

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix*
DE QUILLABAMBA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LAS
REGIONES ITS DEL ADN RIBOSOMAL”**

Presentado por:

Juan José Villanueva Cáceda

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix*
DE QUILLABAMBA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LAS
REGIONES ITS DEL ADN RIBOSOMAL”**

Presentada por:

Juan José Villanueva Cáceda

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg. Sc. Rosa Espejo Joya
PRESIDENTE

Mg. Sc. César López Bonilla
MIEMBRO

Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego
ASESOR

Biol. Cinthia Sheila Quispe Apaza
CO - ASESORA

DEDICATORIA

Con mucho cariño:

A mi padre, por su invaluable apoyo y sabios consejos

A mi esposa, por su comprensión y aliento en la realización de la presente tesis.

A mi hijo, por ser mi estímulo e inspiración para superarme cada día y luchar por un futuro mejor.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud y reconocimiento:

A mi Asesor Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego, por patrocinar y darme la orientación en el desarrollo y la redacción de la presente tesis.

A los Miembros del Jurado Mg. Sc. Rosa Espejo Joya, Mg. Sc. César López Bonilla y Dr. Raúl Blas Sevillano, por su entera disposición y asesoramiento.

A mi Co-Asesora Biol. Cinthia Quispe Apaza, por sus valiosos consejos y recomendaciones.

Al Ing. Jonathan Cárdenas Sotelo, por facilitarme los datos meteorológicos del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI).

Al Señor Augusto Solís Tarazona, por su incondicional ayuda en la edición y empastado de esta publicación.

A los estudiantes del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT), por su apoyo y colaboración desinteresada.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico Y de innovación Tecnológica (FONDECYT), por la aprobación del financiamiento para llevar acabo la presente investigación.

A los caficultores de la zona de Quillabamba, por facilitar el material biológico e información para este estudio.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Hemileia vastatrix</i> BERK. & BROOME.....	3
2.1.1. Clasificación.....	3
2.1.2. Distribución.....	4
2.1.3. Sintomatología.....	5
2.1.4. Ciclo de vida.....	6
2.2. VARIABILIDAD GENÉTICA.....	9
2.3. DIVERSIDAD GENÉTICA.....	11
2.4. REGIÓN ITS DEL ADN RIBOSOMAL.....	12
2.5. MEDIDAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA.....	13
2.5.1. Número de haplotipos.....	13
2.5.2. Número de sitios polimórficos.....	13
2.5.3. Diversidad haplotípica.....	14
2.5.4. Diversidad nucleotídica.....	14
2.5.5. Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	14
2.5.6. Estadísticos F (Wright).....	14
2.6. ÍNDICE DE TAJIMA.....	15
2.7. REDES HAPLOTÍPICAS.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. MATERIALES.....	16
3.1.1. Zona de estudio.....	16
3.1.2. Población y muestra.....	17
3.1.3. Iniciadores.....	17

3.2. METODOLOGÍA.....	18
3.2.1. Análisis genético.....	18
3.2.2. Análisis de datos.....	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE <i>Hemileia vastatrix</i>	28
4.2. AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DEL ADN RIBOSOMAL.....	29
4.2.1. Amplificación.....	29
4.2.2. Aislamiento.....	30
4.3. CLONACIÓN Y ALINEAMIENTO DEL ADN RIBOSOMAL.....	30
4.3.1. Clonación.....	30
4.3.2. Alineamiento.....	32
4.4. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>Hemileia vastatrix</i>	33
V. CONCLUSIONES.....	40
VI. RECOMENDACIONES.....	41
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
VIII. ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Datos de pasaporte de <i>Hemileia vastatrix</i> procedentes de Quillabamba.....	17
Tabla 2:	Iniciadores universales de las regiones ITS del ADN ribosomal.....	17
Tabla 3:	Interpretación del Índice de Tajima.....	25
Tabla 4:	Estimación de varianzas para datos haploides.....	26
Tabla 5:	Interpretación de los valores F_{ST}	27
Tabla 6:	Valores de la cuantificación y calidad del ADN de <i>H. vastatrix</i> a partir de datos de absorbancia.....	28
Tabla 7:	Valores del número de haplotipos, diversidad nucleotídica y haplotípica por zona.....	35
Tabla 8:	Cuadro de AMOVA de las muestras de <i>H. vastatrix</i> de Quillabamba.....	36
Tabla 9:	Haplotipos de <i>H. vastatrix</i> detectados en cinco zonas productoras de café en Quillabamba.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Distribución de <i>Hemileia vastatrix</i> en el ámbito mundial.....	4
Figura 2:	Distribución de <i>Hemileia vastatrix</i> en Sudamérica.....	5
Figura 3:	Plantas de café con hojas completamente infectadas en Quillabamba.....	6
Figura 4:	Ciclo de la enfermedad de la Roya amarilla del cafeto causada por <i>Hemileia vastatrix</i>	7
Figura 5:	Micrografías ópticas de <i>H. vastatrix</i> sitios de infección a 72 Hdi.....	9
Figura 6:	Región ITS del ADN Ribosomal de <i>H. vastatrix</i>	12
Figura 7:	Ubicación de las zonas en la provincia de La Convención Cusco, en las cuales se realizó el muestreo de las hojas infectadas con <i>Hemileia. vastatrix</i>	16
Figura 8:	Gel de agarosa al uno por ciento mostrando el ADN extraído de <i>H. vastatrix</i> para cada zona.....	29
Figura 9:	Gel de agarosa al uno por ciento mostrando producto de amplificación de aproximadamente 1100 pb, utilizando iniciadores ITS.....	29
Figura 10:	Gel de agarosa al uno por ciento mostrando los productos de amplificación de la región ITS aislada.....	30
Figura 11:	Placas con medio sólido LB, mostrando colonias blancas (recombinantes) y colonias de azules (sin el inserto) de <i>E. coli</i>	31
Figura 12a:	Gel de agarosa al uno por ciento donde se muestra la confirmación del inserto en el plásmido extraído mediante digestión con enzima ECO RI.....	31
Figura 12b:	Gel de agarosa al uno por ciento donde se muestra la confirmación del inserto en el plásmido extraído mediante digestión con enzima ECO RI.....	32
Figura 13:	Sitios polimorficos de los 38 haplotipos de <i>Hemileia vastatrix</i> que fueron obtenidos por el software DNAsp.....	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1:	Protocolo para extracción y purificación de ADN.....	52
Anexo 2:	Medios de cultivo LB para <i>E. coli</i>	54
Anexo 3:	Protocolo de aislamiento y purificación del plásmido.....	55
Anexo 4:	Secuencias múltiples alineadas.....	56
	Alineamiento posiciones 1-93.....	56
	Alineamiento posiciones 93-185.....	57
	Alineamiento posiciones 186-276.....	58
	Alineamiento posiciones 277-367.....	59
	Alineamiento posiciones 368-459.....	60
	Alineamiento posiciones 460-552.....	61
	Alineamiento posiciones 553-644.....	62
	Alineamiento posiciones 645-737.....	63
	Alineamiento posiciones 738-828.....	64
	Alineamiento posiciones 829-919.....	65
Anexo 5:	Red de Haplotipos de <i>Hemileia vastatrix</i>	66
Anexo 6:	Agrupación de secuencias en haplotipos.....	67
Anexo 7:	Datos meteorológicos del SENAMHI.....	68
Anexo 8:	Rango de temperatura anual (1964-2014) en Quillabamba.....	70
Anexo 9:	Porcentaje de humedad relativa anual (1964-2014) en Quillabamba	71

ABREVIATURAS

AMOVA	Analysis of Molecular Variance.
Cenicafé	Centro Nacional de Investigaciones en Café.
CICAFFE	Centro de Investigación en Café.
CIFC	Centro de Investigaçã das Ferrugens do Cafeeiro.
COCLA	Central de Cooperativas de La Convención y Lares.
dNTPs	Desoxinucleosidos trifosfatados.
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Hdi	Horas después de la infección.
INDECOPI	Instituto de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual.
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria-Bertani
MINAGRI	Ministerio de Agricultura y Riego.
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPDs	Random Amplified Polymorphic DNA
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SENAMHI	Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología.
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression.
SSR	Simple Sequence Repeat.
TBE	Tris Borato EDTA.
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido.

RESUMEN

Se estudió la diversidad genética del patógeno *Hemilia vastatrix* por medio del análisis de la región ITS del ADN ribosomal. La extracción del ADN se realizó con el protocolo descrito por Goodwin y Lee (1993) y Cristancho *et al.* (2007) con algunas modificaciones, a partir de uredosporas aisladas de hojas infectadas de *Coffea arabica*, las que fueron seleccionadas al azar en cinco fincas localizadas en la zona productora de Quillabamba (Región Cusco). La amplificación de la región ITS se realizó mediante la técnica de PCR, los fragmentos obtenidos fueron separados utilizando electroforesis en gel de agarosa al uno por ciento. La purificación desde el gel del producto de amplificación se realizó utilizando el kit “QIAquick gel extraction”. La clonación de dicho fragmento se logró por transformación de una cepa de *E. coli* competente empleando el kit “pGEM®-T Easy Vector Systems” (PROMEGA). El aislamiento de las colonias transformadas se realizó en el medio LB más ampicilina. Para la extracción del plásmido de la bacteria se utilizó el kit “Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System”. Los plásmidos obtenidos fueron enviados a GenBioteck (Argentina) para su secuenciación. A partir de 49 secuencias se identificaron 38 haplotipos ($h=38$), con diversidad haplotípica ($Hd=0.977 \pm 0.012$), diversidad nucleotídica ($\pi=0.0054 \pm 0.00038$) e índice de Tajima ($D = -2.35287$, $p<0.01$). Los resultados sugieren que *H. vastatrix* es una población que está en crecimiento con una alta proporción de haplotipos únicos.

Palabras clave: ADN Ribosomal, Uredosporas, Quillabamba, ITS, Haplotipos

SUMMARY

The genetic diversity of the pathogen *Hemileia vastatrix* was studied by analyzing ITS region of the ribosomal DNA. The extraction of the DNA was done by following the protocol described by Goodwin and Lee (1993) and Cristancho *et al.* (2007) with certain deviations, the uredospores were isolated from the infected leaves of the *Coffea spp.*, these were random chosen from five farm located in the productive zone of Quillabamba (Cusco Region). The amplification of the ITS region was done by the PCR technique, and the fragments obtained were separated by electrophoresis in agarose gel at one percent. The purification of the amplification's product was made by utilizing the QIAquick gel extraction kit following the manual. The cloning was realized by transforming an competent strain of the *E. coli* using the pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA) kit. The isolation of the transformed colonies was done in a LB medium with ampicillin. For the extraction of the plasmid from the bacteria the Wizard®Plus SV Minipreps DNA purification system was used. For the sequencing the obtained plasmid was sent to GenBioteck (Argentina). From 49 sequences 38 haplotypes ($h = 38$) were identified, resulting haplotype diversity ($Hd = 0.977 \pm 0.012$), nucleotide diversity ($\pi = 0.0054 \pm 0.00038$) and index of Tajima ($D = -2.35287$, $p < 0.01$). The results suggest that *H. vastatrix* is a population that is growing with a high proportion of unique haplotypes.

Keyword: Ribosomal DNA, Uredospores, Quillabamba, ITS, haplotypes,

I. INTRODUCCIÓN

La roya amarilla es una de las principales enfermedades que afecta al cultivo de café, y está ampliamente distribuida a través de todos los países productores en el mundo, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas en casi todas las regiones cafetaleras. Su agente causal es el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix* **BERK. & BROOME** (Berkeley, 1869; Ward, 1882) el cual provoca severas defoliaciones y afecta a casi todos los cultivares de *Coffea arabica*.

En el Perú, el cafeto, que es uno de los principales cultivos de agroexportación, proviene mayormente de las variedades de la especie *Coffea arabica*, las cuales se caracterizan por tener una alta calidad de taza; sin embargo, son extremadamente susceptibles a *Hemileia vastatrix*. Según la Cámara de Comercio de Lima la producción de café se redujo en 37% entre los años 2011 y 2014, principalmente por la presencia de roya amarilla (Diario Gestión, 2015).

A pesar de la importancia del café para el Perú, muy poco se ha avanzado en el mejoramiento genético para lograr resistencia a *H. vastatrix*, debido a que, entre otros aspectos, se tiene poco conocimiento científico de este hongo en las zonas de alta incidencia. No obstante, se conoce, que en la mayoría de países productores de café ya desde mucho tiempo atrás se han venido realizando trabajos de identificación y caracterización de la roya, hallándose en casi todos los casos a la raza II como posible inóculo inicial, a partir del cual se han generado naturalmente nuevas razas (Zambolim *et al.*, 2005).

Una de las secuencias de ADN más utilizadas en el análisis de diversidad de hongos son los *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Cristancho *et al.*, 2007) o espaciadores transcribibles internos del ADN ribosomal, los cuales se emplean en estudios moleculares de hongos fitopatógenos en forma eficiente, tanto en la caracterización de nuevas especies

como en la separación de especies muy cercanas o de razas de una misma especie (Grube & Kroken, 2000); además, estas regiones son muy útiles para estudios filogenéticos de hongos, en tal sentido, el presente trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos:

1.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Analizar la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome de la zona de Quillabamba a través de la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer y purificar ADN de *H. vastatrix*, proveniente de Quillabamba (Región Cusco).
- Amplificar la región ITS del ADN ribosomal de *H. vastatrix*.
- Clonar y secuenciar la región ITS del ADN ribosomal de *H. vastatrix*.
- Analizar la diversidad de *H. vastatrix* de las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Hemileia vastatrix* BERK. & BROOME

El inglés Grant en 1861 reportó por primera vez la presencia de roya en cafetos silvestres de la región del Lago Victoria – Nyansa, en la zona centro oriental de África (Wellman, 1975). En 1868 se reportó la misma enfermedad en Ceilán (Sri Lanka), zona de mayor producción de café de ese entonces; luego en 1869, Berkeley describió por primera vez el hongo y lo designó como género *Hemileia*, por la forma de media luna de las esporas y como especie *Hemileia vastatrix*, por la condición devastadora de la enfermedad (Scheiber y Zentmyer, 1984).

2.1.1. Clasificación

La roya del cafeto es un patógeno biotrófico (Vieira *et al.*, 2012), esto es, que solamente puede desarrollarse en el interior de la planta hospedera. Anteriormente se le incluía en la familia Pucciniaceae, pero estudios morfológicos y moleculares determinaron que *H. vastatrix* estaba alejada de ese grupo taxonómico y más cercano a la familia Chaconiaceae (Cummins y Hiratsuka, 2003).

La taxonomía de *Hemileia vastatrix* BERK. & BROOME según Cummins y Hiratsuka (2003):

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycotina

Orden: Pucciniales

Familia: Chaconiaceae

Género: *Hemileia*

Especie: *Hemileia vastatrix*

2.1.2. Distribución

El hongo *Hemileia vastatrix*, actualmente se encuentra distribuido en todos los países productores de café en el mundo (Figura 1).

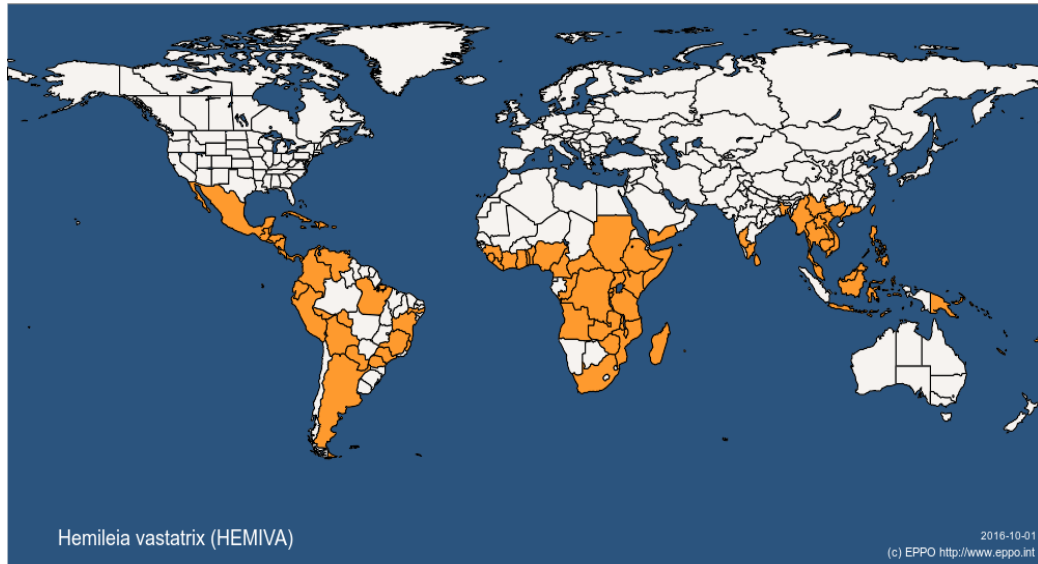


Figura 1: Distribución de *Hemileia vastatrix* en el ámbito mundial. Sombreado en color anaranjado están las zonas donde se reporta la presencia del hongo.

FUENTE: EPPO (2016).

El patógeno *H. vastatrix* llegó a Latinoamérica en 1970, infectando los cultivos de café en Bahía - Brasil, de ahí no tardó en reportarse brotes en los países vecinos de Paraguay y Argentina (Figura 2); posteriormente su presencia se reportó en otros países de la región como: Bolivia, El Salvador, Perú, Guatemala, Ecuador, México, Colombia y Costa Rica (Scheiber y Zentmyer, 1984). Esta rápida propagación de la roya en los cultivos se debe principalmente a su diseminación por vientos, semillas portadoras del hongo y los seres humanos. (CICAFFE, 2013).

La llegada de la roya amarilla del cafeto al Perú fue en 1979, reportándose la presencia de la raza II de *Hemileia vastatrix* en la zona de Satipo, en la región Junín (Figura 2).



Figura 2: Distribución de *Hemileia vastatrix* en Sudamérica.

FUENTE: Schieber y Zentmyer (1984).

2.1.3. Sintomatología

La infección a causa de *Hemileia vastatrix* se manifiesta por la presencia de manchas polvorientas de color amarillo anaranjado en la superficie abaxial de las hojas (Figura 3), que conduce a una fotosíntesis deteriorada, defoliación prematura, reducción de la iniciación floral y la consecuente pérdida de rendimiento (Bettencourt *et al.*, 1971).

Las lesiones (pústulas) son producidas por las uredosporas, aparecen tanto en las hojas jóvenes como en las viejas y eventualmente en las primeras hojas de plántulas de semilleros (Figura 3). Se han observado que los frutos de *Coffea liberica* muestran indicios de infección por la presencia de haustorios sobre los cuales se produce una capa de esporas anaranjadas típicas de *Hemileia vastatrix* (Cramer, 1957). Asimismo, Gopalkrishnan (1951), reportó la incidencia de fructificaciones en los haces de las hojas y en los peciolo.

Los primeros síntomas en aparecer son pequeñas manchas cloróticas (1-3 mm de diámetro) y a los pocos días esas manchas se incrementan en diámetro y masa de uredosporas que se observan en el envés de las hojas (CICAFE, 2013), lugar por donde el hongo ha ingresado a través de los estomas. El centro de una pústula vieja muchas veces se torna necrótica mientras que la producción de esporas continúa a los bordes de la pústula (Nutman y Roberts, 1970). También, se ha observado que las primeras pústulas son usualmente producidas en los bordes o en el ápice del envés de las hojas porque frecuentemente se encuentran suspendidas por mucho tiempo en el rocío y agua de lluvia, humedad necesaria para la germinación y penetración del hongo, incluso, a partir de la pústula original, las uredosporas pueden ser transportadas por la lluvia a otras regiones del envés de la hoja, a otras hojas y a otras plantas (Schieber, 1975).



Figura 3: Plantas de café con hojas completamente infectadas en Quillabamba.
FUENTE: Elaboración propia.

2.1.4. Ciclo de vida

La Figura 4 muestra un esquema del ciclo de vida de *H. vastatrix* que fue propuesto por Ward (1882) y, esencialmente, este aún sigue siendo el modelo aceptado (Arneson, 2000; Agrios, 2005). De acuerdo con esta interpretación, las masas polvorientas de color naranja en las hojas de café corresponden a uredosporas producidas por esporóforos que emergen de los estomas de plantas infectadas. Este tipo de esporas representan el estado asexual del hongo y tienen las funciones de dispersión, supervivencia e infección, además, emergen ocasionalmente del mismo estoma, esporóforos que producen teliosporas, las que luego germinan para formar un promicelio (basidia) cuya función es producir basidiosporas, es decir, esporas sexuales cuya infectividad no ha sido demostrada en el cafeto, ni se ha encontrado al hospedero alternativo (Fernandes *et al.*, 2009).

La infección se inicia con la diseminación del patógeno, en la cual, la uredospora se despegra del esporóforo y luego abandona la lesión (dispersión) hasta llegar a la nueva hoja que infectará (depositación) (Silva *et al.*, 1999). Antes de la inoculación, las uredosporas deben de localizarse en el envés de las hojas donde se encuentra el mayor número de estomas, a través de los cuales el hongo va a penetrar e infectar; de ahí que, para tener éxito en la infección necesita ciertas condiciones como: temperatura de 18 a 24 °C, oscuridad y humedad en forma de rocío o gotas de agua de la lluvia (Rayner 1961; Nutman *et al.* 1963; Hocking y Freeman, 1968), las uredosporas bajo estas condiciones germinan y producen apresorios sobre los estomas, diferenciándose luego en hifas que penetran a través de los estomas al espacio intercelular (Figura 5). Esta etapa inicial de la infección ocurre tanto en cafetos resistentes como en los susceptibles, seguidamente las hifas forman dos ramas laterales (ancla) que se diferencian en células madres haustoriales (CMH) para dar lugar a los haustorios que penetraran a las células del mesófilo, esto solo en plantas susceptibles (Silva *et al.*, 2006), lo cual involucra la colonización del tejido que culminará con el lanzamiento de las uredosporas a través de los estomas. El número de esporas producidas es muy elevado, según Ward (1882) contabilizó en una sola instancia más de 150 000 esporas en una sola lesión; posteriormente, McCain y Hennen (1984) estimaron que una sola lesión podría producir entre 300 000 a 2 000 000 de esporas.

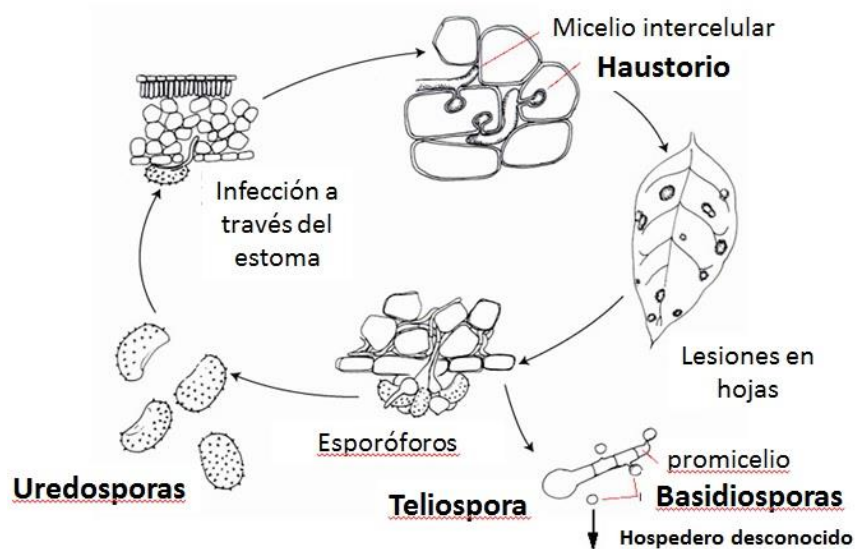


Figura 4: Ciclo de la enfermedad de la roya amarilla del café causada por *Hemileia vastatrix*.
 FUENTE: Modificado de Arneson (2000).

Existe un periodo de latencia, entre el tiempo de invasión y el tiempo de esporulación, que fue reportado por varios investigadores, los cuales difieren de acuerdo a la estación (Bock, 1962). Ward (1882) encontró que este periodo es de 12 a 16 días; Mayne (1932), informó que fue de 15 a 16 días; Rayner (1961), concluyó que puede tardar hasta cinco semanas, mientras que Nutman *et al.* (1963), reportaron que el tiempo es de 21 días, lo que se comprobó en discos de hojas de café mantenidas en cámaras húmedas. Posteriormente Herrera *et al.* (2009), reportaron que individuos con resistencia parcial exhibían un progreso lento (un retraso de hasta cinco meses en comparación de variedades susceptibles) con menos defoliación. Entonces, se podría considerar que este tiempo de latencia varía según el tipo de resistencia que exhiben los cafetos, la ecología (pisos altitudinales) y condiciones ambientales (temperatura, luz y humedad) de las zonas productoras de café.

La dispersión de las uredosporas ocurre en ambientes húmedos y secos (Avelino y Rivas, 2013). En ambientes húmedos, las esporas se dispersan a través de las salpicaduras originadas por la lluvia, sin embargo, excesivas precipitaciones pueden remover las uredosporas depositadas en la superficie de las hojas (Nutman *et al.*, 1963; Kushalappa, 1989). La dispersión en seco ocurre por vientos fuertes (Rayner, 1961; Becker y Kranz, 1977). También varios autores han sugerido la diseminación de la roya por el hombre (Butler, 1918; Chaves *et al.*, 1970; Nutman y Robert, 1970; Schieber, 1970) e insectos (Nutman y Robert, 1970; Amante, 1971).

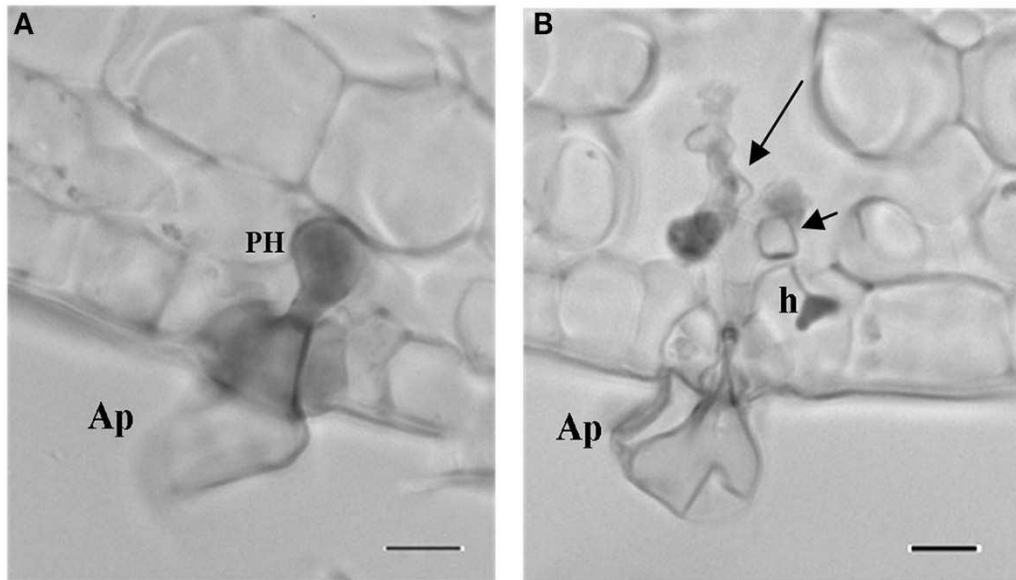


Figura 5: Micrografías ópticas de sitios de infección de *H. vastatrix* a las 72 Hdi. (A) Apresorio (Ap) sobre los estomas y una hifa de penetración (PH) en las hojas de muestras resistentes. (B) Apresorio (Ap) e hifas intercelulares (flecha grande) en las hojas de muestras susceptibles, siendo visible una célula madre haustorial (HMC) (pequeña flecha) con un haustorio (h) en la célula estomática subsidiaria
 FUENTE: Guerra-Guimarães *et al.* (2015).

2.2. VARIABILIDAD GENÉTICA

En el estudio para la identificación y determinación de la variabilidad de *Hemileia vastatrix*, Rodrigues *et al.* (1975) emplearon aproximadamente 40 plantas diferenciales de café que fueron desarrolladas en el CIFC del Portugal. Las plantas empleadas poseían entre uno y cinco genes de resistencia al patógeno, y de acuerdo a este número de genes se clasificaron en grupos fisiológicos (Rodrigues *et al.*, 1975).

En Tanzania, se han utilizado 18 clones diferenciales de café para caracterizar la prevalencia de *Hemileia vastatrix*, los resultados mostraron la presencia de siete nuevas razas causantes de la roya del cafeto (Deusdedit *et al.*, 2013).

En Brasil, 14 razas fueron confirmadas, siendo la raza II predominante en los cultivares comerciales (Zambolim *et al.*, 2005). Posteriormente en el mismo país Cabral *et al.* (2009) reportaron la presencia de la raza XXXVII.

En Venezuela, parece encontrarse muy baja variabilidad del patógeno, dado que se han identificado las razas I y II (Silva *et al.*, 1997). La identificación y caracterización morfológica del patógeno mediante el uso de cafetos diferenciales va volviéndose insuficientes para la identificación de nuevas razas de *Hemileia vastatrix*.

Cristancho y Escobar (2008), mencionan la importancia del desarrollo de técnicas moleculares para la identificación del hongo, debido al continuo desarrollo de nuevas razas, utilizaron marcadores microsatélites (SSR) de especies relacionadas a *H. vastatrix*, pero comprobaron que solo cuatro de 25 marcadores SSR podían ser usados para identificación genética.

Estudios realizados por Gouveia *et al.* (2005) demostraron la presencia de nuevas razas de roya en Colombia, utilizando marcadores moleculares RAPDs, sin embargo, no pudieron asociar los patrones de bandas obtenidos con el origen geográfico, su espectro de virulencia o con las razas fisiológicas individuales.

En estudios posteriores realizados en Brasil por Maia *et al.* (2013), se reporta que *Hemileia vastatrix* se comporta como una gran población indiferenciada, con un alto nivel de diversidad genética, que no está estructurada en relación a su origen geográfico y hospedero. Sin embargo, Cabral *et al.*, (2015), reportan un bajo valor de diversidad génica de Nei ($h = 0.027$) en la población del hongo.

Se conoce que el inóculo inicial de *Hemileia vastatrix* es la raza II, que está ampliamente distribuida en todos los países productores de café a partir del cual se generaron otras razas genéticamente diferentes (Zambolim *et al.*, 2005). La presión de selección provocada por el ambiente sobre el patógeno acelera la evolución y la formación de nuevas razas variantes (Várzea *et al.*, 2005), estos procesos se acentúan más en los lugares de uso continuo de fungicidas y en plantaciones a gran escala de genotipos de baja divergencia genética (Silva, 2000).

2.3. DIVERSIDAD GENÉTICA

De acuerdo a Piñero *et al.* (2008b) «diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie».

La diversidad genética de manera específica se refiere a la variación en los genes dentro de una especie, dicho de otro modo, a los cambios en las secuencias de bases nitrogenadas del ADN de los individuos que puedan generar poblaciones diferenciadas de la misma especie o variaciones genéticas dentro de una población, esto hace posible que las poblaciones de todas las especies puedan adaptarse a los cambios del medio ambiente (de Vicente *et al.*, 2004).

El estudio de la diversidad genética de las especies produce conocimientos útiles para evaluar enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones, especies nativas y recursos genéticos (Piñero *et al.*, 2008b), los que tienen importancia para el crecimiento y el desarrollo económico de los países.

En México, Piñero *et al.* (2008b) realizaron un estudio de la diversidad genética de una amplia variedad de especies de bacterias, protistas, hongos, plantas y animales, en cada caso se reportaron medidas de diversidad genética que incluyen número de haplotipos, número total de sitios polimórficos, número promedio de polimorfismos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica.

En España, Domínguez (2015) hizo un estudio de la diversidad genética de poblaciones del roedor *Microtus arvalis*, en el cual analizó el ADN mitocondrial para estimar las medidas de diversidad genética antes mencionadas, pero añadiendo el índice de Tajima (D), el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), el índice de fijación F_{ST} y una red de haplotipos para 34 localidades.

En Brasil, Cabral *et al.* (2015) utilizaron una red de haplotipos en el análisis de diversidad genética, detectándose hasta 68 haplotipos en poblaciones de *Hemileia vastatrix* procedentes de cinco Estados productores de café, la comparación entre haplotipos se realizó con la distancia genética de Nei (Nei, 1973). Adicionalmente, Nunes *et al.* (2009), estudiaron la diversidad genética en poblaciones de *H. vastatrix* procedentes de dos regiones del Estado de Minas Gerais, encontrando hasta 92 haplotipos y evidenciando que la principal variación se encontraba dentro de cada población (aproximadamente un 80 por ciento según el AMOVA).

2.4. REGIÓN ITS DEL ADN RIBOSOMAL

Los ITS o espaciadores transcribibles internos del ADN ribosomal, son zonas no codificantes ubicados entre los genes ribosomales 18S, 5.8S y 28S del ADN nuclear (White *et al.*, 1990). Estas permiten diferenciar a nivel de géneros o especies a hongos y plantas (White *et al.*, 1990), esto se debe a que se han diseñado ciertos cebadores que permiten la amplificación de la región ITS (Figura 6) mediante el uso de PCR (Mullis *et al.*, 1986; Mullis, 1990).

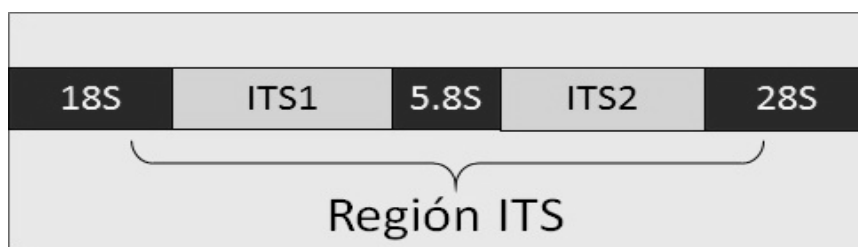


Figura 6: Región ITS del ADN ribosomal de *H. vastatrix*. Comprende parte del gen 18S, los espaciadores transcribibles internos ITS1 e ITS2, el gen 5.8S y parte del gen 28S.

FUENTE: Modificado de Korabecna (2007)

Los primeros iniciadores fueron diseñados por White *et al.* (1990) para la amplificación mediante PCR de las regiones ITS de hongos. Aunque el diseño se realizó a partir de un número limitado de secuencias, su capacidad como herramienta de detección e identificación ha quedado ampliamente demostrada, así como su utilidad en el análisis de la diversidad genética.

Estudios comparativos de las secuencias nucleotídicas de genes del ARN ribosomal (ARNr) proveen un medio para el análisis de la relación filogenética sobre un amplio rango de niveles taxonómicos (Woese & Olsen 1986; Medlin *et al.*, 1988). El grupo de genes del ARNr está presente en múltiples copias, dispuestas en tándem en los genomas de los hongos, lo que facilita la amplificación del ADN de pequeñas cantidades de muestra (Gardes *et al.*, 1991).

Los iniciadores de las regiones internas transcribibles del ADN ribosomal (ITS) se usan en zonas conservadas de 18s, 5.8s y 28s de los genes del ARN ribosomal para amplificar las regiones no codificantes entre ellos (Figura 6), estas secuencias se han utilizado para el análisis interespecífico de muchas especies de hongos (Gardes *et al.*, 1991; Hibbett y Vilgalys, 1991; Lee y Taylor, 1992). La región ITS tiene la ventaja de ser muy variable o polimórfica tanto en secuencia como en longitud (Korabecna, 2007; Slabbert *et al.*, 2010).

Se han diseñado cebadores ITS1-F e ITS4-B para el estudio ecológico de hongos deuteromicetos formadores de ectomicorrizas (Gardes y Bruns, 1993), obteniéndose buenos resultados en la amplificación, clonación y secuenciación del ADN ribosomal (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004). Posteriormente, el uso de los cebadores universales ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) sirvieron para evidenciar la alta tasa de mutación de *Hemileia vastatrix*, obteniéndose secuencias amplificadas por PCR con una longitud entre 909 a 977 pares de bases (Cristancho *et al.*, 2007).

2.5. MEDIDAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

2.5.1. Número de haplotipos (h): Es el número de secuencias de ADN diferentes en la muestra (Nei, 1987). El haplotipo es al material genético haploide cuyas variaciones o polimorfismos son heredados por una sola línea parental.

2.5.2. Número de sitios polimórficos (S): Es el número de sitios con al menos un nucleótido diferente en el mismo sitio de las secuencias de ADN alineadas. Los sitios polimórficos pueden dividirse en:

- a. **Sitios informativos:** Son los sitios en los cuales hay de dos a más nucleótidos diferentes al comparar las secuencias de ADN en el alineamiento.
- b. **Sitios no informativos (*singletons*):** Son los sitios que contienen solamente en una muestra un nucleótido diferente al comparar las secuencias de ADN en el alineamiento.

2.5.4. Diversidad haplotípica (H_d): Probabilidad que dos haplotipos tomados al azar presenten secuencias de ADN diferentes (Nei, 1987).

2.5.5. Diversidad nucleotídica (π): Probabilidad de escoger dos secuencias de ADN al azar y que difieran en una posición determinada (Nei y Li, 1979).

2.5.6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA): Es un método que sirve para estudiar la variación molecular dentro de una especie, se basa en un modelo jerárquico o anidado que permite obtener estimados de componentes de varianza y estadísticos F para un mejor estudio de subpoblaciones cuando las diferencias moleculares entre haplotipos son introducidas en el análisis (Excoffier *et al.*, 1992).

Los diferentes niveles jerárquicos de la diversidad genética estudiados por AMOVA, pueden abarcar (de Vicente *et al.*, 2004):

1. Continentes, que pueden contener niveles jerárquicos menores
2. Regiones geográficas dentro de un continente
3. Zonas dentro de una región, en un continente
4. Poblaciones dentro de una zona de una región, en un continente
5. Individuos dentro de una población en una zona de una región, en un continente.

2.5.7. Estadísticos F (Wright): Fueron establecidos por Wright (1951), basándose en el coeficiente de endogamia para el análisis de la estructura genética poblacional. Este método se sustenta en el hecho que las poblaciones subdivididas generalmente muestran una reducción en la heterocigosis observada respecto al valor estimado (García y Cañon, 2008). Los estadísticos F también posibilitan medir la distancia genética entre

subpoblaciones, así como estimar el grado de diferenciación genética entre ellas y dentro de la población (de Vicente *et al.*, 2004).

Los índices estadísticos involucran a (García y Cañon, 2008):

- F_{IS} : mide el nivel de endogamia dentro de las subpoblaciones.
- F_{ST} : mide el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones.
- F_{IT} : representa la reducción media en heterocigosis en un individuo relativa a la población total.

En el presente estudio se empleará el índice de fijación F_{ST} , que es el más utilizado para el análisis de secuencias de ADN.

2.6. ÍNDICE DE TAJIMA (D)

Es una prueba estadística cuyo propósito es diferenciar entre una secuencia de ADN que evoluciona al azar (neutralidad) y otra evolucionando bajo un proceso no aleatorio, incluyendo selección direccional o selección balanceada, expansión o contracción demográfica, deriva genética o introgresión (Tajima, 1989).

2.7. REDES HAPLOTÍPICAS

Las redes haplotípicas son gráficas que permiten distinguir patrones demográficos, flujo genético, cuello de botella genético o un probable efecto fundador en las poblaciones. También se utiliza para observar las relaciones ancestralidad-descendencia entre los haplotipos, teniendo en cuenta la distribución geográfica y sus frecuencias.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Zona de estudio

En la provincia de la Convención de la Región Cusco, se muestrearon cinco fincas ubicadas en las zonas productoras de Santa Teresa, Centro Bayona, Maranura, Sector Beatriz y el local de la cooperativa agraria COCLA en Quillabamba (Figura 7).

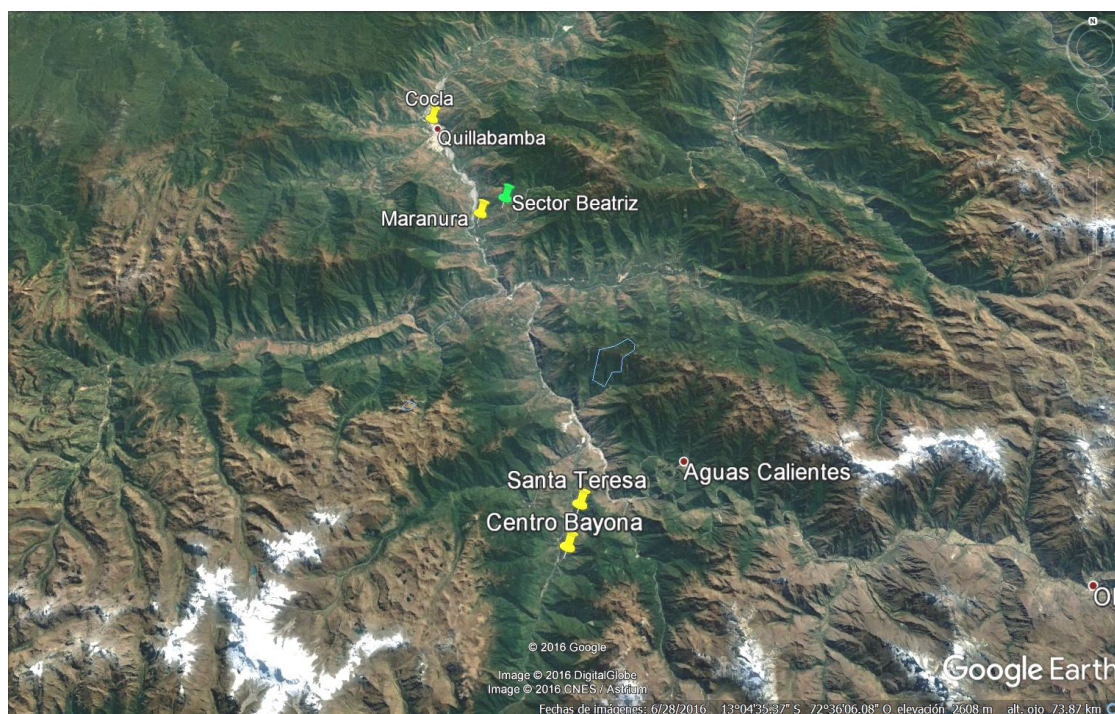


Figura 7: Ubicación de las zonas en la provincia de La Convención – Cusco, en las cuales se realizó el muestreo de las hojas infectadas con *Hemileia vastatrix*. FUENTE: Google Earth, (2016).

3.1.2. Población y muestra

Las muestras de uredosporas de *H. vastatrix* utilizadas en el presente estudio, vienen de colectas realizadas durante el mes de agosto (Tabla 1).

Tabla 1: Datos de pasaporte de *Hemileia vastatrix* procedentes de Quillabamba (2014).

Zonas de muestreo	Código	Altitud (msnm)	Latitud (GD)	Longitud (GD)
COCLA	HVQ01	1033	-12.86021	-72.7005
Maranura	HVQ02	1152	-12.95125	-72.66411
Sector Beatriz	HVQ03	1776	-12.94241	-72.64352
Santa Teresa	HVQ04	1865	-13.18405	-72.6043
Centro Bayona	HVQ05	2076	-13.21229	-72.61512

3.1.3. Iniciadores

Para el análisis de la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* se utilizó el par de iniciadores de White *et al.* (1990), que flanquean las regiones ITS1, el gen 5.8S e ITS2 (Tabla 2).

Tabla 2: Par de iniciadores universales de las regiones ITS del ADN ribosomal.

N°	Nombre del investigador	Nombre del Primer	Secuencia
1	White <i>et al.</i> , 1990	ITS1-L	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
2	White <i>et al.</i> , 1990	ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Análisis genético

a. Recolección de muestras

Se realizó según la metodología empleada por Silva *et al.* (2000). Se tomaron al azar 25 a 30 hojas con pústulas de roya de diferentes cafetos por finca, las muestras fueron almacenadas en bolsas de papel, cada una de las cuales forman un *bulk* de esporas. Las bolsas fueron transportadas al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), donde se realizó el aislamiento y el análisis molecular.

b. Aislamiento

Las uredosporas fueron aisladas desde las pústulas de las hojas con ayuda de pinceles a tubos de 1.5 mL, luego fueron almacenadas a una temperatura de -20°C.

c. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó utilizando el protocolo descrito por Goodwin y Lee (1993) y Cristancho *et al.* (2007), con algunas modificaciones. Se añadió 150 µL de buffer de lisis (50 mM de tris HCl pH 7.5; 50 mM de EDTA pH 8.0; 3 por ciento de SDS; uno por ciento de Mercaptoetanol) a tubos de 1.5 mL conteniendo las uredosporas, luego se maceró la solución con un micromortero. Una vez fraccionadas las uredosporas, se introdujo el tubo con la tapa abierta a un horno microondas, a su nivel máximo de poder, durante intervalos de 18 a 20 s, de 13 a 15 s y por último de 8 a 10 s, cuidando que no presentara ebullición. A continuación, se adicionaron 450 µL de buffer de lisis, se mezcló e incubó en baño maría a 80 °C durante 10 min. Seguidamente se dejaron enfriar los tubos a una temperatura de 50 °C, para luego agregar 10 µL de proteinasa K (0.5 mg.mL⁻¹), se agitó en un mezclador de vórtice y se incubó a 50 °C durante 30 min.

Posteriormente se añadió 700 μL de solución Fenol : Cloroformo : alcohol Isoamílico (25 : 24 : 1), se mezcló suavemente hasta obtener una emulsión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionó el mismo volumen de Cloroformo : alcohol Isoamílico (24 : 1). Se mezcló suavemente y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min.; este procedimiento se repitió dos veces. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionaron dos volúmenes de isopropanol frío para precipitar durante 24 horas. El pellet resultante se obtuvo centrifugando los tubos a 10.000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante, y el pellet se lavó con 480 μL de etanol al 70 por ciento y 120 μL de NaCl 5M. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 40, 50 ó 60 μL de buffer T₁₀E₁ (Tris-HCl 0.01M pH 8.0; EDTA 0.001 M). Se agregó 1 μL de RNAasa A y se incubó a 30 °C por 30 minutos, finalmente para desactivar la enzima se incubó a 65 °C por 10 minutos.

d. Calidad y cuantificación del ADN

La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al uno por ciento. Como tampón de corrida se utilizó TBE 1X (Trizma base 0.89 M, Ácido bórico 0.89 mM, EDTA 0.5 M, pH 8.0). En cada pozo del gel se colocó una mezcla que contiene 1 μL de ADN con 8.9 μL de tampón de carga 1X (0.15 por ciento de azul de bromofenol, 0.15 por ciento de xilencianol, 0.2 por ciento de naranja G, TBE 0.5X y sucrosa 60 por ciento) y 0.1 μL de solución *Gel red Nucleic Acid Stain* (1/9) (Biotium). Su visualización se realizó bajo luz ultravioleta del transiluminador (UV SOLO TS imagen system).

Para medir la concentración del ADN se utilizó el espectrofotómetro Epoch (Biotek). La ventaja de este equipo radica en el pequeño volumen de muestra que se necesita (1-2 μL). Como muestra blanco se utilizaron 2 μL de la solución tampón T₁₀E₁. Las concentraciones se determinaron a partir de la absorbancia a 260 nm (en ng/ μL) y la calidad de ADN con la relación de absorbancias 260/280. Las muestras de ADN fueron diluidas hasta 20 ng/ μL , solución que se utilizó para la PCR.

e. PCR

Para amplificar las regiones ITS del ADN ribosomal, se utilizaron los iniciadores ITS1 e ITS4 de White *et al.* (1990) (Tabla 2). Se preparó la mezcla de reacción en un volumen final de 10 µl, conteniendo 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada iniciador, 1X de Buffer de PCR (GenBiotech), 1.25 Unidades de Taq ADN polimerasa (GenBiotech) y 40 ng de ADN. Cada muestra se amplificó con 6 repeticiones para obtener un volumen final de 60 µL.

El perfil térmico utilizado fue el siguiente:

Etapas 1: 1 ciclo de 95 °C por 5 minutos (min.)

Etapas 2: 30 ciclos de 1.5 min. a 94 °C, 1 min. a 60 °C, y 2 min. a 72 °C.

Etapas 3: 1 ciclo de 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al uno por ciento en las mismas condiciones empleadas para la determinación de la calidad y cantidad de ADN. Su visualización se realizó por medio de luz ultravioleta con GelRed (Biotium) y un marcador 100 pb de peso molecular para tener certeza que haya amplificado la banda apropiada.

f. Clonación

- **Aislamiento**

Se cortaron y purificaron las bandas de ADN del gel de agarosa utilizando el “QIAquick gel extraction kit protocol” de QIAGEN (Anexo 1).

- **Ligamiento**

La reacción de ligamiento (kit de PROMEGA) se llevó a cabo en un volumen final de 5 µL utilizando 1.5 µL del producto de PCR purificado; 0.5 µL de T₄ ADN ligasa (3 unidades Weiss/µL); 2.5 µL de Tampón de ligamiento 2X; y 0.5 µL del Vector pGEM®-T easy, el cual se mezcló suavemente y se incubó a 14 °C por 14 horas.

La cantidad del inserto se calculó en función del tamaño y de la relación molar 3:1 (inserto: plásmido). Así pues, para calcular la cantidad de producto de PCR se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{pb del producto de PCR})(50 \text{ ng de pGEM®-T})}{3015 \text{ pb de pGEM®-T}} \times \frac{3}{1} = \text{ng de producto de PCR (Inserto)}$$

- **Transformación**

Se descongeló 100 µL de células competentes (PROMEGA), se agregó al vial de las células 2 µL de la reacción de ligamiento, luego se mezcló suavemente e incubó la mezcla en hielo por 30 minutos, posteriormente se realizó un choque térmico de 50 segundos a 42 °C, e inmediatamente después se las colocó en hielo por 2 min. y se adicionaron 250 µL de medio SOC (PROMEGA). El vial conteniendo las células competentes, la reacción de ligación y el medio SOC se incubó a una temperatura de 37 °C a 225 rpm durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo se esparcieron las muestras en placas que contenían medio sólido LB (Anexo 2), X-Gal, IPTG y ampicilina los cuales se incubaron toda la noche (14 horas aproximadamente) a 37 °C. La identificación de las células bacterianas transformantes se llevó a cabo mediante el método del “White blue screening”.

Se seleccionaron 10 colonias blancas por cada placa Petri, las cuales fueron sembradas en 5 mL de caldo o medio líquido LB (Anexo 2) que contenían 50 µg/mL de ampicilina para luego ser incubadas a 37 °C por 24 horas.

g. Purificación de ADN plasmídico de *E. coli*

Se realizó la extracción del plásmido de *E. coli* conteniendo el fragmento de ADN (región ITS) de interés a partir de 5 mL de cultivo bacteriano empleando el protocolo Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System de PROMEGA (Anexo 2).

h. Confirmación de la presencia del gen en las colonias seleccionadas

Se realizó mediante digestión del plásmido con enzima de restricción EcoRI y los fragmentos visualizados en gel de agarosa al 1.5 por ciento utilizando GelRed (Biotium).

i. Secuenciación

Las muestras conteniendo los plásmidos con el inserto de cada fragmento, fueron enviadas para su secuenciación a la empresa GenBioteck (Argentina).

3.2.2. Análisis de datos

Las secuencias fueron editadas con el programa CodonCode Aligner v. 2.0.6 y alineadas con el programa MAFFT v. 7 (2016). A continuación, se definen e interpretan las estimaciones utilizadas en esta investigación:

a. Estimación de la diversidad nucleotídica

La diversidad nucleotídica mide la diversidad de nucleótidos entre varias secuencias en una región dada del genoma, dentro de una población (de Vicente *et al.*, 2004). La diversidad nucleotídica (π) se estima:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum X_i X_j \pi_{ij}$$

Donde:

n = el número de secuencias analizadas en los individuos de la población.

X_i = la frecuencia estimada de la i -ésima secuencia en la población.

X_j = la frecuencia calculada de la j -ésima secuencia en la población.

π_{ij} = la proporción de nucleótidos diferentes entre las secuencias i y j .

La diversidad nucleotídica varía de 0 a 1 ($0 \leq \pi \leq 1$). Si las secuencias de una muestra presentan los mismos nucleótidos será 0 y si las secuencias de una muestra presentan todos los nucleótidos diferentes será 1.

b. Estimación de la diversidad haplotípica

De acuerdo a Domínguez (2015), «la diversidad haplotípica mide la singularidad de un haplotipo en una población dada en relación con el tamaño muestral». La diversidad haplotípica (H_d) se estima:

$$H_d = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^h X_i^2\right)$$

Donde:

n = Número de secuencias

h = Número de haplotipos diferentes

X_i = Frecuencia del haplotipo i

El valor de H_d varía entre 0 y 1. Si todos los haplotipos de una muestra son iguales el valor de H_d será 0 y si todos los haplotipos de la muestra fuesen diferentes el valor será 1.

La diversidad nucleotídica y la haplotípica fueron determinadas mediante el DNAsp v.5 (Rozas *et al.*, 2010).

c. Estimación del Índice de Tajima (D)

El D de Tajima calcula la diferencia entre dos medidas de diversidad genética: el número medio de diferencias nucleotídicas (π) entre pares de secuencias y el número de sitios polimórficos (S). Se espera que estas medidas sean iguales en una población de tamaño constante que evoluciona de forma neutral (Tajima, 1989). El índice de Tajima (D) se estima:

$$D = \frac{d}{\sqrt{V(d)}}$$

$$d = k - \frac{S}{a_1}$$

$$k = \frac{\sum \sum_{i < j} k_{ij}}{\binom{n}{2}}$$

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$$

Donde:

k = número promedio de polimorfismos entre pares de secuencias

S = número total de sitios polimórficos en todas las secuencias

n = número total de secuencias de la muestra

d = diferencia entre dos estimaciones

i = la secuencia i-ésima

a₁ = parámetro estimado con el número de secuencias

V(d) = varianza de “d”

Generalmente los valores significativos que puede tomar el índice de Tajima (D) para aceptar la hipótesis de la evolución neutral deben estar entre -2 y 2. Según Tajima (1989) los valores pueden variar por el tamaño de la muestra y el nivel de significancia utilizado.

El valor del índice de Tajima (D) se calculó mediante el programa DNAsp v.5 y la interpretación se realizó utilizando la Tabla 3.

Tabla 3: Interpretación del Índice de Tajima.

Valor del índice de Tajima (D)	Primera Interpretación	Segunda Interpretación
D = 0	La variación de haplotipos observada es igual a la variación esperada	La población evoluciona en un equilibrio de mutación – deriva genética. No hay evidencia de selección
D < 0	Los haplotipos raros están en alta frecuencia	La población se encuentra en expansión después de un reciente cuello de botella (efecto fundador)
D > 0	Los haplotipos raros están en baja frecuencia	Hay una selección balanceada y una súbita contracción de la población

FUENTE: Elaboración propia en base a Tajima (1989)

d. Determinación del AMOVA

El AMOVA estima la diferenciación poblacional directamente de datos obtenidos de marcadores moleculares, secuencias de ADN o árboles filogenéticos (Excoffier *et al.*, 1992). Los componentes de varianza por nivel jerárquico entre grupos y dentro de cada grupo de una población se estiman utilizando la Tabla 4 (Campos, 2005).

Tabla 4: Estimación de varianzas para datos haploides

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	Cuadrados medios esperados (CME)
Entre grupos	$G - 1$	SC(EG)	CM(EG)	$n\sigma_a^2 + \sigma_b^2$
Dentro de grupos	$N - G$	SC(DG)	CM(DG)	σ_b^2
Total	$N - 1$	SC(T)	CM(T)	σ_T^2

Donde:

G = Número de subpoblaciones o grupos

N = Número total de secuencias

σ_a^2 = Valor de la varianza debido al efecto entre grupos

σ_b^2 = Valor de la varianza debido al efecto dentro de grupos

σ_T^2 = Valor de la varianza total

n = factor de corrección

En la tabla 4, los cuadrados medios (CM) se obtienen dividiendo la suma de cuadrados (SC) entre el grado de libertad (gl) del nivel jerárquico respectivo, y los componentes de varianza se estiman igualando los cuadrados medios (CM) con los cuadrados medios esperados (CME) para cada nivel (Excoffier *et al.*, 1992).

e. Estimación del Índice de Fijación F_{ST}

El índice de fijación F_{ST} mide el grado de diferenciación genética existente entre subpoblaciones debido a la deriva génica (García y Cañon, 2008). La interpretación equivale a medir la similitud entre grupos de individuos de una misma población con respecto a la población total (Domínguez, 2015). Se estima a partir de los componentes de varianza obtenidos del AMOVA, de la siguiente manera:

$$F_{st} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

El rango de F_{ST} varía de 0 a 1. Cuando no existe diferenciación será 0 y si existe diferenciación completa será 1. En la tabla 5, observamos los intervalos de valores del índice de fijación F_{ST} para interpretar la medida de la diferenciación genética en la población.

Tabla 5: Interpretación de los valores F_{ST}

Rango	Diferenciación genética
$0 \leq F_{ST} < 0.05$	pequeña
$0.05 \leq F_{ST} < 0.15$	moderada
$0.15 \leq F_{ST} < 0.25$	grande
$0.25 \leq F_{ST}$	muy grande

FUENTE: de Vicente *et al.* (2014)

f. Red de haplotipos

Con el fin de observar las variaciones entre los haplotipos se construyó la red de haplotipos utilizando el algoritmo median joining implementado en el software PopART v. 1.7 (Clement *et al.*, 2002).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE *Hemileia vastatrix*

Mediante el protocolo de extracción de ADN a partir de uredosporas de *H. vastatrix*, se pudo obtener ácidos nucleicos con valores de concentración entre 267.5 ng/ μ L a 723 ng/ μ L (Tabla 6), con calidad del ADN (260/280) entre 2.02 y 2.21 que sobrepasan ligeramente los valores óptimos (entre 1.8 y 2.0) como lo señalan Sambrook y Russell (2001), a pesar de ello, no fue problema para la amplificación específica del fragmento deseado. La visualización del gel de agarosa a través del transiluminador UV que se observa en la Figura 8, demuestra la existencia de ADN de alto peso molecular. Estos resultados de pureza y calidad fueron suficientes para la amplificación de la región ITS de las muestras de uredosporas de *H. vastatrix*.

Tabla 6. Valores de la cuantificación y calidad del ADN de *H. vastatrix* a partir de datos de absorbancia.

Código	Concentración (ng/ μ L)	Absorbancia		
		A260	A280	260/280
HVQ01	689.2	13.784	6.232	2.21
HVQ02	689.2	3.645	1.802	2.02
HVQ03	267.5	5.349	2.563	2.09
HVQ04	560.1	11.202	5.205	2.15
HVQ05	723.8	14.475	6.558	2.21

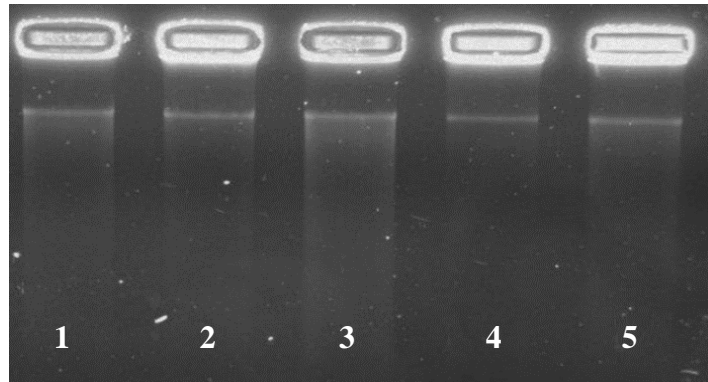


Figura 8: Gel de agarosa al uno por ciento mostrando el ADN extraído de *H. vastatrix* para cada zona: 1=HVQ01, 2=HVQ02, 3=HVQ03, 4=HVQ04 y 5=HVQ05.

4.2. AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DEL ADN RIBOSOMAL

4.2.1. Amplificación

Los productos amplificados por PCR fueron visualizados empleando la técnica de electroforesis en gel de agarosa al uno por ciento (Figura 9). El marcador de peso molecular evidencia una longitud de aproximadamente 1100 pares de bases para la región ITS del ADN ribosomal, la cual se puede apreciar como una banda gruesa en el gel.

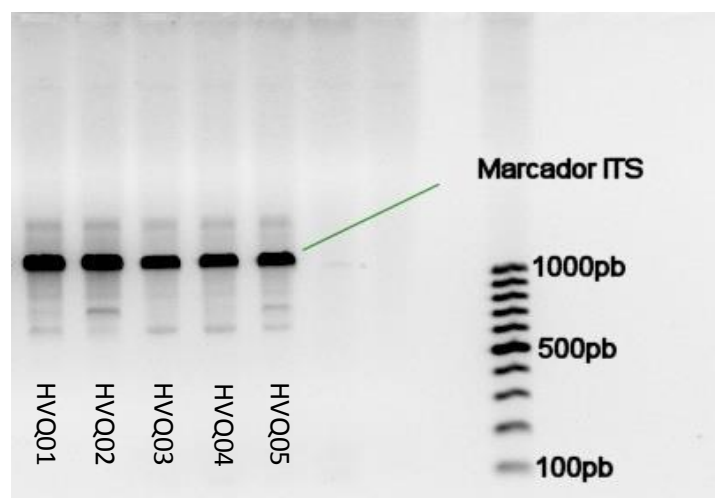


Figura 9: Gel de agarosa al uno por ciento mostrando productos de amplificación de aproximadamente 1100 pb, utilizando iniciadores ITS.

4.2.2. Aislamiento

A partir del gel de agarosa (Figura 9) se realizó el aislamiento del fragmento que corresponde a la región ITS mediante el KitQIAquick® Gel Extraction (Anexo 1), luego se realizó la verificación de la presencia del producto de amplificación de la región ITS por medio de un gel de agarosa al uno por ciento (Figura 10).

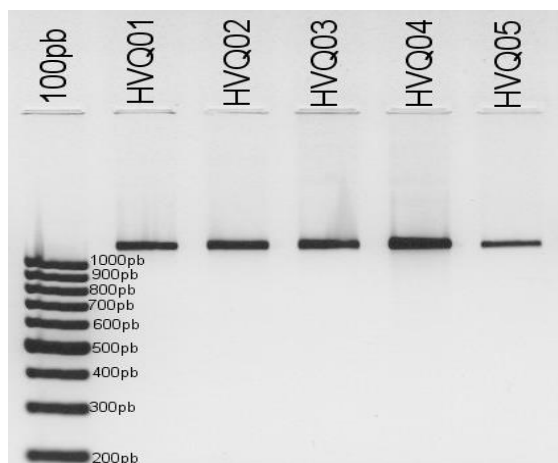


Figura 10: Gel de agarosa al uno por ciento mostrando los productos de amplificación de la región ITS aislada.

4.3. CLONACIÓN Y ALINEAMIENTO DEL ADN RIBOSOMAL

4.3.1. Clonación

La clonación fue realizada empleando el kit pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA), que permitió obtener las colonias blancas transformadas conteniendo el fragmento ITS de *Hemileia vastatrix* (Figura 11). Después de obtener los plásmidos mediante el protocolo del KitWizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Anexo 3), se verificó la presencia del fragmento insertado digiriendo los plasmidos con enzima de restricción EcoRI y utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5 por ciento.

Mediante electroforesis se comprobó la inserción del fragmento ITS cuando en el gel se observaba la presencia de dos bandas correspondientes al inserto y de una banda correspondiente al plásmido (Figuras 12a y 12b). Las dos bandas que generó el inserto es debido a que presenta una diana de restricción para la enzima EcoRI. La colonia HVQ02.3 no presentó dichos fragmentos por lo que se asumió que no llegó a transformarse (Figura 11).

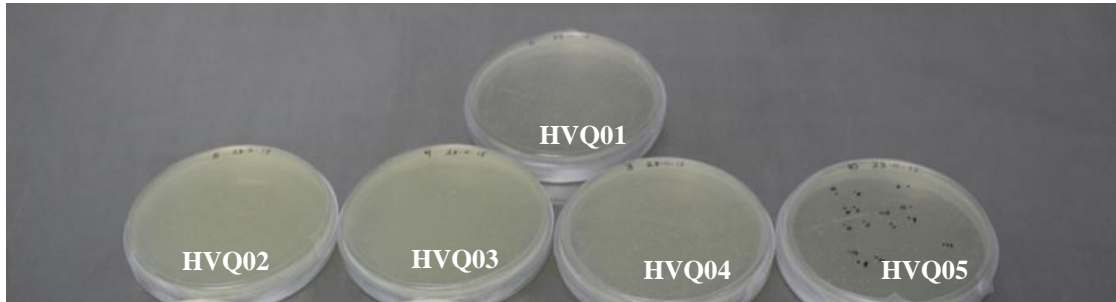


Figura 11: Placas con medio sólido LB, mostrando colonias blancas (recombinantes) y colonias azules (sin el inserto) de *E. coli*.

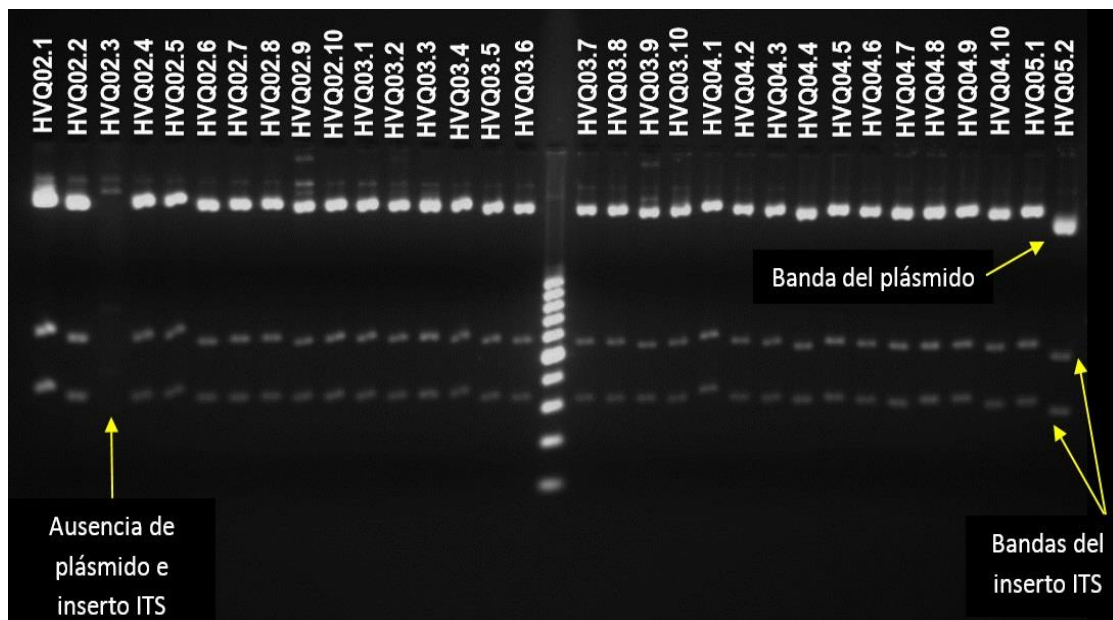


Figura 12a: Gel de agarosa al 1.5 % donde se muestra la confirmación del inserto en el plasmido extraído mediante digestión con enzima EcoRI. En la imagen se muestran los productos de amplificación de 31 colonias transformadas.

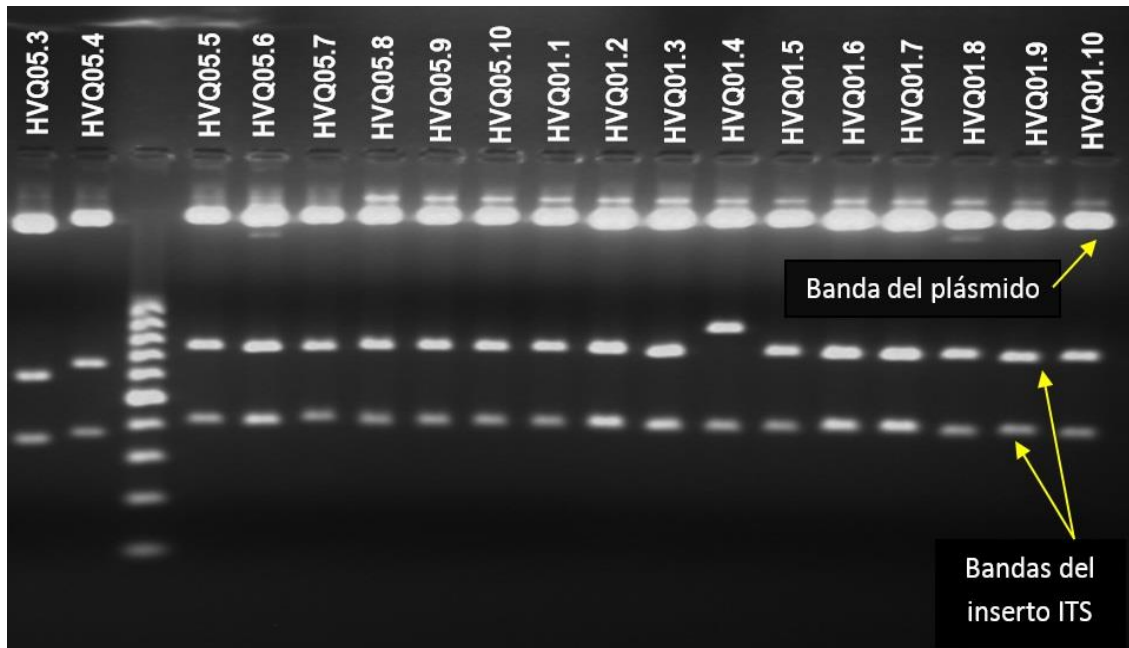


Figura 12b: Gel de agarosa al 1.5 % donde se muestra la confirmación del inserto en el plásmido extraído mediante digestión con enzima EcoRI. En la imagen se muestran los productos de amplificación de 18 colonias transformadas.

4.3.2. Alineamiento

El alineamiento múltiple de las 49 secuencias obtenidas de la región ITS del ADN ribosomal resultó en 915 sitios alineados, en los cuales se pueden observar 837 sitios conservados, 66 sitios polimórficos ($S=66$), 16 sitios *gaps*, 57 sitios *singleton* y nueve sitios polimórficos informativos (Anexo 4).

Las posiciones de los nueve sitios polimórficos informativos son:

149 423 462 492 564 642 697 704 919

Las posiciones de los 57 sitios polimórficos no informativos (*singleton*) son:

5	11	16	28	41	56	58	60	84
92	103	137	157	158	161	163	195	196
229	244	245	272	296	29	314	326	333
341	352	354	368	409	414	415	434	442
465	502	508	520	558	572	604	614	637
673	675	676	702	755	797	804	829	835
849	889	918						

Las 49 secuencias de la región ITS de *Hemileia vastatrix* fueron codificadas para identificar la zona de procedencia de las colonias transformadas; la secuencia consenso y las posiciones de los nucleótidos se aprecian en la parte superior del alineamiento múltiple que se muestran en el Anexo 3.

4.4. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix*

Las 49 secuencias obtenidas de *H. vastatrix* se agruparon en 38 haplotipos (h=38) (Anexo 5). En la determinación de los haplotipos, realizado por medio del alineamiento, sólo se han considerado los sitios polimórficos (Figura 13).

La mutación es la principal fuente de variabilidad para generar nuevas razas de *Hemileia vastatrix* (Cenicafé, 2012). Se desconoce el mecanismo exacto de las mutaciones, pero es posible que tengan su origen por errores acumulativos y espontáneos durante la replicación y/o reparación del ADN, los que rápidamente son transmitidos a las próximas generaciones al aumentar las poblaciones del patógeno. Esto justificaría el gran número de haplotipos detectados en Quillabamba ($h = 38$), cuyas secuencias se diferencian en pocos nucleótidos (Figura 13).

Otro mecanismo propuesto que podría generar variabilidad de *H. vastatrix* es el de la criptosexualidad (Carvalho *et al.*, 2011), la cual consiste en la ocurrencia de cariogamia y meiosis dentro de la uredospora, es decir, esta espora asexual efectuaría los procesos antes mencionados propios de las teliosporas para la formación de basidiosporas o esporas sexuales, esto probablemente explicaría el alto valor de diversidad haplotípica encontrado en Quillabamba.

En la Tabla 7 podemos observar el cuadro de análisis de la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* en las cinco zonas cafetaleras de Quillabamba.

Tabla 7: Valores del número de haplotipos, diversidad nucleotídica y haplotípica ($p < 0.01$) por zona.

Zona	Código	Diversidad nucleotídica (π)	Número de haplotipos (h)	Diversidad haplotípica (H_d)
COCLA (fundo)	HVQ01	0.0055	8	0.956
MARANURA	HVQ02	0.00398	8	0.972
SECTOR BEATRIZ	HVQ03	0.00439	8	0.933
SANTA TERESA	HVQ04	0.00584	10	1
CENTROBAYONA	HVQ05	0.0047	10	1

De las zonas antes mencionadas, los valores más altos de diversidad nucleotídica y diversidad haplotípica lo presentan Santa Teresa y Centro Bayona, la explicación de estos resultados estaría relacionada con el hecho que ambas zonas se encuentran a mayor altitud (Tabla 1) y por tanto, es probable que *H. vastatrix* este adaptándose a las condiciones de altura como se puede inferir del estudio realizado por Cenicafé (2012).

COCLA tiene elevada diversidad haplotípica ($H_d=0.956$) y nucleotídica ($\pi=0.0055$) (Tabla 7) a pesar de encontrarse a una baja altitud (Tabla 1), este fenómeno es posible porque el mencionado fundo es un centro de acopio de café en Quillabamba, razón por la cual es propensa a recibir uredosporas de *Hemileia vastatrix* provenientes de varias zonas productoras.

A partir del análisis de variancia molecular (AMOVA) que se muestra en la Tabla 8, se concluye que el mayor porcentaje de la diferenciación genética está dentro de cada zona (99.89656 por ciento) pero muy poca entre zonas (0.10344 por ciento). Esto significaría que se está generando variaciones de las secuencias dentro de cada zona por el aumento de la población de roya. El índice de fijación obtenido ($F_{ST} = 0.00103$) es pequeño, esto confirmaría que la población estudiada de *Hemileia vastatrix* en Quillabamba es casi uniforme con muy poca diferenciación genética como concluyeron Maia *et al.* (2013), debido a la biología de su reproducción (Gouveia *et al.*, 2005) y probablemente a la pequeña área geográfica comprendida en el presente estudio (Piñero *et al.*, 2008a).

Tabla 8: Cuadro de AMOVA ($p=0.418$) de las muestras de *Hemileia vastatrix* de Quillabamba.

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados	Varianza (σ^2)	Porcentaje de variación (%)
Entre zonas	4	58.595	0.015	0.10344
Dentro de zonas	44	636.467	14.465	99.89656
Total	48	695.061	14.480	100

$F_{ST} = 0.00103$

En la red de haplotipos obtenida (Anexo 4), las líneas representan las posiciones de los sitios informativos del alineamiento y las muescas sobre ellas la diferencia en el número de nucleótidos. Los diferentes colores representan las zonas de donde se colectaron las muestras de uredosporas, lo que permite observar que los haplotipos Hap_4, Hap_8 y Hap_22 se encuentran presentes en cuatro, tres y dos zonas respectivamente (Tabla 9). El resto de los haplotipos se consideran de frecuencia única a excepción del Hap_2 que a pesar de encontrarse en una sola zona se encuentra repetido (Anexo 6).

Tabla 9: Haplotipos de *Hemileia vastatrix* detectados en cinco zonas productoras de café en Quillabamba.

Zona	Código de la zona	Nº de Haplotipos	Haplotipos
COCLA	HVQ01	8	Hap_1, Hap_2, Hap_3, Hap_4 , Hap_5, Hap_6, Hap_7, Hap_8
MARANURA	HVQ02	8	Hap_4 , Hap_8 , Hap_9, Hap_10, Hap_11, Hap_12, Hap_13, Hap_14
SECTOR BEATRIZ	HVQ03	8	Hap_4 , Hap_8 , Hap_15, Hap_16, Hap_17, Hap_18, Hap_19, Hap_20
SANTA TERESA	HVQ04	10	Hap_21, Hap_22 , Hap_23, Hap_24, Hap_25, Hap_26, Hap_27, Hap_28, Hap_29, Hap_30
CENTRO BAYONA	HVQ05	10	Hap_4 , Hap_22 , Hap_31, Hap_32, Hap_33, Hap_34, Hap_35, Hap_36, Hap_37, Hap_38

Se podría considerar a los haplotipos 4 y 8 como los ancestrales a partir de los cuales se generó el resto, por lo tanto, se podría proponer que estos en algún momento llegaron a Quillabamba de otras zonas del Perú o el extranjero, se establecieron y en tiempos actuales vienen diversificándose. Aparentemente la introducción fue escasa, con el transcurrir del tiempo el crecimiento poblacional se fue incrementando en la medida que los cafetos cultivados que predominen dicha zona sean susceptibles (MINAGRI, 2003; Márquez y Aguilar, 2013), las condiciones climáticas favorezcan al patógeno (Cenicafé, 2012) y el control químico y/o biológico de la enfermedad se realicen con baja frecuencia (MINAGRI, 2003; INDECOPI, 2011).

De acuerdo a MINAGRI (2003), en Quillabamba se concentra hasta un 57 por ciento de la variedad Typica, 20 por ciento de la variedad Caturra, 10 por ciento de variedad Catimor, cinco por ciento de la variedad Bourbon, cinco por ciento de la variedad Pache, y tres por ciento de otras variedades de *Coffea arabica*. De todas ellas, la variedad Catimor presenta resistencia a la roya debido a que proviene del cruce de la variedad Caturra con el Híbrido de Timor, éste último ha sido muy utilizado en los programas de mejoramiento genético para obtener variedades resistentes. Las demás variedades mencionadas son susceptibles a *Hemileia vastatrix*. En un estudio para evaluar la severidad de la roya amarilla (Márquez y Aguilar, 2013), se determinó que la variedad Typica fue la más afectada y la que tenía una prevalencia de hasta el 96 por ciento de las fincas cafetaleras muestreadas en la provincia de La Convención.

Lo anterior es corroborado por el estudio en evolución de razas de *H. vastatrix* (Cristancho *et al.*, 2007) en materiales diferenciales de café susceptibles a la enfermedad como es el caso de la variedad Caturra de la especie *Coffea arabica*. De acuerdo con Cenicafé (2012), la susceptibilidad a *Hemilaeia vastatrix* se debe a que este patógeno al evolucionar puede perder genes de avirulencia, y de esta manera, generar nuevas razas para ampliar su ataque a diversos genotipos de cafetos que no producen otros genes de resistencia.

Conforme a los datos obtenidos de SENAMHI (Anexo 7), las variaciones climáticas de la estación meteorológica de Quillabamba confirman las condiciones favorables de temperatura y humedad para el incremento poblacional de *Hemileia vastatrix* (Nutman *et al.*, 1963). Como podemos apreciar (Anexo 8) el rango de temperatura se ha ido estrechando debido a la disminución de la temperatura máxima y al aumento de la temperatura mínima, esto explicaría el incremento de la temperatura; además, el registro del porcentaje de la humedad relativa aumentó significativamente desde el año 1964 hasta la fecha (Anexo 9). Estos cambios graduales en las condiciones climáticas posiblemente contribuyeron al incremento poblacional del patógeno en los últimos años desde que llegó al Perú en 1979.

La información respecto a que los factores climáticos influyen en el crecimiento poblacional de *H. vastatrix* está sustentada en la epidemia de roya en Colombia (2008-2011), donde los rangos óptimos de humedad y temperatura, debido al cambio en las condiciones climáticas, favorecieron el desarrollo del patógeno especialmente en las zonas superiores a los 1600 msnm (Cenicafé, 2012). En este estudio, las zonas de Sector Beatriz, Centro Bayona y Santa Teresa están ubicadas por encima de los 1600 msnm, es posible que en ellos haya ocurrido una situación similar a la acontecida en Colombia.

Por otro lado, las fincas cafetaleras de Quillabamba en su mayoría minimizan el uso de productos químicos (INDECOPI, 2011) y presentan baja tecnología (Márquez y Aguilar, 2013), en consecuencia, no habría un control efectivo de la enfermedad y por tanto, se favorecería la infección de *H. vastatrix* y el incremento de sus poblaciones. Según MINAGRI (2003) los productores de Quillabamba utilizan mayormente el control orgánico y biológico como medida de protección fitosanitaria; esto les permitiría obtener café orgánico, producto de agroexportación con alta demanda en el mercado internacional.

En resumen, el análisis de las secuencias de las regiones ITS del ADN ribosomal tal como lo hicieran Cristancho *et al.* (2007) ha demostrado una elevada diversidad haplotípica ($Hd = 0.977 \pm 0.012$) de *Hemileia vastatrix*, por el gran número de haplotipos hallados ($h=38$), los que probablemente se originaron a partir de haplotipos ancestrales que al encontrar condiciones favorables en la zona de estudio sus poblaciones crecieron muy rápidamente, concretándose un efecto fundador evidenciado por el índice negativo de Tajima ($D = -2.35287$). Además, la diversidad nucleotídica baja ($\pi = 0.00540 \pm 0.00038$) y un valor pequeño del índice de fijación ($F_{ST} = 0.00103$) prueban que la población de *H. vastatrix* en Quillabamba presenta baja diversidad genética, posiblemente por la baja frecuencia de haplotipos ancestrales y el elevado número de haplotipos únicos que no demuestran su adaptación, ello se evidencia por su elevada diferenciación genética dentro de cada zona estudiada, llegando a una variación del 99.89656 por ciento según el AMOVA.

V. CONCLUSIONES

1. Mediante el análisis de la región ITS del ADN ribosomal, se ha determinado una elevada diversidad haplotípica ($H_d = 0.977 \pm 0.012$) de *Hemileia vastatrix* en la zona de Quillabamba encontrándose 38 haplotipos, sin embargo, la diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00540 \pm 0.00038$) fue baja por el escaso número de sitios polimórficos informativos encontrados.
2. Los protocolos de extracción de ADN, clonación y purificación de la región ITS para *H. vastatrix* son reproducibles y fueron óptimos como para permitir su secuenciación.
3. Se ha determinado a partir del índice de Tajima obtenido ($D = -2.35287$) que *H. vastatrix* de la zona de Quillabamba, está atravesando un crecimiento poblacional en el que se muestra un probable efecto fundador con una alta frecuencia de haplotipos únicos.
4. De acuerdo al AMOVA la diversidad genética de la población de roya en Quillabamba estaría explicada principalmente por la diferenciación genética dentro de las fincas (99.89656 por ciento).

VI. RECOMENDACIONES

A partir de la información del presente estudio se recomienda:

- Realizar evaluaciones constantes de la diversidad genética de *H. vastatrix* para conocer la evolución del patógeno y las autoridades sanitarias puedan realizar las recomendaciones necesarias para el control efectivo de la enfermedad.
- Debido al gran número de haplotipos de *H. vastatrix* hallados en el presente estudio se recomienda realizar los *bulks* a partir de una sola planta.
- Hacer los estudios de diversidad genética de *H. vastatrix* en otras zonas del país para comparar con la hallada en el presente estudio.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. UK, Elsevier Academic Press. Printed in China, 922 p.
- Amante, E; Vulcano, MA. Abrahao, J. 1971. Observações preliminares sobre a influencia da entomofauna na dispersao dos uredosporos da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). *Biológico* 37(4):102-105.
- Arneson, PA. 2000. Coffee rust. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02. Consultado 4 nov. 2016. Disponible en file:///C:/Users/tutoria1/Downloads/Arneson,%202005_Hemileia%20vastatrix.pdf
- Avelino, J; Rivas,G. 2013. La roya anaranjada del cafeto 47 p. Consultado 7 oct. 2016. Disponible en https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/1071036/filename/LA_ROYA_ANARANJADA_DEL_CAFETO_V1.pdf
- Becker, S; Kranz, J. 1977. Comparative studies on the dispersal of *Hemileia vastatrix* in Kenya. *Journal of Plant Diseases and Protection* 84(9):526-539.
- Berkeley, MJ. 1869. *Gard. Chron.* 1157 p. Consultado 12 dic. 2017. Disponible en <https://www.biodiversitylibrary.org/item/103387#page/1069/mode/1up>
- Bettencourt, AJ; Rodrigues Junior, CJ; Noronha-Wagner, M. 1971. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Agronomía Lusitana* 31:285-292.

- Bock, KR. 1962. Seasonal periodicity of coffee leaf rust and factors affecting the severity of outbreaks in Kenia Colony. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 45(3):289-300.
- Butler, EJ. 1918. *Fungi and disease in plants; an introduction to the diseases of field and plantation crops, especially those for indian and the east.* Thacker, Spink & Col. Calcutta, 547 p.
- Cabral, PGC; Zambolim, EM; Oliveira, SAS; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2015. Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*: 1–9. doi:10.1111/ppa.12411
- Cabral, PGC; Zambolim, EM; Zambolim, L; Lelis, TP; Capucho AS; Caixeta, ET. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Dis. Notes* 4(1):129-130.doi:10.1071/DN09052
- Campos, R. 2005. Análisis de estructura genética y diversidad de tres poblaciones de Costa Rica, México y el Suroeste de Estados Unidos relacionadas con la esquizofrenia, utilizando marcadores Y-STRs y ADNmt. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica. 147 p.
- Carvalho, CR; Fernandez, RC; Carvalho, GMA; Barreto RW; Evans, HC. 2011. Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *Plos one* 6(11):1-7.e26387.doi:10.1371/journal.pone.0026387.
- Cenicafé (Centro Nacional de Investigaciones del Café, Colombia). 2012. Razas de roya: Epidemias de 2008 a 2011. Programa de Investigación Científica - Fondo Nacional del Café, Imprenta: ISSN – 0120 – 0178. Consultado 7 oct. 2016. Disponible en <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/353/1/avt0425.pdf>
- Chaves, GM; Cruz Filho, J; Carvalho, MG; Matsuoka, K;Coelho, DJ; Shimoya, CA. 1970. Ferregem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.): revisao de literatura com observacoes e comentarios sobre a enfermidade no Brasil. *Seiva* 30:1-75.

- CICAFAE (Centro de Investigaciones en Café, Costa Rica). 2013. Recomendaciones para el Combate de la Roya del Cafeto. Barquero Miranda, M (ed.). San José, Costa Rica. 63 p. ISBN 978-9977-55-045-9.

- Clement, M; Snell, Q; Walke, P; Posada, D; Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp 2:184.

- Cramer, PJS. 1957. A review of literature of coffee research in indonesia. Wellman, FL (ed.). SIC Editorial Inter-American Institute of Agricultural Sciences, Turrialba, Costa Rica. 262 p.

- Cristancho, M; Escobar, C. 2008. Transferability of SSR markers from related Uredinales species to the coffee rust *Hemileia vastatrix*. Genet. Mol. Res. 7(4):1186-1192.

- Cristancho, AM; Escobar, OC; Ocampo, JD. 2007. Evolución de razas de *H. vastatrix* en Colombia. Cenicafé 58(4):340-359.

- Cummins, GB; Hiratsuka, Y. 2003. Illustrated genera of rust fungi. 3rd ed., American Phytopathological Society (APS). St. Paul, Minnesota, USA. 223 p.

- de Vicente, MC; López, C; Fulton, T. (eds.). 2004. Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje Volumen 2. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia. Consultado 4 nov. 2016. Disponible en https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_2_es.pdf

- Deusdedit, LK; Shazia, OWM; Mamiro, R; Mamiro, D. 2013. Races of *Hemileia vastatrix* and Variation in Pathogenicity of *Colletotrichum kahawae* Isolates to Compact Coffee Genotypes in Tanzania. Journal of Plant Studies 2(2):95-104. ISSN 1927-0461 E-ISSN 1927-047X.

- Diario Gestión. 2015. “Producción de café cayó en 37% en los tres últimos años, informó la CCL”. Gestión, Lima, Perú, 30 mar. Consultado 7 oct. 2016. Disponible en <http://gestion.pe/economia/produccion-cafe-cayo-37-tres-ultimos-anos-informo-ccl-2127666>

- Domínguez, JC. 2015. Estructura y diversidad genética de las poblaciones de topillo campesino (*Microtus arvalis*) en España. Trabajo de Fin de Master, Universidad Castilla - La Mancha, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC). Consultado 7 oct. 2016. Disponible en https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/7221/TFM_JULIO%20DOMINGUEZ%20VILLASE%20C3%91OR.pdf?sequence=1

- EPPO GLOBAL DATA BASE. 2016. *Hemileia vastatrix* HEMIVA distribution. Consultado 17 mar. 2016. Disponible en <https://gd.eppo.int/taxon/HEMIVA/distribution>

- Excoffier, L; Smouse, PE; Quattro, JM. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics 131:479-491.

- Fernandes, RC; Evans, HC; Barreto, RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology 34(2):108-113.

- García, D; Cañon, DJ. 2008. Diversidad Genética y Establecimiento de prioridades en esquemas de conservación. Ejemplo de aplicación en la raza de Lidia. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid. 159 p.

- Gardes, M; White, TJ; Fortin, JA; Bruns, TD; Taylor, JW. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Canadian Journal of Botany 69(1):180 - 190. doi:10.1139/b91-026.

- Gardes, M; Bruns, TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118.

- Goodwin, DC; Lee, SB. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques* 15:438-444. Consultado 15 mar. 2016. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8217156>

- Gopalkrishnan, KS. 1951. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. *Mycologia* 43(3):271-283. doi:10.2307/3755591.

- Gouveia, MMC; Ribeiro, A; Várzea, VMP; Rodrigues Junior, CJ. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia* 97(2):396-404.

- Grube, M; Kroken, S. 2000. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycological Research* 104(11):1284-1294.

- Guerra-Guimarães, L; Tenente, R; Pinheiro, C; Chaves, I; Silva, MCD; Cardoso, FM; Planchon, S; Barros, DR; Renaut, J; Ricardo, CP. 2015. Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Frontiers in Plant Science* 6. Consultado 12 mar. 2016. Disponible en <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00478/full>

- Herrera, JC; Alvarado, AG; Cortina, HA; Combes, MC; Romero, G; Lashermes, P. 2009. Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica* 167(1):57-67. doi:10.1007/s10681-008-9860-9.

- Hibbett, DS; Vilgalys, R. 1991. Evolutionary relationships of Lentinus to the Polyporaceae: evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* 83:425–439.

- Hocking, D; Freeman, GH. 1968. Fungicides for Arabica coffee, 17: Relationships among some new fungicides, leaf rust (*Hemileia vastatrix*), leaf fall and yield. *Tropical Agriculture* 45(2):141-145.

- INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual, Perú). 2011. Dirección de Signos Distintivos, Resolución N° 003917 – 2011/DSD-INDECOPI, Expediente N° 371469-2008. Lima, Perú, 18 mar. 17 p. Consultado 7 oct. 2016. Disponible en https://www.indecopi.gob.pe/documents/20795/198944/7+R07_003917-2011-DSD_CafeMachuPicchuHuadquina.pdf/ecbbeb2b-9dd0-4f8e-9e8b-82e40ccbd3b1

- Korabecna, M. 2007. The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, p. 783-787.

- Kushalappa, AC; Eskes, AB. 1989. Advances in coffee rust research. *Ann. Rev. Phytopathol* 27:503-531.

- Lee, SB; Taylor, JW. 1992. Phylogeny of five fungus-like protist Phytophthora species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9(4):636–653.

- Maia, TA; Zambolim, EM; Caixeta, ET; Mitzubuti, ESG; Zambolim, L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology* 42:533-542.

- Márquez, F; Aguilar, D. 2013. Severidad en planta de café (*Coffea Arabica* L.) causada por *Hemileia vastatrix* B. en la Convención – Cusco – Perú. *In* Aragón, L (ed.). XXII Congreso Peruano y XVII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Lambayeque – Perú. p. 32.

- Mayne, WW. 1932. Physiological specialization of *Hemileia vastatrix*. Nature 129:510.
- McCain, JW; Hennen, JF. 1984. Development of the uredinal thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. Phytopathology 74(6):714-721.
- Medlin, L; Elwood, HJ; Stickel, S; Sogin, ML. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene 71:491-499.
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego, Perú). 2003. Caracterización de las zonas cafetaleras en el Perú. PROAMAZONIA. 136 p. Informe final de agosto.
- Mullis, KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am. Apr, 262(4):56-61, 64-5.
- Mullis, KB; Faloona, F; Scharf, S; Saiki, R; Horn, G; Erlich, H.1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold. Spring. Harb. Symp. Biol. 51 Pt 1:263-273
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivision populations. Proceedings of the national academy of sciences, USA 70, p. 3321-3.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 512 p.
- Nei, M; Li, WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(10):5269-5273.
- Nunes, CC; Maffia, LA; Mizubuti, ESG; Brommonschenkel, SH; Silva, JC. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. Australasian Plant Pathology Society 38:445-452.

- Nutman, FJ; Roberts, FM; Clarke, RT. 1963. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Transactions of the British Mycological Society. 46(1):27-48.
- Nutman, FJ; Roberts, FM. 1970. Coffee Leaf Rust. PANS (Pest Articles & News Summaries) 16(4):607-624.
- Piñero, D; Barahona, A; Eguiarte, L; Rocha, A; Salas, R. 2008a. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. In Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, p. 415-435.
- Piñero, D; Brush, SB; Zizumbo-Villarreal, D. 2008b. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, p. 437-494.
- Rayner, RW. 1961. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br). Annals of Applied Biology 49(3):497-505.
- Rodrigues Junior, CJ; Bettencourt, AJ; Rijo L. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Annual Review Phytopathology 13:49-70.
- Rozas, J; Librado, P; Sánchez-DelBarrio, JC; Messeguer, X; Rozas, R. 2010. DNAsp version 5.10. 1 (Self-extracting file of 4.6 Mb). Consultado 15 mar. 2016. Disponible en <http://www.ub.edu/dnasp/>
- Sambrook, J; Russell, W. 2001. Molecular Cloning; A laboratory Manual. 3th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2100 p.
- Schieber, E. 1970. Viaje al Brasil y el África para estudiar y observar el problema de la herrumbre del café. Rept. Org. Int. Reg. San. Agr. 109 p.

- Schieber, E. 1975. Observaciones comparativas de la roya del café en los hemisferios oriental y occidental. *In* Simposio sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk & Br) IICA zona norte, Mexico, p. 18-38
- Schieber, E; Zentmeyer, GA. 1984. Coffee rust in the western hemisphere. *Pl. Dis.* 68:89-93.
- Silva, DG. 2000. Levantamento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e resistência de clones de *coffea canephora* var. conillon à ferrugem. Tesis Doctoral, Universidade Federal de Viçosa, Brazil. p. 20,21.
- Silva-Acuña, R; Zambolim, L; Pérez, E. 1997. Identificación de razas fisiológicas de la roya del cafeto en el estado Táchira, Venezuela. *Bioagro* 9(3):95-98.
- Silva, MCD; Várzea, V; Guerra-Guimarães, L; Azinheira, HG; Fernandez, D; Petitot, AS; Bertrand, B; Lashermes, P; Nicole, M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(1):119-147.
- Silva, MC; Nicole, M; Rijo, L; Geiger, JP; Rodrigues, CJ. 1999. Cytochemical aspects of the plant – rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra). - *Hemileia vastatrix* (race III). *International Journal of Plant Science*, 160(1):79-91.
- Slabbert, R; Prins, N; Brink, D. 2010. A microsatellite panel for triploid verification in the abalone *Haliotis midae*. *Afr. J. Mar. Sci.* 32:259-264.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis of DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Várzea, V; Marques, DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance. *In* Zambolim, L; Zambolim, EM; Várzea, VMP (eds.). Durable resistance to coffee leaf rust. Universidade Federal de Viçosa, Brasil, p. 53-74.

- Vieira, A; Talhinas, P; Loureiro, A; Thürich, J; Duplessis, S; Fernandez, D; Silva, MC; Paulo, OS; Azinheira, HG. 2012. Expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea Arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. Eur. J. Plant Pathol. 133(1):261–277.

- Ward, HM. 1882. On the morphology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (The fungus of the coffee disease of Ceylon). Quarterly Journal of Microscopical Science 22:1-11.

- Wellman, FL. 1975. Resumen de la difusión mundial de la roya del café. In Fernández, CE. Simposio sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). Organizado por el comité de Fitopatología Tropical de la American Phytopathological Society, publicación miscelánea N° 26 del IICA, México, p. 9-17.

- White, TJ; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, MA; Gelfand, DH; Sninsky, JJ; White, TJ. (eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, Academic Press, p. 315-322

- Woese, CR; Olsen, GJ. 1986. Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. Syst. Appl. Microbiol. 7:161-177.

- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15:323-354.

- Zambolim, L; Zambolim, EM; Várzea, VMP. 2005. Durable resistance to coffee leaf rust. Universidade Federal de Viçosa. 450 p.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de extracción y purificación de ADN

Quick-Start Protocol July G2015 QIAquick® Gel Extraction Kit The QIAquick Gel Extraction Kit (cat. nos. 28704 and 28706) can be stored at room temperature (15-25°C) for up to 12 month.

Notes before starting:

This protocol is for the purification of up to 10 µg DNA (70 bp to 10 kb).

The yellow color of Buffer QG indicates a pH ≤ 7.5. DNA adsorption to the membrane is only efficient at pH ≤ 7.5.

Add ethanol (96-100 %) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).

Isopropanol (100 %) and a heating block or water bath at 50 °C are required.

All centrifugation steps are carried out at 17,900 x g (13,000 rpm) in a conventional table-top microcentrifuge.

1. Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.
2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes Buffer QG to 1 volume gel (100 mg gel ~ 100 µL). The maximum amount of gel per spin column is 400 mg. For > 2% agarose gels, add 6 volumes Buffer QG.
3. Incubate at 50°C for 10 min (or until the gel slice has completely dissolved). Vortex the tube every 2-3 min to help dissolve gel. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose). If the color of the mixture is orange or violet, add 10 µL 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The mixture turns yellow.
4. Add 1 gel volume isopropanol to the sample and mix.

5. Place a QIAquick spin column in a provided 2 mL collection tube or into a vacuum manifold. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 1 min or apply vacuum to the manifold until all the samples have passed through the column. Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube. For sample volumes of >800 μ L, load and spin/apply vacuum again.
6. If DNA will subsequently be used for sequencing, in vitro transcription, or microinjection, add 500 μ L Buffer QG to the QIAquick column and centrifuge for 1 min or apply vacuum. Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube.
7. To wash, add 750 μ L Buffer PE to QIAquick column and centrifuge for 1 min or apply vacuum. Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube. Note: If the DNA will be used for salt-sensitive applications (e.g., sequencing, bluntended ligation), let the column stand 2-5 min after addition of Buffer PE. Centrifuge the QIAquick column in the provided 2 mL collection tube for 1 min to remove residual wash buffer.
8. Place QIAquick column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
9. To elute DNA, add 50 μ L Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or water to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. For increased DNA concentration, add 30 μ L Buffer EB to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min. After the addition of Buffer EB to the QIAquick membrane, increasing the incubation time to up to 4 min can increase the yield of purified DNA.
10. If purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel.

Anexo 2: Medios de cultivo LB para *E. coli*

Composición para la preparación de un litro de medio de cultivo LB

Componentes	Medio líquido LB (g)	Medio sólido LB (g)
Triptona	10	10
Extracto de levadura	5	5
NaCl	10	10
Agar	-	15
Agua destilada	Hasta 1 litro	Hasta 1 litro

Anexo 3: Protocolo de aislamiento y purificación del plásmido

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

www.promega.com

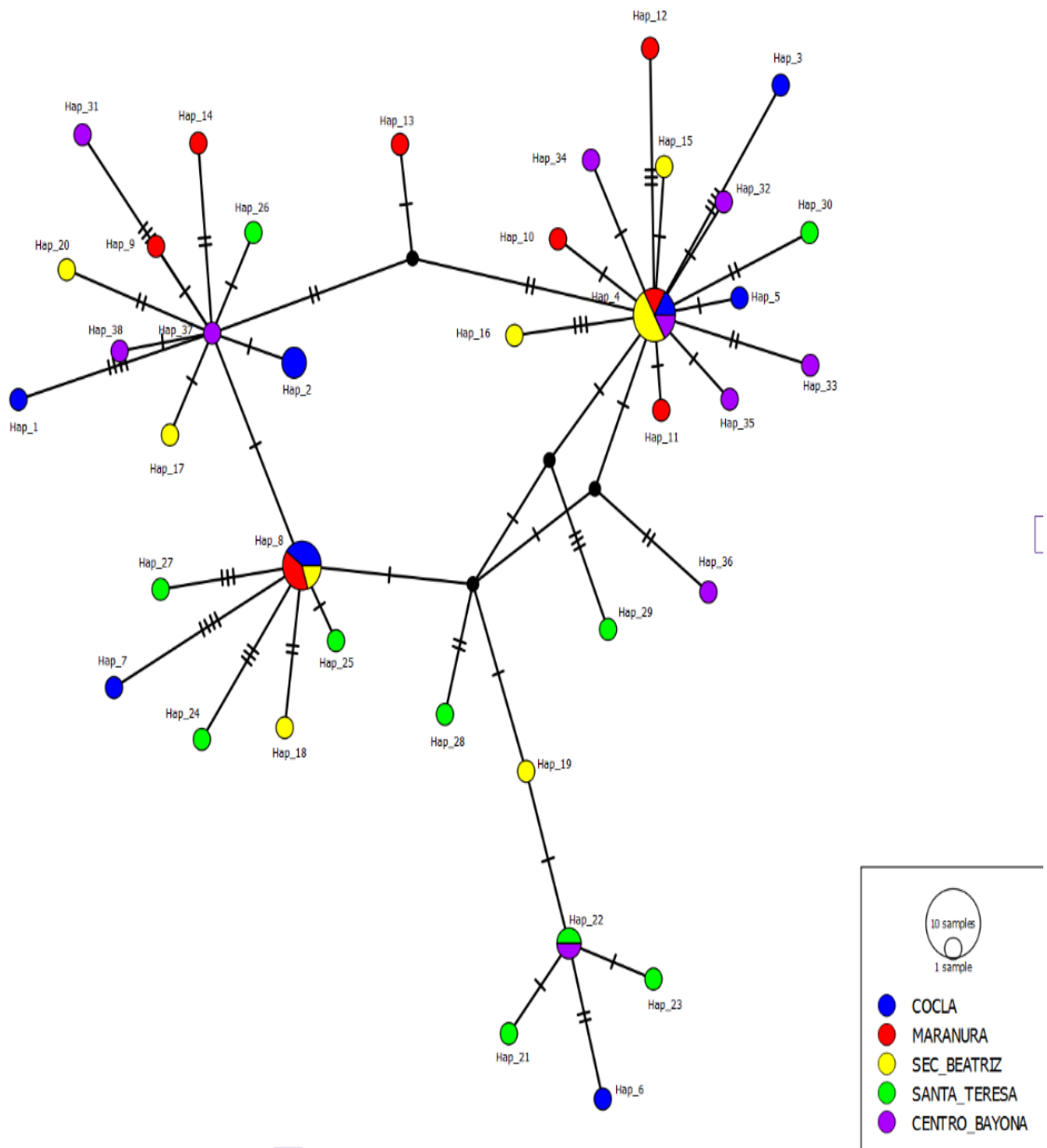
Centrifugation Protocol

Production of Cleared Lysate

1. Pellet 1-10mL of overnight culture for 5 minutes.
2. Thoroughly resuspend pellet with 250 μ L of Cell Resuspension Solution.
3. Add 250 μ L of Cell Lysis Solution to each sample; invert 4 times to mix.
4. Add 10 μ L of Alkaline Protease Solution; invert 4 times to mix. Incubate 5 minutes at room temperature.
5. Add 350 μ L of Neutralization Solution; invert 4 times to mix.
6. Centrifuge at top speed for 10 minutes at room temperature. Binding of Plasmid DNA
7. Insert Spin Column into Collection Tube.
8. Decant cleared lysate into Spin Column.
9. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature. Discard flow through, and reinsert Column into Collection Tube. Washing
10. Add 750 μ L of Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at top speed for 1 minute. Discard flow through and reinsert column into Collection Tube.
11. Repeat Step 10 with 250 μ L of Wash Solution.
12. Centrifuge at top speed for 2 minutes at room temperature. Elution
13. Transfer Spin Column to a sterile 1.5 mL microcentrifuge tube, being careful not to transfer any of the Column Wash Solution with the Spin Column. If the Spin Column has Column Wash Solution associated with it, centrifuge again for 1 minute at top speed, then transfer the Spin Column to a new, sterile 1.5 mL microcentrifuge tube.
14. Add 100 μ L of Nuclease-Free Water to the Spin Column. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature.
15. Discard column, and store DNA at -20 °C or below.

Anexo 5: Red de haplotipos de *Hemileia vastatrix*.

Los círculos corresponden a los haplotipos detectados y los colores a las zonas productoras de café de Quillabamba. El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo y los segmentos transversales sobre las líneas señalan el número de nucleótidos de diferencia entre parejas. Los nodos (círculos negros) representan a los haplotipos no muestreados.



Anexo 6: Agrupación de secuencias en haplotipos

Haplotipos	Frecuencia	Secuencias ITS
Hap_1	1	HVQ_1.1
Hap_2	2	HVQ_1.2 HVQ_1.5
Hap_3	1	HVQ_1.3
Hap_4	6	HVQ_1.4 HVQ_2.10 HVQ_3.3 HVQ_3.5 HVQ_3.10 HVQ_5.9
Hap_5	1	HVQ_1.6
Hap_6	1	HVQ_1.7
Hap_7	1	HVQ_1.8
Hap_8	5	HVQ_1.9 HVQ_1.10 HVQ_2.2 HVQ_2.7 HVQ_3.1
Hap_9	1	HVQ_2.1
Hap_10	1	HVQ_2.4
Hap_11	1	HVQ_2.5
Hap_12	1	HVQ_2.6
Hap_13	1	HVQ_2.8
Hap_14	1	HVQ_2.9
Hap_15	1	HVQ_3.2
Hap_16	1	HVQ_3.4
Hap_17	1	HVQ_3.6
Hap_18	1	HVQ_3.7
Hap_19	1	HVQ_3.8
Hap_20	1	HVQ_3.9
Hap_21	1	HVQ_4.1
Hap_22	2	HVQ_4.6 HVQ_5.6
Hap_23	1	HVQ_4.10
Hap_24	1	HVQ_4.2
Hap_25	1	HVQ_4.4
Hap_26	1	HVQ_4.5
Hap_27	1	HVQ_4.9
Hap_28	1	HVQ_4.7
Hap_29	1	HVQ_4.3
Hap_30	1	HVQ_4.8
Hap_31	1	HVQ_5.1
Hap_32	1	HVQ_5.2
Hap_33	1	HVQ_5.3
Hap_34	1	HVQ_5.4
Hap_35	1	HVQ_5.5
Hap_36	1	HVQ_5.7
Hap_37	1	HVQ_5.8
Hap_38	1	HVQ_5.10

Anexo 7: Datos meteorológicos del SENAMHI

Estación: QUILLABAMBA (000606-M)

Departamento: CUSCO / Provincia: LA CONVENCION / Distrito: SANTA ANA

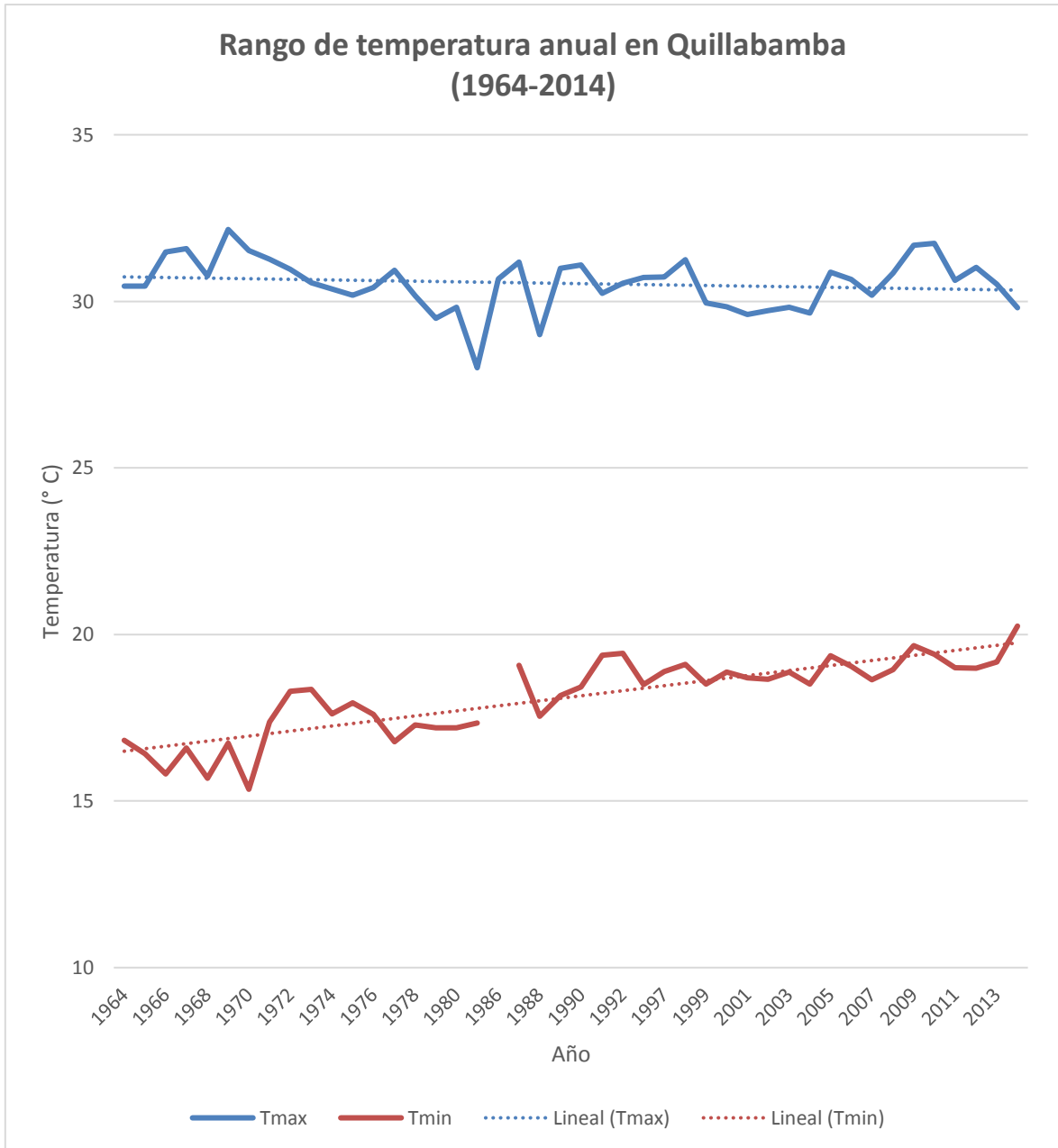
Latitud: -12.85611111 / Longitud: -72.69194444 / Altitud: 990 msnm

Año	Humedad relativa (%)	Temperatura máxima (C°)	Temperatura mínima (C°)
1964	66.386705	30.452304	16.8231183
1965	71.442144	30.4574	16.413686
1966	73.539229	31.479028	15.8148144
1967	71.718929	31.581837	16.5963307
1968	72.186369	30.760619	15.686514
1969	72.062468	32.156622	16.7322786
1970	74.16491	31.530602	15.3526298
1971	72.137286	31.271646	17.3700582
1972	71.824705	30.956002	18.3014349
1973	74.706696	30.559254	18.3586802
1974	72.393228	30.377162	17.6160023
1975	72.428181	30.188214	17.9546838
1976	72.214631	30.411348	17.6037554
1977	73.034863	30.926418	16.7782079
1978	74.462752	30.165809	17.2780383
1979	75.410662	29.487284	17.1998835
1980	75.825561	29.826178	17.1996283
1981	83.816563	28.005312	17.3448018
1986	78.041011	30.678625	-
1987	78.050614	31.17372	19.0787977
1988	85.568464	29.002622	17.5429924
1989	77.368089	30.987957	18.1608602
1990	80.587679	31.091772	18.4249728
1991	81.401888	30.246919	19.3774209
1992	80.698405	30.538771	19.44118
1996	75.058478	30.719012	18.4965188
1997	82.622011	30.729971	18.880585
1998	79.445526	31.244542	19.0986226
1999	75.860009	29.955361	18.5150371
2000	78.656625	29.838368	18.8661964
2001	78.270783	29.603742	18.6918126
2002	77.33587	29.722389	18.6529954
2003	77.772776	29.817501	18.8673353

Continuación...

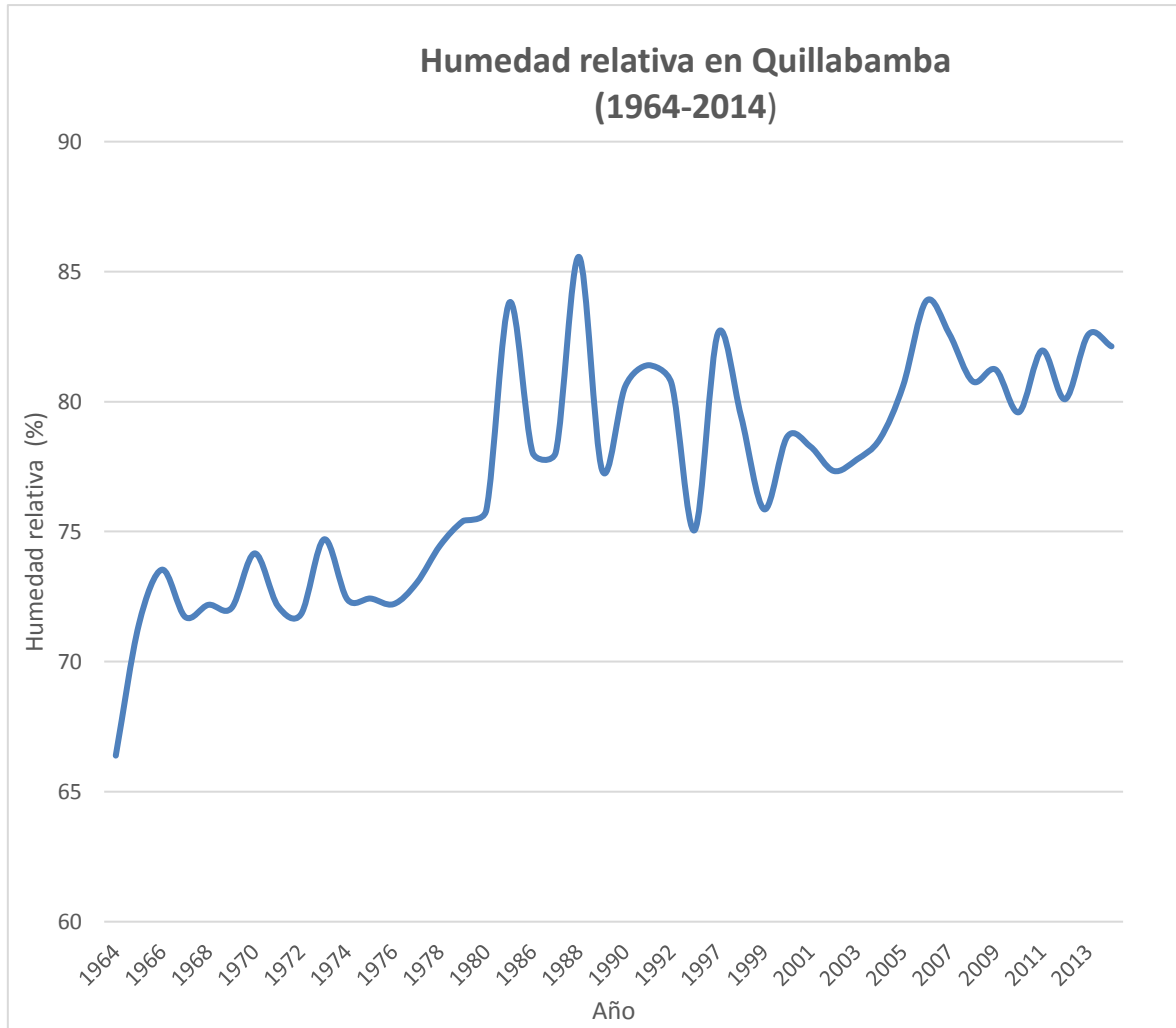
Año	Humedad relativa (%)	Temperatura máxima (C°)	Temperatura mínima (C°)
2004	78.567943	29.647041	18.5051409
2005	80.610974	30.873847	19.3588198
2006	83.874234	30.657097	19.0408717
2007	82.599483	30.181	18.6343877
2008	80.782478	30.843671	18.9487925
2009	81.230426	31.680038	19.6657687
2010	79.594303	31.746567	19.4094809
2011	81.967514	30.635475	19.0013671
2012	80.095036	31.015022	18.9882075
2013	82.581328	30.508612	19.1801792
2014	82.126197	29.809677	20.2516129

Anexo 8: Rango de temperatura anual en Quillabamba (1964-2014)



FUENTE: Elaboración propia en base a datos del SENAMHI

Anexo 9: Porcentaje de humedad relativa anual en Quillabamba (1964-2014)



FUENTE: Elaboración propia en base a datos del SENAMHI