia, 12 horas antes de la inoculación con *H. vastatrix*.

Cada uno de los sub-tratamientos tuvo 3 plantas que fungieron como repeticiones biológicas (población de 30 plantas por variedad de café), las cuales fueron colocadas en bloques completos al azar para asegurar la homogeneidad de condiciones ambientales para todas las plantas.

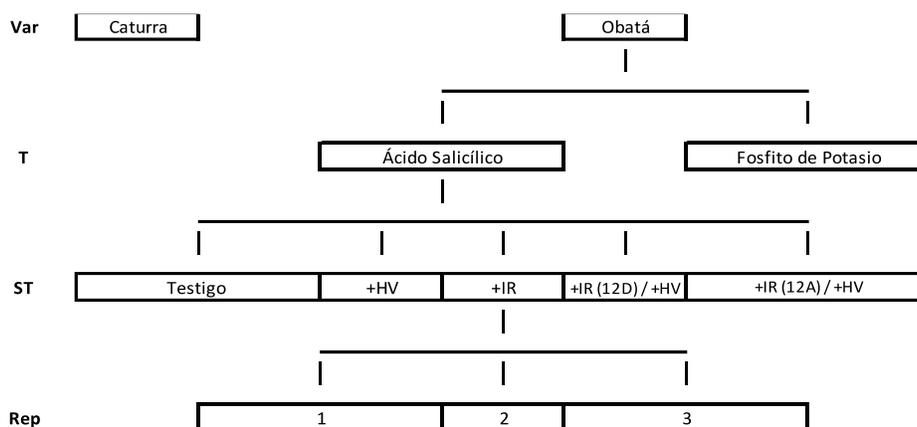


Figura 2. Esquema organizacional de las unidades experimentales. \*El ejemplo desarrollado con el tratamiento de ácido salicílico fue el mismo utilizado en fosfito de potasio y ambos tratamientos se realizaron también en la variedad Caturra. Var: Variedad, T: Tratamiento, ST: Sub-tratamiento, Rep: Repetición.

El procedimiento de inoculación *in vivo* del hongo de roya se realizó en las plantas del sub-tratamiento 2, 3 y 4 (ST2, ST3 y ST4). De la misma forma que en la prueba de viabilidad, se preparó una suspensión con una concentración de  $8 \times 10^4$  uredinosporas/mL de agua (verificado mediante el conteo con cámara de Neubauer) y siguiendo el protocolo de inoculación de roya del ICAFE, se colocaron sobre el envés de hojas jóvenes-completamente desarrolladas, 6 gotas de 25  $\mu$ L que se extendieron cuidadosamente con una cuchara de cerámica. El total de plantas inoculadas, fueron distribuidas y albergadas, durante 18 horas dentro de cámaras de germinación caseras (Figura 3). Estas cámaras fueron construidas con madera y fueron recubiertas con malla anti-áfidos para favorecer una buena ventilación y posteriormente con plástico negro para mantener la oscuridad durante el período necesario que permitió la germinación del hongo. Durante esta etapa, las plantas fueron asperjadas con agua a través de riego manual para asegurar la humedad de la hoja y finalizado el tiempo, las mismas fueron retiradas y colocadas en un régimen de luz ambiental.



Figura 3. Cámara de germinación casera construida con madera, malla anti-áfidos y recubierta con plástico negro para introducir plantas de café durante el período de inoculación de roya.

Por otra parte, la dosis de aplicación de ácido salicílico fue preparada a una concentración de 0.5 mM, mientras que el fosfito de potasio Fosfo-K Extra, de la casa comercial Greenplants, (40% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 39% K<sub>2</sub>O) a 5 mL/L. Ambos compuestos fueron asperjados sobre la totalidad del follaje de las plantas con un atomizador doméstico. La aplicación de los inductores de resistencia en el tratamiento +IR, se realizó de forma paralela al momento de inoculación de roya en el tratamiento +HV, mientras que en los tratamientos +IR (12D) /+HV y +IR (12A) /+HV, se realizaron 12 H posterior y 12 H antes de la inoculación de las esporas, respectivamente.

#### **Cuantificación y determinación del tiempo de expresión de los genes asociados a la dinámica defensiva de dos variedades de café.**

La respuesta de los genes de defensa como resultado de las aplicaciones de los inductores de resistencia e inoculación de *H. vastatrix*, se cuantificó mediante el ARNm extraído y luego retro-transcrito a ADNc de los genes *CaPR1b*, *CaPR10*, *CaR11*, *CaWRKY1*, *CaRLK*, *CaGT* y *CaUbiquitin* (gen de normalización), empleados en el estudio de la respuesta defensiva del café contra la roya según Ramiro *et al.* (2009).

Cuadro I. Genes relacionados al sistema de defensa de *Hemileia vastatrix* bajo la infección del patógeno de roya, número de accesión y secuencia de imprimadores utilizados para qPCR-RT.

Gen	No. Accesión	BLASTX ID	Secuencia de Primer 5'-3'
<i>CaPR1b</i> <sup>a</sup>	DQ335594	PR1b (At2g14610) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	F-GATTACCTGGACGCCATAA R-GCTGCCAGGTTTTCTCCATA
<i>CaPR10b</i>	CF589103	>emb CAC16166.1  Pathogenesis-related protein 10 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	F-GCCACCATCCTTGAAGAGAA R-CAACTCTCTGCTTGGCAGTCT
<i>CaR111b</i>	CF589193	>gi 11280502  Hypothetical protein F14F18.180 [ <i>A. thaliana</i> ]	F-TCCAAATCGCTTCGACACC R-GTTGCGGTTTGTATATGGAGATTG
<i>CaWRKY1b</i>	CO773974	>gb AAL11009.1  WRKY31 transcription factor [ <i>A. thaliana</i> ]	F-TGCAACAAGGACAGCACCAG R-CGTGATCGCGGCCGT
<i>CaRLKb</i>	CF589181	gi 20521419  Putative receptor-like kinase [ <i>O. sativa</i> ]	F-ATGGGAGAAAAGAATGGCAGAAG R-GGCCAATTACAGTTTGAAAACACC
<i>CaGTb</i>	CO773975	gb AAF61647.1 glucosa- UDP: ácido salicílico glucosiltransferasa [ <i>N. tabacum</i> ]	F-ACTCCAGCAACAACCACCATTA R-GAGACGTCTTGCAAGGTTTTGA
<i>CaUbiquitina</i> <sup>a</sup>	AF297089	gb AAF70460.1  polyubiquitin [ <i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i> ]	F-AACATTGAGGGTGGTTCTGTTC R- GCAGAAAACCAACTAAGACCTAACA A

<sup>a</sup>Ramiro *et al.* (2009)

<sup>b</sup>Fernandez *et al.* (2004)

Una vez culminado el proceso de inoculación del hongo de roya (18 horas), se realizaron diferentes tiempos (horas) de muestreo pos-inoculación (Hdi) 8, 12, 24, 72 y 360 horas (15 días). Para esto, hojas inoculadas con la suspensión fueron desadheridas de cada planta y se colocaron en sobres de aluminio identificados (Figura 4), en los cuales se adicionó aproximadamente 100 mL de nitrógeno líquido para preservar las muestras que fueron almacenadas en un congelador a -80°C hasta el momento en que se llevó a cabo la extracción de ARN por el método CTAB optimizado por Barbosa de Paula *et al.* (2012).

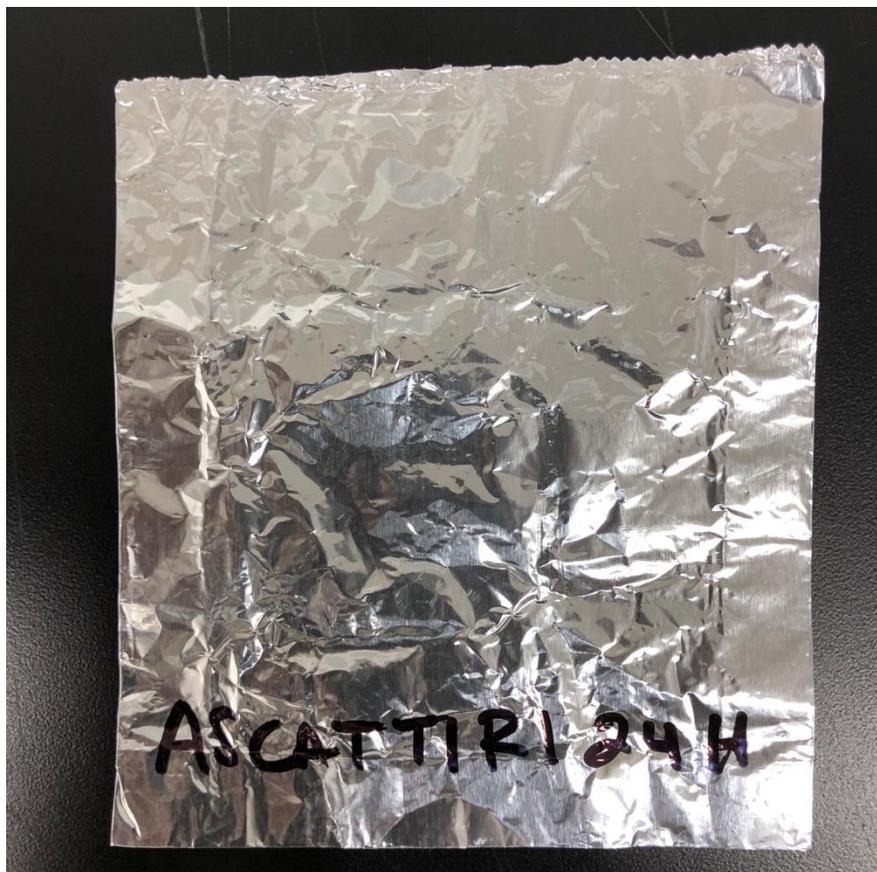


Figura 4. Sobre de aluminio empleado para el almacenamiento de las hojas de cafeto de los tratamientos en cada momento de muestreo, posterior a la adición de nitrógeno líquido para su conservación.

*Método de mini-extracción de ARN CTAB*

1. Posterior al muestreo, congelamiento y almacenaje de hojas recolectadas, se cortó un trozo de aprox. 10 cm<sup>2</sup>, al cual se le adicionó nitrógeno líquido en un mortero cerámico para tritarlo con un pistilo del mismo material.
2. El material triturado se colocó en un tubo plástico Eppendorf de 2 mL y 400 µL de solución tampón de extracción (Cuadro II) + 4 µL de Beta-Mercaptoetanol que se adicionaron para continuar con el proceso de extracción.
3. Cada muestra se incubó por 20 minutos a 55°C.
4. Luego se adicionaron 150 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
5. Posteriormente, se procedió a centrifugar los tubos durante 5 min a 7500 rpm a temperatura ambiente.
6. Culminada la centrifugación, aprox. 300 µL del sobrenadante fue recolectado y transferido a un nuevo tubo plástico Eppendorf de 2 mL.
7. Seguidamente, se adicionó el mismo volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) del paso 4 y se repitieron los pasos 5 y 6.
8. El sobrenadante obtenido en el último paso (entre 250-280 uL) se transfirió a un nuevo tubo y se añadió el volumen necesario de cloruro de litio 8M para obtener una concentración final de 2.5M.

9. Las muestras se refrigeraron a 4°C durante toda la noche o un tiempo de 12 horas o más para el proceso de precipitación.
10. Culinado el período de precipitación, los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 13000 rpm a 4°C.
11. Posteriormente, el sobrenadante se descartó con cuidado de no perder el pellet formado en el fondo del tubo.
12. Una vez el tubo vacío, se volvió adicionar 100 µL de cloruro de litio a concentración 2.5 M para eliminar posibles residuos de contaminantes.
13. Seguidamente se realizó una centrifugación por 15 minutos a 13000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.
14. Culinado el paso con LiCl, se adicionaron 100 µL de etanol al 70% y un nuevo ciclo de centrifugación a 13000 rpm por 10 min a 4°C se llevó a cabo.
15. Luego el sobrenadante fue eliminado nuevamente esta vez empleando una pipeta para asegurar la conservación del pellet.
16. Finalmente, el pellet de ARN fue resuspendido en 30 µL de buffer TE 1X.
17. Culinada toda la extracción las muestras se almacenaron a -20°C, hasta llevar a cabo los procedimientos restantes.

Cuadro II. Lista de reactivos y sus respectivas concentraciones utilizados para la preparación de 100 mL de buffer de extracción.

Reactivo	Concentración
CTAB	2% (m/v)
PVP	2% (m/v)
Tris-HCl	0.1 M pH 7.8
EDTA	0.02 M pH 8
NaCl	1.4 M

Las muestras de ARN obtenidas del proceso anterior fueron sometidas al tratamiento con DNasa *RQ1* de la marca Promega Corp. para asegurar la obtención de ARNs totales libres de ADN.

*Tratamiento con DNasa, Retro-transcripción y cuantificación qPCR tiempo real*

1. Una alícuota de 20 µL de ARN, 2 µL de la enzima y 2.2 µL del buffer incluido en el kit fueron adicionados en un tubo plástico Eppendorf.
2. Los tubos fueron incubados en seco por 30 minutos a 37°C.
3. Posteriormente, se adicionaron 2 µL de solución inactivadora de DNasa.
4. Finalmente, las muestras se colocaron nuevamente en una incubadora en seco a 65 °C por 10 minutos.

La calidad y cantidad de los ARN fueron evaluados mediante un espectrofotómetro Nanodrop y posteriormente, 11 µL de ARN fueron utilizados para sintetizar ADNc siguiendo las instrucciones del kit de retrotranscripción *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific™) a un volumen final de 20 µL.

El proceso de qPCR en tiempo real se realizó por triplicado en cada muestra utilizando placas de 96 pozos, en los cuales se adicionó 2 µL de ADNc, 1 µL de primer F y R según el gen analizado, 6.25 µL del Master Mix SYBR Green (2X) y 2.25 µL de agua ultrapura, todo lo anterior según el manual de instrucciones del kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCRMater Mix (2X)* (Thermo Scientific™) para un volumen total de 12.5 µL. Las condiciones del termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems de Thermo Scientific™) para la amplificación del ADNc consistieron en 1 ciclo de 5 min de activación de la polimerasa a 95°C y 40 ciclos a 95°C por 15 seg, 60°C por 20 seg y 72°C por 40 seg (Ramiro *et al.* 2009). La especificidad de los productos de PCR obtenidos posterior al proceso se corroboró de acuerdo con el análisis de las curvas fusión.

Los valores de *Ct* (triplicados por cada repetición biológica) cuantificados por el termociclador fueron promediados y posteriormente se empleó la fórmula  $fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{gen\ objetivo} - Ct_{Ubiquitina})_{muestra} - (Ct_{gen\ objetivo} - Ct_{Ubiquitina})_{control}$ , para obtener los datos de cuantificación relativa de los genes investigados, respecto al gen de normalización de Ubiquitina.

Una vez obtenidos los valores de cuantificación relativa se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de Tuckey para determinar las diferencias significativas de la expresión a través de los tiempos de muestreo en el mismo tratamiento de cada variedad e IR.

Cuadro III. Esquema organizacional de los tiempos y procedimientos realizados en los tratamientos de la investigación “Expresión de genes relacionados al sistema de defensa de dos variedades de café (*Coffea arabica*) mediante el uso de inductores de resistencia contra el patógeno de la roya (*Hemileia vastatrix*)”.

	Procedimiento	Aplicación / Inoculación		Muestreo (Hdi)				
		Compuesto / Organismo	IR/HV	8	12	24	72	360
	Tiempo	12 Hai	18 h inoculación					
Tratamiento	T1: Testigo	-	-	X	X	X	X	X
	T2: +HV	-	X	X	X	X	X	X
	T3: +IR	-	X	X	X	X	X	X
	T4: +IR (12D) / +HV	-	X	X	X (aplicación IR)	X	X	X
	T5: +IR (12A) / +HV	X	X	X	X	X	X	X

\*Hai: horas antes de la inoculación; Hdi: horas después de la inoculación; IR: Inductor de Resistencia; HV: *Hemileia vastatrix*.

## Resultados

### Expresión de genes asociados a la dinámica defensiva de dos variedades de café

De forma general es posible indicar que la inoculación con el hongo de roya en las plantas de cafeto provoca el aumento de la expresión de todos los genes cuantificados en esta investigación. El nivel y patrón de expresión de los genes en relación con la expresión del gen “housekeeping” de Ubiquitina varió de acuerdo con el tiempo de muestro y variedad de la planta (reacción compatible o incompatible). Por otro lado, la aplicación en forma de aspersión de los inductores de resistencia (IRs) generó también la expresión de los genes de defensa, en algunos casos al mismo nivel o superior que

la inoculación del hongo. Cabe destacar que se evidenció una respuesta distinta en los niveles de expresión dependiendo del IR utilizado, así como cuando se aplicó individualmente o en conjunto con la inoculación del hongo de roya. Para el análisis e interpretación de los resultados es necesario observar ambas figuras (un IR en cada uno) en cada gen, con el objetivo de observar el comportamiento de la acumulación de transcritos en los tratamientos dependiendo del IR utilizado. Cada figura presenta los mismos tratamientos, no obstante, el promedio que cada barra representa corresponde al promedio de 3 repeticiones en plantas distintas, por lo que es posible observar variaciones en los niveles de expresión aun comparando el mismo tratamiento de los dos IRs (ejemplo comparar la expresión del ST2 de la var. Caturra en las figuras de AS y FP en la evaluación 8 Hdi).

### ***CaPR1b***

La expresión del gen *CaPR1b* asociada a la inoculación con el hongo de roya en la var. Obatá (Oba) fue mayor que en la var. Caturra (Cat), los valores 8 Hdi reflejan una rápida respuesta al reconocimiento de una posible infección en ambas variedades, alcanzando la acumulación más alta de transcritos de todas las evaluaciones, 106 y 78 veces más que el gen control, respectivamente. Durante las siguientes horas de evaluación, 12, 24, 72 y 360 H, los niveles de expresión permanecieron más altos en plantas de Obatá; sin embargo, en ambas variedades los niveles decayeron hasta la evaluación final. La aplicación de AS y FP (ST3) generaron un aumento en la expresión del gen en ambas variedades de plantas, siendo más efectivo durante las primeras 8 h el AS en la var. Caturra (11 veces más). Por su parte, el FP provocó la mayor expresión del gen en ambas variedades, sin embargo, son las plantas de la var. Obatá durante las 12 y 24 horas que alcanzan los niveles de transcritos más altos (24 y 16 veces más, respectivamente). Así mismo, la aplicación de los IRs en el ST4 (+IR (12D) /+HV) reflejó un efecto sobre el aumento de expresión del gen en ambas variedades de café (valores mayores que en el ST2). En la evaluación de la expresión del gen *CaPR1b* 24 Hdi en la var. Caturra producto de la aplicación con AS, mientras que en la evaluación 72 Hdi, se cuantificó un incremento en ambas variedades de café con la aplicación de AS y FP. Por otro lado, la aplicación de los IRs en el ST5 (+IR (12A) /+HV) no mostraron tener efecto en los niveles de expresión a través de las evaluaciones, puesto que los valores cuantificados son similares o menores a los obtenidos por la inoculación con el hongo.

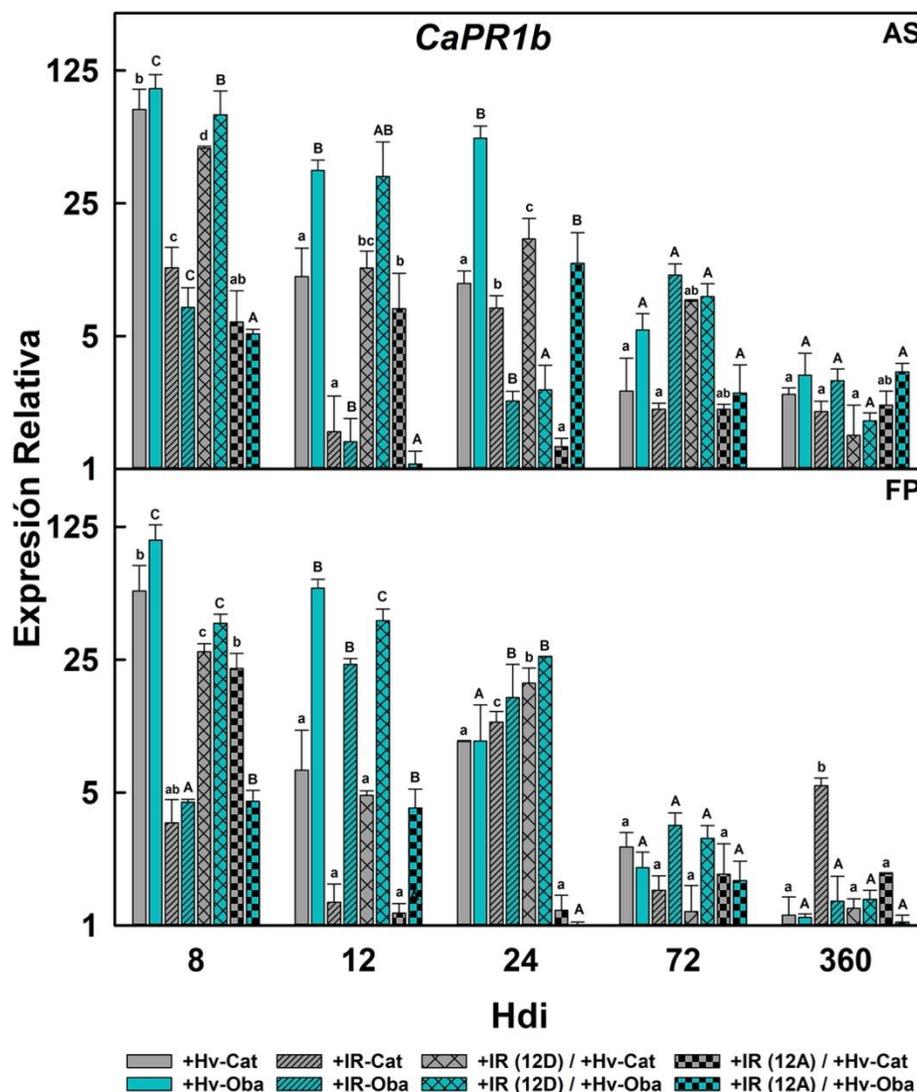


Figura 5. Análisis de expresión relativa del gen *CaPR1b* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) / +HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) / +HV Cat-Oba).

\*Las barras de expresión relativa del gen representan el promedio de transcritos acumulados respecto al gen *CaUBiquitina* utilizado como control interno, en comparación con hojas de plantas del **ST1**: tratamiento control que no fue inoculado, ni asperjado con IRs. Los valores con barras de error con la misma letra (mayúsculas para var. Obatá y minúsculas para var. Caturra) no son significativamente diferentes dentro del mismo tratamiento a través del tiempo según la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ ).

### *CaPR10*

Los niveles de expresión del ARN del gen *CaPR10* producto de la inoculación con HV (ST2) fueron superiores a través de las evaluaciones en plantas var. Caturra, su pico máximo se alcanzó 8

Hdi (79 veces más), mientras que en Obatá se alcanzó 12 Hdi (37 veces más). Ambas variedades de café mostraron una acumulación de transcritos constante (sin diferencias significativas) a través del tiempo, hasta la evaluación final donde se cuantificaron los valores más bajos. Por otro lado, la aplicación individual de los IRs (ST3) generó una menor expresión del gen en comparación con los provocados por inoculación con el hongo, sin embargo, es el FP quien promovió los niveles de expresión más altos en ambas variedades. Además, el efecto de la aplicación de IRs en el ST4, se observó 72 Hdi cuando las plantas var. Caturra y Obatá, respectivamente alcanzan una acumulación de transcritos 43 y 13 veces más que el control por efecto del AS y 15 y 64 por el FP, ambos IRs generando valores considerablemente más altos que los obtenidos en el mismo tiempo de evaluación que las plantas del ST2. Finalmente, la aplicación de los IRs 12 Hai (ST5) no causó un cambio significativo en el patrón de expresión del gen en ambas variedades de café, puesto que la acumulación de transcritos en ambas variedades pareció responder a la defensa intrínseca de las plantas tal como se observa en el ST2 (Fig. 5).

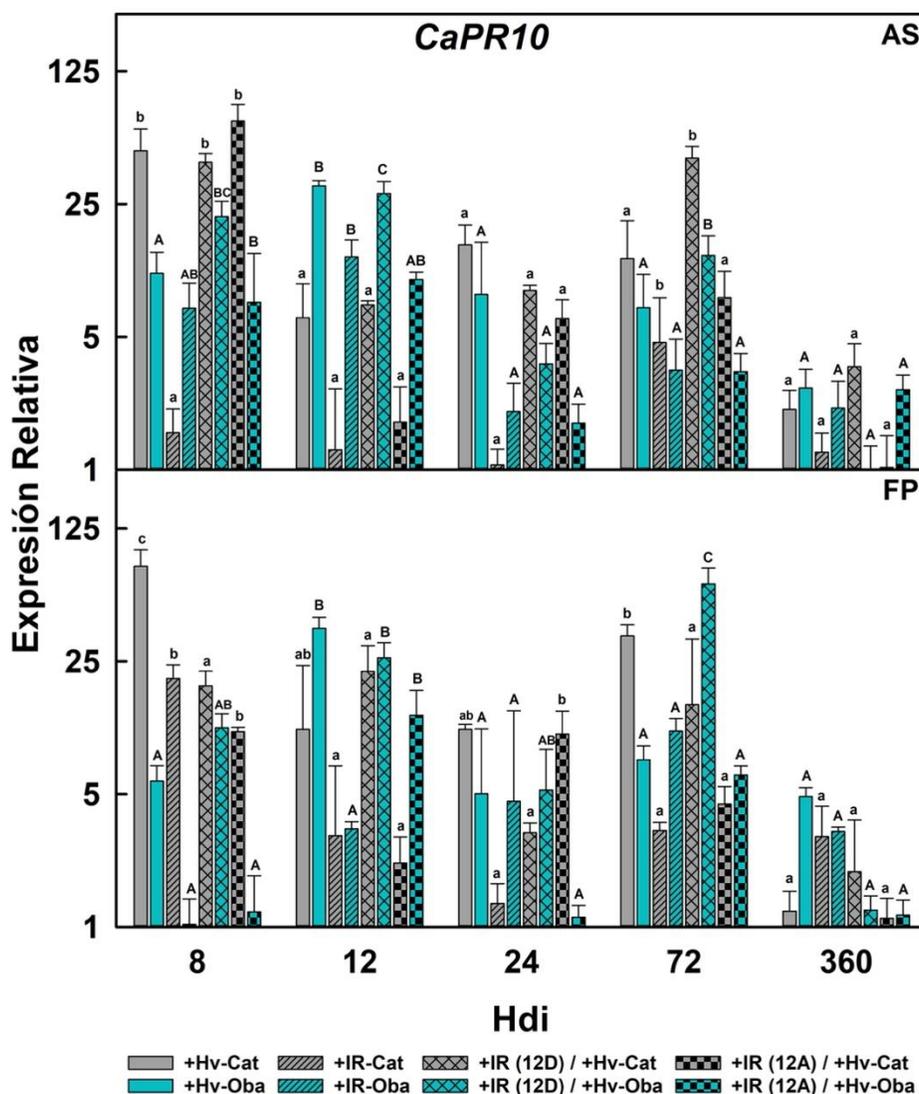


Figura 6. Análisis de expresión relativa del gen *CaPR10* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

\*Las barras de expresión relativa del gen representan el promedio de transcritos acumulados respecto al gen *CaUBiquitina* utilizado como control interno, en comparación con hojas de plantas del **ST1**: tratamiento control que no fue inoculado, ni asperjado con IRs. Los valores con barras de error con la misma letra (mayúsculas para var. Obatá y minúsculas para var. Caturra) no son significativamente diferentes dentro del mismo tratamiento a través del tiempo según la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ ).

### **CaR111**

La acumulación cuantificada más alta del gen *CaR111* en plantas de la var. Caturra como consecuencia del ST2, ocurrió durante las primeras 8 Hdi (6 veces más) y posteriormente, sus niveles disminuyeron causando así que los valores obtenidos en la var. Obatá fueran superiores el resto de las evaluaciones. La acumulación más alta de transcritos en la reacción incompatible se cuantificó 8 y 12 Hdi (4.8 y 3.9 veces más, respectivamente).

La aplicación individual de los IRs en las plantas (ST3) provocó que los niveles de expresión del gen aumentaran respecto al tratamiento control en ambas variedades de café, y a pesar de que los valores cuantificados producto de la aspersión con AS y FP no fueron tan altos durante las primeras horas de evaluación, cuando se comparan con los generados por la inoculación del hongo, si se mantuvieron constantes (sin diferencias significativas) y en algunos casos superiores a los del ST2, incluso 360 hdi. Así mismo, el efecto de los inductores se reflejó en el ST4, donde el AS potenció la acumulación de transcritos en plantas var. Caturra 24 y 72 Hdi (4.4 y 2.9 veces más, respectivamente), y el FP aumentó los niveles de transcritos 72 Hdi en plantas var. Obatá (3.7 veces más); en ambos casos valores superiores a los cuantificados en el mismo tiempo de evaluación y variedad de café del ST2.

De manera similar a otros genes, la respuesta provocada por la aspersión de los IRs 12 h antes de la inoculación (ST5) en ambas variedades de café, no mostró una respuesta significativa y diferenciada en la expresión del gen *CaR111*, ya que los valores cuantificados por lo general fueron menores a los medidos en plantas del ST2, sin embargo y de forma interesante el patrón de expresión es constante a través de las evaluaciones, caso similar a lo ocurrido en plantas del ST3.

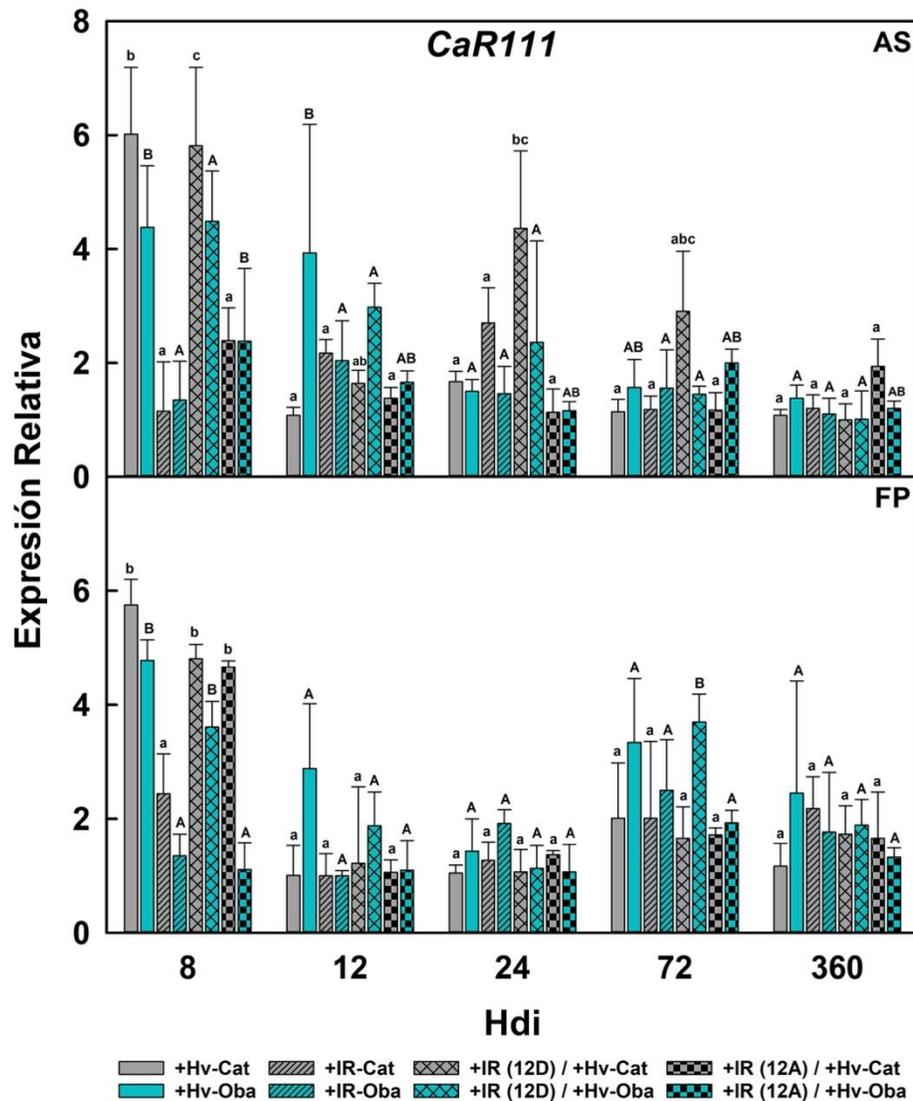


Figura 7. Análisis de expresión relativa del gen *CaR111* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obata (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) / +HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) / +HV Cat-Oba).

\*Las barras de expresión relativa del gen representan el promedio de transcritos acumulados respecto al gen *CaUBiquitina* utilizado como control interno, en comparación con hojas de plantas del **ST1**: tratamiento control que no fue inoculado, ni asperjado con IRs. Los valores con barras de error con la misma letra (mayúsculas para var. Obata y minúsculas para var. Caturra) no son significativamente diferentes dentro del mismo tratamiento a través del tiempo según la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ ).

### **CaWRKY1**

Pertenciente a una familia de factores de transcripción, los niveles de expresión del gen *CaWRKY1* accionados por la inoculación con el hongo de roya (ST2 y en ST4 durante las 2 primeras evaluaciones) se mantuvieron constantes y sin diferencias significativas a lo largo de las evaluaciones. La var. Obatá mostró el nivel de expresión más alto 8 Hdi y sus valores de expresión fueron superiores en 4 de las 5 mediciones, ya que 72 Hdi se cuantificó en plantas var. Caturra la acumulación de transcritos más elevada de todas las evaluaciones (7 veces más) en ambas variedades de café. Por su parte, la aplicación individual de IRs (ST3) promovió la expresión del gen en ambas variedades de café, sin embargo, fue el FP en plantas de var. Obatá el inductor que causó una mayor acumulación de transcritos en todas las evaluaciones. Este comportamiento producto de la aplicación de FP en la misma variedad, se observó 24, 72 y 360 Hdi cuando la expresión fue potenciada hasta alcanzar los niveles más altos de las mediciones del ST4. Por su parte, en plantas var. Caturra, la aplicación con FP o AS no provocó que los niveles de expresión aumentaran a través del tiempo cuando fueron asperjadas 12 antes (ST5) o después (ST4) de la inoculación, por el contrario, en algunas evaluaciones parecen ser reprimidos cuando se comparan con los niveles de expresión del ST2 o simplemente muestran valores que responden a la defensa natural de las plantas.

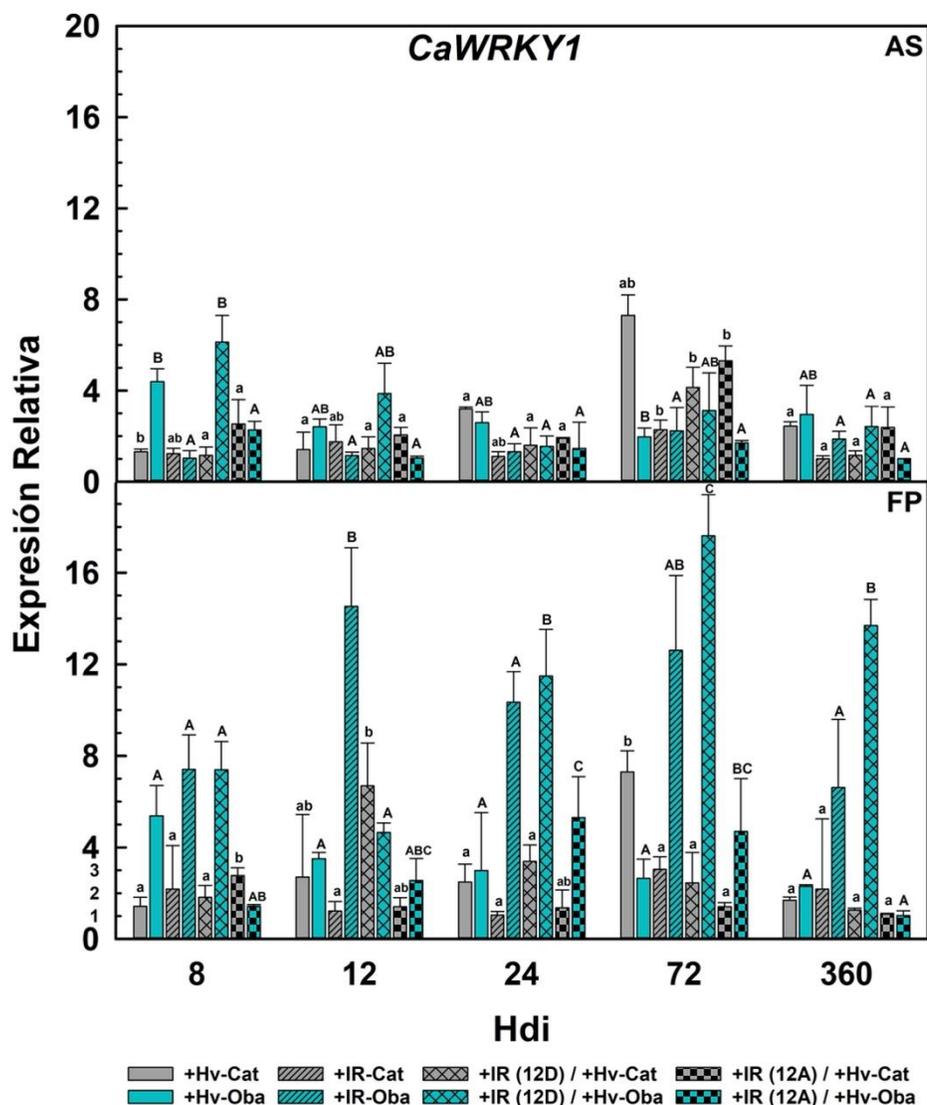


Figura 8. Análisis de expresión relativa del gen *CaWRKY1* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obata (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

\*Las barras de expresión relativa del gen representan el promedio de transcritos acumulados respecto al gen *CaUBiquitina* utilizado como control interno, en comparación con hojas de plantas del **ST1**: tratamiento control que no fue inoculado, ni asperjado con IRs. Los valores con barras de error con la misma letra (mayúsculas para var. Obata y minúsculas para var. Caturra) no son significativamente diferentes dentro del mismo tratamiento a través del tiempo según la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ ).

## ***CaRLK***

Como resultado de la inoculación del hongo de roya (ST2) las plantas de la var. Caturra respondieron con la mayor acumulación de transcritos 8 Hdi (5.9 veces más) en comparación con la var. Obatá (5 veces más). A pesar de lo anterior, las siguientes evaluaciones mostraron que la reacción incompatible (Obatá) es la que generó cuantificaciones superiores, donde destacan dos picos de expresión 12 y 72 Hdi (5.9 y 5.6 veces más, respectivamente). De manera interesante, ambas variedades generaron los niveles más bajos de expresión 24 Hdi y cabe mencionar que aún 360 Hdi tanto la var. Caturra como Obatá siguieron expresando el gen *CaRLK* a un nivel significativamente similar a las 24 Hdi, lo que posiblemente pueda contribuir a combatir la infección de la roya.

Los resultados cuantificados como resultado de la aspersión individual de AS y FP en las dos variedades (ST3), no alcanzaron los niveles de expresión generados por la inoculación del hongo, su efecto sobre la acumulación de transcritos es constante y sin diferencias significativas a través del tiempo. No obstante, su aplicación pareció causar efecto en plantas del ST4, ya que 72 Hdi el AS potenció la expresión 4.7 y 7.4 veces más en la var. Caturra y Obatá, respectivamente. Además, el FP generó un aumento en la transcripción 24 Hdi (3 y 6.3 veces más, var. Cat y Oba respectivamente) y 72 Hdi (3.7 y 6.3 veces más, var. Cat y Oba respectivamente), en ambos tiempos de evaluación niveles mayores a los generados por la infección de roya en el mismo momento de evaluación y variedades, lo que demuestra un aumento y prolongación de la defensa contra el hongo.

Así mismo, ambos IRs aplicados 12 Hai (ST5) no mostraron niveles de expresión con patrones diferenciados a los del ST2, lo que nuevamente permite especular que los valores cuantificados corresponden a la defensa intrínseca de las plantas. Específicamente, los valores de acumulación de transcritos en ambas variedades cuando fueron asperjadas con AS se asemejan a los del ST2, exceptuando la evaluación 72 Hdi donde los niveles son menores a los del T2 y como caso aislado en la cuantificación 360 Hdi donde la var. Obatá mantuvo un nivel de expresión de 3.3 veces más, valor significativamente similar al obtenido 72 Hdi. Por su parte, el efecto del FP parece ser el de disminuir la expresión, puesto que a través de las evaluaciones todos los niveles son inferiores comparados con los del ST2, pero con la tendencia de expresión mostrada en ese mismo tratamiento.

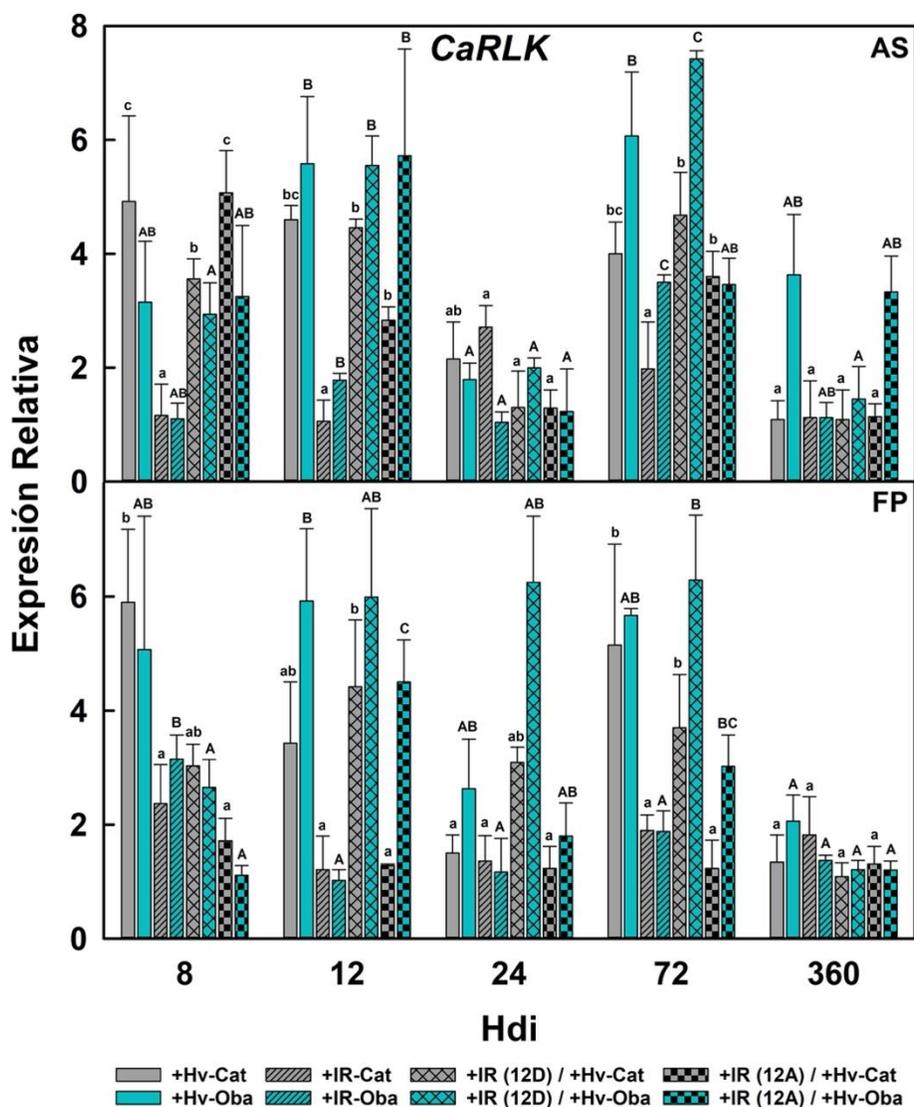


Figura 9. Análisis de expresión relativa del gen *CaRLK* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obata (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) / +HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) / +HV Cat-Oba).

\*Las barras de expresión relativa del gen representan el promedio de transcritos acumulados respecto al gen *CaUBiquitina* utilizado como control interno, en comparación con hojas de plantas del **ST1**: tratamiento control que no fue inoculado, ni asperjado con IRs. Los valores con barras de error con la misma letra (mayúsculas para var. Obata y minúsculas para var. Caturra) no son significativamente diferentes dentro del mismo tratamiento a través del tiempo según la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ ).

## **CaGT**

En este caso, como resultado de la inoculación del hongo sobre las plantas (ST2), el nivel más alto cuantificado en plantas var. Caturra se alcanzó 8 Hdi (7 veces más). Posteriormente, en las evaluaciones 12-360 Hdi los valores de expresión fueron superiores en plantas var. Obatá, siendo las 12 Hdi donde ocurrió el pico de expresión (14 veces más) en esta variedad. Cabe destacar que la acumulación de transcritos en ambas variedades descendió constantemente hasta la evaluación final.

La aspersión foliar de los inductores (ST3) también promovió la expresión de este gen, donde resaltan los niveles de expresión obtenidos 8 y 24 Hdi por efecto del AS y FP, respectivamente, en plantas var. Obatá, esto cuando los valores son comparados con los obtenidos en plantas del ST2 durante el mismo momento de evaluación. De manera similar a la respuesta de otros genes, ambas variedades mostraron que la expresión fue potenciada por efecto de la aplicación de IRs 12 Hdi (ST4), puesto que sus valores son mayores cuando se comparan con la respuesta en plantas del ST2. Específicamente, el AS promovió un aumento de 6 veces más transcritos en ambas variedades 24 Hdi y su efecto se mantuvo 72 Hdi cuando alcanzó un nivel de 5.5 veces en plantas var. Caturra. Por su parte, el FP generó un efecto similar en los mismos momentos de evaluación en ambas variedades, sin embargo, siendo más notorio en plantas var. Obatá 72 Hdi (8 veces más). En plantas del ST5 aplicadas con IRs 12 Hai, se cuantificaron valores similares a los obtenidos del T2, aunque cabe destacar que los niveles de expresión obtenidos 8 y 24 Hdi producto de la aplicación de AS en las dos variedades, y 12 y 24 Hdi en la var. Obatá por efecto del FP fueron mayores que los niveles de plantas inoculadas con el hongo, lo que podría dar indicio del efecto “priming” por parte de los IRs.

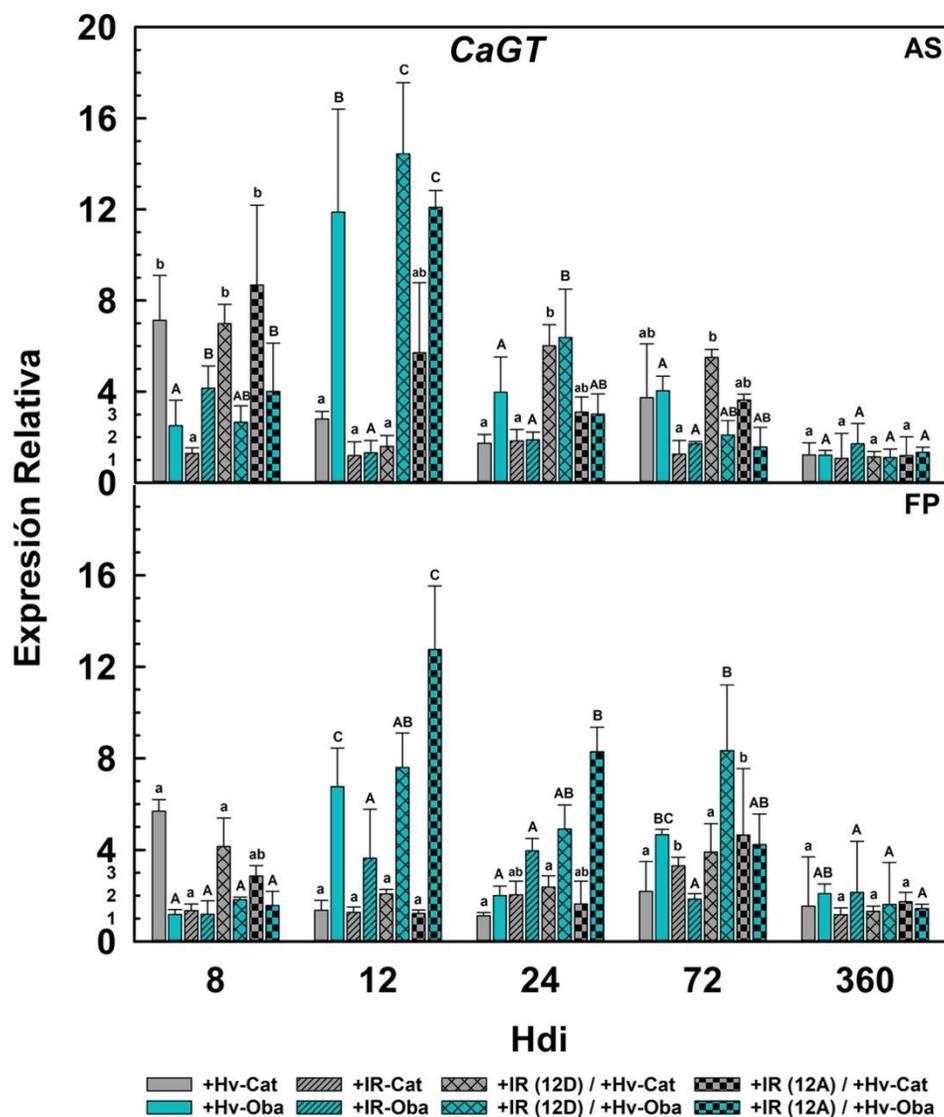


Figura 10. Análisis de expresión relativa del gen *CaGT* relacionado con la dinámica defensiva cuantificado en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obata (Oba) en 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV Cat-Oba), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR Cat-Oba), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) / +HV Cat-Oba) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) / +HV Cat-Oba).

\*Las barras de expresión relativa del gen representan el promedio de transcritos acumulados respecto al gen *CaUBiquitina* utilizado como control interno, en comparación con hojas de plantas del **ST1**: tratamiento control que no fue inoculado, ni asperjado con IRs. Los valores con barras de error con la misma letra (mayúsculas para var. Obata y minúsculas para var. Caturra) no son significativamente diferentes dentro del mismo tratamiento a través del tiempo según la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ ).

Cuadro IV. Expresión relativa acumulada-promedio de 6 genes relacionados con la dinámica defensiva cuantificados en hojas de *Coffea arabica* var. Caturra (Cat) y Obatá (Oba) después de 5 evaluaciones (8-360 h) en los tratamientos: **ST2**: inoculación con *H. vastatrix* (+HV), **ST3**: aspersión con inductores de resistencia (AS) Ácido Salicílico o (FP) Fosfito de Potasio (+IR), **ST4**: aspersión de IR 12 h después de la inoculación con HV (+IR (12D) /+HV) y **ST5**: aspersión IR 12 h antes de la inoculación con HV (+IR (12A) /+HV Cat-Oba).

<i>Var. Caturra</i>	Genes de Defensa											
	<i>CaPR1b</i>		<i>CaPR10</i>		<i>CaWRKY1</i>		<i>CaGT</i>		<i>CaR111</i>		<i>CaRLK</i>	
Tratamiento/IR	AS	FP	AS	FP	AS	FP	AS	FP	AS	FP	AS	FP
+HV	22,11 <sup>c</sup>	17,1 <sup>b</sup>	19,11 <sup>b</sup>	29,6 <sup>c</sup>	3,22 <sup>c</sup>	3,51 <sup>c</sup>	3,71 <sup>b</sup>	4,08 <sup>b</sup>	2,58 <sup>ab</sup>	2,36 <sup>b</sup>	3,54 <sup>c</sup>	3,74 <sup>b</sup>
+IR	5,08 <sup>ab</sup>	4,84 <sup>a</sup>	2,75 <sup>a</sup>	6,99 <sup>ab</sup>	1,57 <sup>a</sup>	2,71 <sup>bc</sup>	1,58 <sup>a</sup>	1,9 <sup>ab</sup>	1,81 <sup>a</sup>	2,0 <sup>ab</sup>	1,85 <sup>ab</sup>	1,95 <sup>a</sup>
+IR (12D) /+HV	17,53 <sup>bc</sup>	10,99 <sup>ab</sup>	21,33 <sup>b</sup>	15,17 <sup>b</sup>	2,07 <sup>ab</sup>	3,48 <sup>c</sup>	4,34 <sup>b</sup>	3,5 <sup>ab</sup>	3,37 <sup>b</sup>	2,35 <sup>b</sup>	3,06 <sup>c</sup>	3,19 <sup>b</sup>
+IR (12A) /+HV	4,3 <sup>a</sup>	5,99 <sup>a</sup>	18,27 <sup>b</sup>	6,07 <sup>ab</sup>	3,02 <sup>bc</sup>	1,71 <sup>ab</sup>	5,23 <sup>b</sup>	2,92 <sup>ab</sup>	1,71 <sup>a</sup>	2,16 <sup>ab</sup>	2,85 <sup>bc</sup>	1,44 <sup>a</sup>

<i>Var. Obatá</i>	Genes de Defensa											
	<i>CaPR1b</i>		<i>CaPR10</i>		<i>CaWRKY1</i>		<i>CaGT</i>		<i>CaR111</i>		<i>CaRLK</i>	
Tratamiento/IR	AS	FP	AS	FP	AS	FP	AS	FP	AS	FP	AS	FP
+HV	41,49 <sup>b</sup>	37,44 <sup>c</sup>	13,43 <sup>b</sup>	13,15 <sup>bc</sup>	3,0 <sup>b</sup>	3,73 <sup>a</sup>	5,23 <sup>bc</sup>	3,47 <sup>abc</sup>	2,9 <sup>b</sup>	3,4 <sup>c</sup>	4,37 <sup>b</sup>	4,56 <sup>b</sup>
+IR	5,01 <sup>a</sup>	10,35 <sup>ab</sup>	6,06 <sup>a</sup>	5,93 <sup>ab</sup>	1,64 <sup>a</sup>	11,75 <sup>b</sup>	2,31 <sup>ab</sup>	3,08 <sup>ab</sup>	1,71 <sup>ab</sup>	1,87 <sup>ab</sup>	1,74 <sup>a</sup>	1,82 <sup>a</sup>
+IR (12D) /+HV	27,42 <sup>b</sup>	22,11 <sup>bc</sup>	14,19 <sup>b</sup>	22,71 <sup>c</sup>	3,78 <sup>b</sup>	13,08 <sup>b</sup>	5,75 <sup>c</sup>	6,59 <sup>c</sup>	2,88 <sup>b</sup>	2,56 <sup>bc</sup>	4,04 <sup>b</sup>	4,97 <sup>b</sup>
+IR (12A) /+HV	5,5 <sup>a</sup>	2,59 <sup>a</sup>	6,28 <sup>a</sup>	5,0 <sup>ab</sup>	1,62 <sup>a</sup>	3,39 <sup>a</sup>	4,81 <sup>bc</sup>	5,94 <sup>bc</sup>	1,84 <sup>ab</sup>	1,46 <sup>a</sup>	3,73 <sup>b</sup>	2,42 <sup>a</sup>

\*Los valores de expresión relativa de cada gen representan el promedio de transcritos acumulados respecto al gen *CaUBiquitina* utilizado como control interno, en comparación con hojas de plantas del **ST1**: tratamiento control que no fue inoculado, ni asperjado con IRs. Valores con la misma letra muestran diferencias no-significativas entre los tratamientos según la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ )

La acumulación de transcritos de la mayoría de los genes cuantificados a lo largo de las evaluaciones y producto de las relaciones compatibles e incompatibles con el hongo de roya son los más altos en comparación con el resto de los tratamientos. El cuadro IV refleja que los valores de expresión más elevados se obtuvieron en los genes PR, en los cuales el PR1b fue superior en plantas var. Obatá, mientras que en Caturra correspondió al PR10. El resto de los genes cuantificados en este mismo tratamiento (+HV) mostraron valores similares entre variedades, con una leve tendencia de mayor respuesta en plantas de Obatá.

Por otra parte, el efecto de ambos IRs aplicados individualmente generó que la expresión de los genes *CaWRKY*, *CaGT*, *CaR111* y *CaRLK* en ambas variedades fuera similar y sin diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento inoculado con el hongo, sin embargo, la aspersión con AS y FP no generó el mismo efecto sobre los genes de mayor expresión relativa, *CaPR1b* y *CaPR10*, puesto que únicamente alcanzaron la cuarta parte o mitad de los valores del tratamiento inoculado con roya.

Los resultados obtenidos en este trabajo resaltan un efecto potenciador de la aplicación de IRs posterior a la inoculación de *H. vastatrix* (+IR (12D) / +HV), ya que la cuantificación acumulada en cada uno de los genes fue estadísticamente superior o similar, a la obtenida por la infección del hongo (+HV), dato interesante a considerar para los productores cafetaleros, quienes podrían incorporar en su estrategia de manejo contra la roya, el uso de IRs periódicamente como compuestos para el combate de la enfermedad una vez que la presión de inóculo sea mínima.

De manera general, los valores acumulados después de todas las evaluaciones por efecto de la aplicación temprana de los IRs (+IR (12A) / +HV) muestra un efecto de “priming” en casos aislados como en los genes *CaPR10* y *CaGT* por consecuencia de la aspersión con AS en plantas var. Caturra, no obstante, en los restantes genes y tipos de reacción, los valores son estadísticamente similares a los generados por la inoculación con roya o inferiores, posiblemente por un efecto directamente fungicida de los IRs (como es el caso del FP) que evitaba a la planta utilizar sus genes de defensa o por un gasto en la maquinaria de expresión que no fue cuantificado inmediatamente y repercutió sobre la expresión cuando ya la planta fue inoculada y ejercía su proceso de infección.

## Discusión

La aplicación de inductores de resistencia (IRs) como estrategia alterna al uso de fungicidas (agroquímicos) se ha implementado con mayor frecuencia durante las últimas décadas en diferentes cultivos (Gozzo & Faoro, 2013). En plantas de café (*Coffea arabica*) y otros cultivos, distintos compuestos pertenecientes al grupo de fosfitos se han empleado por un amplio rango de respuestas defensivas contra la infección de varias enfermedades, a través de la inducción de mecanismos relacionados con la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR por sus siglas en inglés). (Fernandes *et al.* 2014; Costa *et al.* 2014; Ogoshi *et al.* 2013; da Silva *et al.* 2013; Tripathi *et al.* 2019). Por otra parte, el ácido salicílico (AS) es conocido por su rol clave en la activación de la red de señales SAR (Backer *et al.* 2019; Lim *et al.* 2020) y su aplicación exógena ha disminuido la severidad e incidencia de enfermedades, así como la activación de genes, factores de transcripción y proteínas involucrados en la dinámica defensiva de las plantas (Alemu *et al.* 2018; Petitot *et al.* 2013; Tannuri *et al.* 2021).

El objetivo de esta investigación consistió en analizar la respuesta de genes asociados al sistema de defensa de plantas de café una vez se realizaron aplicaciones de AS y fosfito de potasio (FP) contra la roya, hongo biotrófico que se caracteriza por provocar la expresión de genes como los PR (Pathogenesis-Related) para prevenir la infección por patógenos (Azinheira *et al.* 2010; Kinkema *et al.* 2000). Ejemplos de estos son los genes PR1b y PR10 que codifican proteínas con actividad antimicrobiana y ribonucleasa, respectivamente (Akbulak *et al.* 2020; Van Loon & Van Strien, 1999). Los resultados obtenidos en este proyecto mostraron como en ambas variedades de café la expresión de los genes PR es temprana, puesto que los valores significativamente superiores se obtuvieron entre las 8-24 Hdi, resultado similar al obtenido en el trabajo de Diniz *et al.* (2011), en el cual la expresión de *CaPR1b* y *CaPR10* en plantas de *C. arabica* Híbrido de Timor, HDT832/2, alcanzaron valores máximos 21-24 Hdi con *H. vastatrix*.

Cabe mencionar que la acumulación de transcritos de los genes PR varió de acuerdo con el tiempo de la evaluación y también respecto al tipo de reacción entre planta-patógeno, ya que se observó como las plantas de Obatá (reacción incompatible) expresaron mayores niveles del gen PR1b, caso contrario a lo sucedido con el gen PR10 donde las plantas de Caturra (reacción compatible) mostraron niveles superiores de expresión. Silva *et al.* (2008) menciona como las reacciones no-compatibles evitan el desarrollo del hongo durante sus primeros estadios, razón por la cual es común observar mayores niveles de expresión de genes de defensa durante las primeras horas del ataque, mientras que las reacciones compatibles, aunque generan los mismos compuestos de defensa tardan más en reaccionar, permitiendo que el hongo pueda colonizar con mayor efectividad el interior de las células de la planta.

Por otro lado, el AS y FP mostraron tener efecto como elicitores de la expresión de los genes PR, puesto que su aplicación de manera individual provocó cambios en los niveles de expresión de ambas variedades de café, así como cuando se aplicaron en conjunto con la inoculación de roya, donde tuvieron un efecto potenciador o “preparador” posterior o anterior a la inoculación con la solución de esporas de roya, respectivamente. Investigaciones han demostrado que la familia de genes PR10, por su actividad ribonucleasa-antifúngica, incrementa su síntesis como respuesta a posibles infecciones por patógenos y puede ser inducida por la aplicación de AS (Filipenko *et al.* 2013; Xie *et al.* 2010; ; McGee *et al.* 2001). Así mismo, el AS fue reportado como activador de la cascada de reacciones que permiten la expresión del gen CaNPR1 que controla de manera directa la expresión del gen PR1 en plantas de café (Barsalobres-Cavallari *et al.* 2013). Por su parte, los fosfitos además de su efecto como fungicida directo también son conocidos por su eficacia para activar SAR a través de la acumulación de AS y elicitar la expresión de genes de defensa y proteínas relacionadas con la patogénesis (Gozzo & Faoro, 2013; Ogoshi *et al.* 2013) de manera constitutiva o cuando las plantas sufren el ataque de un patógeno (Monteiro *et al.* 2016; Orober *et al.* 2002; Eshraghi *et al.* 2011; Fernandes *et al.* 2014; Groves *et al.* 2015).

El gen *CaR111* es clasificado como un gen putativo con actividad nucleasa según GenBank y la investigación de Ascencio-Ibáñez *et al.* (2008) en la cual se realizó un análisis de microarreglos del transcriptoma de la planta de *A. thaliana* inoculada con el virus CaLCuV (cabbage leaf curl virus), mostró que el gen análogo al *CaR111* se encontraba enlistado como parte de los genes involucrados

por la vía del AS en respuesta al ataque de patógenos. De forma similar, en este trabajo se evidenció que la inoculación con el hongo de roya y la aplicación con los IRs generaron un cambio en los patrones de expresión del gen en ambas variedades de café a través de las evaluaciones. Cabe resaltar que las reacciones compatibles mostraron niveles de expresión superiores durante las primeras horas de infección, y a partir de las 12 Hdi la reacción incompatible generó mayores niveles de transcritos, caso relacionado con lo obtenido en el trabajo de Ramiro *et al.* (2009) donde las plantas de var. Tupí (reacción incompatible) mostraron un promedio de expresión menor desde las 18-24 Hdi, en comparación con la var. Catuaí (reacción compatible) y mayor después de las 36-45 Hdi.

La familia de factores de transcripción WRKY (solo encontrada en plantas) ha sido caracterizada por influir en distintas funciones biológicas entre la que destaca su respuesta sobre-regulada por la infección de patógenos o factores abióticos (Ülker & Somssich. 2004). Específicamente, *CaWRKY1* fue identificado por su sobreexpresión en reacciones incompatibles con el hongo de roya (*C. arabica* var. Caturra vs raza VI y *C. arabica* var. Tupí vs raza II) y aplicaciones exógenas de hormonas como AS (Ramiro *et al.* 2009). Al igual que el caso anterior, en esta investigación fue posible observar que la acumulación de transcritos del gen *CaWRKY1* fue mayor en plantas de var. Obatá (reacción incompatible) durante la mayoría de las mediciones, exceptuando el valor obtenido 72 Hdi donde las plantas var. Caturra expresaron el valor más elevado de todas las evaluaciones en ambas variedades. Cabe destacar que sus niveles de expresión se mantuvieron constantes y no mostraron un declive a lo largo del ensayo. Además, su expresión fue influenciada por la aspersión con IRs en las dos variedades de café. Al igual que la investigación de Ganesh *et al.* (2006) y Petitot *et al.* (2013) en los cuales plantas de var. Caturra aumentaron la expresión del gen *CaWRKY1* por la aspersión de AS, en esta investigación ambas variedades mostraron cambios en la expresión del mismo gen cuando el IR fue aplicado de manera individual. Así mismo, el efecto del AS 12 horas antes de la inoculación de roya tuvo un efecto de “priming” en las plantas (8 Hdi), mientras que su efecto posterior a la inoculación (12 horas después de la inoculación) aumentó la expresión del gen en la evaluación 72 Hdi, sin embargo no al mismo nivel o superior al generado por la infección del patógeno, posiblemente debido al efecto auto-regulador y de supresión que tienen los genes de la familia WRKY, puesto que poseen en sus promotores, elementos (W boxes) que les permiten ser su propio objetivo (regulación por retroalimentación) (Eulgem *et al.* 2000; Eulgem & Somssich. 2007).

De manera interesante, el gen ortólogo de *CaWRKY1* en plantas de *A. thaliana*, *AtWRKY6*, actúa como un regulador positivo de genes PR (Petitot *et al.* 2008), lo que posiblemente se relacione con los resultados de esta investigación donde los patrones de expresión de los genes *CaPR10* y *CaPR1b* en diferentes momentos de evaluación coinciden con los del *CaWRKY1* (ejemplo el valor de expresión de *CaWRKY1* y *CaPR10* 72 Hdi en plantas de Caturra del ST2). Por otra parte, a diferencia del AS que provocó una respuesta moderada de la expresión del gen WRKY (similar a la investigación de Ramiro *et al.* 2010), el FP mostró activar de manera significativa la expresión de este (de manera individual o en conjunto con la inoculación del hongo en diferentes momentos), además de cuando se compara con los niveles de expresión generados por la infección del hongo. Resultados similares se observaron en *S. tuberosum* que aumentó la expresión del gen *StWRKY*, relacionado con mecanismos de defensa contra *P. infestans*, cuando se atomizó con una solución de FP (Machinandiarena *et al.* 2012).

El gen *CaRLK* (proteína de la familia quinasa con dominio rico en repeticiones de leucina), pertenece al grupo de secuencias codificantes de proteínas receptoras localizados en la superficie de la célula y están involucrados en diferentes procesos como reguladores de las señales comunicativas célula-célula o célula-medio ambiente, como por ejemplo receptores reconocedores de patrones moleculares (MAMPs o PAMPs por sus siglas en inglés) que poseen los patógenos que arriban como amenaza para las plantas (Ou *et al.* 2020; Tang *et al.* 2017; Afzal *et al.* 2008). Los resultados de esta investigación mostraron como las plantas de ambas variedades cuando fueron inoculadas con el hongo de roya, generaron un patrón de expresión del gen *CaRLK* similar 8, 12 y 72 Hdi, cuando se acumularon considerablemente transcritos en comparación con los tiempos de evaluación siguientes, siendo mayor en Caturra en la primera hora de evaluación y en Obatá en las siguientes dos. Este comportamiento se asemejó al trabajo de Ramiro *et al.* (2009), donde se observó como este mismo gen aumentó su expresión en relación con los momentos de desarrollo del haustorio primario (18-24 Hdi) y secundario (36-35 Hdi) en plantas de café var. Catuai y Tupí. Pires de Almeida *et al.* (2021) y Florez *et al.* (2017) demostraron también como la expresión de genes RLK aumentó 24 Hdi producto de una reacción incompatible en plantas de café HdT inoculadas con *H. vastatrix*, lo que refleja como las plantas con características de resistencia a la roya reconocen el patógeno en sus primeras etapas de desarrollo (pre-haustoriales) para inducir una rápida cascada de respuestas defensivas.

Por su parte, la aplicación individual de los IRs provocó que las plantas expresaran el gen *CaRLK*, alcanzando valores máximos en distintos momentos de la evaluación, 24 y 72 Hdi en plantas de Caturra y Obatá, respectivamente una vez aplicadas con AS y a las 8 Hdi por efecto del FP en ambas variedades de café. Aunque la aspersión por si sola de cada IR no mostró valores de expresión tan altos como los generados por la inoculación, si mostraron tener un efecto potenciador de la acumulación de transcritos posterior a la inoculación (efecto de AS y FP en ambas variedades 24 y 72 Hdi), así como el efecto de “priming” (efecto AS 8 Hdi en ambas variedades). Este efecto producto de la aplicación de IRs se ha observado en la planta modelo *A. thaliana*, donde genes pertenecientes a la familia de RLKs son super-regulados ante la aplicación exógena de AS (Ohtake *et al.* 2000), mientras que agonistas del AS como el Acibenzolar causan un efecto potenciador de respuesta ante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través del incremento de receptores RLKs (Tateda *et al.* 2014). Así mismo, la atomización con FP en plantas de papa ha provocado el incremento de la expresión de genes RLK, mismos genes que responden ante la infección de hongos como *P. infestans* (Feldman *et al.* 2020; Han *et al.* 2021).

Un factor importante en el desempeño del AS como activador de la vía SAR está relacionado con su disponibilidad inmediata para que las plantas reaccionen rápidamente ante el ataque de un patógeno o su almacenamiento en compuestos más estables para luego ser descompuesto en formas más simples. La glucosilación del AS es una de las maneras para conservarlo a largo plazo en las plantas, ya que consiste en la transferencia de una molécula de azúcar proveniente de nucleósidos difosfatos mediante enzimas llamadas UDP-glucosiltransferasas (UGTs) (Lim *et al.* 2002), proceso que vuelve más estable la hormona. Esta transformación del AS ocurre en varias plantas, incluyendo la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) donde se identificó la secuencia de ADN para referenciar la UDP-glucosiltransferasa de *C. arabica*, y una vez glucosilado es conocido como 2-O-β-D-glucósido (SAG); este se encuentra principalmente en las cercanías de lesiones necróticas producto de

respuestas hipersensitivas (Lee & Raskin, 1999). En plantas de tabaco se ha demostrado que la acción de la transferasa es promovida por la aplicación exógena de ácido salicílico o la inoculación de patógenos, ya que la adición de una molécula de azúcar al AS le permite tener mayor solubilidad para su transporte (Lee & Raskin, 1999, Taguchi *et al.* 2001). Lo anterior, se evidenció a través de los picos de expresión del gen *CaGT* en plantas de ambas variedades inoculadas con el hongo de roya (8 y 12 Hdi en Caturra y Obatá, respectivamente) y también, aunque en menor cuando fueron aplicadas con el IR, ya fuera de manera individual o en conjunto con la inoculación. Debido a la ya expuesta relación en la inducción del SAR por efecto del FP, es también posible entender que este IR haya ocasionado que los niveles de expresión del gen *CaGT* respondieran ante la aplicación del IR, caso similar al obtenido en plantas de *Lupinus angustifolius* donde el contenido de ácido salicílico glucosilado, SAG, aumentó posterior a la aspersión con 0.25% de solución de fosfitos, indicativo de mayor actividad de la transferasa (Groves *et al.*, 2015).

## Conclusiones

El presente estudio demostró que la aplicación de ácido salicílico y fosfito de potasio como IRs provoca la expresión de genes relacionados a la defensa contra el patógeno de roya en plantas de dos variedades de café. Además, se pudo demostrar que los mismos genes logran responder a la infección con esporas de este hongo como parte de la respuesta de defensa de la planta de café. El tipo de reacción, compatible o incompatible, ante la infección del hongo genera que los niveles de expresión de genes de defensa se comporten diferente en las variedades de café, donde pueden ser significativamente mayores durante las primeras horas de infección y posteriormente disminuir permitiendo la culminación del desarrollo del hongo o aumentando de manera gradual y manteniendo sus niveles a través del tiempo para contener etapas importantes como la germinación o generación de células haustoriales.

La aplicación de los IRs además de promover la expresión de varios genes de defensa, también funcionan en algunos casos como preparadores ante el potencial ataque del patógeno de roya, sin embargo, otras investigaciones son necesarias para corroborar el evento de “preparador”. Así mismo, es claro que su aplicación pocas horas después de las primeras etapas de desarrollo del hongo funciona como un potenciador de la expresión de los genes, alcanzando niveles superiores a los provocados por la infección, lo que permite extender la defensa por un tiempo más prolongado y posiblemente combatir *H. vastatrix* en sus etapas críticas de desarrollo.

Finalmente, es necesario entender que la expresión de los genes de defensa influidos por la inoculación del hongo o aplicación de un IR, no se mantiene por tiempos prolongados (mayor a 72 Hdi). Es posible que los picos de expresión sean transitorios y respondan a la presión del inóculo presente en las plantas, dado que el gasto energético de la planta sería muy grande si el sistema de defensa permaneciera siempre activo. Los niveles de expresión en plantas con resistencia a la roya como la var. Obatá pueden influir sobre la contención inmediata de la infección, lo cual favorece a su desarrollo e inversión de fitoasimilados en etapas como el llenado de fruta.

## Referencias bibliográficas

Alvarenga, S., Caixeta, E., Hufnagel, B., Thiebaut, F., Zambolim, E., Zambolim, L., Sakiyama, N. (2011). Molecular markers from coffee genome expressed sequences potentially involved in resistance to rust. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 46(8), 890-898.

Asociación Nacional del Café, ANACAFE. (2019). *Guía de variedades de café*. 2da Edición. Guatemala. 48 p.

Afzal, A. J., Wood, A. J y Lightfoot, D. A. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5), 507-517.

Akbudak, M. A., Yildiz, S y Filiz, E. (2020). Pathogenesis related protein-1 (PR-1) genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Bioinformatics analyses and expression profiles in response to drought stress. *Genomics*, 112, 4089-4099.

Alemu, k., Adugna, G., Lemessa, F y Muleta, D. (2018). Induction of systemic resistance in Arabica coffee (*Coffea arabica* l.) against coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge) mediated through plant defense activator. *International Journal of Pest Management*, 65(4), 313-323.

Arneson, P, A. (2000). Coffee rust. *The Plant Health Instructor Index*. American Phytopathological Society.

Ascencio-Ibáñez, J. T., Sozzani, R., Lee, T. J., Chu, T. M., Wolfinger, R. D., Cella, R y Hanley-Bowdoin, L. (2008). Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology*, 148, 436-454.

Azinheira, H. G., do Céu Silva, M., Talhinhos, P., Medeira, C., Maia, I., Petitot, A.S y Fernandez, D. (2010). Non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Botany*, 88, 621-629.

Avelino J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, Bornemann, G., Laderach, P., Anzueto, F., Hruska, A. J y Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7,303-321.

Backer, R., Naidoo, S y van den Berg, N. (2019). The nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1) and related family: mechanistic insights in plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, 10(102), 1-21.

Barbosa de Paula, M. F., Aparecida, S., Lazzari, F., Gomes, H., Vilela, L y Chalfun-Junior, A. (2012). Efficiency of RNA extraction protocols in different types of coffee plant tissues. *Coffee Science*, 7(3), 284-293.

Barsalobres-Cavallari, C. F., Petitot, A. S., Severino, F. E., Maia, I. G y Fernandez, D. (2013). Host response profiling to fungal infection: molecular cloning, characterization, and expression analysis of NPR1 gene from coffee (*Coffea arabica*). En A. Mendez-Vilas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology, and education* (pp. 411-418). Formatex Research Center.

Berlinger, C., Alvarado, C., Silva-Acuña, R., Marín, C., La Cruz, L., Durán, D., Bustamante, J. (2007). Evaluación agronómica de 18 líneas de café en la localidad de la Vitu, estado de Trujillo, Venezuela. *Bioagro*, 19(1), 27-33.

Burketova, L., Trda, L., Ott, P., Valentova, O. (2015). Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances*, 33(6), 994-1004.

Cabral, P. G. C., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Lelis, T. P., Capucho, A. S y Caixeta, E.T. (2009). Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 4, 129-130.

Costa, B. E. G., de Resende, M. L. V., Ribeiro Junior, P. M., Mathioni, S. M., Pádua, M. A y da Silva Junior, M. B. (2014). Suppression of rust and Brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. *Journal of Phytopathology*, 162, 635-642.

Couttolenc-Brenis, E., Carrión, G., Villain, L., Ortega, F., Ramírez, D., Mata, M., Méndez, A. (2020). Prehaustorial local resistance to coffee leaf rust in a mexican cultivar involves expression of salicylic acid-responsive genes. *Peer Journal*, 8, e8345.

Da Silva, A.C., de Resende, M. L. V., de Souza, P. E., Silva, N. C. N., Silva Junior, M. B y Vitorino, L. R.R. (2013). Coffee-leaf extract and phosphites on the curative control of powdery mildew in eucalyptus mini-stumps. *Forest Pathology*, 43, 297-305.

Diniz, I., Talhinhos, P., Azinheira, H. G., Várzea, V., Medeira, C., Maia, I., Petitot, A. S., Nicole, M., Fernandez, D y do Céu Silva, M. (2012). Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistances to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. *Europe Journal of Plant Pathology*, 133, 141-157.

Diola, V., Greigh de Brito, G., Caixeta, E. T., Maciel-Zambolim, E., Sakiyama, N. S y Loureiro, M. E. (2011). High density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. *Tree Genetics & Genomes*, 7, 1199-1208.

Do Céu Silva, M., Várzea, V. M. P, Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H. G., Fernandez, D., Petitot, A. S., Bertrand, B., Lashermes, P y Nicole, M. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 119-147.

Du, L y Chen, Z. (2000). Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 24(6), 837-847.

Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G y O'Brien, P. (2011). Phosphite primed defense responses and enhanced expression of defense genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60, 1086-1095.

Eskes, A, B. (1982). The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88, 127-141.

Eulgem, T y Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 366-371.

Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S y Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factor. *Trends in Plant Science*, 5(5), 199-206.

Fazuoli, L. C., Braghini, M. T., Silvarolla, M. B., Gonçalves, W., Mistro, J. C., Gallo, P. B y Filho, O. G. (2018). IAC Oatã 4739-dwarf arabic coffee cultivar with yellow fruits and resistant to leaf rust. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18, 330-333.

Feldman, M. L., Guzzo, M. C., Machinandarena, M. F., Rey-Burusco, M. F., Beligni, M.V., Di Rienzo, J., Castellote, M. A., Daleo, G. R y Andreu, A. B. (2020). New insights into the molecular basis of induced resistance triggered by potassium phosphite in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 109, 101452

Fernandes, L. E., de Oliveira Silveira, H. R., Dázio de Souza, K. R., Vilela de Resende, M. L y Alves, J. D. (2014). Inductors of resistance and their role in photosynthesis and antioxidant system activity of coffee seedlings. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 3710-3716.

Fernández, D., Santos, P., Agostini, C., Bon, M. C., Petitot, A. S., Silva, M. C., Guerra-Guimarães, L., Ribeiro, A., Argout, X y Nicole, M. (2004). Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 527-536.

Filipenko, E. A., Kochetov, A. V., Kanayama, Y., Malinovsky, V. I y Shummy, V. K. (2013). PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. *Russian Journal of Genetics Applied Research*, 3(6), 474-480.

Florez, J. C., Moffato, L. S., Freitas-Lopes, R., Ferreira, S. S., Zambolim, E. M., Crazolle, M. F., Zambolim, L. y Caixeta, E. T. (2017). High throughput transcriptome analysis of coffee reveals prehaustorial resistance in response to *Hemileia vastatrix* infection. *Plant Molecular Biology*, 95, 607-623.

Ganesh, D., Petitot, A. S., Silva, M. C., Alary, R., Lecouls, A. C y Fernández, D. (2006). Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Science*, 170, 1045-1051.

Guerra-Guimarães, L., Tenente, R., Pinheiro, R., Chaves, I., do Céu Silva, M., Cardoso, F. M. H., Planchon, S., Barros, D. R., Renaut, J y Ricardo, C. P. (2015). Proteomic analysis of apoplasmic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Frontiers in Plant Science*, 6:478.

Gichuru, E., Ithiru, J., Silva, M., Pereira, A., Varzea, V. (2012). Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 424-427.

Greigh de Brito, G., Caixeta, E. T., Gallina, A. P., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Diola, V y Loureiro, M. E. (2010). Inheritance of coffee leaf rust disease and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, 173, 255-264

Gozzo, F y Faoro, F. (2013). Systematic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 12473-12491.

Groves, E., Howard, K., Hardy, G y Burgess, T. (2015). Role of salicylic acid in phosphite-induced protection against Oomycetes; a *Phytophthora cinnamoni-Lupinus augustifolius* model system. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3), 559-569.

Han, X., Xi, Y., Zhang, Z., Mohammadi, M. A., Joshi, J., Borza, T y Wang-Pruski, G. (2021). Effects of phosphite as plant biostimulant on metabolism and stress response for better plant performance in *Solanum tuberosum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 210, 111873

Hammerschmidt, R. (2014). Induced resistance for plant defense: A sustainable approach to crop protection. Ed. By Walters, D., Newton, A and Lyon, G. 1-10 p.

Herrera, J. C., Lambot, C. (2015). The coffee tree-genetic diversity and origin. En B. Folmer (Ed.), *The Craft and Science of Coffee* (pp.1-16). Elsevier.

Instituto del Café de Costa Rica, ICAFE. (2020). *Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica*. Barva, Heredia, Costa Rica. 62 p.

Instituto del Café de Costa Rica-Centro de Investigaciones en Café. (2011). *Guía técnica para el cultivo del café*. Barva, Heredia, Costa Rica. 72 p.

Instituto del Café de Costa Rica, ICAFE. (2016). *Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica*. Barva, Heredia, Costa Rica. 63 p.

Jackson, T. J., Burgees, T., Colquhoun, I y Hardy, G. E. StJ. (2000). Action of the fungicide phosphite of *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamoni*. *Plant Pathology*, 49, 147-154.

Kamle, M., Borah, R., Bora, H., Jaiswal, A., Singh, R., Kumar, P. (2020). Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens. *Fungal Biotechnology and Bioengineering*, 457-470.

Kinkema, M., Fan, W y Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell*, 12, 2399-2350.

Krishnan, S. (2017). Sustainable coffee production. Oxford Research Encyclopedia, 1-34.

La Gaceta. (2013). Emergencia Fitosanitaria Nacional por epifitía y daño severo causado por la roya (*Hemileia vastatrix* Berk & Br) en el cultivo del café. Imprenta Nacional. La Uruca, San José, Costa Rica. 48 p.

Lee, H y Raskin, I. (1999). Purification, cloning, and expression of pathogen inducible UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(51), 36637-36642.

Lim, E. K., Doucet, C. J., Li, Y., Ellias, L., Worrall, D., Spencer, S. P., Ross, J., Bowles, D. J. (2002). The activity of arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and others benzoates. *The journal of Biological Chemistry*, 277(1), 586-592.

Lim, G. H., Liu, H., Yu, K., Liu, R., Shine, M.B., Fernandez, J., Burch-Smith, T., Mobley, J. K., McLetchie, N., Kachroo, A y Kachroo, P. (2020). The plant cuticle regulates apoplastic transport of salicylic acid during systemic acquired resistance. *Science Advance*, 6, 1-14.

Llorens, E., García, P., Lapeña, L. (2017). Advances in induced resistance by natural compounds: towards options for woody crop protection. *Scientia Agricola*, 74(1), 90-100.

Machinandiarena, M. F., Lobato, M. C., Feldman, M. L., Daleo, G. R y Andreu, A. B. (2012). Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, 169, 1417-1424.

McGee, J. D., Hamer, J. E y Hodges, T. K. (2001). Characterization of PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(7), 877-886.

Monteiro, L. H., Rezende de Oliveira, H., Dázio de Souza, K. R., Vilela de Resende, M. L y Donizeti, J. (2014). Inductors of resistance and their role in photosynthesis and antioxidant system activity of coffee seedlings. *American journal of Plant Sciences*, 5, 3710-3716.

Monteiro, A. C., Vilela de Resende, M. L., Valente, T., Ribeiro Junior, P. M., Pereir, V. F., da Costa, I. R y da Silva, J. A. (2016). Manganese phosphite in coffee defense against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. *Journal of Phytopathology*, 164(11-12), 1043-1053.

Neves, B., Teixeira, E., Mathioni, S., Pereira, P., Zambolim, L., Zambolim, E., Donofrio, N., Polson, S., Andrade, T., Chen, C., Adetunji, M., Kingham, B., Durigan, R., Vilela de Resende, M. (2019). Fenome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* reveal expression dynamics of candidate effectors dependent in host compatibility. *PLoS ONE*, 14(4), e0215598.

Ogoshi, C., Abreu, M. S., da Silva, B.M., Net, H. S., Ribeiro Junior, P. M y de Resende, M. L. V. (2013). Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporoides* in coffee plants. *Bioscience Journal*, 29(1), 1558-1565.

Ohtake, Y., Takahashi, T y Komeda, Y. (2000). Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 41(9), 1038-1044.

Orober, M., Siegrist, J y Buchenauer, H. (2002). Mechanism of phosphate-induced disease resistance in cucumber. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 345-353.

Ou, Y, Kui, H y Li, J. (2020). Receptor-like kinases in root development: current progress and future directions. *Molecular Plant*, 14, 166-185.

Petitot, A. S., Lecouls, A. C y Fernandez, D. Sub-genomic origin and regulation patterns of duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Genetics & Genomics*, 4, 379-390.

Petitot, A. S., Barsalobres-Cavallari, C., Ramiro, D., Freire, E. A., Etienne, H y Fernandez, D. (2013). Promoter analysis of the WRKY transcription factors CaWRKY1a and CaWRKY1b homologous genes in coffee (*Coffea arabica*). *Plant Cell Reports*, 32, 1263-1276.

Pires de Almeida, D., Castro, I. S. L., Mendes, T. A., Alves, D. R., Barka, G. D., Barreiros, P. R., Zambolim, L., Sakiyama, N. M y Caixeta, E. T. (2021). Receptor-like kinase (RLK) as candidate gene conferring resistance to *Hemileia vastatrix* in coffee. *Scientia Agricola*. 78(6): e20200023

Prabhakaran, K. (2020). *Tree Crops: Harvesting cash from the world's important cash crops*. Springer, 530.

Prakash, N. S., Marques, D. V., Varzea, V. M. P., Silva, M. C., Combes, M. C y Lashermes, P. (2004). Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea lberica* into *C. arabica* L. *Theoretical Applied Genetics*, 109, 1311-1317.

Ramiro, D. A., Jalloul, A., Petitot, A. S., Grossi De Sá, M. F., Maluf, M. P y Fernandez, D. (2010). Identification of coffee WRKY transcription factor genes and expression profiling in resistance responses of pathogens. *Tree Genetics & Genomics*, 6, 767-781.

Ramiro, D. A., Escoute, J., Petitot, A. S. Nicole, M., Maluf, M. P y Fernández, D. (2009). Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defense response in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*, 58, 944-955.

Reglinski, T., Dann, E y Deverall, B. (2014). Agents that can elicit induced resistance. *Induced resistance for plant defense: A sustainable approach to crop protection*. Ed. By Walters, D.; Newton, A and Lyon, G. 249-299 p.

Rojas, M. L., Montes de Gómez, V y Ocampo, C.A. (1993). Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43(3), 209-219.

Rolz, C y Cifuentes, R. (2016). Hongos hiperparásitos de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) prevalencias en plantaciones de café en Guatemala: nota gráfica e ilustrativa. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*, 32, 55-59.

Romero, G., Alvarado, G., Cortina, H., Ligarreto, G., Galeano, N y Herrera, J. C. (2010). Partial resistance to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee (*Coffea arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. *Molecular Breeding*, 25,685-697.

Shine, M.B., Xiao, X., Kachroo, P., Kachroo, A. (2019). Signaling mechanism underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science*, 279, 81-86.

Silva, M. C., Guerra-Guimarães, L., Loureiro, A y Nicole, M. R. (2008). Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 29-38.

Taguchi, G., Yazawa, T., Hayashida, N y Okazaki, M. (2001). Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European Journal of Biochemistry*, 268, 4068-4094.

Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V y Do Céu Silva, A. M. (2016). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8), 1039-1051.

Tang, D, Wang, G y Zhou, J. M. (2017). Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. *The Plant Cell*, 29, 618-637.

Tannuri, L. A. R., Lopes, E. A., Macedo, W. R., Canedo, E. J. (2021). Exogenous application of salicylic acid to control coffee rust. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 43, e54495.

Tateda, C., Zhang, Z., Shrestha, J., Jelenska, J., Chinchilla, D y Greenberg, J. T. (2014). Salicylic acid regulates Arabidopsis microbial pattern receptor kinase levels and signaling. *The Plant Cell*, 25, 4171-4187.

Tripathi, D., Raikhy, G y Kumar, D. (2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance-salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Pathology*, 17, 48-59.

Silva, M. C., Nicole, M., Guerra- Guimarães, L y Rodrigues Junior, C. J. (2002). Hypersensitive cell death and post-haustorial defence response arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60, 169-183.

Ulker, B y Somssich, I. E. (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 491-498.

Van der Vossen, H., Bertrand, B y Charrier, A. (2015). Next generation variety for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. *Euphytica*, 204, 243-256.

Van Loon, L. C y Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 85-97.

Várzea, V. M. P., Marques, V. D., Pereira, A. P y Silva, M.C. (2009). The use of Sarchimor derivatives in coffee breeding resistance to leaf rust. Artículo presentado en la 22nd International Conference of Coffee Science, campinas, Brasil. Tomado de: [https://www.researchgate.net/publication/281119479\\_The\\_Use\\_of\\_Sarchimor\\_Derivatives\\_in\\_Coffee\\_Breeding\\_Resistance\\_to\\_Leaf\\_Rust](https://www.researchgate.net/publication/281119479_The_Use_of_Sarchimor_Derivatives_in_Coffee_Breeding_Resistance_to_Leaf_Rust)

Virginio, E., Domian, C. (2019). Prevent and control of coffee leaf rust: handbook of best practices for extension agents and facilitators. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 96p.

World Coffee Research. 2018. Las variedades del café arábica. WCR. Portland, Oregon, USA. 54 p.

Xie, Y. R., Chen, Z. Y., Brown, R. L y Bhatnagar, D. (2010). Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology*, 167, 121-130.

Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant pathology*, 41, 1-8.