

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Efecto de condiciones abióticas en la expresión génica y la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) durante el desarrollo floral en café arábico (*Coffea arabica* L.)

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

Elodia María Sánchez Barrantes

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2025

DEDICATORIA

“A Dios, mis padres y mis hermanos”.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por la salud, las fuerzas y por permitirme disfrutar de todo este proceso.

A mi familia por su apoyo incondicional, especialmente a mis padres quienes siempre han estado a mi lado, han sido mi bordón a lo largo de mi vida.

A mi tutor el Dr. Andrés Gatica por ser mi guía durante todo este tiempo, por la confianza y el apoyo incondicional.

A el Dr. Federico Albertazzi por sus consejos, su apoyo, por brindarme espacio en su laboratorio y brindarme las facilidades para terminar los experimentos.

A el Dr. Luis Barboza por sus valiosos aportes en la revisión del trabajo.

Alejandro Bolívar quien fue de gran ayuda durante los muestreos y el procesamiento de las muestras.

A Carolina Muñoz por su buena disposición y toda la ayuda brindada durante las pruebas y optimizaciones de protocolos.

A los compañeros del laboratorio 50 por su grata compañía, y por toda la colaboración brindada.

A Andrea Irías del CIGRAS, por su colaboración en el procesamiento de las muestras para determinar el perfil hormonal y a Sebastián Camacho por su colaboración en el procesamiento de los datos.

Miguel Barquero del ICAFE, quien me brindó el acceso a las instalaciones y al material vegetal para realizar los experimentos.

A Daniela Masís, Kathia Alfaro, Gabriel Ríos y Nelson Chaves, por su gran amistad, por ser quienes siempre me acompañan, me aconsejan y me dan fuerzas para seguir adelante.

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

Dr. Pablo Bolaños Villegas
**Representante de la Decanatura
Sistema de Estudios de Posgrado**

Dr. Andrés Gatica Arias
Director de Tesis

Dr. Luis Orlando Barboza Barquero
Asesor

Dr. Federico Albertazzi Castro
Asesor

Dr. Adam Karremans Lok
Representante del Director del Programa de Posgrado en Biología

Elodia María Sánchez Barrantes
Postulante

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
HOJA DE APROBACIÓN	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo general	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1. Muestreo del material vegetal bajo condiciones de estrés hídrico.....	6
3.2. Muestreo material vegetal bajo condiciones de sombra	8
3.3. Preparación del material vegetal para la extracción de ácidos nucleicos	10
3.4. Extracción de ARN (Protocolo Sigma TRI Reagent T9424)	10
3.5. Extracción de ADN (Doyle & Doyle 1990 con modificaciones)	11
3.6. Síntesis de ADN copia.....	11
3.7. Amplificación de genes de interés.....	12
3.8. Análisis de expresión génica mediante qRT-PCR.....	13
3.8.1. Determinación de los genes de referencia (housekeeping genes)	13
3.8.2. Cuantificación de los niveles de expresión de los genes relacionados en procesos de floración	14
3.9. Reacciones de amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación (MSAP: “Methyl- Sensitive Amplification Polymorphism”) (Muñoz, 2020).	14
3.9.1. Digestión y ligación	14
3.9.2. Pre-amplificación	15
3.9.3. Amplificación selectiva.....	16
3.10. Metilación global de ADN utilizando secuenciación por bisulfito.....	16
3.11. Perfil de hormonas vegetales	18
3.11.1. Extracción de las hormonas	18
3.11.2. Preparación de curvas de calibración, cuantificación y estimación de incertidumbre.....	19
4. RESULTADOS.....	20

4.1.	Extracción de ADN, ARN y síntesis de ADNc	20
4.2.	Expresión génica	21
4.3.	Reacciones de amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación (MSAP: “Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism”).....	24
4.4.	Metilación global de ADN utilizando secuenciación por bisulfito.....	25
4.5.	Perfil de hormonas.....	28
5.	DISCUSIÓN	34
5.1.	Expresión génica	34
5.2.	Metilación.....	37
5.3.	Perfil de hormonas.....	38
6.	CONCLUSIONES	40
7.	Recomendaciones	41
8.	REFERENCIAS.....	42
9.	ANEXOS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Distribución de las plantas de *Coffea arabica* L. de la variedad Catuaí en la parcela experimental del ICAFE utilizadas en el presente estudio. El color rojo corresponde a plantas no irrigadas (condiciones de sequía) y el color amarillo corresponde a plantas que recibieron riego por goteo..... 7
- Figura 2. Distribución de las plantas de *Coffea. arabica* L. de la variedad Villa Sarchí en la parcela experimental del ICAFE utilizadas en el presente estudio. El color azul representa las plantas a muestrear, la intensidad del color va aumentando conforme aumenta la cantidad de sombra que proporciona el sarán en los diferentes tratamientos (0 %, 30 %, 50 % y 70 %). 9
- Figura 3. Flujo de trabajo bioinformático empleado en la plataforma Galaxy para analizar perfiles de metilación del ADN genómico en *Coffea arabica* L. mediante datos de secuenciación por bisulfito (WGBS). Elaboración propia. 17
- Figura 4. Análisis cuantitativo por PCR tiempo real (RT-qPCR) de la expresión relativa de genes relacionados con el proceso de floración en *Coffea arabica* L. en diferentes tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) durante el mes de setiembre. Las barras muestran el promedio \pm DE de 3 repeticiones 22
- Figura 5. Análisis cuantitativo por PCR tiempo real (RT-qPCR) de la expresión relativa de genes relacionados con el proceso de floración en *Coffea arabica* L. en diferentes tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) durante el mes de enero..... 24
- Figura 6. Gráfico de distribución de los niveles globales de metilación de citosinas en los contextos CpG, CHG y CHH, generado a partir del módulo Bismark Methylation Extractor e integrado en MultiQC. Cada punto representa una muestra individual (n = 8) las muestras verdes corresponden al mes de setiembre 2019 y las azules al mes de enero 2020, la intensidad del color va aumentando conforme aumenta la cantidad de sombra en el tratamiento. 27
- Figura 7. Mapa de calor jerárquico de concentraciones relativas de hormonas en nudos de *Coffea arabica* L. recolectados en dos meses (septiembre 2019 y enero 2020) bajo distintos niveles de sombra (0%, 30%, 50% y 70%). 28
- Figura 8. Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en las concentraciones de hormonas en nudos de *Coffea arabica* L. bajo distintos niveles de sombra (0%, 30%, 50% y 70%) recolectados en enero y septiembre. El gráfico de puntuaciones (izquierda) muestra la distribución de las réplicas según las dos primeras componentes principales (t1 y t2) y el gráfico de cargas (derecha) indica la contribución de cada hormona a la varianza explicada. 29
- Figura 9. Gráficos de barras de las concentraciones promedio (\pm DE) de siete hormonas vegetales (AG1, AG7, ZR-1, ZR-2, ABA, JA e iPR) en nudos florales de plantas de *Coffea arabica* L. bajo cuatro niveles de sombra (0%, 30%, 50% y 70%) durante dos épocas del año: enero (gris claro) y septiembre (gris oscuro). Cada letra (A–G) corresponde a una hormona diferente. 31
- Figura 10. Resumen de los análisis moleculares planificados y su estado de ejecución en los dos ensayos experimentales (estrés hídrico y condiciones de sombra). Las flechas indican la secuencia

lógica entre el planteamiento experimental, los análisis previstos y los resultados obtenidos.
Elaboración propia. 33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes relacionados en procesos de floración en <i>Coffea arabica</i> L. reportados en la literatura.....	13
Cuadro 2. Combinación de adaptadores selectivos analizados para el MSAP (Reportados por Cheng et al, 2019 y elaborados por Federico Albertazzi).....	16
Cuadro 3. Porcentajes globales de metilación de citosinas en los contextos CpG, CHG y CHH en muestras de nudos de <i>Coffea arabica</i> L. recolectadas en dos meses (septiembre 2019 y enero 2020) bajo distintos niveles de sombra (0%, 30%, 50% y 70%).	27

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: Albúmina sérica bovina

CIGRAS: Centro de Investigación en Granos y Semillas

CTAB: Cetil-trimetil bromuro de amonio

dNTPs: Desoxinucleósido trifosfatos

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ESI: “Electrospray Ionization” (Ionización por electrospray)

HRM: “High resolution melting” (Fusión de alta resolución)

ICAFE: Instituto del Café de Costa Rica

KOAc: Acetato de potasio

MgCl: Cloruro de magnesio

MgOAc: Acetato de magnesio

MOPS: Ácido 3- (N- Morfolino) propano sulfónico

MS/MS: “Tandem Mass Spectrometry” (Espectrometría de masas en tándem)

MSAP: “Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism” (Amplificación del polimorfismo sensible a la metilación)

msnm: Metros sobre el nivel del mar

NaCl: Cloruro de sodio

OPSL: “Orthogonal Partial Least Squares” (Regresión por mínimos cuadrados ortogonales)

PCA: Análisis de componentes principales

PCR: “Polymerase chain reaction” (Reacción en cadena de la polimerasa)

PSL: “Partial Least Squares” (Regresión por mínimos cuadrados parciales)

PVP: Polivinilpirrolidona

rpm: Revoluciones por minuto

RT-qPCR: retrotranscripción cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa

TBE: Tris-Borato-EDTA

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

TrisHOAc: Tris acetato

UHPLC: “Ultra High Performance Liquid Chromatography” (Cromatografía líquida de ultra alta resolución)

WGBS: “Whole genome bisulfite sequencing” (Secuenciación por bisulfito del genoma completo)

Resumen

La floración en *Coffea arabica* L. es un proceso altamente regulado por señales ambientales, hormonales y epigenéticas, cuya comprensión es clave ante escenarios de cambio climático. En este estudio se evaluaron los efectos de diferentes niveles de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) sobre la expresión génica, los perfiles hormonales y los patrones de metilación del ADN en nudos florales de *C. arabica* durante dos etapas fenológicas contrastantes (enero: yemas florales; septiembre: frutos en desarrollo). Se cuantificó la expresión de 21 genes relacionados con floración por RT-qPCR. Además, se determinaron concentraciones de ABA, GA, iPR y JA mediante UHPLC-MS, y se evaluó la metilación global por secuenciación con bisulfito.

Los resultados mostraron que la sombra intermedia (30–50%) en enero indujo la expresión de genes como *CaFT1*, *CaLFY*, *CaSVP-1* y *CaAPI*, en concordancia con una mayor acumulación de AG1, AG7 e iPR, lo que sugiere una regulación promotora de la floración. En contraste, en septiembre, predominó la acumulación de ABA y JA, especialmente bajo 70% y 0% de sombra, respectivamente, lo que indica una asociación con latencia floral y estrés abiótico. En cuanto a la metilación del ADN, el contexto mCpG presentó los niveles más altos de metilación en todas las muestras, y el tratamiento con 70% de sombra mostró mayor metilación global, independientemente del mes. No se encontraron diferencias significativas entre meses evaluados, lo que sugiere estabilidad relativa del metiloma a nivel global.

Estos hallazgos apoyan la existencia de una red reguladora de floración altamente plástica en *C. arabica*, donde la interacción entre luz, hormonas y epigenética modula la transición floral y la asincronía reproductiva, ofreciendo información valiosa para el manejo agronómico y el mejoramiento genético del cultivo.

Palabras clave: *Coffea arabica*, floración, expresión génica, metilación global, perfil hormonal, estrés abiótico

1. INTRODUCCIÓN

El café es una especie perenne, pertenece a la familia Rubiaceae y al género *Coffea*, (Montoya et al., 2006). El género consta de 103 especies conocidas (Missio et al., 2009), de las cuales solo *Coffea arabica* L. (conocido como el café arábico) y *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (conocido como el café Robusta) tienen importancia comercial (Tornincasa et al., 2010).

El café es una de las bebidas más populares, y uno de los cultivos más importante en el comercio mundial, que genera grandes ingresos a los países productores (Montoya et al., 2006), entre los que destacan Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y Etiopía. Siendo Brasil y Vietnam los principales exportadores, que generan producto a los grandes consumidores tradicionales de esta bebida como los son los habitantes de la Unión Europea, los Estados Unidos, Japón, Reino Unido y la Federación Rusa (ICAFFE, 2021). Según el reporte del Instituto Costarricense del Café para el periodo 2020-2021, se estimó una producción mundial promedio de 169,54 millones de sacos de 60 kg. Costa Rica ocupó el décimo cuarto lugar entre los países productores, aportando el 0,85% de la producción mundial (ICAFFE, 2021).

Sin embargo, estudios como el realizado por Moat et al. (2017) han previsto futuros escenarios de cambio climático en los cuales la producción de café se verá seriamente afectada por el calentamiento global y el incremento de las precipitaciones. En los últimos años se han dado grandes avances informativos con respecto a los factores ambientales y endógenos que afectan la producción de café, pero estos aspectos han sido poco analizados durante el proceso de floración, esencial para mejorar este cultivo (López et al., 2021).

La fase reproductiva del café inicia con el proceso de floración, la cual constituye uno de los aspectos más importantes para los productores de este cultivo, ya que cada flor se convertirá en un fruto, por lo que la magnitud de la cosecha resultante dependerá del éxito de la floración (Camayo et al., 2003). La culminación del proceso floral se da con la antesis, la cual ocurre de 10 a 12 días después de que la planta reciba un estímulo hídrico y rompe el estado de latencia de los botones florales (Vignola et al., 2018). Sin embargo, Crisosto et al. (1992) describe que, dependiendo de la gravedad y la duración del déficit hídrico que sufre la planta, no todos los botones florales maduros florecen, de modo que una parte de los botones quedan para florecer

algún tiempo después. De esta manera, se pueden esperar varios episodios de floración durante una temporada, hasta que todos los botones de una planta hayan madurado, y se hayan activado para florecer. Esta asincronía en el desarrollo de los botones florales se señala como la causa principal de la floración no uniforme en el café (Majerovicz & Söndahl, 2005).

Se ha visto que la floración del café no está controlada por un factor principal aislado como se observa en otras angiospermas, además del fotoperíodo y la vernalización, también se da una asociación importante con cambios en el potencial hídrico de las plantas (Majerovicz & Söndahl, 2005), humedad, estado nutricional de la planta, fitohormonas, temperatura (López et al., 2021) y los sistemas de producción (Meyland et al., 2017). En Costa Rica el café se cultiva durante la estación seca (la cual estaba bien definida tiempo atrás), por lo tanto, la antesis ocurría con el retorno de la lluvia, y los cafetos mostraban intensos eventos de floración generalmente entre abril y mayo en las principales áreas de producción de café en el país (Vignola et al., 2018). Este cultivo muestra un proceso de floración gregaria (Almeida, 2015), en el cual la mayor parte de las plantas de una determinada región florecen simultáneamente. Esta es la razón principal por la que existe un pico de cosecha fuerte por año. Además, este patrón de temporada de floración concentrada permite que la cosecha se extienda por un período relativamente corto de aproximadamente tres meses cada año. En los últimos años este panorama ha cambiado en el país, y en toda la región centroamericana, debido a los incrementos variables de temperatura, y cambios en los patrones de precipitación ocasionados por el cambio climático, estas variaciones han afectado directamente al cultivo que es altamente susceptible a estos cambios (patrones de temperatura y precipitación) (Viguera et al., 2019). El estrés hídrico, por ejemplo, ha agravado la asincronía floral que sufre el cultivo del café, ya que la antesis puede activarse cada vez que hay un período seco seguido de lluvias espontáneas (Almeida, 2015). Este problema de asincronía floral afecta directamente la calidad del café, porque las frutas en diferentes etapas de maduración (inmaduros, maduros y sobremaduros) estarán presentes en el momento de la cosecha, creando dificultades para la recolección mecánica eficiente del fruto (Drinnan & Menzel, 1994) y provocando pérdidas de rendimiento por desperdicio que afecta directamente a los productores nacionales.

El aumento en los patrones de temperatura en los últimos tiempos es otro de los factores que está causando preocupación, ya que en zonas con poca elevación las plantaciones abiertas pueden disminuir su productividad en respuesta al estrés causado por las altas temperaturas

(Muschler, 1997.). Estudios realizados en años anteriores han demostrado que las plantas de café cultivadas bajo radiación intensa tienden a tener una alta producción, pero irregular (DaMatta, 2004; Chaves et al, 2012), esto como resultado de las adaptaciones en los procesos morfológicos y metabólicos (Morais et al., 2006). Sin embargo, las altas producciones provocan un agotamiento en las plantas que lleva a la muerte progresiva de las ramas, requiere un período de recuperación, y la cosecha tiende a alternar entre años de floración intensa y floración ligera, lo que lleva a una tendencia de producción bienal (Chaves et al., 2012). Por otro lado, la alta producción requiere altos niveles de insumos externos para maximizar el rendimiento de los cultivos y, se asocian con la degradación del suelo y la contaminación ambiental (DaMatta, 2004).

En el proceso de floración se ha visto que las precipitaciones asociadas a una disminución de la temperatura de aire pueden contribuir a la interrupción de la latencia de las yemas, y por lo tanto mejorar el desarrollo floral (Morais et al., 2008). Una de las estrategias que se utiliza para disminuir la temperatura y aumentar la humedad relativa en las plantaciones, es el uso de sombra. El sombreado provoca cambios en el microclima, y debido a la plasticidad de las plantas de café, puede llegar a afectar su anatomía, fisiología, proceso de inducción, diferenciación floral y anthesis (Morais et al., 2008). Por lo que tener conocimiento en los niveles de sombra adecuados para que no afecte económicamente a la producción, es fundamental para enfrentar un escenario de cambio climático que permita la protección contra el estrés abiótico, y la identificación de alternativas para mejorar los procesos de floración con el fin mantener o aumentar la productividad de los cafetos.

En general, el desarrollo floral comprende una secuencia compleja de eventos moleculares, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos (Camayo et al., 2003). La mayoría de los trabajos realizados se basan en estudios fenológicos, pero aún no hay claridad en la relación entre el desarrollo reproductivo y su interacción con las señales ambientales. No se ha logrado encontrar suficiente evidencia molecular que apoye la influencia o rechace su relación con el estado metabólico y energético que podría desencadenar procesos de desarrollo (López et al., 2021).

Estudios previos han revelado que los mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN, está involucrada en la estabilidad e integridad del genoma (Gan et al., 2013), y además tiene un papel esencial en la regulación de la expresión de numerosos genes (Chan et al., 2005). Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Yang et al., (2015) en el cual demuestran que la

metilación del ADN está asociada con cambios en la expresión de más de 3000 genes, y sugieren que la metilación afecta genes con diversas funciones durante la regulación del desarrollo de las flores. Distintos investigadores se han dado la tarea de estudiar la metilación del ADN en todo el genoma de los tejidos vegetativos de especies modelos como *Arabidopsis*, pero aún se sabe poco sobre los patrones de metilación del ADN y su asociación con la expresión génica durante el desarrollo de la flor.

Para el caso de la especie *Coffea arabica*, a la fecha no se logró encontrar ningún estudio sobre metilación del ADN durante el proceso de floración, aunque si se encontró información sobre la expresión de genes asociados. Tal es el caso de De Oliveira et al., (2014) que contribuye con un importante trabajo en flores de *C. arabica*., donde realizó un análisis de expresión con 23 genes MADS-box, los cuales corresponden a un grupo de factores de transcripción que regulan varios procesos de desarrollo en plantas, que van desde el desarrollo de la raíz hasta el fruto. En este estudio se obtuvo una caracterización inicial de los genes involucrados en la inducción y desarrollo floral.

Por otro lado, Vieira et al., (2019) reportaron el análisis de la expresión de cinco genes similares a *FRIGIDA (FRL)*, que codifican proteínas clave en la regulación de la floración mediante la activación del gen *FLC (FLOWERING LOCUS C)*. Se identificaron los genes homeólogos de *FRL* en las especies parentales de *C. arabica* (*C. canephora* y *C. eugenioides*), lograron caracterizar la familia de 10 genes *FRL* en *C. arabica* a lo largo del desarrollo de flores y frutos, y determinaron que estos genes se transcriben de manera diferencial.

A pesar de que toda esta información es de suma importancia para este sector en el país, el proceso de inducción de la floración ha sido poco estudiado. Solamente se tiene un conocimiento general y cualitativo sobre las épocas de floración, y desde el punto de vista de estudios moleculares, el mecanismo involucrado en la percepción de estos estímulos o señales, y la activación del desarrollo reproductivo en *C. arabica* es poco conocido (De Oliveira et al., 2014). Por lo tanto, determinar y estudiar factores moleculares como patrones de metilación de ADN global y cambios que ocurren en la expresión de genes asociados al proceso de floración del café, comparando plantas bajo diferentes tratamientos hídricos y diferentes niveles de sombra, proporcionaría información útil para ayudarnos a comprender de una mejor forma estas vías de

señalización asociadas a los procesos de floración. Información que a su vez podría contribuir a los programas de mejoramiento genético de este cultivo, al proporcionar un mayor conocimiento del desarrollo floral, y en un futuro permita mitigar la asincronía floral frente a un escenario de estrés hídrico y aumento de temperatura. Además, en el área agronómica permitiría generar información para mejorar las prácticas agrícolas, que lograría establecer la distribución de la cosecha y estimar las necesidades de mano de obra para la recolección.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar el efecto del estrés abiótico hídrico y de sombra en la expresión génica y metilación global del ácido desoxirribonucleico ADN ocurridos durante el desarrollo floral en café arábico (*C. arabica*).

2.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la expresión diferencial de algunos genes relacionados con la floración en café (*C. arabica*) bajo distintas condiciones de estrés abiótico (condiciones hídricas y de sombra).
- Analizar los patrones de metilación global del ADN en los nudos de café sometidos a diferentes porcentajes de sombra mediante secuenciación por bisulfito y amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación (MSAP: “Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism”).
- Determinar la asociación entre la metilación del ADN y la expresión génica durante el desarrollo floral en café arábigo (*C. arabica*).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo del material vegetal bajo condiciones de estrés hídrico

Se trabajó con plantas de café de la especie *C. arabica* variedad Catuaí ubicadas en la parcela experimental del Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE), en San Pedro de Barva de Heredia, Costa Rica (10°02'03.2"N 84°08'11.1"O, 1.170 msnm.).

La zona de siembra posee columnas con 25 plantas cada una. El marcaje de las plantas se realizó de acuerdo al esquema adjunto en la figura 1, entre cada columna hay una distancia de 2 m y entre cada planta 80 cm. La columna A no se tomó en cuenta ya que corresponde al borde de la zona, al igual que las primeras cinco plantas de cada columna. Lo que quiere decir que el marcaje de cada columna siempre empieza a partir de la sexta planta.

Se marcó en la columna B las plantas sin tratamiento de riego las cuales corresponden a las plantas enumeradas de la 1 a la 15 (color rojo), mientras que las plantas que recibieron riego por goteo 10 días antes de la fecha de colecta corresponden a las columnas C y D, y se enumeraron de la 16 a la 30 (color amarillo) de forma intercalada (zigzag) entre cada columna.

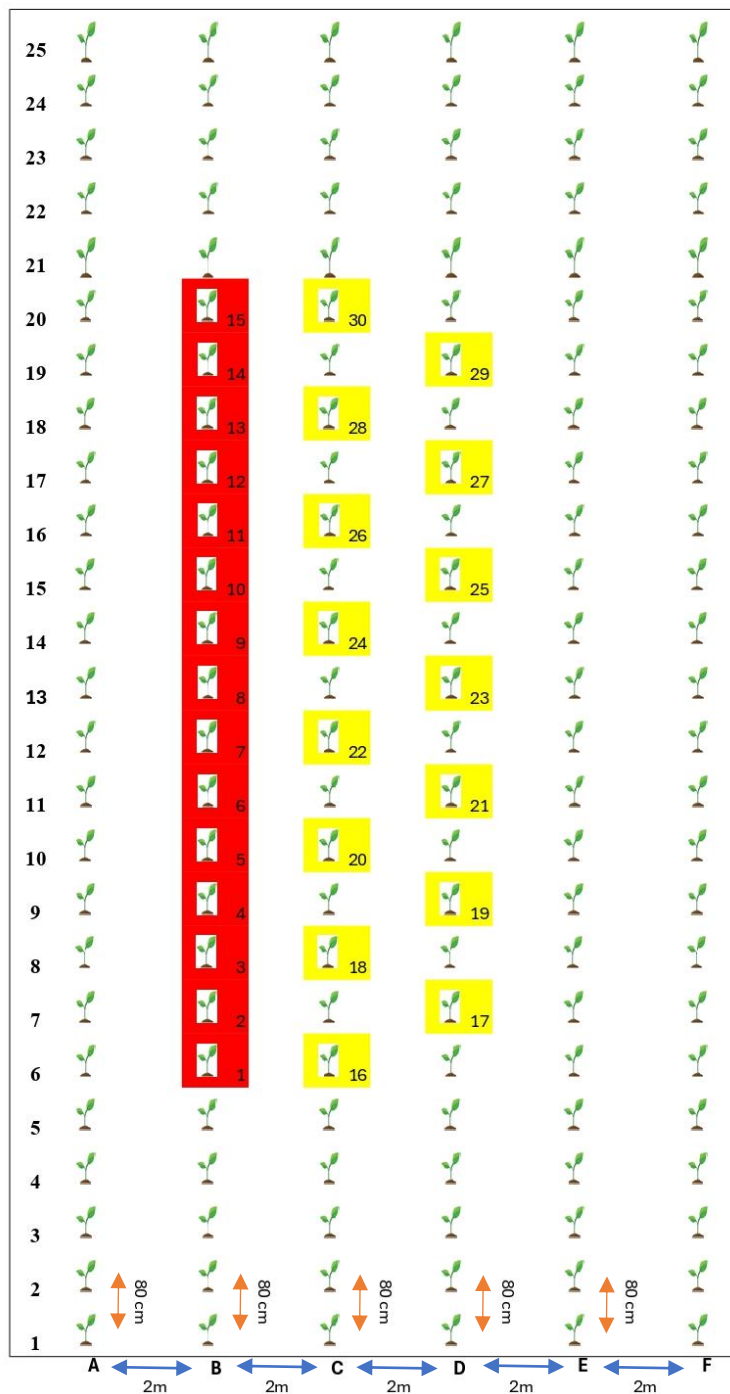


Figura 1. Distribución de las plantas de *Coffea arabica* L. de la variedad Catuaí en la parcela experimental del ICAFE utilizadas en el presente estudio. El color rojo corresponde a plantas no irrigadas (condiciones de sequía) y el color amarillo corresponde a plantas que recibieron riego por goteo. Elaboración propia.

En cada una de las plantas seleccionadas se marcó una bandola en la parte apical, una en la parte media y una en la parte basal. En cada una de estas bandolas se tomó los siguientes datos: número de planta, cantidad de flores y estadio de las flores, el cual fue determinado en base a la clasificación de 6 etapas reportada por De Oliveira et al., (2014).

Posteriormente, se colectaron las flores de las 30 plantas seleccionadas (15 plantas sin tratamiento (bajo condición de sequía) + 15 plantas tratadas (aplicación de riego)) en los tres niveles de las bandolas indicadas anteriormente. Las flores colectadas se encontraban en los estadios E3, E4 y E5, se colocaron en sobres de aluminio y fueron sumergidas en nitrógeno líquido. Se trasladaron congeladas hasta el laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca. Una vez en el laboratorio se almacenaron a -80 °C.

3.2.Muestreo material vegetal bajo condiciones de sombra

Se trabajó con plantas de café de la especie *C. arabica* variedad Villa Sarchí ubicadas en la parcela experimental del Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE), en San Pedro de Barva de Heredia, Costa Rica (10°02'03.2"N 84°08'11.1"O, 1.170 msnm). Se aplicaron cuatro tratamientos de sombra utilizando mallas de sarán con diferentes niveles de cobertura: 0 % (plantas expuestas al sol sin sarán), 30 %, 50 % y 70 % de sombra. Las plantas se expusieron al tratamiento siete meses antes de realizar el muestreo, se tomaron muestras en 2 meses con condiciones climáticas contrastantes (época lluviosa/época seca): en el mes de setiembre (postfloración) y en enero (antes de que inicie la próxima floración). El marcaje se realizó seleccionando columnas de plantas que se encontraban fuera de los bordes de cada tratamiento y, en cada columna se marcó la planta en la posición 6, 12 y 18, es decir el marcaje de cada columna fila siempre empieza a partir de la sexta planta y se dejaron cinco plantas de separación en cada columna (Figura 2).

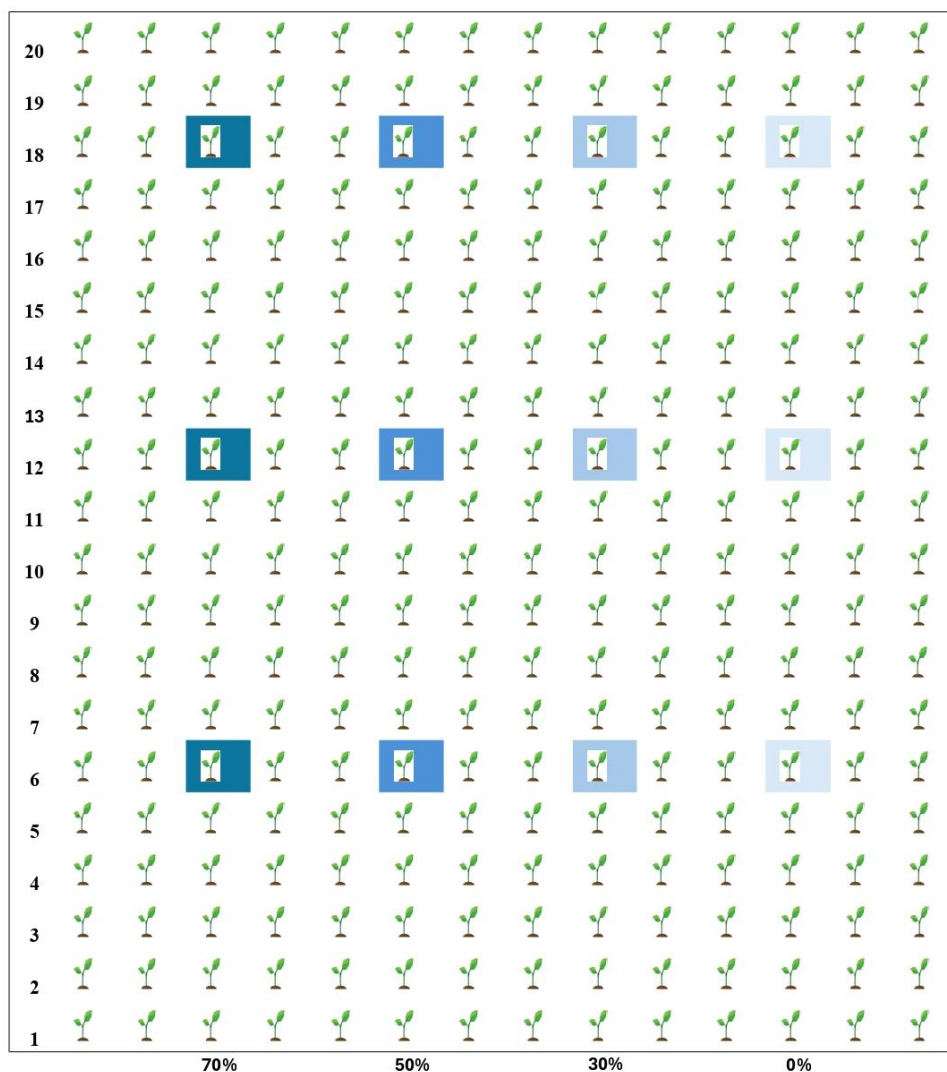


Figura 2. Distribución de las plantas de *Coffea arabica* L. de la variedad Villa Sarchí en la parcela experimental del ICAFE utilizadas en el presente estudio. El color azul representa las plantas a muestrear, la intensidad del color va aumentando conforme aumenta la cantidad de sombra que proporciona el sarán en los diferentes tratamientos (0 %, 30 %, 50 % y 70 %). Elaboración propia.

En cada una de las plantas seleccionadas (tres plantas por tratamiento) se cortó una bandola en la parte media (en el mes de setiembre) y se marcó otra bandola cercana para coleccionar en el segundo muestreo (en el mes de enero). Las bandolas coleccionadas se colocaron en bolsas plásticas con agua y se trasladaron al laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca. Una vez en el laboratorio, se aislaron las yemas florales de las 3 bandolas y se combinaron muestras de tres individuos por tratamiento en cada mes, para

obtener una sola muestra compuesta, se empacaron en tubos cónicos plásticos de 50 ml y se almacenaron a -80°C .

3.3.Preparación del material vegetal para la extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN y ARN se realizó utilizando ~ 100 mg de material vegetal fresco en el caso de las flores, y ~ 500 mg en las muestras de las yemas florales (mezclas de tres individuos). El material vegetal fue macerado en un mortero con nitrógeno líquido hasta pulverizar y se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml.

3.4.Extracción de ARN (Protocolo Sigma TRI Reagent T9424)

En cada muestra se agregó 1 ml de Trizol (TRI Reagent T9424, Sigma) y se dejaron reposar por 5 min en hielo. Luego se agregaron 200 μl de cloroformo, se mezclaron por inversión por 30 s y se dejaron reposando por 3 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 10000 rpm a 4°C por 20 min. El sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 500 μl de isopropanol frío. Se dejaron precipitando en hielo por 10 min y centrifugaron por 15 min a 10000 rpm a 4°C . Luego, se descartó el isopropanol, se lavó el precipitado formado con 600 μl de etanol frío libre de RNasas al 70 % y se centrifugaron por 5 min a 13 000 rpm. Se descartó el etanol y realizó un segundo lavado nuevamente con etanol de 70%. Finalmente, el precipitado se secó a 37°C por 5 min (aproximadamente) y posteriormente se resuspendió en 60 μl de agua libre de RNasas. Se agregó 1 μl de DNasa I (1 U/ μl , Thermo Scientific™) junto con 1 μl de buffer con MgCl_2 a cada muestra, se incubaron a 37°C por 1 h, y finalmente se añadió 1 μl EDTA (0,5 M, Thermo Scientific™) y se incubaron nuevamente a 60°C por 10 min. El ARN obtenido se almacenó a -80°C .

La cantidad de ARN se cuantificó utilizando el fluorómetro Quantus™ con el kit QuantiFlour® RNA System (Promega Corporation), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para estimar la calidad, se determinaron las relaciones A260/280 nm y A260/230 nm en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), y se verificó la integridad en un gel de

agarosa desnaturalizante con 2 % formaldehído (37 % v/v), el cual se corrió en buffer MOPS 1X durante 1 h a 100 V.

3.5.Extracción de ADN (Doyle & Doyle 1990 con modificaciones)

En cada muestra de flores y de nudos (~100 mg de material vegetal fresco) se agregaron 600 µl de buffer de extracción (20 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM Tris (pH 8,0), 2 % m/v PVP, 2 % m/v CTAB, 1,4 M NaCl y 0,2 % v/v β-mercaptoetanol), se mezcló por inversión por 15 s y se incubaron a 65 °C por 30 min, agitando cada 10 min por inversión. Posteriormente, se agregaron 600 µl de una solución de cloroformo: octanol (24:1) a cada tubo y homogenizaron por inversión.

Los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se transfirió 400 µl del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se agregaron 400 µl de isopropanol frío (-20 °C), se homogenizaron por inversión y dejaron reposar por 30 min en hielo. Luego se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min a -4 °C y se descartó el isopropanol. Se lavó el precipitado formado con 600 µl de etanol 70 v/v % frío, y centrifugó por 2 min a 13 000 rpm. Se descartó el etanol y se realizó un segundo lavado de nuevo con la misma cantidad de etanol. El precipitado se secó a 42 °C por aproximadamente 20 min y posteriormente, cada muestra se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas junto con 1 µl de RNasa I (10 U/µl, Thermo Scientific™), se incubaron a 37 °C por 30 min y se almacenaron a -20 °C.

La cantidad de material genómico (ADN), se cuantificó utilizando el fluorómetro Quantus™ con el kit QuantiFlour® ONE dsDNA System (Promega Corporation). Para estimar la calidad, se determinaron las relaciones A260/280 nm y A260/230 nm en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), y se verificó la integridad en un gel de agarosa al 1 % con buffer TBE 1X (45 min/100 V).

3.6.Síntesis de ADN copia

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 1000 ng totales de ARN de cada una de las muestras, y se siguieron las instrucciones del fabricante del kit comercial RevertAid RT Reverse Transcription

Kit (ThermoScientific®). Se utilizaron controles negativos (muestras sin ARN) y controles absolutos (muestras sin RT). Posteriormente la cantidad del ADNc y las relaciones A260/280 nm y A260/230 nm se cuantificaron en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

En las muestras de los nudos aparte del control absoluto se realizó también una PCR con el marcador ClpP_1 para descartar contaminación de ADN genómico, y este se verificó en gel de agarosa al 1% (45 min/100V). (Anexo 1).

3.7. Amplificación de genes de interés

Para identificar algunos de los genes involucrados en el proceso de floración del café, se realizó la validación de 35 oligonucleótidos reportados en la literatura (uno de ellos sintetizado con el programa Primer 3) (Cuadro 1) mediante PCR en tiempo final. Para ello se utilizaron: 50 ng de ADN con 1X Taq Buffer (Thermo Scientific™), 1,5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific™), 0,5 mM dNTPs (Promega™), 0,2 μM de oligonucleótidos, 0,01 mg BSA (Thermo Scientific™) y 0,5 U de Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific™) para un volumen final de 25 μl.

Para los oligonucleótidos que no se reportaban las condiciones de amplificación, se realizó un gradiente de temperatura de 55-62 °C con el fin de determinar la temperatura de hibridación apta para la amplificación del fragmento del gen. Se corrió bajo el siguiente programa de amplificación: un ciclo de desnaturalización de 95 °C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55-62 °C por 1 min y 72 °C por 1:20 min, finalizando con un ciclo de extensión de 7 min.

Aquellos oligonucleótidos, de los 34 analizados, que amplificaron en una sola banda se utilizaron para realizar el estudio de expresión génica mediante PCR en tiempo real.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes relacionados en procesos de floración en *Coffea arabica* L. reportados en la literatura

Nombre del gen	# de accesión	Oligonucleótido	Secuencia Forward 5'-3'	Secuencia Reverse 3'-5'	Referencia
FRIGIDA like	CDP03992	<i>CaCe_FRL1</i>	CGCCGACAAGAACTCCTATCC	GTGGTTGTCAGTTGGTCCAGTG	Vieira et al., 2019
		<i>CaCe_FRL1</i>	GCCGCTGACAAGAGCTTCTATCT	GGTTGTCAGTTGGTCCAGCA	
	CDO99060.1	<i>CaCe_FRL2</i>	TGACTCAGACTCAGCCTCCTCAT	CCTTCCAGAGGAGAGTGCAGC	
		<i>CaCe_FRL2</i>	GAGTTGACTCAGCCCTCCGCG	CCTTCCAGAGGAGAGTGCAGC	
	CDO98273.1	<i>CaCe_FRL3</i>	CTGTATTGCATGGAGCTGGTTG	AACCAGTTCCGACAACACTGG	
		<i>CaCe_FRL3</i>	TGCATTGCATGGAGCTGGTAC	AGAACCAGTTCCGACAACACTCT	
	CDP13747.1	<i>CaCe_FRL4</i>	CGCCGGACCCAGCTAAGA	AACCCGAATCATCCGCATC	
		<i>CaCe_FRL4</i>	CGCCGGACCCAGCTAAGT	AACCCGAATCATCCGCATC	
CDP19997.1	<i>CaCe_FRL5</i>	GC AACTCCACTTCTCCCAATGG	TTCACTGGTGACTCAAGGTTCTC	De Oliveira et al., 2014	
	<i>CaCe_FRL5</i>	TCAGTAACTCCACTTCTCGTCAATCT	CTTCACTGGTGACTCAAGGTTCTC		
AGAMOUS like	KJ483224	<i>CaAGL6</i>	GAGAATGCTGCTGAAAGAGA		GGTGAGAAGTGTGCATAGGA
	KJ483245	<i>CaAGL6</i>	CGAGGTGTCCGTATGAGAAAG		GCACCAC TCC TTACGAATTGA
	KJ483230	<i>CaAGL1 7-1</i>	AACCCCTTTCAGCAATCACA		GCCATACAGTTCTTCTCCCATC
	KJ483240	<i>CaAGL42</i>	GCTTGCCTATTAGAGTCTTG		GGTCGCTTCTTTGATCTTCT
Tomato MADS-box gene like	KJ483226	<i>CaTM3-1</i>	CGTCTCACCTACCCAGCAITTT		GTGCTTGTCCATTCTTCTGCT
	KJ483227	<i>CaTM3-2</i>	GCAGCAAGTAGACAAGTGACA		CTCCCAAACAATAGGCTCT
	KJ483228	<i>CaTM3-3</i>	CGCACCTGATCTGCTCATAA	TGGCAATTGGCATAAACAATC	
	KJ483238	<i>CaTM6</i>	ACAATATGTGCCGTCTGCAA	TTCTCATACGAGGACTAGCACA	
APETALA	KJ483237	<i>CaAPI</i>	ATGÁGCTCGAAAGACCTCCA	TGGTTTC TCCGCTTTTATC	
	KJ483229	<i>CaAP3</i>	TCAAAAGGCTGTAGGGGTTG	TGTG AAG ATTAGGCTGGGTAGG	
SEPALATA	KJ483235	<i>CaSEPI2</i>	TGGCCCTCATCATCTTCTCT	TTTCCAAGCTCCTTTCTAATGC	
	KJ483233	<i>CaSEP3</i>	GCGAAGAAATGGGCTAATTGA	ACTTGAGTCCGTTGATCTG	
	KJ483232	<i>CaSEP4</i>	TGTGATGCTGAGGTTGCTCT	GGCCTTGTITACTTCCATCA	
	KJ483234	<i>CaPI</i>	TGGAAAG AAGC TG TGGGATG	TGAAGATTGGCTGCATTGG	
PISTILLATA	KJ483234	<i>CaPI</i>	TGGAAAG AAGC TG TGGGATG	TGAAGATTGGCTGCATTGG	
AGAMOUS	KJ483236	<i>CaAG</i>	AGCAGAGTCCGATCCAAAAA	CTTCGCTCCACCAACAC	
FRUITFULL	KJ483239	<i>CaFUL</i>	GCTGTGAGTCTGGAAACAT	CATTGGTTTGGCTGCTCTG	
SHORT VEGETATIVE PHASE	KJ483225	<i>CaSVP-1</i>	TGGATACCTTTGACTCTTGG	CTCTTCTCATITGCTCAGTTG	
	KJ483241	<i>CaSVP-2</i>	TTTTTGCGATGCTGATGTT	ICTGGAATCACTGGCCTCTT	
	KJ483242	<i>CaSVP-3</i>	TCCGAGTCGAGAAAAATGGT	ACC CAAGTCTTCCATGCTCA	
FLOWERING LOCUS C	KJ483243	<i>CaFLC</i>	CTACGACTTCTGCAAGCACA	AAGGTCCCAATCAAGGAT	
FLOWERING LOCUS T	JQ955602.1	<i>CaLFI</i>	CAGGTGTTCAAGGTATGCAAAAA	CGTTCAGATGGCAAGTT	
CONSTANS	JQ955600.1	<i>CaCO</i>	TGCTATTGGTGCCGAGGTT	CGGTGCTCTCCTCCGTAATC	
PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4	XM027208636.2	<i>CaPIF4</i>	CACATACATGCCCGCTTAG	GAACATTGTGGTTTGGTGGCA	
LEAFY		<i>CaFT1</i>	GTTCCACAGGTCCTAAGCC	ATCGTCACTCCAACTCAACC	Diseñado con programa Primer 3

3.8. Análisis de expresión génica mediante qRT-PCR

3.8.1. Determinación de los genes de referencia (housekeeping genes)

Se realizó la validación de los genes de referencia: ubiquitina 19 (*UBQ19*), tubulina (*TUB*), actina (*ACT*), gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa (*GAPDH*) y el factor de iniciación eucariota 4A (*EIF4A*), los cuales se han utilizado como referencia interna en otras investigaciones (Bolívar, 2021). Cada gen se validó para tres tejidos: flor, nudo y hoja, para ello se utilizó la aplicación “Reference gene selection tool” (GENorm) del programa CFX Maestro (Bio-Rad™), que calcula automáticamente la estabilidad de cada gen de referencia en todas las muestras incluidas. De acuerdo con los resultados de la evaluación, se seleccionaron los dos genes que se expresan de manera estable en todas las muestras según el programa.

3.8.2. Cuantificación de los niveles de expresión de los genes relacionados en procesos de floración

Se analizaron los cambios en los niveles de expresión de 24 genes seleccionados (ver sección 3.7) contra los genes de referencia (previamente seleccionados). La amplificación de estos se realizó con el kit comercial Applied Biosystems™ SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Scientific™). Para cada reacción se utilizó 12 µl de master mix, 0,5 µl de cada oligonucleótido “forward” y “reverse” (10 uM), 9,5 µl de agua ultrapura y 2 µl de ADNc para un volumen final de 25 µl.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real StepOne (Applied Biosystems), todos los oligonucleótidos amplificaron correctamente con una temperatura de 60 °C. Por lo que se utilizó el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 45 s y el HRM con un incremento de temperatura de 55 °C a 95 °C a una velocidad de 0,5 °C /0,05 s. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se usó un control negativo con agua.

Mediante el análisis de HRM se verificó la especificidad de los productos de PCR y se realizó un análisis de expresión genética normalizada ($\Delta\Delta Cq$) siguiendo el método comparativo Ct (Livak & Schmittgen, 2001) para la normalización con el programa CFX Maestro (Bio-Rad™), utilizando los dos mejores genes de referencia internos (*EIF4A* y *ACT*).

3.9.Reacciones de amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación (MSAP: “Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism”) (Muñoz, 2020).

3.9.1. Digestión y ligación

Se utilizó el ADN extraído anteriormente (ver sección 3.5) de las flores y los nudos, de los tratamientos de estrés hídrico y sombra. Para la digestión del ADN de cada una de las muestras se hicieron pruebas con la cantidad de ADN total y el tiempo de incubación, ya que en pruebas previas utilizando el protocolo de Muñoz, 2020, no se logró una digestión completa del material.

Se llevaron a cabo simultáneamente en 2 tubos de 0,5 ml con cada uno de los siguientes reactivos:

- Tubo 1: 6 μ l del buffer Tango 10 X (Thermo Scientific™), 5U de la enzima *EcoRI* (Thermo Scientific™), 10 U de la enzima *HpaII* (Thermo Scientific™) y X ng de ADN. Donde X representa cada una de las cantidades de ADN que se probó: 100 ng, 150 ng, 200 ng, 300 ng, 500 ng.
- Tubo 2: 6 μ l del buffer Tango 10 X (Thermo Scientific™), 5U de la enzima *EcoRI* (Thermo Scientific™), 10 U de la enzima *MspI* (Thermo Scientific™) y X ng de ADN.

Esta digestión se realizó por un período de incubación de 3 h a 37 °C. Posteriormente, se realizó una segunda digestión con ligación simultánea, en la que se agregaron 10 μ l de una solución compuesta por 6 μ l de buffer digestión-ligación 5X (250 mM KOAc, 50 mM Tris-HOAc, pH: 7,5, 50 mM MgOAc, 250 μ g/ml BSA y 25 mM DTT), 5 U de *EcoRI*, 10 U de la enzima correspondiente de cada tubo (*MspI* o *HpaII*), 5 pmol/ μ l del adaptador-*EcoRI* (AATTGGTACGCAGTCTAC), 50 pmol/ μ l del adaptador H/M (CGATCGAGACTCAT), 10 mM ATP y 400 U/ μ l de ligasa T4 DNA (1000U) (Thermo Scientific™). Las muestras se incubaron según estos 2 protocolos:

- 3 h a 37°C, 2h por 16°C y finalmente se dejarán toda la noche a 4 °C.
- 16 h a 37°C, 2h por 16°C y finalmente se dejarán toda la noche a 4 °C.

Para verificar que las reacciones se efectuaron de forma correcta se realizará un gel de agarosa al 1 % m/v con buffer TBE 1X (45 min/100 V).

3.9.2. Pre-amplificación

Para las reacciones de pre-amplificación se utilizaron los ADN previamente digerido/ligado diluido (1/30, 1/10, 1/5 μ l) junto con 3 μ l de 10X buffer de PCR con MgCl₂, 0,6 μ l de dNTPs (10 mM), 0,2 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l), 1,5 μ l de *Eco*+0 (GACTGCGTACCAATTCA) (10 μ M), H/M+0 (ATGAGTCTCGATCGG) (10 μ M) y se llevarán al termociclador bajo el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min; 28 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min con una extensión final de 72 °C por 15 min. Para verificar que las reacciones de pre-amplificación se efectuaron de forma correcta se realizó un gel de agarosa al 1 % con buffer TBE 1X (45 min/100 V).

3.9.3. Amplificación selectiva

Para realizar las amplificaciones selectivas se utilizaron los productos de pre-amplificación obtenidos previamente diluidos (1/30, 1/10, 1/5 μ l) junto con 2 μ l de 10X buffer de PCR con $MgCl_2$, 0,4 μ l de dNTPs (10 mM), 0,2 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l), 1,5 μ l de *Eco*+3 (10 μ M), H/M+3 (10 μ M) (Cuadro 2) y se llevarán al termociclador bajo el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min; 13 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s (reduciendo la temperatura 0.7 °C por ciclo) y 72 °C por 1 min; 23 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min; 1 ciclo de extensión final de 72 °C por 15 min y 37 °C por 3 min.

Cuadro 2. Combinación de adaptadores selectivos analizados para el MSAP (Reportados por Cheng et al, 2019 y elaborados por Federico Albertazzi, comunicación personal)

<i>EcoRI</i>	<i>MspI/HpaII</i>
1) GACTGCGTACCAATTCAGG	1) ATGAGTCTCGATCGGAAT
2) GACTGCGTACCAATTCACG	2) ATGAGTCTCGATCGGACG
3) GACTGCGTACCAATTCAAA	3) ATGAGTCTCGATCGGATC
4) GACTGCGTACCAATTCATA	4) ATGAGTCTCGATCGGATT
6) GACTGCGTACCAATTCATT	6) ATGAGTCTCGATCGGTCA
7) GACTGCGTACCAATTCAAAT	7) ATGAGTCTCGATCGGTGC
8) GACTGCGTACCAATTC AATT	8) ATGAGTCTCGATCGGTCCA
9) GACTGCGTACCAATTCATAA	9) ATGAGTCTCGATCGGAATA
10) GACTGCGTACCAATTC AAATA	10) ATGAGTCTCGATCGGTACA
11) GACTGCGTACCAATTC AATTA	11) ATGAGTCTCGATCGGTAAA
12) GACTGCGTACCAATTC AATAA	12) ATGAGTCTCGATCGGTT

3.10. Metilación global de ADN utilizando secuenciación por bisulfito

Este procedimiento se realizó únicamente para el experimento de sombra. Se utilizaron 50 μ l del ADN aislado previamente y se envió a la empresa NOVOGENE donde se realizó la secuenciación genómica completa por bisulfito (WGBS) la cual se utiliza para convertir las citosinas no metiladas en uracilo, permitiendo que las citosinas metiladas se identifiquen mediante secuenciación genómica.

Para procesar los datos se utilizó la plataforma Galaxy (versión Europea), utilizando el siguiente flujo de trabajo:

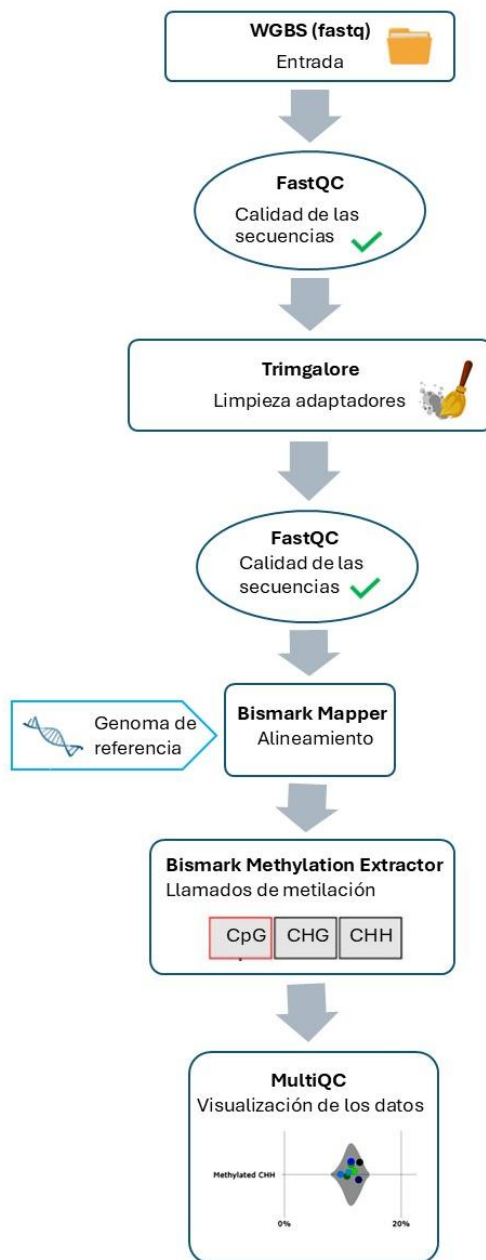


Figura 3. Flujo de trabajo bioinformático empleado en la plataforma Galaxy para analizar perfiles de metilación del ADN genómico en *Coffea arabica* L. mediante datos de secuenciación por bisulfito (WGBS). Elaboración propia.

3.11. Perfil de hormonas vegetales

Para la obtención del perfil hormonal de cada muestra de nudos en los diferentes tratamientos de sombra se utilizó el protocolo “Análisis de hormonas vegetales por cromatografía de alto desempeño con detección de masas (UHPLC-MS)”, el cual fue desarrollado por el laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS).

3.11.1. Extracción de las hormonas

Se colocó la muestra (previamente liofilizada) en un mortero y se pulverizó con nitrógeno líquido, se pesaron 20 mg de material seco y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml color ámbar. A cada muestra se le agregó 1 ml de acetonitrilo al 50% (v/v) frío y se dejaron durante toda la noche en oscuridad y a 4 °C con agitación de 600 rpm. Posteriormente se centrifugaron los tubos a máxima velocidad (13200 min⁻¹ a 4 °C por 10 min) y se traspasó el sobrenadante en un tubo limpio, los cuales se colocaron en un concentrador al vacío speed-vac (modo V-AQ) a temperatura ambiente (duración aproximada: 5 horas). El precipitado de cada muestra se resuspendió en 400 µl de acetonitrilo al 30 % (v/v), y se colocó en el sonicador por 5 min., finalmente se filtraron utilizando filtros de 0,2 µm y se procedió a analizar en el UHPLC–ESI–MS/MS (Ultimate 3000 TSQ Endura, serie TQH-E1-0288, marca Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Para la obtención de las muestras enriquecidas se utiliza el mismo procedimiento, pero luego de pesar del material seco, se agregó el estándar d-2ip (2,93 µL a cada tubo de una solución a 10 mg/L) al tubo Eppendorf color ámbar y se homogenizó utilizando el ultra-turrax con potencia escalonada. La utilización de muestras enriquecidas permite la estimación de la eficiencia de la extracción por medio del cálculo del porcentaje de recuperación.

3.11.2. Preparación de curvas de calibración, cuantificación y estimación de incertidumbre

Para la cuantificación de hormonas vegetales, se prepararon curvas de calibración específicas para cada corrida en el UHPLC–ESI–MS/MS. Se utilizaron 15 estándares, correspondientes a 12 hormonas naturales (trans-zeatina, zeatina ribósido isopenteniladenina, benziladenina, ácido indol-3-acético, isopentenila-denosina, benziladenina ribósido, ácido abscísico, ácido jasmónico y las giberelinas A1, A4 y A7) y 3 hormonas deuteradas utilizadas como controles internos (d-trans-zeatina, d-Benziladenina, d-Ácido indol-3-acético). Las concentraciones abarcaron un rango de 1,7 a 222 µg/kg. A partir de soluciones madre individuales, se preparó una mezcla estándar con una concentración de 1000 µg/kg. A partir de esta mezcla, se realizaron diluciones seriadas en metanol grado cromatográfico para generar los distintos puntos de la curva de calibración. Todas las soluciones se filtraron a través de filtros de membrana de 0,2 µm antes de su análisis. Las curvas de calibración se utilizaron para determinar la concentración de hormonas en las muestras analizadas, mediante interpolación del área del pico cromatográfico.

La concentración de cada hormona en las muestras se calculó con la siguiente fórmula:

$$C_H = \frac{\left(\frac{A - b}{m}\right) \times V_r}{M} \times \%R$$

donde CH es la concentración de la hormona en µg/kg, A es el área del pico cromatográfico, b el intercepto y m la pendiente de la curva de calibración, Vr el volumen de resuspensión en litros, M la masa de la muestra seca en kilogramos, y %R el porcentaje de recuperación.

Para estimar el porcentaje de recuperación del método de extracción, se prepararon muestras enriquecidas con una concentración conocida de un estándar deuterado y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{(\text{Concentración en muestra enriquecida})}{\text{Concentración real adicionada}} \times 100$$

Los límites de detección y cuantificación fueron determinados previamente para cada hormona vegetal mediante validaciones internas en el laboratorio. La estimación de la incertidumbre en los resultados se realizó considerando dos factores principales: la variabilidad entre repeticiones

(representando el 89% de la incertidumbre total) y el porcentaje de recuperación (11%). Por esta razón, todos los análisis se realizaron por duplicado y se reportó la desviación estándar. El porcentaje de recuperación fue incorporado directamente en el cálculo de la concentración, lo que permitió una estimación precisa y confiable del contenido hormonal en las muestras analizadas.

Para el análisis del perfil hormonal, se aplicaron métodos estadísticos multivariados con el objetivo de identificar patrones de variación entre los diferentes tratamientos de sombra y épocas de muestreo. Se realizaron análisis de componentes principales (PCA), regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) y su versión ortogonal (OPLS) utilizando el software Multivariate (versión 2.3.10) en la plataforma Galaxy, lo que permitió explorar la estructura de los datos, clasificar las muestras y determinar las hormonas con mayor capacidad discriminante. Además, se construyeron gráficos de barras con las concentraciones promedio de cada hormona, comparando todos los tratamientos de sombra (0%, 30%, 50% y 70%) en los meses de enero del 2020 y septiembre del 2019, para facilitar la interpretación de los cambios hormonales. Además, se generaron mapas de calor mediante el software heatmap2 (versión 3.2.0) también de la plataforma Galaxy, incorporando agrupamiento jerárquico bidireccional para visualizar la distribución relativa de las hormonas y las similitudes entre condiciones experimentales.

4. RESULTADOS

4.1.Extracción de ADN, ARN y síntesis de ADNc

Se logró extraer de forma exitosa ADN y ARN de los nudos de café para los análisis posteriores (Anexo I). El ARN se extrajo libre de contaminación con ADN, esto se comprobó al amplificar el ADNc de las muestras con el oligonucleótido ClpP_1 el cual es exclusivo de una región del genoma del cloroplasto por lo que no amplificó en ninguna de las muestras de ADNc, y amplificó en el control positivo de ADN genómico (Anexo II)

En el caso del tejido floral, se presentó un inconveniente importante: el congelador que almacenaba las muestras sufrió un desperfecto mecánico, lo que provocó la descongelación y oxidación de todo el material. Aunque se logró realizar la extracción de los ácidos nucleicos, el producto final

mantenía signos de oxidación. En el gel de agarosa se observó una ligera degradación tanto del ADN como del ARN; no obstante, debido a la intensa coloración de las muestras, no fue posible medir las relaciones 260/280 y 260/230 en el espectrofotómetro para evaluar su calidad (Anexo I).

4.2. Expresión génica

Los genes de referencia seleccionados fueron Actina (*ACT*) y el factor de iniciación eucariota 4A (*EIF4A*), esto según los resultados de estabilidad del “Reference gene selection tool” (GENorm) del programa CFX Mestro (BioRad) (Anexo III).

Durante las pruebas preliminares para el análisis de expresión génica de las flores recolectadas en el experimento de sequía, se identificaron problemas asociados a la calidad del ARN extraído. A pesar de que fue posible sintetizar ADNc, la oxidación del tejido floral, producto de una degradación acelerada por la descongelación, comprometió la integridad del ARN y como resultado, las reacciones de qPCR presentaron fallos en la amplificación de los genes objetivo.

Esto se evidenció en los análisis de curvas de disociación (HRM), donde solo unas pocas muestras mostraron picos definidos para los genes de referencia (Anexo IV), mientras que la mayoría no presentó amplificación o generó productos inespecíficos. Ejemplo de esto, sucedió con el gen *CaAP3*, donde se detectaron múltiples picos anómalos que indican una amplificación inespecífica (Anexo V). Debido a estos resultados inconsistentes y la baja calidad general de las curvas de fusión con la mayoría de los genes incluyendo los genes de referencia, se decidió no continuar con el experimento de expresión genética para las muestras florales.

En el caso de las muestras de los nudos de café para los tratamientos de sombra, se logró optimizar el protocolo para 21 oligonucleótidos de los 34 seleccionados inicialmente. Se analizó la expresión diferencial relativa de estos genes bajo la respuesta de 4 tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) en dos meses contrastantes (setiembre 2019-época lluviosa, enero 2020-época seca). Para el mes de setiembre se observó que en el tratamiento de 70% sombra, los genes *CaAGL42*, *CaAGL6*, *CaCc_FRL1*, *CaCc_FRL3*, *CaCe_FRL1*, *CaCO*, *CaFT1*, *CaSVP-1*, *CaAPI* mostraron mayor expresión con respecto al resto de los tratamientos (Anexo VI). Esta diferencia es notable principalmente en los genes *CaAGL6*, *CaCO* y *CaFT1* (Figura 4).

Para los genes *CaFLC*, *CaLFY*, *CaSVP3* y *CaTM3-1* mostraron una expresión baja constante entre los tratamientos, con un leve aumento en los tratamientos de 30% y 50% de sombra. Los genes *CaAP3*, *CaCc_FRL2*, *CaCe_FRL4* y *CaAPI* también mostraron una expresión baja constante entre los tratamientos, pero estos con un leve aumento en el tratamiento 0% de sombra (Figura 4).

Finalmente, los genes *CaCe_FRL2*, *CaCe_FRL3*, *CaCe_FRL4* y *CaTM6* mantuvieron una expresión baja constante en todos los tratamientos, no se observaron diferencias importantes entre los tratamientos (Anexo VI).

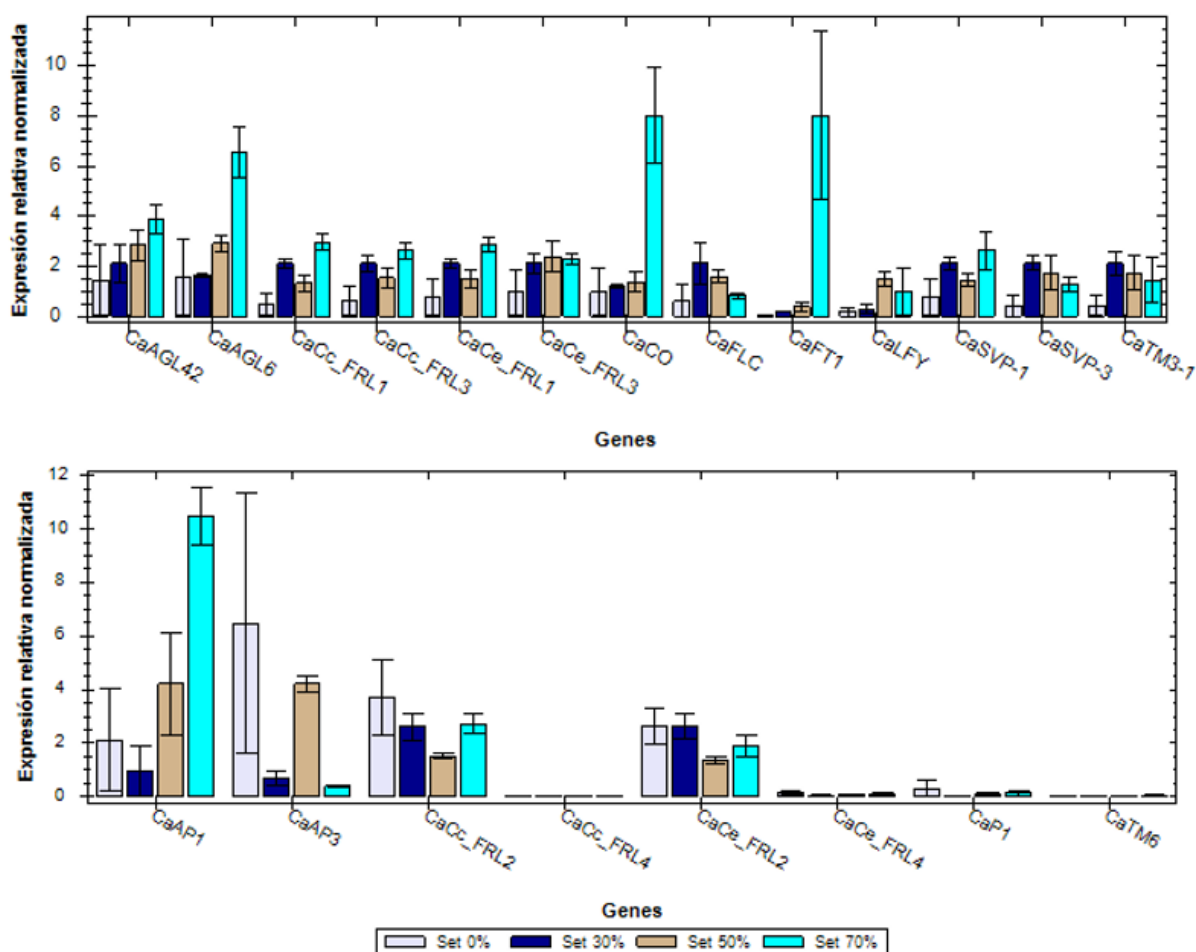


Figura 4. Análisis cuantitativo por PCR tiempo real (RT-qPCR) de la expresión relativa de genes relacionados con el proceso de floración en *Coffea arabica* L. en diferentes tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) durante el mes de setiembre. Las barras muestran el promedio \pm DE de 3 repeticiones

En general para el mes de enero se observó un aumento de expresión en los tratamientos de sombra intermedia, se obtuvieron valores de expresión muy altos para los genes *CaAGL6* (30% y 50% sombra), *CaLFY* (30 % sombra) y *CaSVP-1* (30% y 50% de sombra) (Figura 5).

Los genes *CaCc_FRL1*, *CaCc_FRL2*, *CaCc_FRL4*, *CaCe_FRL1*, *CaCc_FRL2* y *CaCeFRL4*, al igual que en setiembre muestran baja expresión sin diferencias relevantes entre los tratamientos. Sin embargo, vemos que los genes *CaCc_FRL3* y *CaCe_FRL3*, muestran un aumento de la expresión en tratamiento de sombra intermedia de 30%. Los genes *CaCO* y *CaFTI* vuelven a mostrar un comportamiento de expresión similar entre ellos, pero esta vez con un aumento de expresión en el nivel de sombra intermedia de 30%. Por otro lado, los genes *CaAGL42*, *CaAP1* y *CaAP3* muestran un aumento de expresión en el tratamiento de 50% sombra (Figura 5).

Los genes *CaFLC*, *CaSVP3*, *CaTM3-1*, *CaP1* y *CaTM6* mantuvieron una expresión baja constante en todos los tratamientos, incluso en algunos tratamientos la expresión fue nula, no se observaron diferencias entre los tratamientos (Anexo VI).

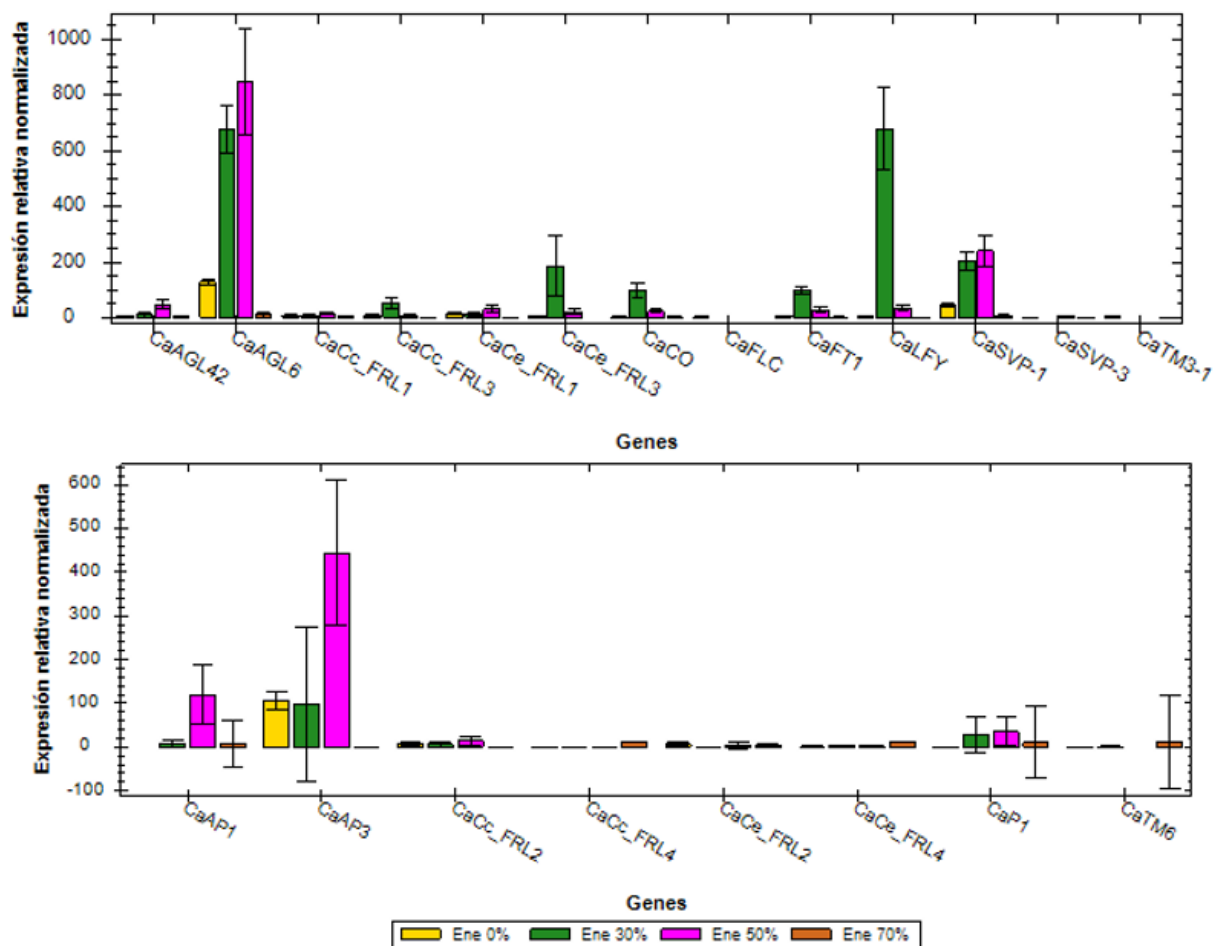


Figura 5. Análisis cuantitativo por PCR tiempo real (RT-qPCR) de la expresión relativa de genes relacionados con el proceso de floración en *Coffea arabica* L. en diferentes tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) durante el mes de enero. Las barras muestran el promedio \pm DE de 3 repeticiones

4.3. Reacciones de amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación (MSAP: “Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism”)

Durante el desarrollo del protocolo de metilación MSAP, se realizaron ensayos tanto con ADN extraído de flores oxidadas (estadio E3, E4, E5) como de nudos florales de *C. arabica* sometidos a condiciones de sombra y estrés hídrico, se procedió a realizar el protocolo de digestión y ligación con las enzimas *EcoRI* y *HpaII/MspI*, según el procedimiento descrito. En el caso del ADN de

flores oxidadas, se aplicaron diferentes concentraciones de ADN (100, 200, 300 y 500 ng) y condiciones de incubación (3 h a 37 °C y 16 h a 37 °C, seguidas de incubaciones a 16 °C y 4 °C) para lograr una digestión completa con las enzimas; sin embargo, ninguno de los tratamientos resultó en una digestión eficiente, lo cual fue confirmado por electroforesis en gel (Anexo 4). Debido al estado degradado del material vegetal y a los fallos persistentes en la digestión, se optó por no continuar con el análisis de estas muestras.

Con el ADN de los nudos florales se continuó el protocolo, y aunque se observó una ligera digestión, los productos obtenidos fueron escasos. Se procedió a realizar la pre-amplificación, pero en los análisis por electroforesis las bandas obtenidas fueron sumamente tenues, incluso al reducir las diluciones. En la amplificación selectiva que se visualizaron por medio de electroforesis capilar, el patrón de bandas fue aún más débil. Se realizaron pruebas adicionales limpiando el ADN extraído de los nudos mediante purificación adicional; sin embargo, los resultados de las reacciones de amplificación no mejoraron. A pesar de utilizar múltiples combinaciones de oligonucleótidos selectivos, los perfiles obtenidos continuaron mostrando baja intensidad y escasa resolución, limitando la utilidad de los productos amplificados para análisis posteriores como se evidencia en los electroferogramas presentados en el anexo 5. Debido a los resultados negativos y a la poca repetibilidad que se observó durante las pruebas se decide no continuar con este análisis.

4.4. Metilación global de ADN utilizando secuenciación por bisulfito

Las 8 muestras de ADN correspondientes a los tratamientos de sombra (0%, 30%, 50% y 70%) durante los meses de setiembre 2019 y enero 2020, fueron enviadas a la empresa NOVOGENE y se logró realizar la secuenciación con tratamiento de bisulfito de forma exitosa. Se determinó el nivel de metilación de la citosina en cada contexto para todas las muestras.

En el mes de setiembre 2019 el tratamiento de sombra del 70% fue la muestra que obtuvo los porcentajes más altos de metilación en todos los contextos (mCpG=67,4%, mCHG=36,9%, mCHH=12,9%). La muestra del tratamiento de sombra de 50% tuvo un porcentaje de metilación en el contexto mCpG de 64,7 % y tuvo los porcentajes de metilación más bajos de todas las muestras en los contextos mCHG (31,2%) y mCHH (10,7%). Mientras que el tratamiento de sombra de 30% tuvo un porcentaje de metilación alto en el contexto mCpG (65.4%) y un

porcentaje bajo en los contextos mCHG (32.6%) y mCHH (11,4%) con respecto al resto de las muestras. (Cuadro 3). La muestra del tratamiento sin sombra (0%) fue la que obtuvo el valor más bajo en el contexto mCpG, pero porcentajes altos en los contextos mCHG (33,3%) y mCHH (11,9%).

Para el mes de enero 2020 se obtuvieron valores parecidos al mes de setiembre, donde la muestra del tratamiento de 70% sombra presenta valores altos en todos los contextos (mCpG=66,4%, mCHG=35,5%, mCHH=12,7%). En la figura 6 podemos ver como en el contexto mCHG, las muestras del tratamiento 70% se separan del resto. Para muestra del tratamiento de 50% sombra se presentaron porcentajes intermedios con respecto al resto de las muestras en los 3 contextos (mCpG=64%, mCHG=32,7%, mCHH=11,4%). La muestra del tratamiento de 30% de sombra presenta los porcentajes más bajos en los contextos mCpG (63,9%) y mCHH (9,6%), mientras que en el contexto mCHG presenta un porcentaje intermedio de 33%. La muestra del tratamiento sin sombra (0%) presenta el porcentaje más alto de todas las muestras en el contexto mCp (66,8%), el porcentaje más bajo de todas las muestras en el contexto mCHG (32,3%) y un porcentaje intermedio en el contexto mCHH de 11%. (Cuadro 3). Finalmente se realizó una comparación de los 3 contextos de metilación entre los meses de enero y setiembre mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis; sin embargo; no hubo diferencias significativas para ninguno de los contextos ($p>0,05$).

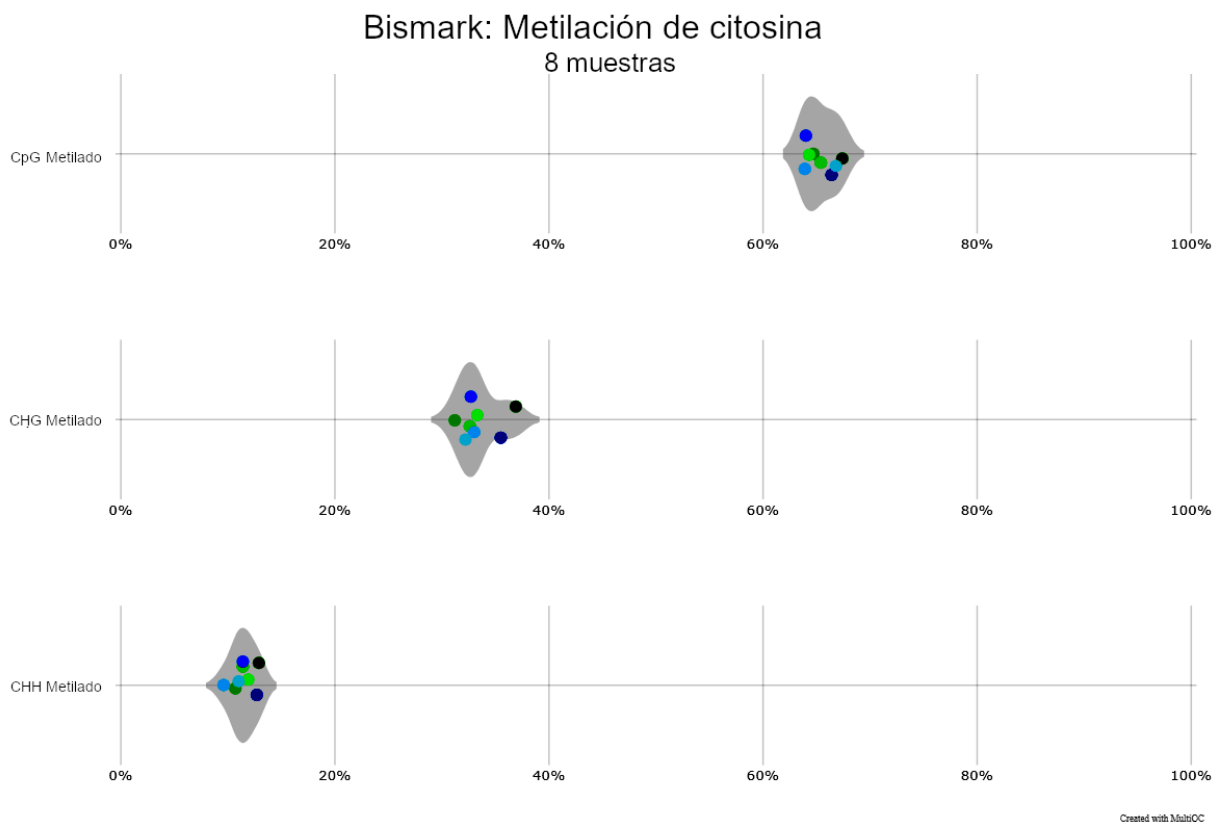


Figura 6. Gráfico de distribución de los niveles globales de metilación de citosinas en los contextos CpG, CHG y CHH, generado a partir del módulo Bismark Methylation Extractor e integrado en MultiQC. Cada punto representa una muestra individual ($n = 8$) las muestras verdes corresponden al mes de setiembre 2019 y las azules al mes de enero 2020, la intensidad del color va aumentando conforme aumenta la cantidad de sombra en el tratamiento.

Cuadro 3. Porcentajes globales de metilación de citosinas en los contextos CpG, CHG y CHH en muestras de nudos de *Coffea arabica* L. recolectadas en dos meses (septiembre 2019 y enero 2020) bajo distintos niveles de sombra (0%, 30%, 50% y 70%).

Muestra	Mes	% Sombra	%mCpG	%mCHG	%mCHH
S70	Septiembre	70	67,4	36,9	12,9
S50	Septiembre	50	64,7	31,2	10,7
S30	Septiembre	30	65,4	32,6	11,4
S0	Septiembre	0	64,3	33,3	11,9
E70	Enero	70	66,4	35,5	12,7
E50	Enero	50	64	32,7	11,4
E30	Enero	30	63,9	33	9,6
E0	Enero	0	66,8	32,2	11

4.5. Perfil de hormonas

Se logró medir la concentración de las siguientes 7 hormonas vegetales en todas las muestras de nudos florales en los 4 tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%): ácido abscísico (ABA), ácido giberélico 1 y 7 (AG1 y AG7), ácido jasmónico (JA), isopenteniladenina ribósido (iPR) y Zeatina ribósido 1 y 2 (ZR-1 y ZR-2).

En el análisis multivariado mediante mapa de calor jerárquico nos mostró diferencias claras en el perfil hormonal de los nudos de café tanto en el mes de muestreo (setiembre 2019-enero 2020) como en los tratamientos de sombra utilizados (0%, 30%, 50% y 70%). Los colores indican niveles relativos de concentración: tonos claros representan valores cercanos a la media, tonos marrones indican concentraciones por debajo del promedio, y tonos turquesa reflejan concentraciones elevadas. La agrupación jerárquica muestra relaciones entre muestras y perfiles hormonales similares, (Figura 7).

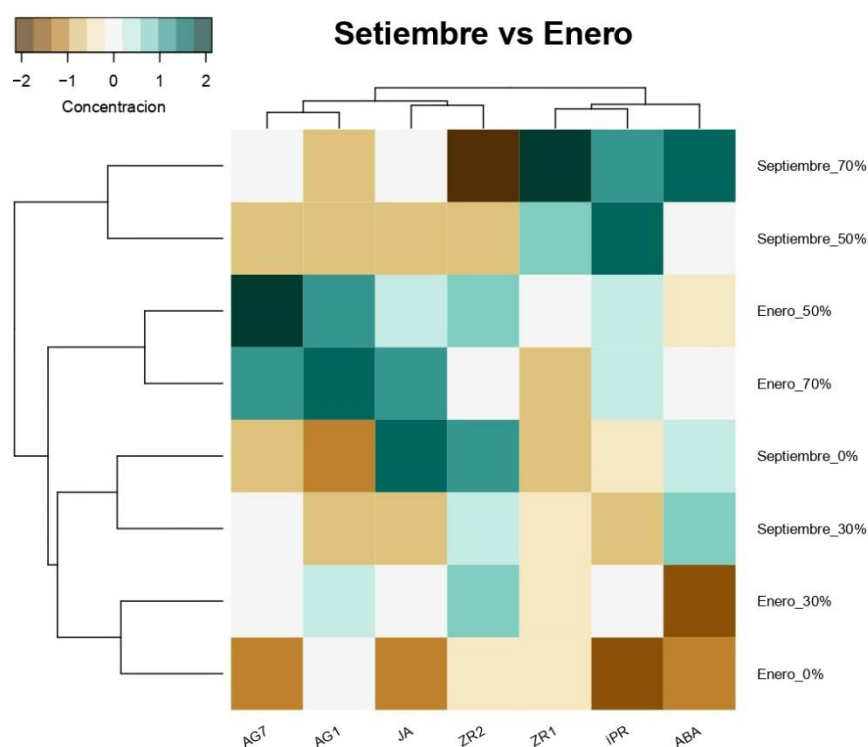


Figura 7. Mapa de calor jerárquico de concentraciones relativas de hormonas en nudos de *Coffea arabica* L. recolectados en dos meses (septiembre 2019 y enero 2020) bajo distintos niveles de sombra (0%, 30%, 50% y 70%).

La figura 8 muestra el gráfico del análisis de componentes principales donde el componente 1 (t1) explica el 46% de la variabilidad, y separa claramente las muestras según el tratamiento de sombra. Podemos observar que las muestras con 70% de sombra (Rep1, Rep3, Rep4) se agrupan en el sector positivo del eje t1, mientras que las repeticiones correspondientes al tratamiento de 0% y 30% de sombra están hacia el sector negativo. El componente 2 (t2) explica un 20% adicional, aportando pequeñas variaciones entre muestras que no son explicadas únicamente por el grado de sombra.

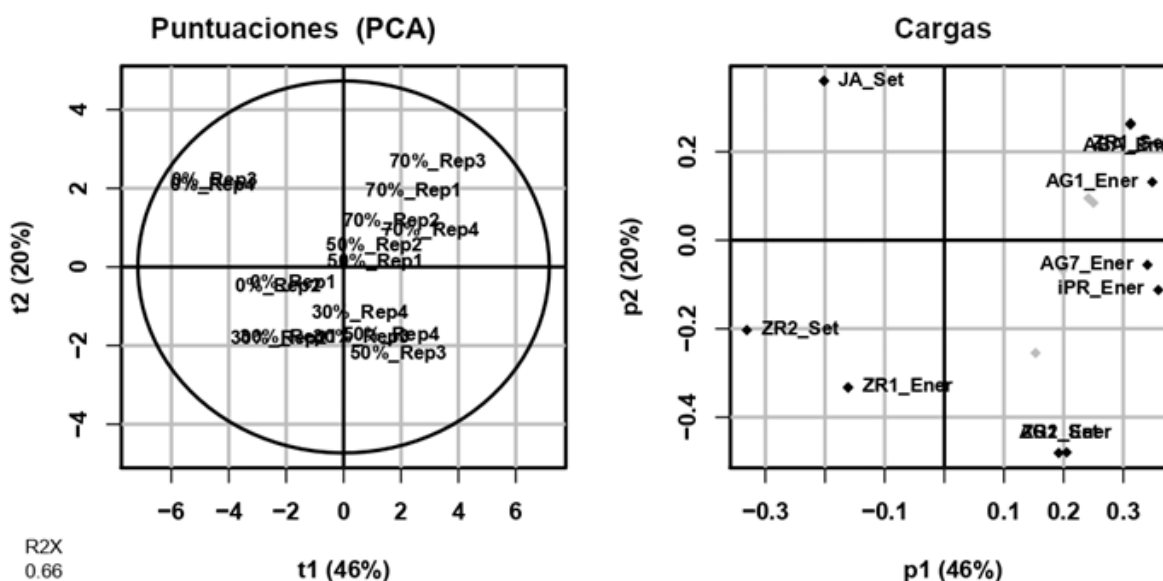


Figura 8. Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en las concentraciones de hormonas en nudos de *Coffea arabica* L. bajo distintos niveles de sombra (0%, 30%, 50% y 70%) recolectados en enero y septiembre. El gráfico de puntuaciones (izquierda) muestra la distribución de las réplicas según las dos primeras componentes principales (t1 y t2) y el gráfico de cargas (derecha) indica la contribución de cada hormona a la varianza explicada.

Específicamente en el caso de las giberelinas, AG1 presentó mayores concentraciones en los tratamientos del 30% (0,156 ug/kg) y 50% (0,157 ug/kg) en el mes de setiembre 2019, y en los tratamientos de 50% (0,284 ug/kg) y 70 % (0,311 ug/kg) en el mes de enero 2020 como se observa en la figura 7.

Sin embargo, en la figura 9A se puede apreciar en el mes de enero un aumento de esta giberelina en todos tratamientos con respecto a setiembre, principalmente en el tratamiento de 70% sombra donde la concentración de AG1 triplica la concentración de setiembre. Para AG7 podemos observar que en ambos meses y en todos los tratamientos este se encuentra presente en mayor concentración que AG1 (Figura 9). En general mantiene constante entre los tratamientos, y entre los 2 meses de colecta, podemos ver un ligero aumento en el tratamiento de 50% y 70% sombra en el mes de enero (figura 9 B). La acumulación de estas hormonas en los tratamientos de mayor sombreado coincide con su localización en el gráfico de puntuaciones de PCA (figura 8), donde AG1_Ener y AG7_Ener mostró una contribución positiva al componente PC1, contribuyendo significativamente a la separación de las muestras correspondientes a condiciones de alta sombra.

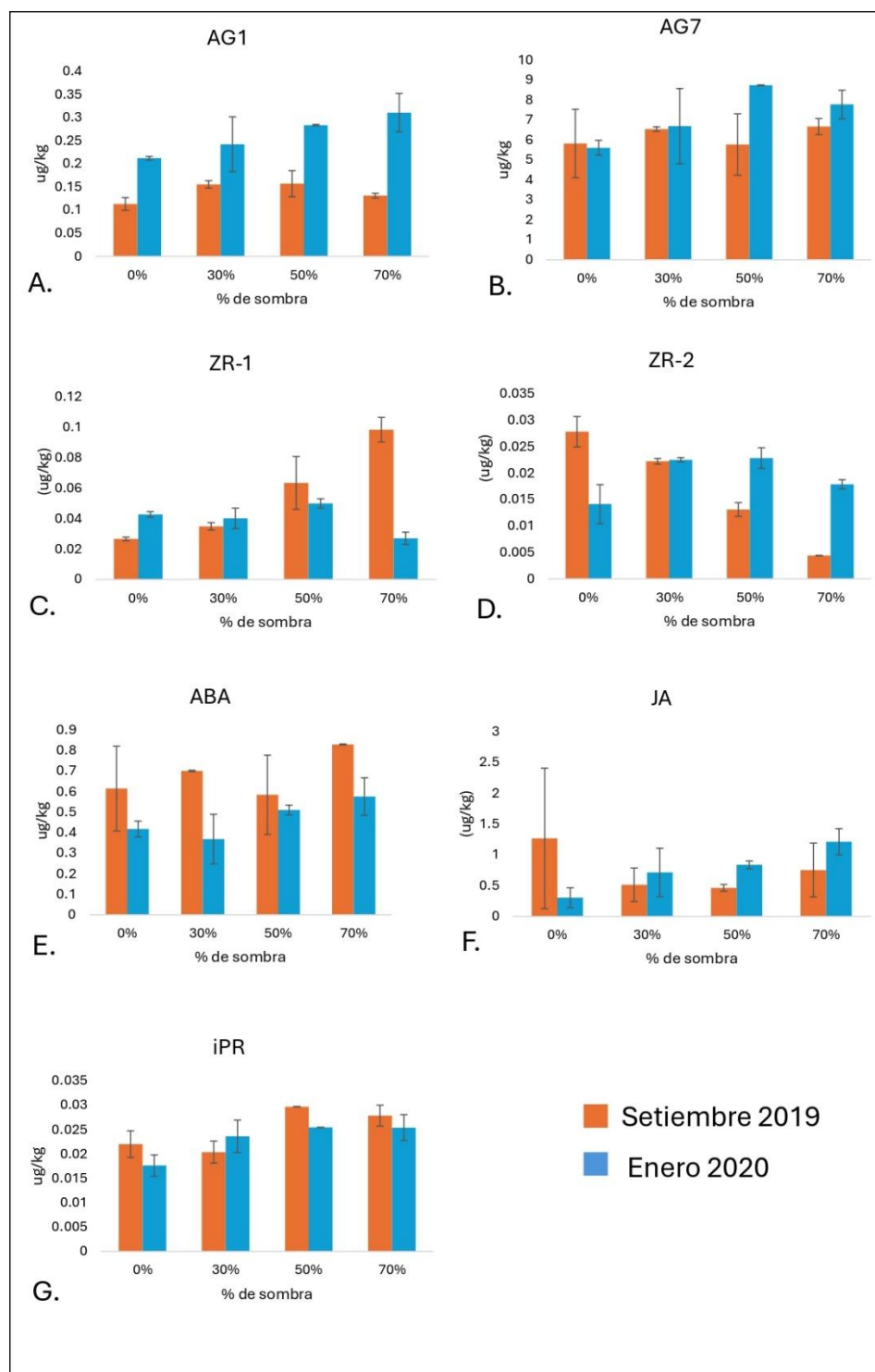


Figura 9. Gráficos de barras de las concentraciones promedio (\pm DE) de siete hormonas vegetales (AG1, AG7, ZR-1, ZR-2, ABA, JA e iPR) en nudos florales de plantas de *Coffea arabica* L. bajo cuatro niveles de sombra (0%, 30%, 50% y 70%) durante dos épocas del año: enero (gris claro) y septiembre (gris oscuro). Cada letra (A–G) corresponde a una hormona diferente.

Las citoquininas ZR-1 y ZR-2, mostraron una concentración baja en general. En el caso de ZR-1 podemos observar en el mes de setiembre una mayor concentración en el tratamiento de 70% y para ZR-2 una mayor concentración en el tratamiento de 0%. Para el mes de enero ambas citoquininas presentan la mayor concentración en el tratamiento de sombra intermedia de 50%. (figura 9 C y D). Mientras que en la figura 8 nos muestra que ZR1_Ener y ZR2_Set tienen cargas negativas lo que sugiere que las muestras con niveles altos de ZR2 y ZR1 tienden a tener perfiles hormonales distintos, probablemente asociados a bajos niveles de sombra y con poca actividad de giberelinas como G1_Ener, AG7_Ener y ABA_Set que se encuentran de forma positiva en el cuadrante derecho.

Para la citoquinina iPR hay poca variabilidad entre los tratamientos de sombra, esto sucede tanto en setiembre como en enero. Se observa un leve aumento en los porcentajes de sombra de 50% y 70% (figura 7) que también se ve reflejado en el gráfico 8 donde vemos a iPR_Ener con una contribución positiva al componente PC1.

Para ABA se observó mayor acumulación en el tratamiento de 70% tanto en setiembre como en enero (figura 9 E), en la gráfica de cargas de la figura 8 podemos observar que tanto ABA_Set como ABA_Ener contribuyen de forma positiva al componente PC1, se encuentra una muy cercana a la otra, lo que puede sugerir que su comportamiento es similar en ambos meses. Además, se observa que ABA está relacionada con muestras que tienen perfiles dominados por giberelinas y citoquininas en enero, especialmente en condiciones de alta sombra.

En las muestras se observó mayor acumulación de JA en el tratamiento de 0% para setiembre y 70% para enero (figura 9 F), lo que evidencia un patrón de acumulación diferencial entre ambos meses. La gráfica de la figura 8 nos muestra que JA_Set contribuye a la separación vertical (PC2) y en menor grado a la horizontal (PC1), se observa que muestras con altos niveles de JA en setiembre tienden a ubicarse en el cuadrante superior izquierdo del gráfico de puntuación PCA, y se encuentra opuesta a las giberelinas y ABA (que están a la derecha), lo que indica que no se acumula en las mismas condiciones.

Para finalizar se adjunta la figura 10 donde se resume los análisis inicialmente planteados y su estado de ejecución para ambos ensayos experimentales. En el experimento de estrés hídrico (riego-sequía) se previó cuantificar la expresión génica y caracterizar la metilación global mediante el sistema MSAP; sin embargo, la oxidación severa del ARN y el ADN extraídos impidió

la obtención de resultados confiables y repetibles, por lo que dichas determinaciones no pudieron completarse. En el experimento de condiciones de sombra (0 %, 30 %, 50 % y 70 %) sí permitió avanzar con éxito en la cuantificación de la expresión génica y en el perfil hormonal, así como en la evaluación de la metilación global del ADN mediante WGBS. El análisis MSAP, propuesto inicialmente para realizar una comparación entre técnicas, fue suspendido debido a la limitada integridad del ADN para esta técnica, optándose únicamente por la técnica de secuenciación por bisulfito que ofrece una resolución superior. Esta figura, por tanto, delimita claramente el conjunto de datos disponibles que sustentan la discusión y deja en evidencia las restricciones metodológicas que condicionaron el alcance de los resultados.

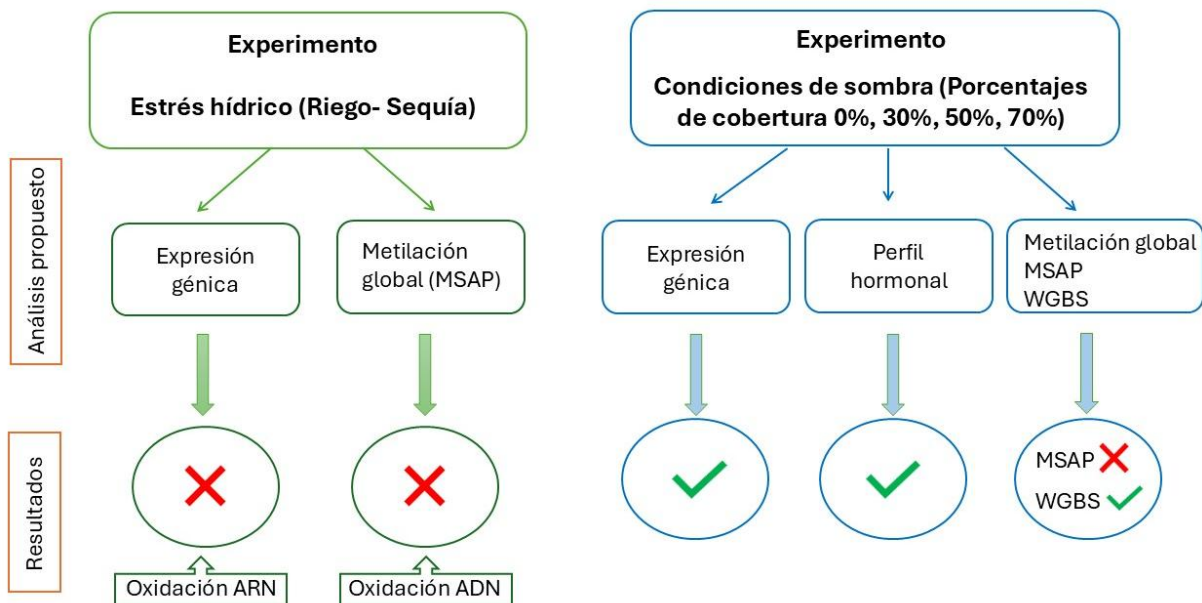


Figura 10. Resumen de los análisis moleculares planificados y su estado de ejecución en los dos ensayos experimentales (estrés hídrico y condiciones de sombra). Las flechas indican la secuencia lógica entre el planteamiento experimental, los análisis previstos y los resultados obtenidos. Elaboración propia.

5. DISCUSIÓN

5.1. Expresión génica

Los perfiles de expresión génica obtenidos en nudos florales de *C. arabica* bajo condiciones de sombra revelan una red reguladora floral compleja y dinámica, ajustada tanto al estado fenológico del tejido como a las condiciones ambientales, particularmente la radiación modulada por la sombra. Durante enero, cuando las yemas florales se encuentran en etapas tempranas de diferenciación, se observó una inducción notable de genes asociados con la transición floral, como *CaFT1*, *CaLFY*, *CaAPI* y *CaSVP-1*, especialmente bajo sombra intermedia (30% y 50%).

FLOWERING LOCUS T (*FT*) es un florigeno conservado en angiospermas que actúa como integrador central de señales inductoras como el fotoperiodo, la temperatura y hormonas, promoviendo la transición floral a través de su interacción con *FD* (factor de transcripción clonado de FLOWERING LOCUS D, que codifica un factor de transcripción del tipo bZIP) en el meristemo apical (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). En café, *CaFT1* presentó una fuerte expresión bajo 30% de sombra en enero, coincidiendo con una alta expresión de *CaLFY*, un regulador de identidad floral (Blázquez et al., 1997). Este patrón respalda su rol conjunto en la activación del meristemo floral, tal como se ha descrito en *Arabidopsis* y especies perennes como el manzano y el eucalipto (Kotoda et al., 2010; Klocko et al., 2016). Y coincide con las ventanas fisiológicas de inducción floral previamente descritas para café, tanto en modelos clásicos (enero-marzo; Camargo & Camargo, 2001) como en modelos extendidos (febrero-octubre; Cardón et al., 2022).

El aumento de *CaAPI* bajo sombra intermedia, aunque de menor magnitud comparado con *CaLFY*, sugiere un efecto aditivo o sinérgico en la determinación del meristemo floral, como ha sido propuesto en *Arabidopsis*, donde *LFY* activa directamente la expresión de *API* (Liljegren et al., 1999; Winter et al., 2011). Este modelo también se ha reportado en otras especies leñosas como *Populus*, en la que la activación secuencial *LFY-API* determina la transición floral en el meristemo apical (Böhlenius et al., 2006).

Por otro lado, *CaSVP-1* mostró un patrón de expresión elevado en enero bajo 30–50% de sombra, aunque no exactamente paralelo a *CaAPI*, como se había sugerido anteriormente. Esto implica

que, si bien *CaSVP-1* podría haber adquirido funciones promotoras de floración similares a *AGL24* por neofuncionalización (de Oliveira et al 2014), su regulación puede estar modulada por factores adicionales o contextuales, posiblemente epigenéticos o hormonales (Li et al., 2008; Alexandre & Hennig, 2008).

Los genes *CaCe_FRL1*, *CaCc_FRL1* y *CaCe_FRL3*, homólogos de *FRIGIDA*-like, también se expresaron con mayor intensidad en enero bajo sombra intermedia, en coincidencia con la activación de *CaFTI* y *CaLFY*. En *Arabidopsis*, *FRI* promueve la expresión de *FLC*, un represor de la floración que actúa inhibiendo la expresión de *FT* y *SOC1* en el meristemo floral (Michaels & Amasino, 1999; Amasino, 2010). Sin embargo, en *C. arabica*, la expresión de *CaFLC* fue baja en enero y se incrementó en septiembre, lo que sugiere que *CaFRL* podría cumplir funciones divergentes, posiblemente como reguladores positivos de la floración, tal como se ha propuesto en otras especies tropicales no vernalizantes (Barreto et al., 2012; de Oliveira et al., 2014).

Durante septiembre, mes en el cual los nudos florales contenían frutos en desarrollo, la mayoría de los genes inductores florales mostraron niveles bajos de expresión, excepto bajo sombra intensa (70%), donde *CaFTI* y *CaCO* se expresaron de forma marcada. Esta expresión sugiere una posible reinducción floral asincrónica inducida por baja radiación, en concordancia con modelos de floración recurrente descritos para *C. arabica* y otras especies tropicales perennes, en los que factores ambientales como la sombra o la rehidratación tras un periodo de estrés hídrico modulan la transición floral (López et al., 2021). Además, *CONSTANS (CO)*, un regulador dependiente del fotoperiodo que induce la expresión de *FT* en *Arabidopsis*, también responde a señales del reloj circadiano y a cambios en la irradiancia mediante fotorreceptores como *PHYA* y *CRY1/2* (Valverde et al., 2004; Imaizumi et al., 2005). Su coactivación con *CaFTI* bajo 70% de sombra en septiembre apoya un modelo tropical adaptado, menos dependiente de la duración del día y más sensible a variaciones en la calidad de luz (Turck et al., 2008).

El perfil de *CaFLC* mostró un incremento en septiembre bajo sombra, especialmente bajo 30%, sin correlación inversa clara con *CaFTI*. Esto refuerza la hipótesis de que *CaFLC* no actúa como represor central de floración, sino que podría estar implicado en la regulación de latencia o procesos asociados a estrés abiótico (Sheldon et al., 2000). Esta función alternativa está respaldada por su expresión en tejidos vegetativos y reproductivos (Barreto et al., 2012) y su regulación

positiva por estrés hídrico (de Oliveira et al., 2014), lo cual podría ser relevante durante la fase de maduración del fruto en condiciones de sombra.

En cuanto a los genes MADS-box, *CaAGL6* mostró una expresión marcadamente elevada en enero bajo sombra intermedia y alta, así como una expresión moderada en septiembre, lo que indica una función persistente tanto en la iniciación floral como en el desarrollo del fruto (Rijkema et al., 2009).

CaPI y *CaAP3* mantuvieron expresión moderada enero y un poco más alta en setiembre, lo cual indica una posible participación extendida más allá del desarrollo floral, probablemente en procesos de crecimiento vegetativo o maduración de frutos (Poupin et al., 2007). Estos patrones de expresión de genes morfogenéticos sugieren una regulación precisa que va más allá del control transcripcional convencional. De hecho, estudios recientes han identificado mecanismos adicionales que modulan la transición floral, como el procesamiento alternativo de ARN y la regulación intrónica. Por ejemplo, en el gen *AGAMOUS* (*AG*), se han identificado elementos cis-regulatorios en intrones que actúan como plataformas para la integración de señales de activadores como *LFY* y *WUS*, permitiendo una modulación espaciotemporal precisa de su expresión durante el desarrollo floral (Hong et al., 2003). Asimismo, investigaciones recientes han destacado el papel del “splicing” alternativo de microexones en la regulación del tiempo de floración, lo cual posibilita la generación de isoformas funcionales específicas de genes clave involucrados en floración y desarrollo reproductivo (Wang et al., 2024). Estos mecanismos postranscripcionales y cis-regulatorios enriquecen significativamente el panorama del control genético de la floración, especialmente en especies perennes, donde la plasticidad fenológica requiere una modulación ajustada en respuesta a señales ambientales variables.

En conjunto, estos resultados apoyan un modelo regulador de floración altamente plástico en *C. arabica*, donde múltiples genes incluidos *CaFTI*, *CaLFY*, *CaAPI*, *CaCO*, *FRL* y *MADS-box* actúan en redes reguladas por señales ambientales como la sombra, y moduladas por mecanismos temporales y espaciales. La asincronía en la activación de genes inductores entre enero y septiembre, así como la expresión persistente de genes morfogenéticos en etapas reproductivas tardías, reflejan una estrategia adaptativa de floración flexible, coherente con la ecología perenne de la especie en ambientes tropicales con estacionalidad lumínica poco marcada.

5.2. Metilación

La metilación del ADN es una de las principales modificaciones epigenéticas que regulan la expresión génica, la estabilidad del genoma y las respuestas al ambiente en plantas (Law & Jacobsen, 2010; Zhang et al., 2018). En este estudio se evaluaron los niveles de metilación de citosina en los contextos mCpG, mCHG y mCHH en nudos florales de *C. arabica* variedad Villa Sarchí bajo distintos niveles de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) durante dos estados fenológicos contrastantes: en enero, cuando los nudos contenían yemas florales, y en septiembre, cuando los nudos presentaban frutos inmaduros.

Los resultados revelaron que, en ambos meses, el tratamiento con 70% de sombra presentó los niveles más altos de metilación en los tres contextos de citosina. Esto sugiere que una menor disponibilidad lumínica podría estar asociada con un aumento en la metilación del ADN, posiblemente como parte de una respuesta epigenética que modula la expresión de genes clave en desarrollo y estrés (Kinoshita & Seki, 2014; Crisp et al., 2016). Lo que resulta relevante, considerando que el desarrollo de yemas florales y de frutos inmaduros está controlado por redes génicas sensibles a regulaciones epigenéticas, incluyendo metilación y desmetilación activa (Zhang et al., 2018; Gehring et al., 2009).

El contexto mCpG fue el más metilado en todas las muestras, superando el 63%, lo cual es coherente con su papel conservado en la regulación transcripcional estable, particularmente en regiones codificantes y promotoras de genes (Law & Jacobsen, 2010; Bewick & Schmitz, 2017). Por otro lado, los contextos mCHG y mCHH, conocidos por su participación en el silenciamiento de elementos transponibles y regiones repetitivas, mostraron mayor sensibilidad a los tratamientos de sombra, especialmente en los nudos con frutos inmaduros. Esta variabilidad es consistente con la participación activa de la vía de metilación dirigida por ARN (RdDM), que regula dinámicamente la metilación en contextos no CpG durante procesos de desarrollo o en respuesta a estímulos ambientales (Zhang et al., 2018; Law & Jacobsen, 2010).

En septiembre, el tratamiento de 50% de sombra presentó los niveles más bajos en mCHG y mCHH, lo que podría reflejar una desregulación epigenética temporal en nudos con frutos en desarrollo. En contraste, en enero, el tratamiento de 70% mantuvo los valores más altos en los tres contextos, lo que podría estar asociado a un estado de latencia o control epigenético más estricto

durante la formación floral, como se ha observado en otros cultivos donde la transición floral se acompaña de reconfiguración epigenética (Zhang et al., 2018; Springer, 2013).

A pesar de estas diferencias entre tejidos, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de metilación entre los meses de enero y septiembre ($p > 0,05$). Esto sugiere que el metiloma de los nudos de café es relativamente estable, y que los principales determinantes de variación observados se deben al nivel de sombra más que al estado de desarrollo del tejido. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la reprogramación epigenética puede ser específica de loci y no necesariamente reflejarse en los niveles globales, por lo que se recomienda complementar estos resultados con análisis a nivel de genes relacionados con floración, desarrollo de fruto o regulación hormonal (Niederhuth et al., 2016; Ganguly et al., 2017).

Además, la metilación en contextos CHG y CHH ha sido asociada con silenciamiento transitorio de genes o elementos móviles en tejidos reproductivos o en transición, como se ha observado durante la gametogénesis o el desarrollo del endospermo (Law & Jacobsen, 2010; Gehring et al., 2009). Por tanto, es posible que, en enero, los niveles más altos de metilación en estos contextos estén contribuyendo a regular genes críticos en la transición floral, mientras que en septiembre el patrón podría estar más relacionado con el desarrollo de estructuras reproductivas.

Finalmente, estos resultados destacan la necesidad de estudiar la interacción entre el ambiente (como la sombra), el desarrollo fenológico y la epigenética para comprender cómo se regula el desarrollo reproductivo en café. La estabilidad relativa del metiloma del ADN observada aquí, también refuerza la idea de que los tejidos vegetativos pueden mantener patrones epigenéticos robustos, salvo en contextos específicos como gametogénesis o embriogénesis (Zhang et al., 2018; Kinoshita & Seki, 2014).

5.3. Perfil de hormonas

La acumulación diferencial de hormonas vegetales en los nudos florales de *C. arabica* bajo distintos niveles de sombra reveló patrones específicos relacionados con el estado fenológico (enero: yemas florales; septiembre: frutos en desarrollo) y la intensidad lumínica. El análisis de perfiles hormonales mostró un incremento sostenido de giberelinas AG1 y AG7, así como de la

citoquinina iPR en enero, particularmente bajo 50% y 70% de sombra, coincidiendo con una elevada expresión de genes inductores de floración como *CaFT1* y *CaLFY*. Estos resultados son consistentes con el papel conocido de las giberelinas y citoquininas como promotores de la floración en diversos cultivos, incluyendo café (D'Aloia et al., 2011; López et al., 2021), y sugieren una interacción positiva entre la señalización lumínica y hormonal durante la transición floral. En particular, iPR mostró su máxima concentración en enero bajo 50% de sombra, lo que coincide con estudios recientes que reportan un aumento de citoquininas en los tejidos de *C. arabica* tras la rehidratación, asociado con la ruptura de la latencia floral y la inducción de la antesis (López et al., 2021). Esta citoquinina podría estar regulada por la luz a través de fitocromos, como se ha documentado en otras especies (Kraepiel et al., 1995; Chory et al., 1994; Kami et al., 2010), actuando en sinergia con la señal circadiana para promover la transición floral (Wada et al., 2005). Además, tal como lo señala Campos et al. (2017), la señalización hormonal puede estar ajustada mediante mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN, modificación de histonas y la regulación por ARN no codificantes, lo que ofrece un nivel adicional de control sobre la sensibilidad del tejido floral a estímulos como la luz.

Por otro lado, en septiembre se observó una acumulación más alta de ABA, especialmente bajo 70% de sombra, lo cual es coherente con su papel en la latencia de yemas florales y en la respuesta al estrés hídrico (McElwain et al., 1992; López et al., 2021). De hecho, el ABA ha sido propuesto como una señal de mantenimiento de latencia en yemas florales del estado G4 en café, mientras que su disminución tras rehidratación favorece el inicio floral (Santos et al., 2022). También se registró una mayor acumulación de jasmonato (JA) bajo 0% de sombra en septiembre, lo cual podría reflejar un estado de estrés lumínico asociado a la exposición plena, como ha sido reportado en café y otras especies (Millenaar et al., 2009; Carvalho et al., 2011). La presencia elevada de JA en condiciones de alta radiación se alinea con su rol como regulador clave en respuestas al estrés abiótico, especialmente térmico y lumínico (Wasternack & Hause, 2013), y con la interacción hormonal conocida con ABA y GA en la modulación del crecimiento reproductivo y priorización de defensa (Kazan & Manners, 2011; Yang et al., 2012). Estas interacciones hormonales pueden estar sujetas a una regulación epigenética dinámica, donde condiciones de estrés promueven modificaciones cromatínicas que activan o reprimen genes clave del desarrollo reproductivo (Campos et al., 2017)

El análisis multivariado (PCA) confirmó estos patrones, separando claramente las muestras recolectadas en enero de aquellas de septiembre a lo largo del primer componente principal (PC1), que explica el 46% de la varianza. Las muestras de enero, especialmente bajo 50% y 70% de sombra, se agruparon en el cuadrante positivo de PC1, asociadas a niveles elevados de giberelinas AG1 y AG7 y de la citoquinina iPR, reforzando su implicación en la transición floral. En contraste, las muestras de septiembre se distribuyeron hacia los cuadrantes negativos o centrales, mostrando una ligera asociación con JA, aunque esta contribución se explica principalmente por el PC2. Este resultado respalda la hipótesis de que la floración en café está modulada por la interacción entre señales lumínicas y hormonales, donde una sombra moderada favorece la acumulación de hormonas promotoras como las giberelinas y citoquininas, mientras que condiciones de sombra intensa o exposición total pueden activar rutas hormonales asociadas al estrés y la latencia (Franklin, 2008; Casal, 2013). En conjunto, estos resultados sugieren que la modulación hormonal en respuesta a la intensidad de luz no solo regula la transición floral, sino también la asincronía reproductiva característica del café, permitiendo una plasticidad fenológica adaptativa en ambientes tropicales

6. CONCLUSIONES

Este estudio permitió integrar datos de expresión génica, perfil hormonal y metilación del ADN en nudos de *C. arabica* sometidos a distintos niveles de sombra durante dos estados fenológicos contrastantes. Los resultados evidencian que la floración en café es regulada por una red genética altamente plástica y sensible a factores ambientales, particularmente la intensidad lumínica.

Durante enero, cuando los nudos contenían yemas florales, se observó una mayor expresión de genes inductores como *CaFT1*, *CaLFY*, *CaAPI* y *CaSVP-1*, especialmente bajo sombra intermedia (30%–50%), lo cual coincidió con una acumulación elevada de giberelinas (AG1, AG7) y citoquininas (iPR), sugiriendo una interacción promotora entre luz y hormonas durante la transición floral. En septiembre, con nudos en desarrollo de fruto, los niveles de expresión disminuyeron, salvo bajo 70% de sombra, donde se detectó un posible pulso de reinducción floral, acompañado de mayor acumulación de ABA y JA, hormonas asociadas a estrés y latencia. En

cuanto a la metilación del ADN, se encontró que los niveles más altos ocurrieron bajo condiciones de baja radiación (70% sombra), independientemente del mes, lo que sugiere una regulación epigenética sensible al ambiente. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los meses, los contextos mCHG y mCHH mostraron mayor variabilidad, en línea con su participación en el silenciamiento transitorio durante fases de desarrollo reproductivo.

En conjunto, estos hallazgos respaldan un modelo de floración flexible y asincrónica en *C. arabica*, donde la interacción entre regulación génica, señales hormonales y modificaciones epigenéticas permite una adaptación eficiente a condiciones ambientales variables, especialmente en entornos tropicales con baja estacionalidad lumínica. Esta comprensión integral proporciona una base sólida para futuros estudios orientados al manejo fenológico y la mejora del cultivo bajo sistemas agroforestales.

7. Recomendaciones

- Ampliar el análisis transcriptómico a nivel global: para comprender de forma más completa los mecanismos moleculares involucrados, sería valioso implementar análisis de expresión génica mediante RNA-seq, lo cual permitiría identificar redes de coexpresión, isoformas alternativas, y nuevas vías regulatorias sensibles a la sombra y al estado fenológico.
- Incluir genes de señalización hormonal y estrés: se recomienda ampliar el panel de genes estudiados con genes relacionados directamente con las vías de biosíntesis y señalización hormonal (GA, ABA, JA, iPR), así como genes de respuesta a estrés, para comprender mejor la interacción entre señales endógenas y ambientales.
- Realizar estudios funcionales en condiciones controladas: ensayos en cámaras de crecimiento con tratamientos controlados de luz, temperatura y riego permitirían confirmar la influencia directa de estos factores sobre la floración, la metilación y la dinámica hormonal observada en campo.
- Monitorear la dinámica hormonal y epigenética a lo largo del tiempo: se sugiere realizar muestreos en una serie temporal más amplia (mes a mes) para capturar con mayor resolución los cambios hormonales y epigenéticos durante las distintas etapas del desarrollo floral y la antesis.

8. REFERENCIAS

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., & Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, *309*(5737), 1052–1056. <https://doi.org/10.1126/science.1115983>
- Alexandre, C. M., & Hennig, L. (2008). FLC or not FLC: The other side of vernalization. *Journal of Experimental Botany*, *59*(6), 1127–1135. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern070>
- Almeida, L. A. (2015). *Ethylene regulation under different watering conditions and its possible involvement in coffee (Coffea arabica L.) flowering: Ethylene is involved in coffee flowering regulation* [Tesis de maestría, Universidade Federal de Lavras].
- Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, *61*(6), 1001–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04148.x>
- Barreto, H. G., Lazzari, F., Ságio, S. A., Chalfun-Junior, A., Paiva, L. V., & Benedito, V. A. (2012). *In silico* and quantitative analyses of the putative FLC-like homologue in coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, *30*(1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/s11105-011-0310-9>
- Bewick, A. J., & Schmitz, R. J. (2017). Gene body DNA methylation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *36*, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.12.007>
- Blázquez, M. A., Soowal, L. N., Lee, I., & Weigel, D. (1997). LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*, *124*(19), 3835–3844. <https://doi.org/10.1242/dev.124.19.3835>
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A. M., Jansson, S., Strauss, S. H., & Nilsson, O. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, *312*(5776), 1040–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1126038>
- Bolívar, A. (2021). *Análisis de la variabilidad genética natural e inducida en accesiones de Coffea spp. y evaluación de la respuesta a la infección de roya (Hemileia vastatrix) en plantas de*

- C. arabica* L. var. *Catuai* desarrolladas mediante mutagénesis *in vitro* [Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica].
- Camargo, Â. P. D., & Camargo, M. B. P. D. (2001). Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Bragantia*, *60*, 65–68. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052001000100008>
- Camayo, G. C., Chaves, B., Arcila, J., & Jaramillo, A. (2003). Desarrollo floral del cafeto y su relación con las condiciones climáticas de Chinchiná Caldas. *Cenicafé*, *54*(1), 35–49.
- Campos, G., Osorio, P., Sánchez, R., Us, R., Duarte, F., & De la Peña, C. (2017). Plant hormone signaling in flowering: An epigenetic point of view. *Journal of Plant Physiology*, *214*, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.03.018>
- Cardon, C. H., de Oliveira, R. R., Lesy, V., Ribeiro, T. H. C., Fust, C., Pereira, L. P., & Chalfun-Junior, A. (2022). Expression of coffee florigen CaFT1 reveals a sustained floral induction window associated with asynchronous flowering in tropical perennials. *Plant Science*, *325*, 111479. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111479>
- Carvalho, R. F., Campos, M. L., & Azevedo, R. A. (2011). The role of phytochrome in stress tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology*, *53*(11), 920–929. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6108-1_12
- Casal, J. J. (2013). Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 403–427. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120221>
- Chan, S. W. L., Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, *6*(5), 351–360. <https://doi.org/10.1038/nrg1601>
- Chaves, A. R., Martins, S. C. V., Batista, K. D., Celin, E. F., & DaMatta, F. M. (2012). Varying leaf-to-fruit ratios affect branch growth and dieback, with little to no effect on photosynthesis, carbohydrate or mineral pools, in different canopy positions of field-grown coffee trees. *Environmental and Experimental Botany*, *77*, 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.11.011>

- Cheng, Y. H., Peng, X. Y., Yu, Y. C., Sun, Z. Y., & Han, L. (2019). The effects of DNA methylation inhibition on flower development in the dioecious plant *Salix viminalis*. *Forests*, *10*(2), 173. <https://doi.org/10.3390/f10020173>
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T., & Brenner, M. (1994). A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (det mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology*, *104*(2), 339–347. <https://doi.org/10.1104/pp.104.2.339>
- Crisosto, C. H., Grantz, D. A., & Meinzer, F. C. (1992). Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). *Tree Physiology*, *10*(2), 127–139. <https://doi.org/10.1093/treephys/10.2.127>
- Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O., & Pogson, B. J. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances*, *2*(2), e1501340. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501340>
- D'Aloia, M., Bonhomme, D., Bouché, F., Tamseddak, K., Ormenese, S., Torti, S., & Périlleux, C. (2011). Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the *FT* paralogue *TSF*. *The Plant Journal*, *65*(6), 972–979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04482.x>
- DaMatta, F. M. (2004). Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: A review. *Field Crops Research*, *86*(2–3), 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2003.09.001>
- De Oliveira, R. R., Cesarino, I., Mazzafera, P., & Dornelas, M. C. (2014). Flower development in *Coffea arabica* L.: New insights into MADS-box genes. *Plant Reproduction*, *27*(2), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00497-014-0242-2>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*, 13–15.
- Drinnan, J. E., & Menzel, C. M. (1994). Synchronization of anthesis and enhancement of vegetative growth in coffee (*Coffea arabica* L.) following water stress during floral

- initiation. *Journal of Horticultural Science*, 69(5), 841–849.
<https://doi.org/10.1080/14620316.1994.11516520>
- Franklin, K. A. (2008). Shade avoidance. *New Phytologist*, 179(4), 930–944.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02507.x>
- Gan, E. S., Huang, J., & Ito, T. (2013). Functional roles of histone modification, chromatin remodeling and microRNAs in *Arabidopsis* flower development. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 305, 115–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407695-2.00003-2>
- Ganguly, D. R., Crisp, P. A., Eichten, S. R., & Pogson, B. J. (2017). The *Arabidopsis* DNA methylome is stable under transgenerational drought stress. *Plant Physiology*, 175(4), 1893–1912. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00744>
- Gehring, M., Reik, W., & Henikoff, S. (2009). DNA demethylation by DNA repair. *Trends in Genetics*, 25(2), 82–90.
- Hong, R. L., Hamaguchi, L., Busch, M. A., & Weigel, D. (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *The Plant Cell*, 15(6), 1296–1309. <https://doi.org/10.1105/tpc.009548>
- Imaizumi, T., Schultz, T. F., Harmon, F. G., Ho, L. A., & Kay, S. A. (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science*, 309(5732), 293–297. <https://doi.org/10.1126/science.11110586>
- Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE). (2022). *Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica*. Recuperado el 10 de marzo de 2022 de <https://www.icafe.cr>
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., & Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*, 91, 29–66.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91002-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91002-8)

- Kazan, K., & Manners, J. M. (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *Journal of Experimental Botany*, *62*(12), 4087–4100. <https://doi.org/10.1093/jxb/err142>
- Kinoshita, T., & Seki, M. (2014). Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant and Cell Physiology*, *55*(11), 1859–1863. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu125>
- Klocko, A. L., Ma, C., Robertson, S., Esfandiari, E., Nilsson, O., & Strauss, S. H. (2016). *FT* overexpression induces precocious flowering and normal reproductive development in *Eucalyptus*. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(2), 808–819. <https://doi.org/10.1111/pbi.12431>
- Kotoda, N., Hayashi, H., Suzuki, M., Igarashi, M., Hatsuyama, Y., Kidou, S. I., & Abe, K. (2010). Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like genes of apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant and Cell Physiology*, *51*(4), 561–575. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq021>
- Kraepiel, Y., Marree, K., Sotta, B., Caboche, M., & Miginiac, E. (1995). In vitro morphogenic characteristics of phytochrome mutants in *Nicotiana plumbaginifolia* are modified and correlated to high indole-3-acetic acid levels. *Planta*, *197*, 142–146. <https://doi.org/10.1007/BF00239950>
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, *11*(3), 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., & Yu, H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, *15*(1), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.002>
- Liljegren, S. J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G. S., & Yanofsky, M. F. (1999). Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *The Plant Cell*, *11*(6), 1007–1018. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.1007>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López, M. E., Santos, I. S., de Oliveira, R. R., Lima, A. A., Cardon, C. H., & Chalfun-Junior, A. (2021). An overview of the endogenous and environmental factors related to the *Coffea arabica* flowering process. *Beverage Plant Research*, 1(1), 1–16. <https://doi.org/10.48130/BPR-2021-0013>
- Majerowicz, N., & Söndahl, M. R. (2005). Induction and differentiation of reproductive buds in *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(2), 247–254. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000200008>
- McElwain, E. F., Bohnert, H. J., & Thomas, J. C. (1992). Light moderates the induction of phosphoenolpyruvate carboxylase by NaCl and abscisic acid in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology*, 99(3), 1261–1264. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.1261>
- Meylan, L., Gary, C., Allinne, C., Ortiz, J., Jackson, L., & Rapidel, B. (2017). Evaluating the effect of shade trees on provision of ecosystem services in intensively managed coffee plantations. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 245, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.005>
- Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell*, 11(5), 949–956. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.949>
- Millenaar, F. F., Van Zanten, M., Cox, M. C. H., Pierik, R., Voeselek, L. A. C. J., & Peeters, A. J. M. (2009). Differential petiole growth in *Arabidopsis thaliana*: Photocontrol and hormonal regulation. *New Phytologist*, 184(1), 141–152. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02921.x>

- Missio, R. F., Caixeta, E. T., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Cruz, C. D., & Sakiyama, N. S. (2009). Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *10*, 89–94.
- Moat, J., Williams, J., Baena, S., Wilkinson, T., Gole, T. W., Challa, Z. K., & Davis, A. P. (2017). Resilience potential of the Ethiopian coffee sector under climate change. *Nature Plants*, *3*(7), 1–14. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.81>
- Montoya, G., Cristancho, M. A., & Moncada, M. (2006). Análisis de secuencias de genes de *Coffea arabica* var. Caturra. *Cenicafé*, *57*(2), 79–87.
- Morais, H., Caramori, P. H., Ribeiro, A. M. A., Gomes, J. C., & Koguishi, M. S. (2006). Microclimatic characterization and productivity of coffee plants grown under shade of pigeon pea in Southern Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *41*, 763–770. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000500007>
- Morais, H., Marur, C. J., Caramori, P. H., Koguishi, M. S., Gomes, J. C., & Ribeiro, A. M. A. (2008). Desenvolvimento de gemas florais, florada, fotossíntese e produtividade de cafeeiros em condições de sombreamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *43*, 465–472. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000400004>
- Muñoz Flores, C. (2020). *Análisis de la metilación del ADN en las especies forestales Sideroxylon capiri e Hyeronima alchorneoides y su posible relación con los factores climatológicos de la región del Pacífico en Costa Rica* [Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica]. Repositorio Kérwá.
- Muschler, R. (1997). Shade or sun for ecologically sustainable coffee production: A summary of environmental key factors. In *III Semana Científica del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)* (pp. 109–112). CATIE.
- Niederhuth, C. E., Bewick, A. J., Ji, L., Alabady, M. S., Kim, K. D., Li, Q., & Schmitz, R. J. (2016). Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. *Genome Biology*, *17*, 194. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1059-0>

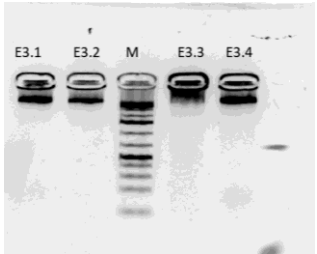
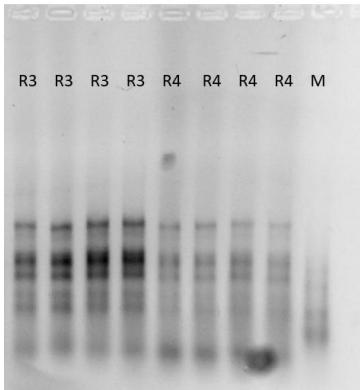
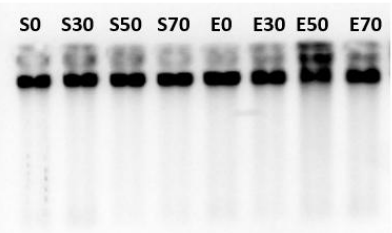
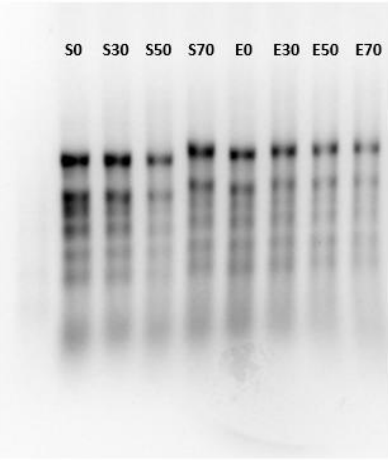
- Poupin, M. J., Federici, F., Medina, C., Matus, J. T., Timmermann, T., & Arce-Johnson, P. (2007). Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6, PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene*, *404*(1–2), 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.08.005>
- Rijkema, A. S., Zethof, J., Gerats, T., & Vandenbussche, M. (2009). The petunia AGL6 gene has a SEPALLATA-like function in floral patterning. *The Plant Journal*, *60*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03917.x>
- Santos, I. S., Ribeiro, T. H. C., de Oliveira, K. K. P., dos Santos, J. O., Moreira, R. O., Lima, R. R., & Chalfun-Junior, A. (2022). Multigenic regulation in the ethylene biosynthesis pathway during coffee flowering. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *28*(9), 1657–1669. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01235-y>
- Sheldon, C. C., Rouse, D. T., Finnegan, E. J., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2000). The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(7), 3753–3758. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3753>
- Springer, N. M. (2013). Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genetics*, *29*(4), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.009>
- Tornincasa, P., Furlan, M., Pallavicini, A., & Graziosi, G. (2010). Coffee species and varietal identification. In *Tools for identifying biodiversity: Progress and problems* (pp. 307–313).
- Turck, F., Fornara, F., & Coupland, G. (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 573–594. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092755>
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*, *303*(5660), 1003–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1091761>

- Vieira, N. G., Ferrari, I. F., & Rezende, J. C. (2019). Homeologous regulation of *Frigida*-like genes provides insights on reproductive development and somatic embryogenesis in the allotetraploid *Coffea arabica*. *Scientific Reports*, *9*, 8446. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44666-6>
- Vignola, R., Watler, W., Poveda, K., & Vargas, A. (2018). Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en el cultivo de café en Costa Rica: “Como parte del estudio de prácticas efectivas para adaptación de cultivos prioritarios para seguros, en Costa Rica”. *Ficha técnica*. CATIE.
- Viguera, B., Alpízar, F., Harvey, C. A., Martínez-Rodríguez, M. R., & Saborío-Rodríguez, M. (2019). Percepciones de cambio climático y respuestas adaptativas de caficultores costarricenses de pequeña escala. *Agronomía Mesoamericana*, *30*(2), 333–351. <http://dx.doi.org/1015517/am.v30i2.32905>
- Wada, M., Shimazaki, K. I., & Iino, M. (Eds.). (2005). *Light sensing in plants* (Vol. 37). Springer.
- Wang, J., Ma, X., Hu, Y., Feng, G., Guo, C., Zhang, X., & Ma, H. (2024). Regulation of micro- and small-exon retention and other splicing processes by GRP20 for flower development. *Nature Plants*, *10*(1), 66–85. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01605-8>
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, *111*(6), 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, *309*(5737), 1056–1059. <https://doi.org/10.1126/science.1114358>
- Winter, C. M., Austin, R. S., Blanvillain-Baufumé, S., Reback, M. A., Monniaux, M., Wu, M. F., & Wagner, D. (2011). LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Developmental Cell*, *20*(4), 430–443.

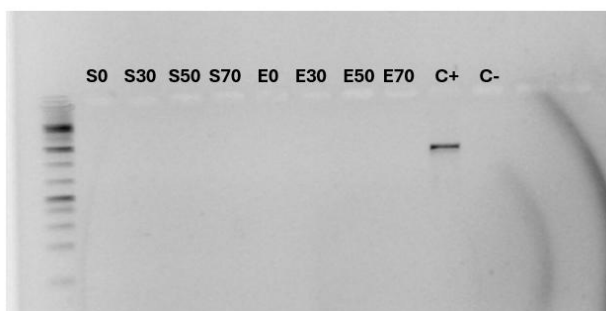
- Yang, D. L., Yao, J., Mei, C. S., Tong, X. H., Zeng, L. J., Li, Q., & He, S. Y. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(19), E1192–E1200. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201616109>
- Yang, H., Chang, F., You, C., Cui, J., Zhu, G., Wang, L., & Ma, H. (2015). Whole-genome DNA methylation patterns and complex associations with gene structure and expression during flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *81*(2), 268–281. <https://doi.org/10.1111/tpj.12726>
- Zhang, H., Lang, Z., & Zhu, J. K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(8), 489–506. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0016-z>

9. ANEXOS

Anexo I: ADN y ARN de tejido vegetal (flores y nudos) de *Coffea arabica* L. en los experimentos de estrés hídrico y porcentajes de sombra El ADN se corrió en geles de agarosa al 1% (m/v) y el ARN se corrió en geles de agarosa desnaturalizantes (formaldehído) al 1% (m/v)

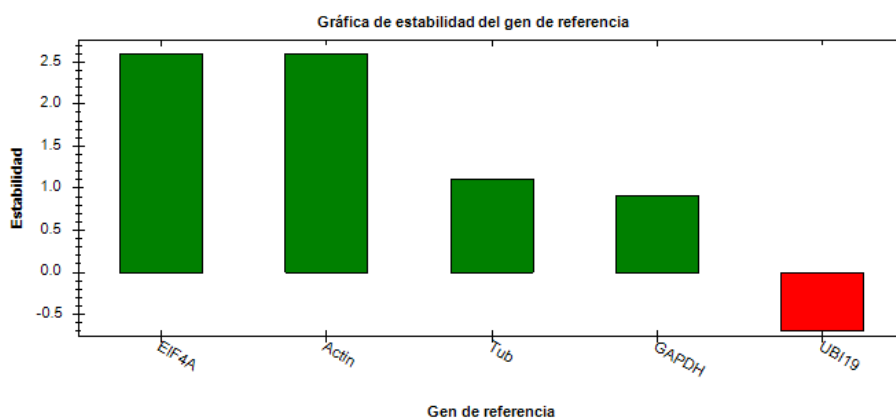
Experimento/Tejido vegetal	ADN	ARN
<p>Experimento de estrés hídrico. Flores estadio E5 (R3) y E3 (R4) a las que se les aplicó riego.</p>		
<p>Experimento porcentajes de sombra. Nudos florales expuestos diferentes tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) durante los meses de setiembre 2019 (S) y enero 2020 (E).</p>		

Anexo II: Amplificación de los productos de PCR con el marcador CIPp_1 a partir de muestras de ADNc de los diferentes tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) durante los meses de setiembre 2019 (S) y enero 2020 (E). Se utilizó ADN genómico de hojas de café como control positivo y agua como control negativo.

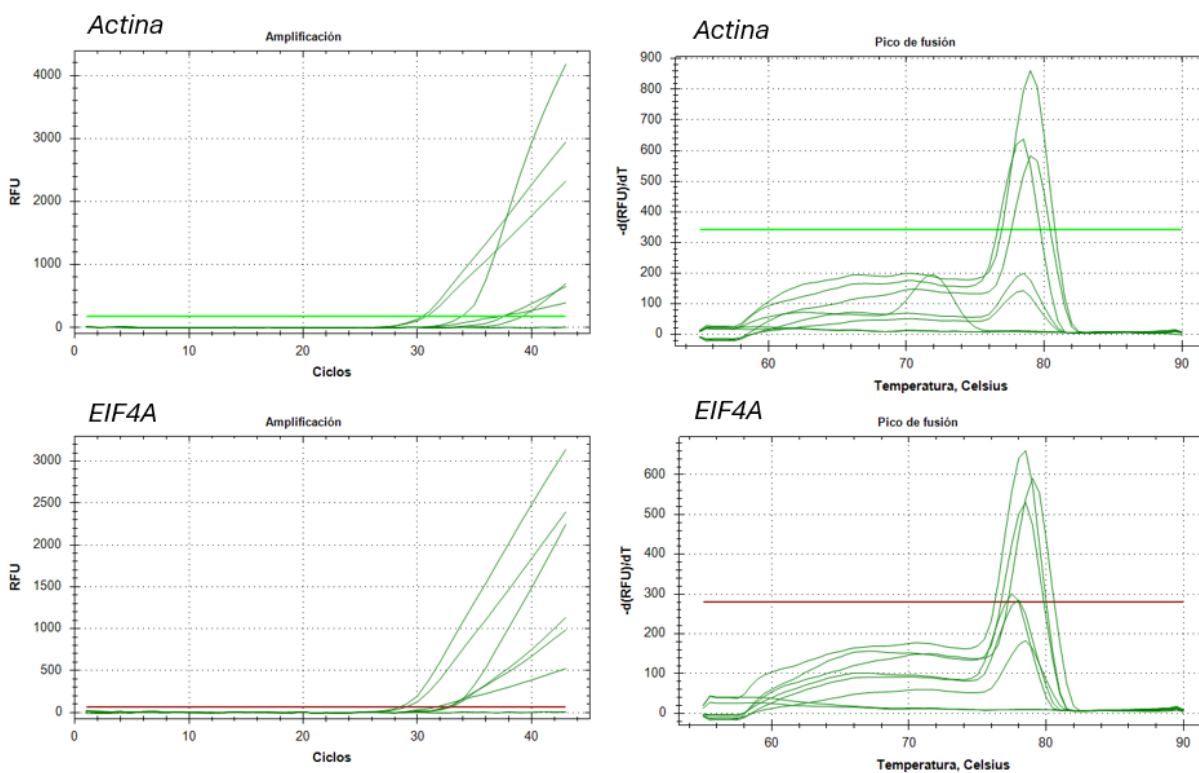


Anexo III: Evaluación de la estabilidad de genes de referencia para RT-qPCR en *Coffea arabica* L. Se muestran los valores de estabilidad calculados con “Reference gene selection tool” de CFX Maestro™ (Bio-Rad) para cinco genes candidatos (*EIF4A*, *ACT*, *TUB*, *GAPDH* y *UBI19*) analizados en tres tipos de tejido (flor, hoja y nudo). Para cada tejido se utilizaron tres réplicas biológicas, y cada reacción de RT-qPCR se corrió en triplicado técnico.

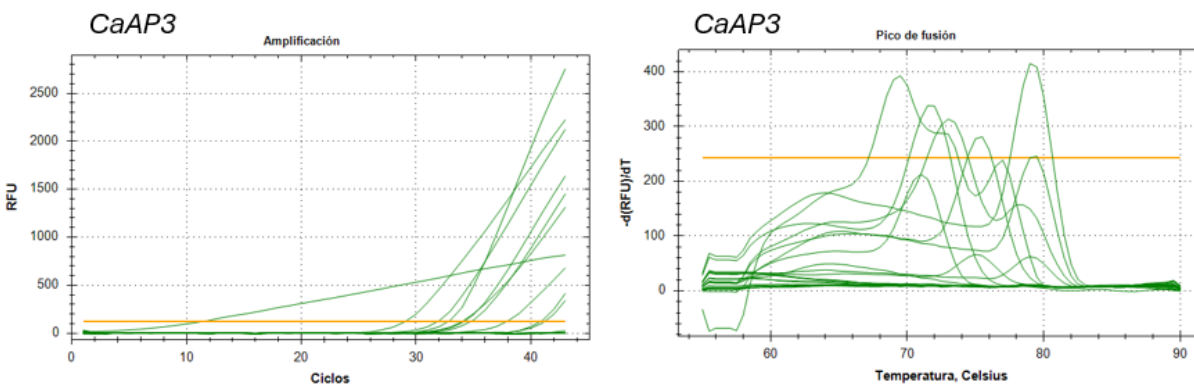
Orden	Nombre del gen	Evaluación	Avg M Valor	Estabilidad (Ln(1/AvgM))	# Muestras
1	<i>EIF4A</i>	Ideal	0.07433812	2.599131339	3
2	<i>Actin</i>	Ideal	0.07433812	2.599131339	3
3	<i>Tub</i>	Ideal	0.33118814	1.105068665	3
4	<i>GAPDH</i>	Ideal	0.40479396	0.904377087	3
5	<i>UBI19</i>	Inestable	2.00442185	-0.695355665	3



Anexo IV: Curvas de amplificación y disociación para los genes de referencia *Actina* y *EIF4A* en 8 muestras de tejido floral estadio E5 que se corrieron por triplicado.



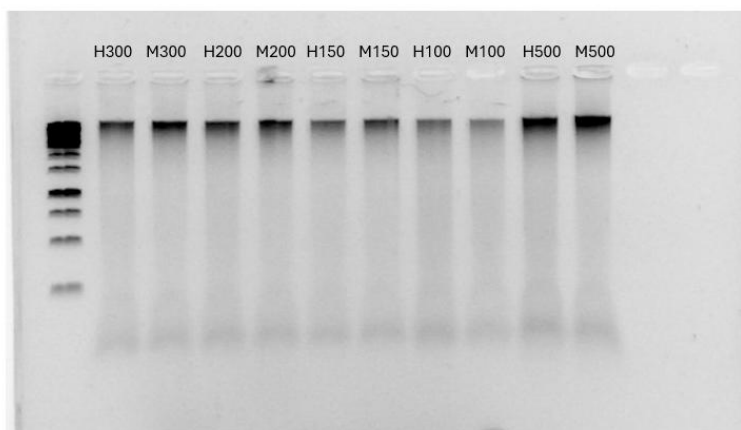
Anexo V: Curvas de amplificación y disociación para el gene de referencia *CaAP3* en 8 muestras de tejido floral estadio E5 que se corrieron por triplicado.



Anexo VI: Resultados obtenidos con el software CFX maestro (BioRad) del promedio de expresión relativa normalizada de 21 genes asociados a la floración en las muestras de nudos florales de *Coffea arabica* L. de los diferentes tratamientos de sombra (0%, 30%, 50%, 70%) durante los meses de setiembre 2019 y enero 2020. Se utilizó como genes de referencia *Actina* y *EIF4A* y todas las muestras se corrieron por triplicado.

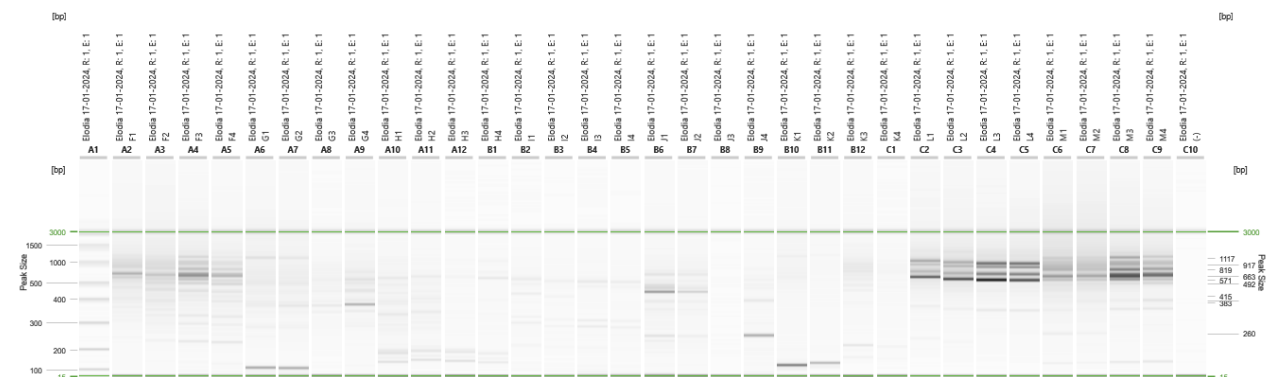
Gen	Set 0%	Set 30%	Set 50%	Set 70%	Ene 0%	Ene 30%	Ene 50%	Ene 70%
CaAGL42	1.45349	2.11726	2.83844	3.87813	6.20108	11.18761	46.63596	4.43285
CaAGL6	1.59519	1.66345	2.9111	6.54318	129.0117	678.1581	848.169	10.22911
CaAP1	2.12479	0.9463	4.20865	10.47759	NA	8.06113	120.1624	8.82339
CaAP3	6.47277	0.66931	4.20865	0.39573	105.9754	97.22447	444.3189	0.22598
CaCc_FRL1	0.48681	2.11726	1.32591	2.95345	8.20496	9.24514	15.66637	7.27873
CaCc_FRL2	3.70701	2.62133	1.51202	2.70641	6.39493	5.873	13.86351	0.02739
CaCc_FRL3	0.61404	2.11726	1.54174	2.64058	7.87748	52.38107	7.34732	0.13681
CaCc_FRL4	0.0011	0.00045	0.00066	0.00243	0.01196	0.0067	0.00653	11.68723
CaCe_FRL1	0.75636	2.11726	1.50017	2.87453	17.86617	13.39155	32.23565	2.13977
CaCe_FRL2	2.6115	2.62133	1.37287	1.89964	6.04346	0.3417	4.58592	3.02928
CaCe_FRL3	0.95762	2.11726	2.38488	2.32549	6.38288	186.7569	21.00994	NA
CaCe_FRL4	0.15724	0.03234	0.06104	0.08558	1.03852	2.63778	1.63165	11.68723
CaCO	0.98802	1.18523	1.38926	8.03333	2.86926	100.7936	22.84074	3.7989
CaFLC	0.61491	2.11726	1.5913	0.84033	3.54683	NA	NA	NA
CaFT1	0.04335	0.20075	0.39188	8.03333	7.37959	98.0231	28.68062	2.75313
CaLFY	0.18953	0.28209	1.48909	0.9912	4.12018	678.1581	34.94263	0.57703
CaP1	0.29641	0.02377	0.09226	0.12715	0.05972	28.70656	35.29489	11.68723
CaSVP-1	0.76973	2.11726	1.45572	2.65108	43.97401	203.5986	240.2155	9.31094
CaSVP-3	0.41773	2.11726	1.74204	1.28067	1.60547	NA	5.43678	0.50511
CaTM3-1	0.42284	2.11726	1.7266	1.44343	4.5221	NA	NA	0.85683
CaTM6	0.00759	0.00435	0.0138	0.04566	0.23519	0.92702	NA	11.68723

Anexo VII: • Reacción de digestión-ligación con las enzimas *EcoRI/HpaII* (H) y *EcoRI/MspI* (M) para una muestra de tejido floral estadio E5 utilizando diferentes cantidades de ADN (100 ng, 150 ng, 200 ng, 300 ng y 500 ng) y utilizando un tiempo de incubación de 16 h.



Anexo VIII: Electroferogramas de la amplificación selectiva de las muestras de nudos florales de *Coffea arabica* L.

Electroferograma de 2 muestras de nudos florales con dilución 1/10 utilizando la combinación de adaptadores *EcoRI-MspI/HpaII* : 4-6(F), 4-2(G), 8-3(H), 8-9(I), 8-10(J)-10-2(K), 10-3(L), 10-6 (M) (Secuencias de los adaptadores en cuadro 2)



Electroferograma de 2 muestras de nudos florales utilizando la combinación de adaptadores *EcoRI-MspI/HpaII* : 8-6 (Ver cuadro 2) y probando las diluciones 1/5, 1/7,5 y 1/10.

