

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO
DE PLANTAS**



**“RESISTENCIA A LA ROYA AMARILLA (*Hemileia vastatrix* Berk. &
Broome) EN EL CAFÉ (*Coffea spp.*) A TRAVÉS DE ESTUDIOS
MOLECULARES”**

Presentada por:

CINTHIA SHEILA QUISPE APAZA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

Lima – Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

**“RESISTENCIA A LA ROYA AMARILLA (*Hemileia
vastatrix* Berk. & Broome) EN EL CAFÉ (*Coffea spp.*) A
TRAVÉS DE ESTUDIOS MOLECULARES”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

CINTHIA SHEILA QUISPE APAZA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Rosa Espejo Joya
PRESIDENTE

Dr. Raúl Humberto Blas Sevillano
PATROCINADOR

Mg. Sc. María De Lourdes Tapia y Figueroa
MIEMBRO

Mg. Sc. César López Bonilla
MIEMBRO

Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego
COPATROCINADOR

DEDICATORIA

Con mucho amor:

*A mis padres y hermanos por su invaluable apoyo
y sabios consejos*

*A mi esposo, por su apoyo en la realización de la
presente tesis.*

*A mi hija, 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 Dr. Raúl Blas Sevillano por sus valiosos consejos y recomendaciones.

A los Miembros del Jurado Dra. Rosa Espejo Joya, Mg. Sc. César López Bonilla y Mg.Sc. María De Lourdes Tapia y Figueroa, por su entera disposición y asesoramiento.

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

A los integrantes 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 y Villa Rica, por facilitar el material biológico e información para este estudio.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Café (<i>Coffea spp.</i>).....	3
2.1.1. Origen del Café.....	3
2.1.2. Clasificación taxonómica.....	4
2.1.3. Morfología.....	5
2.1.4. Variedades de café arábico.....	7
2.1.5. Resistencia vegetal a enfermedades.....	9
2.1.6. Resistencia genética en café.....	11
2.1.7. Marcadores moleculares.....	11
2.1.8. Iniciadores asociados a la resistencia a la roya amarilla en el café.....	12
2.2. La roya amarilla del café (<i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Broome).....	15
2.2.1. Origen y distribución.....	16
2.2.2. Taxonomía de la roya amarilla del café.....	18
2.2.3. Sintomatología.....	19
2.2.4. Ciclo de vida.....	20
2.2.5. Variabilidad genética.....	22
2.2.6. Región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Ubicación del área de estudio.....	25
3.2. Material biológico.....	25
3.2.1. Café (<i>Coffea spp.</i>).....	25
3.2.2. Roya (<i>Hemileia vastatrix</i> Berk & Broome).....	27
3.3. Metodología.....	29
3.3.1. Identificación de la resistencia a la roya amarilla en los cafetos procedentes de dos Regiones productoras de café en el Perú mediante el uso de marcadores moleculares	29
3.3.2. Diversidad genética de la roya amarilla existente en la zona cafetalera de Quillabamba y Villa Rica.....	32
3.3.3. Análisis de datos.....	33

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	36
4.1. Identificación de la resistencia a la roya amarilla en los cafetos procedentes de dos Regiones productoras de café en el Perú mediante el uso de marcadores moleculares.....	36
4.1.1. Extracción, calidad y cuantificación del ADN genómico de café.....	36
4.1.2. Amplificación de Marcadores Moleculares.....	37
4.2. Diversidad genética de la roya amarilla existente en la zona cafetalera de Quillabamba y Villa Rica.....	46
4.2.1. Extracción, calidad y cuantificación del ADN genómico de la roya amarilla.....	46
4.2.2. PCR y Secuenciación.....	46
4.2.3. Análisis de la diversidad Genética.....	46
4.3. Estrategia de un método de mejoramiento genético en café.....	59
V. CONCLUSIONES.....	63
VI. RECOMENDACIONES.....	64
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
VIII. ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Datos de pasaporte de cultivares de café procedentes de dos zonas productoras de café en el Perú.....	26
Cuadro 2:	Descripción general de los cafetos procedentes de dos zonas productoras de café en el Perú utilizados en la evaluación de marcadores moleculares relacionados a la resistencia a la roya amarilla.....	27
Cuadro 3:	Información georreferenciada de los fundos en los que se muestrearon las pústulas de <i>Hemileia vastatrix</i> de dos zonas cafetaleras del Perú y los bulks generados.....	28
Cuadro 4:	Lista de los iniciadores asociados a regiones de DNA relacionados con la resistencia a la roya amarilla del café.....	29
Cuadro 5:	Distribución de los alelos del marcador Sat 225 en una población de 25 accesiones de cafetos de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica.....	45
Cuadro 6:	Valores de los parámetros obtenidos sobre las medidas descriptivas de la variabilidad de las secuencias de la región ITS para las zonas productoras de Quillabamba y Villa Rica	49
Cuadro 7:	Información de los haplotipos, su frecuencia dentro de las diferentes zonas de origen y las secuencias que los conforman.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** *Coffea* subgen. *Coffea*. A: Hoja, B: Domacio, C: Inflorescencia, D: Inflorescencia (mostrando el Cáliz y la flor), E: Inflorescencia mostrando lóbulos de los cálculos y el cáliz, F: Detalle foliar del tercer lóbulo foliar de cálculo, G: flores y H: Fruto. (Dibujado por Lucy T. Smith). Fuente: David et al., 2006.....6
- Figura 2.** Uredosporas de *Hemileia vastatrix* en un microscopio electrónico de barrido, mostrando paredes lisas y paredes equinuladas con espinas cónicas sobre la estoma de hoja. Fuente: SENASICA, 2018.....15
- Figura 3.** Distribución de *Hemileia vastatrix* a nivel mundial. Fuente: Schieber y Zentmeyer, 1984.....17
- Figura 4.** Distribución de *Hemileia vastatrix* en Sudamérica. Fuente: Schieber y Zentmeyer, 1984.....18
- Figura 5.** Fotografías de hojas (A) y cotiledones (B) de café mostrando síntomas de infección por *H. vastatrix*. Fuente: Elaboración propia.....20
- Figura 6.** Interacción de plantas de café con *Hemileia vastatrix* 1E: Uredosporas (U), apresorio (A) sobre el estoma y penetración de la hifa; 24 horas después de la inoculación (x800). 1F: Apresorio (A) sobre la estoma y un ancla, 48 horas después de la inoculación (x650). 1G: Apresorio (A) Apresorio sobre la estoma y una hifa intracelular con haustorio en células subsidiarias, 72 horas después de la inoculación (x650). Fuente: (Silva et al., 2006).....21
- Figura 7.** Esquema de la disposición del ADNr 18S, 5.8S y 28S en tándem; ITS: espaciador transcribible interno. Fuente: elaboración propia.....24
- Figura 8.** Mapa de ubicación de las zonas de procedencia de la roya amarilla en el Perú.....25
- Figura 9.** Gel de agarosa al 1% mostrando fragmentos de ADN genómico de café.....36
- Figura 10.** Gel de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación de aproximadamente 440 pb, amplificados con el par de iniciadores CARF 005, los cuales estuvieron presentes tanto en genotipos resistentes como en susceptibles.....37
- Figura 11.** Gel de agarosa al 2% sin presencia de producto de amplificación para los iniciadores M19 y 20.....38

Figura 12.	Gel de agarosa al 2% mostrando bandas de ADN monomórficos de 380 pb tanto en variedades resistentes como en susceptibles y una banda de ADN heteromórfica de 290 pb solo para <i>C. canephora</i> . Amplificados con los iniciadores SAT 244. Nomenclatura: R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular.....	39
Figura 13.	Gel de agarosa al 2% donde se observan bandas de ADN monomórficas de 175 pb y 190 pb aproximadamente amplificados con los iniciadores Sat 229. Nomenclatura: R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular.....	41
Figura 14.	Gel de agarosa al 2% donde se observa bandas de ADN de 350 pb y 400 pb que caracterizan a las variedades resistentes y bandas de ADN de 330 pb y 390 pb para las variedades susceptibles, amplificados con los iniciadores Sat225. Nomenclatura: R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular.....	42
Figura 15.	Gel de agarosa al 2%, en los que se muestran los fragmentos amplificados con el marcador Sat225 en una población de 25 accesiones de cafetos peruanos. R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular.....	43
Figura 16.	Gel de agarosa al 1% mostrando fragmentos de ADN del genoma de <i>Hemileia vastatrix</i>	46
Figura 17.	Gel de agarosa al 1% mostrando la región ITS (fragmento de ADN de interés)	47
Figura 18.	Gel de agarosa al 1.5% mostrando fragmentos de ADN de interés con aproximadamente 1100 pb que corresponden a la región ITS de <i>H. vastatrix</i> , además se muestran los controles positivos y negativos.....	47
Figura 19.	Gel de agarosa al 1.5% mostrando fragmentos de ADN de aproximadamente 700 y 400 pb que corresponden a la región ITS, que presenta una región de reconocimiento para la enzima de digestión Eco RI.....	48
Figura 20.	Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 68 haplotipos detectados para la región ITS de <i>Hemileia vastatrix</i> de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos perdidos o no muestreados están representados por nodos de color negro.....	54

- Figura 21.** Red haplotípica por el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 73 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y del CIFIC. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos no muestreados están representados por nodos de color negro.....58
- Figura 22.** Esquema de retrocruza para piramidación de genes. Fuente: Joshi and Nayak. (2008).....62

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.	Protocolo de extracción de ADN, empleando el método de CTAB de Doyle y Doyle (1990).....	77
ANEXO 2.	Protocolo de extracción del ADN de <i>Hemileia vastatrix</i> según Cristancho et al. (2005).....	78
ANEXO 3.	Protocolo de purificación de “QIAquick gel extracción Kit” de QIAGEN.....	79
ANEXO 4.	Protocolo de Ligación del producto de PCR en el vector pGemT-Easy vector.....	80
ANEXO 5.	Clonación del fragmento de ADN de la región ITS.....	81
ANEXO 6.	Protocolo de purificación del Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification Kit de Promega.....	82
ANEXO 7.	Protocolo de digestión del plásmido bacteriano.....	85
ANEXO 8.	Concentración del ADN de roya amarilla en ng/μL.....	86
ANEXO 9.	Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de <i>H. vastatrix</i> , los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC.....	87

RESUMEN

Las técnicas moleculares vienen siendo muy utilizadas en programas de mejoramiento genético del café para la identificación de fuentes de resistencia a la roya amarilla, sin embargo, debe ser considerado el estudio de la estructura y evolución de las poblaciones del hongo, con la finalidad de determinar el tipo de estrategia de mejoramiento genético que debe utilizarse para la generación de nuevas variedades de cafetos resistentes a esta enfermedad. Por lo tanto, en un grupo de genotipos resistentes y susceptibles se han evaluado mediante PCR los marcadores moleculares CARF 005, M 19, M20, Sat244, BA-124-12K-f, Sat225 y Sat229; los cuales han sido reportados por estar relacionados a algún factor de resistencia a la roya amarilla. Además, se realizó estudios moleculares para determinar la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de las zonas cafetaleras de Quillabamba (Cusco) y Villa Rica (Pasco), mediante secuenciación de las Regiones espaciadoras internas transcritas (ITS) del ADN ribosomal. Para el análisis poblacional de *H. vastatrix* se calcularon los índices de diversidad genética y se construyó una red de haplotipos. De los marcadores moleculares analizados en el café, solamente Sat225 amplificó patrones diferentes entre las variedades resistentes y susceptibles. Mediante el análisis poblacional de la roya, se determinó que ambas regiones productoras presentaron valores altos de diversidad genética, sin embargo, la zona de cafetalera de Quillabamba albergó la mayor diversidad de *H. vastatrix* ($H_d = 0.977 \pm 0.012$). La red de haplotipos permitió evidenciar las principales diferencias entre las royas, revelando una población grande indiferenciada con presencia de haplotipos ancestros a partir de la cual se fueron generando nuevas variantes del hongo. Asimismo, se determinó que las royas peruanas evaluadas en el presente estudio son muy similares en su secuencia de DNA a las royas colombianas. Debido a la presencia de una baja fuente de resistencia y la alta variabilidad del patógeno se debe considerar la incorporación de resistencia multigénica.

Palabras claves: Café, roya amarilla, Perú, Colombia, resistencia, marcadores moleculares

ABSTRACT

Molecular markers are very useful in breeding programs for resistance sources identification in coffee cultivars to yellow rust improvement, however, the structure and evolution of the fungus's populations must be considered to determine the type of breeding strategy that will be used in the generation of new resistant coffee trees varieties to this disease. Therefore, in a group of resistant and susceptible coffee plants has been evaluated by PCR the molecular markers CARF 005, Sat244, BA-124-12K-f, Sat225 and Sat229, which has been reported to be related to some resistance factor to yellow rust. In addition, molecular studies have been performed to determine the genetic diversity of *Hemileia vastatrix* in coffee growing areas of Quillabamba and Villa Rica by sequencing the internal transcribable regions (ITS) of the ribosomal DNA. Analysis of *Hemileia vastatrix* populations have been made, using genetic diversity indices and to determine the similarities between the populations, haplotype network has been built. From molecular markers analyzed, only Sat225 amplified different patterns between resistant and susceptible varieties of coffee plants from Quillabamba (Cusco) and Villa Rica (Pasco). Yellow rust population analysis, it has been determined that the two producing regions showed high levels of genetic diversity, however, the area of Quillabamba hosted the greatest diversity of *H. vastatrix* ($H_d = 0.977 \pm 0.012$). Haplotype network Survey revealed major differences between rust, evidencing a large undifferentiated population ($P_i = 0.00409 \pm 0.00024$ in) with the presence of haplotypes ancestors from which they were generating new variants of the fungus. Also, it is determined that the Peruvian yellow rusts evaluated in this study are very similar to DNA sequences of Colombian rust ($P_i = 0.00351 \pm 0.00022$), due to the presence of a low resistance source and the high variability of the pathogen, it should consider implementing a breeding program whit incorporating multigene resistance.

Keywords: Coffee, yellow rust, Peru, Colombia, resistance, molecular markers

I. INTRODUCCIÓN

El café (*coffea spp.*) es uno de los principales productos de agroexportación del Perú, ascendiendo su área de cultivo a 361 671 hectáreas en los que se producen 222 047 toneladas métricas. Siendo sus principales regiones productoras, Cajamarca, Amazonas, Junín, Cusco y San Martín (MINAGRI, 2015).

El café peruano proviene en un 95 % de cultivares de *Coffea arabica* (JNC, 2014) que se caracterizan por su alta calidad en taza, sin embargo, son extremadamente susceptibles a la enfermedad de la roya amarilla, cuyo agente causal es el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome (Berkeley, 1869). Esta enfermedad, es considerada como una de las principales amenazas para el desarrollo de este cultivo a nivel mundial, provoca severas defoliaciones y pérdidas sustanciales en su producción (Silva et al., 2000). El primer reporte de *H. vastatrix* en el Perú se realizó en la Región Junín en el año 1979 (Scheiber y Zentmyer, 1984), sin embargo, su mayor incidencia ocurrió en el año 2013 que ocasionó pérdidas que alcanzaron el 27 % de la producción (INEI, 2014).

Existen dos enfoques para hacer frente a esta enfermedad, el primero está basado en el uso de fungicidas, que si no son bien utilizados no dan buenos resultados, pero además, incrementan el costo de la producción haciéndolo menos rentable y difícil de ser utilizados en la agricultura orgánica; el segundo, es a través, del uso de variedades resistentes, siendo esta alternativa mucho más económica y amigable con el medio ambiente, sin embargo, requiere del conocimiento de las fuentes de resistencia presentes en los genotipos parentales utilizados en el mejoramiento, así como, de la diversidad del patógeno.

En los programas de mejoramiento genético del café se están utilizando como genotipos parentales a accesiones provenientes del Híbrido Timor, los cuales se caracterizan por presentar resistencia a todas las razas de *H. vastatrix* conocidas, y es por ahora la principal fuente de resistencia a la enfermedad (Romero et al., 2014; Pestana et al., 2015; Herrera et al., 2009) reportándose hasta la fecha al menos cinco factores de resistencia (SH5, SH6, SH7, SH8 y SH9) (Rodríguez Jr. et al., 2000; Bettencourt 1981).

A través de los estudios de la herencia y mapeo de los factores de resistencia, se han identificado marcadores asociados a la resistencia, los cuales podrían ser utilizados durante procesos de selección en los programas de mejoramiento genético del café (Herrera et al., 2009; Romero et al., 2014; Brito et al., 2010; Diola et al., 2011 y Pestana et al., 2015). Uno de los primeros trabajos fue el realizado por Prakash et al. (2004), quienes identificaron 21 marcadores AFLP ligados al gen SH3. Posteriormente Mahe et al. (2008) identificó marcadores SSR asociados al SH3, en esa misma línea, Lashermes et al. (2010) hallaron la secuencia completa de una región del cromosoma que contenía al gen SH3. Además, en estudios realizados por Herrera et al. (2009) identificaron siete marcadores (cinco AFLPs y dos SSR) asociados a la resistencia parcial a la roya amarilla del café. Por su parte, Brito et al. (2010) identificó tres marcadores AFLP los cuales se encontraban flanqueando al gen de resistencia a la raza II de *H. vastatrix*, posteriormente Diola et al. (2011), identificó seis marcadores SCAR los cuales permitieron disminuir las distancias de 20.78 a 9.45 cM, confirmando la presencia de un único gen de efecto dominante, reportado también por Brito et al. (2010). Posteriormente Romero et al. (2014), identificó cuatro marcadores moleculares SSR estrechamente relacionados a resistencia a la enfermedad en el mismo material utilizado por Herrera et al. (2009). Finalmente, Pestana et al. (2015), identificó dos marcadores AFLPs asociados a resistencia a la raza II; tres marcadores AFLPS y EST-SSR asociados a la resistencia a la raza I y patotipo 001 de la roya amarilla.

En el Perú a pesar de la importancia del café en cifras para la economía nacional, aún no se han implementado programas de mejora genética, posiblemente por el elevado costo que demandaría la generación variedades en este cultivo, debido a su largo ciclo vegetativo, el poco conocimiento de las fuentes de resistencia y la baja incidencia de la roya amarilla por un largo periodo. Consecuentemente, existe escasez de investigaciones sobre las fuentes de resistencia a esta enfermedad presente en el café peruano, y más aún la ausencia de conocimientos sobre el patógeno. Por lo tanto, los objetivos de la tesis fueron, identificar la resistencia a la roya amarilla de los cafetos mediante el uso de marcadores moleculares, determinar la diversidad genética de la roya amarilla existente en las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica, y proponer una estrategia de mejoramiento genético para el cultivo de café en base a los estudios moleculares realizados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El café (*Coffea spp.*)

El café es uno de los principales cultivos en el mundo, y se siembra en alrededor de 80 países en las regiones tropicales y subtropicales (Pearl et al., 2004; Berthaud y Charrier, 1988). Perteneció al género *Coffea* que se encuentra dentro de la familia de las Rubiáceas. Hasta la fecha se han descrito 100 especies (Davis et al., 2008), sin embargo, la producción comercial a nivel mundial está representada por dos especies que tienen un gran impacto económico, *Coffea arabica* L. (Arabica) y *Coffea canephora* Pierre (Robusta) (Berthaud y Charrier, 1988, Herrera et al., 2002).

Coffea arabica es una especie tetraploide ($2n=4x=44$) autofertil, mientras que las demás especies del género *coffea* incluyendo *C. canephora* son diploides ($2n=2; x=22$) autoestériles. Su origen es el resultado de una hibridación interespecífica entre dos formas ancestrales diploides relacionadas con las especies actuales *C. eugenioides* y *C. canephora* (Lashermes et al., 1999), como resultado de la estabilización de dicho híbrido ancestral, se originó el alotetraploide actual *C. arabica* cuyo genoma está constituido por dos subgenomas poco diferenciados denominados Ca y Ea (Carvalho y Monaco, 1971).

Las variedades de café arábico se caracterizan por mostrar una gran uniformidad genética, atribuida a su origen alotetraploide reciente, a su naturaleza autógama y a la forma particular de dispersión que tuvo a partir de su centro de origen y como consecuencia, dichas variedades son susceptibles a muchas enfermedades y plagas que atacan al cultivo (Lashermes et al., 1996).

2.1.1 Origen del Café

La principal hipótesis sobre el origen del café es que tuvo lugar en Etiopía, país donde también se inició su cultivo (Anthony et al., 1999), esta hipótesis es sustentada por que actualmente el café arábico crece en forma silvestre en las áreas montañosas sobre los 1500 m.s.n.m. de este país y áreas vecinas de Sudán (Leon, 2000). Se estima que su cultivo se

inició a comienzos del siglo VIII, el cual se mantuvo como un monopolio de los árabes en las cercanías del mar Rojo hasta el siglo XV, con una fuerte expansión hacia Yemen (ex Arabia del Sur) en el siglo XIV, y hacia el Oriente Medio durante el siglo XV (Anthony et al., 1999).

Otra hipótesis señala que esta planta es de origen árabe, basándose en que el primer conocimiento del arbusto y la bebida se obtuvieron de Arabia, de ahí el nombre científico dado por Linneo (Sylvain, 1958). Yemen fue casi la exclusiva fuente de germoplasma de café durante la mayor parte de la historia registrada; sin embargo, no hay mayores razones para sugerir que *C. arabica* tuvo su origen en Yemen. La fecha en que el café se introdujo a Yemen, donde se ha cultivado durante cinco siglos, es desconocida (Aga, 2005); pero la propagación al Sur Este de Asia fue aproximadamente en el año 1700.

La primera introducción de café al continente americano se realizó a inicios del siglo XVIII, desde Ámsterdam hacia la Guyana Holandesa (hoy Surinam); y de París a la isla de Martinica en las Antillas, de donde en 1719 el cultivo se extendió rápidamente hacia la Guyana Francesa, y luego en 1727 hacia Brasil (Chevalier y Dagron 1928; Anthony et al., 1999). Los ingleses introdujeron plantas de café a Jamaica en 1730 y hacia finales del siglo XVIII (Anthony et al., 1999) e inicios del siglo XIX el cultivo se extendió por toda América tropical (León, 2000).

Según la JNC (2014), “los datos históricos registran la llegada de plantaciones de café a Lima en 1760 desde la ciudad de Guayaquil”, cuando ésta formaba parte del virreinato del Perú, sin embargo, dan cuenta de que ya existían algunas plantas en Huánuco, aunque sin fecha exacta, ni lugar de procedencia y sin saber quién las sembró por primera vez. Recientes descubrimientos apuntan al distrito de Chinchao de la provincia de Huánuco, como la zona donde comenzó a cultivarse el café entre 1740 y 1760.

2.1.2 Clasificación taxonómica

El género *Coffea* pertenece a la familia Rubiaceae y se divide en cuatro secciones: Argocoffea, Paracoffea, Mascarocoffea y Eucoffea, esta última se subdivide en cinco subsecciones: Erythrocoffea, Pachycoffea, Melanocoffea, Nanocoffea y Mozambicoffea. Las especies cultivadas *C. arabica* y *C. canephora* pertenecen a la primera subsección mientras que *C. liberica* y *C. dewevrii* pertenecen a la segunda (Chevalier, 1947).

Según Leroy (1980) y Davis et al. (2007) el café arábico se clasifica en:

División: Angiospermae

Clase: Eudicotyledoneae

Subclase: Asteridae

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Subfamilia: Ixoroideae

Tribu: Coffeae

Género: *Coffea*

Especie: *Coffea arabica* L.

2.1.3 Morfología

El cafeto es un arbusto que está formado por un tallo central en cuyo extremo se encuentra la “yema” terminal u ortotrópica”, que es la responsable del crecimiento vertical, formando nudos y entrenudos. De los nudos se generan las ramas laterales o bandolas que presentan un crecimiento plagiotrópico (Aga et al., 2003). A través de ambos tipos de crecimiento se conforma la arquitectura del cafeto, es decir su sistema vegetativo y productivo. Las hojas nacen en la parte terminal del tallo y en las ramas. Crecen en disposición opuesta, son de forma elíptica. Su tamaño, color y cantidad varía de acuerdo a la especie y variedad. La disposición floral del cafeto es distal, o sea, en grupos separados de yemas, que brotan en los nudos a lo largo de las ramas laterales. Cada flor tiene en la base un receptáculo corto que se prolonga en el cáliz, es de color verde y mide de uno a dos milímetros de largo. La corola es un tubo largo, cilíndrico en la base y de color blanco, que mide de seis a doce milímetros de largo, la cual se abre arriba en cinco pétalos. Consta de cinco estambres insertados en el tubo de la corola. El gineceo está constituido por un ovario súpero con dos óvulos. El estilo es fino y largo con terminaciones estigmáticas (Figura 1). Esta morfología floral permitiría la polinización cruzada natural, pero, sin embargo, *C. arabica* es en gran medida autógama, y la formación de frutos después de la autopolinización es de 60 por ciento o superior (Aga, 2005).

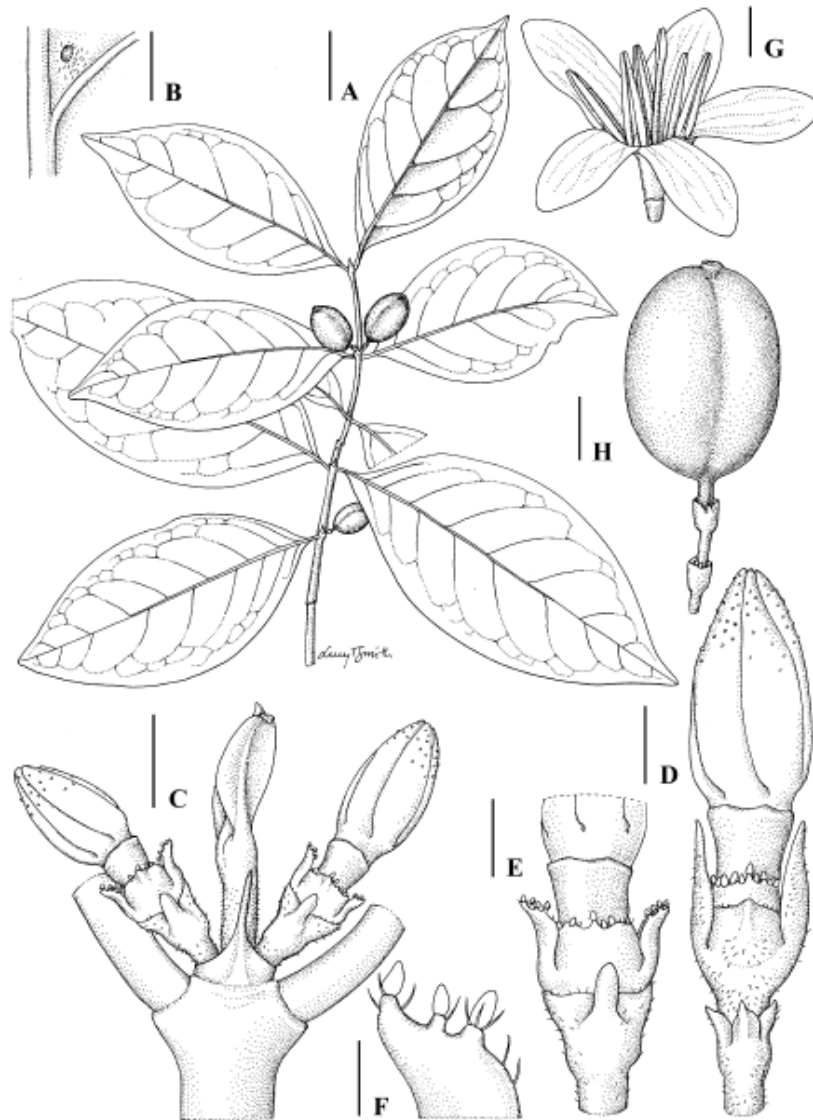


Figura 1. *Coffea* subgen. *Coffea*. A: Hoja, B: Domacio, C: Inflorescencia, D: Inflorescencia (mostrando el Cáliz y la flor), E: Inflorescencia mostrando lóbulos de los cálculos y el cáliz, F: Detalle foliar del tercer lóbulo foliar de caliculo, G: flores y H: Fruto. (Dibujado por Lucy T. Smith). Fuente: David et al., 2006.

El fruto es una drupa que generalmente contiene dos semillas con longitudes de diez a diecisiete milímetros. El fruto está formado por la pulpa (exocarpio y mesocarpio), el pergamino (endocarpio), la película plateada (testa), la semilla (endosperma) y el embrión (Aga, 2005). La dureza del endocarpo es para proteger a la semilla de las actividades enzimáticas digestivas de aves y mamíferos (Urbaneja et al., 1996). El grano de café se compone de un endosperma y un embrión pequeño incrustado en el extremo basal de la semilla. No hay dormancia en las semillas del café y su viabilidad se pierde normalmente en un plazo de tres a seis meses después de la cosecha (Aga, 2005). La semilla de café es

recalcitrante, pero es posible la preservación de la viabilidad por más de dos años y medio cuando poseen 41 por ciento de humedad y son almacenadas a 15°C (Van der Vossen, 1979).

2.1.4 Variedades de café arábico

El término variedad se usa para describir la diversidad de las especies cultivadas autógamas, a pesar de que en el Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas (ICNCP) se adoptó el término cultivar en reemplazo de variedad, en el café tradicionalmente aún se mantiene el término variedad. Este Código define al cultivar como un taxón que ha sido seleccionado por un atributo particular o combinación de atributos, que es claramente distinto, uniforme y estable en sus características y que cuando es propagado por medios apropiados mantienen sus características distintivas (Sevilla y Holle 2004).

Las variedades de café se diferencian por la longitud de la planta, el ángulo que existen entre las ramas y el tronco principal, el color del fruto, el color de la hoja, la productividad, el rendimiento, la adaptabilidad a diferentes altitudes, la resistencia a plagas y enfermedades, es decir, por todas las características que pueden ser observados y medidos por el agricultor. Algunas variedades de café arábico se describen a continuación:

- a. Typica, es la base sobre la cual muchas variedades han sido desarrolladas, tiene una forma cónica con un tronco principal vertical. Typica es una planta alta que alcanza de tres a cuatro metros de altura. Las ramas laterales forman un ángulo de 50 - 70 grados con el tallo vertical. Las hojas que emergen tanto del apice como de las ramas laterales son de color bronceado rojizo. Typica tiene una producción muy baja, pero tiene una calidad de taza excelente (Coffee Research Institute, <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>).
- b. Bourbon, esta variedad comparada con Typica produce de 20 a 30 % más granos de café, y la planta es de menos forma cónica, sin embargo, tiene más ramas. Los ángulos entre las ramas secundarias y el tallo principal son pequeños, y los puntos de las ramas sobre el tallo principal están situados cercanamente. Las hojas son amplias y con bordes ondulados mientras que el fruto es relativamente pequeño. Los cerezos crecen densamente y maduran rápidamente por lo que pueden caer con vientos o

- lluvias fuertes. La calidad de taza es excelente y similar a Typica. Los mejores resultados en su cultivo se observan entre los 1067-1980 m.s.n.m. (Coffee Research Institute, <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>).
- c. Caturra, esta variedad es una mutación del café Bourbon que fue descubierta en Brasil, es una planta de porte bajo (1.5 a 2 m), tiene una alta producción y buena calidad, pero requiere de un cuidado extensivo y mucha fertilización. La planta es corta con un tronco grueso y tiene muchas ramas secundarias. Esta variedad tiene hojas grandes con bordes ondulados similares al Bourbon, se adapta bien a casi cualquier ambiente, pero presenta mejores resultados entre los 457 y 1676 m.s.n.m., con una precipitación anual entre 2500-3500 milímetros. A mayor altitud la calidad es aún mejor, pero disminuye su producción (Coffee Research Institute, <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>).
- d. Catuai, es una variedad de alto rendimiento resultado del cruce entre Mundo Novo y Caturra. La planta es relativamente de porte bajo y las ramas laterales forman ángulos cortos con el tronco principal. El fruto no cae fácilmente de las ramas, lo cual es favorable en áreas con vientos y lluvias fuertes. Estas plantas también necesitan suficiente fertilización y cuidado (Coffee Research Institute, <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>).
- e. Catimor, es un cruce entre el café Híbrido de Timor (resistente a la Roya) y el café Caturra. Fue creado en Portugal en el año 1959. La maduración de sus frutos es temprana y su producción es muy alta, por esta razón el método de fertilización debe ser supervisado muy de cerca (Coffee Research Institute, <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>).
- f. Mundo Novo, es un híbrido natural entre el café Typica y el café Bourbon. La planta fue primero encontrada en Brasil, es fuerte y resistente a enfermedades. Mundo Novo tiene una alta producción y ofrece mejores resultados cuando es cultivado entre los 1067 y 1676 m.s.n.m. además, soporta una precipitación anual de 1200-1800 milímetros (Coffee Research Institute, <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>).
- g. Maragogype, es una mutación del café Typica y fue descubierto en el Brasil. Es una planta grande, más alta que el Bourbon o Typica. La producción es baja pero las semillas son

muy grandes, y se adapta mejor entre los 610-762 m.s.n.m. Las características de taza se aprecian altamente en ciertos mercados del café (Coffee Research Institute, <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>).

- h. Villa Sarchi, esta variedad es originaria de Costa Rica, de la provincia de Alajuela, que antiguamente se llamó Sarchi. Es una planta de porte bajo, muy similar en su forma y tamaño al Caturra y Pacas; tiene brotes de color verde, hojas de tamaño mediano, sistema radical fuerte y entrenudos cortos en su eje principal. Es una variedad precoz para producir y de maduración intermedia y uniforme, tiene buen comportamiento en zonas cafetaleras altas, donde otras variedades son afectadas tanto en producción como en la maduración de los frutos. En condiciones agronómicas adecuadas, su producción es similar a Caturra (Coffee Research Institute, <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>).
- i. Pache, este café es originario de Guatemala y es conocido también como San Bernardo. Esta variedad ha sido estudiada en el Instituto Agronómico de Campinas, concluyendo que su porte reducido y entrenudos cortos están controlados por un gen de carácter dominante, consecuencia de una mutación en la variedad Typica. Sus hojas, flores y frutos son similares a los de Typica y además produce en promedio un 80 por ciento de semillas de tamaño grande, porcentaje que es ligeramente superior al observado en Typica (Castillo y Moreno 1976).

2.1.5 Resistencia vegetal a enfermedades

Las plantas tienen la capacidad de reconocer potenciales patógenos invasores y han desarrollado varios mecanismos de defensa para evitar el ataque de los patógenos (Heath, 1997). Al mismo tiempo los patógenos han desarrollado estrategias para evadir los mecanismos de resistencia de las plantas, lo cual podría haber sido como un juego evolutivo en ping pong (Keen, 1999). Algunos de estos mecanismos están constitutivamente expresados y proporcionan barreras físicas y químicas, mientras que otros son activados solo en presencia de los patógenos.

En mamíferos, la maquinaria de defensa envuelve un complejo sistema inmune basado en células altamente especializadas distribuidas por el sistema circulatorio. En contraste, en las células de las plantas las respuestas de defensa son autónomas, de este modo cada célula

puede percibir y responder ante un ataque. Por lo tanto, la resistencia de las plantas puede estar asociada a una rápida muerte confinada de células, denominada respuesta hipersensitiva (HR) que tiene como objetivo impedir el progreso de la enfermedad (Bonas y Lahaye, 2002). Esta respuesta local puede desencadenar una respuesta sistémica permanente, denominada respuesta sistémica adquirida (SAR), la cual convierte a la planta resistente a un amplio espectro de especies patógenas (Dong, 2001; Métraux, et al., 2002; Somssich y Hahlbrock, 1998). Estas defensas están bajo control genético y son activados solamente a través de la detección del invasor.

Por lo tanto, frente al ataque de los patógenos las plantas han desarrollado un “sistema inmune” basado en el reconocimiento molecular y evolución del patógeno, diferenciándose principalmente dos tipos. El primero reconoce moléculas comunes en diversas clases de microorganismos los cuales son percibidos por receptores denominados PRRs, receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*), este mecanismo de defensa es conocida como resistencia basal, y permite el primer reconocimiento del patógeno, percibiendo moléculas conservadas presentes en los patógenos o microorganismos que han sido denominadas PAMPs o MAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos o microorganismos (*pathogen-associated molecular patterns/microorganism*) (López, 2007; Chisholm et al., 2006; Qutob et al., 2006). El reconocimiento de los PAMPs por parte de los PRRs es común para todos los organismos multicelulares y esto conduce a una serie de respuestas de defensa y a un redireccionamiento de la energía celular a manera multirespuesta, las que deben ser rápidas y eficientes, con el fin de evitar que más patógenos ingresen (López, 2007). En general, el reconocimiento del PAMPs conduce a una cadena de eventos de señalización que activan los sistemas de respuesta de defensa de la planta, este tipo de inmunidad es efectiva contra aquellos patógenos no huéspedes que no han evolucionado para infectar estas plantas, por lo tanto, no han desarrollado los mecanismos para suprimirla (López et al., 2003; Mishina et al., 2007).

Frente a la resistencia activada por el reconocimiento de los PAMPs, conocida como PTI (*Pamp Triggered Immunity*), los patógenos han desarrollado sofisticadas estrategias moleculares para evadir y manipular el sistema inmunológico de su hospedante, al igual que ocurre con los mamíferos. El éxito que han tenido los patógenos es la evolución de las proteínas efectoras las cuales suprimen la PTI (Qutob et al., 2006). Sin embargo, a su vez las plantas han desarrollado genes de resistencia R, cuyos productos proteicos se encargan

de detectar directa o indirectamente esos efectores conocidos con el nombre de proteínas de avirulencia o Avr, esta segunda rama de la inmunidad corresponde al modelo gen por gen propuesto por Flor en 1954 (Dickinson, 2003; Flor, 1954; López, 2007). Actualmente esta rama de la inmunidad es denominada: Inmunidad activada por efectores o ETI (*Effector Triggered Immunity*). La respuesta ETI está acompañada generalmente por una respuesta hipersensible, una forma de muerte celular programada que tiene como objetivo básico la restricción de la colonización de la planta por el patógeno. Este modelo muestra la dinámica de coevolución en el patosistema patógeno y hospedante. La ETI es capaz de desencadenar una respuesta sistémica a través de lo que se conoce como SAR (*Systemic Acquired Resistance*), la que protege a la planta frente a posteriores infecciones y frente a un rango amplio de patógenos, por lo que se considera durable y de amplio espectro (Chisholm et al., 2006; Jones et al., 2006, López, 2007).

2.1.6 Resistencia genética en *Coffea spp*

La interacción entre *Coffea spp* y *H. vastatrix* puede ser explicada por la teoría gen a gen de Flor (1954), la cual postula que por cada gen que condiciona la resistencia en el huésped, existe un gen específico que condiciona la patogenicidad en el patógeno. Basados en esta teoría los estudios de herencia de la resistencia a la roya amarilla llevados a cabo por el CIFIC (Centro de Investigaçã das Ferrugens do Cafeeiro) permitieron evidenciar la existencia de al menos nueve factores de resistencia (SH1 a SH9) presentes en las especies de café (Bettencourt y Rodrigues, 1988). Los factores SH1, SH2, SH4 y SH5 han sido identificados en el germoplasma de *C. arabica*, mientras que el SH3 solo en selecciones de la india derivadas de cruzamientos con *C. liberica*. Los factores SH6 a SH9 se encuentran en la especie *C. canephora* y han sido introducidos a las variedades comerciales a través del Híbrido de Timor, un híbrido natural entre *C. arabica* y *C. canephora*, que es considerado el recurso genético más ampliamente utilizado en los programas de mejoramiento en América (Bettencourt y Lopes, 1982).

2.1.7 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta que permite revelar sitios neutrales de variación a nivel de la secuencia de ADN entre individuos o entre especies (Jones et al., 1997). Generalmente constituyen regiones anónimas en el genoma, que pueden estar o no ligados a un gen de interés.

A comienzo de los años 80's se empezaron a desarrollar y utilizar un gran número de marcadores moleculares cuyas características y potencialidades varían ampliamente.

Hoy día existe una gran variedad de marcadores que han sido utilizados desde la búsqueda de polimorfismo, hasta la caracterización de poblaciones. Una lista no exhaustiva incluye: *Restriction Fragment Length Polymorphisms* -RFLPs (Botstein et al., 1980); *Random Amplified Polymorphic DNA*- RAPDs (Williams et al., 1990); *Inter-Simple Sequence Repeats*- ISSRs (Welsh y McClelland, 1990); *Amplified Fragment Length Polymorphisms*- AFLPs (Vos et al., 1995), los cuales no exigen el conocimiento previo de la secuencia del ADN. Por el contrario, existen marcadores que si lo requieren tales como: *Simple Sequence Repeats*- SSRs, *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence CAPs*, *Sequence Characterized Amplified Region* - SCARs y *Single-Nucleotide Polymorphisms* - SNPs (Owusu, 2008). Todos estos marcadores son denominados “marcadores anónimos”, dado que se derivan de sitios polimórficos distribuidos más o menos al azar en el genoma y que pueden o no estar asociados a un carácter o gen de interés.

2.1.8 Marcadores asociados a la resistencia a la roya amarilla en el café

A pesar de los avances en el uso de técnicas moleculares para la búsqueda de polimorfismo en el genoma del café, ha sido difícil la identificación de marcadores moleculares asociados a características de interés, especialmente a resistencia a roya. Entre las razones más relevantes están, el carácter poliploide de *Coffea arabica*, su escasa variabilidad genética, así como la falta de información genómica de las especies portadoras de la resistencia. Además, existe desconocimiento sobre la variabilidad genética de las razas de roya amarilla, favorecido por la dificultad de aislar y cultivar el hongo en condiciones *in vitro*. También, se carece de plantas diferenciales que permitan la identificación de todas las razas de roya presentes en las regiones cultivadas, lo que limita la selección de genotipos compatibles, así como de poblaciones idóneas para el estudio genético de la resistencia. (Romero, 2014)

Uno de los primeros trabajos de investigación sobre marcadores moleculares de ADN que están relacionados a la resistencia a roya amarilla, es el estudio de Prakash et al. (2004), en el cual se identificaron 21 marcadores AFLPs distribuidos en una zona de 6.3 cM, los cuales, estuvieron fuertemente asociados al factor de resistencia SH3. Dicho gen fue introgresado de *C. liberica* en *C. arabica*. Posteriormente Mahé et al. (2008), generaron marcadores SSR,

SCARs a partir de los AFLPs identificados por Prakash et al. (2004) y de clones BAC (*Bacterial artificial chromosome*) ligados al gen SH3. En esa misma línea, Lashermes et al. (2010) hallaron la secuencia completa de la región del cromosoma que contiene al gen SH3, constituyéndose así en el primer y único gen de resistencia a la roya, identificado y secuenciado hasta el momento en el genoma del café.

Herrera et al. (2009) identificaron cinco marcadores AFLPs y dos marcadores SSR ligados a la resistencia parcial a la roya, en una población segregante F2 derivada del cruzamiento entre *Coffea arabica* variedad “Caturra” y una línea introgresada del Híbrido de Timor (DI 200), las variables que utilizaron para evaluar la resistencia parcial a *H. vastatrix* fueron menor defoliación e incidencia de la enfermedad. En el análisis de ligamiento con los 7 marcadores asociados a resistencia parcial a la roya del café, se observó que los marcadores AFLP y el marcador Sat 229 se encontraron en una posición diferente en el genoma del café con respecto al marcador Sat 225, sugiriendo el autor que al menos dos locus con efectos aditivos estarían involucrados en la resistencia a la enfermedad. Posteriormente, Romero et al. (2014) utilizando la misma población, 11 líneas elites, cuatro variedades comerciales y siete plantas diferenciales pertenecientes a diferentes grupos de resistencia, lograron mapear una región QTL denominado QCLR_4 asociado estrechamente a resistencia a roya a la amarilla ubicada en el cromosoma cuatro del mapa internacional de *Coffea canephora* contiguo al marcador Sat 229 que previamente fue mapeado por Herrera et al. (2009), identificando cuatro marcadores SSR estrechamente asociados a resistencia a la roya amarilla, sin embargo, en la validación de estos marcadores no fue posible la asociación directa de este marcador con la resistencia a la enfermedad debido a la ausencia de este marcador en variedades que muestran alta resistencia en campo, sugiriendo los autores que “la existencia de genes de resistencia adicionales estarían enmascarando las respuestas de resistencia, sin embargo, su alta prevalencia del QCLR_4 en líneas elite se explicaría como resultado de selección intensa contra la susceptibilidad a la roya a través de procesos de mejoramiento”. La asociación de esta región QCLR_4 a la resistencia a la roya amarilla observada en campo estaría particularmente presente en los genotipos derivados de Híbrido de Timor de CIFIC 1343 y CIFIC 832/2.

Brito et al. (2010), analizaron la herencia de la resistencia a la raza II en tres poblaciones (F2, BCr y Bcs) derivados del cruce del Híbrido de Timor UFV427-15 (CIFIC 1343-36) como progenitor resistente y UFV-2143-236 (IAC 30) como progenitor susceptible, determinando

que la herencia de la resistencia a la raza II de la roya del café en los derivados del UFV 427-15 es de tipo monogénica dominante y podría estar determinado por los factores de resistencia SH7, SH8, SH9 o por algún otro factor SH desconocido.

En sus estudios moleculares, lograron identificar tres marcadores AFLPs los cuales se encontraron flanqueando al gen de resistencia a la raza II de *H. vastatrix*. Posteriormente en la misma línea de investigación Diola et al. (2011), analizaron 1154 combinaciones de iniciadores AFLPs en una población segregante F2 derivados del HDT UFV 427-15, logrando identificar 25 marcadores asociados al gen de resistencia a la roya amarilla, el mapeo de estos 25 marcadores en la población segregante F2 les permitió identificar 6 marcadores estrechamente asociados al gen de resistencia, los cuales fueron convertidos en marcadores SCAR, permitiendo disminuir la distancia genética de 20.78 a 9.45 cM. La caracterización fenotípica de la población F2 inoculada con la raza II de la roya del café confirmó la presencia de un único gen de efecto dominante en derivados del HDT UFV 427-15, reportado también por Brito et al. (2010).

Alvarenga et al. (2011) diseñaron 59 pares de iniciadores a partir de secuencias ESTs de la base de datos CafEST, los cuales fueron probados en 12 cafetos resistentes y 12 susceptibles a *H. vastatrix*, resultando solamente un marcador (CARF 005) capaz de diferenciar los cafetos resistentes de los susceptibles a la roya amarilla. Posteriormente Pestana et al. (2005), estudió la herencia de la resistencia a la raza I, II y patotipo 001 de la roya del café en una población F2 derivado del HDT UFV 443-3, utilizando marcadores SSR, AFLP, RAPD y CARF, logrando identificar dos marcadores AFLPs asociados a dos loci de resistencia a la raza II, localizados en los grupos de ligamiento (LG 2 y LG 10), cuya herencia estaría condicionada por la presencia de al menos dos loci dominantes e independientes, asimismo, identificó tres marcadores AFLPs localizados en los LG 2 y LG 10 y un marcador EST-SSR localizado en el GL3, asociados a cuatro loci de resistencia a la raza I y patotipo 001 en los derivados del HDT UFV 443-3, este resultado sugiere que la herencia de la resistencia a la raza I y patotipo 001 de la roya del café estaría conferida por al menos cuatro genes dominantes e independientes. Sin embargo, el estudio fenotípico de la herencia de los derivados de HDT UFV 443-3 a los tres aislados del patógeno no permitió concluir si la resistencia observada estaba condicionada por dos loci dominantes e independientes o por tres loci independientes (dos loci dominante y un locus recesivo).

2.2 La roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix* Berk & Broome)

La roya amarilla es una de las principales enfermedades del cultivo de café y su agente causal es el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix*, parásito obligado que necesita de células vivas para sobrevivir y completar su ciclo de vida (Avelino et al., 1999; Zuluaga et al., 2009), no existiendo reportes que indiquen la sobrevivencia del hongo en el suelo o tejido vegetal muerto. Este patógeno infecta a todas las especies del género *Coffea*, sin embargo, *C. arábica* es una de las especies más susceptibles (Avelino y Rivas, 2013).

Las estructuras reproductivas del hongo son las uredosporas (reproducción asexual), que constituyen el medio de reproducción y dispersión; estas son de forma arrionada, rugosas en su mitad superior y lisas ventralmente (Figura 2) (Coutinho et al., 1995; Fernández et al., 2009). Rajendren (1967) fue el primero en observar que la uredospora podía albergar un proceso de meiosis, la cual fue comprobada recientemente por Carvalho et al. (2011) denominándola criptosexualidad.



Figura 2. Uredosporas de *Hemileia vastatrix* en un microscopio electrónico de barrido, mostrando paredes lisas y paredes equinuladas con espigas cónicas sobre la estoma de hoja. Fuente: SENASICA, 2018.

2.2.1 Origen y Distribución

La enfermedad fue descubierta en el año 1861 a los alrededores del lago Victoria al este de África (Schiber, 1972) y poco después en 1867 fue encontrada en Ceylan (Sri Lanka), luego se extendió a gran parte del sureste de Asia y gradualmente invadió todas las regiones de África (Figura 3), En 1970, la temida enfermedad fue encontrada en el Estado de Bahía (Brasil), luego en 1978 fue hallada en Bolivia y en 1979 fue detectada la raza II de roya en las plantaciones de café en la provincia de Satipo Región Junin en el Perú (Figura 4) (Scheiber et al., 1984). Actualmente la roya amarilla se encuentra distribuida a través de todos los países productores de café y puede causar severas defoliaciones, con pérdidas sustanciales entre el 30 y 50 % en la producción (Silva et al., 2006).

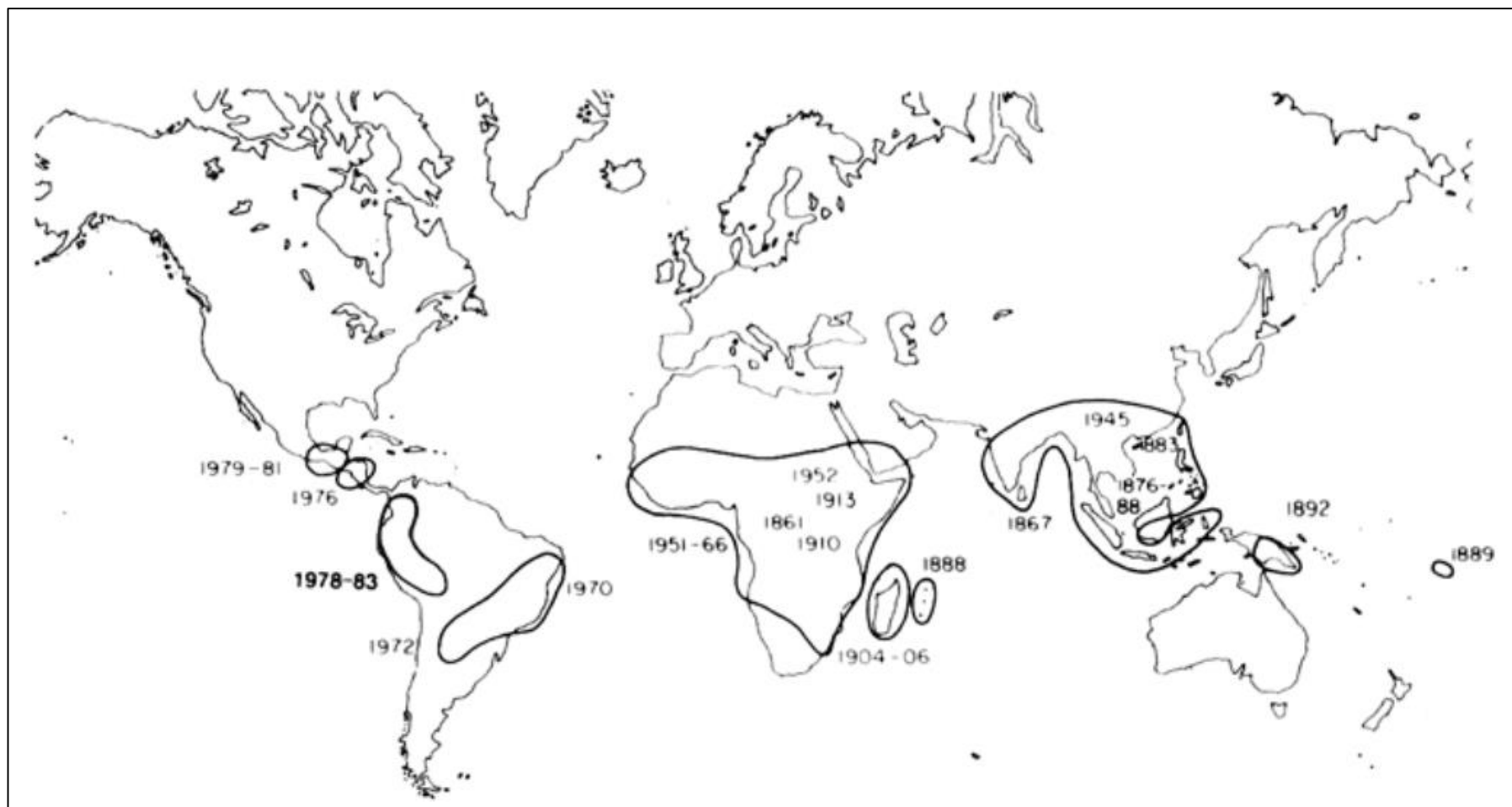


Figura 3. Distribución de *Hemileia vastatrix* a nivel mundial. Fuente: Schieber y Zentmeyer, 1984.



Figura 4. Distribución de *Hemileia vastatrix* en Sudamérica.
Fuente: Schieber y Zentmeyer, 1984.

2.2.2 Taxonomía de la roya amarilla del café

En estudios filogenéticos realizados a nivel morfológico y molecular colocaron a *Hemileia vastatrix* en una posición indeterminada a nivel de familia, pues la afinidad de este género con la familia Chaconiaceae es problemática. Aime (2006), sugiere, que el género *Hemileia* debería ser ubicado en la familia Mikronegeriaceae, sin embargo, aún es necesario realizar más estudios incluyendo a más royas tropicales.

La taxonomía de *Hemileia vastatrix*, es de la siguiente manera:

Reyno: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycotina

Orden: Pucciniales

Familia: no determinada

Género: *Hemileia*

Especie: *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome.

2.2.3 Sintomatología

Los primeros síntomas son manchas pequeñas cloróticas 1-3 mm de diámetro que se incrementan en diámetro y masa de uredosporas que se observan en el envés de las hojas, lugar por donde el hongo ha penetrado a través de las estomas. El centro de una uredopústula vieja muchas veces se torna necrótica, mientras, la producción de esporas continúa a los bordes de esta. Usualmente las primeras pústulas se producen en los bordes o en el ápice del envés de las hojas, porque, en estas zonas se encuentran suspendidas por mucho tiempo el agua del rocío y de la lluvia, que aportan la humedad necesaria para la germinación y penetración del hongo. Asimismo, a partir de estas pústulas iniciales las uredosporas pueden ser transportadas por la lluvia y el viento a otras regiones del envés de la misma hoja, a otras hojas de la misma planta y a otras plantas. La infección por *H. vastatrix* se manifiesta con lesiones en polvo de color amarillo anaranjado en la superficie abaxial de las hojas y conduce a una fotosíntesis deteriorada, defoliación prematura y reducción de la iniciación floral que resulta en la pérdida de rendimiento (Bettencourt y Noronha-Wagner, 1971). Las uredosporas producidas en estas lesiones es su forma infecciosa y aparecen tanto en hojas jóvenes como en hojas viejas y eventualmente en las primeras hojas de los semilleros jóvenes (Figura 5).

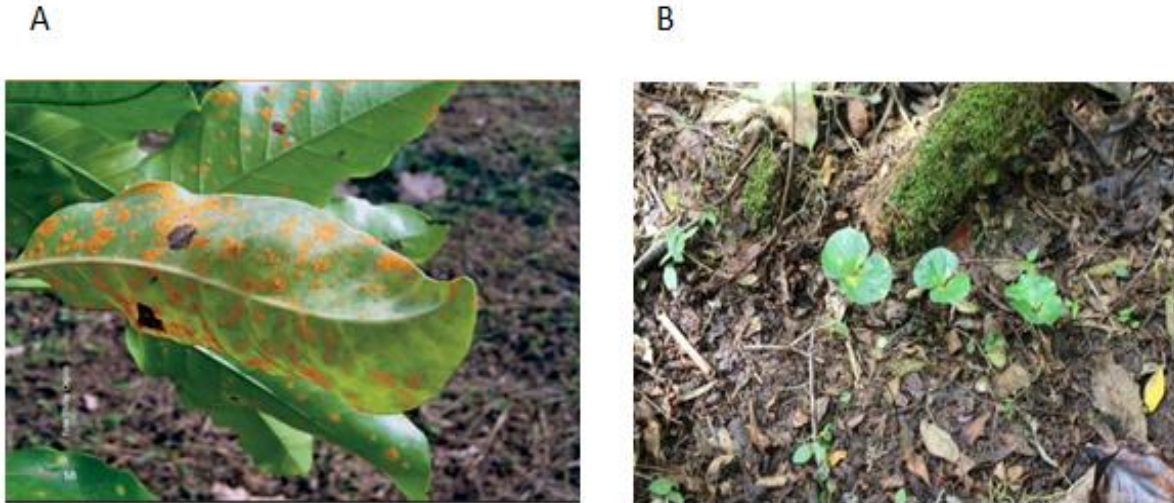


Figura 5. Fotografías de hojas (A) y cotiledones (B) de café mostrando síntomas de infección por *H. vastatrix*. Fuente: Elaboración propia.

2.2.4 Ciclo de vida

Un esquema del ciclo de vida de *H. vastatrix* fue propuesto por Ward (1882) y, en esencia, esto todavía sigue siendo un modelo aceptado (Ayres, 2005). De acuerdo con esta interpretación, las lesiones de color naranja en las hojas de café representan el estado asexual (anamorfo) del hongo. Este tipo de esporas forman masas pulverulentas de color naranja y tienen la función de dispersión, supervivencia e infección, sin embargo, ocasionalmente de vez en cuando, se producen esporas sexuales, lisas, de color naranja con paredes delgadas (teliosporas) que producen basidiosporas, su infectividad no ha sido demostrada y, por ahora, el huésped alternativo no se ha encontrado.

La infección inicia con la diseminación del patógeno en la cual la uredospora se desprende del esporóforo y luego abandona la lesión (dispersión) hasta llegar a una nueva hoja que infectará (Silva et al., 1999). Para que se inicie la inoculación, las uredosporas deben de localizarse en el envés de las hojas donde se encuentran el mayor número de estomas, a través del cual el hongo va a penetrar e infectar, pero 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 (Hocking, 1968; Rayner, 1961; Nutman y Robert, 1963), 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 intracelular (Figura 6), esta etapa inicial de la infección ocurre tanto en plantas de café resistente como en 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 las células subsidiarias a los estomas (mesófilo), esto solo en plantas susceptibles (Silva et al., 1999), lo cual involucra la colonización del tejido que culminara con el lanzamiento de las uredinosporas a través de los estomas. El número de esporas producidas es muy elevado, Ward conto en una sola instancia más de 150 000 esporas en una sola lesión.

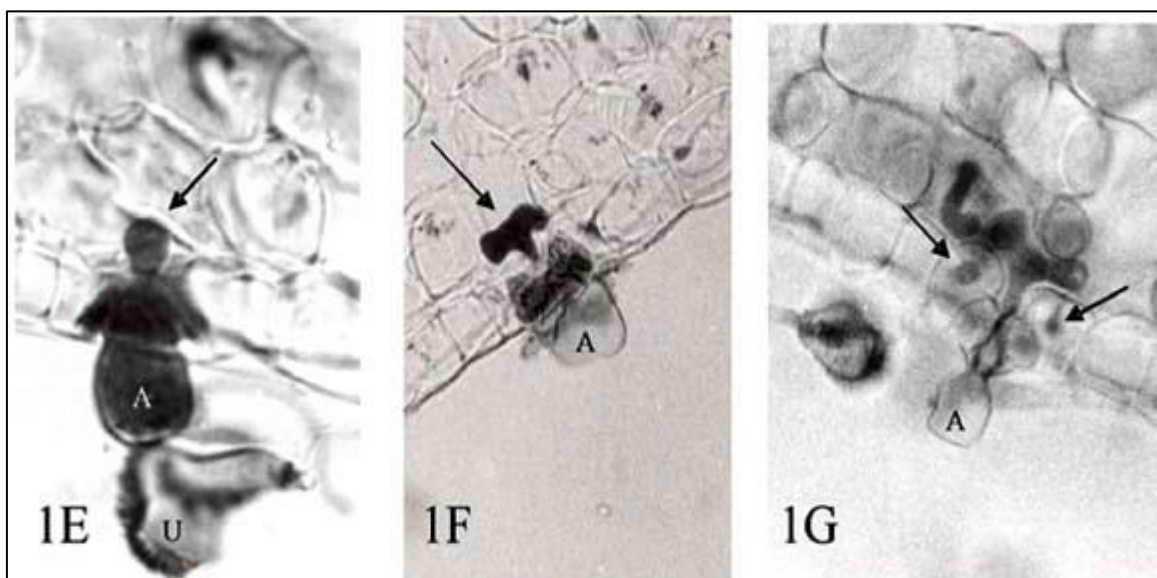


Figura 6. Interacción de plantas de café con *Hemileia vastatrix* 1E: Uredosporas (U), apresorio (A) sobre el estoma y penetración de la hifa; 24 horas después de la inoculación (x800). 1F: Apresorio (A) sobre la estoma y un ancla, 48 horas después de la inoculación (x650). 1G: Apresorio (A) Apresorio sobre la estoma y una hifa intracelular con haustorio en células subsidiarias, 72 horas después de la inoculación (x650). Fuente: (Silva et al., 2006)

Existe un periodo de latencia, entre el tiempo de invasión y la de esporulación, que fue reportado por varios investigadores, los cuales varían de acuerdo a la estación (Bock, 1962), Ward (1882), encontró que este periodo es de 12 a 16 días; Mayne (1932), reporto para la India, que el periodo de incubación fue de 15 a 16 días, Rayner (1961), concluyo que se puede tomar hasta 5 semanas, mientras que Nutman y Robert (1963), informaron que el tiempo fue de 21 días, esto en discos de hojas de café, mantenidas en cámaras húmedas. Sin embargo, en estudios recientes Herrera et al. (2009), reporta que individuos con resistencia parcial exhiben un progreso lento (un retraso de hasta 5 meses en comparación de variedades susceptibles) con menos defoliación. Entonces se podría considerar que este tiempo de latencia varía de acuerdo con el tipo de resistencia que exhiben las plantas de café, 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 por la lluvia, sin embargo, excesivas cantidades de agua pueden causar lavado de uredosporas (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; Schiber, 1970) e insectos (Nutman y Robert, 1970; Amante, 1971).

2.2.5 Variabilidad genética

Para realizar estudios de la variabilidad del hongo *Hemileia vastatrix*, se ha utilizado aproximadamente 40 plantas diferenciales de café, que han sido desarrolladas en el CIFC, que poseen entre uno y cinco genes de resistencia al patógeno, y de acuerdo con este número de genes se clasifican 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 que son agentes causantes de la enfermedad (Kilambo et al., 2013). En el año 2000, en Brasil se identificaron 15 razas fisiológicas de la roya amarilla del café: I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXIII, XXIV, XXV, XXXI y XXXVII, pero la raza II seguía siendo la de más amplia distribución (Zambolim et al., 2005; Cabral et al., 2009). En el 2007, Capucho et al. (2012) recolectaron 64 muestras de roya del café en las diferentes regiones productoras de café en Brasil, detectando la presencia de las razas I, II, III, XV, XXII y XXXIII de la roya amarilla del café; sin embargo, la raza II estuvo presente en 68,7% de las muestras, en tanto que las razas I, III, XV y XXII estuvieron presentes en seis, cuatro, una y dos muestras respectivamente. En Colombia, los estudios realizados en el año 1983 reportaron a la raza II como responsable de la afectación a la variedad Caturra. Cristancho et al. (2007) estima que debe existir más de 10 razas aun no identificadas atacando variedades derivadas del Híbrido de Timor los cuales no pueden ser identificados por la falta de plantas diferenciales, además, mencionan la existencia de las razas XXII, XXV, XXIII, XVII y XXX. Estudios posteriores realizados después de la severa epidemia entre 2008 y 2011, con pérdidas superiores al 30% de la producción, para determinar si se presentaban nuevas razas de la enfermedad, reveló que la raza II y sus derivados prevalecen en el país (Castro et al., 2013; Cristancho et al., 2007).

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 se va mostrándose insuficientes para la identificación de nuevas razas de *Hemileia vastatrix*. Cristancho (2008), menciona la importancia del desarrollo de una técnica molecular para la identificación del hongo, debido al continuo desarrollo de nuevas razas, sin embargo, la transferibilidad de los SSR de especies relacionadas de uredinales *Puccinia coronata* f. sp. *loli* and *Melampsora linii* a *H. vastatrix* resulto en un bajo nivel de transferibilidad y solo 4 de 25 marcadores pueden ser usados para identificación genética. En estudios realizados por Gouveia et al. (2005) demostraron la presencia de nuevas razas de roya de Colombia, utilizando marcadores moleculares RAPDs, pero no pudieron asociar los patrones de bandas obtenidos con el origen geográfico de las razas, con su espectro de virulencia o con las razas fisiológicas individuales. En estudios posteriores realizados en Brasil por Maia et al. (2013), reporta que *Hemileia vastatrix* se comporta como una gran población indiferenciada, con un alto nivel de diversidad genética, que no está estructurado con relación a su origen geográfico y hospedero. Sin embargo, Cabral et al. (2016), reporta un bajo nivel diversidad genética ($h = 0.027$) en la población del hongo. Se conoce que el inoculo inicial de *Hemileia vastatrix* es la raza II, que está ampliamente distribuida en todos los países productores de café en el mundo a partir del cual se generaron otras razas genéticamente diferentes (Zambolin et al., 2005). La presión de selección provocada por el ambiente sobre el patógeno acelero la evolución y la formación de nuevas razas variantes (Varzea y Marques, 2005), este proceso se acentúa más en los lugares de uso continuo de fungicidas con principios activos similares o iguales en las plantaciones a gran escala de genotipos de baja divergencia genética (Silva, 2000).

2.2.6 Región espaciadora interna transcrita del ARN ribosomal

El grupo de genes del rRNA 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 tejidos (Gardes et al., 1991). Los iniciadores de las regiones ITS se utilizan en zonas conservadas de los genes del ARN ribosomal (18s, 5,8s y 28s) para amplificar las regiones no codificantes entre ellos (Figura 7).

Los estudios comparativos de las secuencias nucleotídicas de los genes del ARNr ribosomal (rARN) provee un medio para el análisis de las relaciones filogenéticas sobre un amplio rango de niveles taxonómicos (Woese & Olsen 1986; Medlin et al., 1988). 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). Asimismo, se ha utilizado en estudios de la diversidad genética del hongo basidiomiceto *H. vastatrix* realizados por Cristancho et al. (2007) en Colombia y por Santana et al. (2007) en Brasil, determinando la existencia de nuevas variantes del hongo.

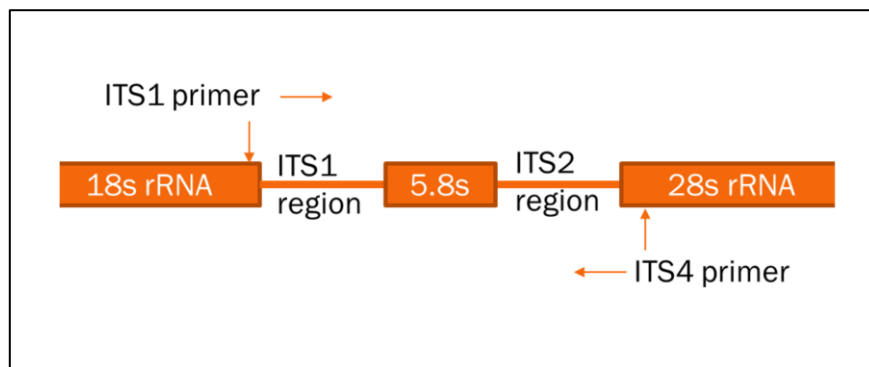


Figura 7. Esquema de la disposición del ADNr 18S, 5.8S y 28S en tándem; ITS: espaciador transcribible interno. Fuente: elaboración propia.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación del área de estudio.

Se utilizaron accesiones de café que fueron muestreados en fundos cafetaleros ubicados en el distrito de Villa Rica de la Provincia de Oxapampa (Región Pasco), y en el distrito de Quillabamba de la Provincia de la Convención (Región de Cuzco) (Figura 8). Las muestras de roya amarilla también fueron muestreadas en estas dos zonas.

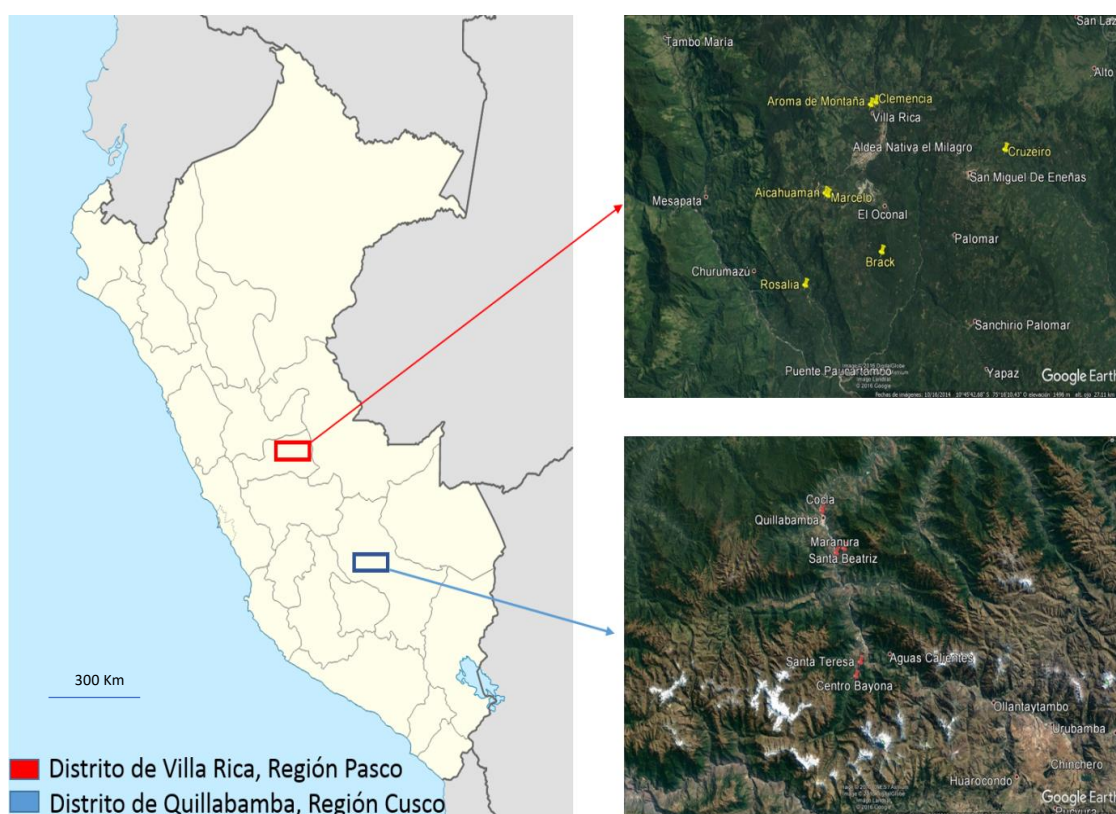


Figura 8. Mapa de ubicación de las zonas de procedencia de la roya amarilla en el Perú.
Fuente: elaboración propia

3.2 Material biológico

3.2.1 Café (*Coffea spp*)

Se muestrearon hojas jóvenes de café de 48 accesiones procedentes de las zonas de Villa Rica (Región Pasco) y Quillabamba (Región Cuzco) (Cuadro 1). Se tomaron datos de la

resistencia y susceptibilidad a la roya amarilla manifestada por cada accesión en el campo, información proporcionada por los agricultores.

Cuadro 1: Datos de pasaporte de cultivares de café procedentes de dos zonas productoras de café en el Perú.

Código	Fundo	Zona	Altitud (msnm)	Latitud (S)	Longitud (W)	Variedad*	Resistencia observada en campo
B1	Brack	VILLA RICA	1730	10.77195	75.26601	Bourbon Amarillo	Susceptible
B3	Brack	VILLA RICA	1731	10.77195	75.26601	Borbón	Susceptible
B5	Brack	VILLA RICA	1731	10.77195	75.26601	Typica Rojo	Susceptible
B6	Brack	VILLA RICA	1761	10.7725	75.265	Typica Amarilla	Susceptible
B7	Brack	VILLA RICA	1742	10.77284	75.26575	ND	Susceptible
B8	Brack	VILLA RICA	1705	10.77261	75.26827	Caturra Villa Sarchi	Susceptible
B9	Brack	VILLA RICA	1705	10.77261	75.26827	Caturra	Susceptible
B10	Brack	VILLA RICA	1531	10.78518	75.2665	Geisha 727	Susceptible
C6	Oconal	VILLA RICA	1574	10.76537	75.26817	Caturra	Susceptible
C7	Antaz	VILLA RICA	1302	10.80508	75.28120	Typica	Susceptible
Q11	Paltaypampa	QUILLABAMBA	2073	13.21229	72.61610	Typica	Susceptible
QCC59	Primavera	QUILLABAMBA	1414	12.80051	72.64277	Catimor Amarillo	Resistente
QCC62	Cooperativa Aguilayoc	VILLA RICA	1470	12.79173	72.63615	Caturra Amarilla	Susceptible
QCC63	Cooperativa Aguilayoc	QUILLABAMBA	1467	12.79168	72.633651	Bourbon	Susceptible
QCF70	Facultad agronomía UNSAAC	QUILLABAMBA	1002	12.85585	72.69325	Canephora	Resistente
QCF71	Facultad agronomía UNSAAC	QUILLABAMBA	1002	12.85585	72.69325	Canephora	Resistente
QCR65	Yanai	QUILLABAMBA	1528	12.88732	72.64793	Typica Roja	Susceptible
QCR66	Yanai	QUILLABAMBA	1527	12.88711	72.64789	Catimor	Resistente
QCR67	Yanai	QUILLABAMBA	1507	12.88784	72.64799	Catimor	Resistente
QCR68	Yanai	QUILLABAMBA	1532	12.88725	72.64701	Catimor	Resistente
S3	Schuller	VILLA RICA	1613	10.73015	75.26527	Typica	Susceptible
V1	San Vicente	VILLA RICA	1389	10.78869	75.06689	ND	Susceptible
V2	San Vicente	VILLA RICA	1446	10.79202	75.06797	ND	Susceptible
V3	San Vicente	VILLA RICA	1446	10.79202	75.06797	ND	Susceptible
VCA12	Ave Fenix	VILLA RICA	1545	10.77714	75.22498	Costa Rica 95	Resistente
VCA13	Ave Fenix	VILLA RICA	1545	10.77714	75.22498	Limaní	Resistente
VCA15	Ave Fenix	VILLA RICA	1558	10.7759	75.22379	Villa Sarchi	Susceptible
VCA19	Ave Fenix	VILLA RICA	1576	10.77763	75.22389	Catuai	Susceptible
VCA20	Ave Fenix	VILLA RICA	1576	10.77763	75.22389	Catuai	Susceptible
VCB48	Santa Teresa	VILLA RICA	1542	10.77822	75.26767	Pache	Susceptible
VCB50	Santa Teresa	VILLA RICA	1555	10.77822	75.26767	Bourbon Rojo	Susceptible
VCB53	Santa Teresa	VILLA RICA	1569	10.77822	75.26767	Catuai	Susceptible
VCB57	Santa Teresa	VILLA RICA	1576	10.77822	75.26767	Typica	Susceptible
VCD29	Esperanza	VILLA RICA	1546	10.74955	75.24068	Typica	Susceptible
VCD30	Esperanza	VILLA RICA	1546	10.74955	75.24068	Typica	Susceptible
VCD32	Esperanza	VILLA RICA	1546	10.74955	75.24068	Catimor	Resistente
VCD34	Esperanza	VILLA RICA	1546	10.74955	75.24068	Pache	Susceptible
VCM10	Mayme	VILLA RICA	1490	10.74416	75.23888	Typica	Susceptible
VCM7	Mayme	VILLA RICA	1490	10.74416	75.23888	Typica	Susceptible
VCM9	Mayme	VILLA RICA	1490	10.74416	75.23888	Typica	Susceptible
VCR23	Roni	VILLA RICA	1532	10.77822	75.22501	Caturra	Susceptible
VCR24	Roni	VILLA RICA	1532	10.77822	75.22501	Catimor	Resistente
VCS2	Shuller	VILLA RICA	1525	10.73257	75.26936	Typica	Susceptible
VCS3	Shuller	VILLA RICA	1520	10.73279	75.26911	Typica	Susceptible
VCS5	Shuller	VILLA RICA	1522	10.73239	75.26807	Typica	Susceptible
VCS6	Shuller	VILLA RICA	1472	10.73287	75.26633	Catimor	Resistente
VCW46	Mundo Novo	VILLA RICA	1392	10.77296	75.2524	ND	Susceptible
Vo 1	San Vicente	VILLA RICA	1395	10.78876	75.06678	ND	Susceptible

S = Sur; W = Oeste; ND = Nombre no definido

* El nombre de la variedad fue el indicado por el mismo agricultor.

** UNSAAC=Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

Para la evaluación de los marcadores moleculares fueron seleccionados de las 48 accesiones cuatro genotipos resistentes y cuatro genotipos susceptibles (Cuadro 2), Cada accesión fue representada por un solo individuo debido al alto grado autogamia que presenta el café.

Cuadro 2: Descripción general de los cafetos procedentes de dos zonas productoras de café en el Perú utilizados en la evaluación de marcadores moleculares relacionados a la resistencia a la roya amarilla.

Código	Lugar de Procedencia	Variedad*	Resistencia frente a roya amarilla**
VCS6	Villa Rica	Catimor	Resistentes
VCA12	Villa Rica	Costa Rica	
VCR24	Villa Rica	Catimor	
QCF71	Quillabamba	Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	
VCB48	Villa Rica	Pache	Susceptibles
VCB50	Villa Rica	Borbón Rojo	
QCC62	Quillabamba	Caturra Amarillo	
QCC63	Quillabamba	Borbón Amarillo	

*variedad denominada por el caficultor;

**resistencia observada en el campo durante la colecta.

3.2.2 Roya (*Hemileia vastatrix* Berk & Broome)

Hojas con pústulas que mostraban presencia de esporas de *H. vastatrix* fueron recolectadas en cinco fundos de la zona cafetalera de Quillabamba, (Región Cusco) y en siete fundos de la zona cafetalera de Villa Rica (Región Pasco) (Tabla 3). Estas zonas se encuentran distanciadas geográficamente (490 km) y están consideradas dentro de las regiones cafetaleras con mayor producción de café en el Perú.

En cada fundo se colectaron 25 hojas de cafetos que presentaban abundantes pústulas de roya amarilla de las “variedades Typica y Caturra”. Con la finalidad de obtener suficiente concentración de DNA y por el tipo de metodología utilizada para el análisis de la diversidad del hongo se construyeron “Bulks” de esporas por cada fundo muestreado (Cuadro 3), una ventaja del uso de técnicas como clonación y secuenciación, es la obtención de las secuencias de los diferentes haplotipos presentes en cada bulk, esto se debe a la aceptación de solo una secuencia de ADN en el plásmido de la bacteria quimiocompetente durante la

transformación. Contrario a esta técnica, es el uso de marcadores moleculares neutrales los cuales requieren del uso de aislados monopustulares.

Cuadro 3: Información georreferenciada de los fundos en los que se muestrearon las pústulas de *Hemileia vastatrix* de dos zonas cafetaleras del Perú y los bulks generados.

Zona Cafetalera	Fundo	Bulks	Altitud (msnm)	Latitud (S)	Longitud (W)
Quillabamba	Cocla	HVQ01	1033	12.86021	72.7005
	Maranura	HVQ02	1152	12.95125	72.66411
	Santa Beatriz	HVQ03	1766	12.94241	72.64352
	Santa Teresa	HVQ04	1865	13.18405	72.6043
	Centro Bayona	HVQ05	2076	13.21229	72.61512
Villa Rica	Brack	HVV06	1537	10.78518	75.2665
	Cruzeiro	HVV07	1478	10.7396	75.19847
	Aróma de Montaña	HVV08	1633	10.71801	75.2713
	Rosalía	HVV09	1391	10.79966	75.30816
	Clemencia	HVV10	1549	10.71675	75.2686
	Aicahuaman	HVV11	1750	10.75821	75.29628
	Marcelo		1776	10.75919	75.295

S = Sur

W= Oeste

3.3 Metodología

3.3.1 Identificación de la resistencia a la roya amarilla en los cafetos procedentes de dos Regiones productoras de café en el Perú mediante el uso de marcadores moleculares.

a. Extracción, calidad y cuantificación del ADN genómico de café

La extracción de ADN se desarrolló mediante el protocolo Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones realizadas al momento de la extracción (Anexo 1). La calidad del ADN genómico se evaluó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% teñidas con GelRed (Biotium®), su visualización se realizó bajo luz UV. Asimismo, se determinó la concentración del ADN por espectrofotometría y la pureza se determinó por la relación de absorbancia 260/280 nanómetros.

b. Amplificación de Marcadores Moleculares

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador de Applied Biosystems (Veriti 96®). Se utilizaron siete pares de iniciadores, seleccionados por estar relacionados a la resistencia a roya amarilla del café (Cuadro 4).

Cuadro 4: Lista de los iniciadores asociados a regiones de DNA relacionados con la resistencia a la roya amarilla del café.

Cebador	Forward	Reverse	Tamaño de amplificado	Referencia
CARF 005	GGACATCAACACCAACCTC	ATCCCTACCATCCACTTCAAC	400 pb	Alvarenga et al. 2011
M19	CTCAAAGACAAGTGGTCTCG	CGTTGGTTGCGATGCGAC	459 pb	Diola et al. 2011
M20	GAATACGCGCTACACTATG	CTCTTTCCTATGACGCTCG	208 pb	Diola et al. 2011
BA-124-12K-f	TGATTTGCTTGTGTCGAG	TGCAGATTGATGGCACGTTA	320 pb	Prakash et al. 2011
Sat 244	GCATGTGCTTTTTGATGTCGT	GCATACTAAGGAAATTATCTG ACTGCT	300 pb	Prakash et al. 2011
Sat 225	CATGCC ATC ATCAATTCCAT	TTACTGCTC ATCATTCCGCA	300 pb	Herrera et al. 2009
Sat 229	TTCTAAGTTGTTAAACGAGAC GCTTA	TTCTCCATGCCCATATTG	190 pb	Herrera et al. 2009

- **CARF 005**

El marcador CARF 005 fue amplificado según el procedimiento descrito por Alvarenga et al. (2011) con algunas modificaciones. El volumen de amplificación fue de 10 μ L conteniendo 15 ng de DNA genómico, 0.8U de Taq DNA polimerasa (GenBiotek), 1mM ClMg_2 , 0.24 mM de dNTPs, buffer de PCR 1X y 0.7 μ M de cada cebador.

El programa de amplificación consistió en una primera fase de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; seguida por una segunda fase de 5 ciclos con etapa de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento desde 65°C hasta 60°C, “touchdown PCR” (descendiendo 1°C por cada ciclo), por 20 segundos y etapa de extensión a 72°C por 20 segundos. La tercera fase fue de 30 ciclos con etapa de desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 60°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos. Finalmente, una cuarta fase de extensión final a 72°C por 7 minutos.

- **M19 y M20**

Los marcadores M 19 y M 20 fueron amplificados en un volumen de 10 μ L conteniendo buffer de PCR 1X, 1.25 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de dNTPs, 0.11 μ M de cada cebador, 1.5 U de Taq DNA polimerasa y 40 ng de DNA genómico.

El programa de amplificación consistió en una primera fase de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; seguida por una segunda fase de 5 ciclos con etapa de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, etapa de alineamiento desde 62 °C hasta 58 °C, “touchdown PCR” (descendiendo 1 °C por cada ciclo), por 20 segundos y etapa de extensión a 72 °C por 1 minuto. La tercera fase fue de 28 ciclos la con etapa de desnaturalización inicial a 94 °C por 30 segundos, etapa de alineamiento a 58 °C por 30 segundos y etapa de extensión a 72 °C por 1 minuto. Finalmente, una cuarta fase de extensión final a 72°C por 7 minutos (Diola et al. 2011). Se realizaron modificaciones a estas condiciones iniciales de amplificación; se incrementó el tiempo de la desnaturalización (de 30 segundos a 1 minuto) para asegurar la separación completa de las cadenas complementarias. También, se probaron dos

rangos de temperatura de alineamiento, de 50 °C a 45 °C y de 45 °C a 40 °C, con el objetivo de facilitar la unión de los cebadores a la cadena molde.

Asimismo, se modificaron las condiciones de la mezcla de reacción, se incrementó la concentración de MgCl₂ a 2.5 mM, del dNTPs a 0.3 mM, y la concentración de cada cebador a 0.4 μM, y taq polimerasa a 0.5 U.

- **Sat 244, BA-124-12K-f, Sat225 y Sat229**

Los iniciadores Sat 244, BA-124-12K-f, Sat225 y Sat229 fueron amplificados en un volumen final de 10 μl conteniendo buffer de PCR 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 0.3 mM de dNTPs, 0.4 μM de cada cebador, 0.5U de Taq DNA polimerasa y 60 ng de DNA genómico (Combes et al., 2000).

El programa de amplificación consistió en una primera fase de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; seguida por una segunda fase de 6 ciclos con etapa de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, etapa de alineamiento desde 50°C hasta 45°C (para iniciadores Sat 244 y BA-124-12K-f) y desde 55 °C hasta 50°C (para iniciadores Sat225 y Sat229,) “touchdown PCR” (descendiendo 1°C por cada ciclo), por 1 minuto y etapa de extensión a 72°C por 1.5 minutos. La tercera fase fue de 30 ciclos con etapa de desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto, etapa de alineamiento a 45°C por 1 minuto y etapa de extensión a 72°C por 1.5 minutos. Finalmente, una cuarta fase de extensión final a 72°C por 8 minutos.

Los productos de amplificación por PCR fueron separados en geles de agarosa al 2 % en tampón de corrida electroforética 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 10 μl del producto de amplificación con 1.9 μl de tampón de carga 10X (0.15% de azul de bromofenol, 0.15% de xilencianol, 0,2% de naranja G, tris borato EDTA 0.5X y sucrosa 60%) y 0.1 de gel red diluido 1:10 (Biotium). La visualización del gel de agarosa se realizó bajo luz UV (UV SOLO TS imagen system). El peso molecular de los fragmentos amplificados se estimó utilizando un marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific®).

3.3.2 Diversidad genética de la roya amarilla existente en las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica.

El análisis de la diversidad de *H. vastatrix* se realizó mediante PCR y secuenciación, utilizando el par de iniciadores ITS1 e ITS4 de White et al. (1990). Para la obtención y análisis de las secuencias de ADN de la región ITS se realizó las siguientes etapas:

a. Extracción, calidad y cuantificación del ADN de roya amarilla

La extracción de ADN de *H. vastatrix* se realizó mediante el protocolo descrito por Cristancho et al., 2007 con algunas modificaciones (Anexo 2). Las uredosporas de cada Bulk se depositaron en tubos de 1.5 ml, luego se adicionó 150 µL de buffer de lisis (50 mM de tris HCl pH 7,5; 50 mM de EDTA pH 8,0; 3 % de SDS; 1 % de β Mercaptoetanol), posteriormente se trituraron las uredosporas con ayuda de un pistilo de polipropileno durante 30 a 45 minutos. La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Como tampón de corrida electroforética 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 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, 0.5 X de TBE y sucrosa 60 por ciento) y 0.1 µl de gel red (Biotium®) diluido en agua libre de nucleasas 1:10. Su visualización se realizó bajo luz UV (UV SOLO TS imagen system®). Para cuantificar la concentración del ADN se utilizó el espectrofotómetro Epoch (Biotek®), determinando la absorbancia a 260 nm.

b. PCR y Secuenciación

Para la secuenciación del ADN de la Región ITS, se amplificaron por sextuplicado los 11 ADNs BULKs de *H. vastatrix* con el par de iniciadores universales ITS1L e ITS4R (White et al., 1990), tomando como referencia el protocolo descrito por Cristancho et al. (2007). Para un volumen final 10 µL se utilizó, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada iniciador, 1 X Buffer de PCR, 1.25 Unidades de Taq DNA polimerasa (GenBiotech) y 40 ng de ADN. El programa de amplificación consistió de una etapa de desnaturalización inicial con 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1,5 minutos, 60°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, la purificación del fragmento de ADN de la Región ITS se realizó utilizando el “QIAquick gel extracción Kit” de QIAGEN según las instrucciones del fabricante (Anexo 3). El producto de amplificación purificado fue seguidamente ligado en el vector pGemT-easy vector (Anexo 4). La introducción del ADN plasmídico por transformación se realizó utilizando el pGem T-easy vector system II Kit de Promega según las especificaciones del producto (Anexo 5), seguidamente se seleccionaron 10 colonias blancas las cuales fueron sembradas en 5ml de medio LB que contenían 60 µg/ml de ampicilina para luego ser incubadas a 37 °C por 24 horas. Se realizó la extracción del plásmido de *E. coli* conteniendo el fragmento de ADN de interés a partir de 5ml de cultivo bacteriano (medio LB más ampicilina 60 µg/ml) empleando el protocolo Wizard®Plus SV Minipreps DNA purification system de PROMEGA (Anexo 6), la confirmación de la presencia de la secuencia de ADN de la región ITS se realizó mediante digestión con Eco RI y electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Anexo 7) y finalmente los plásmidos de 10 colonias que presentaron el inserto por cada *Bulk* de ADN fueron enviadas a secuenciar a Gen Biotech (Argentina).

3.3.3 Análisis de datos

a. Identificación de la resistencia a la roya amarilla de los cafetos mediante el uso de marcadores moleculares

El análisis se realizó mediante la visualización en geles de agarosa de los patrones de amplificación de los marcadores moleculares asociados a la resistencia a roya amarilla del café en genotipos de cafés resistentes y susceptibles, tomando en cuenta el tamaño de los productos de amplificación previamente reportados para cada marcador.

b. Diversidad genética de la roya amarilla existente en la zona cafetalera de Quillabamba y Villa Rica

Para el análisis de la diversidad de la roya amarilla de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica, las secuencias de los ADNs de la región ITS (Espacio interno transcribible del gen del ARN ribosomal 5.8S, espacio interno transcribible 2 y secuencia incompleta del gen del ARN ribosomal 28S) fueron alineadas y editadas manualmente con el programa CodonCode Aligner v 2.0.6. Para el análisis de las secuencias se consideró como referencia las secuencias de la región ITS completa de *H. vastatrix*

almacenadas en el GenBank (EF 394118 - EF394132). Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa MAFFT implementado en la plataforma UGENE (Golosova, et al., 2014).

Los análisis de la diversidad nucleotídica y Haplotípica (Nei, 1979), así como el índice de Tajima (Tajima, 1989), se realizaron con el programa DNAsp v 5.1 (Librado y Rozas, 2009).

La Diversidad haplotípica (H_d), está expresada como la probabilidad de encontrar dos haplotipos diferentes en la muestra. La ecuación que permite estimar la diversidad haplotípica (H_d) esta expresada por la siguiente formula:

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

Dónde:

H_d : Diversidad haplotípica

n : Número de secuencias

h : Número de haplotipos diferentes

p_i : Frecuencia del haplotipo i .

La diversidad nucleotídica, mide el número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias de ADN seleccionadas al azar (Nei and Li, 1979). Ello se expresa por la siguiente ecuación:

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

Dónde:

π : Número promedio de diferencias por sitios entre secuencias tomadas en pares

x_i : Frecuencia de la secuencia i

x_j : Frecuencia de la secuencia j .

π_{ij} : es el número de diferencias de nucleótidos por sitio de nucleótidos entre la i -ésima y las secuencias de j .

La prueba D, examina el número de sitios de segregantes y el número medio de diferencias de nucleótidos (π_n) entre dos secuencias en muestra al azar de **n** secuencias de una población. (Tajima, 1989).

Cuando:

D = 0; población en equilibrio.

D < 0; exceso de haplotipos raros

D > 0; déficit de haplotipos raros

Para el determinar las semejanzas entre los haplotipos se construyó una red utilizando el algoritmo median Joining (MJ) (Bandelt et al. 1999) implementado en el programa PopArt. Al análisis se añadieron secuencias de las regiones ITS de dos poblaciones de *Hemileia vastatrix* almacenadas en el GenBank, que corresponden a secuencias de *H. vastatrix* colombianas reportadas por Cristancho et al., (2007) y a la raza II y XXII del “Centro de Investigaçã das Ferrugens do Cafeeiro” (CIFC).

c. Propuesta de una estrategia de mejoramiento genético para el cultivo de café en base a los estudios moleculares realizados

Se realizó a partir de la información reportada de la diversidad del café en el Perú, así como, de la obtenida del análisis de la resistencia mediante el uso de marcadores moleculares. Esta información fue complementada con los valores de diversidad genética hallada en el estudio poblacional de la roya amarilla realizado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de la resistencia a la roya amarilla en los cafetos procedentes de dos Regiones productoras de café en el Perú mediante el uso de marcadores moleculares

4.1.1 Extracción, calidad y cuantificación del ADN genómico de café

El uso de la metodología del CTAB para la extracción del ADN de hojas de café, permitió la obtención de ADNs de buena calidad (Figura 9), con concentraciones que estuvieron entre 500 ng y 1500 ng/ μ L y con una relación de absorbancia entre 1.8-2.0 nm.

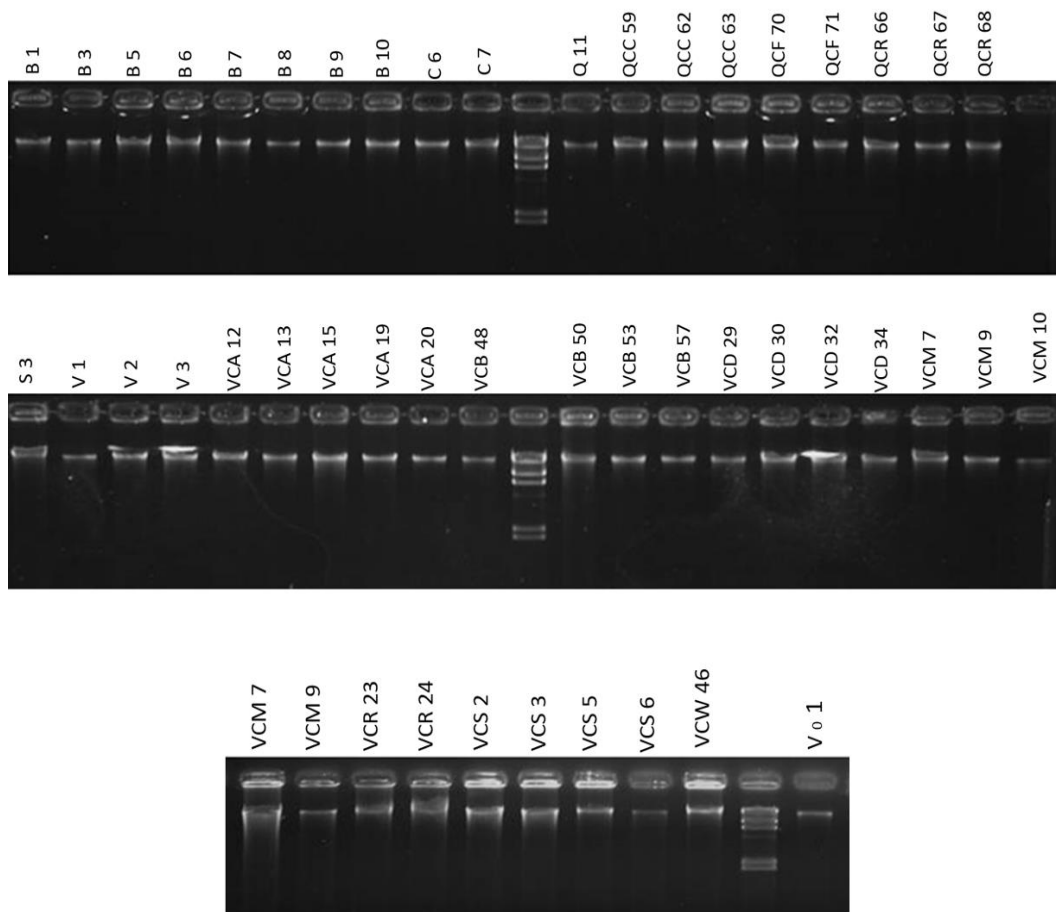


Figura 9. Gel de agarosa al 1% mostrando fragmentos de ADN genómico de café.

4.1.2 Amplificación de Marcadores Moleculares

a. Marcador CARF 005

La amplificación realizada con los cebadores del marcador CARF 005 produjo una banda monomórfica de aproximadamente 440 pb que estuvo presente tanto en los cafetos susceptibles como en resistentes (Figura 10). Este marcador, fue obtenido a partir de etiquetas de secuencias expresadas (EST) del Proyecto Brasileiro del Genoma del Café (Alvarenga et al., 2010 y 2011), está asociado a un marco de lectura abierta (ORF) que actúa como un factor de resistencia presente en *C. arábica*. La presencia de dicho marcador en cafetos susceptibles también fue observada por Alvarenga et al. (2011) en un genotipo susceptible de *Coffea dewevrei excelsa*. Por lo tanto, es posible que el factor de resistencia identificado por el marcador CARF 005 no esté otorgando la resistencia a las variantes de roya presente en las zonas de Quillabamba y Villa Rica. Por lo tanto, este marcador no podría ser usado en programas de mejoramiento genético contra la roya amarilla del café en el Perú.

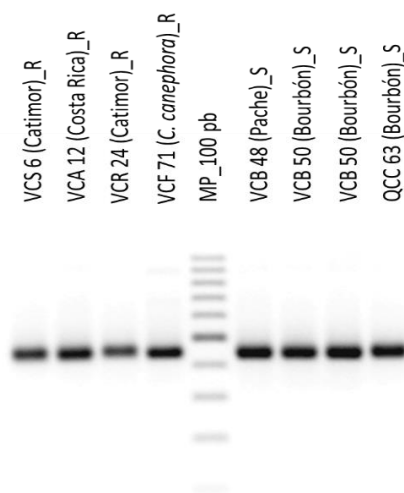


Figura 10. Gel de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación de aproximadamente 440 pb, amplificados con el par de iniciadores CARF 005, los cuales estuvieron presentes tanto en genotipos resistentes como en susceptibles.

b. Marcadores M19 y M20

Los marcadores M19 y M20 a pesar de haber sido probados en diferentes condiciones de amplificación en todos los casos no produjeron las bandas esperadas (Figura 11), sin

embargo, ambos marcadores SCARs provenientes de marcadores AFLPs que fueron desarrollados por Diola, (2011), se encuentran, equidistantes a 2.1 cM, flanqueando al gen R de resistencia a la raza II de la roya amarilla del café en derivados del Híbrido de Timor UFV 427-15. Estudios de validación de los marcadores M19 y M20 en una población de 47 genotipos procedentes del cruzamiento entre *C. arabica* variedad “Bourbon Vermelho” y *C. canephora* variedad “Robusta” realizados por De Oliveira et al. (2015), sugieren que la presencia del gen de resistencia a la raza II identificada por Brito et al. (2010) y Diola et al. (2011), probablemente se encuentra solo en los derivados del HDT UFV 427-15, y la transferencia de estos marcadores moleculares que están asociados al gen de resistencia a la raza II de roya del café para su uso en MAS en otras poblaciones es restringido. Los derivados del Híbrido de Timor son la principal fuente de genes de resistencia a enfermedades, y son muy utilizados en programas de mejoramiento genético del café (Setotaw et al. 2010). La no presencia de dichos marcadores determina la ausencia del gen R de resistencia a la raza II en los genotipos evaluados, y abre la posibilidad de existencia de otros factores de resistencia, y que la raza II reportada en el Perú ya desde el año 1979 no sea la causante de la epidemia iniciada en el año 2013 que ha provocado pérdidas hasta del 30% de la producción.

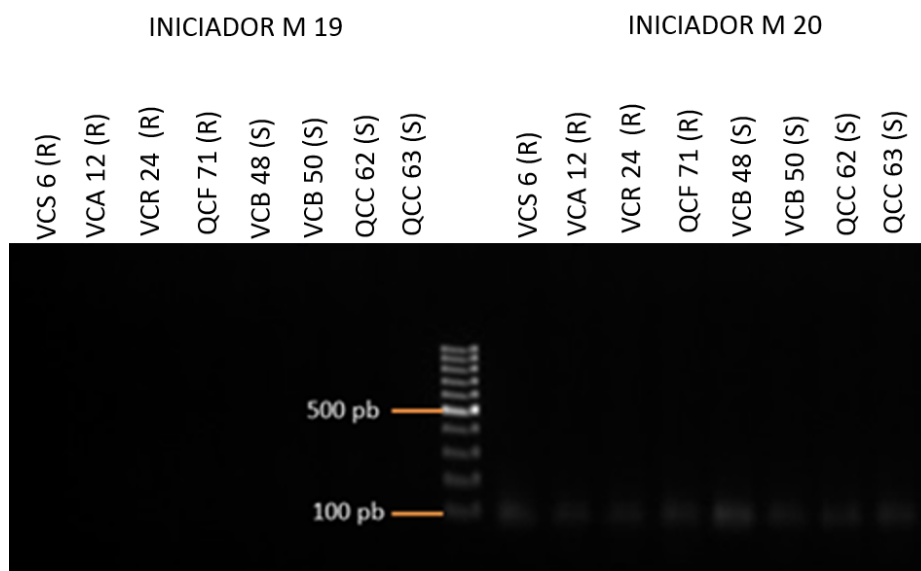


Figura 11. Gel de agarosa al 2% sin presencia de producto de amplificación para los iniciadores M19 y M20.

c. Marcador Sat 244 y Marcador BA-124-12K-f

El marcador Sat 244 produjo dos bandas (Figura 12), de los cuales una es monomórfica y está presente en los genotipos susceptibles y resistentes y la otra heteromórfica solamente para *C. canephora*. Todo lo contrario, el marcador BA-124-12K-f, no produjo ninguna banda. Se conoce que ambos marcadores se caracterizan por segregar en acoplamiento con el gen SH3, el cual es muy apreciado en los programas de mejoramiento genético actuales, por ser un gen mayor presente en *Coffea libérica* y no en *C. canephora* (Mahe et al., 2008) (Gonzales et al., 2009). La finalidad de usar estos dos marcadores fue evaluar la presencia de dicho gen en los cafetos analizados. En el presente trabajo todos los genotipos amplificaron dos bandas y al parecer, ninguna está relacionada a dicho factor de resistencia, por el contrario, los fragmento amplificados fueron de mayor peso molecular (350 y 380 pb) a excepción de la muestra de *C. canephora* que amplificó una banda de 290 pb. Por lo tanto, la ausencia de amplificados en nuestros genotipos tanto resistentes como susceptibles se podría explicar, por la carencia del factor de resistencia SH3. Un resultado muy similar también lo obtuvieron Gonzales et al. (2009), en genotipos de Caturra, Bourbon, C. Canephora e Híbrido de Timor.

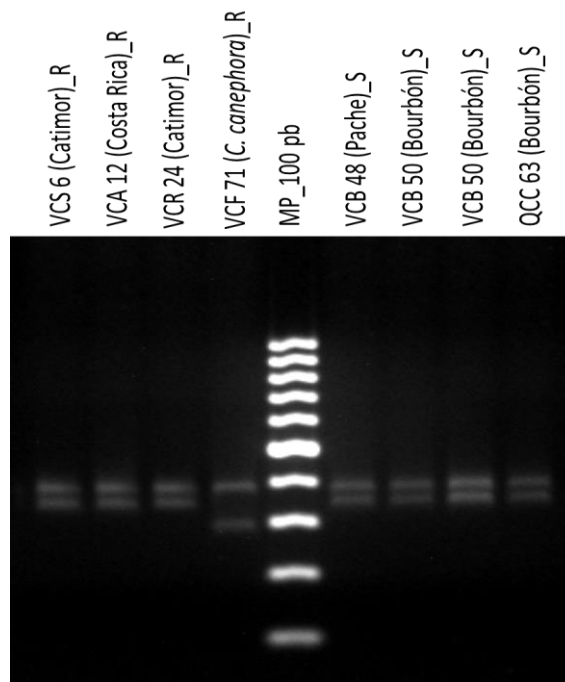


Figura 12. Gel de agarosa al 2% mostrando bandas de ADN monomórficos de 380 pb tanto en variedades resistentes como en susceptibles y una banda de ADN heteromórfica de 290 pb solo para *C. canephora*. Amplificados con los iniciadores SAT 244. Nomenclatura: R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular.

d. Marcadores Sat 225 y Sat 229

Los marcadores microsatélites Sat 225 y Sat 229 amplificaron fragmentos con los pesos esperados. Así el marcador Sat 225 produjo bandas con polimorfismo que si permitieron diferenciar genotipos resistentes de susceptibles (Figura 14); mientras que Sat 229 amplificó dos fragmentos monomórficos (Figura 13). Estudios realizados por Herrera et al. (2009) y Romero et al. (2014) ubican a estos dos marcadores en regiones distintas en el genoma del café, sugiriendo Herrera et al. (2009) que al menos dos locus con efectos aditivos estarían involucrados en la resistencia a la enfermedad, sin embargo, ambos marcadores están relacionados a la resistencia parcial a la roya amarilla. Según Van der Vossen (2005), la resistencia parcial a diferencia de la vertical involucra un conjunto de genes, que no son específicos para una raza particular de roya, y que para el caso del café serían pocos los genes involucrados en este tipo de resistencia.

De acuerdo con el patrón de amplificación presentado por el marcador Sat 229, todos los genotipos evaluados presentarían el factor de resistencia parcial, por lo tanto, no podría ser utilizado para diferenciar genotipos resistentes de genotipos susceptibles. En estudios realizados por Romero et al. (2014), sugieren que la presencia de la región QTL asociada a resistencia a roya amarilla estaría presente solo en los derivados del Híbrido de Timor particularmente en los derivados de CIFIC 1343 y CIFIC 832/2, por lo que los marcadores (SSR_SFCan022c, SSR_SFCan105d, SSR_SFCan105b, SSR_05RM1 y Sat 229) asociados a esta región QTL no podrían ser utilizados en otras poblaciones.

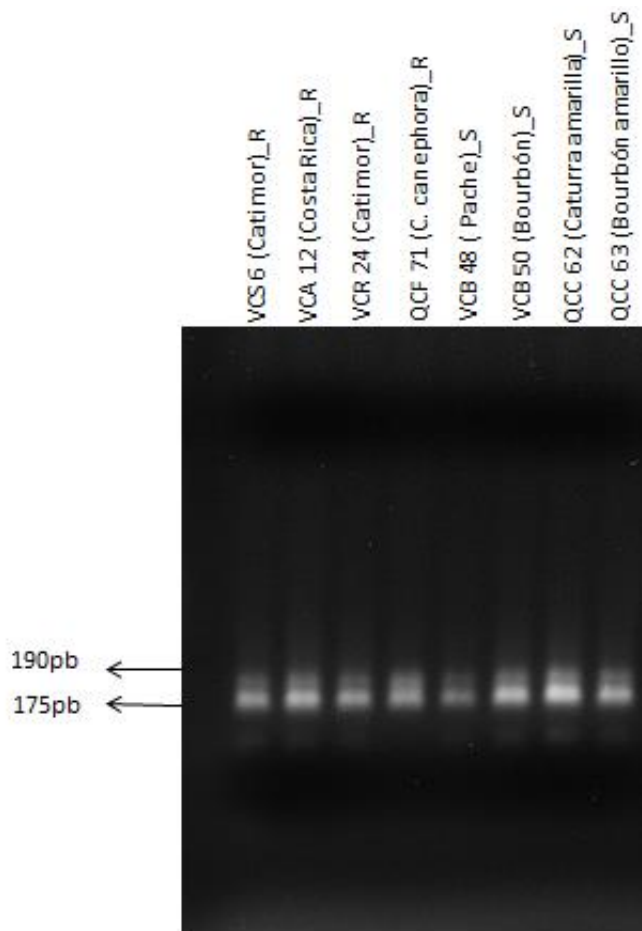


Figura 13. Gel de agarosa al 2% donde se observan bandas de ADN monomórficas de 175 pb y 190 pb aproximadamente amplificadas con los iniciadores Sat 229. Nomenclatura: R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular.

No obstante, el marcador Sat225 amplificó un patrón diferente entre individuos resistentes y susceptibles. Como se puede apreciar en la Figura 14, los cafetos resistentes presentaron tres bandas cuyos pesos aproximados son 350, 380 y 400 pb, mientras que los susceptibles son de 330, 380 y 390 pb. Además, la banda de 380 pb es compartida entre resistentes y susceptibles. Sin embargo, la banda 350 pb está presente solo en los genotipos resistentes. Los individuos de *C. canephora* presentan también la banda de 350 pb, por lo tanto, dicho fragmento estaría identificando a los genotipos resistentes.

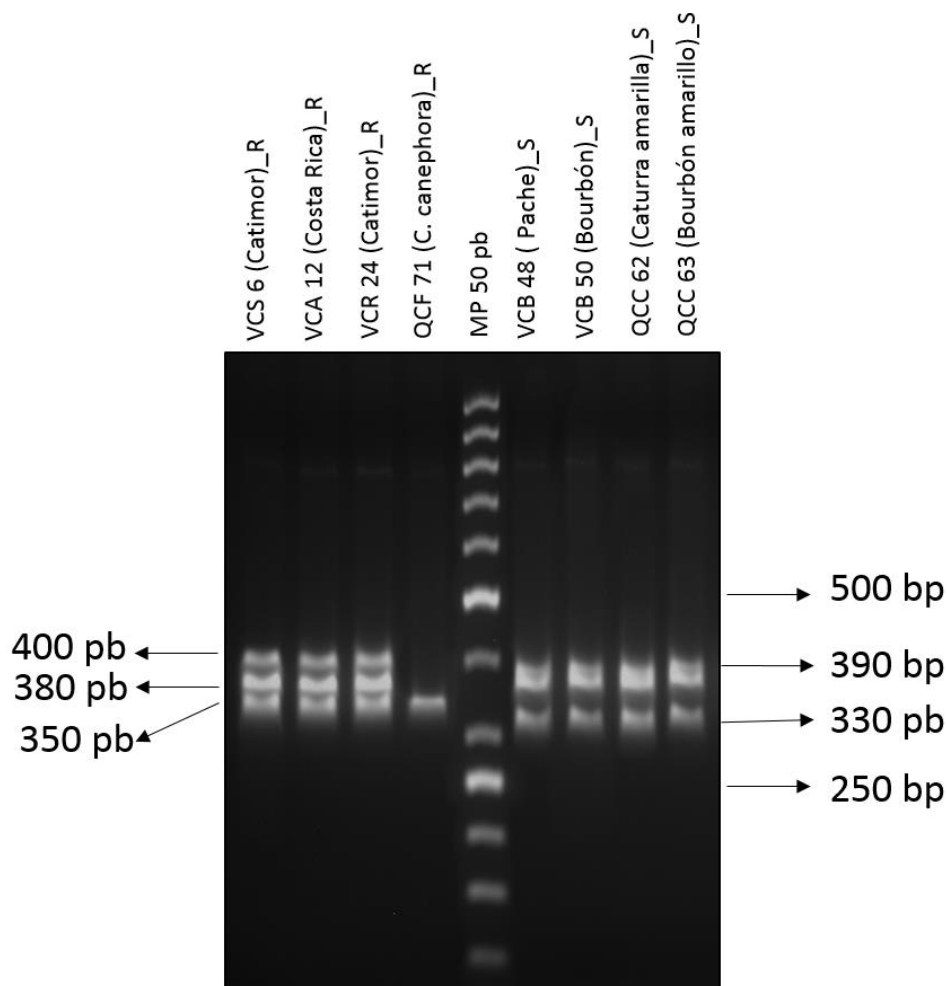


Figura 14. Gel de agarosa al 2% donde se observa bandas de ADN de 350 pb y 400 pb que caracterizan a las variedades resistentes y bandas de ADN de 330 pb y 390 pb para las variedades susceptibles, amplificadas con los iniciadores Sat225. Nomenclatura: R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular

El marcador Sat225 fue evaluado en toda la población (Figura 15); 10 genotipos de las variedades Catimor, Limaní, Costa Rica 95 y de *C. canephora*, amplificaron el fragmento de 350 pb evidenciando el patrón de resistencia; los restantes 38 genotipos de las variedades principalmente Typica, Caturra, Bourbon, Villa Sarchí, Geisha, Catuaí y Pache mostraron el patrón de susceptibilidad (Cuadro 5). De acuerdo con estos resultados el marcador Sat225 tiene alta frecuencia en las variedades consideradas resistentes del Perú, similar a Herrera et al., (2009) quien reporta una alta frecuencia de este marcador en las resistentes.

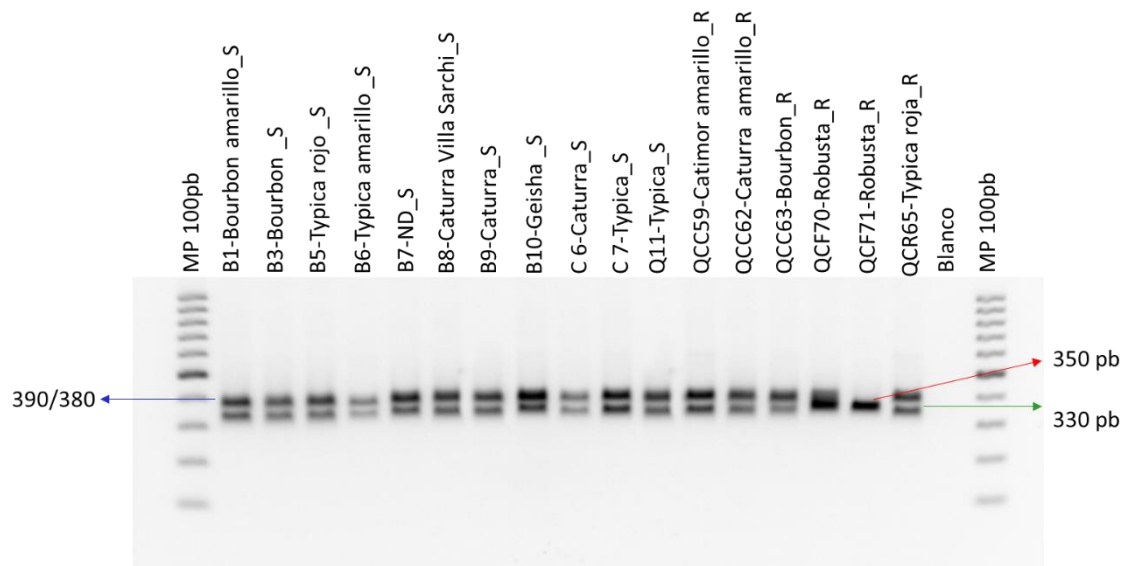


Figura 15. Gel de agarosa al 2%, en los que se muestran los fragmentos amplificados con el marcador Sat225 en una población de 25 accesiones de cafetos peruanos. R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular.

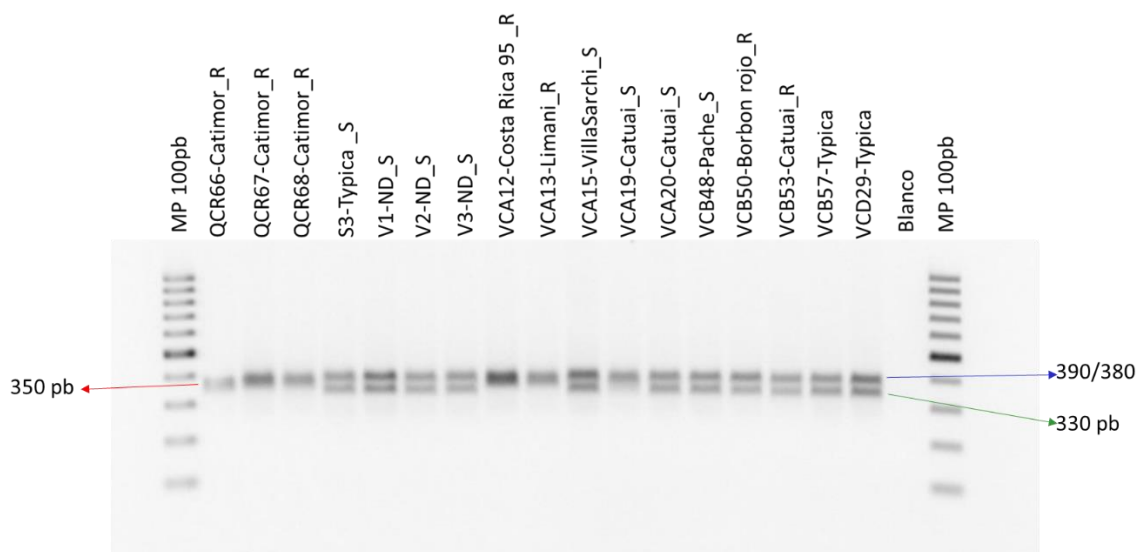


Figura 15. Gel de agarosa al 2%, en los que se muestran los fragmentos amplificados con el marcador Sat225 en una población de 25 accesiones de cafetos peruanos. R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular (continuación).

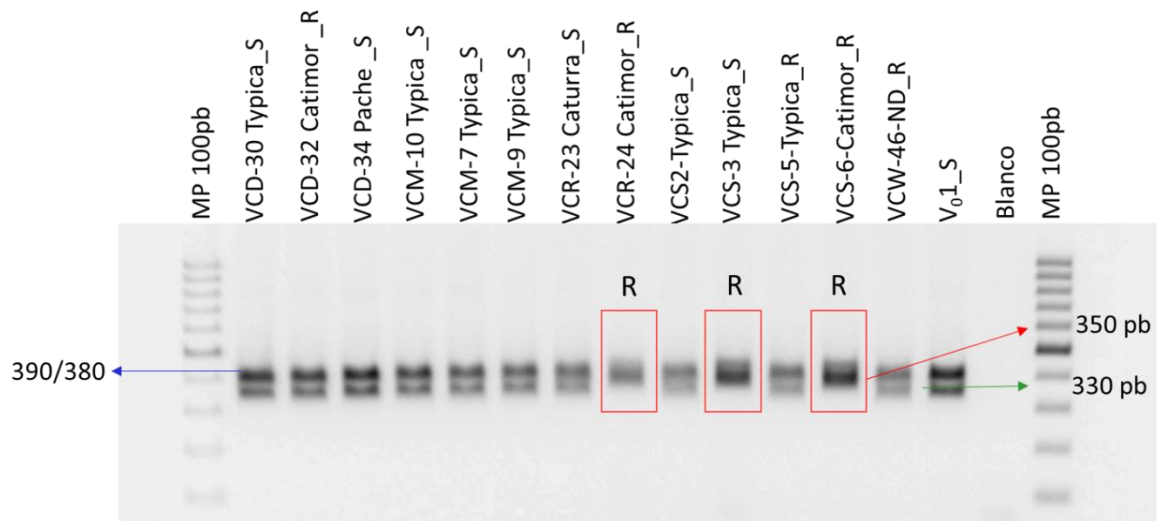


Figura 15. Gel de agarosa al 2%, en los que se muestran los fragmentos amplificados con el marcador Sat225 en una población de 25 accesiones de cafetos peruanos. R = Resistente, S = susceptible. MP = Marcador de peso molecular (continuación).

Cuadro 5: Distribución de los alelos del marcador Sat 225 en una población de 25 accesiones de cafetos de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica.

Código	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 3	Alelo 4	Alelo 5	Variedad*	Resistencia según el marcador Sat225
B1		390 pb	380 pb		330 pb	Bourbon Amarillo	Susceptible
B3		390 pb	380 pb		330 pb	Borbón	Susceptible
B5		390 pb	380 pb		330 pb	Typica Rojo	Susceptible
B6		390 pb	380 pb		330 pb	Typica Amarilla	Susceptible
B7		390 pb	380 pb		330 pb	ND	Susceptible
B8		390 pb	380 pb		330 pb	Caturra Villa Sarchi	Susceptible
B9		390 pb	380 pb		330 pb	Caturra	Susceptible
B10		390 pb	380 pb		330 pb	Geisha 727	Susceptible
C6		390 pb	380 pb		330 pb	Caturra	Susceptible
C7		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
Q11		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
QCC59		390 pb	380 pb		330 pb	Catimor Amarillo	Susceptible
QCC62		390 pb	380 pb		330 pb	Caturra Amarilla	Susceptible
QCC63		390 pb	380 pb		330 pb	Bourbon	Susceptible
QCF70				350 pb		Robusta	Resistente
QCF71				350 pb		Robusta	Resistente
QCR65		390 pb	380 pb		330 pb	Typica Roja	Susceptible
QCR66	400 pb		380 pb	350 pb		Catimor	Resistente
QCR67	400 pb		380 pb	350 pb		Catimor	Resistente
QCR68	400 pb		380 pb	350 pb		Catimor	Resistente
S3		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
V1		390 pb	380 pb		330 pb	ND	Susceptible
V2		390 pb	380 pb		330 pb	ND	Susceptible
V3		390 pb	380 pb		330 pb	ND	Susceptible
VCA12	400 pb		380 pb	350 pb		Costa Rica 95	Resistente
VCA13	400 pb		380 pb	350 pb		Limaní	Resistente
VCA15		390 pb	380 pb		330 pb	Villa Sarchi	Susceptible
VCA19		390 pb	380 pb		330 pb	Catuai	Susceptible
VCA20		390 pb	380 pb		330 pb	Catuai	Susceptible
VCB48		390 pb	380 pb		330 pb	Pache	Susceptible
VCB50		390 pb	380 pb		330 pb	Bourbon Rojo	Susceptible
VCB53		390 pb	380 pb		330 pb	Catuai	Susceptible
VCB57		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
VCD29		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
VCD30		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
VCD32		390 pb	380 pb		330 pb	Catimor	Susceptible
VCD34		390 pb	380 pb		330 pb	Pache	Susceptible
VCM10		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
VCM7		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
VCM9		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
VCR23		390 pb	380 pb		330 pb	Caturra	Susceptible
VCR24	400 pb		380 pb	350 pb		Catimor	Resistente
VCS2		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
VCS3	400pb		380 pb	350pb		Typica	Resistente
VCS5		390 pb	380 pb		330 pb	Typica	Susceptible
VCS6	400 pb		380 pb	350 pb		Catimor	Resistente
VCW46		390 pb	380 pb		330 pb	ND	Susceptible
Vo 1		390 pb	380 pb		330 pb	ND	Susceptible

4.2 Diversidad genética de la roya amarilla existente en la zona cafetalera de Quillabamba y Villa Rica.

4.2.1 Extracción, calidad y cuantificación del ADN de la roya amarilla

La extracción del ADN utilizando el protocolo descrito por Cristancho et al. (2007) con modificaciones, permitió la obtención de ADN de buena calidad (Figura 16) con valores de concentración entre 267.5 ng/μl y 1342.5 ng/μl y con una relación de absorbancia entre 260/280 entre 2.13 - 2.22 (Anexo 8)

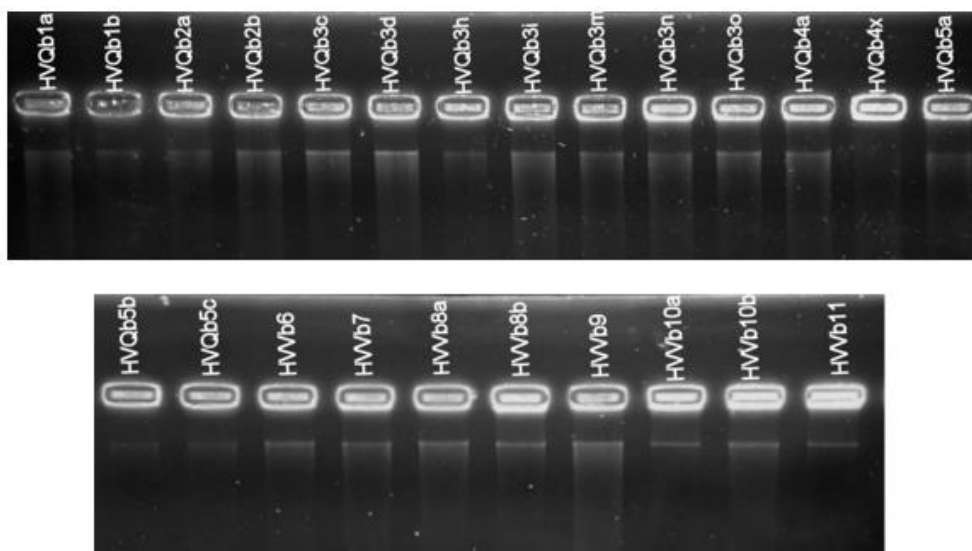


Figura 16. Gel de agarosa al 1% mostrando fragmentos de ADN del genoma de *Hemileia vastatrix*.

4.2.2 PCR y Secuenciación

El producto de amplificación que se obtuvo a partir del ADN genómico de la roya amarilla mediante amplificación con los iniciadores ITS tuvo tamaños de 1100 pb aproximadamente como se observa en la Figura 17.

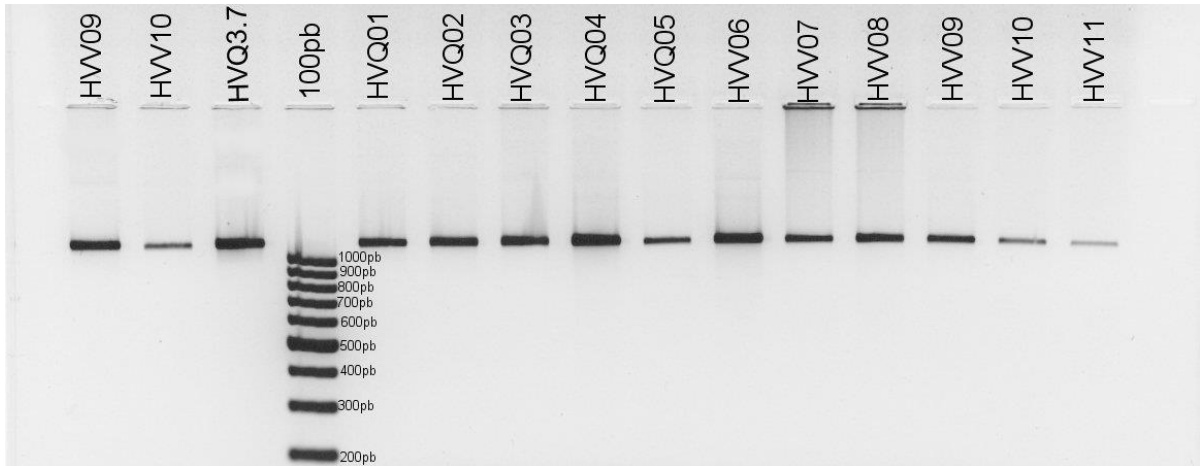


Figura 17. Gel de agarosa al 1% mostrando la región ITS (fragmento de ADN de interés).

La verificación del inserto dentro del plásmido de la bacteria se realizó mediante dos técnicas, una por amplificación utilizando el iniciador M13 (Figura 18) y la segunda se efectuó utilizando enzimas de restricción Eco RI (Figura 19), de las 110 colonias de color blanco seleccionadas solo 106 colonias presentaron el ADN plasmídico con el fragmento de interés.

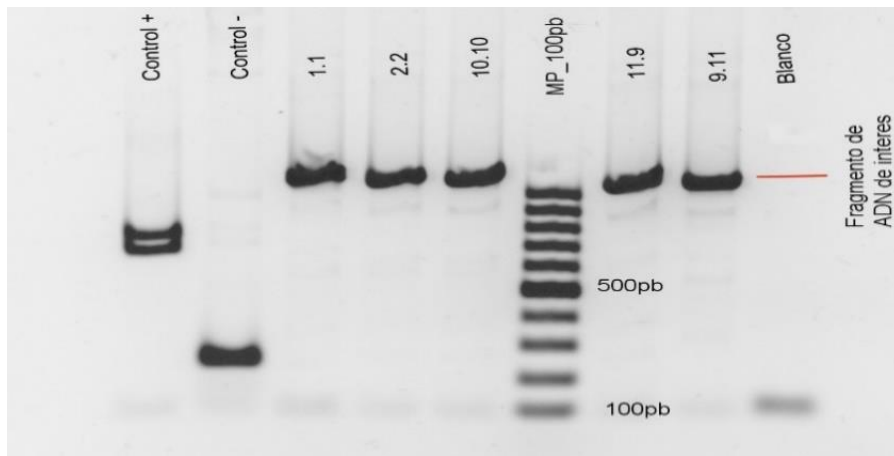


Figura 18. Gel de agarosa al 1.5% mostrando fragmentos de ADN de interés con aproximadamente 1100 pb que corresponden a la región ITS de *H. vastatrix*, además se muestran los controles positivos y negativos.

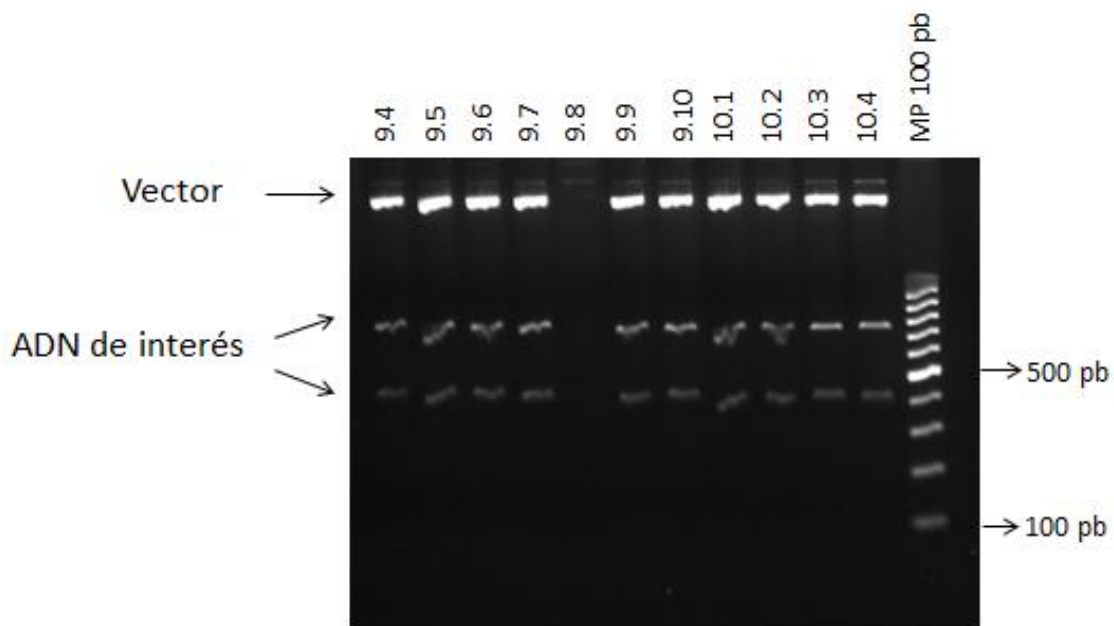


Figura 19. Gel de agarosa al 1.5% mostrando 2 fragmentos de ADN de aproximadamente 700 y 400 pb respectivamente (ADN de interés), que corresponden a la región ITS, que representa una región de reconocimiento para la enzima de digestión Eco RI.

4.2.3 Análisis de la diversidad genética

a. Análisis de la diversidad genética de dos poblaciones de roya.

A partir de las muestras de *H. vastatrix* colectadas en los fundos de Quillabamba (Cinco fundos) y de Villa Rica (Siete fundos) se obtuvieron 106 secuencias de ADN de la región ITS de *Hemileia vastatrix*. Las longitudes de las secuencias se encontraron entre el rango de 910 pb y 918 pb.

Del alineamiento de estas secuencias se obtuvieron 921 sitios alineados, de los cuales 21 resultaron ser *gaps* (inserciones o deleciones). Asimismo, se encontró 101 sitios polimórficos, con 11 posiciones parsimoniosas informativas (Cuadro 6).

Cuadro 6: Valores de los parámetros obtenidos sobre las medidas descriptivas de la variabilidad de las secuencias de la región ITS para las zonas productoras de Quillabamba y Villa Rica

Distritos	Número de secuencias	Número de nucleotidos	Diversidad Nucleotídica (Pi)	Número de Haplotipos (H)	Diversidad de haplotipos (Hd)	Índice de Tajima (D)	Sitios variables	Singleton variable sites	Posiciones informativas parsimoniosas
Quillabamba	49	919	0.00540 +/- 0.00038	38	0.977 +/- 0.012	-2.35287 P < 0.01	66	57	9
Villa Rica	57	921	0.00293 +/- 0.00026	36	0.934 +/- 0.024	-6.09578 P < 0.01	47	42	5
Quillabamba -VillaRica	106	921	0.00409 +/- 0.00024	68	0.953 +/- 0.014	-2.66315 P < 0.001	101	90	11
Perú-Colombia-Portugal	121	921	0.00351 +/- 0.00022	73	0.951 +/- 0.013	-2.72541 P < 0.001	103	92	11

Entre las dos zonas cafetaleras se halló un total de 68 haplotipos con una diversidad haplotípica ($H_d = 0.953 \pm 0.014$) y nucleotídica ($P_i = 0.00409 \pm 0.00024$); con 62 haplotipos con secuencias únicas y 6 haplotipos conformados por más de dos secuencias (Cuadro 7). Los haplotipos Hap_4, Hap_8, Hap_36 y Hap_21, que se encontraron en mayor frecuencia, se podrían considerar como los ancestrales (Figura 20); además, éstos se encuentran distribuidos en ambas zonas cafetaleras, a donde debieron haber llegado en tiempos diferentes adaptándose a las condiciones ambientales de cada zona. Los haplotipos Hap_4 y Hap_36 son más frecuentes en Villa Rica; mientras que, Hap_8 y Hap_21 son más frecuentes en Quillabamba. Esta distribución de los ancestrales en las dos zonas obedece a la teoría genética de coalescencia observada también por Santana et al. (2007) en poblaciones de este hongo en Brasil.

Del análisis de las poblaciones de *H. vastatrix* de Quillabamba y Villa Rica, se ha determinado que la mayor diversidad genética se encuentra en la zona cafetalera de Quillabamba, porque presenta los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica más altos (Cuadro 6).

Al no observarse en la red haplotípica de la Figura 20, nodos exclusivos por región geográfica, se estaría evidenciando una población de *H. vastatrix* grande e indiferenciada, que pudo haberse generado por el flujo de las esporas entre ambas zonas, favorecido por el movimiento de personas, semillas y/o plantas infectadas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Cabral et al. (2016) en Brasil, quienes no observan una estructuración de la población de *H. vastatrix* respecto a su origen, hospedero ni razas fisiológicas; sin embargo, la diversidad genética fue relativamente menor a la hallada en el presente trabajo. No obstante, Maia et al. (2013) también en Brasil, obtuvieron resultados similares al presente trabajo, a través del estudio de 91 aislados del hongo, proponiendo que *H. vastatrix* se comporta como una gran población indiferenciada con una alta diversidad genotípica, y de igual forma, sin estructuración con respecto a su origen geográfico y de hospedero. Por lo tanto, la falta de estructuración de las dos poblaciones de *H. vastatrix* por regiones podría explicarse por la dispersión del hongo a grandes distancias.

La prueba de neutralidad de Tajima se realizó para las poblaciones de *H. vastatrix* de Villa Rica ($D = -2.50181$; $P < 0.001$), Quillabamba ($D = -2.35287$; $P < 0.001$), así como, de ambas zonas juntas ($D = -2.66315$; $P < 0.001$). Estos valores menores a 0 indican que las

poblaciones del hongo se encuentran en proceso de expansión. Además, éstas se habrían originado a partir de pocos genotipos que fueron introducidos recientemente, o serían los descendientes de la raza II, la cual, según Scheiber y Zentmyer (1984), existe desde el año 1979 en el Perú. También, estos valores negativos de D de Tajima explicarían la presencia en la red haplotípica de un elevado número de haplotipos únicos que vienen incrementando la variabilidad, y que es el resultado de un crecimiento acelerado de la población. Por lo tanto, se refleja el estado de la población de *H. vastatrix* y se estaría demostrando que el origen de la epidemia de roya amarilla del café en el Perú que se inició en el año 2013 fue a partir de pocos individuos. Sin embargo, no se ha podido establecer un efecto de la altitud sobre el nivel del mar en la población, puesto que el valor negativo de la prueba de Tajima indicaría que aún no es evidente la existencia de un proceso selección.

Los mecanismos que conducen al incremento de la variabilidad y la creación de nuevas razas de *H. vastatrix* no se conocen. Por lo tanto, se podría considerar a las mutaciones espontáneas como el principal mecanismo responsable de la creación de variabilidad en el hongo, principalmente en las épocas de mayor incidencia de la enfermedad. Además, se debe sumar la presión de selección ejercida por el medio ambiente; al respecto, en Brasil, Varzea y Marques (2005) consideran que la presencia de genes de resistencia de algunas variedades en el hospedero, incrementan el número de mutantes virulentos en la población. Otro factor que podría explicar el surgimiento frecuente y rápido de nuevas variantes es la criptosexualidad (Carvalho et al., 2011), la cual podría estar jugando un papel importante en la generación de variabilidad genética de *H. vastatrix*.

Cuadro 7: Información de los haplotipos, su frecuencia dentro de las diferentes zonas de origen y las secuencias que lo conforman.

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencias
		Quillabamba	Villa Rica	Colombia	CIFC	
Hap_1	1	1	0	0	0	HVQ_1.1
Hap_2	2	2	0	0	0	HVQ_1.2; HVQ_1.5
Hap_3	1	1	0	0	0	HVQ_1.3
Hap_4	23	7	13	1	2	HVQ_1.4; HVQ_2.4; HVQ_2.10; HVQ_3.3; HVQ_3.5; HVQ_3.10; HVQ_5.9; HVV_6.3; HVV_6.9; HVV_8.5; HVV_9.2; HVV_9.4; HVV_10.2; HVV_10.4; HVV_10.9; HVV_10.8; HVV_10.8; HVV_11.11; HVV_11.5; HVV_11.6; RaceII-1126; HVV_11.9; raceXXII-535; CT_2_N
Hap_5	1	1	0	0	0	HVQ_1.6
Hap_6	1	1	0	0	0	HVQ_1.7
Hap_7	1	1	0	0	0	HVQ_1.8
Hap_8	9	5	4	0	0	HVQ_1.9; HVQ_1.10; HVQ_2.2; HVQ_2.7; HVQ_3.1; HVV_6.6; HVV_8.3; HVV_8.8; HVV_8.10
Hap_9	1	1	0	0	0	HVQ_2.1
Hap_10	1	1	0	0	0	HVQ_2.5
Hap_11	1	1	0	0	0	HVQ_2.6
Hap_12	1	1	0	0	0	HVQ_2.8
Hap_13	1	1	0	0	0	HVQ_2.9
Hap_14	1	1	0	0	0	HVQ_3.2
Hap_15	1	1	0	0	0	HVQ_3.4
Hap_16	1	1	0	0	0	HVQ_3.6
Hap_17	1	1	0	0	0	HVQ_3.7
Hap_18	2	1	0	1	0	HVQ_3.8; VColPa1_2
Hap_19	1	1	0	0	0	HVQ_3.9
Hap_20	1	1	0	0	0	Bulk_4.1
Hap_21	6	2	1	3	0	Bulk_4.6; HVQ_5.6; HVV_9.1; CT_12_v; CTInNa1; CT_7_N
Hap_22	1	1	0	0	0	Bulk_4.10
Hap_23	1	1	0	0	0	Bulk_4.2
Hap_24	1	1	0	0	0	Bulk_4.4
Hap_25	1	1	0	0	0	Bulk_4.5
Hap_26	1	1	0	0	0	Bulk_4.9
Hap_27	1	1	0	0	0	Bulk_4.7
Hap_28	1	1	0	0	0	Bulk_4.3
Hap_29	1	1	0	0	0	Bulk_4.8
Hap_30	1	1	0	0	0	HVQ_5.1
Hap_31	1	1	0	0	0	HVQ_5.2
Hap_32	1	1	0	0	0	HVQ_5.3
Hap_33	1	1	0	0	0	HVQ_5.4
Hap_34	2	1	1	0	0	HVQ_5.5; HVV_11.3
Hap_35	1	1	0	0	0	HVQ_5.7
Hap_36	10	1	7	2	0	HVQ_5.8; HVV_6.2; HVV_8.1; HVV_8.2; HVV_8.4; HVV_8.6; HVV_8.7; HVV_11.8; CTInNa2; CT_13_v
Hap_37	1	1	0	0	0	HVQ_5.10
Hap_38	1	0	1	0	0	HVV_6.1
Hap_39	1	0	1	0	0	HVV_6.4
Hap_40	1	0	1	0	0	HVV_6.5

Cuadro 7: Información de los haplotipos, su frecuencia dentro de las diferentes zonas de origen y las secuencias que lo conforman. (Continuación).

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencias
		Quillabamba	Villa Rica	Colombia	CIFC	
Hap_41	1	0	1	0	0	HVV_6.7
Hap_42	1	0	1	0	0	HVV_6.8
Hap_43	1	0	1	0	0	HVV_6.10
Hap_44	1	0	1	0	0	HVV_7.1
Hap_45	1	0	1	0	0	HVV_7.2
Hap_46	1	0	1	0	0	HVV_7.3
Hap_47	1	0	1	0	0	HVV_7.4
Hap_48	1	0	1	0	0	HVV_7.5
Hap_49	1	0	1	0	0	HVV_7.6
Hap_50	1	0	1	0	0	HVV_7.7
Hap_51	1	0	1	0	0	HVV_7.9
[Hap_52	1	0	1	0	0	HVV_7.10
Hap_53	1	0	1	0	0	HVV_9.5
Hap_54	1	0	1	0	0	HVV_9.6
Hap_55	1	0	1	0	0	HVV_9.7
Hap_56	1	0	1	0	0	HVV_9.9
Hap_57	1	0	1	0	0	HVV_9.10
Hap_58	1	0	1	0	0	HVV_10.1
Hap_59	1	0	1	0	0	HVV_10.5
Hap_60	1	0	1	0	0	HVV_10.6
Hap_61	1	0	1	0	0	HVV_10.10
Hap_62	1	0	1	0	0	HVV_10.7
Hap_63	1	0	1	0	0	HVV_10.3
Hap_64	1	0	1	0	0	HVV_11.10
Hap_65	1	0	1	0	0	HVV_11.1
Hap_66	1	0	1	0	0	HVV_11.2
Hap_67	1	0	1	0	0	HVV_11.4
Hap_68	1	0	1	0	0	HVV_11.7
Hap_69	1	0	0	1	0	CTSol_1
Hap_70	2	0	0	1	1	CTInNa3; RaceXXII-637
Hap_71	1	0	0	1	0	CT_18_N
Hap_72	1	0	0	1	0	CT_28_v
Hap_73	1	0	0	1	0	CT-9-8

Hap: haplotipo

HVQ: Corresponde a la codificación de las muestras de roya amarilla que proceden de la zona cafetalera de Quillabamba (H: Hemileia; V: vastatrix; Q: Quillabamba).

HVV: Corresponde a la codificación de las muestras de roya amarilla que proceden de la zona cafetalera de Villa Rica (H: Hemileia; V: vastatrix; V: Villa Rica).

CT: corresponden a muestras de roya amarilla de Colombia

Race XXII y Race II: muestras que corresponden al CIFC

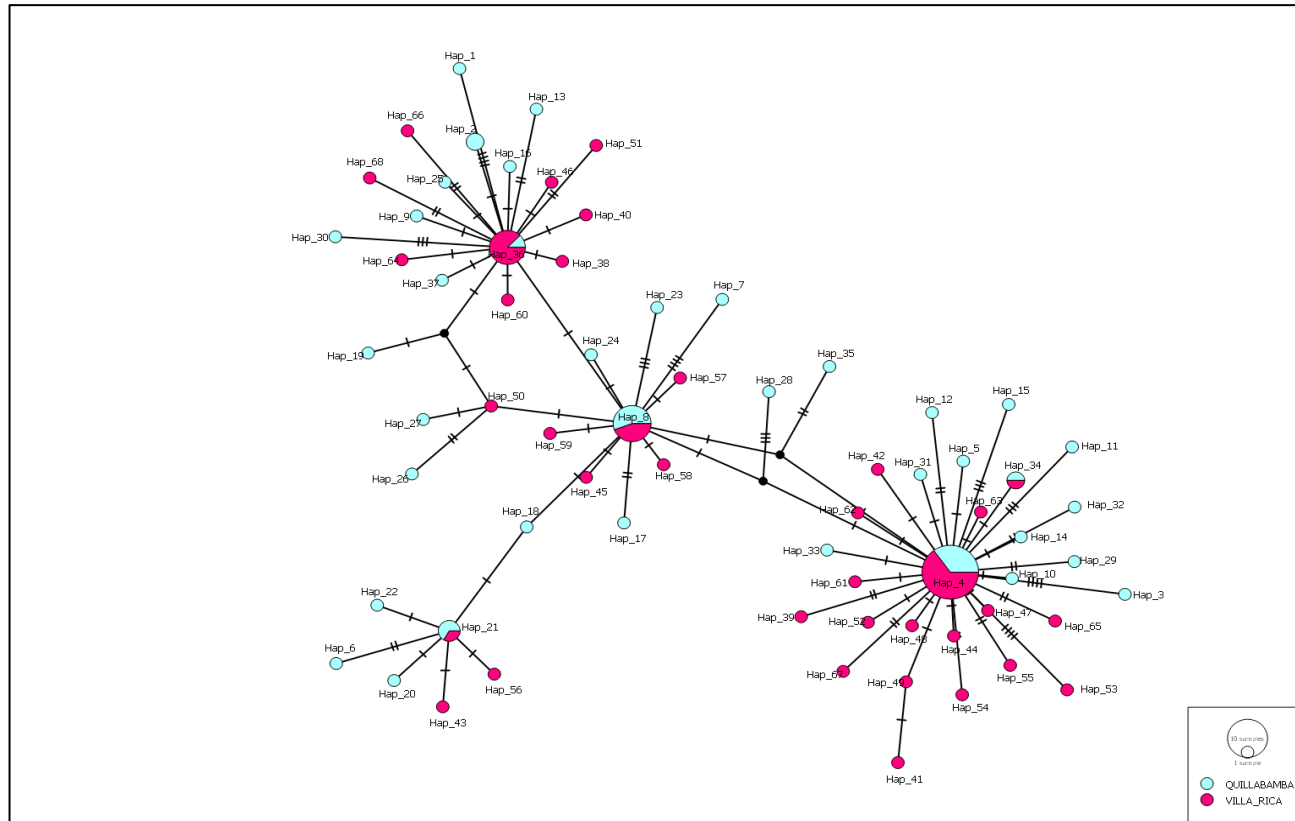


Figura 20. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 68 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos perdidos o no muestreados están representados por nodos de color negro.

b. Análisis de la diversidad genética de la roya peruana, colombiana y del CIF

Al análisis de las secuencias ITS de las poblaciones de *H. vastatrix* peruanas se incluyeron 15 secuencias de ADN de la región ITS del hongo que se encuentran almacenadas en el GenBank, de las cuales 12 corresponden a *H. vastatrix* colombianas y tres a las del CIFC, estas últimas son haplotipos de la raza II y XXII (Figura 21). En dicho análisis se hallaron un total de 73 haplotipos, de los cuales 65 fueron únicos (no presentaron repeticiones). Además, se evidenció que el haplotipo Hap_4 contiene a la raza II y XXII; se encuentra en mayor frecuencia y está distribuida en todas las zonas estudiadas (siete secuencias de Quillabamba, 13 de Villa Rica, uno de Colombia y dos de CIFC). Por lo tanto, a partir de este haplotipo ancestral, se podría suponer, que surgieron los demás, corroborando lo planteado por Zambolim et al. (2005) en Brasil, quien sugiere que a partir de la raza II surgieron las demás razas; y es la predominante en América Latina (Cristancho et al., 2007). Así mismo, se observa que los haplotipos Hap_36 y Hap_21 presentes en Colombia, Villa Rica y Quillabamba, son nodos que aparecieron en momentos posteriores. Además, el haplotipo Hap_8 se encuentra presente solamente en Quillabamba y Villa Rica, el cual luego de ingresar o surgir en el Perú se pudo adaptar mejor a las condiciones ambientales de las zonas cafetaleras peruanas. De acuerdo con lo observado en los principales nodos, en los cuales es reiterativa la presencia de secuencias de *H. vastatrix* colombianas y peruanas, se podría sugerir que en el Perú y Colombia la enfermedad pudo provenir de la misma zona llegando con cuatro años de diferencia (Scheiber y Zentmyer, 1984; Buriticá, 2010) Además, en la red no se observan nodos por origen de procedencia, lo que estaría indicando que las secuencias de *H. vastatrix* colombianas son similares a las secuencias de las peruanas. Existen reportes de estudios que se realizaron a inicios de 1970, que le atribuyen al viento un rol muy importante en la diseminación de la enfermedad. Martines et al. (1975) comprobaron la presencia de uredosporas a más de 1000 m de altura con una buena viabilidad de germinación, asimismo la dispersión por el viento fue sugerida como la causa de introducción y rápida diseminación del hongo a Sudamérica (Bowden et al., 1971); también se mencionan otros medios de dispersión de la enfermedad, por ejemplo la introducción de la enfermedad a Brasil a través de plantas procedentes de África, por personas (trabajadores migrantes) y por semillas (Schieber, 1972), por lo tanto, la dispersión antropogénica pudo tener un rol muy importante en la llegada del hongo al Perú.

Basados en el análisis de poblaciones del hongo de las regiones estudiadas, se podrían generar tres hipótesis acerca del origen de la epidemia de roya amarilla del café surgida en el año 2013 en el Perú. La primera postularía que existió la introducción de una nueva raza de *H. vastatrix* al Perú, la cual provino de la Raza II, y debió adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales de las zonas cafetaleras, que se encuentran en altitudes superiores a los 1000 msnm. Además, por la mayor frecuencia observada de los principales haplotipos ancestrales en Villa Rica debió llegar antes a esta zona que a Quillabamba; sin embargo, en la red haplotípica existen más de un nodo principal considerados como ancestrales (Hap_4, Hap_8, Hap_21 y Hap_36). Estos cuatro haplotipos debieron llegar de una manera progresiva y en un corto periodo de tiempo al Perú. Así mismo, el haplotipo Hap_4 que corresponde a la raza II, está en mayor frecuencia en ambas zonas cafetaleras e incluyen en su conformación a la secuencia CT_2N colombiana.

La segunda hipótesis postularía que hubo una evolución de la población de *H. vastatrix* a partir de la raza II, generándose una variante capaz de infectar a los cafetos de altura; sin embargo, de acuerdo a lo observado en la red haplotípica (Figura 21), debieron formarse de manera casi simultánea al menos 4 variantes las que corresponden a los haplotipos ancestrales; no obstante, en dos de ellos (Hap_4 y Hap_36) se encuentran secuencias tanto de Colombia como de Perú, las cuales debieron generarse simultáneamente en ambos países o de lo contrario pudieron haber sido introducidos desde el Perú, lo cual es una posibilidad poco probable considerando que existen controles sobre el movimiento de todo material vegetal (Cristancho et al., 2007).

La tercera hipótesis, apunta a los cambios en las condiciones climáticas que habrían favorecido la reproducción del hongo y su expansión hacia las zonas por encima de los 1000 msnm. Esta hipótesis se sustenta con lo observado en la red haplotípica (Figura 21), en la cual, se han formado 4 nodos correspondientes a los haplotipos ancestrales (Hap_4, Hap_8, Hap_21 y Hap_36), posiblemente existentes desde hace años atrás, porque se encuentran en ambas zonas cafetaleras peruanas y están en proceso de expansión. Además, el haplotipo de mayor frecuencia es Hap_4 que corresponde a la raza II, la cual existe desde el año 1979 en el Perú. Esta hipótesis, es similar a la que propusieron, Cristancho et al. (2012) en Colombia para el origen de la epidemia de roya del café ocurrido en el año 2008 y que afectó los cafetos colombianos sobre los 1400 msnm.

Mediante el análisis de la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* a través de la secuenciación de la región ITS, se determinó que los valores de diversidad haplotípica para las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica del Perú fueron altos (0.934 +/- 0.024 y 0.977 +/- 0.012 respectivamente); no obstante, la diversidad nucleotídica fue baja (0.00293 +/- 0.00026 y 0.00540 +/- 0.00038, respectivamente). Sin embargo, la mayor diversidad de *H. vastatrix* se encuentra en la zona cafetalera de Quillabamba. Entre las dos zonas evaluadas se ha encontrado una población grande no diferenciada por zona de procedencia, y sus haplotipos son similares a los de Colombia. Las secuencias de las razas II y XXII almacenadas en el GenBank que corresponden al haplotipo Hap_4, se encuentran tanto en Quillabamba como en Villa Rica. Además, se proponen tres hipótesis para explicar el incremento de la intensidad de la roya en el Perú.

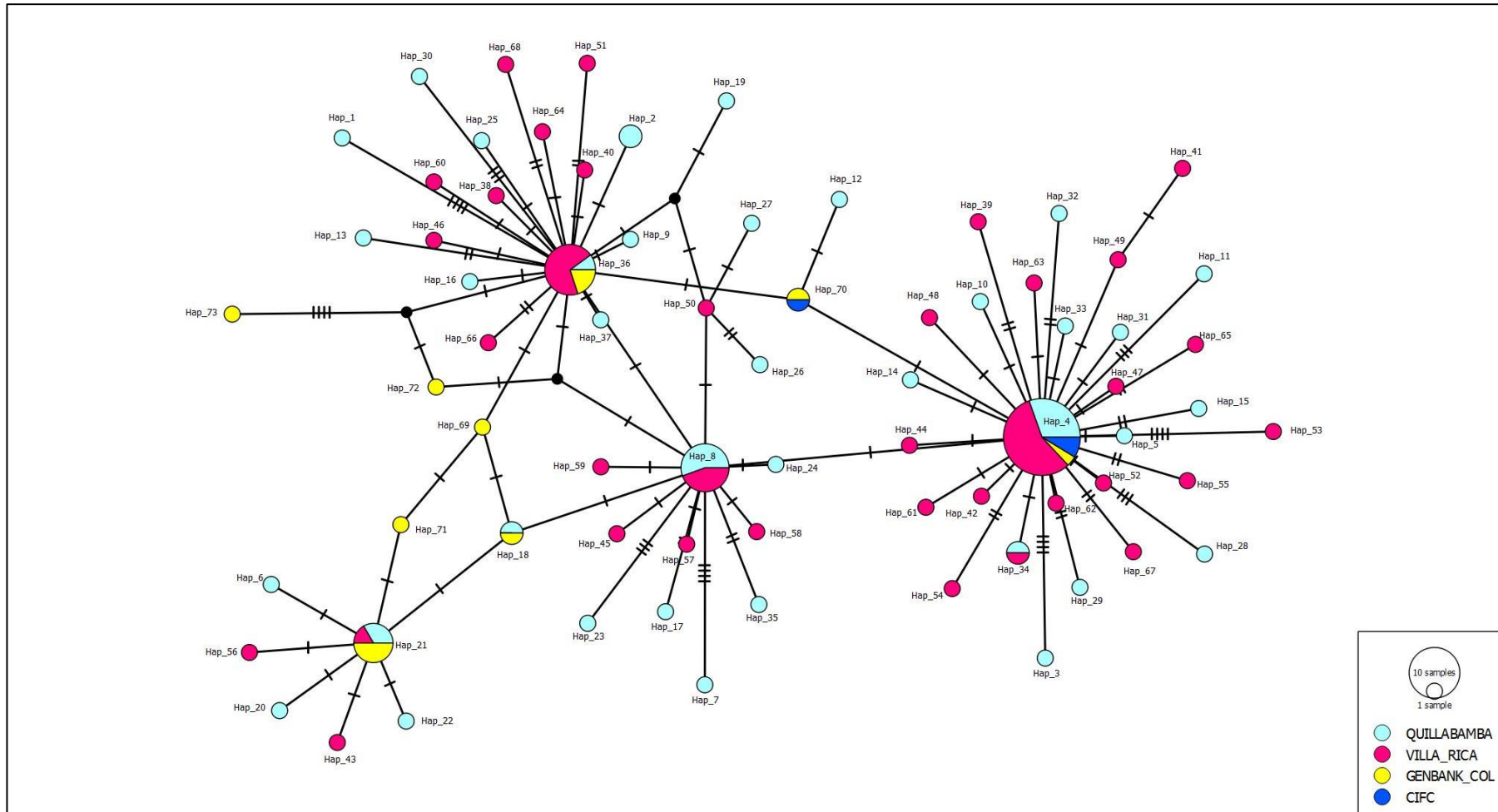


Figura 21. Red haplotípica por el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 73 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y del Cifc. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos no muestreados están representados por nodos de color negro.

4.3 Estrategia para el mejoramiento genético en café en base a estudios moleculares

La elección de la estrategia de mejoramiento genético a ser utilizada en un cultivo dependerá de muchos factores, entre los que se encuentran, el tipo de reproducción de la planta, la variabilidad del cultivo y el acervo genético que servirá de fuente de genes. Para el caso del mejoramiento a patógenos, también, es necesario el conocimiento de la biología del patógeno, como su fisiología; y en la población, la variación y distribución de las frecuencias génicas, con la finalidad de predecir los cambios evolutivos que puedan acontecer. El Mejoramiento genético del café contra la roya amarilla en el Perú presenta notables dificultades, sumada a la baja variabilidad genética en los cultivares (Palomino et al., 2014), muy poco se ha estudiado respecto a la población del hongo.

Sin embargo, por estudios realizados en los diferentes países productores a nivel mundial se ha logrado establecer que la resistencia del café a *H. vastatrix* es de tipo vertical (Prakash, 2004). Por lo tanto, los factores de resistencia genética presentes en el café se ajustan al modelo propuesto por Flor (1954) que consiste en la interacción gen por gen. Los estudios moleculares realizados según este modelo plantean que los patógenos producen moléculas elicitoras, producidas a partir de genes de avirulencia, que son reconocidas por receptores específicos en la planta, productos de genes de resistencia. Cuando el receptor de la célula de una planta reconoce el elicitor del patógeno, se activa una respuesta hipersensitiva que ocasiona la muerte de la célula infectada, impidiendo de esta manera la colonización del patógeno. Las mutaciones de avirulencia hacia virulencia que ocurren en el patógeno producen la modificación del elicitor que ocasiona el no reconocimiento por el receptor del hospedador. Bajo este modelo, el quiebre de la resistencia es debido al incremento en la población del patógeno de la frecuencia de la cepa que alberga la mutación. Consecuentemente, los mutantes virulentos se propagan porque el sistema de defensa del hospedero no se activó lo suficientemente temprano para prevenir la infección y la reproducción del patógeno.

De acuerdo con los estudios poblacionales de *Hemileia vastatrix* realizados en las dos regiones cafetaleras del Perú, se ha obtenido, un índice de Tajima negativo, el que se puede interpretar que la población está atravesando un crecimiento acelerado a partir de un número pequeño de genotipos, es decir, desarrollo de una gran población que parte de un fenómeno de cuello de botella y se expande rápidamente, sin que se manifieste algún proceso de selección. Este resultado, reafirma lo observado en la red haplotípica, en la cual se aprecia

un elevado número de haplotipos con mutaciones simples (Figura 20). Además, en dicha red se puede observar que los haplotipos ancestrales que existen en Quillabamba son los mismos de Villa Rica, por lo tanto, la roya amarilla del café entre estas dos zonas estaría comportándose como una única población. En este contexto, frente al desarrollo poblacional mostrado por *H. vastatrix*, se espera que la diversidad genética de la población se incremente en los posteriores años. Las nuevas variantes que se evidencia con la elevada diversidad haplotípica mostrada, puede tener su origen en las mutaciones generadas aleatoriamente. Sin embargo, no se descarta también el incremento de la diversidad genética por la presencia de una reproducción mixta (Criptosexualidad) en las poblaciones de *H. vastatrix*.

La presencia del haplotipo que corresponde a la raza II de la roya amarilla tanto en Quillabamba como en Villa Rica concuerdan con las observaciones realizadas en Colombia y Brasil reafirmando su persistente presencia en el continente americano, y hace suponer que las variantes existentes derivan de esta. Además, se debe considerar que la selección es la principal fuerza que genera cambios en la frecuencia de alelos mutantes; por lo tanto, la fuerza de la selección direccional que ocurre cuando se enfrenta a una resistencia mayor y que está ampliamente distribuida sobre una gran área geográfica, dirigirá el incremento de la frecuencia del mutante virulento que ha perdido el elicitor (alelo a virulento), provocando el quiebre de esta resistencia mayor. Esto ocurre en agroecosistemas que están basados en monocultivos y con excesiva uniformidad genética como la existente en el café y sus variedades resistentes a la roya amarilla.

Por lo tanto, de acuerdo a la forma como se viene comportando la población de la roya amarilla y la elevada homogeneidad genética de las variedades de cafetos, sumada al tipo de resistencia de genes mayores que se ha podido encontrar contra la roya amarilla; se debe buscar un método de mejoramiento que consista en una resistencia duradera que acumule un número grande de genes de resistencia de diferentes fuentes, como la piramidación de genes mayores, o la formación de variedades compuestas que estaría conformado por líneas que contengan diferentes factores de resistencia. Para este tipo de patógeno, estas estrategias de mejoramiento asegurarían variedades que contengan más tiempo de vigencia, ya que con un mayor número de genes de resistencia presentes en una variedad disminuiría la probabilidad del quiebre de la resistencia por parte del patógeno.

En un esquema de piramidación de genes, la estrategia es acumular en un solo genotipo muchos genes que fueron identificados en diferentes padres. El uso de marcadores moleculares de ADN facilitaría la selección de la progenie con las características deseadas en cada generación, incrementando la velocidad del proceso de piramidación.

El Híbrido de Timor (HDT) es la principal fuente de genes de resistencia a la roya amarilla del café que ha sido utilizada por programas de mejoramiento genético de diferentes países productores. La resistencia a la roya amarilla del café es controlada por genes mayores denominados SH (Prakash et al., 2004; Silva et al., 2006). Los HDT llevan los factores SH5, 6, 7, 8 y 9 y Catimor SH5, 6, 7, 8 y 9+ (Varzea y Marques 2005). De acuerdo con las razas de *H. vastatrix* que podrían estar presentes en las dos zonas cafetaleras estudiadas y por lo reportado por Bettencourt et al. (1968), los genotipos resistentes de café evaluados podrían tener factores de resistencia SH 7, 8, 9 o algún factor SH adicional aun no identificado, que estaría confiriendo resistencia a las razas II y XXII y a las variantes de *H. vastatrix* presentes tanto en zonas cafetaleras de Quillabamba como de Villa Rica.

Además, se recomendaría el uso como progenitor susceptible al cultivar Caturra o Typica por presentar la característica de alta calidad de taza que caracteriza al café peruano, y por ser las variedades más cultivadas en el Perú (95 %) (JNC, 2014). El siguiente esquema (Figura 22) involucra cruces simultáneos de padres recurrentes (RP1) con varios padres donantes, seguido de retrocruzamientos hasta la generación BC3. La población retrocruzada con genes individuales son entrecruzados entre si para obtener líneas piramidadas que presentaran resistencia durable y de amplio espectro a la enfermedad.

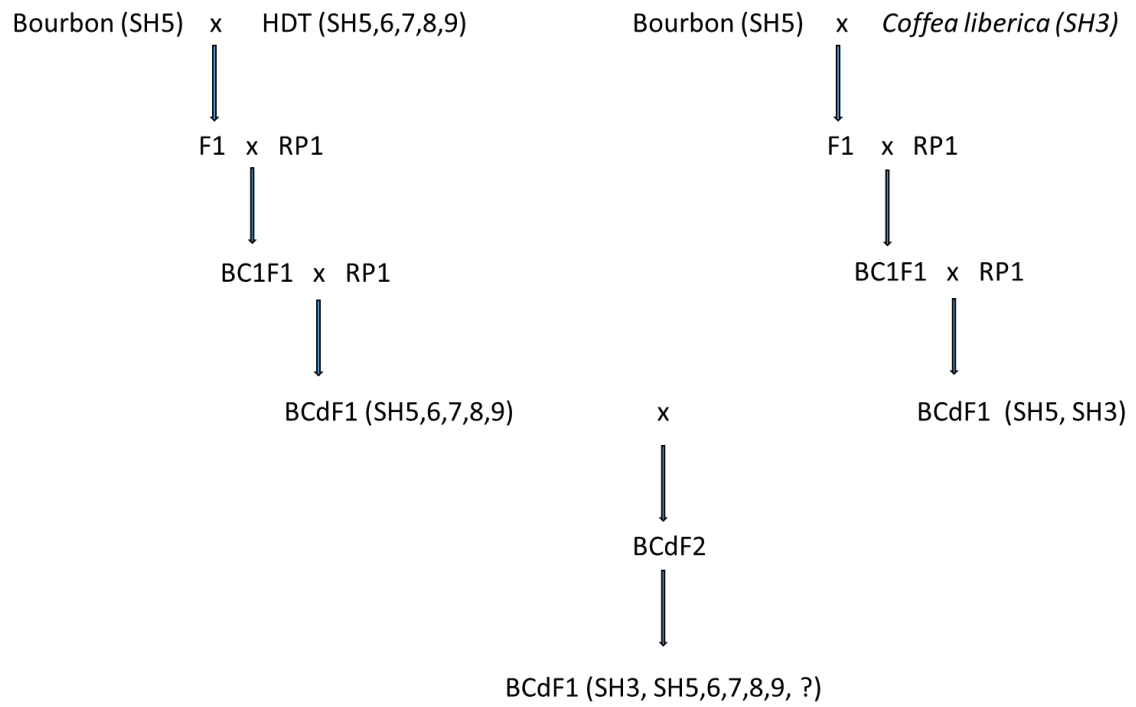


Figura 22. Esquema de retrocruza para piramidación de genes. Fuente: Joshi and Nayak. (2008)

V. CONCLUSIONES

- Del análisis de los siete marcadores moleculares asociados a la resistencia a la roya amarilla del café, se sugiere la presencia de los factores de resistencia SH7, 8, 9 u otro factor SH adicional aun no identificado, el cual estaría confiriendo resistencia a la raza II, XXII y a otras variantes de *H. vastatrix*, que están presentes tanto en Quillabamba como en Villa Rica.
- De acuerdo con los marcadores moleculares probados se descarta la presencia del factor de resistencia SH3 en este grupo de genotipos analizados.
- El Hongo *Hemileia vastatrix* presentó una alta diversidad genética, sin embargo, en las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica fueron hallados haplotipos de Colombia y de las razas II y XXII.
- Como resultado del análisis sobre la diversidad genética de los cafetos, las fuentes de resistencia a la roya amarilla presentes en las zonas estudiadas, sumada al análisis genético poblacional de *H. vastatrix*; se propone como estrategia de mejoramiento genético del café en el Perú, el utilizar la piramidación de genes o la generación de variedades compuestas.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos de la evolución de las poblaciones de *Hemileia vastatrix* en las principales zonas cafetaleras del país.
- Considerar la búsqueda e introgresión de nuevas fuentes de resistencia en variedades de café utilizados en el Perú.
- Identificar marcadores moleculares relacionados a la resistencia del café a la roya amarilla, mediante técnicas genómicas que analicen una gran cantidad de genes.
- Identificar y caracterizar cafetos con resistencia a la roya amarilla, utilizando caracteres agronómicos, morfológicos, Bioquímicos para y calidad de tasa para la generación de poblaciones segregantes con resistencia a roya amarilla.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aga, E; Bryngelsson, T; Endashaw, B; Salomon, B. 2003. Genetic diversity of forest arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Ethiopia as revealed by random amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Hereditas* 138: 36-46.
2. Aga, E. 2005. Molecular genetic diversity study of forest coffee tree (*Coffea arabica* L.) populations in Ethiopia: Implications for conservation and breeding. Doctoral thesis. Alnarp, Swedish University of Agricultural Sciences. 37 p.
3. Aime, MC. 2006. Toward Resolving Family-level Relationships in Rust Fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112– 122.
4. Alvarenga, SM, Teixeira, E; Hufnagel, B; Thiebaut, F; Maciel-Zambolin, E; Zambolin, L; Sussumu, N. 2010. In silico identification on coffee genome expressed sequences potentially associated with resistance to diseases. *Genetics and Molecular Biology* 33(4):795-806.
5. Alvarenga, SM; Caixeta, ET; Hufnagel, B; Thiebaut, F; Maciel-Zambolim, E; Zambolim, L and Sakiyama, NS. 2011. Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(8), 890-898. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000800015>.
6. Amante, E; Vulcano, MA; Abraho, J. 1971. Observacoes preliminares sobre a influencia da entomofauna na dispersao dos uredosporos da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). *O Biologico* 37: 102-105.
7. Anthony, F; Astorga, C; Berthaud, J. 1999. Los recursos genéticos: las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. In Bertrand, B; Rapidel, B. eds. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. San José, CR, IICA. p. 369-406.
8. Avelino, J; Muller, R; Eskes, A; Santacreo R; Holguín, F. 1999. La roya anaranjada del cafeto : Mito y realidad. In: B. Bertrand y B. Rapidel (eds.). *Desafíos de la*

- Caficultura en Centroamérica. Editorial Agroameriica, San José, Costa Rica. pp. 193-241.
9. Avelino, J; Rivas, G. 2013. la roya anaranjada del cafeto. 47 p.
 10. Ayres, P. 2005. Harry Marshall Ward and the fungal thread of death. Saint Paul MN. APS Press.
 11. Bandelt, H; Forster, P; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1):37–48. Disponible en línea: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/16/1/37.full.pdf+html>.
 12. Becker, S; Kranz, J. 1977. Comparative studies on the dispersal of *Hemileia vastatrix* in Kenya. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 84(9): 526-539.
 13. Berkeley, MJ.1869. [Untitled]. *Gardener's Chronicle* 45: 1157.
 14. Berthaud, J; Charrier, A. 1988. Genetics resources of *Coffea*. In: R.J. Clarke & R. Macrae (Eds) *Coffee*, Elsevier Applied Science, London. 4: 1 – 42.
 15. Bettencourt, AJ. 1968. Preliminary report of the coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) material received from the FAO coffee mission to Ethiopia 1964- 65. FAO coffee mission to Ethiopia 1964-65: 124-40. Rome: FAO.
 16. Bettencourt, AJ; Noronha-Wagner, M. 1971. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Agronomic Lusitana*. 31: 285-292.
 17. Bettencourt, AJ. 1981. Melhoramento genético do cafeeiro: transferência de factores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. and Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L. Lisboa: Junta de investigações científicas do ULTRAMAR/Centro de Investigação das Ferrugens do cafeeiro, Oeiras, 93 p.
 18. Bettencourt, AJ; Lopez, J. 1982. Factores genéticos que condicionan a Resistencia do Híbrido de timor a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. *Colloque Scientifique Internationale Sur le Café*, 10. Salvador, Bahia Brasil, Rio de Janeiro. 11 a 14 octubre de 1982.
 19. Bettencourt, AJ; Rodrigues, CJ. 1988. Principles and practices of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: Clarke SJ, Macrae R (Eds.) *Coffee: Agronomy*. London UK. Elsevier Applied Science. 4: 199 – 234.

20. Bock, KR. 1962. Dispersal of uredospores of *Hemileia vastatrix* under field conditions. *British Mycological Society Transactions*. 45(1): 63-74.
21. Bonas, U; Lahaye, T. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current opinion in microbiology*, 5(1): 44-50.
22. Botstein, D; White, RL; Skolnick, M; Davis, RW.1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am JHumGenet*. 32:314- 331.
23. Bowden, J; Gregory, PH; Johnson, CG. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature* 224:500–501. <https://doi.org/10.1038/229500b0>.
24. Brito, GG; Caixeta, ET; Gallina, AP; Zambolim, EM; Zambolim, L; Diola, V; Loureiro, ME. 2010. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica* 173:255–264.
25. Buriticá, CP. 2010. La Roya del Cafeto en Colombia: Realizaciones de Impacto Nacional e Internacional en el Siglo XX *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. Medellín, 63(1): 5285-5292: Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179914617007>.
26. Butler, EJ. 1918. *Fungi and disease in plants*. Thacker, Spink, and, and Co. Calcutta.
27. Cabral, ISR; Oldoni, TLC; Prado, A; Bezerra, RMN; Alencar, SM; Ikegaki, M; Rosalen, PL. 2009. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 32(6), 1523-1527. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600031>.
28. Cabral, PGC; Maciel-Zambolim, E; Oliveira, SAS; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2016. Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*. 65(2): 196-204.
29. Carvalho, A; Monaco, L. 1971. Melhoramento do cafeeiro visando resistencia a ferrugem alaranjada. *Ciencia e Cultura Brasil* 23(2): 41- 146.
30. Carvalho, CR; Fernandes, RC; Carvalho, GMA; Barreto, RW; Evans, HC. 2011. Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE*, 6(11), e26387. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0026387>

31. Castillo, ZJ; moreno RLG. 1976. Comportamiento de la variedad San Bernardo en Colombia. Manizales: Cenicafe, 1976. 4 p.
32. Castro, CBL; Cortina, GHA; Rouxl, J; Wingfield, MJ. 2013. New coffee (*Coffea arabica*) genotypes derived from *Coffea canephora* exhibiting high levels of resistance to leaf rust and Ceratocystis canker. Tropical Plant Pathology. 38(6): 485-494.
33. Capucho, AS; Zambolim, EM; Freitas, RL; Haddad, F; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. Australasian Plant Dis. 7(1):189-191.
34. Chaves, GM; Cruz FJ; Carvalho, MG; Matsuoka; Coelho, DT; Shimoya, CA. 1970. Ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). Revisão de literatura com observações e comentários sobre a enfermidade no Brasil. Seiva,
35. *Chevalier*, A; Dagrón, M. 1928. Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique. Communications et Actes de Académie des Sciences Coloniales, Paris.
36. *Chevalier*, A. 1947. Les caféiers du globe, fasc. 3: systématique des caféiers et faux-caféiers maladies et insectes nuisibles. Encyclopédie Biologique. 28: 1–352.
37. Chisholm, ST; Coaker, G; Day, B; Staskawicz, BJ. 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response Cell. 124(4):803-814.
38. Combes, MC; Andrzejewski, S; Anthony, F; Bertrand, B; Rovelli, P; Graziosi, G; Lashermes, P. 2000. Characterization of microsatellites loci in *Coffea arabica* and related coffee species. Molecular Ecology, 9: 1171-11930.
39. Coutinho, TA; Rijkenberg, FHJ; Van Asch, MAJ. 1995. Teliospores of *Hemileia vastatrix*. Mycol. Res. 99: 932-934.
40. Cristancho, AMA; Escobar, OC; Ocampo, MJD. 2007. Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. Cenicafé 58(4): 340-359.
41. Cristancho, M; Escobar, C. 2008. Transferability of SSR markers from related Uredinales species to the coffee rust *Hemileia vastatrix*. *Genet Mol Res*, 7 (4), 1.
42. Cristancho, M; Roza, Y; Escobar, C; Rivillas, CA; Gaitán, AL. 2012. Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. New Disease Reports 25: 19.

43. Davis, AP; Chester, M; Maurin, O; Fay, MF. 2007. Searching for the relatives of *Coffea* (Rubiaceae, Ixoroideae): the circumscription and phylogeny of Coffeae based on plastid sequence data and morphology. *American Journal of Botany*. 94:313- 329.
44. Davis, AP; Rakotonasolo, F; 2008. A taxonomic revision of the *baracoffea* alliance: nine remarkable *Coffea* species from western Madagascar. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 158(3):355-390.
45. De Oliveira, FF; Ariyoshi, C; Ramos, LC; Pereira, LFP; Validação de marcadores ligados a resistência à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). 2015. Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, 9. Curitiba. Anais. Brasília, DF: Embrapa.
46. Dickinson, MJ. 2003. *Molecular Plant Pathology*. University of Nottingham, Nottingham.
47. Diola, V; De Brito, GG; Caixeta, ET; Maciel-Zambolim, E; Sakiyama, NS; Loureiro, ME. 2011. High density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. *Tree Genetics & Genomes*. DOI 10.1007/s11295-011-0406-2.
48. Dong, X. 2001. Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr Opin Plant Biol* 4: 309–314.
49. Doyle, JJ; Doyle, JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 (1):13-15.
50. Fernandes, RC; Evans, HC; Barreto, RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode germination. *Tropic Plant Pathol* 34:108–113.
51. Flor, HH. 1954. Identification of races of flax rust by lines with single rust-conditioning genes. U.S. Dept. of Agriculture, Washington. 29 p.
52. 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. *Can J Bot* 69:180-190.
53. Golosova, O; Henderson, R; Vaskin, Y; Gabrielian, A; Grekhov, G; Nagarajan, V; Oler, AJ; Quiñones, M; Hurt, D; Fursov, M; Huyen, Y. 2014. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and Chip-seq data analyses. *PeerJ* 2: 1-15. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.644>.

54. Gonzalez, ML; Cortina, GH; Herrera, PJ. 2009. Validación de Marcadores moleculares ligados al gen *SH3* de resistencia contra la roya en introducciones de la colección colombiana de café. *Cenicafé*. Colombia. 60(4):366-380.
55. Gouveia, MM; Ribeiro, A; Várzea, VMP; Rodrigues, JRC. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia* 97: 396–404.
56. Heath, MC. 1997. Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal parasites. In: Carrol GC, Tudzynski P (eds), *The Mycota*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 5: 257 - 276.
57. Herrera, JC; Combes, MC; Anthony, F; Charrier, A; Lashermes, P. 2002. Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora*; genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. arabica* x *C. canephora*). *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 104 (4): 661 - 668.
58. Herrera, JC; Alvarado, G; Cortina, H; Combes, MC; Romero, G; Lashermes, P. 2009. Genetic analysis of partial resistance of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica* 167: 57—67.
59. 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.
60. Hocking, D. 1968. Effects of light on germination and infection of coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *British Mycological Society Transactions* 51(1): 89-93.
61. INEI, Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2014. Compendio estadístico del Perú. https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1173/cap12/cap12.pdf. (Consulta, setiembre 2016).
62. JNC, Junta Nacional del Café. 2014. Plan Nacional de Renovación de cafetales. <http://juntadelcafe.org.pe/publicaciones/documento-plan-nacional-de-renovacion-de-cafetales>(Consulta, octubre 2016).
63. Jones, N; Ougham, H; Thomas. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol.* 137:165 – 177.
64. Jones, JDG; Dangl, JL. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444(7117):323-329.

65. Joshi, RK; Nayak S. 2010. Gene pyramiding a broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biothechnological and Molecular Review*. 5(3), pp. 51-60.
66. Keen, NT. 1999. Plant Disease Resistance: Progress in basic understanding and practical application. In: Callow JA (eds), *Advances in Botanical Research*, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo and Toronto. pp. 291-328.
67. Kilambo, DL, Reuben SOWM; Mamiro DP. 2013. Races of *Hemileia vastatrix* and variation in pathogenicity of *Colletotrichum kahawae* isolates to compact coffee genotypes in Tanzania. *Journal of Plant Studies*. 2:95 – 104.
68. Kushalappa, AC. 1989. Biology and epidemiology, in: *Coffee rust: epidemiology, resistance and management*. CRC Press: Florida.: 16-80.
69. Lashermes, P; Trouslot, P; Anthony, F; Combes, MC and Charrier, A. 1996. Genetic diversity for RAPD marks between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica* 87: 59- 64.
70. Lashermes, P; Combes, MC; Robert, J; Trouslot, P; D'Hont, A; Anthony F and Charrier A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet* 261(2): 259–266.
71. Lashermes, P; Combes, MC; Ribas, A; Cenci, A; Mahé, L; Etienne, H. 2010. Genetic and physical mapping of the SH3 region that confers resistance to leaf rust in coffee tree (*Coffea arabica* L.). *Tree Genetics Genomes* 6(6): 973-980.
72. Lee, SB; Taylor, JW. 1992. Phylogeny of five fungus-like Protocistan Phytophthora species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA, *Molecular Biology and Evolution* 9: 636-653.
73. Leon, J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales*. 3 ed. San José, IICA. :350-364.
74. Leroy, JF. 1980. Les grandes lignées de Cafésiers. *Association Scientifique Internationale du Café (ASIC) 9th Colloque* 473–477.
75. Librado, P; Rozas, J. 2009. DnaSP v. 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451 – 1452. <http://dx.doi:10.1093/bioinformatics/btp187>.

76. López, CE; Acosta, IF; Jara, C; Pedraza, F; Gaitán-Solis, E; Gallego, G; Beebe, S; Thome, J. 2003. Identifying Resistance Gene Analogs Associated with Resistances to Different Pathogens in Common Bean. *Phytopathology* 93(1):88-95.
77. López, C. 2007. *Fitopatología Molecular*, 1 ed. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
78. Maia, TA; Maciel-Zambolim, E; Caixeta, ET; Mizubuti, ESG; Zambolim, L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology*. 42(5): 533-542.
79. Mahe, L; Combes, MC; Varzea, VMP; Guilhaumon, C; Lashermes, P. 2008. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Mol Breeding* 21:105-113.
80. Martínez, JA; Palazzo, DA; Karazawa, M; Monteiro, MVM; Reu, NRN. 1975. Presença de esporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. agente causal de ferrugem do cafeeiro, em diferentes altitudes nas principais areas cafeeiras dos estados de Sao Paulo e Parana, Brasil. *O Biológico* 41(3): 77-88.
81. Mayne, WW. 1932. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* B. et Br. *Nature* 129:510.
82. Medlin, L; Elwood, HJ; Stickel and Sogin ML. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16 S like rRNA coding regions. *gene* 71: 491 -499.
83. Métraux, JP; Nawrath, C; Genoud, T. 2002. Systemic acquired resistance. *Euphytica*.124 :237 – 43.
84. Mishina, TE; Zeier, J. 2007. Pathogen associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 50(3):500-513.
85. MINAGRI, Ministerio de Agricultura y Riego, 2015. Síntesis agroeconómica del café. file:///C:/sintesis-cafe-junio-2015%20(6).pdf (Consulta, octubre 2016).
86. Nei, M; Li, WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10):5269-5273. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>.
87. Nutman, FJ; Roberts, FM; Clarke, RT. 1963. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. *Transactions of the British Mycological Society*. 46(1): 27-44.

88. Nutman, FJ; Roberts, FM. 1970. Coffee leaf rust. PANS. 16(4):607-624.
89. Owusu, AK. 2008. Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs): Emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. African Journal of Biotechnology 7(4): 331-341.
90. Palomino, AC; López, BC; Espejo. JR; Mansilla. SR Quispe, VJ. 2014. Evaluación de la diversidad genética del Café (*Coffea arabica* L.) en villa rica (PERÚ). Ecología Aplicada, 13(2):129-134.
91. Pearl, HM; Nagai, C; Moore, PH; Steiger, DL; Osgood, RV and Ming, R. 2004. Construction of a genetic map for arabica coffee. Theoretical and Applied Genetics, 108(5), 829-835.
92. Pestana, NK; Capucho, SA; Caixeta, TE; Almeida, PD; Eunize Maciel Zambolim, ME; Cosme Damião Cruz, DC; Zambolim, L; Pereira, AA; De Oliveira, BCA; Sakiyama, SN. 2015. Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03.
93. Prakash, NS; Marques, DV; Varzea, VMP; Silva, MC; Combes, MC; Lashermes, P. 2004. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. Theor. Appl. Genet 109:1311-1317.
94. Prakash, NS; Muniswamy, B; Hanumantha, BT; Sreenath, HL; Sundaresha, Kumar, D; Suresh, N; Santhosh, P; Soumya, PR; Bhat, AM; Jayarama. 2011. Marker assisted selection and breeding for leaf rust resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). New Delhi. 71(2): 1-6.
95. Qutob, D; Tedman-Jones, J; Gijzen, M. 2006. Effector-triggered immunity by the plant pathogen *Phytophthora*. Trends in Microbiology 14(11):470-473.
96. Rajendren, RB. 1967. Atypical and typical germination of uredinoid teliospores of *H. vastatrix*. Mycologia 59:918-921.
97. Rayner, RW. 1961. Spore liberation and dispersal of coffee rust *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Nature 191(4789): 725.
98. Rodrigues, JR; Bettencourt, CJ; Rijo, AJ. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Annual Review Phytopathology 14: 49-70.

99. Rodrigues, JrCJ; Várzea, VMP; Silva, MC; Guerra Guimarães, L; Rocheta, M; Marques, DV. 2000. Recent advances on coffee leaf rust. In: International Scientific Symposium on Coffee. 4 de dezembro de 2000. Bangalore, India, Central Coffee Research Institute. Proceedings Coffee Board. p.179-193.
100. Romero, G; Vasquez, L; Lashermes, P; Herrera, JC. 2014. Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemilia vastatrix*) in the natural Timo hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). Plant Breeding. 133:121-129.
101. Santana, MF; Zambolim, EM; Oliveira, LO; Caixeta, ET; Zambolim L. 2007. Análise molecular do rDNA de *Hemileia vastatrix*. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5, Águas de Lindóia, SP. Anais. Brasília, DF: Embrapa Café. Disponible en línea: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/46691/1/Analise-molecular>.
102. Schiber, E. 1970. Viaje al Brasil y el África para estudiar y observar el problema de la herradumbre del café. Abril- mayo. Report to OIRSA. Pp. 109.
103. Schiber, E. 1972. Economic impact coffee rusting Latin America. Annu, Rv. Phytopatol. 10:491-510.
104. Schieber, E; Zentmyer, GA. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. Plant Disease 68(2):89-93. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n02_89.pdf.
105. SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2018. Protocolo de diagnóstico *Hemileia vastatrix* (roya del café). Tecámac, Estado de México. Área de diagnóstico fitosanitario. 1:1-12
106. Setotaw, TA; Caixeta, ET; Guilherme FP; Zambolim, EM, Pereira, AA; Sakiyama NS. 2010. Breeding potential and genetic diversity of “Hybrid do Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers Timor” coffee evaluated by molecular markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology 10: 298-304, 2010.
107. Sevilla, R; Holle, M. 2004. Recursos genéticos vegetales. Luis León Asociados S.R.L. 445p.

108. Silva, AR; Zambolim, L; Pérez, E. 1997. Identificación de razas fisiológicas de la roya del cafeto en el estado Táchira, Venezuela. *BioAgro* 9:95-98.
109. Silva, MC; Nicole, M; Rijo, L; Geiger, JP; Rodrigues, JrCJ. 1999. Cytochemistry of plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)- *Hemileia vastatrix* (race III). *Int. J. Plant Sci.* 160:79-91.
110. Silva, DG. 2000. Levantamento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e resistência de clones de *Coffea canephora* var. Conilon à ferrugem. Dissertation, Federal University of Viçosa, Brazil.
111. Silva, MC; Várzea, V; Guimarães, LG; Azinheira, HG; Fernandez, D; Petitot, A. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 119–147 10.1590/S1677-04202006000100010.
112. Somssich, IE; Hahlbrock, K. 1998. Pathogens defense in plants a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science.* 3:86-90.
113. Sylvain, P. 1958. Ethiopian coffee: Its significance to world coffee problems. *Economic Botany* 12(2):111-139.
114. Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
115. Urbaneja, G; Ferrer, J; Paez, G; Arenas, L; Colina, G. 1996. Acid hydrolysis and carbohydrates characterization of coffee pulp. *Renew. Energ.* 9, 1041–1044.
116. Van der Vossen, HAM. 1979. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. *Seed Sci. Technol.* 7:65–74.
117. Van der Vossen, HAM. 2005. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. p. 305 In: E. Zambolim, M. Zambolim, V.M.P. Várzea (eds) Durable resistance to coffee leaf rust. UFV, Viçosa, Brasil.
118. Varzea, VM; Marques, DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolin L, Zambolim EM, Várzea VM (Eds.) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa MG, Brazil. Editora UFV. pp. 53-74.

119. Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Leet, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23:4407-4414.
120. Ward, MH. 1882. On the morphology of *Hemileia vastatrix* Berk. and Br. (The fungus of the coffee disease of Ceylon). *Quarterly Journal of Microscope Science* 22:1-11.
121. Welsh, J; Mcclelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res* 18:7213-7218.
122. White, TJ; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Inoculum* 64(1):1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
123. Williams, J; Kubelik, A; Livak, K; Rafalki, J; Tingey, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
124. Woese, CR; Olsen, GJ. 1986. Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. *Syst. Appl. Microbiol.* 7:161-177.
125. Zambolim, L; Maciel-Zambolim, E; Vale, FXR; Pereira, AA; Sakiyama, NS; Caixeta, ET. 2005. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil – Physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim, L., Maciel-Zambolim, E. & Várzea, V.M.P. (Eds.) *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 75-98.
126. Zuluaga, CM; Buriticá, CP; Montoya, MM. 2009. Generalidades de las uredinales (fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 41-56. Retrieved March 13, 2017, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120548X200900010003&lng=en&tlng=es.

X. ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de extracción de ADN, empleando el método de CTAB de Doyle y Doyle (1990).

1. Sumergir las muestras de hojas de café en un mortero con nitrógeno líquido y pulverizar con ayuda de un pilón, ambos morteros y pilones deben estar previamente enfriados con nitrógeno líquido.
2. Transferir el material pulverizado a un tubo eppendorf de 2 ml, y agregar 700 ul de CTAB 2X - buffer de lisis y 2 uL de β -mercaptoetanol.
3. Homogenizar las muestras por inversión y posteriormente incubar a 65 °C durante 45 minutos, agitándose cada 15 minutos.
4. Después de la incubación, dejar enfriar el tubo a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se agregar 700 ul de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1), y mezclar suavemente por inversión. Luego centrifugar a 14000 rpm durante diez minutos.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo 2 ml.
6. Agregar 700ul de buffer CTAB 10X y homogenizar por inversión.
7. Luego añadir 700 ul de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1). Homogenizar y centrifugar a 14000 rpm por diez minutos.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml.
9. Luego, añadir 500 ul de isopropanol frío y mezclar suavemente hasta ver la medusa de ADN.
10. Almacenar las muestras a -20 °C por un periodo de 60 minutos. Luego centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos.
11. Posteriormente eliminar el sobrenadante, dejando secar el tubo. Lavar el precipitado dos veces el primero con 700 ul de etanol 70 % y el segundo con 700 ul de etanol absoluto centrifugar las muestras a 14000 rpm por 10 y 5 minutos, respectivamente.
12. Descartar el etanol y dejar que el precipitado seque a temperatura ambiente durante toda la noche.
13. Finalmente, resuspender el precipitado dependiendo de su tamaño, en 50-100 ul de TE.

ANEXO 2. Protocolo de extracción del ADN de *Hemileia vastatrix* según Cristancho *et al.*, (2007).

1. Depositar las uredinosporas de cada aislamiento de roya en tubos Eppendorf de 1.5 ml.
2. Adicionar 150µL de buffer de lisis (50mM de tris HCl pH 7,5; 50mM de EDTA pH 8,0; 3% de SDS; 1% de Mercaptoetanol) y macerar la solución con un micromortero hasta fraccionarlas.
3. Destapar el tubo Eppendorf e introducir en un horno microondas, al nivel máximo de poder, durante 18-20s, luego de 13-15s y por último de 8-10s, tener cuidado que no presente ebullición.
4. Adicionar 450µL de buffer SDS.
5. Mezclar e incubar en baño maría a 80°C durante 10 minutos.
6. Enfriar los tubos a una temperatura de 50°C, para luego agregar 10µL de proteinasa K (0, 5mg.mL-1).
7. Agitar en Vortex e incubar a 50°C durante 30min.
8. Agregar 700µL de Fenol: Cloroformo: Isoamilalcohol (25: 24: 1), y mezclar suavemente hasta obtener una emulsión.
9. Centrifugar a 10.000rpm durante 10 minutos.
10. Transferir el sobrenadante a otro tubo y adicionar el mismo volumen de Cloroformo: alcohol Isoamilalcohol (24:1).
11. Mezclar suavemente y centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos; repetir dos veces este procedimiento.
12. Tranferir el sobrenadante a otro tubo y adicionar dos volúmenes de isopropanol frío.
13. Almacenar a -20 °C para precipitar durante 24 horas.
14. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos y descartar el sobrenadante cuidando de no eliminar los Pellet de ADN.
15. Lavar los pellets de ADN con 480 µL de etanol al 70 % y 120 µL de NaCl 5 M.
16. Secar a temperatura ambiente y resuspender en 40, 50 y 60 µL de buffer TE.
17. Adicionar 1µL de RNAsa A e incubar a 30°C por 30 minutos.
18. Finalmente, para desactivar la enzima se incubar a 65°C por 10 minutos.

ANEXO 3. Protocolo de purificación de “QIAquick gel extracción Kit” de QIAGEN.

1. Cortar el fragmento de ADN con un bisturí estéril, cuidando de no exponer mucho tiempo las muestras a la luz ultravioleta para evitar que se degraden.
2. Colocarlo en un tubo para microcentrífuga de 2 mL y determinar el peso de la agarosa para lo cual previamente se debe determinar el peso del tubo. Añadir 3 volúmenes del buffer QG por cada volumen del gel de agarosa al 1 % (100 mg ~ 100 µL). La cantidad máxima de agarosa que puede ser procesada en cada columna QIAquick es de 400 mg. Para mayores cantidades de agarosa emplear más de una columna.
3. Incubar a 50 °C por 10 minutos (o hasta que se disuelva la agarosa). Mezclar con un vortex cada 2 minutos y medio.
4. Cuando se haya disuelto la agarosa, verificar que el color de la mezcla sea amarillo. Si estuviese de color anaranjado o violeta, añadir 10 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.0 y mezclar.
5. Añadir 1 volumen de isopropanol y mezclar.
6. Colocar la columna QIAquick en el tubo de 2 mL que viene en el kit.
7. Añadir la muestra a la columna y centrifugar por 1 minuto a más de 10000 g (14000 rpm en un centrífuga Eppendorf 5415C). El volumen máximo del recipiente es de 800 µL por lo que para volúmenes de muestras mayores hay que centrifugar varias veces.
8. Descartar lo eluído y colocar la columna en el mismo tubo de 2 mL.
9. Añadir 0.5 mL del Buffer QG a la columna y centrifugar por 1 minuto a más de 10000 g.
10. Lavar con 0.75 del Buffer PE (al cual previamente se le añadido etanol absoluto) a la columna. Dejar que la columna repose por 3 minutos. Centrifugar por 1 minuto a más de 10000 g.
11. Descartar lo eluído y centrifugar la columna por 1 minuto a más de 10000 g.
12. Colocar la columna en un tubo estéril para microcentrífuga de 1.5 mL.
13. Para eluir añadir 30 µL del buffer EB al centro de la membrana, dejar reposar la columna por 1 minuto y centrifugar por un minuto a más de 10000 g. Se recupera un 80 % de la cantidad de ADN que había originalmente.

ANEXO 4. Protocolo de Ligación del producto de PCR en el vector pGemT-Easy vector.

Los productos de PCR no deben de tener más de un día porque de lo contrario los extremos 3' Adenina podrían degradarse.

Para calcular la cantidad de producto de PCR a utilizarse se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng del vector} \times \text{kb tamaño del inserto}}{\text{kb tamaño del vector}} \times \text{relación molar del inserto: vector} = \text{ng del inserto}$$

1. Centrifugar brevemente el pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector and Control Insert DNA para coleccionar el contenido en el fondo del tubo.
2. Realizar la reacción de ligamiento como se describe abajo:

Nota: usar tubos de a.5 ml que se conocen tienen baja capacidad de unión del ADN, vortex vigorosamente el buffer 2X rapid ligation antes de cada uso.

Reaction Component	Standard Reaction	Positive Control	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1µl
PCR product	Xµl*	–	–
Control Insert DNA	–	2µl	–
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
nuclease-free water to a final volume of	10µl	10µl	10µl

*Molar ratio of PCR product:vector may require optimization.

3. Incubar la mezcla de reacción a 4 °C hasta el siguiente día (~ 14 horas).

ANEXO 5. Clonación del fragmento de ADN de la región ITS.

1. Descongelar 100 μ L de células ultra competentes.
2. Agregar al vial de las células 2 μ L de la reacción de ligamiento y mezclar suavemente.
3. Incubar la mezcla en hielo por 30 minutos.
4. Posteriormente realizar un choque térmico de 50 segundos a 42 °C.
5. Inmediatamente después colocar el vial con células ultracompetentes transformadas en hielo durante 2 minutos y adicionar 250 μ L de medio SOC.
6. Incubar el vial conteniendo las células ultra competentes transformadas y el medio SOC a una temperatura de 37° C a 225 rpm durante 1 hora.
7. Una vez transcurrido este tiempo, verter y espacir el contenido del vial en placas petry conteniendo medio LB, X-Gal, IPTG y ampicilina.
8. Incubar las placas petry toda la noche (14 horas aproximadamente) a 37° C.
9. Seleccionar solo colonias blancas, que son las colonias que presentan el inserto.
10. Sembrar cada colonia blanca en 5ml de medio LB conteniendo 5 μ g/ml de ampicilina.
11. Incubar a 37 °C por 24 horas.

El IPTG es un inductor artificial del gen lacZ (determinante del B-galactosidasa) el cual se encuentra dentro del sitio de clonamiento del pGem T Easy vector por lo tanto cuando el gen lacZ permanece intacto (ausencia del inserto en el sitio de clonamiento), el sustrato cromógeno del X-gal es escindido por acción de la B-galactosidasa y su degradación produce coloración azul de las colonias, de otro lado, cuando la presencia del inserto inactiva el gen lacZ las colonias presentan una coloración blanca.

ANEXO 6. Protocolo de purificación del Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification Kit de Promega.

Componentes del producto:

- 20ml Cell Resuspension Solution (CRA)
- 20ml Cell Lysis Solution (CLA)
- 30ml Neutralization Solution (NSB)
- 20ml Column Wash Solution (CWA)
- 50 Wizard® SV Minicolumns
- 50 Collection Tubes (2ml)
- 550µl Alkaline Protease Solution
- 13ml Nuclease-Free Water

Materiales de laboratorio:

- Medio LB que contiene antibióticos
- Etanol (95%)
- Microcentrífuga capaz de $14.000 \times g$
- Tubos de microcentrífuga estériles de 1,5 ml
- Centrífuga capaz de $10.000 \times g$

Protocolo:

1. Cosechar 1-5ml (plásmido de alto número de copias) o 10ml (plásmido de bajo número de copias) del cultivo bacteriano por centrifugación durante 5 minutos a $10.000 \times g$ en una centrífuga de mesa. Eliminar el sobrenadante e invertir el tubo sobre papel toalla para eliminar el exceso de medios.
2. Añadir 250 µl de Solución de Resuspensión Celular y resuspender completamente el sedimento celular agitando con vórtex o pipeteando. Es esencial resuspender completamente las células.

3. Añadir 250 μ l de solución de lisis celular y mezclar mediante la inversión 4 veces (no vórtice). Incubar hasta que la célula en suspensión desaparesca (aproximadamente 1-5 minutos).

Nota: Es importante observar la limpieza parcial del lisado antes de proceder a la adición de la solución alcalina Solución de proteasa (etapa 4); no incubar más de 5 minutos.

4. Añadir 10 μ l de Solución de Proteasa Alcalina y mezclar invirtiendo el tubo 4 veces. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregue 350 μ l de Solución de Neutralización y mezcle inmediatamente invirtiendo el tubo 4 veces.
6. Centrifugar el lisado bacteriano a velocidad máxima (alrededor de 14.000 xg) en una microcentrífuga durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a velocidad axima durante 10 inutos.

Union del ADN plasmidico:

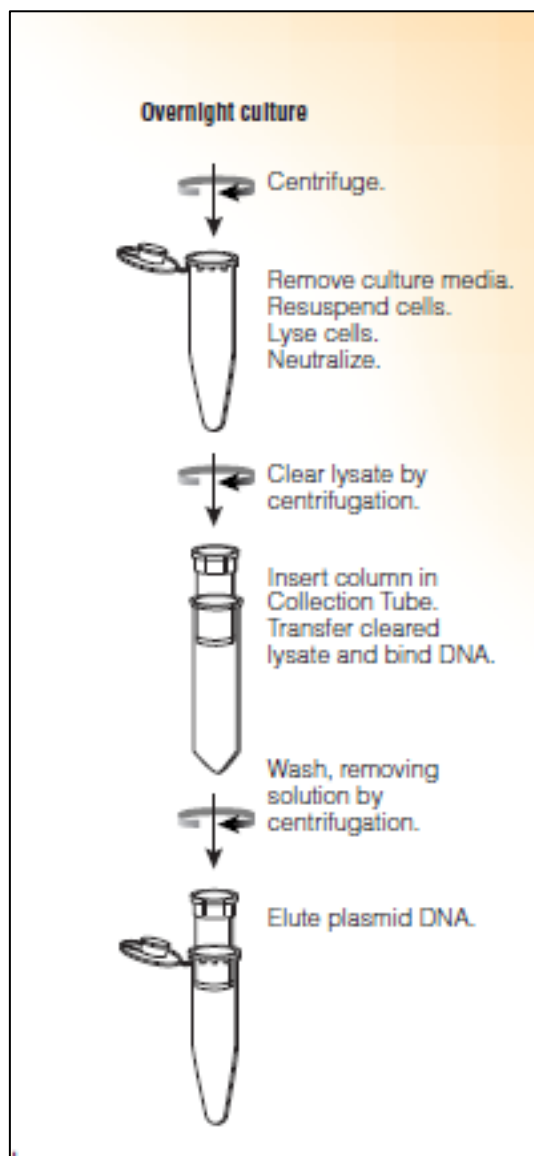
8. Insertar el spin column dentro del tubo colector
9. Decantar el lisado claro dentro de la columna
10. Centrifufgar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante y reinsertar la columna dentro del tubo colector

Lavado:

11. Añadir 750 ul de Wash solution (previamente se haya añadido etanol), centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto, descartar el sobrenandante y reinsertar la columna en el tubo.
12. Repetir el paso 11. Con 250 ul de wash solution
13. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente

Elución:

14. Transferir la columna a un tibo esteril de 1.5 ml, teniendo cuidado de no transferir cualquier solución de lavado en la columna.
15. Añadir 100 ul de agua libre de nucleasas a la columna. Centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto a temperatura ambiente.
16. Descartar la columna y almacenar a -20 °C o menos.



Wizard@Plus SV Minipreps DNA Purification System

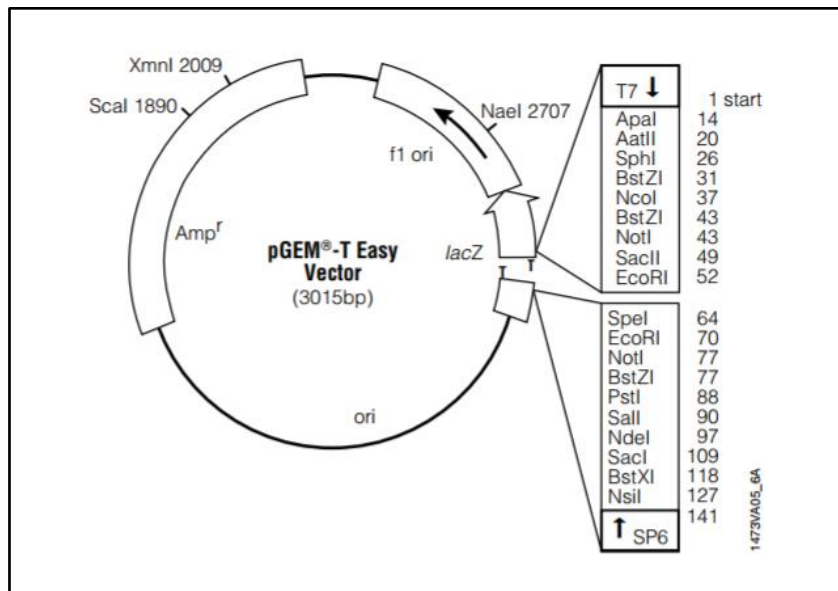
ANEXO 7. Protocolo de digestión del plásmido bacteriano

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción para la digestión.

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
Agua destilada	8.50 – X μ L	
EcoRINEBuffer 10 X	1.00 μ L	1X
EcoRI 20 U/ μ L	0.50 μ L	10 U
ADN plásmido (1 μ g)	X μ L	
Total	10 μ L	

2. Incubar a 37 °C durante toda la noche

Mapa del pGEM®-T Easy Vector y Zona de reconocimiento de las enzimas de restricción



ANEXO 8. Concentración del ADN de roya amarilla en ng/μL

<i>Código de ADN Roya</i>	Concentración	A260	A280	260/280	260/230
HVQ1.1	689.2	13,784	6.232	2,21	1,88
HVQ1.2	689.2	3.645	1.802	2.02	0.96
HVQ2.1	267.5	5.349	2.563	2.09	1.21
HVQ2.2	560.1	11.202	5.205	2.15	1.72
HVQ3.1	723.8	14.475	6.558	2.21	2
HVQ3.2	694.6	13.893	6.245	2.22	2.06
HVQ3.3	1342.5	26.85	12.344	2.18	2.06
HVQ3.4	966.1	19.322	8.74	2.21	1.97
HVQ3.5	1037.5	20.749	9.387	2.21	2.01
HVQ3.6	334.6	6.693	3.194	2.1	1.24
HVQ3.7	1020.1	20.403	9.225	2.21	2.05
HVQ3.8	1078	21.56	9.871	2.18	2
HVQ3.9	1190.3	23.807	11.225	2.12	1.81
HVQ3.10	999.9	19.999	9.01	2.22	1.92
HVQ3.11	628.9	12.578	5.825	2.16	1.86
HVQ3.12	869.3	17.387	7.856	2.21	2.02
HVQ3.13	741.9	14.839	6.729	2.21	2
HVQ4	813.7	16.274	7.405	2.2	1.88
HVQ5.1	802.7	16.054	7.323	2.19	1.77
HVQ5.2	214.4	4.288	1.97	2.18	1.16
HVQ5.3	465.8	9.317	4.275	2.18	1.41
HVV6	533	10.66	4.963	2.15	1.61
HVV7	542.2	10.844	4.994	2.17	1.76
HVV8.1	586.8	11.736	5.476	2.14	1.59
HVV8.2	994.4	19.887	8.954	2.22	2
HVV9	825.5	16.509	7.585	2.18	1.78
HVV10.1	586.1	11.721	5.462	2.15	2.15
HVV10.2	697.5	13.951	6.444	2.16	1.73
HVV11	602.2	12.044	5.666	2.13	1.59

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Hap_1	G	A	A	A	T	T	G	G	A	T	T	G	G	A	T	T	T	T	T	T	T
Hap_2
Hap_3	A	.	.	.	C
Hap_4
Hap_5
Hap_6
Hap_7	.	C
Hap_8
Hap_9
Hap_10	A
Hap_11	C	.	.	.
Hap_12
Hap_13
Hap_14
Hap_15
Hap_16
Hap_17
Hap_18
Hap_19
Hap_20
Hap_21
Hap_22
Hap_23	.	.	.	T	G
Hap_24
Hap_25
Hap_26
Hap_27
Hap_28	A
Hap_29
Hap_30	C	C
Hap_31
Hap_32
Hap_33	.	.	G
Hap_34	A
Hap_35	C
Hap_36
Hap_37
Hap_38	A
Hap_39	C	.
Hap_40
Hap_41
Hap_42	C
Hap_43
Hap_44
Hap_45
Hap_46	G
Hap_47	C
Hap_48
Hap_49

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	22	23	24	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Hap_1	T	T	C	T	G	T	T	T	T	T	T	A	A	T	A	T	T	G	A	A	A	T
Hap_2	A	C	A
Hap_3	A	C	A
Hap_4	A	C	A
Hap_5	A	C	C	A
Hap_6	A	C	A
Hap_7	A	C	A
Hap_8	A	C	A
Hap_9	A	C	A
Hap_10	A	C	A
Hap_11	A	.	.	C	C	A
Hap_12	A	C	A
Hap_13	A	C	A
Hap_14	A	.	.	.	C	C	A
Hap_15	A	C	A	.	.	C	.
Hap_16	A	C	A
Hap_17	A	C	A
Hap_18	A	C	A
Hap_19	C	.	.	.	A	C	A
Hap_20	A	C	A
Hap_21	A	C	A
Hap_22	A	C	A	.	.	.	C
Hap_23	A	C	A	.	G	.	.
Hap_24	A	C	A
Hap_25	A	C	A
Hap_26	A	C	C	A
Hap_27	A	C	A
Hap_28	.	C	.	.	A	C	A
Hap_29	A	C	A
Hap_30	A	C	.	.	C	A
Hap_31	A	C	A
Hap_32	A	C	C	A
Hap_33	A	C	A
Hap_34	A	C	A
Hap_35	A	C	A
Hap_36	A	C	A
Hap_37	A	C	A
Hap_38	A	C	A
Hap_39	A	C	A
Hap_40	A	C	A
Hap_41	A	C	A
Hap_42	A	C	A
Hap_43	A	C	.	C	A
Hap_44	A	C	A
Hap_45	A	C	A
Hap_46	A	C	A
Hap_47	A	C	A
Hap_48	A	C	A
Hap_49	A	C	A

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	
Hap_1	T	C	A	T	T	A	A	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	T	T	
Hap_2	C	
Hap_3
Hap_4
Hap_5
Hap_6	G	.	T	A
Hap_7	A	.	.
Hap_8
Hap_9	C
Hap_10
Hap_11	C
Hap_12
Hap_13
Hap_14
Hap_15	C
Hap_16
Hap_17	C
Hap_18	T
Hap_19
Hap_20	T	A
Hap_21	T	A
Hap_22	T	A
Hap_23
Hap_24
Hap_25	A
Hap_26
Hap_27
Hap_28
Hap_29	.	.	G	C
Hap_30
Hap_31
Hap_32
Hap_33
Hap_34
Hap_35	.	G	G
Hap_36
Hap_37
Hap_38
Hap_39
Hap_40
Hap_41	C
Hap_42
Hap_43	T	A
Hap_44
Hap_45
Hap_46
Hap_47
Hap_48
Hap_49	C

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
Hap_1	A	A	G	T	A	T	T	A	T	C	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G
Hap_2	C
Hap_3	C	.	.	C	.	.	G	.	A	.
Hap_4	C	.	.	C	A	.
Hap_5	C	.	.	C	A	.
Hap_6	C	A	.
Hap_7	G	C	A	.
Hap_8	C	A	.
Hap_9	C
Hap_10	C	.	.	C	A	.
Hap_11	C	.	.	C	A	.
Hap_12	C	.	.	C	.	.	.	G	.	.
Hap_13	C	.	G
Hap_14	C	.	.	C	A	.
Hap_15	C	.	.	C	A	.
Hap_16	C
Hap_17	C	A	A	.
Hap_18	C	A	.
Hap_19	C
Hap_20	C	C	A	.
Hap_21	C	A	.
Hap_22	C	A	.
Hap_23	C	A	.
Hap_24	C	C	A	.
Hap_25	C
Hap_26	C	A	.
Hap_27	C	A	.
Hap_28	C	C	.	.	C	A	.
Hap_29	C	.	.	C	A	.
Hap_30	C
Hap_31	C	.	.	C	A	.
Hap_32	C	.	.	C	.	C	.	.	A	.
Hap_33	C	.	.	C	A	.
Hap_34	C	.	.	C	A	.
Hap_35	C	A	.
Hap_36	C
Hap_37	G	C
Hap_38	C
Hap_39	T	C	.	.	C	A	.
Hap_40	C	.	C
Hap_41	C	.	.	C	A	.
Hap_42	C	.	.	C	A	.
Hap_43	C	A	.
Hap_44	.	.	A	C	.	.	C	A	.
Hap_45	.	T	C	A	.
Hap_46	C
Hap_47	C	.	.	C	A	.
Hap_48	T	.	.	C	.	.	C	A	.
Hap_49	C	.	.	C	A	.

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
Hap_1	T	A	A	T	T	A	A	T	T	C	A	T	T	A	A
Hap_2
Hap_3	C
Hap_4
Hap_5
Hap_6
Hap_7	.	.	.	C
Hap_8
Hap_9
Hap_10
Hap_11
Hap_12
Hap_13	T
Hap_14
Hap_15
Hap_16	C	.	.
Hap_17
Hap_18
Hap_19	T
Hap_20
Hap_21
Hap_22
Hap_23
Hap_24
Hap_25
Hap_26	G	T
Hap_27	T	T
Hap_28
Hap_29
Hap_30
Hap_31	.	G
Hap_32
Hap_33
Hap_34
Hap_35
Hap_36
Hap_37
Hap_38
Hap_39
Hap_40
Hap_41	G
Hap_42
Hap_43
Hap_44
Hap_45
Hap_46
Hap_47
Hap_48
Hap_49

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Hap_1	G	A	A	A	T	T	G	G	A	T	T	G	G	A	T	T	T	T	T	T	T
Hap_50
Hap_51
Hap_52
Hap_53
Hap_54
Hap_55	.	G
Hap_56
Hap_57	C	.	.
Hap_58
Hap_59
Hap_60
Hap_61
Hap_62
Hap_63
Hap_64
Hap_65
Hap_66
Hap_67
Hap_68
Hap_69
Hap_70
Hap_71
Hap_72	G
Hap_73	G	G

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	22	23	24	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Hap_1	T	T	C	T	G	T	T	T	T	T	T	A	A	T	A	T	T	G	A	A	A	T
Hap_50	A	C	A
Hap_51	A	.	C	C	A
Hap_52	A	C	A
Hap_53	A	C	A
Hap_54	A	C	A	G	.	.	.
Hap_55	A	C	A
Hap_56	A	C	A
Hap_57	A	C	A
Hap_58	A	G	.	C	A
Hap_59	A	C	A
Hap_60	A	G	C	A
Hap_61	A	C	A
Hap_62	.	.	T	.	A	C	A
Hap_63	.	.	.	C	A	C	A
Hap_64	A	C	C	A
Hap_65	A	C	A
Hap_66	A	C	A
Hap_67	A	C	A
Hap_68	A	G	.	.	.	C	A
Hap_69	A	C	A
Hap_70	A	C	A
Hap_71	A	C	A
Hap_72	A	C	A
Hap_73	A	C	A

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Hap_1	T	C	A	T	T	A	A	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	T	T
Hap_50
Hap_51
Hap_52
Hap_53
Hap_54
Hap_55	C
Hap_56	T	A	C	.
Hap_57
Hap_58
Hap_59
Hap_60
Hap_61
Hap_62
Hap_63
Hap_64
Hap_65	C
Hap_66	G
Hap_67	C
Hap_68
Hap_69	T
Hap_70
Hap_71	T	A
Hap_72
Hap_73	G	.	G	G

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
Hap_1	A	A	G	T	A	T	T	A	T	C	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G
Hap_50	C	A	.
Hap_51	C
Hap_52	C	.	.	C	A	.
Hap_53	C	.	.	.	C	.	.	C	A	A
Hap_54	C	C	.	.	C	A	.
Hap_55	C	.	.	C	A	.
Hap_56	C	A	.
Hap_57	C	A	.
Hap_58	C	A	.
Hap_59	C	.	.	.	G	.	.	.	A	.
Hap_60	C
Hap_61	C	.	.	C	A	.
Hap_62	C	.	.	C	A	.
Hap_63	C	.	.	C	A	.
Hap_64	C
Hap_65	C	.	.	C	A	.
Hap_66	.	.	.	C	C
Hap_67	C	.	.	C	A	.
Hap_68	G	C
Hap_69	C
Hap_70	C	.	.	C
Hap_71	C
Hap_72	C	C
Hap_73	C

ANEXO 9. Diferencias en secuencias de la región ITS de los 73 haplotipos de *H. vastatrix*, los cuales proceden del análisis de las secuencias de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFIC (Continuación).

	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
Hap_1	T	A	A	T	T	A	A	T	T	C	A	T	T	A	A
Hap_50	T
Hap_51	G
Hap_52	C
Hap_53	G	.	.	.
Hap_54
Hap_55
Hap_56
Hap_57
Hap_58
Hap_59
Hap_60
Hap_61	.	.	G
Hap_62
Hap_63
Hap_64
Hap_65	C
Hap_66
Hap_67	C
Hap_68
Hap_69
Hap_70
Hap_71
Hap_72
Hap_73