

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

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



**“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL CAFÉ Y SU  
POTENCIAL USO EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO FRENTE A  
LA ROYA AMARILLA”**

**Presentada por:**

**JAVIER ALBERTO WITHER VILLAVICENCIO**

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

**Lima - Perú**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

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

**“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL CAFÉ Y  
SU POTENCIAL USO EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO  
FRENTE A LA ROYA AMARILLA”**

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

**Presentada por:**

**JAVIER ALBERTO WITHER VILLAVICENCIO**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa

**PRESIDENTE**

Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego

**PATROCINADOR**

Mg. Sc. César López Bonilla

**MIEMBRO**

Dr. Raúl Blas Sevillano

**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

*Con mucho amor:*

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

*A mi esposa, por su paciencia, comprensión y  
aliento en la realización de este proyecto*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi eterna gratitud y reconocimiento:

A mi Asesor Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego, por sus valiosos consejos y recomendaciones en el desarrollo de la presente tesis.

A los Miembros del Jurado Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa, Mg. Sc. César López Bonilla y Dr. Raúl Blas Sevillano, por su entera disposición y asesoramiento.

A la asistente de mi asesor Mg. Sc. Cinthia Quispe, por sus valiosos consejos y recomendaciones en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT).

A los compañeros de la maestría Mariela Aponte, Maribel Vargas y Juan Morales por su valiosa colaboración durante todo el periodo académico.

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

Al Señor Hans Brack, propietario del fundo Santa Teresa, por facilitarme la toma de muestras en el mencionado fundo.

Al proyecto “Biodigestores como alternativa de solución para el tratamiento de residuos, del proceso de producción de granos de café” contrato 017-2015-INIA-PNIA, por el financiamiento para llevar a cabo la presente investigación.

## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
	2.1 Objetivo general.....	3
	2.2 Objetivos específicos .....	3
III.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
	3.1 Generalidades.....	4
	3.2 Genética del café.....	6
	3.3 Clasificación taxonómica.....	6
	3.4 Morfología .....	7
	3.4.1 La Semilla .....	7
	3.4.2 La Flor .....	7
	3.4.3 El Fruto.....	8
	3.5 Variedades de café .....	8
	3.6 Orígenes de Villa Rica .....	13
	3.7 Información geopolítica de Villa Rica.....	13
	3.8 El cultivo de café en el contexto de Villa Rica.....	15
	3.9 Mejoramiento genético del café.....	15
	3.10 Diversidad genética.....	16
	3.11 Variabilidad genética .....	16
	3.12 Caracterización molecular .....	17
	3.12 Aislamiento del ADN .....	17
	3.14 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	19
	3.15 Marcadores Moleculares.....	20
	3.15.1 Marcadores microsatélites.....	22
	3.15.2 Base genética de los marcadores microsatélites (SSR).....	23
	3.15.3 Ventaja de los marcadores microsatélites .....	23
	3.15.4 Limitaciones de los marcadores microsatélites.....	24
	3.15.5 Uso de marcadores microsatélites para el análisis de la diversidad genética....	24
	3.15.6 Uso de marcadores microsatélites para resistencia a estreses .....	25
	3.15.7 Marcadores SCAR .....	27

3.16	Roya amarilla del café .....	27
3.16.1	El patógeno.....	29
3.16.2	Genes de resistencia .....	29
3.16.3	Control genético de la enfermedad.....	30
3.17	Análisis de datos .....	30
3.17.1	Tablas de datos .....	30
3.17.2	Distancia Genética.....	30
3.17.3	Proporción de loci polimórficos .....	31
3.17.4	Heterocigosis .....	31
3.17.5	Contenido de información polimórfica (PIC) .....	31
3.17.6	Número de alelos efectivos por locus .....	32
3.17.7	Análisis de conglomerados.....	32
3.17.8	Medida de asociación .....	32
3.17.9	Técnica clúster.....	33
3.17.10	Algoritmos para el análisis de clúster .....	33
3.17.11	Estadísticos F.....	34
3.17.12	Análisis molecular de varianza .....	34
IV.	METODOLOGÍA .....	35
4.1	Material vegetal .....	35
4.2	Material para la toma de muestras .....	36
4.3	Lugar de muestreo .....	36
4.4	Materiales y equipos de laboratorio .....	38
4.4.1	Materiales para la extracción y cuantificación del ADN .....	38
4.4.2	Materiales para la amplificación por PCR .....	38
4.4.3	Materiales para la electroforesis y detección de bandas .....	38
4.4.4	Otros materiales.....	39
4.4.5	Equipos.....	39
4.5	Extracción de ADN.....	40
4.6	Cuantificación y determinación de la calidad del ADN .....	40
4.7	Amplificación mediante PCR de marcadores SSR y SCAR .....	41
4.8	Electroforesis en geles de agarosa .....	41
4.9	Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	42
4.9.1	Preparación de geles de poliacrilamida.....	42
4.9.2	Instalación del equipo de electroforesis .....	42

4.9.3 Tinción y revelado de los geles de poliacrilamida .....	43
4.9.4 Detección y evaluación de bandas .....	43
4.10 Análisis de los datos .....	43
4.10.1 Similitud genética.....	43
4.11 Análisis de variabilidad.....	44
4.11.1 Número de alelos por locus .....	44
4.11.2 Proporción de loci polimórficos .....	44
4.11.3 Contenido de información polimórfica (PIC) .....	44
4.11.4 Heterocigosis .....	44
4.11.5 Estadísticos F.....	45
4.11.6 Análisis molecular de variancia .....	45
4.11.7 Análisis de conglomerados.....	46
4.11.8 Análisis de la estructura poblacional.....	46
4.12 Identificación de resistencia a roya del café, mediante marcadores moleculares ....	46
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
5.1 Extracción y cuantificación de ADN .....	47
5.2 Análisis de marcadores SSR utilizados .....	49
5.3 Análisis de varianza molecular .....	53
5.4 Estructura poblacional .....	55
5.5 Análisis de conglomerados .....	59
5.6 Análisis de coordenadas principales .....	63
5.7 Amplificación de marcadores moleculares asociados a resistencia a roya del cafeto	64
5.7.1 Marcadores SFcan0105d y SFcan0105b .....	64
5.7.2 Marcadores Sat 225 y Sat 259.....	67
5.7.3 Marcador SSR 016 .....	68
VI. CONCLUSIONES .....	74
VII. RECOMENDACIONES .....	75
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
IX. ANEXOS.....	90

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Material vegetal del fundo Santa Teresa utilizado en el estudio (17 variedades arábicas, una variedad de <i>C. canephora</i> ).....	37
<b>Cuadro 2:</b> Valores de la relación 260 nm/280 nm y la concentración obtenidos mediante espectrofotometría del ADN extraído de las muestras de café. ....	47
<b>Cuadro 3:</b> Relación de marcadores microsatélites, con sus características de amplificación, utilizados para la evaluación de las muestras de café. ....	50
<b>Cuadro 4:</b> Descripción de los datos obtenidos del análisis de marcadores SSR con las muestras de café del fundo Santa Teresa. ....	53
<b>Cuadro 5:</b> Análisis AMOVA (Índice de fijación $F_{ST} = 0.67$ ). ....	54
<b>Cuadro 6:</b> Mejor valor para Delta de K.....	57
<b>Cuadro 7:</b> Individuos amplificados con marcadores asociados a resistencia.....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Delimitación de la zona productora de Café Villa Rica.....	14
<b>Figura 2.</b> Microsatélites: desarrollo, distribución, funciones y aplicación.....	22
<b>Figura 3.</b> Caracterización de dos OTUs donde se generan 4 diferentes posibilidades.....	33
<b>Figura 4.</b> Variedades de plantas de café del fundo Santa Teresa en Villa Rica, Departamento de Pasco - Perú. a) Pache, b) Gran Colombia, c) Limaní, d) Catuaí.....	35
<b>Figura 5.</b> Mapa de Perú, que indica la ubicación de la región Pasco y mapa del Distrito de Villa Rica, mostrando la ubicación del Fundo Santa Teresa. ....	36
<b>Figura 6.</b> a. Equipo de electroforesis vertical, b. Termociclador .....	40
<b>Figura 7.</b> Gel de agarosa al 1% donde se muestran las bandas del ADN genómico producto de la extracción realizada de las muestras de café.....	48
<b>Figura 8.</b> Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador AY2434 en la amplificación de 54 muestras. La flecha roja indica polimorfismo en un individuo de la variedad Pache, las flechas amarillas indican polimorfismo en 2 individuos de <i>C. canephora</i> . ....	51
<b>Figura 9.</b> Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador CMA199 en la amplificación de 54 muestras. La flecha roja indica polimorfismo en un individuo de la variedad Catimor, las flechas amarillas indican polimorfismo en 3 individuos de <i>C. canephora</i> y la flecha azul resalta polimorfismo en un individuo de la variedad Pacamara.....	51
<b>Figura 10.</b> Curva de Delta de K para determinar el K óptimo en el análisis de estructura poblacional de las muestras de café.....	56
<b>Figura 11.</b> Estructura poblacional de 54 muestras del café del Fundo Santa Teresa. A (2K), B (3K).....	59
<b>Figura 12.</b> Dendrograma de 54 muestras de <i>Coffea</i> del fundo Santa Teresa basado en distancia genética obtenido de marcadores SSR utilizando el método UPGMA. ....	62

<b>Figura 13.</b> Análisis de coordenadas principales de 54 muestras de <i>Coffea</i> del Fundo Santa Teresa.....	63
<b>Figura 14.</b> Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador SFcan0105d en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se muestran bandas de interés asociados a resistencia a roya del cafeto, con un peso de 244 pb. ....	66
<b>Figura 15.</b> Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador SFcan0105b en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se señalan fragmento de ADN de interés asociados a resistencia a roya del cafeto, con un peso de 194 pb. ....	66
<b>Figura 16.</b> Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador Sat 225 en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se señalan fragmento de ADN de interés asociados a resistencia a roya del cafeto, con un peso de 308 pb en Robustas y 286 en los individuos de las variedades Catimor, Limaní y Pache Amarillo 1 y 2. ....	69
<b>Figura 17.</b> Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador Sat 259 en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se señalan fragmento de interés asociados a resistencia a roya del cafeto, con un peso de 179 pb en Robustas, tres muestras de la variedad Gran Colombia y en Catuaí 1. ....	69
<b>Figura 18.</b> Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador SSR 016 en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se señalan fragmento de ADN de interés asociados a resistencia a roya del cafeto, con un peso de 132 pb en tres muestras de la variedad Gran Colombia, Caturra, Maragogipe 2, Maragogipe 3, Catuaí 1, Catuaí 2, Limaní 1, Limaní 2, Pache Amarillo 1 y Pache Amarillo 3. ....	70

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Ficha de datos pasaportes. ....	90
<b>Anexo 2.</b> Protocolo de extracción con solución tampón CTAB establecido por Doyle & Doyle (1990), con algunas modificaciones. ....	91
<b>Anexo 3.</b> Cebadores SSR y SCAR evaluados. ....	92
<b>Anexo 4.</b> Preparación del gel agarosa 1,5%. ....	93
<b>Anexo 5.</b> Preparación de tampón de carga (Dye corrida). ....	93
<b>Anexo 6.</b> Soluciones utilizadas para la tinción y revelado del gel de poliacrilamida. ....	93
<b>Anexo 7.</b> Matriz de similitud genética de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa (Índice de Jaccard). ....	94
<b>Anexo 8.</b> Bandas monomórficas producidas. ....	97
<b>Anexo 9.</b> Análisis de coordenadas principales. ....	97
<b>Anexo 10.</b> AMOVA sin muestras de <i>C. canephora</i> . ....	98

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar la diversidad genética y la resistencia asociada a roya amarilla (*Hemileia vastatrix*), mediante el uso de marcadores moleculares de 54 muestras, correspondiente a 18 variedades del germoplasma de café del Fundo Santa Teresa del Distrito de Villa Rica en la Región de Pasco, Perú. El análisis molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina, a partir del ADN genómico extraído de hojas tiernas de los arbustos de café. En el estudio, se emplearon 19 marcadores SSR (Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas) de diversidad genética y 5 SSR asociados a la resistencia a *H. vastatrix*. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en geles de poliacrilamida, registrándose en total 100 alelos, de los cuales 97 fueron polimórficos. El dendograma elaborado a un coeficiente de similitud de 0.79 mostró dos grupos, uno que contenía a las variedades de *C. arabica* y el otro a la variedad Robusta de *C. canephora*. Al reducirse el coeficiente a 0.56, las variedades de *C. arabica* se diferenciaron en tres grupos. El AMOVA (Análisis de Varianza Molecular) de la población, mostró que la mayor variación genética de la población estuvo presente entre las variedades y no dentro de ellas; el valor de  $F_{ST}$  fue 0.67, que sugiere una significativa diferenciación genética entre las variedades. Los marcadores SSR asociados a la resistencia de *H. vastatrix* amplificaron bandas, mostraron la característica de resistencia, en algunos individuos de la variedad Robusta de *C. canephora*; así mismo, amplificaron bandas en individuos resistentes e inclusive en susceptibles de *C. arabica*, lo cual es posible debido a que en el fundo las variedades resistentes y no resistentes, no se encuentran lo suficientemente distanciadas, posibilitando la polinización cruzada. En conclusión, las variedades de café del Fundo Santa Teresa, muestran diversidad genética y se evidencia la existencia de alelos con características de resistencia a la Roya Amarilla en algunos de los individuos del fundo. Los marcadores SSR que se amplificaron en los alelos asociados a la resistencia en individuos de la población, podrían ser usados en la implementación de un programa de mejoramiento genético del café.

**Palabras claves:** roya amarilla, diversidad genética, marcadores SSR, café.

## ABSTRACT

The objective of the current work was to analyze the genetic diversity and the resistance related to Coffee Leaf Rust (CLR) (*Hemileia vastatrix*), by using molecular 54 marker samples, corresponding to 18 varieties of coffee germplasm from Santa Teresa farmland at Villa Rica District in the Pasco Region of Peru. The molecular analysis was performed, in the Molecular Biology laboratory at Universidad Nacional Agraria La Molina, taken from genomic DNA extracted from new leaves from coffee plants. In the study, 19 SSRs markers (Microsatellites or Simple Sequence Repeat) of genetic diversity and 5 SSRs associated with resistance to *H. vastatrix* were used. The amplified fragments were visualized in polyacrylamide gels, registering a total of 100 alleles, from which 97 were polymorphic. The dendrogram developed at a similarity coefficient of 0.79, showed one group contained the varieties of *C. arabica* and the other one the Robusta variety of *C. canephora*. When the coefficient was reduced to 0.56, *C. arabica* varieties were differentiated into three groups. The AMOVA (Analysis of Molecular Variance) showed high genetic variation among varieties of coffee population. The value of  $F_{ST}$  was 0.67, which suggested a significant genetic differentiation among the varieties. The SSR markers associated with the resistance to *H. vastatrix* amplified bands showed that character in some individuals from Robusta variety of *C. canephora*. Similarly, amplified bands were found in resistant individuals and even in those susceptible to *C. arabica*. The latter was possible due to the fact that resistant and non-resistant varieties were not planted at enough distance among them, making cross-pollination possible. In conclusion, the coffee varieties from Santa Teresa farmland showed a high genetic diversity and the existence of alleles with some resistance characteristics to CLR in some of individuals of the farm was evident. The SSR markers related to resistance in individuals within populations could be used to implement a coffee breeding program.

**Keywords:** Coffee Leaf Rust, genetic diversity, SSR markers, coffee.

## I. INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas más comercializados en los mercados internacionales. Se produce en América Latina, África y Asia, y su agroindustria se ha diversificado en todo el mundo, constituyendo una importante fuente de empleo, ingresos y divisas para muchos países productores. En Perú el café es uno de los principales productos de agroexportación de cuyo cultivo dependen más de 200000 familias de pequeños productores.

Debido a su forma de producción, el Perú se ha convertido en uno de los principales productores de cafés especiales en el mundo, sin embargo, en la norma técnica para la producción de este tipo de cafés, requiere que se mantenga la homogeneidad del producto en cada lote de exportación (Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales 2003). No obstante, por el sistema de siembra practicada en la caficultura peruana, es difícil evitar la heterogeneidad porque generalmente no se delimitan las diferentes variedades en parcelas, dificultándose la cosecha selectiva y la separación de los granos por tamaños, aspecto, maduración, etc. Además, para la producción de este tipo de café, es de gran importancia el origen varietal del grano, lo que en el Perú no es claro aún, ni siquiera para los principales cultivares. De manera que sería necesario, la caracterización y el análisis de la variabilidad del café arábico que se cultiva en las zonas cafetaleras del país.

Las técnicas actuales empleadas para realizar estudios de variabilidad y diversidad genética en plantas, se valen de fragmentos de ADN, conoce como marcadores moleculares. Entre ellos tenemos a los basados en secuencias simples repetidas (SSR) o microsatélites, los cuales son muy utilizados, y permiten analizar de manera eficiente mediante ensayos rápidos y simples utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Anthony *et al.* 2002b). Usando este tipo de marcador once loci fueron identificados recientemente para la caracterización molecular de genotipos de café, de los cuales seis fueron polimórficos dentro de *C. arabica* (Combes *et al.* 2000).

Otro de los problemas que viene afectando a la caficultura peruana son las plagas y enfermedades que influyen de manera negativa en los rendimientos y la producción. Según la central piurana de cafetaleros (CEPICAFE) de Perú, las enfermedades son las causantes de las mayores pérdidas económicas en los últimos tiempos. Una de las más importantes es la enfermedad conocida como la roya amarilla del café, ocasionada por el hongo *Hemileia vastatrix*, la cual afecta a las hojas y provoca la defoliación de las plantas, reduciendo indirectamente el crecimiento y la capacidad de producción de frutos. La magnitud del daño depende de: las condiciones ambientales, la edad de la planta, el estado de desarrollo de los frutos, la respuesta de genotipo y la severidad de la epidemia (Alvarado *et al.* 2002).

Una alternativa eficiente para el control de la roya amarilla del café, es la obtención de cultivares resistentes, portadores de genes que confieran resistencia específica. No obstante, por tratarse de una planta perenne y de período juvenil largo, el mejoramiento genético en el cultivo de café toma mucho tiempo y se necesitan técnicas que faciliten y aceleren la selección de genotipos (Teixeira-Cabral *et al.* 2004). Para tal objetivo, las técnicas de biología molecular son instrumentos prometedores que permiten reducir el tiempo de creación de los nuevos cultivares y aumentan la eficiencia de los programas de mejora (Sera *et al.* 2002, Fazuoli *et al.* 2005). Sin embargo, requieren del estudio y caracterización de los potenciales genotipos progenitores en base a la resistencia genética a nivel molecular.

El Fundo Santa Teresa ubicado en el distrito de Villa Rica, provincia de Oxapampa, región Pasco, poseedor de una amplia colección de “variedades de café”, está dedicado a la producción de grano y semillas de café, que se comercializan dentro y fuera de su región. La variabilidad de cultivares que se mantienen en un mismo ambiente, representan a los principales cultivares que se siembran a nivel nacional, de ahí su potencial uso para ensayos de mejoramiento genético. Por lo tanto, la importancia del conocer la diversidad genética de dicha colección y analizar sus fuentes de resistencia a la roya del cafeto que presente.

## **II. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

Los objetivos que persiguió la presente tesis fueron los siguientes:

### **2.1 Objetivo general**

Analizar mediante marcadores moleculares de tipo SSR Y SCAR la colección de cafetos del Fundo Santa Tresa de Villa Rica, para su potencial uso en el mejoramiento genético frente a la roya amarilla.

### **2.2 Objetivos específicos**

Analizar mediante marcadores moleculares microsatélites la diversidad genética de la colección de cafetos del Fundo Santa Teresa de Villa Rica.

Utilizando marcadores moleculares específicos de resistencia a la roya amarilla, evaluar el estado de la diversidad génica en relación a la resistencia a roya amarilla, como fuente potencial para el mejoramiento.



### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Generalidades

El cultivo de café representa para la mayoría de países productores, uno de sus principales productos de exportación y a nivel mundial, ocupa después del petróleo, el segundo lugar en el comercio.

El café pertenece a la familia Rubiaceae y al género *Coffea* (Puerta 1998), cuyas especies de mayor importancia son *Coffea arabica* L y *C. canephora* Pierre, las cuales son responsables del 65 y 35% de la producción mundial de granos de café, respectivamente (Rodrigues *et al.* 1975).

La especie *Coffea arabica* es originaria de las montañas de Etiopía. El inicio de su cultivo se estima que fue a comienzos del siglo VIII, luego, por varios siglos se mantuvo como un monopolio de los árabes en las cercanías del mar Rojo. En el siglo XIV se produce una fuerte expansión hacia Yemen (ex Arabia del Sur), y durante el siglo XV al Oriente Medio (Anthony *et al.* 1999).

Desde el inicio de la caficultura se reconocen dos variedades de *Coffea arabica*: **variedad arábica** también llamada variedad *typica*, la cual se cultivó en los jardines botánicos holandeses, desde donde fue llevada por los franceses al Caribe y de allí se difundió a los países de Centroamérica y Suramérica; y **variedad bourbon** que fue mantenida y cultivada por los franceses en las islas Bourbon o Reunión. Todas las variedades de *Coffea arabica* cultivadas en el mundo se derivan de estas dos variedades (Puerta 1998).

Las variedades americanas tienen su origen a partir de la introducción de unas pocas semillas pertenecientes a *C. arabica* var. *Typica* “Cramer”, introducida en el siglo XVIII a partir de una única planta de Indonesia, cultivada en el jardín botánico de Ámsterdam,

mientras que *C. arabica* var. Bourbon (B. Rodr.) fue introducido de la isla de Bourbon, actual isla de la Reunión, durante el siglo XIX (Smith 1985).

A consecuencia del origen de los cultivares americanos actuales, derivados de estos dos grupos genéticos, su base genética es reducida; por lo tanto, son altamente susceptibles a nuevas plagas y enfermedades, presentan baja adaptabilidad a nuevas condiciones de cultivo (Wilches 1995), y son limitadas las posibilidades para el mejoramiento genético (Anthony *et al.* 2002a).

Sin embargo, los agricultores han tenido la capacidad de crear nuevas variedades, con rendimientos altos, a partir de la estrecha base genética existente. En 1930, en Brasil se inició un programa de semillas, con la población de la variedad Bourbon (Mendes 1939). Posteriormente, en el año 1935, también en Brasil se descubrió un árbol de porte bajo, cuya característica es otorgada por un gen dominante, y la variedad se la denominó Caturra (Carvalho *et al.* 1991).

En Perú el café se desarrolla con relativa facilidad desde los 600 hasta los 1800 metros sobre el nivel del mar; sin embargo, el 75 por ciento de los cafetales está sobre los 1000 metros sobre el nivel del mar. Los cafés del Perú pertenecen a *Coffea arabica* y presentan distintos perfiles de sabor, aroma y acidez. Las variedades que se cultivan son principalmente, Typica (70 por ciento) y Caturra (20 por ciento), además de otras como Bourbon, Pache, Catimor, etc. (10 por ciento). El 90 por ciento del café peruano crece bajo sombra, esencialmente de árboles de leguminosas, a una densidad promedio de 2000 plantas por hectárea (EXPO CAFÉ PERU 2017).

Los niveles de producción y productividad son bajos, con una media inferior a 20 quintales de café por hectáreas. Asimismo, el 63 por ciento de los caficultores son pequeños agricultores con propiedades de 2 a 3 hectáreas que producen de 6 a 8 quintales por hectárea (Origen Café). (Infocafes.com).

Hacia los años 50 del siglo XX, el *Centro de Investigaçao das Ferrugens do Cafeeiro* (CIFC) de Portugal, realizó una de las mayores contribuciones a la caficultura mundial mediante el descubrimiento del Híbrido de Timor (H.T.). El cual, postularon que

se trata de un híbrido natural, probablemente resultante del cruzamiento entre *Coffea arabica* x *Coffea canephora* (Alvarado *et al.* 2002).

La estrecha base genética de *C. arabica* es uno de los factores que explica su elevada susceptibilidad a enfermedades y plagas como la roya amarilla (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) y la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari). Por este motivo la mayoría de programas de mejoramiento han utilizado los híbridos interespecíficos, tanto naturales como artificiales, como fuentes principales de genes de resistencia para las nuevas variedades (Romero *et al.* 2014).

### 3.2 Genética del café

Por el número cromosómico el género *Coffea* se divide en dos grupos: *Coffea arábica* comúnmente conocida como “arabica” que es una especie autógama alotetraploide, con un complemento cromosómico de  $2n=4x=44$  (Regalado 2006), y un comportamiento meiótico de tipo disómico, comparable al de un diploide funcional; y las demás especies de *Coffea*, que incluye a *Coffea canephora*, las cuales son diploides con  $2n=2x=22$  cromosomas y con un mecanismo de reproducción autoincompatible (Romero *et al.* 2014).

Mediante el análisis molecular citogenético, Lashermes *et al.* (2000), demuestra que *C. arabica* es una especie anfidiplóide, resultante de la hibridación natural de especies diploides convergentes, *C. canephora* y *C. eugenioides*.

*Coffea arabica* presenta una baja diversidad genética atribuida a su origen alotetraploide reciente, su naturaleza autogámica y particularmente por la forma como fue dispersada en el mundo desde su centro de origen (Lashermes *et al.* 1996).

### 3.3 Clasificación taxonómica

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

División	: Angiospermae
Clase	: Eudycotiledoneae
Subclase	: Asteridae
Orden	: Gentianales
Familia	: Rubiaceae, citado por Davis <i>et al.</i> (2007)
Subfamilia	: Ixoroideae
Tribu	: Coffeae

Género	:	<i>Coffea</i> , citado por Leroy (1980)
Subgénero	:	<i>Coffea</i>
Especie	:	<i>Coffea arabica</i> L

### 3.4 Morfología

*Coffea arabica* es un arbusto o árbol pequeño, puede alcanzar un tamaño de cuatro a cinco metros y tiene un hábito dimórfico de ramificación que consiste en ramas verticales (ortotrópicas) y horizontales (plagiotrópicas) (Aga *et al.* 2003).

#### 3.4.1 La Semilla

La semilla de café es una nuez, oblonga, plano convexo, de tamaño variable (10 - 18 mm de largo y 6,5 – 9,5 mm de ancho) (Arcila *et al.* 2007). En la semilla se pueden distinguir tres partes: película plateada, endospermo y embrión.

Película plateada: constituida por células esclerenquimáticas (gruesas y de sostén) fusiformes (en forma de huso), de tamaño pequeño, que recubren al endospermo (Velásquez *et al.* 2003).

Endospermo: constituye el principal tejido de reserva de la semilla, utilizado por el embrión como fuente de nutriente en los primeros estadios de su desarrollo.

Embrión: se encuentra conformado por un hipocótilo que da origen a la radícula y un epicótilo del cual se originan los dos cotiledones (Velásquez *et al.* 2003).

La semilla de café es de tipo recalcitrante, pero si es posible su conservación bajo ciertas condiciones específicas (Van der Vossen 1979), no presenta el mecanismo de dormancia en sus semillas, y su viabilidad se pierde normalmente en un plazo de tres a seis meses después de la cosecha (Aga 2005).

#### 3.4.2 La Flor

Las inflorescencias se desarrollan a partir de yemas en serie, que se forman principalmente en las ramas horizontales, conformadas de una a cinco flores con pedicelo corto y cáliz

rudimentario (Aga 2005). La flor del café está compuesta por una corola con cinco lóbulos, un cáliz, cinco estambres y el pistilo (Ovario, estilo y estigma). El ovario está en la base de la corola (ínfero) y contiene dos óvulos, que una vez fertilizados, normalmente van a producir dos semillas de café. La flor se une a la inflorescencia mediante el pedicelo (Arcila 2004).

Las flores son blancas, se abren temprano en la mañana y permanecen abiertas entre 2 y 3 días aproximadamente. Una vez fertilizadas, las anteras se tornan de color café; dos días después la corola y todas las demás partes de la flor caen, dejando el ovario al descubierto, dando inicio a la formación del fruto. Esta etapa es conocida como “pétalos caídos”. Si la fertilización falla, los estigmas y la corola permanecen adheridos al ovario (Wintgens 2004).

### **3.4.3 El Fruto**

El fruto es una drupa globular u ovoide de peciolo corto. Tiene una longitud y un diámetro de 10 a 15 mm y de 11.5 a 14.5 mm, respectivamente, y se le denomina cereza. En el desarrollo del fruto del café se pueden distinguir cinco etapas (Arcila y Jaramillo 2003), el desarrollo del fruto empieza desde la fertilización del óvulo, alcanzando la madurez cuando el endospermo llena el grano, provocando un cambio de color, posteriormente el fruto sobremaduro adquiere un color violeta oscuro y finalmente se seca.

La estructura del fruto, está conformada por un pedicelo, que une el fruto con el tallo. La pulpa del fruto, está conformada por el pericarpio, el cual a su vez está conformado por el exocarpio o epidermis y el mesocarpio (Gast *et al.* 2013).

### **3.5 Variedades de café**

El género *Coffea* se compone de más de 100 especies (Bridson y Verdcourt 1988). Cafés Arábica y Robusta representan el 65 por ciento y el 35 por ciento respectivamente, del café que se produce en todo el mundo. En algún momento de los últimos 100.000 años, *C. arabica* fue formada a partir de las dos especies estrechamente relacionadas *C. canephora* y *C. eugenioides* (Lashermes *et al.* 1999).

Actualmente para describir la diversidad de las especies cultivadas autógamias, se utiliza el término cultivar, como está indicado por el Código Internacional de Nomenclatura de

Plantas Cultivadas (ICNCP), que define al cultivar como un axón 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).

Se puede hacer una distinción de las variedades de café en base a sus características morfológicas como longitud de la planta, el ángulo que posee entre las ramas y el tronco principal, el color del fruto, el color de la hoja, y otras características como la productividad, el rendimiento, la adaptabilidad a diferentes altitudes, la resistencia a plagas y enfermedades, etc., en referencia a características observables y medibles.

Principales variedades de café Arábica:

Typica: es la base desde la cual se han desarrollado muchas variedades de café. Las plantas de café Typica tienen una forma cónica con un tronco vertical principal y varios secundarios que crecen con una ligera inclinación. Typica es una planta alta que alcanza 3.5 - 4 metros de altura. Las ramas laterales forman ángulos de 50 - 70 grados con el vástago vertical. El café Typica tiene una producción muy baja, pero tiene una excelente calidad de taza (Coffeeresearch.org 2018).

Bourbon: sus plantas producen 20 - 30% más de café que Typica, pero tienen una cosecha más pequeña que la mayoría de las variedades de café. Bourbon tiene una forma menos cónica que las plantas de café Typica, pero tiene más ramas secundarias. Los ángulos entre las ramas secundarias y el tallo principal son más pequeños, y los puntos de ramificación en el tallo principal están muy juntos. Las hojas son anchas y onduladas en los bordes. La fruta es relativamente pequeña y densa. Las cerezas maduran rápidamente y corren el riesgo de caerse durante los fuertes vientos o las lluvias. Los mejores resultados para el café Bourbon se obtienen entre 1067-1980 metros de altura. La calidad de la taza es excelente y similar a Typica (Coffeeresearch.org 2018).

Caturra: Mutación de la variedad Bourbon que fue descubierta en Brasil, se caracteriza por elevada producción y calidad, pero requiere un gran cuidado y fertilización. Su rama principal es corta, con un núcleo grueso y tiene muchas ramas secundarias. Tiene hojas grandes con bordes ondulados similares al café Bourbon. Se adapta bien a casi cualquier medio, pero tiene mejor rendimiento entre 458 - 1675 metros de altura, con precipitación

anual entre 2500 - 3500 mm. A mayor altitud la calidad aumenta, pero la producción disminuye (Coffeeresearch.org 2018).

Maragogipe: Esta variedad es una mutación del café Typica y fue descubierto en Brasil. La planta de café Maragogipe es grande y es más alta que Bourbon o Typica. La producción es baja, pero las semillas son muy grandes. Maragogipe se adapta mejor entre 610 - 762 metros de altura. Las características de la taza son muy apreciadas en ciertos mercados de café (Coffeeresearch.org 2018).

Catimor: Esta variedad es un cruce entre el Híbrido de Timor (resistente a la roya amarilla) y Caturra, fue creado en Portugal en 1959, la maduración es temprana y la producción es muy alta con rendimientos iguales o mayores a otras variedades comerciales de café. Los descendientes Catimor T-8667 son relativamente pequeños en estatura, pero tienen grandes frutas y semillas de café. La línea Catimor T-5269 es fuerte y se adapta bien a regiones más bajas entre 610 - 915 metros de altura con una precipitación anual de más de 3000 mm. La línea Catimor T-5175 es muy productivo y robusto, pero puede tener problemas a altitudes muy altas o muy bajas. En altitudes bajas, casi no hay diferencia en la calidad de la taza entre Catimor y los otros varietales comerciales de café, en altitudes bajas Catimor obtiene una buena calidad de taza, lo que no pasa en altitudes superiores a los 1220 metros de altura, donde variedades como Bourbon, Caturra y Catuaí obtienen mejor calidad de tasa. (Coffeeresearch.org 2018).

Catuaí: Variedad de café de alto rendimiento resultante del cruce entre Mundo Novo y Caturra. La planta es relativamente corta, y las ramas laterales forman ángulos cercanos con las ramas primarias. La fruta no se cae fácilmente de la rama, lo cual es favorable en áreas con fuertes vientos o lluvia; sin embargo, necesita suficiente fertilización (Coffeeresearch.org 2018).

Mundo Novo: Descubierta en Brasil en los años 40, árbol fuerte, de porte alto, y muestra gran resistencia a las enfermedades, a los suelos de composición pobre y a las sequías. Sus ramas forman un ángulo de 45 grados con respecto al tronco, con una distancia corta de entrenudos y muestra poca resistencia al viento. Produce una gran cantidad de cereza, pero su maduración es un poco más lenta que otras variedades, lo que se refleja en la taza final. Otra característica de esta variedad es que posee tendencia a producir gran cantidad de

granos vanos dentro de la cereza, pudiendo ser controlado con una buena selección a nivel de campo (S.L. 2018).

Pache: La planta destaca por su porte bajo, con la distancia ente nudos corta y con gran cantidad de ramas secundarias. El color de la guía es rojo vinoso al igual que el color de las cerezas al madurar. Estas destacan por ser muy resistentes a la caída de las cerezas después de su maduración. En la actualidad hay dos variedades de Pache: el Pache Común (mutación del Typica) que fue descubierta en la granja El Brito, en Santa Cruz del Naranjo, Guatemala, y el Pache Colis que es resultado de una hibridación natural entre el Pache Común y el Caturra (S.L. 2018).

Pacamara: Híbrido resultante del cruce del Pacas con el Maragogype Rojo, creado por el Instituto Salvadoreño para Investigaciones del Café (ISIC). La planta es de porte alto, de ramas laterales largas y con abundantes ramas secundarias y terciarias en la parte inferior y media. Los entrenudos del eje vertical y bandolas son cortos. Las hojas son de color verde oscuro y acurrujadas, con brotes verdes y/o bronceados. El aspecto denso y compacto la hace resistente al viento y tolerante a los problemas de sequía. El fruto es de tamaño grande y de color rojo, con una calidad de bebida excepcional (S.L. 2018). En taza destacan su gran equilibrio, con notas florales, dulces y cítricas, que se muestran de mayor manera si el café es producido en zonas de gran altitud. Al cultivarla entre 1200 y 1500 metros de altura, se obtienen rendimientos de 57 a 85 quintales por hectárea con frutos de mayor tamaño (S.L. 2018).

Villa Sarchi: Es una mutación natural del Bourbon, fue descubierto en 1952 en el pueblo costarricense de Villa Sarchi, en la provincia de Alajuela, en la zona de West Valley. La mejor calidad de esta variedad se encuentra en plantaciones a la sombra y al no necesitar suelos muy fértiles, es ideal para plantaciones con métodos orgánicos de producción. En taza destaca su dulzura, aroma agradable, buen balance y sabor, y sobre todo por su intensa acidez, esta no es tan fina o elegante como en las Típicas, pero su intensidad se mantiene incluso en plantaciones a altitudes tan bajas como los 1200 metros (S.L. 2018).

Geisha: Fue descubierta en 1931 en Gesha, una aislada cadena montañosa al Suroeste de Etiopía. Originalmente se la conoció como variedad Abisinia, fue trasladada primero a Kenya y más tarde (alrededor de 1935) a Tanzania. Desde allí, a través de Costa Rica,



llegó a Panamá, y de ahí creció su fama y prestigio mundial. Se caracteriza por sus árboles de gran altura, con bonitas hojas largas, su manejo es mucho más complicado que las demás variedades, una peculiaridad es que sus ramas se desarrollan en un ángulo de 45° cuando lo normal es que lo hagan en un ángulo de 90°. Las cerezas y los granos son especialmente largos, y se ha demostrado que la mejor calidad se da a gran altitud. La variedad se destaca por su gran dulzura, sabor limpio y brillante, con notas afrutadas, también pudiéndose encontrar notas de cacao y canela, y aromas florales a jazmín (S.L. 2018).

Pacas: Híbrido natural de Bourbón que fue descubierto en 1949 en la finca San Rafael, Cantón Palo Campana (Volcán de Santa Ana), departamento de Santa Ana, El Salvador, el fruto es de color rojo y su tamaño es mediano. El arbusto es de porte bajo, con ramas laterales que forman un ángulo de 45°, su follaje es abundante con hojas de color verde oscuro brillantes y ligeramente consistentes. Los entrenudos son cortos que le dan un aspecto compacto. Desarrolla una gran tolerancia a los problemas de sequía, viento y sol. Se adapta mejor a altitudes de 500 a 1000 metros sobre el nivel del mar y tolera suelos de baja capacidad de retención de agua (S.L. 2018).

Colombia: La variedad fue generada en 1980 en Cenicafé, como resultado de un proyecto de investigación iniciado a finales de la década de los años 60. Es una variedad compuesta formada al mezclar la semilla proveniente de las progenies más sobresalientes seleccionadas en un proceso basado en varias generaciones, considerando características tales como calidad de la bebida y del grano, porte bajo, alta producción, uniformidad fenotípica razonable, adaptabilidad y resistencia a la roya amarilla (Moreno y Alvarado 2000).

Limaní: Línea de la variedad Sarchimor probada experimentalmente por la Estación Experimental Agrícola en el barrio Limaní de Adjuntas, Puerto Rico. La variedad Sarchimor es producto del cruce artificial entre la variedad Villa Sarchí y el Híbrido de Timor. Es de porte similar al del Caturra. Su tronco es grueso y poco flexible. Las ramas laterales se forman entrenudos cortos a lo largo del tallo, son de mayor longitud y se ramifican abundantemente. Las hojas son anchas, gruesas y de color verde oscuro. Las hojas nuevas pueden ser verdes o bronceadas. Los frutos son de buen tamaño y maduran de

color rojo. Esta variedad es resistente a la roya del café. La calidad de la bebida es buena, se recomienda la siembra a partir de los 305 metros de altura (Monroig 2014).

### **3.6 Orígenes de Villa Rica**

Las poblaciones nativas que habitaron en la zona que comprende actualmente el distrito de Villa Rica son los “Yanasha” o “Amuesha”, quienes hoy en día representan alrededor del 2.9 por ciento de la población de la zona (Barrientos 2006).

En el año 1921 el gobierno peruano otorga 4000 hectáreas al alemán Leopoldo Krause, con el objetivo de que él y un grupo de colonos austro-alemanes las trabajaran e hicieran productivas. Cuatro años después, estos colonos impulsaron la fundación de Villa Rica, inicialmente con el nombre de Colonización Rada y Gamio. Posteriormente, en 1942, Leopoldo Krause ve la necesidad de poblar estas tierras y anima a sus vecinos austro-alemanes de Pozuzo y Oxapampa a unírsele en la tarea de colonización. Con esfuerzos propios los nuevos colonos en poco tiempo hacen posible la construcción de una escuela, de un templo y de la carretera Villa Rica – Puente Paucartambo, que une a Villa Rica con La Merced (Chanchamayo) (Desco.org.pe 2018).

El 27 de noviembre de 1944, mediante Ley N°10030, se legaliza a Villa Rica como distrito, y no es hasta 1950 que la actividad cafetalera adquiere un ritmo constante, favorecida por el alza de los precios internacionales (Desco.org.pe 2018).

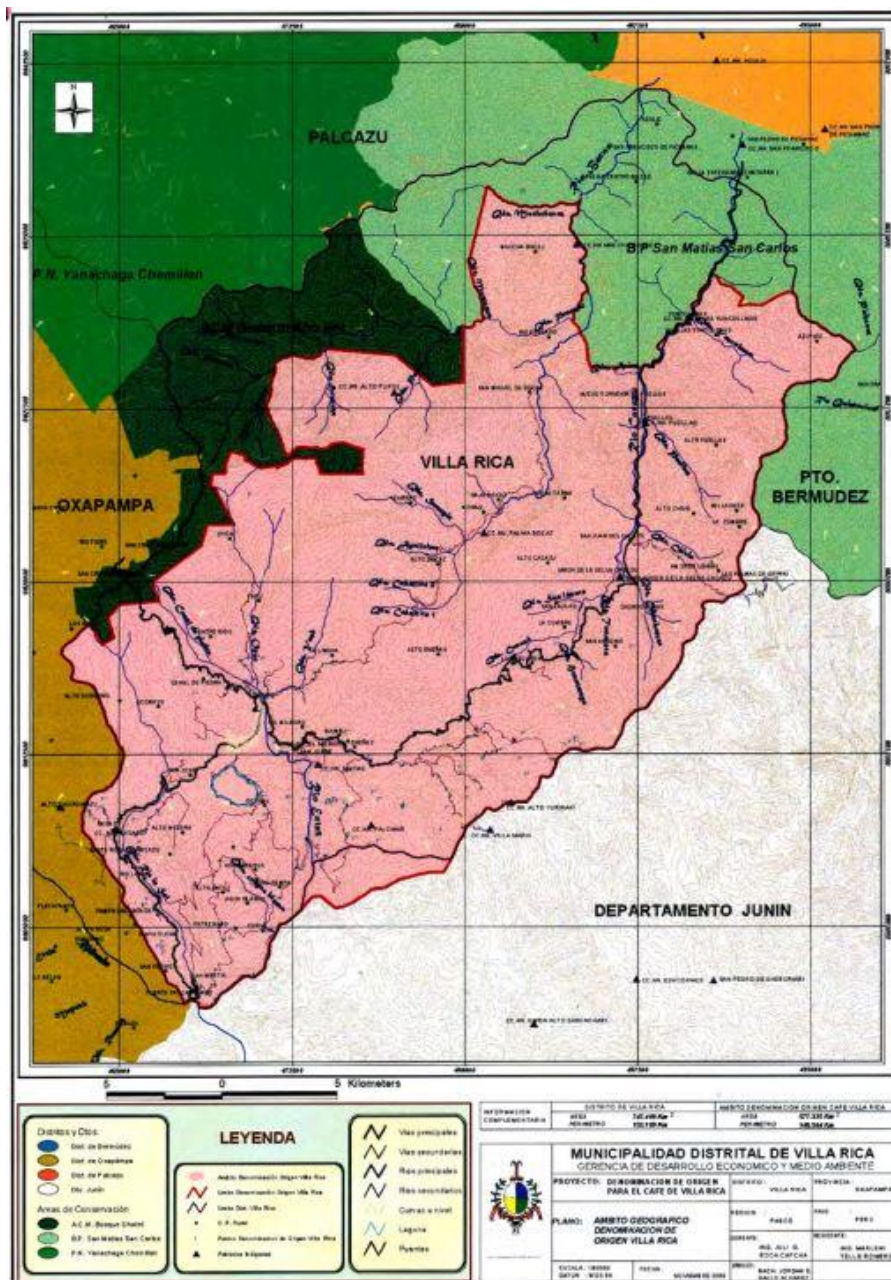
El distrito de Villa Rica concentra una población heterogénea y con características muy marcadas: un grupo mayoritario proviene de los Andes, las familias descendientes de los primeros migrantes austro-alemanes, y en el área rural cercano, las poblaciones originarias del lugar (Yaneshas) (Desco.org.pe 2018).

### **3.7 Información geopolítica de Villa Rica**

El distrito de Villa Rica está ubicado en la provincia de Oxapampa, región Pasco, a una altitud de 1500 metros sobre el nivel del mar y con una extensión territorial de 896.42 km<sup>2</sup>, tiene una población de 16931 habitantes (Desco.org.pe 2018).

El distrito está constituido por zonas de selva alta y selva baja, y se ubica entre los 75° 15` 00`` y 75° 16` 20`` de longitud oeste, y entre los 10° 42` 30`` de latitud sur. Villa Rica

posee una altitud máxima de 2068 metros sobre el nivel del mar, y una altitud mínima de 750 metros sobre el nivel del mar; además este distrito delimita territorialmente por el este con el distrito de Puerto Bermúdez (Oxapampa - Pasco), por el oeste con el distrito de Oxapampa (Oxapampa - Pasco), por el norte con el distrito de Palcazu (Oxapampa - Pasco) y por el sur con la provincia de Chanchamayo (Junín) (Ponce 2008). El núcleo urbano de Villa Rica, está constituido por tres centros poblados: San Miguel de Eneñas, San Juan de Cacazú y Puente Paucartambo (Desco.org.pe 2018).



**Figura 1.** Delimitación de la zona productora de Café Villa Rica.  
 Fuente: INDECOPI (2010).

### **3.8 El cultivo de café en el contexto de Villa Rica**

Gracias a la construcción de la carretera marginal de la Selva, se impulsaron mejoras y cambios en la zona. De esta manera se generaron flujos migratorios desde la sierra. Los migrantes llegan para la cosecha del café como jornaleros, con estadías limitadas, pero posteriormente se fueron asentando en el distrito de Villa Rica (Desco.org.pe 2018).

La economía del distrito gira en torno a la producción y comercialización del café, principal actividad agrícola del distrito. El 90 por ciento de las familias villaricenses se dedican esta actividad (Ponce 2008) y el 90 por ciento de la producción agrícola es cafetalera (Barrientos, 2006). Es tal la importancia del café para el distrito, que se ha introducido en todas sus actividades, incluyendo festivales, monumentos, desarrollo turístico (la ruta del café), el logotipo de identificación del Municipio, los certámenes de belleza, etc. (Ponce 2008).

### **3.9 Mejoramiento genético del café**

Los métodos convencionales de mejoramiento son basados en la selección de individuos superiores, que son escogidos de la progenie provenientes de cruces sexuales. La selección que se realiza se basa en características fenotípicas, como por ejemplo el vigor de la planta, la apariencia general, y también por características de tipo cuantitativas como rendimiento y la composición química del fruto. Los factores medioambientes pueden afectar la eficiencia de la selección por caracteres fenotípicos y por la complejidad de la herencia de caracteres poligénicos (Wilches 1995).

Actualmente, los programas de mejoramiento en café buscan combinar propiedades de resistencia presentes en el Híbrido de Timor, con la buena productividad y calidad de los genes de *C. arabica*. En centros de investigación alrededor del mundo, las características de resistencia a los nemátodos, roya (Leguizamón, 1983) y al CBD (antracnosis de frutos) han sido ampliamente demostradas tanto en las líneas pura del Híbrido de Timor como en sus descendientes, los Catimores (Carvalho 1988, Anzueto 1993, Aguilar *et al.* 1996).

Utilizados datos de la distribución geográfica, observaciones citológicas, datos taxonómicos, características agro-morfológicas y bioquímicas, se ha analizado la variación genética del café. Se ha demostrado la existencia de relación entre la cantidad de ácidos

clorogénicos, cafeína y otros compuestos químicos, con el origen biogeográfico de algunas especies de *Coffea sp.* (Anthony *et al.* 1993, Rakotomalala *et al.* 1993).

Los marcadores moleculares son una herramienta, que permite reducir las limitaciones basadas en la selección por el fenotipo. Un marcador molecular de ADN es una representación de un gen en particular que se cosegrega con los genes de interés (Rafalski *et al.* 1991). Los primeros trabajos de caracterización a nivel molecular realizados en café se hicieron de isoenzimas.

Las isoenzimas son proteínas que pueden presentar formas estructurales diferentes. Al ser colocadas en un medio idóneo (gel de almidón, agarosa o poliacrilamida), dentro de un campo de migración se pueden separar las diferentes formas de la enzima, la separación se produce por el peso molecular y la carga eléctrica que posean, de esta manera se pueden distinguir diferencias en la composición química de los individuos. Los ensayos se ven limitados por el número de loci polimórficos detectados, como en el caso de *C. arabica*. En especies tetraploides como en *C. arabica* se observan la acumulación de bandas, sin mucha variación, estas bandas observadas corresponden a los progenitores, lo que produce que el índice de polimorfismo encontrado con este método sea bajo para esta especie, en comparación con otras especies de *Coffea sp* (Berthou y Trouslot 1977); diferenciándose del nivel de variación morfológica que existe dentro del germoplasma (Louarn 1978).

### **3.10 Diversidad genética**

La diversidad de una especie está constituida por todas las variaciones genéticas. La variación entre poblaciones de una especie, más la variación dentro de las poblaciones constituye la diversidad genética total de una especie. El conocimiento de la base genética de las diferencias es indispensable para entender la diversidad genética, prerrequisito para colectarla, conservarla, caracterizarla y utilizarla. A las especies se las subdivide en categorías intraespecíficas como razas, ecotipos, morfotipos y variedades; la diversidad genética relativa de una especie en una determinada región se basa en el número de categorías intraespecíficas (Sevilla y Holle 2004).

### **3.11 Variabilidad genética**

La variabilidad genética es una característica de las poblaciones dentro de una especie, la cual se aplica a los caracteres; por ejemplo, la variabilidad genética de un ecotipo de camu-

camu para el contenido de ácido ascórbico del fruto, puede ser cuantificada en términos de variancia genética aditiva y no aditiva. Si no hay variancia genética para una característica dentro de una población, este carácter no podrá ser modificado por la selección, y si se produce un cambio en las condiciones medioambientales y este afecta a un carácter, este podría desaparecer de la población (Sevilla y Holle 2004).

La variabilidad genética de una especie es originada por mutación, producida por el cambio en un nucleótido en el sector de la cadena de ADN que codifica un gen. En la naturaleza son muy común los genes con alelos múltiples. El polimorfismo derivado de la interacción de alelos de un mismo gen es la base de muchos métodos para estimar la variabilidad genética (Sevilla y Holle 2004).

### **3.12 Caracterización molecular**

La caracterización es el acto de determinar las características peculiares de alguien o de algo, de modo que se pueda distinguir de los demás. Para este estudio el carácter es cualquier peculiaridad o atributo que varía en la Unidad Taxonómica Operativa (OTU) en estudio (Sneath y Sokal 1973).

La caracterización morfológica y/o molecular de individuos permite determinar el grado de diversidad genética y su distribución, entre y dentro de poblaciones de una determinada especie; así como, el establecimiento de relaciones filogenéticas (García-Carrión, 2008).

En la Genética Molecular los caracteres o atributos están relacionados a puntos de referencia en los cromosomas y técnicamente son denominados marcadores moleculares. Los marcadores moleculares permiten detectar variaciones en las secuencias de ADN cuando se comparan distintos individuos (genotipos), poblaciones o especies con los que se pueden estimar la variabilidad genética y otros parámetros poblacionales; además de hallar el grado de diversidad genética de una especie (García-Carrión, 2008).

### **3.12 Aislamiento del ADN**

La extracción del ADN en plantas es el primer paso al uso de técnicas con marcadores moleculares. Es necesario tomar en cuenta tres factores para la extracción del ADN vegetal:

El tipo de planta y de tejido que se va a emplear como fuente, debido a que los tejidos tiernos contienen más ADN que los tejidos viejos. También hay que tener en cuenta la composición bioquímica de los tejidos. Por ejemplo, deben de ser diferentes los métodos de extracción del material genético proveniente de tejidos ricos en compuestos fenólicos, al de los tejidos ricos en carbohidratos o aceites.

1. El tipo de ADN a extraer, en las plantas existe tres tipos de ADN, el nuclear, mitocondrial y el cloroplástico, su nombre es recibido por el organelo que lo contiene, los distintos tipos de ADN tienen características bioquímicas similares, pero codifican diferente información biológica.
2. El tipo de análisis a realizar, con base en la cantidad y la calidad del ADN se pueden desarrollar diversas técnicas de análisis, como pueden ser: RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR, secuenciación, etc.

El objetivo de la extracción del ADN es obtener una preparación de buena calidad y en gran cantidad. La calidad se refiere a la posibilidad de almacenar el ADN por tiempo indefinido, manteniendo su estructura y propiedades y es la calidad del ADN el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores. En tanto que la cantidad es un concepto relativo que depende, entre otros, del número y estado de las células propias del tejido a estudiar. Una buena extracción debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración (Rocha 2002).

Rocha (2002), indica que los protocolos de extracción de ADN vegetal, deben incluir cuatro pasos indispensables que son:

1. Ruptura de tejidos y paredes celulares. Este paso consiste en pulverizar el material vegetal a bajas temperaturas, generalmente empleando nitrógeno líquido o hielo seco (Rogers y Bendich, 1988). También existe la pulverización en seco, que es un proceso en el cual los tejidos se deshidratan por secado en un horno o con silicagel.
2. Ruptura de membranas. Una vez el tejido es disgregado en células, se hace necesario romper las membranas celulares para liberar el ADN. Esto puede ser llevado a cabo químicamente con detergentes como, por ejemplo: SDS (dodecilsulfato sódico), Triton X-100, CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) o detergentes comerciales.
3. Inhibición de enzimas que destruyen al ADN. Como un mecanismo de defensa natural, las células contienen enzimas llamadas DNasas, que destruyen el ADN.

Estas enzimas deben ser inactivadas para garantizar la calidad de las preparaciones de ADN. La inhibición puede realizarse mediante métodos físicos, tales como desnaturalización por calor (65 °C) o con métodos químicos, estos últimos incluyen tratamiento con solventes orgánicos (fenol y cloroformo), con antioxidantes (Dithiothreitol y  $\beta$ -mercaptoetanol), con agentes quelantes (EDTA, EGTA) que capturan los iones magnesio necesarios para la funcionalidad de las DNAsas, o con agentes caotrópicos que actúan removiendo el agua estructural de las proteínas (Rogers y Bendich 1988).

4. Extracción de contaminantes. El objetivo de extraer ADN es obtener preparaciones enriquecidas en esta molécula. Los reactivos empleados en los procesos iniciales de purificación se convierten en agentes contaminantes. Las metodologías para retirar los contaminantes de una preparación de ADN incluyen: la centrifugación a altas velocidades, la electroforesis, la separación a través de columnas e incluso la utilización de imanes (biomagnética) para obtener preparaciones de alta pureza. Un contaminante generalmente presente en preparaciones de ADN es el ARN (ácido ribonucleico). Esta molécula se degrada por incubación con la enzima RNasa.

### **3.14 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*) fue concebida por Kary Mullis a mediados de la década del 80 (Mullis y Faloona 1987). La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción cíclica dirigida enzimáticamente que permite la amplificación *in vitro* de una región del ácido desoxirribonucleico (DNA), localizada entre dos regiones de secuencia conocida. Utiliza dos oligonucleótidos que funcionan como “iniciadores”, que se hibridan a las cadenas opuestas de DNA de secuencia complementaria, flanqueando a la secuencia de interés. (Camarena *et al.* 2014). Estos iniciadores son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región “blanco” (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, apareamiento y elongación o polimerización. En la primera, el ADN de doble cadena es desnaturalizado mediante el aumento de la temperatura que puede variar de 92 °C a 95 °C. En la segunda etapa, la temperatura es rápidamente reducida entre 35 °C y 60 °C, dependiendo del tamaño y la secuencia del cebador utilizado, que permite la hibridación ADN - ADN de cada cebador



con las secuencias complementarias que flanquean la región “blanco”. Enseguida la temperatura es elevada a 72 °C para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión de la cadena a partir de cada terminal 3' de los cebadores mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde la secuencia - blanco. Este ciclo se repite algunas decenas de veces. Una vez que la cantidad de ADN de la secuencia - blanco se duplica en cada ciclo, la amplificación sigue una progresión geométrica de manera que, después de unos 20 ciclos, se produce más de un millón de veces la cantidad inicial de la secuencia - blanco (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Los productos de amplificación (amplicones) del primer ciclo serían el resultado de la síntesis de DNA del patrón original, de longitud indefinida. La polimerasa del DNA sintetizaría nuevas moléculas (a partir de tales moldes o patrones) hasta que fuese interrumpida por el inicio del siguiente ciclo. A partir del tercer ciclo, los productos de amplificación poseerían una longitud definida, pues únicamente se sintetizan los fragmentos de la secuencia "objetivo", cuya longitud correspondiera a las posiciones de alineamiento (anillamiento, ensamblaje) de los iniciadores con el patrón original. En lo consecutivo, la secuencia "objetivo" se amplificará exponencialmente (Camarena *et al.* 2014).

Las técnicas basadas en la PCR (RAPD, SSR, ISSR, AFLP), utilizan mínimas cantidades de material genético. Estas técnicas difieren entre sí en la longitud y secuencia de los cebadores empleados, condiciones de la PCR y en el método de separación y detección de los fragmentos. Los marcadores moleculares basados en la PCR emplean cebadores de secuencia arbitraria, semiarbitraria o específica (Velasco 2005).

### **3.15 Marcadores Moleculares**

Un marcador es considerado como un carácter cuyo patrón de herencia puede definirse en un nivel morfológico o fenotípico, bioquímico o molecular. Se le utiliza para obtener, aunque de manera indirecta, información con respecto de las bases genéticas de los caracteres o rasgos de interés en el organismo sujeto a estudio (Camarena *et al.* 2014).

Los marcadores moleculares o marcadores del DNA se entienden como regiones o segmentos del DNA cuya función codificadora generalmente se desconoce, pudiéndose ubicar en las inmediaciones de un gen y determinar un carácter de interés agronómico que

pueda evaluarse en cruzas genéticas. Al asociar un marcador con un determinado locus es posible verificar con gran precisión la segregación de los alelos que se ubican en tal locus. La distribución uniforme de estos marcadores a todo lo largo del genoma ha permitido su uso en estimaciones de la contribución genética de cada progenitor a cada miembro de una población segregante. De tal manera, que ha sido posible emplear los polimorfismos entre individuos para el mapeo genético. Consecuentemente, se han transformado de manera radical el estudio y la práctica de la genética

Los parámetros a considerar para la evaluación y elección del marcador molecular más apropiado para la investigación y manipulación de caracteres cuantitativos, son:

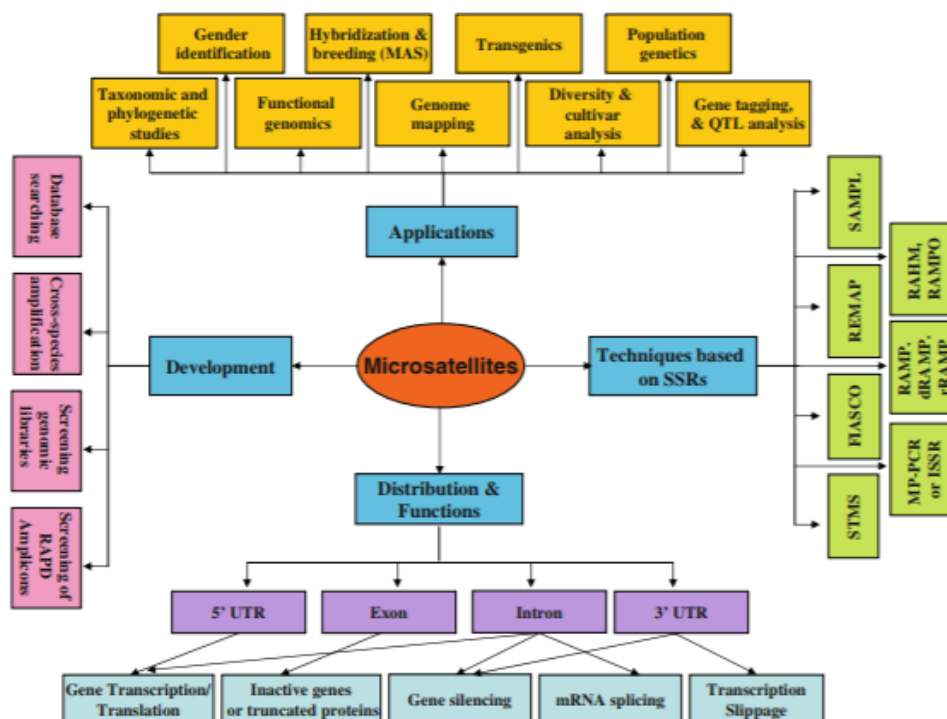
- Base molecular. Los eventos moleculares responsables de los polimorfismos observados son considerados como la base molecular. La simplicidad o complejidad de la modificación de ésta se encuentra en función de los cambios en el nivel de la secuencia de nucleótidos y del número de eventos moleculares.
- Polimorfismo. Los marcadores útiles e informativos son aquellos marcadores que registran el mayor número de alelos por locus.
- Distribución genómica. El sistema de marcadores deberá detectar el mayor número de loci o de grupos de ligamiento a todo lo largo del genoma.
- Mapa. La asociación y segregación de dos (o más) marcadores permite la construcción de un mapa de ligamiento.
- Estabilidad ambiental y experimental. Las fluctuaciones ambientales no afectan teóricamente el análisis de marcadores moleculares de manera significativa. La estabilidad experimental y reproducibilidad son fundamentales para contar con la plena certeza de que las diferencias observadas son en realidad genéticas.
- Factibilidad. El análisis sobre un gran número de individuos o líneas requiere que los métodos de marcadores moleculares sean rápidos, eficaces y lo menos costoso posible (Camarena *et al.* 2014).

Un gran número de técnicas moleculares puede ser utilizado para obtener marcadores de diversidad mediante la detección de polimorfismo a nivel de ADN (Tautz 1989). Estas técnicas moleculares pueden dividirse en dos grupos: Las técnicas que emplean sondas para la detección de los marcadores y las que necesitan la amplificación del ADN mediante PCR para identificar a los marcadores.

### 3.15.1 Marcadores microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como SSRs (“Simple Sequence Repeats”) o STRs (“Short Tandem Repeats”), fueron descritos por Tautz (1989), como secuencias cortas de DNA constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem. En genomas eucariontes son frecuentes estas secuencias cortas, arbitrariamente están mejor distribuidas, constituyen la clase más polimórfica de marcadores moleculares (Ferreira y Grattapaglia 1998).

La existencia de marcadores microsatélites en plantas había sido sugerida cuando se observó que oligonucleótidos compuestos por elementos repetidos de tipo TG y GATA/GACA, mostraban polimorfismo cuando se utilizaban como sonda RFLP (Weising *et al.* 1989, Beyermann *et al.* 1992). Una búsqueda en bancos de datos de secuencia de ADN publicadas reveló que los sitios microsatélites están ampliamente distribuidos con una frecuencia de uno cada 50 mil pares de bases. Su frecuencia se constató en 34 especies vegetales, siendo el elemento repetido más común el dinucleótido AT (Morgante y Olivieri 1993).



**Figura 2.** Microsatélites: desarrollo, distribución, funciones y aplicación.  
Fuente: Kalia *et al.* (2011).

### **3.15.2 Base genética de los marcadores microsatélites (SSR)**

Las regiones que contienen secuencias sencillas repetidas son amplificadas individualmente a través de PCR por medio de un par de “primers” específicos complementarios a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite. Los segmentos que se amplifican de estos sitios presentan un extenso polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos, de esta manera cada microsatélite constituye un locus genético altamente variable, multialélico de gran contenido informativo. Cada segmento amplificado de tamaño diferente representa un alelo diferente del mismo locus (Ferreira y Grattapaglia 1998).

La detección de secuencias SSR vía PCR se realiza en geles de poliacrilamida o agarosa especial de alta resolución, la visualización puede hacerse directamente por coloración con bromuro de etidio, nitrato de plata o a través de autorradiografía utilizando primers marcados con radioisótopos en la reacción de PCR (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Cada locus de microsatélite es analizado individualmente al utilizarse cada par de primers construido específicamente para su amplificación, se pueden analizar más de un locus a la vez, siempre que los alelos de cada locus tengan tamaños diferentes y migren hacia zonas separadas del gel (Ferreira y Grattapaglia 1998).

### **3.15.3 Ventaja de los marcadores microsatélites**

Teniendo en cuenta la expresión codominante y el multialelismo, los marcadores SSR son los que poseen el más elevado contenido de información de polimorfismo o PIC, de manera que cualquier población segregante puede ser usada como referencia para estudios de ligamiento y mapeo genético (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Al ser muy frecuentes y estar distribuidos al azar, permiten completa cobertura de cualquier genoma eucarionte. En genomas animales los sitios microsatélites están bien conservados entre especies relacionadas, lo que permite en algunos casos la transferencia de marcadores entre especies e incluso entre géneros usando primers heterólogos (Moore *et al.* 1991, Pepin *et al.* 1995, Menotti-Raymond y O’Brien 1995).

### **3.15.4 Limitaciones de los marcadores microsatélites**

Su mayor limitación es la gran cantidad de trabajo necesario para su desarrollo previo, su construcción comprende los siguientes pasos: Primero la construcción de una biblioteca genómica de fragmentos pequeños (300 a 500 pb). Estos clones son seleccionados por la presencia de microsatélites, usando sondas sintéticas complementarias a los elementos repetidos más comunes en el organismo. Los clones positivos son secuenciados y finalmente se construyen pares de primers específicos para secuencias únicas cuidadosamente seleccionadas, mediante programas informáticos, que se amplifican para verificar el nivel de polimorfismo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Para reducir el trabajo en el desarrollo de un marcador, en vez de secuenciar las cuatro bases, se puede secuenciar sólo una de las bases presente en el elemento repetido, como ejemplo solamente A o T para elementos AT en el caso de las plantas. La limitación básica está relacionada con la gran cantidad de trabajo que se necesita, exigiendo personal especializado y equipamiento sofisticado para el secuenciamiento automático (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

### **3.15.5 Uso de marcadores microsatélites para el análisis de la diversidad genética**

En los últimos años los microsatélites han cobrado importancia en estudios que van desde caracterización individual hasta mapeo genómico. Debido al alto nivel de polimorfismo, carácter codominante, facilidad de aplicación y alta reproducibilidad, son marcadores ampliamente utilizados y muy informativos. En la identificación de individuos estrechamente relacionados, clones o cultivares se estima que los microsatélites tienen poder de discriminación siete veces mayor que los RAPD (Kraic *et al.* 1998)

En general, la amplificación de microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD. Por ejemplo, en *Cucumis* 29 isoenzimas no mostraron polimorfismo entre dos genotipos comerciales (Perl-Treves *et al.* 1985). Dentro del mismo género RAPD detectó un 38 por ciento de polimorfismo, mientras que los microsatélites detectaron un 71 por ciento, e incluso detectaron diferencias genéticas entre cultivares altamente emparentados que mediante otras técnicas no habían podido ser distinguidos (Katzir *et al.* 1996).

Trabajos sobre caracterización de diversidad genética vegetal sugieren que los microsatélites son útiles para identificar duplicados en bancos de germoplasma, para establecer grupos o asociaciones entre individuos de una población de acuerdo con la especie, localización geográfica, relaciones filogenéticas, entre otras (Muñoz *et al.* 2008).

La evaluación de la diversidad genética y las relaciones filogenéticas ha resultado en la identificación de algunas accesiones mal clasificadas que fueron reclasificadas. La evaluación de la diversidad genética y la construcción de relaciones filogenéticas proporcionarán información importante para elegir líneas parentales para programas de mejoramiento, clasificación de accesiones de germoplasma vegetal y mayor curación y adquisición de nuevas accesiones de germoplasma vegetal (Wang *et al.* 2009).

La diversidad genética existente en 43 introducciones de una colección de uchuva *Physalis peruviana* L, fue estudiada por Bonilla *et al.* (2008), para ello utilizaron la técnica molecular RAM (Microsatélites amplificados al azar). El análisis de similitud diferenció cuatro grupos y 24 haplotipos. La heterocigosidad calculada fue alta, la cual puede estar asociada con la probable naturaleza alógama de la especie, o a la introducción de parientes silvestres. El Análisis de correspondencia múltiple, separó cuatro grupos con coeficiente de similitud de 86 por ciento. Las 39 introducciones del grupo 1 pertenecieron a *P. peruviana* L.; las introducciones de fruto rojo se reunieron en el grupo 2 y las introducciones recolectadas en el departamento del Valle en los grupos 3 y 4.

### **3.15.6 Uso de marcadores microsatélites para resistencia a estreses**

Los marcadores moleculares vinculados al gen o genes de interés (resistencia) facilitarían la selección indirecta de las regiones ligadas a la resistencia en las poblaciones reproductoras, mediante estrategias de selección asistida por marcadores (MAS). Tanto el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) como los marcadores de repetición de secuencia simple (SSR) se han usado ampliamente para identificar regiones genómicas que influyen en la resistencia a enfermedades en diferentes cultivos (Herrera *et al.* 2009)

Simko *et al.* (2004), indican que la asociación entre un marcador de microsatélite y QTL para la resistencia a *Verticillium dahliae* se identificó en cultivares de papa que condujeron a la clonación de QTL por resistencia a *V. dahliae*.

Romero *et al.* (2014), haciendo una revisión de trabajos señala que, en los últimos diez años, los estudios moleculares sobre la resistencia a la roya del café han desarrollado marcadores que están estrechamente relacionados con algunos genes de resistencia a la roya amarilla. Por ejemplo, estudiando el gen SH3 de la especie *C. liberica*, Prakash *et al.* (2004) y Mahé *et al.* (2008), desarrollaron los primeros marcadores específicos de locus estrechamente vinculados a esta región, mientras que Lashermes *et al.* (2010), emprendió su mapeo genético y físico.

Herrera *et al.* (2009), identificaron siete marcadores (5 AFLP y 2 SSR) que muestran una estrecha asociación con la resistencia parcial a roya amarilla, en una población segregada a partir de un cruce entre Caturra y el Híbrido de Timor. Estudiando la misma población, Romero *et al.* (2010), analizaron el determinismo genético de tales resistencias e identificó casi 40 secuencias de café que exhiben una alta homología con diferentes genes candidatos de resistencia y defensa. Más recientemente, también utilizando una población F2 derivada del Híbrido de Timor, de Brito *et al.* (2010), identificaron una región genómica involucrada en la resistencia a la raza II que aparentemente es conferida por un gen dominante relacionado con el factor SH5. Aunque todos estos informes han abierto nuevas posibilidades para la implementación futura de la selección asistida por marcadores (MAS), todos los principales genes resistentes a enfermedades transportados por el Híbrido de Timor y derivados de la especie *C. canephora* (es decir, SH6 a SH9, y tal vez más) quedan por identificar.

Prakash *et al.* (2004) mapearon marcadores moleculares vinculados a los genes de resistencia de *H. vastatrix*, en una población F2, el análisis de introgresión del gen de resistencia SH3 de *C. liberica* en *C. arabica* dio como resultado 21 marcadores ligados al polimorfismo de la longitud del fragmento (AFLP).

Mahé *et al.* (2008) en un estudio para mapear marcadores moleculares vinculados a los genes de resistencia de *H. vastatrix*, hallaron dos marcadores genéticos caracterizados por secuencia, que se cosegregaron perfectamente con el gen SH3, por lo que son adecuados para el MAS y la pirimidación de genes.

### **3.15.7 Marcadores SCAR**

Las técnicas de marcadores arbitrarios (RAPD, AFLP, etc.) son sensibles a los cambios en las condiciones de reacción. Con el fin de cerrar la brecha entre la capacidad de obtener marcadores vinculados a un gen de interés en un corto tiempo y el uso de estos marcadores para los enfoques de clonación basados en mapas y para los procedimientos de detección de rutina, se desarrolló y aplicó la técnica de secuencias caracterizadas de regiones amplificadas (SCAR) (Agarwal *et al.* 2008).

Los SCAR se basan en la PCR y representan fragmentos de ADN genómico en loci genéticamente definidos, que se identifican mediante amplificación por PCR usando cebadores de oligonucleótidos específicos de secuencia (Paran y Michelmore 1993, McDermott *et al.* 1994).

El polimorfismo aparece por la presencia o ausencia de amplificación de la banda o puede aparecer cuando los polimorfismos de longitud convierten los loci marcadores primarios arbitrarios dominantes en marcadores SCAR codominantes, siendo estos más informativos para el mapeo genético que los marcadores moleculares dominantes arbitrarios, ya que se pueden usar para seleccionar bibliotecas genómicas agrupadas mediante PCR y mapeo físico (Chelkowski y Stephen 2001), definiendo la especificidad del locus (Paran y Michelmore 1993) también como mapeo comparativo (Guo *et al.* 2003) y estudios de homología entre especies de plantas relacionadas.

Diola *et al.* (2011), desarrollaron marcadores SCAR para la raza dos de *Hemilea vastatrix*, derivada del híbrido de Timor, los que flanquean el gen SH2 a 0.7cM (CaRHvII 1533) y 0.9 cM (CaRHvII 3459), cosegregan con el gen de resistencia y pueden contribuir eficazmente a programas de mejoramiento de café.

### **3.16 Roya amarilla del café**

La roya amarilla del café es la enfermedad más destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a que esta enfermedad provoca la caída prematura de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte



regresiva en ramas e incluso la muerte de los árboles (The American Phytopathological Society 2011).

La enfermedad causada por el hongo Biotrófico *Hemilea vastatrix* Berk, es una de las más importantes patologías del cultivo de café. Apareció inicialmente en el continente africano y se extendió por casi todas las áreas de cultivo, con excepción de Australia y Hawai. En Brasil, la enfermedad fue diagnosticada en 1970. En los nuevos lugares, la presión de selección provocada por el ambiente sobre el patógeno aceleró la evolución y la formación de nuevas variantes de razas (Varzea y Marques 2005). Más del 75 por ciento de las plantaciones son susceptibles al ataque de las principales razas fisiológicas del patógeno, y cuando no es controlada, provoca pérdidas que se sitúan entre el 30 y el 50 por ciento de la producción (Zambolim *et al.* 2005).

En 1983 se tuvo el primer registro de esta enfermedad en Colombia, con pérdidas de hasta un 30 por ciento en cultivos donde no se realizaron acciones de manejo. Más recientemente, en este mismo país, durante el período de 2008 a 2011, en algunas de las variedades comerciales susceptibles de las principales zonas cafetaleras del país, se presentó un inusual incremento en la incidencia de esta enfermedad, así como una mayor severidad en hojas infectadas (> 30 por ciento) (Cristancho *et al.* 2012).

La sintomatología de la enfermedad se caracteriza por la presencia de manchas de color anaranjado en el envés de la hoja, al inicio de la infección las lesiones son pequeñas de color amarillo claro y translúcidas, a los pocos días aparecen las uredosporas, dando a la lesión un color anaranjado intenso. Con el tiempo las lesiones aumentan de tamaño dejando en el centro un área necrótica donde la esporulación disminuye. La apariencia de una lesión puede variar dependiendo de la variedad de café (Rayner 1972).

La temperatura, la humedad y en menor grado la radiación solar, son los factores microclimáticos que afectan el ciclo de vida de *H. vastatrix*. El factor de mayor incidencia en el periodo de incubación y periodo de latencia de la enfermedad es la temperatura (Becker *et al.* 1991, Kushalappa y Eskes 1989).

### 3.16.1 El patógeno

*Hemileia vastatrix*, hongo de la familia de las uredinales, se especializa en parasitar células vegetales vivas (hongos Bitrófico); por lo tanto, es un parásito obligado que no puede sobrevivir en suelo o materia inerte (Gast *et al.* 2013)

El ciclo de vida del hongo consta de las etapas de diseminación, germinación, colonización y reproducción (Kushalappa y Eskes 1989), citado por (Gast *et al.* 2013).

- a. Diseminación: Realizada por medio de urediniosporas, producidas en grandes cantidades y corresponden al polvillo amarillo o naranja del envés de las hojas.
- b. Germinación: Proceso en el que la espora depositada en el envés de las hojas, emite los tubos germinativos, entre 6 a 12 horas, requiriendo agua libre, poca luminosidad con temperaturas inferiores que oscilan entre 28 a 16 °C.
- c. Colonización: Forman estructuras en el interior de las hojas denominadas haustorios, son las que entran en contacto con las hojas y extraen los nutrientes para su crecimiento, momento en el que aparecen zonas cloróticas en la hoja.
- d. Reproducción: Pasado 30 días, el hongo madura y se diferencian estructuras llamadas soros, que se encargan de producir nuevas urediniosporas, en una proporción de 1600 urediniosporas por cada mm<sup>2</sup> de hoja durante 4 a 5 meses (Gast *et al.* 2013).

### 3.16.2 Genes de resistencia

Los genes dominantes de resistencia del café a *H. vastatrix*, han sido designados como “S<sub>H</sub>” y el correspondiente factor de virulencia del patógeno es el gene “v”. En analogía con la identificación de la raza del patógeno, los genotipos del huésped con espectros de resistencia similares se han clasificado en el CIPF en grupos de resistencia por grupos fisiológicos (Kushalappa y Eskes 1989). Los genes S<sub>H1</sub>, S<sub>H2</sub>, S<sub>H4</sub>, S<sub>H5</sub> provienen de *C. arabica*, los genes S<sub>H6</sub>, S<sub>H7</sub>, S<sub>H8</sub> y S<sub>H9</sub> de *C. canephora*, el gene S<sub>H3</sub> de *C. liberica* (Diola *et al.* 2011).

Los genes S<sub>H</sub> de resistencia como el S<sub>H4</sub>, cuando se encuentran en estado heterocigoto, confiere una reacción de resistencia incompleta, en tanto que el gen S<sub>H3</sub> muestra variabilidad de resistencia a razas que tienen una virulencia baja o intermedia (Kushalappa y Eskes 1989).

### **3.16.3 Control genético de la enfermedad**

Los Híbridos de café que muestran tolerancia a la roya amarilla son los Catimores, obtenidos de la cruce de las variedades Timor y Caturra. Mediante la evaluación de los niveles de susceptibilidad a la enfermedad de los cafetales cultivados en el distrito de Rio Negro de la provincia de Satipo en la selva central de Perú, y según la escala propuesta por Campos *et al.* (2013), se determinaron la existencia de cafetales susceptibles y resistentes, la mayoría de los campos están cultivados con variedades susceptibles, debido a la mayor demanda en el mercado por su calidad de taza y aroma, como la variedad Caturra y en menor proporción las variedades con características de ser tolerantes y resistentes, las principales variedades susceptibles sembradas son Caturra, Typica, Bourbon, Geisha y Pache, las variedades resistentes sembradas son Catimor, Costa Rica 95, Castillo, Gran Colombia y Pacamara (Gamarra *et al.* 2015).

### **3.17 Análisis de datos**

#### **3.17.1 Tablas de datos**

La información molecular se analiza de acuerdo al tipo de marcador y de organismo.

Para marcadores codominantes como aloenzimas, RFLPs o SSRs donde los genotipos pueden ser homocigotos o heterocigotos, hay dos posibilidades 1) los fragmento amplificados pueden ser codificados con datos binarios indicando la ausencia/presencia de cada alelo o 2) ingresando el genotipo, ya sea diploide, por ejemplo, homocigoto=AA, heterocigoto=AB o haploide, por ejemplo, alelo A y alelo B (Balzarini *et al.* 2006).

Los datos obtenidos de la evaluación se presentan en una Matriz de Datos (MBD), es una matriz tipo  $n \times t$ , donde  $n$  (columnas) representa a los caracteres y,  $t$  (filas) a los OTU OTUs. Es necesario también asignarles un símbolo a los datos no obtenibles, los que se descartan durante su procesamiento (Crisci y López 1983).

#### **3.17.2 Distancia Genética**

Los índices de distancias genéticas se dividen en dos grupos: El primero incluye las distancias geométricas, que reflejan la similitud entre poblaciones con respecto a las frecuencias alélicas, que éstas presentan en determinados sistemas genéticos, sin asumir a priori supuesto evolutivo alguno (Demarchi 2009). La medida más utilizada y apropiada para microsatélites es la distancia  $D_A$  de Nei, que representa las relaciones poblacionales, a partir de datos generados por computadora, como datos generados empíricamente

(Takezaki y Nei 1996, 2008). El segundo grupo incluye aquellas que se basan en modelos evolutivos, donde la variación es atribuida principalmente a la acción de la mutación y la deriva, asumiendo que los marcadores utilizados no están sujetos a la selección natural. Estas distancias se ajustan al modelo de alelos infinitos (IAM), la distancia más utilizada basada en el modelo IAM es la distancia estándar  $D_a$  de Nei (1972), que también ha demostrado ser adecuada para el análisis de microsatélites (Takezaki y Nei 2008).

### **3.17.3 Proporción de loci polimórficos**

Un locus es considerado polimórfico si se observan variaciones en la población para ese locus y si la frecuencia del alelo más común no supera 0.99 o 0.95. La proporción de *loci* polimórfico se calcula como el número de loci polimórfico sobre el número total de loci. Cuando existen múltiples loci y cada locus se clasifica como polimórfico o no, es posible calcular el porcentaje de loci polimórfico. La proporción de loci polimórficos se calcula como el número de loci polimórficos/número total de loci (Balzarini *et al.* 2006).

### **3.17.4 Heterocigosis**

Una medida simple de variación genética en una población es la proporción de individuos heterocigotas observados, la cual puede ser calculada para cada locus o como un promedio a través de todos los loci. La heterocigosis de un locus estima la probabilidad de que un individuo sea heterocigota para ese locus en la población (Balzarini *et al.* 2006).

La heterocigosis se puede calcular de dos maneras: (1) por conteo directo, como la proporción de individuos muestreados que son heterocigotas y (2) realizando una estimación insesgada basada en el valor esperado condicional de las frecuencias alélicas (Heterocigosis esperada o insesgada de Nei) (Nei 1978).

### **3.17.5 Contenido de información polimórfica (PIC)**

Para cuantificar el polimorfismo también es común utilizar el contenido de información polimórfica (PIC) (Botstein *et al.* 1980). Un valor de PIC alto indica mayor contenido de información de ligamiento. Cuando el número de alelos es grande, el contenido de información polimórfica se aproxima a la heterocigosis. Cuando todos los alelos tienen igual frecuencia, el PIC es menor que la heterocigosis (Liu 1998).

### 3.17.6 Número de alelos efectivos por locus

Se calcula como el recíproco de la suma de frecuencias alélicas al cuadrado para el locus en cuestión, se la obtendrá usando la siguiente ecuación (Balzarini *et al.* 2006):

$$\frac{1}{\sum_{i=1}^l p_i^2}$$

### 3.17.7 Análisis de conglomerados

El Análisis Cluster, conocido como Análisis de Conglomerados, es una técnica estadística multivariante que busca agrupar variables (marcadores) tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos (De la Fuente 2011).

Los conglomerados bayesianos se han utilizado para el estudio de mezclas de datos de microsatélites de distintas poblaciones (Pritchard *et al.* 2000).

En el análisis de conglomerados para agrupar casos, si se utiliza una matriz de datos  $n \times m$  (casos  $\times$  variables), se calcula primero una matriz de distancias ( $n \times n$ ) que contiene las interdistancias entre todos los pares de casos y luego sobre esa matriz se aplica un procedimiento de conglomeración o agrupamiento, luego el algoritmo de conglomeración trabajará sobre una matriz de interdistancias  $m \times m$ . (Balzarini *et al.* 2006). Para realizar el análisis de conglomerado, es necesario seleccionar una medida de distancia o similitud entre los objetos a agrupar y un criterio o algoritmo de agrupamiento.

### 3.17.8 Medida de asociación

Para poder unir variables o individuos es necesario tener algunas medidas numéricas que caractericen las relaciones entre las variables o los individuos, la medida de asociación puede ser una distancia (distancia euclídea), o una similaridad.

Es importante seleccionar una medida de asociación que se adecue al tipo de datos (cuantitativo o cualitativo). Cuando las variables poseen naturaleza binaria, como puede ser el caso de presencia/ausencia de determinadas bandas de amplificación para marcadores moleculares se propone la similaridad:

- a. Número de caracteres donde ambas muestras coinciden en el 1.
- b. Número de caracteres donde la primera muestra tiene un 1 y la otra un 0.
- c. Número de caracteres donde la primera muestra tiene un 0 y la otra un 1.
- d. Número de caracteres donde ambas muestras coinciden en el 0.

La suma de estos 4 valores dará el total de caracteres medidos (De la Fuente 2011, Echenique *et al.* 2004).

		UTO 1	
		1	0
UTO 2	1	a	b
	0	c	d

**Figura 3.** Caracterización de dos OTUs donde se generan 4 diferentes posibilidades.  
Fuente: Zirilli (2009).

### 3.17.9 Técnica clúster

La técnica clúster puede dividirse en métodos jerárquicos y no jerárquicos, el método jerárquico se clasifica en:

Asociativo o aglomerativo, el cual parte con una situación en que cada observación forma un conglomerado y en sucesivos pasos se van uniendo, hasta que finalmente todas las situaciones están en un único conglomerado.

El jerárquico disociativo sigue el sentido inverso, parte de un gran conglomerado y en pasos sucesivos se va dividiendo hasta que cada observación queda en un conglomerado distinto (Balzarini *et al.* 2006, De la Fuente 2011).

El método no jerárquico está diseñado para la clasificación de individuos (no de variables) en K grupos. El procedimiento es elegir una partición de los individuos en K grupos e intercambiar los miembros de los clusters para tener una partición mejor (De la Fuente 2011).

### 3.17.10 Algoritmos para el análisis de clúster

Existen diversas formas de medir la distancia entre clusters que producen diferentes agrupaciones y diferentes dendogramas, dentro de los principales métodos encontramos:

- Método de la Media: La distancia entre clusters se calcula como la distancia media entre pares de observaciones, una de cada cluster.
- Método del vecino más próximo: La distancia entre dos clusters es el mínimo de las distancias entre un objeto de un cluster y un objeto del otro.
- Método del vecino más lejano: La distancia entre dos clusters es el máximo de las distancias entre un objeto de un cluster y un objeto del otro (De la Fuente 2011).

### **3.17.11 Estadísticos F**

Los estadísticos F de Wright miden la variación en la heterocigosidad comparando el valor observado con el esperado si las poblaciones estuvieran en equilibrio Hardy-Weinberg (Wright, 1921).

Wright estableció tres índices (Peakall y Smouth, 2006):

- $F_{IS}$ : considera la heterocigosidad de un individuo en promedio respecto a la de la subpoblación en promedio.
- $F_{IT}$ : considera la heterocigosidad de un individuo respecto a la población total.
- $F_{ST}$ : considera la heterocigosidad de una subpoblación respecto a la población total (Peakall y Smouth, 2006).

El índice más utilizado para el análisis de secuencias de ADN es el  $F_{IS}$ , mismo que será empleado en el presente estudio.

### **3.17.12 Análisis molecular de varianza**

El método de partición de sumas de cuadrados, en el contexto de información molecular multivariada, se conoce como AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) y es ampliamente usado ya que no depende de tantos supuestos biológicos como las técnicas de análisis basadas en frecuencias alélicas (Balzarini *et al.* 2006).

El AMOVA es importante cuando se pretende estudiar la variabilidad de una respuesta (multivariada de datos binarios) y conocer la influencia de ciertos factores de clasificación (que generan categorizaciones en los datos) sobre esa respuesta, concluye sobre la significancia de uno o más factores de clasificación de los elementos individuales (muestras o haplotipos) y provee estimaciones por el método de los momentos de las componentes de varianza asociadas a cada uno de estos factores. En el caso de existir dos o más factores de clasificación, éstos deben presentar una estructura jerárquica o anidada (Balzarini *et al.* 2006).

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 Material vegetal

Se tomaron muestras, de hojas tiernas, sin aparentes síntomas de estrés en plantas adultas de todas las variedades de *Coffea arabica* L. y de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, presentes en la colección del Fundo Santa Teresa, Los datos fueron registradas en la ficha de datos pasaporte (Anexo 1).



**Figura 4.** Variedades de plantas de café del Fundo Santa Teresa en Villa Rica, Departamento de Pasco - Perú. a) Pache, b) Gran Colombia, c) Limaní, d) Catuaí.



## 4.2 Material para la toma de muestras

Para la recolección de hojas de café se utilizaron los siguientes materiales:

- Ficha de datos pasaporte
- Equipo de posicionamiento global (GPS)
- Papel toalla
- Lapicero rotulador indeleble
- Lápiz de papel
- Etiquetas
- Bolsas de plástico
- Caja de Tecnopor

## 4.3 Lugar de muestreo

Las muestras fueron recolectadas en el Fundo Santa Teresa, ubicado en el Distrito de Villa Rica, perteneciente a la provincia de Oxapampa, Región Pasco, en la zona central del Perú. El Fundo se caracteriza por tener una amplia colección de variedades de café y por producir semillas de las distintas variedades.



**Figura 5.** Mapa de Perú, que indica la ubicación de la región Pasco y mapa del Distrito de Villa Rica, mostrando la ubicación del Fundo Santa Teresa.

**Cuadro 1:** Material vegetal del fundo Santa Teresa utilizado en el estudio (17 variedades árabicas, una variedad de *C. canephora*).

Nº	CÓDIGO	VARIEDAD	ESPECIE	Nº	CÓDIGO	VARIEDAD	ESPECIE	Nº	CÓDIGO	VARIEDAD	ESPECIE
1	JBrack1	Juan Brack	<i>C. arabica</i>	19	Pch1	Pache	<i>C. arabica</i>	37	Cau1	Catuaí	<i>C. arabica</i>
2	JBrack2	Juan Brack	<i>C. arabica</i>	20	Pch2	Pache	<i>C. arabica</i>	38	Cau2	Catuaí	<i>C. arabica</i>
3	JBrack3	Juan Brack	<i>C. arabica</i>	21	Pch3	Pache	<i>C. arabica</i>	39	Cau3	Catuaí	<i>C. arabica</i>
4	Cat1	Catimor 8667	<i>C. arabica</i>	22	CatA1	Caturra Amarilla	<i>C. arabica</i>	40	TypA1	Typica Amarilla	<i>C. arabica</i>
5	Cat2	Catimor 8667	<i>C. arabica</i>	23	CatA2	Caturra Amarilla	<i>C. arabica</i>	41	TypA2	Typica Amarilla	<i>C. arabica</i>
6	Cat3	Catimor 8667	<i>C. arabica</i>	24	CatA3	Caturra Amarilla	<i>C. arabica</i>	42	TypA3	Typica Amarilla	<i>C. arabica</i>
7	Marg1	Maragogipe	<i>C. arabica</i>	25	GeiR1	Geisha Roja	<i>C. arabica</i>	43	Lim1	Limaní	<i>C. arabica</i>
8	Marg2	Maragogipe	<i>C. arabica</i>	26	GeiR2	Geisha Roja	<i>C. arabica</i>	44	Lim2	Limaní	<i>C. arabica</i>
9	Marg3	Maragogipe	<i>C. arabica</i>	27	GeiR3	Geisha Roja	<i>C. arabica</i>	45	Lim3	Limaní	<i>C. arabica</i>
10	Pac1	Pacamara	<i>C. arabica</i>	28	BorR1	Bourbon Rojo	<i>C. arabica</i>	46	Rob1	Robusta	<i>C. canephora</i>
11	Pac2	Pacamara	<i>C. arabica</i>	29	BorR2	Bourbon Rojo	<i>C. arabica</i>	47	Rob2	Robusta	<i>C. canephora</i>
12	Pac3	Pacamara	<i>C. arabica</i>	30	BorR3	Bourbon Rojo	<i>C. arabica</i>	48	Rob3	Robusta	<i>C. canephora</i>
13	BorA1	Bourbon Amarillo	<i>C. arabica</i>	31	CatR1	Caturra Roja	<i>C. arabica</i>	49	PchA1	Pache Amarillo	<i>C. arabica</i>
14	BorA2	Bourbon Amarillo	<i>C. arabica</i>	32	CatR2	Caturra Roja	<i>C. arabica</i>	50	PchA2	Pache Amarillo	<i>C. arabica</i>
15	BorA3	Bourbon Amarillo	<i>C. arabica</i>	33	CatR3	Caturra Roja	<i>C. arabica</i>	51	PchA3	Pache Amarillo	<i>C. arabica</i>
16	Visar1	Villa Sarchí	<i>C. arabica</i>	34	GrC1	Gran Colombia	<i>C. arabica</i>	52	GeiA1	Geisha Amarilla	<i>C. arabica</i>
17	Visar2	Villa Sarchí	<i>C. arabica</i>	35	GrC2	Gran Colombia	<i>C. arabica</i>	53	GeiA2	Geisha Amarilla	<i>C. arabica</i>
18	Visar3	Villa Sarchí	<i>C. arabica</i>	36	GrC3	Gran Colombia	<i>C. arabica</i>	54	GeiA3	Geisha Amarilla	<i>C. arabica</i>

(Juan Brack) Denominación que otorga el agricultor.

#### **4.4 Materiales y equipos de laboratorio**

##### **4.4.1 Materiales para la extracción y cuantificación del ADN**

- Solución tampón CTAB 2X (CTAB 3%, 2.1mM NaCl, 250mM Tris HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8)
- Solución tampón CTAB al 10% (en NaCl, 0.7 M)
- $\beta$ -mercaptoetanol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol absoluto
- Alcohol isoamílico
- Solución tampón Tris-EDTA (TE) (Anexo 2)
- Enzima RNAsa
- Nitrógeno líquido

##### **4.4.2 Materiales para la amplificación por PCR**

- Set de Desoxiribonucleótidos trifosfatados (100 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- Enzima Taq ADN Polimerasa
- Solución tampón de PCR 10X
- Cebadores SSR y SCAR (Anexo 3)
- Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ )
- Agua libre de nucleasas (NFW)

##### **4.4.3 Materiales para la electroforesis y detección de bandas**

- Agarosa
- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder
- Xilencianol
- Solución tampón TBE (Tris Base 0.9 M, Ácido Bórico 0.9 M, EDTA 0.5 M, Agua destilada)
- Trizma Base
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
- Ácido Bórico
- Bromuro de etidio

- Solución tampón de carga (Anexo 5)
- Acrilamida al 6%
- Ácido acético glacial
- Etanol Absoluto
- Nitrato de Plata
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Formaldehido
- Agua Destilada

#### **4.4.4 Otros materiales**

- Tubos de 1,5 y 2 ml (Eppendorf)
- Morteros y pilones
- Tubos para PCR de 0.2  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas de 0,5 a 10  $\mu$ l, de 10 a 100  $\mu$ l y de 100 a 1000  $\mu$ l
- Guantes de nitrilo
- Papel toalla
- Papel aluminio
- Probetas de 250, 500 y 1000 ml
- Matraz de Erlenmeyer de 250 y 500 ml
- Papel bond
- Cinta Masking Tape

#### **4.4.5 Equipos**

- Micropipetores graduables de 0,5 a 10  $\mu$ l, de 2 a 20  $\mu$ l, de 20 a 200  $\mu$ l y de 100 a 1000  $\mu$ l
- Equipo de Baño María
- Congeladora (-20 °C)
- Centrífuga refrigerada J. P. Selecta
- Refrigeradora
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ 96
- Balanza analítica

- Cámaras de electroforesis horizontales
- Cámaras de electroforesis verticales (Figura 6)
- Horno Microondas
- Fuente de poder, Hoefer 600 Volt
- Foto documentador de geles, SmartView Pro UVCI-1000
- Autoclave
- Computadora
- Impresora
- Agitador magnético, New Brunswick Scientific



**Figura 6.** a. Equipo de electroforesis vertical, b. Termociclador

#### **4.5 Extracción de ADN**

El procedimiento de extracción del ADN se realizó mediante un protocolo con solución tampón CTAB establecido por Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones, resumidas en el Anexo 2. Este protocolo se ha estandarizado en el laboratorio de Biología Molecular del IBT para obtener ADN genómico puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la PCR. (Palomino *et al.* 2014; Pérez *et al.* 2011).

#### **4.6 Cuantificación y determinación de la calidad del ADN**

Para cada muestra stock de ADN obtenida se determinó la concentración, en un espectrofotómetro Epoch (Biotek), se realizaron dos repeticiones por muestra stock, aplicando 2  $\mu$ l de ADN en cada pocillo de la placa take3 del equipo Epoch. El equipo proporcionó la concentración en ng/ $\mu$ l y la relación A260/A280 (tasa de absorbancias a 260 nm sobre 280 nm), como parámetro de pureza del ADN, debiendo estar cercana a dos para

una óptima calidad. Luego de este procedimiento se prepararon diluciones de las muestras stock de ADN a una concentración de 30 ng/μl, necesaria para las reacciones de PCR.

#### **4.7 Amplificación mediante PCR de marcadores SSR y SCAR**

El análisis molecular se realizó mediante la técnica SSR y SCAR. Las secuencias de los iniciadores fueron obtenidas de la bibliografía revisada. Se seleccionaron 17 pares de iniciadores, que en su uso se había logrado obtener una mayor cantidad de polimorfismo para diversidad (Geleta *et al.* 2012, Teressa *et al.* 2010, Baruah *et al.* 2003, Silvestrini *et al.* 2007, Combes *et al.* 2000). Además de 10 pares de iniciadores asociados a resistencia, a la roya del café (Diola *et al.* 2011, Romero *et al.* 2014, Pestana *et al.* 2015, Herrera *et al.* 2009).

Se realizó un tamizado de los pares de iniciadores utilizando cinco muestras de ADN (cuatro variedades arábicas escogidas por características de resistencia y susceptibilidad a la roya del café y una de variedad Robusta).

El volumen total de reacción de PCR que se usó fue de 10 μl, la mezcla de reactivos (Master Mix) fue de 8 μl y se adicionó 2μl de ADN genómico de cada muestra. Las proporciones de los componentes del Master Mix, fueron establecidas para cada par de iniciadores mediante pruebas de amplificación en geles de poliacrilamida, tomando como punto de partida lo descrito por los autores de los iniciadores.

De igual manera los programas de amplificación, fueron establecidos, modificando las condiciones establecidas por los autores de los iniciadores, hasta obtener el perfil de amplificación deseado.

#### **4.8 Electroforesis en geles de agarosa**

Para la observación de la integridad de los ácidos nucleicos producto de la extracción de ADN, así como, para la separación de los productos de PCR durante el tamizado, se utilizaron geles de agarosa al 1 y 1,5 % respectivamente, mediante electroforesis horizontal (Anexo 4). Las diluciones de ADN y los productos de PCR fueron preparados de la siguiente manera: 2 μl de buffer de carga y 15 μl del producto de amplificación, para luego depositar cada mezcla en los pocillos del gel. El marcador de peso molecular se preparó colocando en un tubo Eppendorf, 6 μl de tampón de carga y 1 μl del marcador 100 bp DNA Ladder, y finalmente esta mezcla se depositó en el primer pocillo del gel, o separando dos grupos de muestras. La electroforesis se realizó por un lapso de tiempo de 90 minutos, a una potencia de 90 voltios.

## **4.9 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La separación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.

### **4.9.1 Preparación de geles de poliacrilamida**

Se prepararon geles de poliacrilamida al 6 por ciento, usando dos vidrios de 25 cm x 28 cm y de 4 mm de espesor, uno con muesca y el otro sin muesca. Ambos vidrios fueron limpiados y pulidos con la ayuda de etanol al 96 por ciento y frotado con papel tissue. Seguidamente, al vidrio con muesca se le aplicó un repelente de lluvia (“Rain X”) para evitar que el gel de poliacrilamida se adhiera al vidrio, mientras que, el vidrio sin muesca fue tratado con una solución adherente (12 µl de Bind Silano, 12 µl de ácido acético glacial y 1.5 ml de etanol absoluto). Los vidrios fueron pulidos con papel tissue y se dejaron secar por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se colocaron los separadores en medio de los dos vidrios y hacia sus extremos, fueron asegurados con binder clips, luego se procedió a colocar el peine entre los vidrios, asegurando que la presión para introducir el peine sea pareja, luego con ayuda de un nivel fueron nivelados los vidrios en posición horizontal, para asegurar la adecuada formación del gel con sus pocillos. Para preparar el gel se mezcló y homogenizó, 70 ml. de acrilamida, 42 µl de TEMED y 420 µl de APS (1g Persulfato de amonio/10 ml de agua miliQ); la solución de poliacrilamida fue vertida entre los vidrios, se colocó el peine y se dejó polimerizar por 30 minutos, para la formación del gel.

### **4.9.2 Instalación del equipo de electroforesis**

La cámara de electroforesis vertical se instaló colocando verticalmente los vidrios que contenían el gel de acrilamida gelificado, luego se añadió solución tampón TBE 0.5X en la parte superior de la cámara (cátodo) y solución tampón TBE 1X en la parte inferior (ánodo) (Figura 6a). La pre-corrída se realizó por 45 minutos a 600 voltios. Finalizada la pre-corrída de cada pocillo se eliminó la úrea con ayuda de una jeringa, para luego colocar 15µl de la mezcla: ADN producto de la amplificación, con solución tampón de corrída (Dye) (Anexo 5). Por último, se conectó la cámara a la fuente de poder a 600 V, por un tiempo de tres a cuatro horas.

### **4.9.3 Tinción y revelado de los geles de poliacrilamida**

Para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados, se realizó la tinción y revelado de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata. Este procedimiento consiste de las cuatro siguientes etapas: fijación, tinción, revelado y secado del gel; las cuales fueron efectuados de acuerdo al protocolo establecido por el laboratorio de Biología Molecular de la UNALM (Anexo 6).

### **4.9.4 Detección y evaluación de bandas**

El patrón de bandas se visualizó y registró mediante la luz emitida por una lámpara led, cada gel fue documentado mediante fotografías.

Los fragmentos amplificados fueron cuantificados, comparándolos con un marcador de peso molecular de 100 bp DNA. Para los cebadores de diversidad, se determinó el patrón de bandas característico para cada cebador, se contabilizaron las bandas polimórficas y se hallaron sus tamaños moleculares en pares de bases, para los cebadores asociados a resistencia se efectuó el mismo procedimiento y se comparó en todos los genotipos el patrón de banda asociado a la resistencia.

### **4.10 Análisis de los datos**

Para el análisis se eligieron como OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas) 54 genotipos diferentes, que corresponden a 17 variedades de *C. arabica* y una a *C. canephora*. Como caracteres, a los datos de presencia o ausencia del marcador molecular, mediante la cuidadosa visualización de los geles, lo que permitió la generación del perfil de identificación molecular para cada individuo. Las anotaciones corresponden al número uno o cero, para la presencia o ausencia, respectivamente; y para los datos con dudas le correspondió el número nueve. También se obtuvo el tamaño de los fragmentos microsatélites al ser comparados con el perfil de amplificación de marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder.

Mediante este análisis se construyó la matriz básica de datos, información que fue ingresada en hoja de cálculo de Microsoft Excel.

#### **4.10.1 Similitud genética**

Partiendo de la matriz básica de datos y utilizando el índice de similitud de Jaccard para observaciones multivariadas binarias, se estimó la similitud para cada par de genotipos posibles, con esta información se elaboró la matriz de similitud, como se observa en el



Anexo 7. El coeficiente de Jaccard, no tiene en cuenta el evento de ausencia simultánea, su fórmula es la siguiente:  $a(1,1) / a(1,1) + b(1,0) + c(0,1)$ .

#### 4.11 Análisis de variabilidad

##### 4.11.1 Número de alelos por locus

Se determinó el número de alelos por locus, cuando los alelos fueron claramente distinguibles, pudiendo ser usados para determinar presencia o ausencia de bandas.

##### 4.11.2 Proporción de loci polimórficos

Mediante el número de loci polimórficos, se obtuvo el porcentaje de ellos, al dividir el número de loci polimórficos para el número total de loci.

##### 4.11.3 Contenido de información polimórfica (PIC)

El valor PIC puede estar entre 0 y 1, y este refleja cuan informativo es un marcador en la población. Es considerado un locus altamente informativo si el PIC es mayor a 0.5, razonablemente informativo si el valor oscila entre 0.5 y 0.25 y ligeramente informativo si es menor de 0.25 (Botstein *et al.* 1980). Mediante la siguiente ecuación, se halló el valor PIC para cada marcador:

$$PIC = 1 - \sum_i p_i^2$$

donde  $p_i$  es la frecuencia poblacional del alelo  $i$ -ésimo (Nei 1973).

##### 4.11.4 Heterocigosis

La proporción de individuos heterocigotas observados, puede ser calculada para cada locus o como promedio de todos los loci, siendo este una medida de variación genética en la población (Balzarini *et al.* 2006). La heterocigosis se obtuvo de dos maneras:

1. Por conteo directo, como la proporción de individuos muestreados que son heterocigotas
2. Mediante la heterocigosis esperada o insesgada de Nei, usando la siguiente ecuación:

$$\hat{H} = \sum_{k=1}^r h_k / r$$

donde  $h_k$  es el valor de  $h$  para el  $k$ th locus (Nei 1978).

#### 4.11.5 Estadísticos F

Los estadísticos F Wright permiten medir la distancia genética entre subpoblaciones, y determina el grado de diferencia genética que existe entre las subpoblaciones y dentro de la población (de Vicente *et al.* 2004).

El índice de fijación  $F_{ST}$  determina el nivel de diferencia genética entre las subpoblaciones, debido a la deriva génica (García y Cañon, 2008), se estima mediante los componentes de varianza obtenidos del AMOVA de la siguiente manera:

$$F_{ST} = 1 - (HS/HT)$$

Donde:

HS = la heterocigosidad promedio esperada, estimada a partir de cada subpoblación.

HT = la diversidad génica total o la heterocigosidad esperada en la población total, estimada a partir de las frecuencias alélicas combinadas.

La interpretación de valores  $F_{ST}$  es la siguiente (de Vicente *et al.* 2004):

Valor $F_{ST}$	Diferenciación Genética
de 0 a 0.05	pequeña
de 0.05 a 0.15	moderada
de 0.15 a 0.25	grande
> 0.25	muy grande

#### 4.11.6 Análisis molecular de variancia

Se realizó el análisis molecular de variancia (AMOVA) con el programa Arlequin V. 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010), y se determinó la variación genética existente, medida por los marcadores moleculares SSR de diversidad. La variación genética total se dividió en dos componentes: la variación genética entre variedades, y la variación genética dentro de las variedades, que forman parte de la colección de cafetos del Fundo Santa Teresa.

Para el análisis se trabajó con datos binarios, de los cuales se crea la matriz de distancias entre cada par de individuos, con la finalidad de medir la estructura genética de las variedades que fueron muestreadas.

#### **4.11.7 Análisis de conglomerados**

A partir de la matriz básica de datos, y seleccionando una medida de distancia y algoritmo de agrupamiento jerárquico, se construyó la matriz de similitud genética (Anexo 7) y el dendograma (Figura 12), mediante el método de encadenamiento promedio o UPGMA y el índice de similitud de Jaccard, que son empleados para el caso de variables binarias.

Sneath y Sokal (1973) empíricamente demostraron que valores superiores a 0,8 de correlación cofenética, muestran una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendograma y que la técnica de ligamiento promedio es la que origina menor distorsión.

#### **4.11.8 Análisis de la estructura poblacional**

Para el análisis de la estructura de la población, se utilizó el programa Structure versión 2.3 (Pritchard *et al.* 2000), el cual utiliza un algoritmo bayesiano, basados en modelos que se usan ampliamente para agrupar datos genéticos (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003; Falush *et al.* 2007). El programa utiliza el método de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) para integrarse en el espacio de parámetros y realizar asignaciones de clúster (Hubisz *et al.* 2009).

#### **4.12 Identificación de resistencia a roya amarilla, mediante marcadores moleculares**

La evaluación de los marcadores asociados a la resistencia de la roya amarilla, se efectuó mediante comparación del tamaño de los productos de amplificación, con el de los fragmentos que identificaban la resistencia en cada uno de los trabajos de investigación de donde fueron los marcadores seleccionados (Anexo 3).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

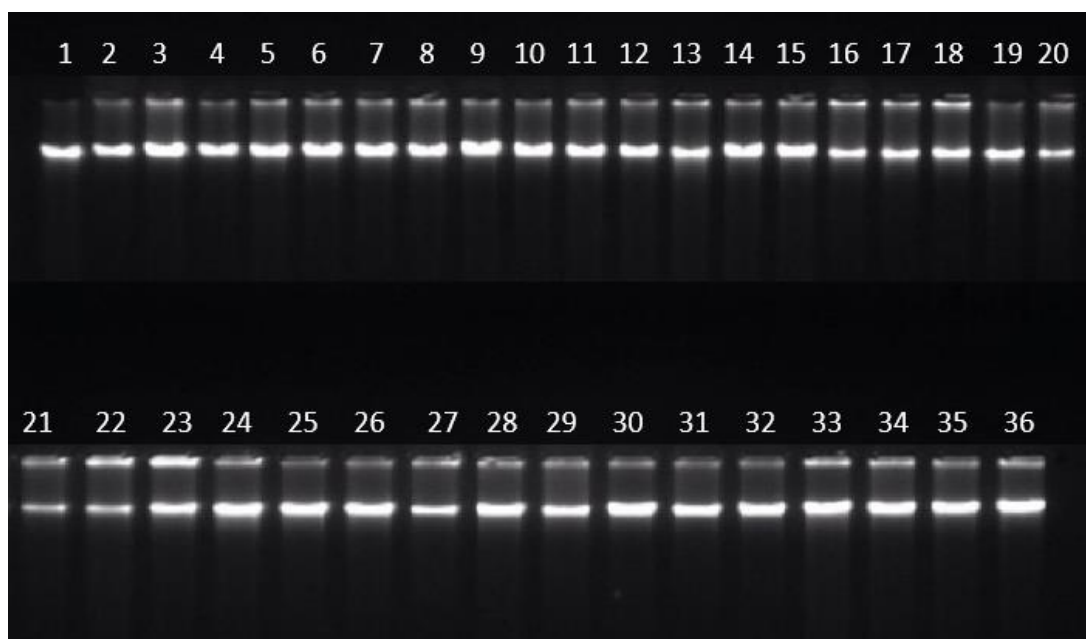
### 5.1 Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción del ADN de las plantas de café se utilizaron, hojas de los brotes y hojas adultas. Los valores de concentración que se obtuvieron de las 54 muestras presentaron elevada variación. La calidad de ADN fue adecuada, como se puede apreciar en la relación 260/280 del Cuadro 2, porque se encuentran cercanos a 1.8.

**Cuadro 2:** Valores de la relación 260 nm/280 nm y la concentración obtenidos mediante espectrofotometría del ADN extraído de las muestras de café.

N°	Código	260/280	ng/μl	N°	Código	260/280	ng/μl
1	JBrack1	1.8	1446	28	BorR1	1.9	1250
2	JBrack2	1.8	2527	29	BorR2	1.8	1359
3	JBrack3	1.8	2347	30	BorR3	1.8	2364
4	Cat1	1.8	1754	31	CatR1	1.9	1116
5	Cat2	1.8	682	32	CatR2	1.8	1090
6	Cat3	1.9	1248	33	CatR3	1.9	1325
7	Maig1	1.8	891	34	GiC1	1.8	1331
8	Marg2	1.9	1846	35	GrC2	1.8	925
9	Marg3	1.9	1487	36	GrC3	1.8	2834
10	Pac1	1.8	888	37	Cau1	1.8	1009
11	Pac2	1.9	1896	38	Cau2	1.9	1110
12	Pac3	1.8	2517	39	Cau3	1.7	3335
13	BorA1	1.8	1069	40	TypA1	1.8	2478
14	BorA2	1.8	2695	41	TypA2	1.8	2373
15	BorA3	1.8	2639	42	TypA3	1.8	1927
16	Visar1	1.8	905	43	Lim1	1.8	2108
17	Visar2	1.8	3122	44	Lim2	1.8	1313
18	Visar3	1.8	2483	45	Lim3	1.8	1572
19	Pch1	1.8	2751	46	Rob1	1.9	1288
20	Pcli2	1.9	1322	47	Rob2	1.8	3086
21	Pch3	1.8	2194	48	Rob3	1.9	852
22	CatA1	1.9	778	49	PchA1	1.9	1912
23	CatA2	1.7	3401	50	PchA2	1.8	2045
24	CatA3	1.7	2508	51	PchA3	1.9	1005
25	GeiR1	1.8	2961	52	GeA1	1.9	2620
26	GeiR2	1.9	3551	53	GeA2	1.8	1940
27	GeiR3	1.8	3574	54	GeA3	1.9	2001

El ADN obtenido de las muestras fue íntegro. La integridad del ADN se pudo determinar mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento, concentración utilizada para generar poros de mayor tamaño, que permite separar moléculas grandes como las de ADN genómico (Wilson y Walker, 2000). En la Figura 7, se puede observar a 36 muestras de ADN íntegros, que no se presentan “smear” en los carriles, lo cual es característica de ADN fragmentado.



**Figura 7.** Gel de agarosa al 1 por ciento donde se muestran las bandas del ADN genómico producto de la extracción realizada de las muestras de café.

Los valores de concentraciones de ADN y de la proporción de absorbancia 260/280 que se obtuvieron en el presente trabajo de investigación, fueron similares a los obtenidos por Palomino *et al.* 2014. Debido a que en ambos trabajos se utilizó el protocolo de extracción establecido por Doyle y Doyle (1990) con modificaciones, necesarias para ser utilizado en el laboratorio de Biología Molecular IBT (Anexo 2).

Después de realizar la dilución, la concentración de ADN obtenida alcanzó los valores recomendados para las reacciones de PCR, y generar la huella molecular de las muestras evaluadas, además que los marcadores tipo microsatélites no requieren de altas concentraciones del ADN para su amplificación (Martínez, 2015).

## 5.2 Análisis de marcadores SSR utilizados

Se evaluaron 17 pares de iniciadores para el análisis de la diversidad, y 10 asociados a la resistencia a roya amarilla. Para el análisis de diversidad se utilizó el programa InfoGen 2016 (Balzarini y Rienzo 2016), los datos fueron analizados por el programa como provenientes de organismos diploides, debido al origen anfiploide de la especie *C. arabica*. El par de iniciadores del marcador de diversidad CMA 233 amplificó fragmentos monomórficos por lo que fue descartado para el análisis, los 16 restantes mostraron fragmentos polimórficos. De los pares de iniciadores para marcadores asociados a resistencia tres no presentaron amplificado alguno durante el tamizado (SSR 071, ETCA-EATG 560, ETCA-EAGA 530), por lo que fueron excluidos para el análisis. Dos pares de iniciadores microsatélites (SFcan 022c y 05RM1) no amplificaron los fragmentos esperados, correspondientes a la resistencia a roya amarilla, sin embargo, amplificaron fragmentos polimórficos, por lo que fueron utilizados como marcadores de diversidad.

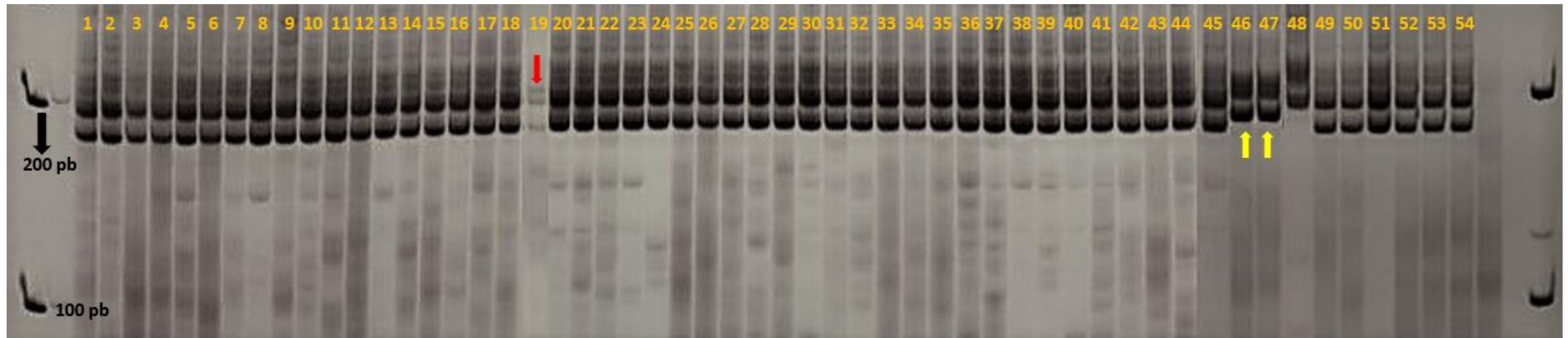
En la amplificación de las 54 muestras con los 18 pares iniciadores seleccionados para el análisis de diversidad, al menos un fragmento polimórfico fue encontrado por par de iniciadores, como lo indica el Cuadro 4. Este elevado número de marcadores polimórficos hallados contrasta con los reportados por Maluf *et al.* (2005), y Vieira *et al.* (2010) quienes obtuvieron solo 22 marcadores polimórficos de los 127 evaluados, Herrera *et al.* (2009) reportaron 3 de 13 marcadores, y Geleta *et al.* (2012) reportaron 8 de los 12 marcadores; gran parte del polimorfismo obtenido en el presente trabajo se produce por la presencia en la población de genotipos pertenecientes a *C. canephora*, además, porque en el presente trabajo se seleccionaron los marcadores más polimórficos para *C. arabica* reportados en la bibliografía.

**Cuadro 3:** Relación de marcadores microsatélites, con sus características de amplificación, utilizados para la evaluación de las muestras de café.

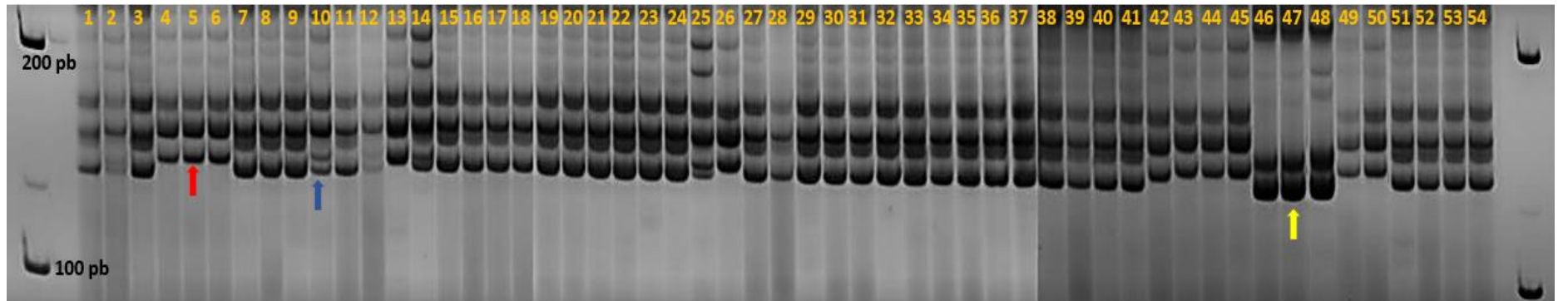
<b>Iniciador</b>	<b>Objetivo</b>	<b>TH O. (C°)</b>	<b>TH M. (C°)</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Rango de alelos<sup>1</sup> (pb)</b>	<b>Rango de alelos<sup>2</sup> (pb)</b>
M24	Diversidad	55	55	30	140-146	132-212
CMA199	Diversidad	50	55	35	112-153	137-163
AY2434	Diversidad	50	55	35	178-199	186-200
Sat207	Diversidad	51	56	32	82-97	78-98
SSR03	Diversidad	56	56	32	142-148	161-189
CM5	Diversidad	54	54	32	188-194	188-270
E12-3CTG	Diversidad	60	65	30	150	149-187
471	Diversidad	54	58	32	293-320	300-362
CMA055	Diversidad	50	58	35	292-320	89-109
CaM03	Diversidad	62	64	32	82-97	170-200
SSR09	Diversidad	56	55	32	124-130	129-153
CMA198	Diversidad	50	56	35	195-236	195-251
CM8	Diversidad	60	57	35	159-183	172-222
AY 2449	Diversidad	50	60	35	273-194	296-333
CaM16	Diversidad	62	62	32	188-194	211-222
CMA233	Diversidad	50	55	35	255-270	255-273
CM16	Diversidad	55	62	35	95-129	106-128
SFcan022c	Diversidad	53	50	35	225	593-630
05RM1	Diversidad	53	61	35	300	792-891
Sat225	Resistencia	55	50	35	300	270-308
Sat259	Resistencia	55	56	30	159, 183	179-226
SSR016	Resistencia	55	45	30	140, 146	132-149
SFcan0105b	Resistencia	53	58	35	190	161-194
SFcan0105d	Resistencia	53	54	35	244	239-251

Donde TH O. es la temperatura de hibridación original y TH M. la modificada. <sup>1</sup> Rango o tamaño de alelos indicado en las publicaciones, <sup>2</sup> Rango de alelos obtenidos de las variedades del fondo Santa Teresa.

Para reducir la presencia de artefactos no deseables, se modificaron las temperaturas de hibridación en 16 de los 19 microsatélites como se aprecia en el Cuadro 3. La modificación en los perfiles de amplificación de la PCR, permitieron presentar resultados robustos y precisos para la caracterización como se aprecia en las Figuras 8 y 9.



**Figura 8.** Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador AY2434 en la amplificación de 54 muestras. La flecha roja indica polimorfismo en un individuo de la variedad Pache, las flechas amarillas indican polimorfismo en 2 individuos de *C. canephora*.



**Figura 9.** Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador CMA199 en la amplificación de 54 muestras. La flecha roja indica polimorfismo en un individuo de la variedad Catimor, las flechas amarillas indican polimorfismo en 3 individuos de *C. canephora* y la flecha azul resalta polimorfismo en un individuo de la variedad Pacamara.



El par de iniciadores CaM03 fue el que mayor número de alelos diferentes amplificó (14 bandas), este marcador se amplificó en una proporción del 14.55 por ciento, para las 54 muestras. Los pares de iniciadores con mayor contenido de información polimórfica fueron: 471 y M24, con valores PIC de 0.33 y 0.25 respectivamente; estos valores indican que son marcadores razonablemente informativos, para la población evaluada, según parámetros establecidos por Botstein *et al.* 1980; El iniciador que presenta la menor proporción de loci polimórficos fue CaM03, revelando que es el iniciador con la menor capacidad discriminatoria, fueron hallados 14 loci con el iniciador CaM03. Sin embargo, se puede decir que los marcadores utilizados en el presente trabajo son ligeramente informativos. La menor probabilidad que dos individuos compartan el mismo alelo por iniciador, fue encontrada para el par de iniciadores CMA 198, (PDICMA 1.10E-02), indicando que dicho iniciador presenta un elevado grado de confianza para la identificación de hasta 54 muestras de café comparadas simultáneamente, por los valores PIC mostrados en el Cuadro 4.

Por el poder discriminante de un locus, se obtuvieron valores de diversidad genética similares entre los iniciadores utilizados. Los marcadores que detectaron mayor diversidad genética fueron: 471, M24, CMA055 y CMA199 con valores de 0.42, 0.30, 0.27 y 0.26 respectivamente, el valor promedio de diversidad genética que se obtuvo de todos los marcadores fue 0.17, que difieren al reportado por (Cubry *et al.* 2007), que fue de 0.30 para *C. arabica* y 0.60 para *C. canephora*, y de 0.35 reportado por Geleta *et al.* (2012). Las diferencias podrían deberse a las poblaciones evaluadas, ya que en dichos trabajos fueron evaluadas colecciones mayores y de diferentes países, y por el contrario la población evaluada en el presente trabajo, solamente correspondió a la de un fundo de una de las principales regiones cafetaleras de Perú.

**Cuadro 4:** Descripción de los datos obtenidos del análisis de marcadores SSR con las muestras de café del Fundo Santa Teresa.

<b>Iniciadores</b>	<b>BP</b>	<b>BM</b>	<b>BT</b>	<b>PMF (95)</b>	<b>PIC</b>	<b>E.E.</b>	<b>AMP</b>	<b>PDICMA</b>	<b>DG</b>
AY2434	4	0	4	0.50	0.08	0.01	50.00	8.40E-03	0.09
CM5	6	0	6	1.00	0.10	0.00	50.00	3.50E-03	0.11
SSR09	4	0	4	1.00	0.15	0.00	50.00	8.40E-05	0.17
CM8	4	0	4	1.00	0.19	2.90E-03	49.07	2.30E-06	0.21
AY2449	4	0	4	0.50	0.08	2.30E-03	50.00	9.10E-03	0.09
471	6	0	6	1.00	0.33	0.01	45.68	4.00E-15	0.42
CMA198	5	0	5	0.40	0.07	3.80E-03	39.63	1.10E-02	0.08
M24	6	0	6	1.00	0.25	0.02	37.96	8.90E-09	0.30
CMA199	6	0	6	1.00	0.22	0.04	34.88	3.10E-08	0.26
E12-3CTG	2	1	3	0.33	0.08	3.40E-03	66.05	3.90E-02	0.06
CMA 055	6	0	6	0.67	0.22	0.04	33.64	3.00E-08	0.27
CaM16	3	0	3	1.00	0.17	0.01	33.33	8.50E-06	0.19
05RM1	6	0	6	0.67	0.13	0.01	32.41	4.60E-05	0.15
Sat 207	7	0	7	0.57	0.09	0.02	29.10	4.60E-03	0.10
SSR 03	7	0	7	0.57	0.14	0.03	28.04	7.70E-05	0.16
CM16	3	2	5	0.60	0.20	0.02	73.33	2.20E-04	0.15
SFcan022c	4	0	4	0.50	0.11	0.01	25.93	1.20E-03	0.12
CaM03	14	0	14	0.29	0.09	0.02	14.55	1.90E-03	0.10
Total	97	3	100		0.34		37.74	5.10E-83	0.17

Donde BP es bandas polimórficas, BM bandas monomórficas, BT bandas totales, PMF es la proporción de loci polimórficos, PIC es el contenido de información polimórfica, E.E es el error estándar del PIC, AMP es el porcentaje de amplificación, PDICMA es la probabilidad que dos individuos compartan el mismo alelo, y DG es la diversidad genética.

### 5.3 Análisis de varianza molecular

El análisis de varianza molecular (AMOVA) se realizó por medio del programa Arlequin V. 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) (Cuadro 5). En dicho análisis se dividió la variación genética total en dos fuentes de variación: varianza molecular entre variedades, y varianza molecular dentro de las variedades. Se muestra que existe mayor grado de variabilidad genética entre las variedades que, dentro de las variedades, el porcentaje de variación entre las variedades es 66.58 por ciento y el porcentaje de variación dentro de las variedades es de 33.42 por ciento, estos resultados son muy parecidos con los mostrados por Missio *et al.* (2009) en la que obtuvieron aproximadamente un 64 por ciento de variación entre las poblaciones y 36 por ciento dentro de las poblaciones, en variedades comerciales de *C. arabica*, seis genotipos de *C. arabica*, cinco de *C. canephora*, tres del Híbrido de Timor y tres triploides (*C. arabica* x *C. racemosa*), por lo tanto, la variación hallada en la colección

estudiada es similar a las de otras colecciones, y podría ser utilizada en programas de mejoramiento genético.

El coeficiente  $F_{ST}$  considera la heterocigosidad de una subpoblación respecto a la población total. Frankham *et al.* (2002) afirma que valores superiores a 0.15 son indicadores de una significativa diferenciación genética entre subpoblaciones. El valor  $F_{ST}$  medio que se obtuvo con los iniciadores empleados es de 0.67, parecido al valor reportado por Missio *et al.* (2009) ( $F_{ST} = 0.637$ ). Por lo tanto, los marcadores SSR utilizados detectaron una alta tasa de polimorfismo genético o diferenciación genética entre las variedades evaluadas.

El análisis AMOVA y el valor  $F_{ST}$  obtenido, nos indican que existe una significativa diferenciación genética entre las variedades, posiblemente porque los marcadores moleculares seleccionados están permitiendo encontrar diferencias moleculares entre las variedades, además en el Fundo Santa Teresa habría muy baja mezcla entre las variedades.

Al efectuar el AMOVA sin la presencia de los individuos de *C. canephora*, se obtuvo una pequeña reducción de la variación entre las variedades, lo que demuestra que los marcadores utilizados podrían permitir diferenciar genéticamente a los individuos por variedades dentro de la misma especie, el nuevo valor obtenido fue 61.02 por ciento como se observa en el Anexo 10, la variación obtenida dentro de las variedades, sin individuos de *C. canephora* sufrió un incremento al 38.98 por ciento. Demostrando que dentro de la variedad Robusta existe mayor variación genética, que se puede explicar por el tipo de polinización cruzada, típica de especies alógamas como es la especie *C. canephora*.

**Cuadro 5:** Análisis AMOVA (Índice de fijación  $F_{ST} = 0.67$ ).

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre variedades	17	345.981	5.81173 Va	66.58
Dentro de variedades	36	105.000	2.91667 Vb	33.42
Total	53	450.981	8.7284	

Índice de Fijación  $F_{ST}$ : 0.66584

#### 5.4 Estructura poblacional

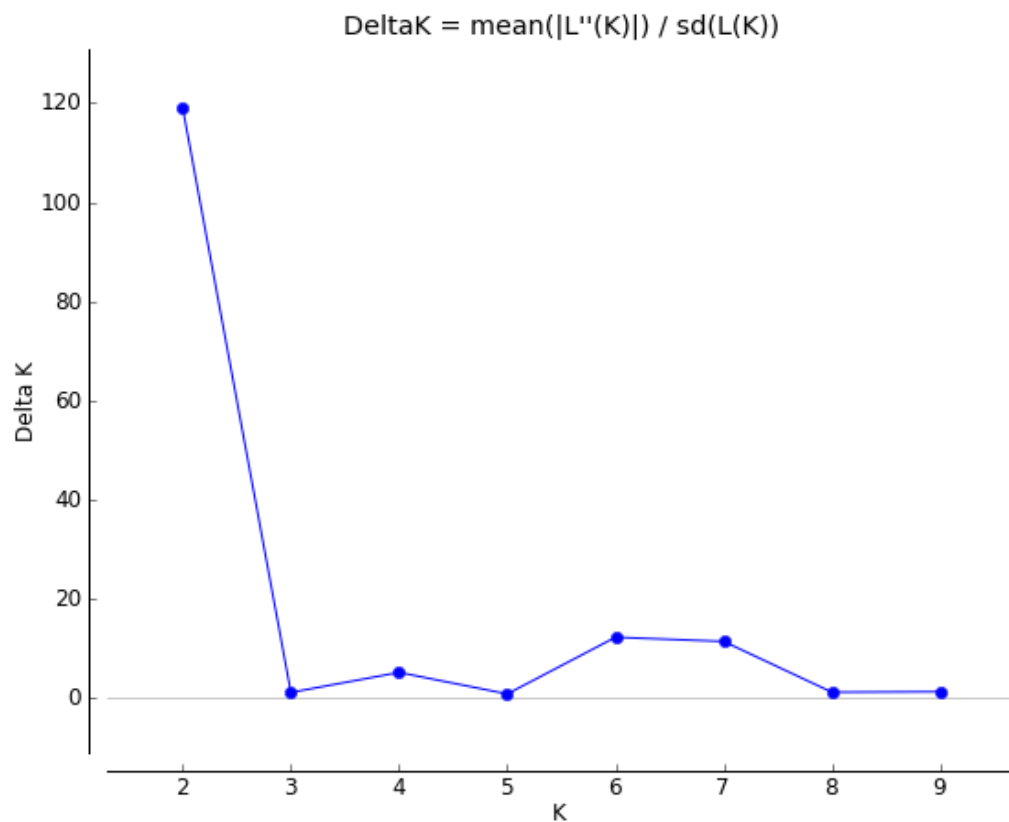
Mediante el uso de 18 marcadores SSR se evaluó la estructura de la población de cafés del Fundo Santa Teresa. Se utilizó el algoritmo bayesiano con el programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.* 2000), que permite realizar mediante el número de clúster K, un análisis de agrupamiento de los individuos. Además, estima las frecuencias alélicas en cada grupo y miembros de la población para cada individuo, el programa puede realizar las estimaciones de dos maneras: el “modelo sin mezclas”, asume que cada individuo pertenece a un solo grupo, mientras que en el "modelo de mezcla" más general, estima las proporciones de mezcla para cada individuo. Utiliza la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) para integrarse en el espacio de parámetros y realizar asignaciones de clúster (Hubisz *et al.* 2009).

En la Figura 11, se pueden apreciar múltiples barras verticales, cada barra corresponde a un individuo o muestra, si la barra tiene un solo color, significa que el 100 por ciento del genoma del individuo pertenece al clúster de ese color, pero si la barra tiene más colores significa que el individuo comparte el genoma con otro clúster (Martínez 2008).

Se ha utilizado un período de “burn-in” de 4000 repeticiones y un largo de corridas de 4000, estas se realizaron en 10 valores de K de manera independiente, y fueron repetidas tres veces para corroborar la consistencia de los resultados, el K óptimo se lo obtuvo mediante el programa en línea Structure Harvester (Earl y vonHoldt, 2012). Dicho programa utilizando el método Delta K (Evanno *et al.* 2005), permite obtener valores para graficar el K óptimo, que representará la estructura de la población. El valor de K óptimo fue dos (Figura 10 y Cuadro 6).

En la Figura 11A se observa la estructura de la población de café del Fundo Santa Teresa a un valor de  $K = 2$ ; en donde se aprecia claramente la diferenciación genética entre las variedades arábicas y los tres individuos de robusta. En algunos individuos de las variedades arábicas se aprecia en proporciones variables la presencia del genoma de la variedad Robusta, como en el caso de los individuos de la variedad Catimor, variedad descendiente del Híbrido de Timor.

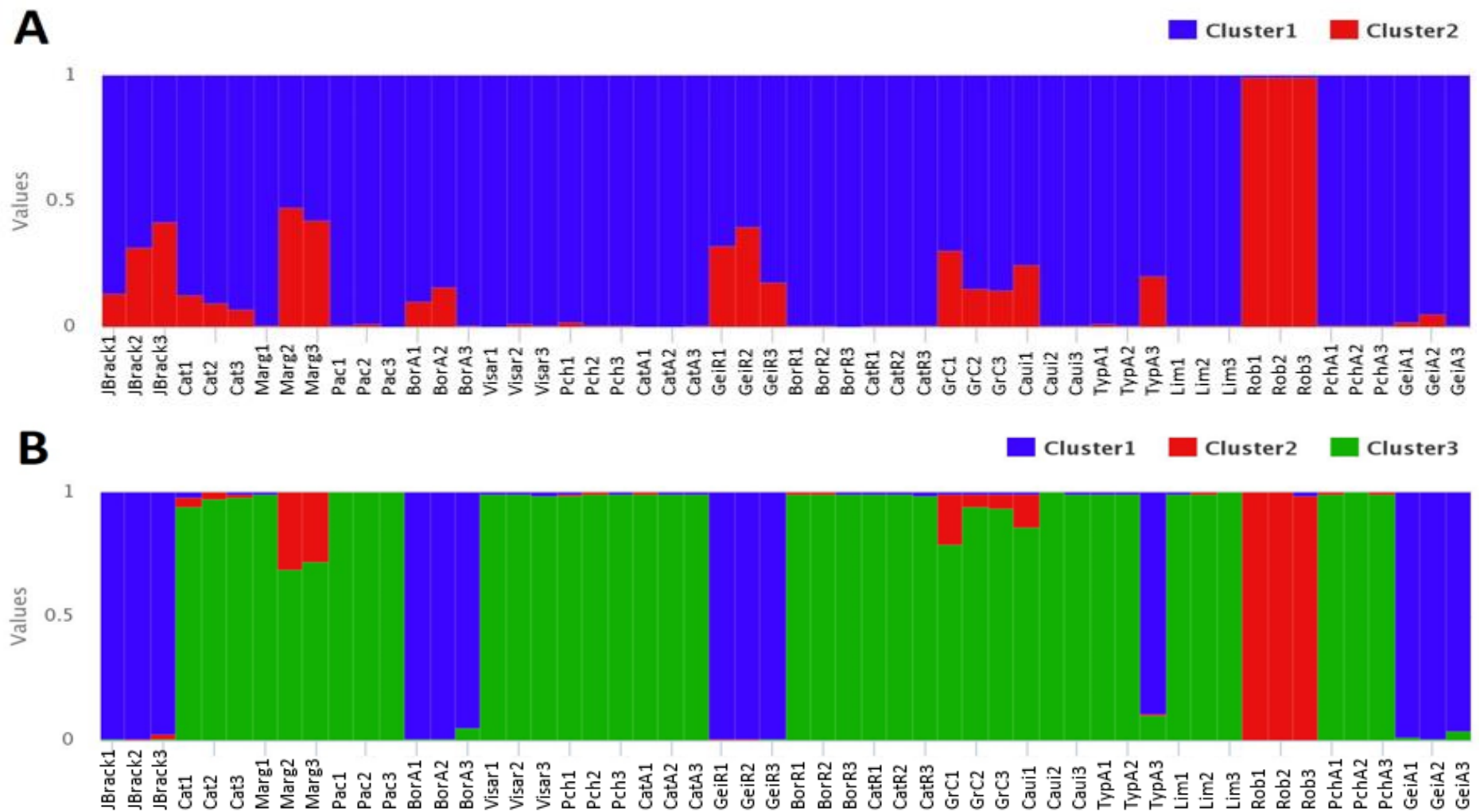
En la Figura 11B, se observa la estructuración de la población a un valor de  $K = 3$ , donde se puede apreciar, que dentro de las variedades arábicas se forman dos grupos, los cuales corresponden a los formados en el análisis de conglomerados cuando se hace un corte en el dendograma a un coeficiente de similitud de 0.56. Se puede apreciar que los individuos de la variedad Colombia, y Catuai 1, presentan en su genoma parte de la variedad Robusta; y de dos muestras de la variedad Maragogipe, una tercera parte genoma de sus genomas corresponderían a Robusta.



**Figura 10.** Curva de Delta de K para determinar el K óptimo en el análisis de estructura poblacional de las muestras de café.

**Cuadro 6:** Mejor valor para Delta de K.

<b>K</b>	<b>Reps</b>	<b>Mean LnP(K)</b>	<b>Stdev LnP(K)</b>	<b>Ln'(K)</b>	<b> Ln''(K) </b>	<b>Delta K</b>
1	3	-1635.06667	0.321455	—	—	—
2	3	-1234.73333	1.386843	400.333333	165.133333	119.071402
3	3	-999.53333	43.693287	235.200000	47.300000	1.082546
4	3	-811.63333	12.788406	187.900000	65.500000	5.121827
5	3	-689.23333	77.655221	122.400000	61.000000	0.785523
6	3	-627.83333	5.834667	61.400000	71.300000	12.220064
7	3	-637.73333	5.361281	-9.900000	61.000000	11.377878
8	3	-708.63333	111.629491	-70.900000	127.033333	1.137991
9	3	-652.50000	31.793553	56.133333	39.266667	1.235051
10	3	-635.63333	18.348115	16.866667	—	—



**Figura 11.** Estructura poblacional de 54 muestras del café del Fundo Santa Teresa. A (2K), B (3K).

## 5.5 Análisis de conglomerados

La Figura 12 muestra el dendograma resultante del análisis de las 54 muestras de café, el alto valor de la correlación cofenética ( $r = 0.939$ ) entre la matriz de similitud y la matriz cofenética, indicó hasta qué punto la agrupación de genotipos representaba con precisión las estimaciones de similitudes genéticas entre los individuos estudiados. La tendencia principal del dendograma fue a separar los genotipos en dos grupos principales (Figura 12), a un punto de corte, con un coeficiente de similitud de 0.79, donde, el primer grupo está constituido por los individuos de la variedad Robusta y el segundo está formado por los individuos de las variedades de *C. arabica*. Dentro del grupo constituido por las variedades de *C. arabica*, al realizar un segundo corte, a un coeficiente de similitud de 0.56, se puede apreciar la formación de tres grupos, este patrón de agrupamiento es consistente con la distribución de los individuos en los ejes 1 y 2 en el análisis de coordenadas principales (Figura 13) y el análisis de la estructura poblacional (Figura 11).

Los tres grupos que se forman en este último corte están conformado por los individuos: grupo uno, Marg2 y Marg3; grupo dos, GrC3, GrC2, GrC1, Cui1, PchA1, PchA2, Lim3, Lim2, Lim1, PchA3, Pac3, Pac1, Cui2, Cat3, Cat, Cat1, Pac2, Pch1, Pch2, Pch3, Marg1, Visar2, CarR2, CatR1, CatA3, TypA1, Visar3, Visar1, TypA2, CatR3, CatA2, CatA1, BorR3 y BorR2; y grupo tres, BorR1, JBrack3, JBrack2, GeiR3, GeiR2, GeiR1, TypA3, BorA2, GeiA2, GeiA3, GeiA1, BorA3, JBrack1, BorA1.

En el dendograma se puede apreciar que en algunos casos los individuos de una misma variedad no se agrupan, encontrándose junto a individuos de otras variedades. En el caso del individuo Marg1 (Maragogipe), se agrupa con los individuos de la variedad Pache; los tres individuos de la variedad Catuaí (Cui) se agrupan con diferentes variedades, Cui 1, con individuos de la variedad Gran Colombia, Cui 2 con dos individuos de Pacamara y Cui 3 con los individuos de la variedad Caturra Rojo. Esta forma de agrupamiento de algunas variedades se puede atribuir a una falta de pureza en dichas variedades, por la posibilidad de cruzamientos entre variedades, debido a que en la mayoría de los casos la distancia de separación entre lotes con distintas variedades es muy escasa.

La matriz de distancia a partir del cual se generó el dendograma nos muestra, que las mayores distancias genéticas están entre las variedades de *C. arabica* y las variedades Robustas, con un valor de distancia genética que va desde 0.95 a 0.90, cabe mencionar que

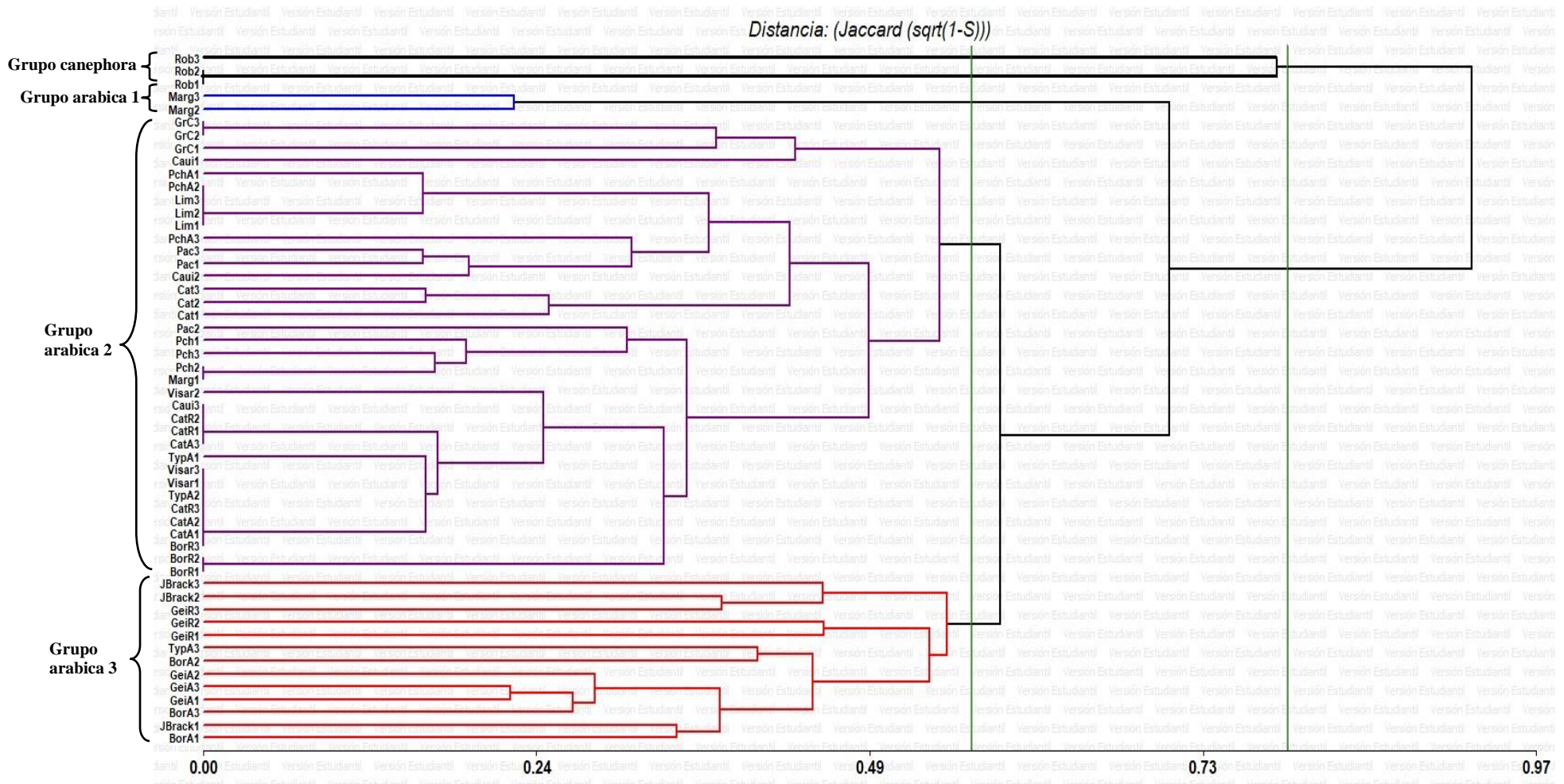


se observa un alto grado de divergencia genética de 0.78 entre las variedades Robustas 1 y 2 con la 3, esto podría deberse al sistema de reproducción alógamo que tiene la especie *C. canephora*. (Klein *et al.* 2003). Dentro de las variedades de *C. arabica*, las que presentan mayor divergencia genéticas son los individuos 2 y 3 de la variedad Maragogipe con el resto de individuos de las variedades arábicas, los valores de distancia genética van desde 0.84 a 0.69; por el contrario, el individuo 1 de Maragogipe está altamente relacionado con los individuos de la variedad Pache, los valores de distancia genética van desde 0.0 hasta 0.17 esta relación podría deberse al origen de ambas variedades, ya que Pache y Maragogipe se originaron por mutaciones de Typica. El individuo Caui3 de Catuaí, está altamente relacionado con los individuos de la variedad Caturra Roja con una distancia genética de 0.0; esto podría deberse al origen de la variedad Catuaí, que fue generada por el cruce de las variedades Mundo Novo y Caturra. Los individuos Visar3, Visar1, CatR1, CatR2, CatR3, BorR3 y TypA2 presentan 0.0 en su distancia genética esto se debe al origen de la variedad Villa Sarchi y Caturra, ambas son mutaciones naturales de Bourbon. Los tres individuos de la variedad Limaní y PacheA2 comparten una alta relación, con una distancia genética de 0.0, esta relación podría entenderse por sus orígenes, Limaní es una línea de Sarchimor, esta a su vez se origina de la variedad Villa Sarchi que esta emparentada a Typica y Pache tiene su origen en una mutación de Typica.

El alto grado de diferenciación genética entre los individuos de la variedad Robusta y las variedades de *C. arabica*, son fácilmente apreciables en la Figura 12, la mayor distancia genética que se obtuvo entre un individuo Robusta y uno de *C. arabica* es 0.91, valor mayor al reportado por Maluf *et al.* (2005), en el que obtuvo un 30 por ciento de divergencia genética al hacer la comparación entre la variedad Apoatã de *C. canephora* y algunas variedades de *C. arabica*, esta diferencia en las distancias genéticas se podrían explicar al origen de las colecciones, Maluf *et al.* (2005), empleó variedades mejoradas de *C. arabica*, provenientes del Instituto Agronómico de Campinas (IAC), la obtención de estas variedades se derivan del cruces con variedades de *C. canephora*, o híbridos interespecíficos como el híbrido de Timor, a diferencia de las variedades del Fundo Santa Teresa. En otra investigación se presentan resultados más cercanos al obtenido en la presente investigación, Steiger *et al.* (2002) hicieron un estudio de diversidad genética entre variedades de *C. arabica* y una variedad de *C. canephora*, cuya diversidad genética fue de 54 por ciento, este resultado se puede explicar al origen de las variedades de *C. canephora*, estas provienen de colectas en Kunia, Oahu, perteneciente al archipiélago de

Hawaii, a diferencia del origen de las variedades utilizadas por Maluf *et al.* (2005), provenientes de programas de mejora genética.

Palomino *et al.* (2014) reportó aproximadamente un 12 por ciento de diversidad genética entre individuos de la variedad *C. canephora* y variedades de *C. arabica*, colectadas en distintos fundos de Villa Rica, este resultado difiere al obtenido para la presente investigación, muy probablemente debido al tipo de marcador molecular utilizado. En la presente tesis se seleccionaron marcadores microsatélites que habían demostrado presencia de polimorfismos entre genotipos de *C. arabica*; mientras que Palomino *et al.* (2014) utilizaron marcadores RAPDs aleatorios.

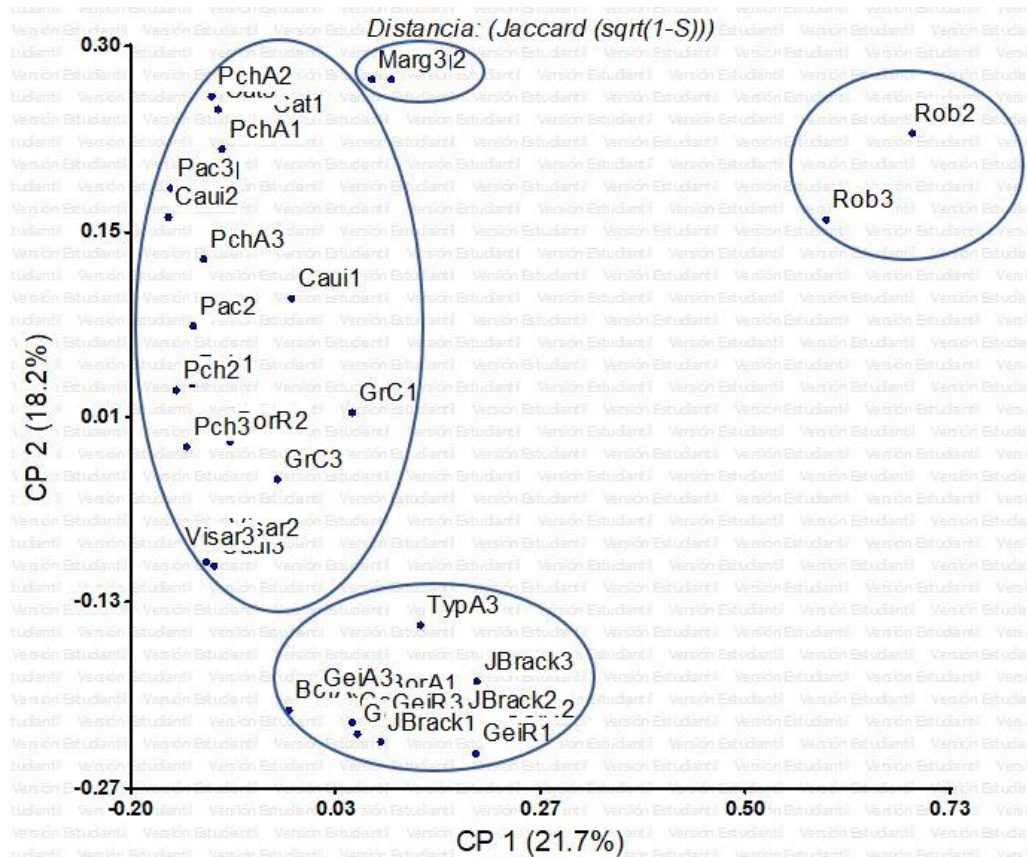


**Figura 12.** Dendrograma de 54 muestras de *Coffea* del Fundo Santa Teresa basado en distancia genética obtenido de marcadores SSR utilizando el método UPGMA.

## 5.6 Análisis de coordenadas principales

Con el objetivo de analizar observaciones multidimensionales, se empleó el Análisis de Coordenadas Principales, que es muy utilizado para realizar ordenaciones de datos provenientes de marcadores moleculares (Balzarini *et al.* 2006).

En la Figura 13 se observa el diagrama de dispersión, y se muestran las dos primeras coordenadas, en la que se presentan las ordenaciones o relaciones de distancia genética entre las 54 muestra. Se aprecia una distribución consistente con el dendrograma mostrado anteriormente, formándose cuatro grupos, el grupo formado por los individuos de la variedad Robusta se separa de forma considerable en el diagrama. Utilizando el coeficiente de Jaccard y como se observa en el Anexo 9, el CP 1 explica un 21.7 por ciento de la variabilidad total, mientras que el CP 2 explica un 18.2 por ciento de variabilidad; los componentes que explican una diversidad genética considerable son CP1, CP2, CP3, CP4 que presentan una proporción acumulada de 61 por ciento de la diversidad genética en los individuos evaluados.



**Figura 13.** Análisis de coordenadas principales de 54 muestras de *Coffea* del Fundo Santa Teresa.

Teresa *et al.* (2010) analizando 133 genotipos de *C. arabica*, que comprenden 54 accesiones obtenidas del Centro de Investigación Agropecuaria Jimma, Instituto Etíope de Investigación Agropecuaria, y 24 accesiones etíopes y genotipos cultivados, se obtuvieron de Nestlé R&D Tours, Francia. Con 32 marcadores moleculares SSR, mediante el análisis de coordenadas principales obtuvo un 28.7 por ciento de variación genética para el CP 1 y el 8.2 por ciento de variación genética con el CP 2, representando un total del 36.9 por ciento de la variación genética total.

## **5.7 Amplificación de marcadores moleculares asociados a resistencia a roya del café**

### **5.7.1 Marcadores SFcan0105d y SFcan0105b**

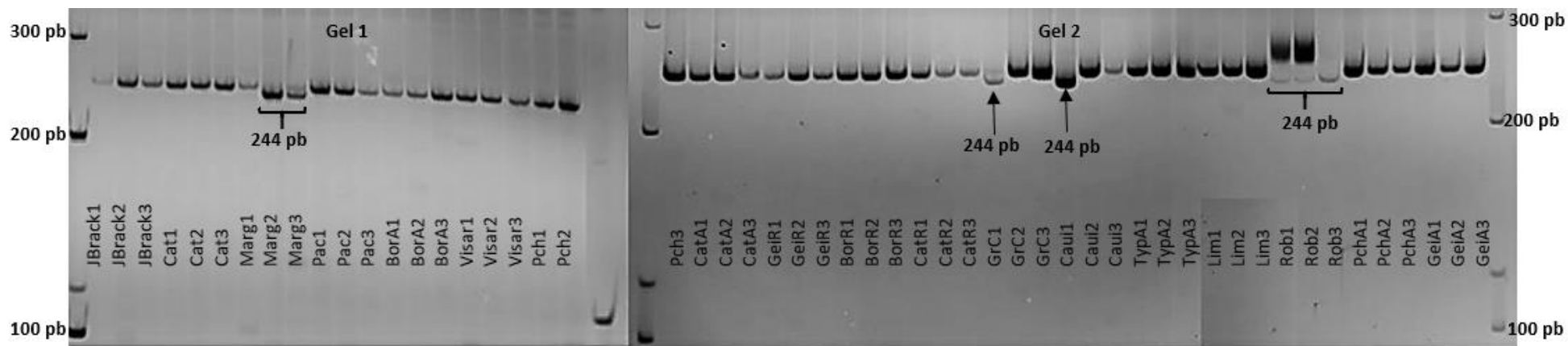
El marcador SFcan0105d y SFcan0105b permitió la amplificación de fragmentos polimórficos para una región QTL (QCLR\_4) asociados a resistencia parcial de roya amarilla, esta región fue identificada en la variedad multilínea Castillo (Alvarado *et al.* 2005), la región QCLR\_4 procede de *C. canephora*, heredada al Híbrido de Timor, esta región no está asociada a ninguno de los factores SH conocidos, e identificados previamente en el Híbrido de Timor.

Analizando los resultados de la amplificación con el marcador SFcan0105d podemos observar que la banda de interés ligada al QTL QCLR\_4, correspondiente al amplicón de 244 pb (Romero *et al.* 2014), fue observado en los individuos 2 y 3 de la variedad Maragogipe, en el individuo uno de las variedades Gran Colombia y Catuaí, y en los tres individuos de la variedad Robusta (Figura 14). En tanto que para el marcador SFcan0105b la banda de interés, correspondiente al amplicón de 190 pb según lo reportado por Romero *et al.* (2014), fue observada en los individuos Marg2, Caui1, y en los individuos 1 y 2 de Robusta (Figura 15).

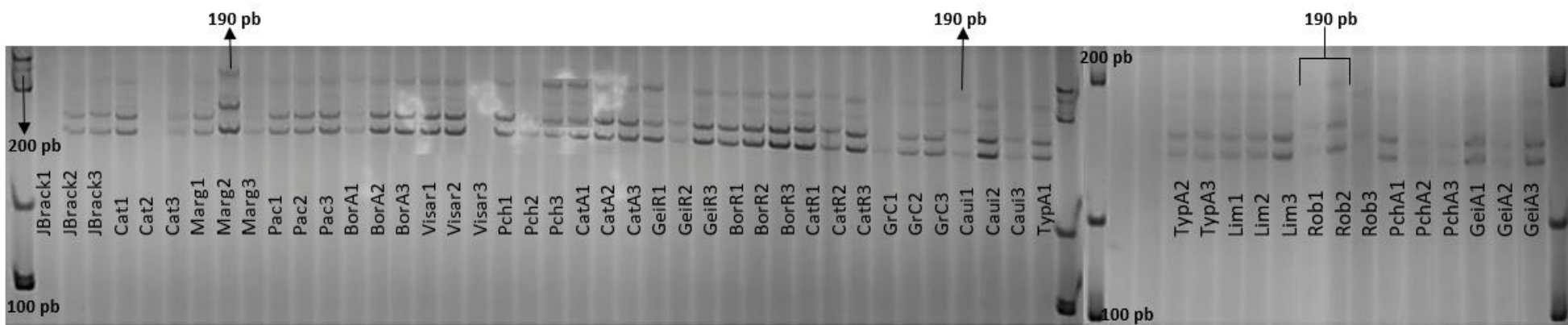
La presencia de las bandas de interés de estos dos marcadores en los individuos 2 y 3 de Maragogipe y Catuaí 1, se puede deber a un proceso de cruce varietal, porque Romero *et al.* (2014), reportó la presencia de la región QCLR\_4 en la línea élite DI.200, resistente a roya amarilla, que corresponde a una progenie F4 proveniente del cruce entre Caturra x TH CIFC1343 (Híbrido Timor), y variedades comerciales como IAPAR 59 y RUIRU 11. La presencia de la banda en el individuo de la variedad Gran Colombia, se debe a su origen, al ser una cruce entre la variedad Caturra y el Híbrido de Timor, además que esta variedad fue base para el desarrollo de la variedad Castillo, en la que se reporta la presencia de la

región QCLR\_4. Además, se explica la presencia de la banda en los individuos de la variedad Robusta de *C. canephora* porque el Híbrido Timor tuvo su origen también en esta especie.

También, se puede relacionar este resultado con lo observado en la Figura 11B de la estructura poblacional, en la que se aprecia la combinación de colores, en la barra que representa a los individuos Marg2, Marg3, GrC1, y Cuai1, compartiendo en gran porcentaje sus genomas con el de la variedad Robusta. Por lo tanto, el factor de resistencia identificado con los marcadores SFcan0105d y SFcan0105b podrían estar identificando genotipos que presentan en su genoma genes de resistencia a la roya del cafeto, provenientes de *C. Canephora*, los cuales deben ser evaluados, para determinar si estos corresponden a las variantes de la enfermedad presentes en Villa Rica.



**Figura 14.** Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador SFcan0105d en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se muestran bandas de interés asociados a resistencia a roya amarilla, con un peso de 244 pb.



**Figura 15.** Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador SFcan0105b en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se señalan fragmento de ADN de interés asociados a resistencia a roya amarilla, con un peso de 194 pb.



### 5.7.2 Marcadores Sat 225 y Sat 259

Los marcadores Sat 225 y Sat 259 permitieron la amplificación de fragmentos con pesos aproximados a los esperados, asociados a las variables incidencia de la roya (RI) y severidad en defoliación (DEF), variables vinculadas a la resistencia parcial a roya amarilla (Herrera *et al.* 2009), en la Figura 16, se puede observar que el marcador Sat 225, presentó una banda polimórfica con un tamaño de 308 pb exclusiva para los individuos 1 y 2 de Robusta, presentó otra banda polimórfica con un tamaño de 286 pb, que amplificó a los individuos de las variedades Catimor, Limaní, y a los individuos 1 y 2 de la variedad Pache Amarillo, los dos primeros provenientes del Híbrido Timor. En la figura 17 se aprecia que el marcador Sat 259 presenta una banda polimórfica con un tamaño de 179 pb, muy cercano a 183 pb reportado por Baruah *et al.* (2003) para resistencia, el marcador amplificó la región de interés en los individuos de la variedad Gran Colombia y Robusta, así como en el individuo Catuai 1.

Herrera *et al.* (2009), reportaron polimorfismo con los marcadores Sat 225, Sat 229 y Sat 259 en progenies F<sub>2</sub>, de la cruce entre Caturra y la línea DI.200, que se deriva del cruce entre Caturra y una accesión del Híbrido de Timor.

Se presume resistencia asociada a roya amarilla en los individuos Rob 1 Rob 2, PachA1, PachA2, Cat y Lim, debido a la amplificación de una banda de 308 pb en Rob 1, Rob 2 y de 286 pb en PachA1, PachA2, Cat y Lim, mostrada con el marcador Sat 225, de igual manera se puede suponer por la amplificación de una banda de 179 pb en los individuos GrC, Caui1 y Rob mostrada por el marcador Sat 259, lo mostrado por los marcadores Sat 225 y Sat 259 se podría suponer un proceso de cruzamiento de los individuos PachA1, PachA2 y Caui1 con variedades resistentes, originando individuos con resistencia a roya amarilla, se explica también la presencia de la banda en los individuos de la variedad Robusta, debido a que esta variedad pertenece a la especie *C. canephora*, que se caracteriza por su resistencia a la roya amarilla, y la presencia de la banda asociada a resistencia en los individuos Catimor, Limaní y Gran Colombia por ser variedades arábicas con la característica de resistencia a roya amarilla.

El análisis realizado mediante las bandas amplificadas en las variedades producidas en el Fundo Santa Teresa con los marcadores Sat 225 y Sat 259, indican aparente resistencia a roya amarilla. Esta posible resistencia se podría validar, mediante evaluaciones en campo

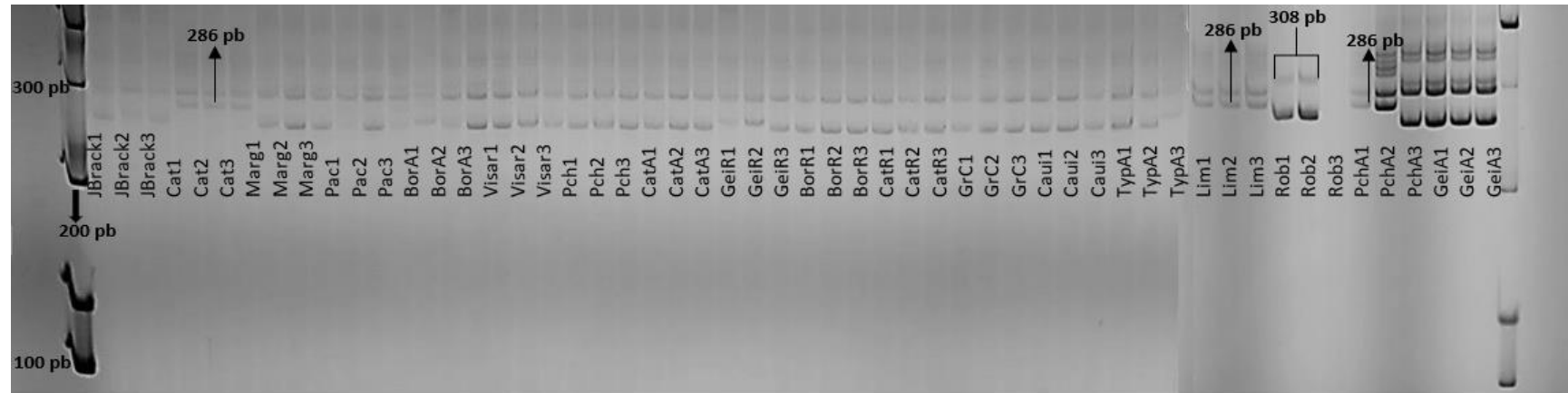


del índice de roya y severidad de defoliación, con el objeto de emplear los marcadores Sat 225 y Sat 259 en la implementación de una estrategia MAS, lo que mejoraría la eficiencia en programas de mejoramiento de café en Perú.

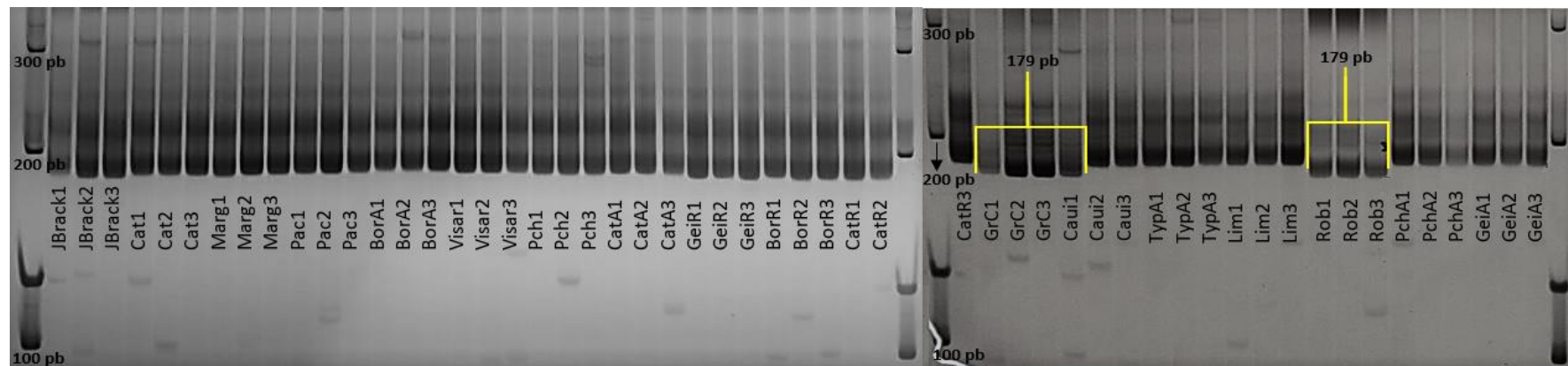
### **5.7.3 Marcador SSR 016**

El marcador SSR 016 permitió la amplificación de fragmentos con pesos aproximados a los esperados que estarían asociados a la resistencia parcial a la roya amarilla. De acuerdo a lo reportado forma parte de un grupo de ligamiento (LG), que contiene tres QTL's asociados a la resistencia a las razas 1, 2, y al patotipo 001 de roya amarilla, respectivamente, reportado por Pestana *et al.* (2015), los cuales se encuentra a distancias entre 0 y 37 cM del marcador SSR 016. En la Figura 18, se muestra que el marcador SSR 016 presenta tres bandas polimórficas con tamaños de 132, 136 y 140 pb, próximos a los 140 y 146 pb reportados por Combes *et al.* (2000); la banda con un peso de 132 pb, estaría identificando a los individuos con resistencia a roya amarilla. Las muestras que presentan dicha banda son: Cat1, Cat2, Cat3, GrC1, GrC2, GrC3, Marg2, Marg3, Caui1, Caui2, Lim1, Lim2, PchA1 y Pach3, los individuos de las variedades Maragogipe, Catuaí y Pache Amarillo, al igual que en los marcadores SFcan0105d, SFcan0105b, Sat 225 y Sat 259 presentaron todas la banda asociada para resistencia a roya amarilla, las cual llegaron a estos posiblemente por un proceso de cruzamiento con las variedades resistentes en la colección del fondo.

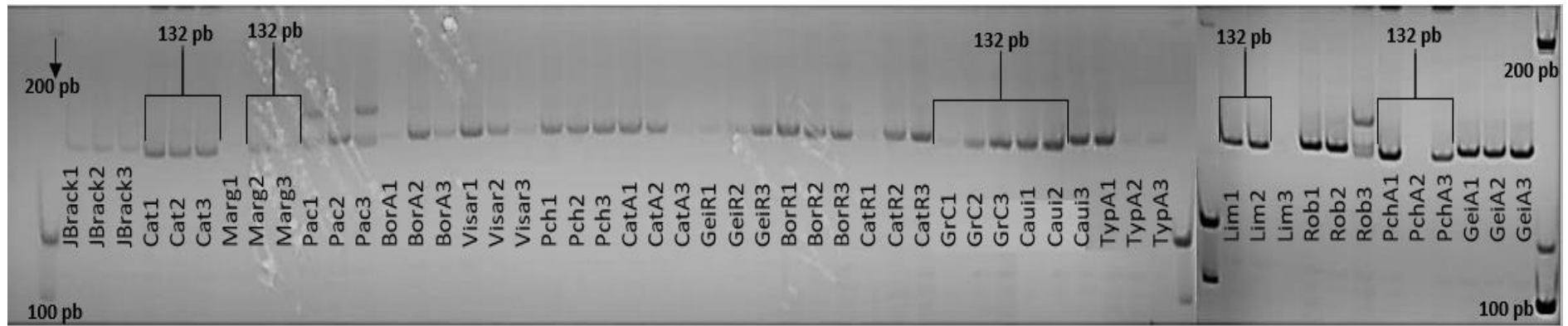
La presencia de la banda de 132 pb, amplificada por el marcador SSR 016, en individuos resistentes a roya amarilla, nos indicaría la presencia de los 3 QTL's asociados a resistencia parcial, esta información se podría complementar con evaluaciones fenotípicas de presencia o ausencia de uredosporas, de esta manera se podría sugerir el uso de dicho marcador para ser usados en procesos de selección en el mejoramiento genético del café.



**Figura 16.** Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador Sat 225 en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se señalan fragmento de ADN de interés asociados a resistencia a roya amarilla, con un peso de 308 pb en Robustas y 286 en los individuos de las variedades Catimor, Limaní y Pache Amarillo 1 y 2.



**Figura 17.** Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador Sat 259 en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se señalan fragmento de interés asociados a resistencia a roya amarilla, con un peso de 179 pb en Robustas, tres muestras de la variedad Gran Colombia y en Catuaí 1.



**Figura 18.** Patrón de bandas SSR obtenido con el iniciador SSR 016 en la amplificación de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa. Se señalan fragmento de ADN de interés asociados a resistencia a roya amarilla, con un peso de 132 pb en tres muestras de la variedad Gran Colombia, Caturra, Maragogipe 2, Maragogipe 3, Catuaí 1, Catuaí 2, Limaní 1, Limaní 2, Pache Amarillo 1 y Pache Amarillo 3.

**Cuadro 7:** Individuos amplificados con marcadores asociados a resistencia.

	MARCADORES SSR					SCAR	
	SFCan105d	SFCan105b	Sat 225	Sat 259	SSR 016	ETCA-EAGA530	ETCA-EATG560
Catimor 1 (R)			X		X		
Catimor 2 (R)			X		X		
Catimor 3 (R)			X		X		
Margogipe 2 (S)	X	X			X		
Margogipe 3 (S)	X				X		
Gran Colombia 1 (R)	X			X	X		
Gran Colombia 2 (R)				X	X		
Gran Colombia 3 (R)				X	X		
Catuaí 1 (T)		X		X	X		
Catuaí 2 (T)					X		
Limaní 1 (R)			X		X		
Limaní 2 (R)			X		X		
Limaní 3 (R)			X				
Robusta 1 (R)	X	X	X	X			
Robusta 2 (R)	X	X	X	X			
Robusta 3 (R)	X			X			
Pache Amarillo 1 (S)			X		X		
Pache Amarillo 2 (S)			X				
Pache Amarillo 3 (S)					X		

Los individuos que amplificaron bandas asociadas a resistencia a roya amarilla, son mostrados en el Cuadro 7, estos individuos pertenecen a variedades, que presentan en campo características de resistencia, tolerancia y susceptibilidad a la roya amarilla.

El Cuadro 7 muestra al iniciador SSR 016, amplificando bandas en individuos de variedades arábicas, y excluye a los individuos de la variedad Robusta, mostrando ser un buen iniciador para identificar resistencia en variedades arábicas.

## VI. CONCLUSIONES

- Los marcadores moleculares microsatélites empleados para la evaluación de genotipos de *Coffea*, presentaron polimorfismos permitiendo distinguir individuos emparentados y la evaluación de la diversidad genética.
- Con los 18 marcadores moleculares microsatélites utilizados en las variedades de café del Fundo Santa Teresa se obtuvo un índice de fijación  $F_{ST} = 0.67$ , por lo tanto, existe una alta diferenciación genética entre las variedades de café.
- Del análisis de la estructura poblacional, se identifican dos grupos dentro de las variedades arábicas, por la presencia en uno de ellos, del genoma de *C. canephora*, por lo tanto, es posible que contengan también genes de resistencia a la roya amarilla del café.
- Del análisis de conglomerados los genotipos de café evaluados mostraron dos grupos, formados por los individuos de las especies *C. arabica* y *C. canephora*. Además, dentro del grupo de las variedades de *C. arabica*, los individuos se agruparon por sus índices de similitud en tres diferentes subgrupos.
- Los marcadores SFcan0105d y SFcan0105b asociados a la resistencia parcial a la roya amarilla del café, sugieren la presencia del QTL denominado QCLR\_4 en individuos de las variedades Maragogipe, Catuaí, Gran Colombia y Robusta, perteneciente a la colección del fundo Santa Teresa.
- Los marcadores Sat 225 y Sat 259, sugieren la presencia de resistencia parcial a la roya amarilla en individuos de las variedades Catimor, Limaní, Pache Amarillo, Gran Colombia, Robusta y Catuaí del fundo Santa Teresa.
- El marcador SSR 016 vinculado a la resistencia parcial de la roya amarilla, sugiere que tres QTL's asociados a la resistencia a las razas 1 y 2, y al patotipo 001 de roya del café, están presentes en individuos de las variedades Catimor, Gran Colombia, Maragogipe, Catuaí, Limaní y Pache Amarillo, procedentes de la colección del Fundo Santa Teresa.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar la caracterización de las accesiones con una estrategia de muestreo que abarquen fundos de diferentes provincias, con la finalidad de cubrir las principales regiones productoras de café y utilizar un número de individuos que permitan detectar la diversidad dentro y entre las variedades.
- Efectuar la caracterización fenotípica en diferentes etapas fenológicas y dos veces al año para reducir el efecto ambiental, y asegurar mayor certeza en la correspondencia entre marcadores moleculares y morfológicos.
- Ampliar el número de marcadores moleculares asociados a resistencia a roya amarilla, en las futuras variedades evaluadas.
- Implementar en condiciones controladas, evaluaciones de variables fenotípicas asociadas a resistencia a roya amarilla, en las variedades que se detectaron aparente resistencia parcial.
- Profundizar en el estudio de los marcadores, que presentaron asociación a resistencia a roya amarilla, con la finalidad de buscar nuevos marcadores que se encuentren cercanos a genes de resistencia, característica que permitirá dar inicio a la selección asistida por marcadores moleculares en Café.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Aga, E; Bryngelsson, T; Bekele, E; 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(1):36-46

Agarwal, M; Shrivastava, N; Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4), 617-631.

Aguilar, G; Bertrand, B.; Anthony, F. 1996. Comportamiento agronómico y resistencia a las principales plagas de diferentes variedades, derivadas del Híbrido de Timor. In 17. Simposio de Caficultura Latinoamericana 23-27 Oct 1995 San Salvador (El Salvador) (No. IICA ICCR-A1/HN 96-001b). Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, San Salvador (El Salvador) Consejo Salvadoreño del Café, San Salvador (El Salvador) IICA, Guatemala (Guatemala). PROMECAFE.

Alvarado, G; Moreno, G; Cortina, H. 2002. Caracteres agronómicos y resistencia incompleta a *Hemileia vastatrix* de progenies de caturra x híbrido de timor. *Cenicafé*, 53(1), 7-24.

Alvarado, G; Posada, H; Cortina, H. 2005. Castillo: Nueva variedad de café con resistencia a la roya. *Avances técnicos Cenicafé* 337, 1-8.

Anthony, F; Clifford, M; Noirot M. 1993. Biochemical diversity in the genus *Coffea* L: chlorogenic acids, caffeine and Mozambioside contents Genetic Resources and Crop Evolution 40:61-70.

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.

Anthony, F; Astorga, C; Topart, P; Bertrand, B; Lashermes, P. 2002a. La caracterización de las variedades de café (*Coffea arabica*) por los marcadores moleculares: ¿mito o realidad? Boletín PROMECAFE no. 93. p. 9-13.

Anthony, F; Combes, MC; Astorga, C; Bertrand, B; Graziosi, G; Lashermes, P. 2002b. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 104(5), 894-900.

Anzuelo, F. 1993. Etude de la résistance du caféier (*Coffea* sp.) à *Meloidogyne* sp. et *Pratylenchus* sp. Tesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes (Francia), 123p,

Arcila, J. 2004. Anormalidades en la floración del cafeto. Chinchiná: CENICAFÉ, 8 p. (Avances Técnicos No. 320).

Arcila, J; Jaramillo, A. 2003. Relación entre la humedad del suelo y la floración y el desarrollo del fruto del cafeto. Chinchiná: CENICAFÉ. 6 p. (Avances Técnicos No. 311).

Arcila, J; Farfán, F; Moreno, A, M; Salazar, L, F; Hincapié, E. 2007. Sistemas de producción de café en Colombia. Chinchiná: CENICAFÉ, 309 p.

Balzarini, M; Arroyo, A; Bruno, C; Di Renzo, J. 2006. Análisis de datos de marcadores con Info-Gen. In XXXV Congreso Argentino de Genética, San Luis, Argentina.



Balzarini, M; Di Rienzo, J. 2016. InfoGen versión 2016. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://info-gen.com.ar>

Barrientos, R. 2006. Villa Rica: la tierra del café. Lima, Desco-Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo-Programa Selva Central. p. 104.

Baruah, A; Naik, V; Hendre, P; Rajkumar, R; Rajendrakumar, P; Aggarwal, R. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. *Molecular Ecology Resources*, 3(4), 647-650.

Becker, S; Moraes, W, B; Quijano, M. (1991). La roya del cafeto, conocimiento y control (No. 633.7342 B396r). GTZ, Eschborn (Alemania).

Berthou, F ; Trouslot, P. 1977. L ' analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: Adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série premiers résultats ASIC 8<sup>avo</sup> Coloquio, Abidjan: 373-383.

Beyermann, B ; Niirnberg, P ; Weihe, A ; Meixner, M ; Epplen, J,T; B/Srner, T. 1992. Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 691-694.

Bonilla, L; Espinosa, K; Posso, A; Vásquez, H; Muñoz, E. 2008. Caracterización molecular de 43 accesiones de uchuva de seis departamentos de Colombia. *Acta Agron (Palmira)* 57(2): 109-115.

Botstein, D; White, L; Skolnick, M; Davis, W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man usin restriction fragment length polymorphis. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.

Bridson, D; Verdcourt, B. 1988. *Coffea*. In: Polhill RM, ed. *Flora of tropical East Africa* (part 2). Rotterdam: A.A.Balkema, 703-723.

Camarena, F; Chura, J; Blas, R. 2014. Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. UNALM/AGROBANCO.

Campos, O; Gento, J; Monterroso, N; Santos, D; Reyes, J; Mazariegos, R. 2013. Método de muestreo de la Roya del Cafeto. (en línea). Guatemala. Consultado 15 Mar. 2018. Disponible en: <https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=16TEC:Metodo-muestreo-roya>.

Carvalho, A. 1988. Principles and Practice of Coffee Plant Breeding for Productivity and Quality Factors *Coffea arabica* in: Clarke, R; Macrae, R. (eds), 1988, Coffee Volume 4: Agronomy Londres (Inglaterra). 129-160.

Carvalho, A; Medina, H; Fazuoli, L; Guerreiro O; Lima, M. 1991. Aspectos genéticos do cafeeiro. Revista Brasileira de Genética 14:135-183.

CEPICAFE. Proyecto “Mejoramiento de la productividad del cultivo de café de las organizaciones socias de CEPICAFE, en la sierra de Piura” (en línea) Consultado 15 mayo 2018. Disponible en: <http://docplayer.es/4898053-Manejo-fitosanitario-en-el-cultivo-de-cafe-ii-plagas-y-enfermedades-en-el-cultivo-de-cafe-y-su-manejo.html>

Chelkowski, J; Stepien, L. 2001. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. J Appl Genet 42:117-126.

Coffeeresearch.org. 2018. Arabica Coffee Bean Varietals. (en línea) Consultado 2 Feb. 2018. Disponible en: <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/variety.htm>

Combes, MC; Andrzejewski, S; Anthony, F; Bertrand, B; Rovelli, P; Graziosi, G; Lashermes, P. 2000. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. Molecular ecology, 9(8), 1178-1180.

Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales. 2003. Cafés Especiales, Requisitos. R.0020-2003/INDECOPI-CRT. 1ª Edición.

Crisci, J; López, M. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la Taxonomía Numérica. Washington, D.C, Secretaria General de La Organización de los Estados Americanos (OEA)-Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. p. 132. (Serie de biología N° 26)

Cristancho, A; Rozo, Y; Escobar, C; Rivillas, A; Gaitán, L. 2012. Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. *New Disease Reports*, 25(19), 2044-0588.

Cubry, P; Musoli, P; Legnate, H; Pot, D; De Bellis, F; Poncet, V; Anthony, F; Dufour, M; Leroy, T. 2007. Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. *Genome*, 51(1), 50-63.

Davis, P; Chester, M; Maurin, O; Fay, F. 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.

de Brito, G; Caixeta, T; Gallina, P; Zambolim, M; Zambolim, L; Diola, V; Loureiro, E. 2010. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, 173(2), 255-264.

de Vicente, MC; López, C; Fulton, T. (eds). 2004. Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje Volumen 2. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (PGRI), Roma Italia. Consultado 10 dic. 2018. Disponible en [https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/online\\_library/publications/pdfs/Molecular\\_Markers\\_Volume\\_2\\_es.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_2_es.pdf)

De la Fuente, S. 2011. Análisis conglomerados. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad Ciencias Económicas y Empresariales. Madrid: UAM.

Demarchi, A. 2009. Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 11(1).

Desco.org.pe. 2018. Villa Rica. Una apuesta por el turismo y el café. Desco-Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo. (en línea) Consultado 2 Feb. 2018. Disponible en: [https://www.desco.org.pe/recursos/site/files/.../22/13\\_Meza\\_Quispe\\_Tueros\\_Dic\\_12.pdf](https://www.desco.org.pe/recursos/site/files/.../22/13_Meza_Quispe_Tueros_Dic_12.pdf)

Diniz, L; Ruas, C; Carvalho, V; Torres, F; Ruas, E; Santos, M; Sera, Tumoru; Ruas, P. 2005. Genetic diversity among forty coffee varieties assessed by RAPD markers associated with restriction digestion. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(4), 511-521.

Diola, V de Brito, G; Caixeta, T; Maciel-Zambolim, E; Sakiyama, S; Loureiro, E. 2011. High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. *Tree genetics & genomes*, 7(6), 1199-1208.

Doyle, J; Doyle, L. 1990. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. *Focus* 12:13-15

Earl, D; vonHoldt, B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.

Evanno, G; Regnaut, S; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.

Excoffier, L; H, Lischer. 2010 Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

Excoffier, L; Smouse, P; Quattro, J. 1992. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data *Genetics* 131: 479-491.

EXPO CAFÉ PERU. 2017. Café Peruano (en línea) Consultado 4 Feb. de 2018. Disponible en: <http://www.expocafeperu.com.pe/CafePeruano.php>

Fazuoli, L. C; Oliveira, B; Toma-Braguini, M; Silvarolla, B. 2005. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at the IAC. *Durable resistance to coffee leaf rust*. UFV, Viçosa, 137-185.

Falush, D; Stephens, M; Pritchard, JK. 2003 Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.

Falush, D; Stephens, M; Pritchard, JK. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7, 574–578

Ferreira, M; Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN. p. 220.

Frankham, R; Briscoe, D; Ballou, J. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. Pp: 607.

Gamarra, G; Suarez, T; Samaniego, C; Izarra, R. 2015. Caracterización y manejo integrado de la roya amarilla del café en selva central del Perú. *Convicciones*, 2(1), 6-17.

García-Carrión, F. 2008. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en Perú. M & O Consulting S.A.C., Lima - Perú.

Gast, F; Benavides, P; Sanz, J; Herrera, J; Ramírez, V; Cristancho, M; Marín, S. 2013. Manual del Cafetalero Colombiano. Investigación y Tecnología para la sostenibilidad de la caficultura. Tomos 1, 2 y 3 CENICAFÉ. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Geleta, M; Herrera, I; Monzón, A; Bryngelsson, T. 2012. Genetic diversity of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as estimated by simple sequence repeat markers. *The Scientific World Journal*, 2012.

Guo, W; Zhang, T; Shen, X; Yu, Z; Kohel, J. 2003. Development of SCAR marker linked to a major QTL for high fiber strength and its usage in molecular-marker assisted selection in upland cotton. *Crop Science*, 43(6), 2252-2256.

Herrera, J; Alvarado, G; Cortina, H; Combes, MC; Romero, G; Lashermes, P. 2009. Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.)

introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica*, 167(1), 57-67.

Hubisz, MJ; Falush, D; Stephens, M; Pritchard, JK. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9(5), 1322-1332.

Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI). 2010. Resolución N° 12784 – 2010/DSD-INDECOPI denominación de origen CAFÉ VILLA RICA. Lima - Perú.

Kalia, K; Rai, K; Kalia, S; Singh, R; Dhawan, K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334.

Katzir, N; Danin-Poleg, Y; Tzuri, G; Karchi, Z; Lavi, U; Cregan, P. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 93 :1282-1290.

Klein, M; Steffan-Dewenter, I; Tschardtke, T. 2003. Pollination of *Coffea canephora* in relation to local and regional agroforestry management. *Journal of Applied Ecology*, 40(5), 837-845. doi:10.1046/j.1365-2664.2003.00847.x

Kraic, J; Sakova, M; Gregova, E. 1998. Comparison of differentiation capability of RAPD and SSR markers in commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Cereal Res Commun.* 26: 375-382.

Kushalappa, C; Eskes, B. 1989. Coffee rust: Epidemiology, resistance, and management. Boca Ratón, United States of América, CRC Press LLC.

Lashermes, P; Trouslot, P; Anthony, F; Combes, MC; Charrier, A. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica* 87: 59- 64.

Lashermes, P; Paczek, V; Trouslot, P; Combes, MC; Couturon, E; Charrier, A. 2000. Singlelocus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora*. *The Journal of Heredity* 91(1):81-85.

Lashermes, P; Combes, MC; Ribas, A; Cenci, A; Mahé, L; Etienne, H. 2010. Genetic and physical mapping of the S H 3 region that confers resistance to leaf rust in coffee tree (*Coffea arabica* L.). *Tree genetics & genomes*, 6(6), 973-980.

Lashermes, P., Combes, MC.; Robert, J; Trouslot, P; D'Hont, A; Anthony, F; Charrier, A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(2), 259-266.

Leguizamon, J. 1983. Contribution à la connaissance de la résistance incomplète du caféier Arabica (*Coffea Arabica* L.) à la rouille orangée (*Hemileia vastratix* Berk et Br.) Tesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (France), 183 p.

Leroy, JF. 1980. Evolution et taxogenèse chez les Caféiers: Hypothèse sur leur origine. *Comptes Rendus de leur Académie des Sciences, Paris*. 291: 593-596.

Liu, H. 1998. *Statistical Genomics*. Boca Raton, United States of America, CRC Press LLC.

Louarn, J; 1978. Diversité comparée des descendance de *Coffea arabica* obtenues en autofécondation en fécondation libre au Tonkoui *Boletín* 14, IFCC, Paris (France): 75- 78.

Mahé, L; Combes, MC; Várzea, M; Guilhaumon, C; Lashermes, P. 2008. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Molecular breeding*, 21(1), 105-113.

Maluf, M; Silvestrini, M; Ruggiero, L; Guerreiro Filho, O; Colombo, C. 2005. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. *Scientia Agricola*, 62(4), 366-373.

Martínez, R. D. 2008. Caracterización genética y morfológica del bovino criollo argentino de origen patagónico (Disertación Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia).

Martínez, D. 2015. Caracterización de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L) por su respuesta de defensa a *Moniliophthora roreri* y su polimorfismo de SSRs (Disertación Doctoral, Universidad Nacional de Colombia).

McDermott, M; Brandle, U; Dutly, F; Haemmerli, A; Keller, S; Muller, E; Wolf, S. 1994. Genetic variation in powdery mildew of barley: development of RAPD, SCAR and VNTR markers. *Phytopathology* 84:1316–1321.

Mendes, E. 1939. Ensaio de variedades de cafeeiros. Sao Paulo, Instituto Agronomico do Estado em Campinas. v.65, p. 1-35. (Boletín Técnico).

Menotti-Raymond, A; O'Brien, J. 1995. Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. *J. of Heredity* 86: 319–322.

Missio, R; Caixeta, E; Zambolim, E; Pena, G; Ribeiro, A; Ribeiro, A; Zambolim, L; Pereira, A; Sakiyama, N. 2009. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on *Coffea*. *Bragantia*, 68(3), 573-581.

Monroig, M. 2014. Descripción de variedades de *Coffea arabica* más cultivadas en Puerto Rico.

Moore, S; Sargeant, L; King, T; Mattick, J; Georges, M; Hetzel, D. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10(3), 654-660.

Moreno, G; Alvarado, G. 2000. La Variedad Colombia: Veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del café.

Morgante, M; Olivieri, M. 1993. PCR-amplified microsatellites as marker in plant genetics. *The Plant J.* 3:175-182.



Mullis, K; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350.

Muñoz, J; Morillo, A; Morillo, Y. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta agronómica*, 57(4), 219-226.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.

Origen Café. (s.f.). Perú un país de cafés de altura. (en línea) Consultado 23 enero de 2018. Disponible en: <http://infocafes.com/portal/biblioteca/peru-un-pais-de-cafes-de-altura/>

Palomino, C; López, C; Espejo, R; Mansilla, R; Quispe, J. 2014. Evaluación de la diversidad genética del café (*Coffea arabica* L.) en Villa Rica (Perú). *Ecología aplicada*, 13(2), 129-134.

Paran, I; Michelmore, W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85:985-999.

Peakall, R; Smouse, E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.

Pepin, L; Amigues, Y; Lepingue, A; Berthier, L; Bensaid, A; Vaiman, D. 1995. Sequence conservation of microsatellites between *Bos Taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Example of use in parentage testing and phylogeny analysis *Heredity* 74:53-61.

Pérez, I; Angulo, L; Osorio, G; Ramis, C; Bedoya, Á; Figueroa-Ruiz, R; Molina, S; Infante, D. 2011. Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*, 23(1), 27-34.

Perl-Treves, R; Zamir, R; Navot, D; Galun, E. 1985. Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. *Theor. Appl. Genet.* 71 :430-436

Pestana, K; Capucho, A; Caixeta, E; de Almeida, D; Zambolim, E; Cruz, CD., Zamboline, L; Pereira, A; de Oliveira, A; Sakiyama, S. 2015. Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree genetics & genomes*, 11(4), 72.

Ponce, MA. 2008. Plan de desarrollo Concertado del Distrito de Villa Rica 2009-2018. Villa Rica, Municipalidad Distrital de Villa Rica-Desco-Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo. p. 18.

Prakash, N; Marques, D; Varzea, V; Silva, M; Combes, MC; Lashermes, P. 2004. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(6), 1311-1317.

Pritchard, JK; Stephens, M; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.

Puerta, G. 1998. Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica* L cultivadas en Colombia. [Biblioteca.cenicafe.org](http://biblioteca.cenicafe.org). (en línea) Consultado 14 de marzo de 2018. Disponible en: <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/64>

Rafalski, J; Tingey, S; Williams, J. 1991. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech. News Info.* 3: 64-648.

Rakotomalala, J; Cros, E; Anthony, F; Noirot, M; Charrier, A. 1993. Marqueurs biochimiques de la diversité des caféiers. *ASIC 15<sup>avo</sup> Coloquio*, Montpellier (Francia):47-55.

Rayner, W. 1972. Micología, Historia y Biología de la roya del cafeto (No. IICA PM-94). IICA, Turrialba (Costa Rica). Centro Tropical de Investigación y Enseñanza.

Regalado, A. 2006. ¿Qué es la calidad en el café? Chapingo, ME. Universidad Autónoma Chapingo. 309 p.

Rocha, P. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. Palmas. 23(3): 9-17.

Rodrigues, C; Bettencourt, A; Rijo, L. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Annual Review of Phytopathology, 13(1), 49-70.

Rogers, S; Bendich, A; 1988. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual. A6: 1-10. Kluwer Academic Publishers, Belgium

Romero, G; Alvarado, G; Ligarreto, G; Galeano, NF. 2010. Partial resistance to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee (*Coffea arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. Molecular breeding, 25(4), 685-697.

Romero, G; Vásquez, LM., Lashermes, P; Herrera, J. C. 2014. Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). Plant breeding, 133(1), 121-129.

S.L., C. 2018. Varietales | Cafés Siboney. Cafesiboney.com. (en línea) Consultado 4 Feb. de 2018. Disponible en: <https://www.cafesiboney.com/varietales/ver/>

Sera, T; Alteia, MZ; Petek, MR. 2002. Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). pp217-251 In: Zambolim L (eds) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa.

Sevilla, PR; Holle, SM. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. Lima, Perú, Ediciones Torre Azul SAC. p. 445.

Silva, M; Várzea, V; Guerra, L; Gil H; Fernandez, D; Petitot, AS; Bertrand, B; Lashermes, F; Nicole, M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. Journal Plant Physiol.* 18(1):119-147.

Silvestrini, M; Junqueira, M; Favarin, A; Guerreiro-Filho, O; Maluf, M; Silvarolla, M; Colombo, C. 2007. Genetic diversity and structure of Ethiopian, Yemen and Brazilian *Coffea arabica* L. accessions using microsatellites markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(6), 1367-1379.

Simko, I; Costanzo, S; Haynes, KG; Christ, BJ; Jones, RW. 2004. Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *Theor Appl Genet* 108:217–224.

Smith, FR. 1985. A history of coffee. In: Clifford, MN; Wilson KC. (eds), *Coffee, botany, biochemistry and production of beans and beverage*. Croom Helm, London & Sydney, pp. 48–97.

Sneath, PHA; Sokal, RR. 1973. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. Freeman W.H & Co, San Francisco. p. 573

Steiger, DL; Nagai, C; Moore, PH; Morden, CW; Osgood, RV; Ming, R. 2002. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 105:209-215

Takezaki, N; Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144:389-399.

Takezaki, N; Nei, M. 2008. Empirical tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. *Genetics* 178:385-392

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17(16):6463-6471.

Teixeira-Cabral, T; Sakiyama, N; Zambolim, L; Pereira, A; de Barros, E; da Silva, D. 2004. Characterization of differential coffee tree hosts for *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. with RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4(1).

Teressa, A; Crouzillat, D; Petiard, V; Brouhan, P. 2010. Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. *Ethiopian journal of applied sciences and technology*, 1(1), 63-79.

The American Phytopathological Society (APS). 2011. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). (en línea) Consultado 25 enero de 2013. Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>

Van der Vossen, HA. 1979. Methods of preserving the viability of coffee in storage. *Seed Science and Technology* 7(1):65-74.

Varzea, V; Marques, D. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance pp.53-74. In: Zambolim L, Zambolim E, Várzea VMP (eds), Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa.

Velasco, R. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias-Universidad del Cauca. 3(1):14-18.

Velásquez, P; Arcila, J; Aristizábal, M. 2003. Relación entre el proceso de beneficio de la semilla de café *Coffea arabica* var. Colombia y el disturbio de la raíz bifurcada. *Cenicafé* 54(4):316-328.

Vieira, E; Von Pinho, É; Carvalho, M; Esselink, D; Vosman, B. 2010. Development of microsatellite markers for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. *Genet Mol Biol* 33:507–514

Wang, ML; Barkley, NA; Jenkins, TM. 2009. Microsatellite markers in plants and insects. Part I. Applications of Biotechnology. *Genes Genomes Genomics* 3:54–67.

Weising, K; Weigand, F; Driesel, J; Kahl, G; Zischler, H; Epplen, T. 1989. Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genome. Nucl. Acid Res. 17:120-128.

Wilches, A. 1995. Uso de los marcadores moleculares RAPDs para evaluar la diversidad genética de los recursos genéticos de café *Coffea arabica* L. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 56 p.

Wilson, K; Walker, K. 2000. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. 5a Edición. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.784 p.

Wintgens, J. 2004. The coffee plant. p. 3-24. In: Wintgens, J. Coffee growing, processing, sustainable production: A guide book for growers, processors, traders and researchers. Weinheim, Germany: Willey-VCH.

Wright, S. 1921. Systems of mating. Genetics 6: 111-178

Zambolim, L; Zambolim, M; Vale, D; Pereira, A; Sakiyama, S; Caixeta, T. 2005. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Brazil—physiological variability, current situation and future prospects. In 'Durable resistance to coffee leaf rust'. (Eds L Zambolim, EM Zambolim, VMP Várzea) pp, 75-98.

Zirilli, PS. 2009. Análisis de la Variabilidad Genética Utilizando Marcadores Moleculares en el Género *Mecardonia*. Tesis Licenciatura en Genética. Universidad de Morón, Argentina. 44 pp.

## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Ficha de datos pasaportes.

#### FICHA DE DATOS PASAPORTES Y DE ALGUNOS DESCRIPTORES PARA CAFE

Adaptado del "Descriptors for coffee" (IPGRI,s/f)

<b>I.DATOS GENERALES</b>			
N° Accesión:		Fecha:	
Nombre del Donante:			
Localidad:	Distrito:	Provincia:	Departamento:
Ubicación del lugar:		Campo N°:	
Altitud:	Latitud:	Longitud:	Topografía:
Color de la matriz del suelo:		Erosión de suelo:	
Disponibilidad agua:		Fuente de recolección:	
<b>II.CARACTERISTICAS DEL CAFE</b>			
<b>General</b>			
Género:	Especie:	Subespecie:	Variedad:
Nombre del cultivar:			
Tipo de muestra:		Tamaño de la accesión:	
Fecha de plantación:		Fecha de la última cosecha:	
Fecha de la última poda:		Densidad ( plantas /hectáreas):	
<b>Manejo</b>			
Tipo de fertilizante:		Tipo de riego:	
Protección plantas:		Sistema de cultivo:	
Flora asociada:		Estreses dominantes:	
<b>2.1.PART E VEGETATIVA</b>			
Habito de la planta:		Altura de la planta:	
Desarrollo vegetativo:		Forma de estipula:	
Color de la hoja joven:		Forma de la hoja:	
Forma del ápice de la hoja:		Pilosidad del Domacio:	
Forma del Domacio:			
<b>2.2.INFLORESCENCIA</b>			
Posición de la inflorescencia:		Presencia en tronco viejo:	
Número de flores por axila:		Número de flores por fascículo:	
Número de fascículos por nudo:		Longitud del tallo de la inflorescencia (mm):	
Longitud del tubo de la corola (mm):		Número de pétalos por flor:	
Inserción de las anteras:		Número de estambres por flor:	
<b>2.3.FRUTO</b>			
Color del fruto:		Forma del fruto:	
Longitud del fruto (mm):		Ancho del fruto (mm):	
Grosor del fruto (mm):			
<b>2.4.SEMILLA</b>			
Longitud de la semilla (mm):		Ancho de la semilla (mm):	
Grosor de la semilla (mm):		Color de la semilla:	
Forma de la semilla:			
<b>III.NOTA:</b>			

**Anexo 2.** Protocolo de extracción con solución tampón CTAB establecido por Doyle & Doyle (1990), con algunas modificaciones.

1. En un mortero triturar con ayuda de un pilón una hoja sin la nervadura central, ambos implementos deben de ser previamente, enfriados con nitrógeno líquido, hasta lograr un polvo fino.
2. Transferir el polvo a un tubo eppendorf de 2ml. Añadir 700ul de solución tampón de extracción CTAB 2X (CTAB 3%, 2.1mM NaCl, 250mM Tris HCl pH8, 50mM EDTA pH 8) y 4µl de β-mercaptoetanol, mezclar bien agitando los tubos por inversión. Incubar a 65°C durante 30 minutos, agitando suavemente cada 10 a 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente por 2 a 5 minutos.
3. Agregar a cada tubo 700µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar suavemente por inversión para no dañar el ADN hasta lograr una consistencia lechosa.
4. Centrifugar las muestras a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, no absorber la interfase.
5. Agregar 70µl de tampón CTAB al 10% (en Nicle, 0.7 M), agitar suavemente hasta obtener una mezcla uniforme. Luego agregar 700µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y mezclar suavemente. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
6. Añadir igual volumen (400-500µl) de isopropanol frío (-20°C) y mezclar suavemente hasta visualizar el pellet de ADN. Incubar a -20°C una hora o toda la noche.
7. Centrifugar las muestras a 14000 rpm por 15 a 20 minutos, eliminar el sobrenadante. El ADN precipitado se deja secar invirtiendo los tubos abiertos por 2 minutos.
8. Lavar una vez el ADN precipitado en 1ml de etanol 70% por 3 minutos. Centrifugar las muestras a 14000. Eliminar el etanol y agregar 1ml de etanol absoluto. Volver a centrifugar las muestras a 14000 rpm por 3 minutos y eliminar el etanol. Dejar que el precipitado seque a temperatura ambiente por 12-14 horas.
9. Diluir el ADN precipitado en 50-100µl de TE, agregar 1µl de RNAsa 10mg/ml por cada 100µl de TE (libre de DNAsa) agitando suavemente y llevar a incubar las muestras a 37°C por 1 hora.
10. Almacenar las muestras a 4°C ó -20°C.



### Anexo 3. Cebadores SSR y SCAR evaluados.

Código	Objetivo	Secuencia Forward y Revers	Bibliografía
CM5	Diversidad	F: GTAACCACCACCTCCTCTGC R: TGGAGGTAACGGAAGCTCTG	Geleta <i>et al.</i> 2012
Sat207	Diversidad	F: GAAGCCGTTTCAAGCC R: CAATCTCTTTCCGATGCTCT	Geleta <i>et al.</i> 2012
CaM03	Diversidad	F: CGCGCTTGCTCCCTCTGTCTCT R: TGGGGGAGGGGCGGTGTT	Geleta <i>et al.</i> 2012
SSR09	Diversidad	F: TTGGCTTTTGTCCCTCCTCCTCTG R: AGCCCATTTCCCTCTCATCATTTCAAG	Geleta <i>et al.</i> 2012
SSR03	Diversidad	F: GGACAAAACACCGCCCAAATA R: AGCGAGACAGAGGAAGGGAATATT	Geleta <i>et al.</i> 2012
CaM16	Diversidad	F: AAGGCAGCTGAAGCGGGACAAA R: TGGGGAGAGCTGCAGTTGGAGG	Geleta <i>et al.</i> 2012
471	Diversidad	F: TTACCTCCCGCCAGAC R: CAGGAGACCAAGACCTTAGCA	Geleta <i>et al.</i> 2012
AY2434	Diversidad	F: CGCAAATGTTTATGTCAATC R: GCAACTTATGAGCCTAATCC	Teressa <i>et al.</i> 2010
AY2449	Diversidad	F: CGAAAATATGCTGCCCATTG R: CCGAACCCATAAAGGTGTGAC	Teressa <i>et al.</i> 2010
CMA055	Diversidad	F: TTGAGCAAAAACCTATTCC R: TAAACCCAAAAGACCACAA	Teressa <i>et al.</i> 2010
CMA198	Diversidad	F: AGCAACTCCAGTCCTCAGGT R: TGGAAGCCCGCATATAGTTT	Teressa <i>et al.</i> 2010
CMA199	Diversidad	F: CATGCCATCATCAATTCCAT R: CTAGCTAGCTGGATCAGTACCC	Teressa <i>et al.</i> 2010
CMA233	Diversidad	F: CAACGAGATAACTGGCAGGTC R: CAAACCAATATTAGGAATAAAGAACG	Teressa <i>et al.</i> 2010
CM8	Diversidad	F: GCCAATTGTGCAAAGTGCT R: ATTCATGGGGCCTTTGTCTT	Baruah <i>et al.</i> 2003
CM16	Diversidad	F: TGGGAAAAGAAGGATATAGACAAGAG R: GAGGGGGGCTAAGGGAATAACATA	Baruah <i>et al.</i> 2003
M24	Diversidad	F: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC	Combes <i>et al.</i> 2000
E12-3CTG	Diversidad	F: TGCTTAGGCACTTGATATAGGA R: CACGTGCAAGTCACATACTTTA	Silvestrini <i>et al.</i> 2007
SSR 016	Resistencia	F: ACCCGAAAGAAAGAACCAAG R: CCACACAACCTCCTCATTC	Pestana <i>et al.</i> 2015
SSR 071	Resistencia	F: GCTAAGTTCAATTGCCCTGT R: GGGTTAATTTGATTGCGTGA	Pestana <i>et al.</i> 2015
SFcan022c	Resistencia	F: TTAATTTGTTCCCTCGTTCC R: CTTTGGATATTCCGACTTG	Romero <i>et al.</i> 2014
SFcan0105d	Resistencia	F: GTGTTTGGTCTTTGCTGAAT R: CTGGATGGAGTGAGAGGATA	Romero <i>et al.</i> 2014
SFcan0105b	Resistencia	F: TGCAACCCAGTTAGTCTCTT R: GTTTGGTGAACCTTGGTGTT	Romero <i>et al.</i> 2014
05RM1	Resistencia	F: GTAGCCCATGTTTGTGTGTC R: CCAAACGGCTGAGTAACTTC	Romero <i>et al.</i> 2014
Sat 259	Resistencia	F: GCCAATTGTGCAAAGTGCT R: ATTCATGGGGCCTTTGTCTT	Herrera <i>et al.</i> 2009
Sat 225	Resistencia	F: CATGCCATCATCAATTCCAT R: TTAATGCTC ATCATTCCGCA	Herrera <i>et al.</i> 2009
ETCA-EATG560	Resistencia	F: CAAGCCGATCATAACTTATC R: TGGTGGAGAATTCCTTCAG	Diola <i>et al.</i> 2011
ETCA-EAGA530	Resistencia	F: CTGATACGGCAATCTTATC R: GTAGATCTGGAAGCTCTTC	Diola <i>et al.</i> 2011

**Anexo 4.** Preparación del gel agarosa 1,5%.

1. Pesar 1,8 g de agarosa
2. Llevar a un Erlenmeyer y agregar 120 ml de Buffer TBE 1X
3. Calentar en un horno microondas por intervalos de 30 segundos
4. Verificar si la agarosa se ha disuelto completamente, sino calentar nuevamente hasta que esté completamente disuelta la agarosa
5. Agitar y dejar que empiece la ebullición
6. Dejar enfriar un poco y verter en la bandeja con el peine y los extremos sellados en una mesa nivelada
7. Dejar solidificar el gel
8. Luego de 30 minutos está listo para usar
9. Retirar con cuidado el peine y sumergir la bandeja en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X

**Anexo 5.** Preparación de tampón de carga (Dye corrida).

<b>Tampón de Carga</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>[CC. final]</b>	<b>10 ml</b>
Formamida	1 M	9.6 ml
EDTA 0.2 Molar	0.2 M	300 $\mu$ l
Dye (Stock)		100 $\mu$ l

**Anexo 6.** Soluciones utilizadas para la tinción y revelado del gel de poliacrilamida.

**Fijación y Stop:**

<b>Solución de Fijación y Stop</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen ml.</b>
Ácido Acético Glacial	5 ml.
Etanol Absoluto	100 ml.
Agua destilada	985 ml.

**Tinción:**

<b>Solución de tinción</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Peso mg./Volumen <math>\mu</math>l.</b>
Nitrato de Plata	2 g.
Agua destilada	1000 ml.

**Revelado:**

<b>Solución de revelado</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Peso g./Volumen <math>\mu</math>l.</b>
NaOH	30 gr.
Formaldehido	6 ml.
Agua destilada	1000 ml.

**Anexo 7.** Matriz de similitud genética de 54 muestras de café del Fundo Santa Teresa  
(Índice de Jaccard).

	BorA1	BorA2	BorA3	BorR1	BorR2	BorR3	Cat1	Cat2	Cat3	CatA1	CatA2	CatA3	CatR1	CatR2	CatR3	Cau1	Cau2	Cau3
BorA1	0.00																	
BorA2	0.43	0.00																
BorA3	0.41	0.40	0.00															
BorR1	0.54	0.53	0.44	0.00														
BorR2	0.54	0.53	0.44	0.00	0.00													
BorR3	0.50	0.49	0.32	0.32	0.32	0.00												
Cat1	0.65	0.65	0.59	0.56	0.56	0.56	0.00											
Cat2	0.65	0.65	0.59	0.52	0.52	0.52	0.23	0.00										
Cat3	0.65	0.64	0.58	0.51	0.51	0.51	0.28	0.16	0.00									
CatA1	0.50	0.49	0.32	0.32	0.32	0.00	0.56	0.52	0.51	0.00								
CatA2	0.50	0.49	0.32	0.32	0.32	0.00	0.56	0.52	0.51	0.00	0.00							
CatA3	0.52	0.52	0.35	0.35	0.35	0.16	0.58	0.54	0.53	0.16	0.16	0.00						
CatR1	0.52	0.52	0.35	0.35	0.35	0.16	0.58	0.54	0.53	0.16	0.16	0.00	0.00					
CatR2	0.52	0.52	0.35	0.35	0.35	0.16	0.58	0.54	0.53	0.16	0.16	0.00	0.00	0.00				
CatR3	0.50	0.49	0.32	0.32	0.32	0.00	0.56	0.52	0.51	0.00	0.00	0.16	0.16	0.16	0.00			
Cau1	0.70	0.69	0.61	0.61	0.61	0.55	0.64	0.64	0.63	0.55	0.55	0.57	0.57	0.57	0.55	0.00		
Cau2	0.60	0.60	0.48	0.48	0.48	0.38	0.44	0.38	0.35	0.38	0.38	0.41	0.41	0.41	0.38	0.55	0.00	
Cau3	0.52	0.52	0.35	0.35	0.35	0.16	0.58	0.54	0.53	0.16	0.16	0.00	0.00	0.00	0.16	0.57	0.41	0.00
GeiA1	0.35	0.40	0.31	0.52	0.52	0.43	0.64	0.64	0.63	0.43	0.43	0.46	0.46	0.46	0.43	0.66	0.55	0.46
GeiA2	0.35	0.40	0.32	0.52	0.52	0.44	0.65	0.65	0.64	0.44	0.44	0.46	0.46	0.46	0.44	0.67	0.56	0.46
GeiA3	0.35	0.45	0.23	0.48	0.48	0.38	0.62	0.62	0.61	0.38	0.38	0.41	0.41	0.41	0.38	0.64	0.52	0.41
GeiR1	0.52	0.51	0.54	0.65	0.65	0.60	0.74	0.74	0.73	0.60	0.60	0.59	0.59	0.59	0.60	0.74	0.68	0.59
GeiR2	0.53	0.56	0.58	0.69	0.69	0.64	0.76	0.76	0.76	0.64	0.64	0.63	0.63	0.63	0.64	0.75	0.71	0.63
GeiR3	0.54	0.53	0.38	0.56	0.56	0.48	0.67	0.67	0.66	0.48	0.48	0.46	0.46	0.46	0.48	0.67	0.59	0.46
GrC1	0.67	0.66	0.58	0.58	0.58	0.51	0.68	0.68	0.67	0.51	0.51	0.53	0.53	0.53	0.51	0.46	0.61	0.53
GrC2	0.60	0.60	0.48	0.48	0.48	0.38	0.62	0.62	0.61	0.38	0.38	0.41	0.41	0.41	0.38	0.42	0.52	0.41
GrC3	0.60	0.60	0.48	0.48	0.48	0.38	0.62	0.62	0.61	0.38	0.38	0.41	0.41	0.41	0.38	0.42	0.52	0.41
JBrack1	0.35	0.40	0.38	0.55	0.55	0.48	0.66	0.66	0.65	0.48	0.48	0.50	0.50	0.50	0.48	0.69	0.58	0.50
JBrack2	0.56	0.49	0.52	0.61	0.61	0.58	0.71	0.71	0.70	0.58	0.58	0.57	0.57	0.57	0.58	0.73	0.66	0.57
JBrack3	0.60	0.59	0.55	0.66	0.66	0.61	0.69	0.69	0.68	0.61	0.61	0.60	0.60	0.60	0.61	0.75	0.69	0.60
Lim1	0.60	0.65	0.59	0.44	0.44	0.52	0.48	0.44	0.41	0.52	0.52	0.54	0.54	0.54	0.52	0.64	0.38	0.54
Lim2	0.60	0.65	0.59	0.44	0.44	0.52	0.48	0.44	0.41	0.52	0.52	0.54	0.54	0.54	0.52	0.64	0.38	0.54
Lim3	0.60	0.65	0.59	0.44	0.44	0.52	0.48	0.44	0.41	0.52	0.52	0.54	0.54	0.54	0.52	0.64	0.38	0.54
Marg1	0.58	0.58	0.45	0.45	0.45	0.32	0.53	0.49	0.47	0.32	0.32	0.28	0.28	0.28	0.32	0.52	0.32	0.28
Marg2	0.80	0.79	0.75	0.75	0.75	0.71	0.71	0.71	0.70	0.71	0.71	0.70	0.70	0.70	0.71	0.57	0.64	0.70
Marg3	0.78	0.77	0.72	0.72	0.72	0.68	0.68	0.68	0.67	0.68	0.68	0.67	0.67	0.67	0.68	0.60	0.60	0.67
Pac1	0.60	0.60	0.52	0.48	0.48	0.44	0.44	0.38	0.35	0.44	0.44	0.41	0.41	0.41	0.44	0.58	0.23	0.41
Pac2	0.63	0.62	0.51	0.51	0.51	0.42	0.55	0.51	0.49	0.42	0.42	0.39	0.39	0.39	0.42	0.54	0.36	0.39
Pac3	0.58	0.58	0.50	0.46	0.46	0.41	0.41	0.35	0.32	0.41	0.41	0.44	0.44	0.44	0.41	0.56	0.16	0.44
Pch1	0.60	0.59	0.47	0.47	0.47	0.36	0.55	0.51	0.49	0.36	0.36	0.32	0.32	0.32	0.36	0.54	0.36	0.32
Pch2	0.58	0.58	0.45	0.45	0.45	0.32	0.53	0.49	0.47	0.32	0.32	0.28	0.28	0.28	0.32	0.52	0.32	0.28
Pch3	0.56	0.56	0.42	0.42	0.42	0.28	0.55	0.51	0.49	0.28	0.28	0.23	0.23	0.23	0.28	0.54	0.36	0.23
PchA1	0.58	0.63	0.57	0.41	0.41	0.50	0.50	0.46	0.44	0.50	0.50	0.52	0.52	0.52	0.50	0.65	0.41	0.52
PchA2	0.60	0.65	0.59	0.44	0.44	0.52	0.48	0.44	0.41	0.52	0.52	0.54	0.54	0.54	0.52	0.64	0.38	0.54
PchA3	0.55	0.61	0.50	0.50	0.50	0.41	0.50	0.46	0.44	0.41	0.41	0.44	0.44	0.44	0.41	0.60	0.27	0.44
Rob1	0.93	0.92	0.93	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.93	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.95	0.94	0.91
Rob2	0.93	0.92	0.93	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.93	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.95	0.94	0.91
Rob3	0.91	0.93	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.93	0.94	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.94	0.95	0.92
TypA1	0.52	0.52	0.35	0.35	0.35	0.16	0.54	0.54	0.53	0.16	0.16	0.23	0.23	0.23	0.16	0.53	0.41	0.23
TypA2	0.50	0.49	0.32	0.32	0.32	0.00	0.56	0.52	0.51	0.00	0.00	0.16	0.16	0.16	0.00	0.55	0.38	0.16
TypA3	0.41	0.40	0.52	0.52	0.52	0.59	0.69	0.69	0.69	0.59	0.59	0.61	0.61	0.61	0.59	0.75	0.67	0.61
Visar1	0.50	0.49	0.32	0.32	0.32	0.00	0.56	0.52	0.51	0.00	0.00	0.16	0.16	0.16	0.00	0.55	0.38	0.16
Visar2	0.54	0.53	0.38	0.38	0.38	0.23	0.59	0.56	0.54	0.23	0.23	0.28	0.28	0.28	0.23	0.55	0.44	0.28
Visar3	0.50	0.49	0.32	0.32	0.32	0.00	0.56	0.52	0.51	0.00	0.00	0.16	0.16	0.16	0.00	0.55	0.38	0.16

«continuación»

**Anexo 7. Matriz de similitud genética**

GeiA1	GeiA2	GeiA3	GeiR1	GeiR2	GeiR3	GrC1	GrC2	GrC3	JBrack1	JBrack2	JBrack3	Lim1	Lim2	Lim3	Marg1	Marg2	Marg3
0.00																	
0.22	0.00																
0.22	0.32	0.00															
0.45	0.50	0.50	0.00														
0.51	0.52	0.55	0.45	0.00													
0.48	0.48	0.44	0.46	0.55	0.00												
0.63	0.63	0.61	0.73	0.73	0.63	0.00											
0.55	0.56	0.52	0.68	0.71	0.59	0.37	0.00										
0.55	0.56	0.52	0.68	0.71	0.59	0.37	0.00	0.00									
0.37	0.43	0.38	0.49	0.55	0.52	0.65	0.58	0.58	0.00								
0.55	0.55	0.55	0.45	0.55	0.38	0.69	0.66	0.66	0.55	0.00							
0.61	0.61	0.58	0.56	0.61	0.48	0.71	0.69	0.69	0.51	0.43	0.00						
0.58	0.62	0.56	0.70	0.73	0.67	0.68	0.62	0.62	0.64	0.71	0.75	0.00					
0.58	0.62	0.56	0.70	0.73	0.67	0.68	0.62	0.62	0.64	0.71	0.75	0.00	0.00				
0.58	0.62	0.56	0.70	0.73	0.67	0.68	0.62	0.62	0.64	0.71	0.75	0.00	0.00	0.00			
0.53	0.53	0.49	0.64	0.68	0.53	0.59	0.49	0.49	0.56	0.63	0.65	0.49	0.49	0.49	0.00		
0.77	0.78	0.76	0.82	0.82	0.76	0.60	0.66	0.66	0.79	0.81	0.82	0.71	0.71	0.71	0.68	0.00	
0.75	0.76	0.74	0.81	0.83	0.76	0.56	0.63	0.63	0.77	0.80	0.81	0.68	0.68	0.68	0.64	0.23	0.00
0.58	0.59	0.56	0.68	0.71	0.59	0.63	0.56	0.56	0.61	0.64	0.69	0.38	0.38	0.38	0.32	0.64	0.60
0.58	0.58	0.55	0.68	0.69	0.58	0.63	0.55	0.55	0.61	0.66	0.69	0.51	0.51	0.51	0.29	0.66	0.65
0.56	0.57	0.54	0.69	0.71	0.60	0.62	0.54	0.54	0.60	0.65	0.69	0.35	0.35	0.35	0.36	0.65	0.61
0.54	0.55	0.51	0.65	0.69	0.55	0.60	0.51	0.51	0.58	0.64	0.66	0.51	0.51	0.51	0.17	0.68	0.65
0.53	0.53	0.49	0.64	0.68	0.53	0.59	0.49	0.49	0.56	0.63	0.65	0.49	0.49	0.49	0.00	0.68	0.64
0.51	0.51	0.47	0.63	0.66	0.51	0.57	0.47	0.47	0.54	0.61	0.64	0.51	0.51	0.51	0.17	0.68	0.65
0.56	0.60	0.54	0.69	0.71	0.65	0.67	0.60	0.60	0.62	0.69	0.73	0.16	0.16	0.16	0.51	0.71	0.69
0.58	0.62	0.56	0.70	0.73	0.67	0.68	0.62	0.62	0.64	0.71	0.75	0.00	0.00	0.00	0.49	0.71	0.68
0.49	0.54	0.46	0.64	0.67	0.60	0.62	0.54	0.54	0.56	0.67	0.69	0.35	0.35	0.35	0.42	0.67	0.64
0.92	0.92	0.93	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92	0.93	0.91	0.91	0.94	0.94	0.94	0.93	0.95	0.94
0.92	0.92	0.93	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92	0.93	0.91	0.91	0.94	0.94	0.94	0.93	0.95	0.94
0.92	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.90	0.91	0.91	0.92	0.92	0.91	0.94	0.94	0.94	0.95	0.93	0.92
0.46	0.46	0.41	0.62	0.65	0.51	0.49	0.35	0.35	0.50	0.60	0.63	0.54	0.54	0.54	0.36	0.70	0.67
0.43	0.44	0.38	0.60	0.64	0.48	0.51	0.38	0.38	0.48	0.58	0.61	0.52	0.52	0.52	0.32	0.71	0.68
0.48	0.48	0.48	0.57	0.58	0.62	0.72	0.67	0.67	0.48	0.61	0.66	0.59	0.59	0.59	0.66	0.84	0.82
0.43	0.44	0.38	0.60	0.64	0.48	0.51	0.38	0.38	0.48	0.58	0.61	0.52	0.52	0.52	0.32	0.71	0.68
0.48	0.48	0.44	0.63	0.64	0.52	0.55	0.44	0.44	0.52	0.61	0.64	0.56	0.56	0.56	0.39	0.71	0.70
0.43	0.44	0.38	0.60	0.64	0.48	0.51	0.38	0.38	0.48	0.58	0.61	0.52	0.52	0.52	0.32	0.71	0.68

«continuación»

**Anexo 7. Matriz de similitud genética.**

Pac1	Pac2	Pac3	Pch1	Pch2	Pch3	PchA1	PchA2	PchA3	Rob1	Rob2	Rob3	TypA1	TypA2	TypA3	Visar1	Visar2	Visar3
0.00																	
0.36	0.00																
0.16	0.39	0.00															
0.36	0.33	0.39	0.00														
0.32	0.29	0.36	0.17	0.00													
0.36	0.33	0.39	0.24	0.17	0.00												
0.41	0.53	0.38	0.53	0.51	0.49	0.00											
0.38	0.51	0.35	0.51	0.49	0.51	0.16	0.00										
0.35	0.44	0.31	0.44	0.42	0.39	0.31	0.35	0.00									
0.94	0.94	0.94	0.92	0.93	0.92	0.93	0.94	0.93	0.00								
0.94	0.94	0.94	0.92	0.93	0.92	0.93	0.94	0.93	0.00	0.00							
0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.94	0.93	0.94	0.93	0.78	0.78	0.00						
0.46	0.45	0.44	0.39	0.36	0.32	0.52	0.54	0.44	0.91	0.91	0.92	0.00					
0.44	0.42	0.41	0.36	0.32	0.28	0.50	0.52	0.41	0.91	0.91	0.92	0.16	0.00				
0.67	0.69	0.65	0.67	0.66	0.64	0.57	0.59	0.63	0.93	0.93	0.91	0.61	0.59	0.00			
0.44	0.42	0.41	0.36	0.32	0.28	0.50	0.52	0.41	0.91	0.91	0.92	0.16	0.00	0.59	0.00		
0.48	0.36	0.46	0.42	0.39	0.36	0.54	0.56	0.46	0.92	0.92	0.92	0.28	0.23	0.62	0.23	0.00	
0.44	0.42	0.41	0.36	0.32	0.28	0.50	0.52	0.41	0.91	0.91	0.92	0.16	0.00	0.59	0.00	0.23	0.00

**Anexo 8.** Bandas monomórficas producidas.

Primer	Banda	Patrón
E12-3CTG	#149pb	11111...
CM16	#128pb	11111...
CM16	#116pb	11111...

**Anexo 9.** Análisis de coordenadas principales.

Autovalores Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada
1	1.93	0.22	0.22
2	1.62	0.18	0.4
3	1.13	0.13	0.52
4	0.8	0.09	0.61
5	0.55	0.06	0.68
6	0.38	0.04	0.72
7	0.36	0.04	0.76
8	0.31	0.04	0.8
9	0.26	0.03	0.82
10	0.21	0.02	0.85
11	0.17	0.02	0.87
12	0.15	0.02	0.88
13	0.13	0.01	0.9
14	0.12	0.01	0.91
15	0.1	0.01	0.92
16	0.07	0.01	0.93
17	0.07	0.01	0.94
18	0.07	0.01	0.95
19	0.07	0.01	0.95
20	0.06	0.01	0.96
21	0.05	0.01	0.97
22	0.05	0.01	0.97
23	0.04	4.40E-03	0.98
24	0.04	4.00E-03	0.98

53 Autovalores no mostrados

**Anexo 10.** AMOVA sin muestras de *C. canephora*.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre variedades	16	229.608	3.94363 Va	61.02
Dentro de variedades	34	85.667	2.51961 Vb	38.98
Total	50	315.275	6.46324	

Índice de Fijación FST: 0.61016