



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix*
(Berk. & Br.) EN ZONAS CAFETALERAS DEL
ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO**

TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL



APROBADA



Presenta:

ELENA SELIK PÉREZ VIVEROS

Bajo la supervisión de: DR. MARCELO ACOSTA RAMOS



Chapingo, Estado de México, mayo de 2020.

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix* (Berk. & Br.) EN ZONAS
CAFETALERAS DE VERACRUZ, MÉXICO**

Tesis realizada por ELENA SELIK PÉREZ VIVEROS bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



Dr. Marcelo Acosta Ramos

ASESOR:



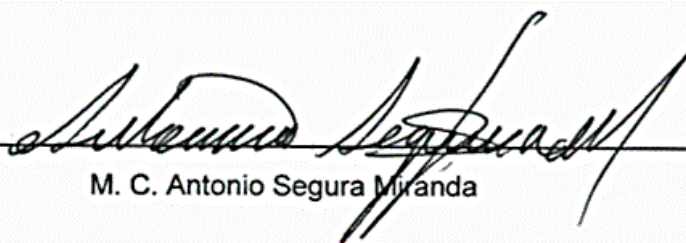
Dr. Dimas Mejía Sánchez

ASESOR:



M. C. Gabriela Pelayo Sánchez

ASESOR:



M. C. Antonio Segura Miranda

CONTENIDO

CONTENIDO	I
Lista de cuadros	III
Lista de figuras	III
Dedicatorias.....	VI
Agradecimientos	VII
Datos biográficos.....	VIII
Resumen general	IX
Abstract	X
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivos.....	4
1.2. Hipótesis.....	4
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Importancia del cultivo de café	5
2.2. Particularidades del café	7
2.3. Variedades de café.....	8
2.4. Roya del café: <i>Hemileia vastatrix</i>	14
2.4.1. Variabilidad genética del hongo.	15
2.5. Estudios moleculares en <i>Hemileia vastatrix</i>	17
3. LITERATURA CITADA.	18
CAPITULO 3. VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>Hemileia vastatrix</i> (Berk. & Br.) EN ZONAS CAFETALERAS DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO...24	
Resumen	24

CHAPTER 3. GENETIC VARIABILITY OF <i>Hemileia vastatrix</i> (BERK. & BR.) IN COFFEE ZONES OF THE STATE OF VERACRUZ, MEXICO.....	25
Abstract	25
1. INTRODUCCIÓN.....	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. Etapa de campo	28
2.2. Etapa de laboratorio	29
2.2.1. Extracción de ADN	29
2.2.2. Secuenciación de ITSS.....	31
2.2.3. Análisis de datos.	32
2.2.4. Enzimas de restricción	33
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1. Sugerencias	45
4. CONCLUSIONES	46
5. LITERATURA CITADA.	47

Lista de cuadros

Cuadro 1. Principales variedades de café en México. Cualidades agronómicas de las variedades comerciales resistentes y susceptibles a la roya.	12
Cuadro 2. Concentrado de muestras. Etiquetas utilizadas para identificar las muestras en campo y laboratorio clasificadas de acuerdo al sitio de colecta. ...	28
Cuadro 3. Concentraciones para la reacción de la PCR.	32
Cuadro 4. Protocolo de endonucleasas. Cantidad por reacción a 25 µL volumen total.....	33
Cuadro 5. Porcentajes de cobertura e identidad	38
Cuadro 6. Haplotipos presentes en Campo y CRUO. Haplotipos distribuidos en los sitios de recolecta.....	42

Lista de figuras

Figura 1. Países productores de café. Primeros 20 países productores de café verde a nivel mundial. Elaboración propia con datos de FAOSTAT, 2020.	5
Figura 2. Producción nacional de café. Estados productores de café en México, producción de los primeros seis lugares, el resto tiene en conjunto 22, 561 toneladas de café cereza. Elaboración propia con datos del SIAP, 2018.....	6
Figura 3. Líneas genéticas comerciales de café. Variedades de café obtenidas por cruza artificiales, mutaciones o selecciones que son susceptibles y resistentes a <i>Hemileia vastatrix</i> . Zamarripa, A. y Escamilla, E. 2016. Origen de las variedades comerciales de <i>Coffea arabica</i> L. Imagen recuperada de Variedades de café en México Origen, características y perspectivas.	9
Figura 4. Genes de resistencia de Coffea. Genes de resistencia a <i>H. vastatrix</i> por linaje de especies comerciales de <i>Coffea</i>	11
Figura 5. Síntomas de roya en café. Manchas amarillas en el envés de las hojas (1) y pústulas color naranja/amarillo (2 y 3) ocasionadas por <i>H. vastatrix</i>	14

Figura 6. Sitio de estudio. Mapa de los municipios muestreados, el Centro de germoplasma CRUO se ubica en el municipio de Huatusco.	27
Figura 7. Recolecta de uredosporas de <i>H. vastatrix</i>. Procesamiento de muestras 1) Secado de las hojas después de sacarlas de refrigeración, 2/3) observación de pústulas en el microscopio estereoscopio (4X), 4) uredosporas observadas al microscopio estereoscopio (4X), 5) recolecta de uredosporas con la cápsula y 6) transferencia de las esporas al tubo eppendorf.	31
Figura 8. Variedades colectadas. Hojas de café con síntomas provocados por <i>H. vastatrix</i> , A) Geisha, B) Lote 2 (campo), C) Typica, D) Oro Azteca, E) Select 12 y F) Catuai.	35
Figura 9. Gel de agarosa al 1.5 % de las regiones ITS 1 Y 4. Mostrando, carril 1 marcador de peso molecular (Mpm) de 100 pares base (pb), carril 2 (positivo), carril 3 (1_campo), carril 4 (5_Oro azteca), carril 5 (7_campo), carril 6 (9_campo), carril 7 (11_campo), carril 8 (12_campo), carril 9 (20_Bourbon Amarillo), carril 10 (26_Garnica), carril 11 (27_Catuai), carril 12 (28_campo); carril 13 (30_campo), carril 14 (33 campo), carril 15 (Br Bourbon Rojo), carril 16 (GH Geisha), carril 17 (blanco), carril 18 (negativo), carril 20 (Ty Typica).	37
Figura 10. Análisis filogenético de ITSs de <i>Hemileia vastatrix</i> por el método de Máxima Verosimilitud con 1000 bootstrap. Historia evolutiva que se infiere utilizando el modelo de Jukes-Cantor. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-237.66).	41
Figura 11. Red de Haplotipos de poblaciones de <i>H. vastatrix</i>. Estructura genética del hongo, los haplotipos 5 y 9 como poblaciones ancestrales de las que derivaron otras poblaciones, las líneas transversales negras indican el número de cambios que ha sufrido cada haplotipo.	43
Figura 12. Endonucleasa Eco RI. Cortes enzimáticos de la enzima Eco Ri en poblaciones por variedad de <i>H. vastatrix</i> . Las muestras se observan en el orden : Carril 1 (marcador de peso molecular 100 pb), carril 2 (1 campo), carril 3 (5 Oro	

azteca), carril 4 (7 campo), carril 5 (9 campo), carril 6 (11 campo), carril 7 (12 campo), carril 8 (20 Bourbon Amarillo), carril 9 (26 Garnica), carril 10 (27 Catuai), carril 11 (28 campo); carril 12 (30 campo), carril 13 (33 campo), carril 14 (Bourbon Rojo), carril 15 (Geisha), carril 16 (marcador de peso molecular 100 pb.). Se observan dos fotografías del mismo gel para observar con mayor precisión las bandas. 45

Dedicatorias

A mis padres Luis y Beatriz por brindarme consejos, educación, cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos por estar a mi lado, por creer en mí y motivarme a ser mejor cada día.

A mis abuelas por ser un ejemplo de superación y vida.

A mi familia y a cada persona que a lo largo de mi vida motivó y contribuyó a mi formación académica.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Universidad Autónoma Chapingo por otórgame los recursos económicos y humanos para la realización de este proyecto de investigación.

A la Coordinación General de Posgrado

A la Coordinación de la Maestría en Protección Vegetal, especialmente al M. C. Antonio Segura Miranda y a la Señora Maribel Espejel Cervantes por todo el apoyo brindado durante mi estancia en la maestría.
Al Departamento de Parasitología Agrícola y Fitotecnia.

A mis asesores de tesis: Dr. Marcelo Acosta Ramos, Dr. Roney Solano Vidal, Dr. Dimas Mejía Sánchez, Dra. Gabriela Pelayo Sánchez y M. C. Antonio Segura Miranda.

A mis profesores y compañeros de la Maestría.

Al Químico Ricardo Gaspar, al M. C. Marco Aurelio Aragón Magadán, a la Ingeniera Erida Yasmin López Vásquez, al Ingeniero Israel Morales por el apoyo otorgado para el procesamiento y análisis de datos, así como para compartir sus conocimientos en este trabajo de investigación.

A José Alfredo Flores Yáñez por compartirme su conocimiento, cariño y apoyo.

A Daniel Eduviges Cituk Chávez, Daniel Ramírez Cerón y José Ignacio Saavedra Ávila por brindarme su amistad y consejos.

Datos biográficos

Datos personales:

Nombre: Elena Selik Pérez Viveros.

Fecha de nacimiento: 23 de abril de 1991.

Lugar de Nacimiento: Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca.

CURP: PEVE910423MOCRVL08.

Profesión: Licenciatura en Biología.

Cédula Profesional: 09599638.

Desarrollo académico:

Licenciatura: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Bachillerato: Centro de Estudios Tecnológicos Industrial y de Servicios N ° 123.



Resumen general

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix* (Berk. & Br.) EN ZONAS CAFETALERAS DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

México es uno de los principales países productores de café a nivel mundial, el valor total de la producción se estima en 4,996 millones de pesos, de los cuales el 72.6 % se destina al pago de jornales, respecto al valor de las exportaciones se han estimado en más de 351 mdd durante el 2018. Los estados que concentran la mayor producción son Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca. El principal problema fitosanitario de este cultivo es la roya del café, ocasionado por el hongo *Hemileia vastatrix*, el cual tiene como hospedante al género *Coffea*. En México existe poca información acerca de la variabilidad genética en las poblaciones del hongo, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar a nivel genético las posibles variaciones del patógeno en el estado de Veracruz, así como el uso de enzimas de restricción para diferenciar visualmente entre cada población. Mediante la comparación de secuencias se realizó un árbol filogenético y un análisis de haplotipos, así como el uso de enzimas de restricción, con lo cual, los resultados obtenidos mostraron diversidad genética entre las poblaciones, esto se podría deber a la presencia de las variedades de café (tolerantes y susceptibles) establecidas en los patosistemas. En los sistemas cafetaleros a nivel mundial se conocen más de 50 razas fisiológicas de *H. vastatrix*, en México solo se ha reportado la especialización de la raza II, sin embargo los resultados indican la presencia de nuevas razas. La digestión de los fragmentos ITSs con enzimas de restricción no permitió evidenciar diferencias visuales entre las poblaciones del patógeno, sin embargo los análisis previos si mostraron variabilidad, lo que podría deberse a los sitios de corte específicos a los que las enzimas reconocen en la región ITS, los cuales no se observaron en los geles de agarosa.

Palabras clave: Variabilidad genética, variedades, ITS, haplotipos.

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Elena Selik Pérez Viveros.

Director de Tesis: Marcelo Acosta Ramos.

Abstract

GENETIC VARIABILITY OF *Hemileia vastatrix* (BERK. & BR.) IN COFFEE AREAS OF THE STATE OF VERACRUZ, MEXICO

Mexico is one of the main coffee producers worldwide, the total value of production is estimated at 4,996 million pesos, which 72.6% goes to the payment of wages. Regarding to the value of exports more than 351 million dollars during 2018 were reported. The states that concentrate the largest production are Chiapas, Veracruz, Puebla and Oaxaca. The main phytosanitary problem of this crop is coffee rust caused by the *Hemileia vastatrix* fungus, which has the *Coffea* sp. genus as host. There is little information in Mexico about the genetic variability in the populations of the fungus, therefore the objective of this work is to determine at genetic level the possible variations of the pathogen in the state of Veracruz, as well as the use of restriction enzymes in order to visually differentiate between each population. Through the comparison of sequences, a phylogenetic tree and a haplotype analysis were carried out as well as the use of restriction enzymes. As a result, the genetic diversity was demonstrated among the populations, this may be due to the presence of the varieties of coffee (tolerant and susceptible) established in pathosystems. In the coffee systems worldwide, more than 50 physiological races of *H. vastatrix* are known, in Mexico only the specialization of race II has been reported, however the results indicate the presence of new races. The digestion of the ITS fragments with restriction enzymes did not reveal visual differences between the populations of the pathogen, however, previous analyzes showed variability, which could be due to the specific cutting sites that the enzymes recognize in the ITS region, which were not observed in the agarose gels.

Key words: Genetic variability, varieties, ITS, haplotypes.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Elena Selik Pérez Viveros.
Advisor: Marcelo Acosta Ramos.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

A nivel mundial, México es el onceavo productor de café, las exportaciones del grano generaron ganancias de 383 millones de dólares, la producción total se cuantificó en 859,992 toneladas con un valor de 4,996 millones de pesos para el periodo de cosecha del 2018 (SIAP, 2019). La superficie cafetalera a nivel nacional es de 730 mil hectáreas contabilizadas, siendo el estado de Chiapas el primer lugar en superficie cultivada y en volumen de producción, el segundo lugar en volumen de producción es Veracruz, seguido de Puebla y Oaxaca, por lo que representa uno de los cultivos importantes en el ámbito social y económico para el país (Flores, 2015; SIAP, 2018). Aunado a ello, este cultivo tiene importancia ambiental, ya que es uno de los agro-sistemas (café bajo sombra) con mayor biodiversidad aérea y edáfica, mayores nutrientes, menor número de malezas, y coadyuva en la protección de cuencas hidrológicas (Moguel y Toledo, 1996).

Para la producción de café a nivel mundial y nacional se distinguen dos especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, cada una presenta diferentes cualidades que las caracterizan en el mercado (Clifford y Willson, 1985; Lashermes et al., 1999; Davis y Rakotonasolo, 2008; Flores, 2015; López-García et al., 2016; Avelino et al., 2018); sin embargo, estos cultivares son más susceptibles a presentar enfermedades ocasionadas por hongos. El principal problema fitosanitario es la roya del café causado por *Hemileia vastatrix* (Hindorf y Omondi, 2010; Castro-Caicedo et al., 2013; Rivillas, et al., 2011), ocasionando daños significativas en la producción de café, siendo más evidentes durante los ciclos productivos posteriores a la infección (Hindorf y Omondi, 2010). Colombia ha reportado disminuciones en las cosechas de los periodos siguientes al establecimiento de la enfermedad, con un 23 % de merma y una tendencia hacia un 30 % de decrecimiento en la productividad. Además, la mayoría de los países productores de café en América Latina y Central han reportado que la roya del café ha alcanzado tasas epidémicas considerables causando pérdidas económicas importantes (Cressy, 2013; Rivillas, et al., 2011; Kosaraju et al., 2017). No obstante, a pesar de que se han implementado medidas para el manejo de la enfermedad, como el uso de fungicidas o el desarrollo de variedades mejoradas

no se ha podido establecer un control adecuado, ya que se reporta que el hongo presenta una gran variabilidad genética que deriva en diferentes razas, lo que lo hace más agresivo tanto para cultivares susceptibles como mejorados (Castro-Caicedo et al., 2013; Quispe-Apaza et al., 2017).

Sin embargo, poco se sabe a cerca de la variabilidad genética en sus poblaciones; la complejidad del ciclo biológico del patógeno dificulta este tipo de análisis, debido a que no se conoce la etapa sexual del hongo, siendo la etapa asexual la que presenta los mecanismos para la generación de nuevas razas. Se considera que la mutación es el principal proceso por el cual el patógeno ha logrado sobrepasar las barreras genéticas del hospedante (Varzea y Marques, 2005; Carvalho et al., 2014). Generar estudios acerca de estos procesos contribuiría documentar los potenciales de desarrollo de variabilidad genética de las poblaciones de *H. vastatrix* para sentar las bases en los programas de mejoramiento genético e introducción de cultivares a sitios de producción (Nunes et al., 2009).

Actualmente el estudio de las variaciones genéticas de organismos fitopatógenos se ha centrado en análisis molecular, debido a su rapidez y efectividad en los resultados. Algunos de estos estudios se han centrado en marcadores moleculares los cuales se han utilizado para medir variabilidad en diferentes organismos, ejemplo de ellos son las técnicas basadas en polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados o AFLPS (Amplified fragment length polymorphism), los marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA) y los marcadores SRAP (Sequence related amplified polymorphism) que se han probado en poblaciones de *H. vastatrix* obteniendo buenos indicadores para medir las variaciones en las poblaciones del patógeno (Serrato-Díaz y Ramos-Ortíz, 2014; Cabral et al., 2016; Kosaraju et al., 2017), por lo cual resultan herramientas útiles que favorecen los estudios acerca de la variabilidad genética de la roya del café.

Como en la mayoría de los países productores de café, en México también se ha reportado la presencia de *H. vastatrix* afectando al cultivo desde 1981, y se sabe que este patógeno se ha distribuido por todos los estados cafetaleros del país

(Mora-Aguilera et al., 2013; Pelayo-Sánchez et al., 2016; SENASICA, 2019) a pesar de ello, existe poca información acerca de la variabilidad genética en la población del hongo dentro de las zonas cafetaleras del país. Los estudios en México se centran en análisis morfológicos o epidemiológicos (Mora-Aguilera et al., 2013; Pelayo-Sánchez et al., 2016), y recientemente Martínez-Bustamante et al., (2018) realizaron el primer reporte de análisis molecular mediante el uso de AFLP's, acerca de la diversidad genética de *H. vastatrix* en México, tomando como base la intensidad epidémica de la enfermedad a través del tiempo, sin embargo es necesario realizar más estudios moleculares acerca de la estructura de las poblaciones del patógeno que afectan a las diferentes variedades establecidas, además de probar metodologías que estén disponibles y que permitan de forma rápida identificar el estado poblacional de la roya del café. Debido a lo anterior y dado que las pérdidas ocasionadas por la roya son significativas y afectan la economía de los productores de manera directa, la finalidad del siguiente trabajo se enfocó en conocer la diversidad en las poblaciones de *H. vastatrix* en siete variedades de café de un banco de germoplasma y ocho colectas distribuidas en plantaciones comerciales del estado de Veracruz mediante el uso de secuencias genéticas y de las regiones ITSs del patógeno..

1.1. Objetivos

- Determinar si existen variabilidad genética en *Hemileia vastatrix* para diferenciar poblaciones del patógeno en seis variedades de café mediante la comparación de secuencias de ADN en el estado de Veracruz, México.
- Evaluar diferentes enzimas de restricción para determinar posibles variaciones genéticas de *H. vastatrix* en diferentes variedades de café de un banco de germoplasma y plantaciones de campo en el estado de Veracruz, México.

1.2. Hipótesis

Existe variabilidad genética en las poblaciones de *H. vastatrix* en la región cafetalera de Veracruz, México.

CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del cultivo de café

A nivel mundial y nacional el mercado del café se centra en dos especies del género *Coffea*, el 70 % de la producción la ocupa *Coffea arabica* y el otro 30 % la tiene *C. canephora*, las cuales presentan diferentes características que son atractivas al mercado destino (Anthony et al., 2011; Flores, 2015; López-García, 2016).

Aunado al factor de mercado, este cultivo tiene importancia ambiental, ya que es uno de los agrosistemas (café bajo sombra) con mayor biodiversidad aérea y edáfica, mayores nutrientes, y menor número de malezas, además coadyuva en la protección de cuencas hidrológicas (Moguel y Toledo, 1996).

México ocupa el lugar número 11 de la producción a nivel mundial (Figura 1), obteniendo ganancias de 383 millones de dólares (MDD) tan solo de exportaciones en el año 2017, con una producción de 110 mil 968 toneladas de café oro (verde), Estados Unidos y Bélgica son los principales países a los que se destinan las exportaciones del grano (SIAP, 2018; FAOSTAT, 2020).

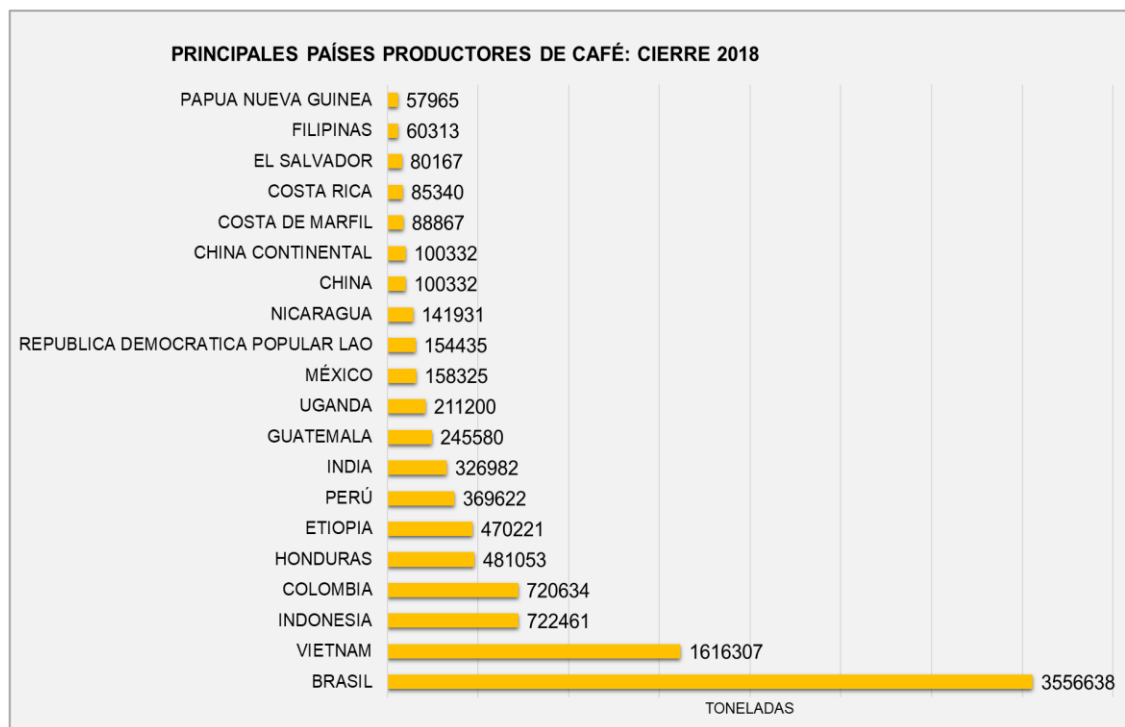


Figura 1. Países productores de café. Primeros 20 países productores de café verde a nivel mundial. Elaboración propia con datos de FAOSTAT, 2020.

México cuenta con una superficie sembrada de 730 mil hectáreas, catorce estados producen en conjunto 852, 158 t de café cereza (Figura 2), los estados que tienen la mayor producción son Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Guerrero e Hidalgo, sin embargo tan solo los primeros tres estados concentran el 81.2 % de la producción nacional (Flores, 2015; SIAP, 2018).

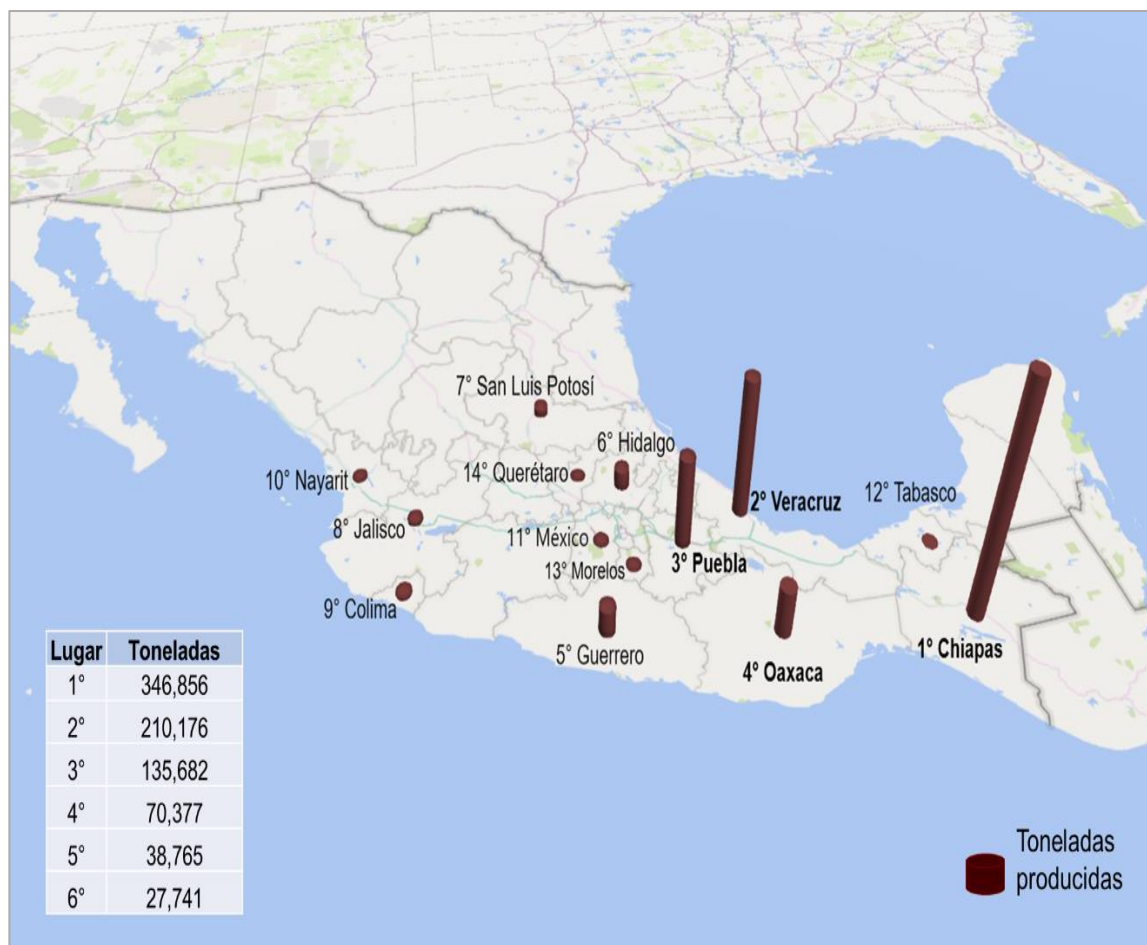


Figura 2. Producción nacional de café. Estados productores de café en México, producción de los primeros seis lugares, el resto tiene en conjunto 22, 561 toneladas de café cereza. Elaboración propia con datos del SIAP, 2018

El estado de Veracruz produce el 24.6 % del café en México, es el segundo estado con mayor rendimiento promedio (SIAP, 2020), cuenta con 143,566 hectáreas sembradas de las que dependen en promedio 70,000 productores (INIFAP, 2013). El café del estado de Veracruz cuenta con diferentes certificaciones que incluyen denominaciones de café de alta calidad, altura y de especialidad así como orgánico, sustentable y de comercio justo (Ejea-Mendoza,

2009; INIFAP, 2013), proporcionando precios de entre 25 y 30 % superiores al establecido en el mercado (Quezada, 2010); México exporta el 20.5 % del café orgánico comercializado a nivel mundial, de esta producción el estado de Veracruz aporta alrededor del 20% de la producción orgánica; la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Australia y Japón son los principales consumidores de café (Sosa, et al., 2004; Pay, 2009; Quezada, 2010).

El estado de Veracruz tiene una división política de 212 municipios, de los cuales 99 siembran café, Juchique de Ferrer, Misantla, Coatepec, Zongolica, Tezonapa, Yecuatla y Huatusco son los municipios que más producen (SIAP, 2020). Dentro de las parcelas establecidas las variedades que predominan son Typica, Garnica, Bourbon y Caturra (Hernández-Solabac et al., 2011); sin embargo también se siembran aunque en menor cantidad variedades como Catuai Amarillo, Pacamara, Colombia, Oro Azteca, Blue Mountain, entre otras (López-García et al., 2016).

2.2. Particularidades del café

El café es una planta originaria de las selvas tropicales de Etiopía y su nombre deriva de la palabra árabe "quahweh", que originalmente se utilizaba como un término poético para el vino, y la cual fue cambiando de acuerdo con la región o país en el que se conocía, hasta llegar al término en latín *Coffea*, siendo este, utilizado como género botánico (Clifford y Willson, 1985; Lashermes et al., 1999). En el género se reconocen ± 130 especies, y al parecer el origen de *Coffea arabica* se dio a partir de una hibridación entre *C. canephora* y *C. eugenioides*. Se considera que *C. arabica* es la única especie que, en su genoma tiene un número de cromosomas correspondiente a $2n=44$, es poliploide natural y autofértil, mientras que en las otras especies, el número de cromosomas es de $2n=22$, y son autoestériles (Louarn, 1972; Rodrigues Jr. et al., 1975; Lécolier et al. 2009). Debido a sus características genéticas, a la forma en la que fue dispersada a lo largo del tiempo, así como las barreras geográficas que tuvo con otros linajes y a pesar de no estar expuesta a la presión de selección cuando apareció la roya del café, *C. arabica*, es una de las especies que mayor

susceptibilidad presenta ante el patógeno *Hemileia vastatrix*, agente causal de la roya del cafeto (Rodrigues et al., 1975).

Se reconocen solo dos especies que son de importancia agrícola y comercial *C. canephora* y *C. arabica*, y se sabe que la primera tiene resistencia a enfermedades; sin embargo, su calidad organoléptica es menor que la segunda, con el fin de mejorar la calidad de taza y la resistencias a enfermedades se han realizado cruza entre estas dos especies (Clifford y Willson, 1985; Lashermes et al., 1999; Davis y Rakotonasolo, 2008; Avelino et al., 2018).

Las enfermedades más recurrentes del cultivo del café son la antracnosis, el ojo de gallo, mancha de hierro y principalmente la roya del café, ocasionadas por *Colletotrichum coffeanum*, *Mycena citricolor*, *Cercospora coffeicola* y *H. vastatrix* respectivamente (SAGARPA, 1993; Barrera, 2017; SENASICA, 2017; Avelino et al., 2018).

Debido a la susceptibilidad de *C. arabica* a enfermedades, se desarrollaron variedades que son resistentes o tolerantes a ellas; durante el desarrollo de estos cultivares se busca que tengan las características organolépticas de *C. arabica*, mayores rendimientos, así como una alta variabilidad genética que permita la búsqueda de genes que confieran resistencia a enfermedades (Anthony et al., 2011).

2.3. Variedades de café

En el mundo se cultivan múltiples variedades de café en diferentes países, sin embargo, las principales características que se requieren para establecerlas son alto rendimiento, calidad y resistencia a enfermedades, principalmente a la roya del café, es por ello que las variedades desarrolladas a lo largo del tiempo han sido de acuerdo a las características destacadas que se toman de sus progenies (Wintgens, 2004, Waller et al., 2007; Van der Vossen et al., 2015).

Las cruza resultantes tanto de la hibridación natural como las hechas por el hombre tan solo de *C. arabica* son alrededor de 200 variantes, de las cuales se derivan diferentes cualidades como rendimiento, calidad o resistencia a algunas enfermedades, en la figura 3 se pueden observar las variedades comerciales que derivan de las diferentes cruza, cabe señalar que las hibridaciones han sido

también entre las variedades de *C. arabica* y con las otras especies comerciales *C. canephora*, *C. liberica* y *C. mauritania* (Anthony et al., 2011; Zamarripa y Escamilla, 2016)

En México, las principales variedades de café comerciales son Blue Montani, Bourbón amarillo/rojo, Catimores, Catuaí amarillo/rojo, Caturra amarillo/rojo, Colombia BC, Colombia BV, Costa Rica 95, Garnica, Geisha, Maracatú, Magarogipe, Mundo Novo, Oro Azteca, Pacamara, Pluma Hidalgo, Typica y Typica Xanthocarpa, estas se encuentran depositadas en el banco de germoplasma perteneciente al Centro Regional Universitario de Oriente (Escamilla et al. 2016), sin embargo no todas las variedades enlistadas son resistentes a roya, algunas carecen de esta característica sin embargo la calidad del grano es mejor, el rendimiento varía desde bajo a un alto rendimiento, en el cuadro 1 se resumen algunas características de estas variedades.

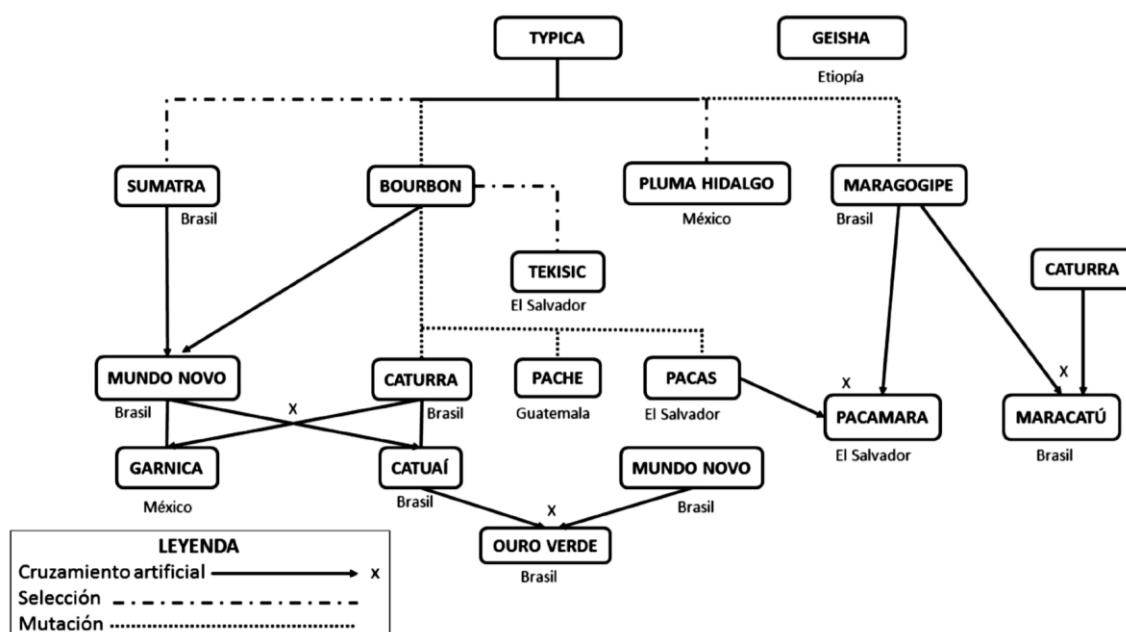


Figura 3. Líneas genéticas comerciales de café. Variedades de café obtenidas por cruces artificiales, mutaciones o selecciones que son susceptibles y resistentes a *Hemileia vastatrix*. Zamarripa, A. y Escamilla, E. 2016. Origen de las variedades comerciales de *Coffea arabica* L. Imagen recuperada de Variedades de café en México Origen, características y perspectivas.

Debido a la necesidad de obtener cultivares resistentes a la roya del cafeto, se han hecho estudios desde el siglo XIX en cuanto a la interacción planta –

patógeno, y se ha encontrado una relación entre genes de resistencia del hospedante y los genes de virulencia del patógeno, por lo que se sabe que los genes presentes en las variedades de *Coffea* van a variar según el linaje al que pertenezcan y por ende la resistencia que presenten. Se conocen nueve genes dominantes en el café, SH1, SH2, SH3, SH4, SH5, SH6, SH7, SH8 y SH9 y uno desconocido (?), distribuidos en los diferentes linajes, a los cuales se les atribuye resistencia a *H. vastatrix*, para el caso de *C. arabica* y sus variantes, los genes presentes que le dotan de resistencia son SH1, SH2, SH4 y SH5, sin embargo, solo presentan resistencia a ciertas razas del patógeno; los genes SH6, SH7, SH8 y SH9 se identificaron en *C. canephora* y el SH3 en *C. liberica* (Noronha-Wagner y Bettencourt, 1967; Bettencourt y Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt et al. 1980).

Derivado de estos estudios es que se conocen las cruzas naturales y se pueden llevar a campo las cruzas artificiales de las tres especies de café, además de que se han ido seleccionando las variedades de cada especie según sea la característica de importancia. Como se observa en la figura 4, estas cruzas dieron origen a las diferentes variedades, tal es el caso del Híbrido de Timor, el linaje ancestral de esta variedad encontrada en la isla de Timor es de un cruce natural entre *C. arabica* y *C. canephora*, el resultado de este evento fue la obtención de los genes SH5, SH6, SH7, SH8 y SH9, los cuales le proporcionan resistencia a la roya del café, además de otras enfermedades como la antracnosis, nematodos del nudo de la raíz y al tizón bacteriano ocasionado por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Chaves 1976; Hiroshi-Sera et al., 2007; Bertrand et al, 2008; Ito et al, 2008; Hindorf y Omondi , 2011; Rezende et al., 2013; Romero et al., 2014; Gichimu et al., 2014; Moreira-Sobreira et al., 2015).

Procedentes de esta cruce, las variedades resistentes que se utilizan en México son las enlistadas en el cuadro 1 y figura 4, de este grupo se destaca la variedad Oro Azteca, la cual deriva del Híbrido de Timor y Caturra Rojo, fue introducida en el país en 1981, primero de forma experimental para después introducirla en los cafetales de los estados productores de café tendiendo un comportamiento en campo de 37 % más rendimiento que su progenitor (Zamarripa y Escamilla,

2016). El objetivo de la introducción de esta variedad fue el de contrarrestar los efectos de la roya del café en México, debido a que fue en los años 80's cuando se publicaron los primeros reportes de la presencia del patógeno en el territorio cafetalero del país, la presencia del hongo tuvo como resultado en esos años una incidencia del 100 %, por lo que era necesario el uso de variedades resistentes (Mora-Aguilera et al., 2014; Zamarripa y Escamilla, 2016).

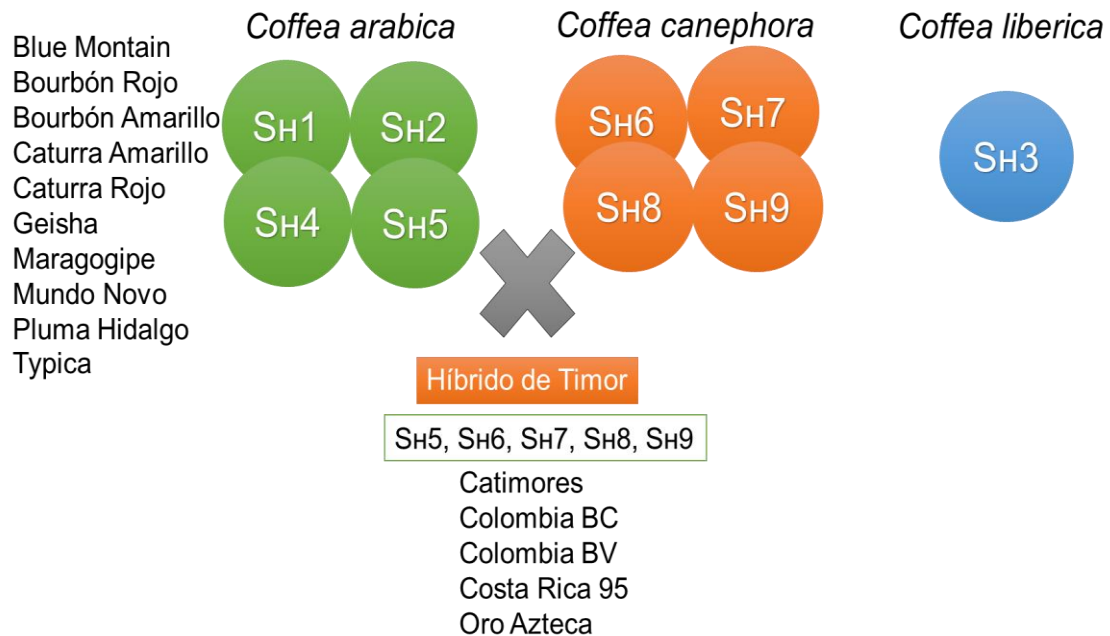


Figura 4. Genes de resistencia de Coffea. Genes de resistencia a *H. vastatrix* por linaje de especies comerciales de *Coffea*.

Cuadro 1. Principales variedades de café en México. Cualidades agronómicas de las variedades comerciales resistentes y susceptibles a la roya.

Genética	Variedad	Resistencia a roya	Resistencia a otros patógenos	Calidad	Rendimiento
Typica	Blue Montain	Susceptible	<i>Colletotrichum</i> sp.	Alta	Bajo
Typica	Bourbón Rojo	Susceptible	Susceptible	Media	Alto
Bourbón - Typica	Bourbón Amarillo	Susceptible	Susceptible	Alta	Medio
Híbrido de Timor - Caturra rojo	Catimores	Resistente	Variado	Variada	Variado
Mundo Novo - Caturra Amarillo	Catuaí Amarillo	Susceptible	Susceptible	Media	Medio
Mundo Novo - Caturra Rojo	Catuaí Rojo	Susceptible	Susceptible	Media	Medio
Bourbón	Caturra Amarillo	Susceptible	Susceptible	Media	Medio
Bourbón	Caturra Rojo	Susceptible	Susceptible	Media	Alto
Híbrido de Timor - Caturra	Colombia BC	Resistente	Susceptible	Baja	Alto
Híbrido de Timor - Caturra	Colombia BV	Resistente	Susceptible	Baja	Alto
Catimor	Costa Rica 95	Resistente	Susceptible	Baja	Alto
Mundo Novo 15 - Caturra Amarillo 13	Garnica	Susceptible	Susceptible	Alta	Variado
T2722	Geisha	Resistente a raza II	Susceptible	Excelente	Medio
Maragogipe - Caturra	Maracatú	Susceptible	Susceptible	Media	Medio
Typica	Maragogipe	Susceptible	Susceptible	Alta	Bajo
Bourbón - Typica	Mundo Novo	Susceptible	Susceptible	Media	Alto

Información de Escamilla et al., 2016; Zamarripa y Escamilla, 2016; World Coffee Research, 2018.

Continuación cuadro 1.

Genética	Variedad	Resistencia a roya	Resistencia a otros patógenos	Calidad	Rendimiento
Hibrido de Timor - Caturra Rojo	Oro Azteca	Resistente	Susceptible	Media	Alto
Pacas - Maragogipe	Pacamara	Susceptible	Susceptible	Excelente	Medio
Typica	Pluma Hidalgo	Susceptible	Susceptible	Alta	Alto
Typica	Typica	Susceptible	Susceptible	Alta	Bajo

Información de Escamilla et al., 2016; Zamarripa y Escamilla, 2016; World Coffee Research, 2018.

2.4. Roya del café: *Hemileia vastatrix*

Los cultivos de café a nivel mundial tienen diferencias en el manejo agronómico, la productividad o la calidad del producto final, sin embargo tienen en común las plagas que se presentan en menor o mayor medida, de éstas, la que mayor pérdidas al cultivo causa es la roya del café ocasionada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Avelino et al., 2018), esta condición fue descrita por vez primera en 1869 en Sri Lanka, sitio donde ocasiono devastación en las plantaciones de café de aquel país y debido a que el café se fue dispersando por todo el mundo, la enfermedad se fue presentando paulatinamente (Ward, 1882; Waller et al., 2007). Los síntomas característicos de la enfermedad son pequeñas manchas amarillas cloróticas de aproximadamente dos a tres milímetros de diámetro inicialmente, y con el tiempo aparecerán esporas que se asemejan a un polvo naranja, estas se conocen como pústulas y se encuentran en el envés de las hojas subsecuentemente las lesiones se tornaran necróticas y el follaje caerá (Figura 5), teniendo un impacto negativo en el proceso de fotosíntesis y por ende en la reducción del rendimiento del cafeto (Agrios. 2005; Waller et al., 2007).

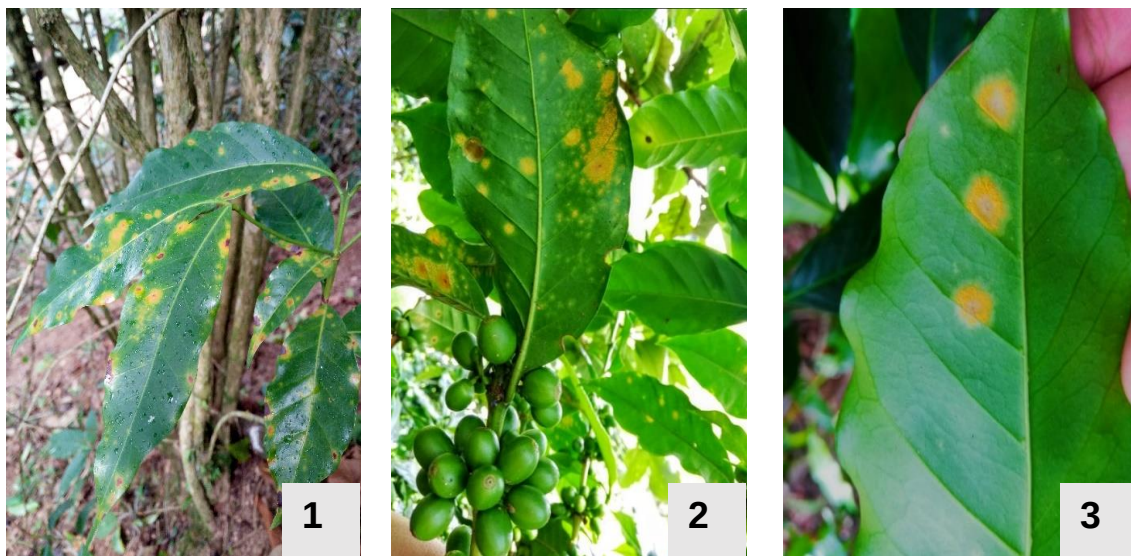


Figura 5. Síntomas de roya en café. Manchas amarillas en el envés de las hojas (1) y pústulas color naranja/amarillo (2 y 3) ocasionadas por *H. vastatrix*.

El ciclo biológico de este patógeno se lleva a cabo bajo condiciones de humedad, es decir durante la época de lluvias, las gotas que salpican durante esta

temporada favorecen la dispersión del patógeno, la temperatura idónea para la infección oscila de 21 a 25 °C, así como un periodo de oscuridad o baja luminosidad (SENASICA, 2019; Avelino et al., 2018). El proceso para que el hongo comience a infectar consiste en la formación de apresorios (hifas) que entran a través de los estomas de la planta, una vez ahí se forman unas estructuras llamadas haustorios, siendo estos los encargados de proporcionar al hongo nutrientes que obtienen de las células del hospedante, posteriormente el hongo inicia la producción de uredosporas que van emergiendo a través de los estomas, las uredosporas se van aglomerando hasta formar soros, dando como resultado el polvo naranja característico de la enfermedad (Agrios. 2005; Waller et al., 2007; SENASICA, 2019).

De acuerdo con los estudios antes mencionados, se conoce que *H. vastatrix* ha coevolucionado con su hospedante y provoca daños en todas las especies del género *Coffea*, siendo *C. arabica* la más susceptible (Waller et al., 2007).

2.4.1. Variabilidad genética del hongo.

Dentro del género *Hemileia* se han descrito cerca de 40 especies, de las cuales 16 especies causan daños en la familia de las rubiáceas, se ha deducido que el género coevolucionó con este grupo de plantas; con base a lo anterior se considera que *Hemileia vastatrix* fue evolucionando como patógeno de las especies de *Coffea* sp; debido a que el centro de origen del café se registró en África, este también pudo ser el del hongo, a su vez también se presentaron diferentes razas fisiológicas con patogenicidad diferencial hacia los linajes de *Coffea* sp (Waller, 1972).

De las diferentes razas identificadas, la raza II es la de mayor distribución y la que mayor daños causa en la especie *C. arabica* y en todas las variedades que de ella derivan (como se observa en la figura 5, el gen presente en este linaje es el SH5 análogo al gen de virulencia V5 del hongo), aunado a ello tiene una alta especialización y gran variabilidad genética que ha sido descrita a nivel mundial (Solano, 1996; Várzea y Marques 2005; Talhinhos et al., 2017).

La variabilidad genética entre las poblaciones del patógeno que han sido identificadas como razas fisiológicas indica una combinación de genes de

virulencia que participan en la especialización para cada hospedante, para el caso de *H. vastatrix* se han identificado alrededor de 50 razas fisiológicas en hospedantes diferenciales (Talhinhas et al., 2017; Bhat et al., 2013). Se ha reportado que la tasa de generación de nuevas razas está relacionada con la generación de nuevas variedades de café, debido a que el patógeno tiene la capacidad de romper la resistencia de esas variedades (Alvarado y Moreno, 2005).

De acuerdo con la teoría gen a gen (Flor, 1971) lo anterior se cumple en las poblaciones de *H. vastatrix*, debido a que se tiene gen de resistencia en el hospedante al que le corresponde un gen de virulencia del patógeno, sin embargo, el grado de especialización de *H. vastatrix* no solo se puede deber a las razas fisiológicas del patógeno sino también a un polimorfismo en sus poblaciones, Cabral et al., (2016) encontraron que en diferentes sitios de muestreo en Brasil, la especialización del patógeno se debía a un polimorfismo en las poblaciones de cada zona.

Las razas fisiológicas se han descrito en la mayoría de los patógenos que atacan a los cultivos, por lo que se sabe que este mecanismo de especialización les confiere una alta variabilidad genética, una raza fisiológica se puede definir como aquellas variaciones de una cepa y que tiene la capacidad de infectar a una o ciertas variedades específicas en una planta (Agrios, 2005), en el caso de *H. vastatrix* se han descrito 50 razas fisiológicas, sin embargo, se ha reportado la existencia de más razas desconocidas, esto debido a que *Coffea* sp., presenta por lo menos 10 genes de resistencia vertical y a la rápida especialización del patógeno a las variedades que se han ido desarrollando (Solano, 1996; Várzea y Marques, 2005).

Debido a lo anterior se desarrolló una nomenclatura que identificara a las razas presentes en los diferentes patosistemas, por lo que se han identificados con números romanos (I, II, III, etcétera) y se han reportado las razas nuevas bajo este esquema (Rodrigues Jr. et al., 1975; Rodrigues Jr. et al., 1993; Várzea y Marques, 2005). Por otro lado Solano (1996) reportó una nomenclatura en base a un sistema binomial y calcula el número de patotipos presentes en poblaciones

de *H. vastatrix*, los cuales serían análogos a las razas fisiológicas del patógeno, bajo esta metodología se puede inferir que el comportamiento de la especialización del hongo cumple la relación gen por gen, este recurso contribuye con la descripción de las poblaciones distribuidas en los patosistemas de *Coffea* sp.

2.5. Estudios moleculares en *Hemileia vastatrix*

Los estudios moleculares en las últimas décadas han contribuido a la comprensión a nivel genético de campos como sistemática, biología de la conservación y en específico de la genética a nivel poblacional, lo que ha permitido determinar la estructura genética de las poblaciones de casi todos los organismos (Fetzner Jr y Crandall, 2001).

En torno a este enfoque se han hecho investigaciones relacionadas con la genética de poblaciones en organismos patógenos de plantas, por lo que *H. vastatrix* no ha sido la excepción, desde los estudios de sistemática hasta los más específicos como variaciones genéticas, identificación de razas patogénicas, mecanismos de interacción planta – patógeno como proteínas, etcétera (Gouveia et al., 2005; Herrera et al., 2009; Carvalho et al., 2011; Santana et al., 2018).

Los estudios que más se han implementado en este hongo son de identificación molecular, por lo que se ha utilizado la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR por sus siglas en inglés, la cual mediante una serie de reactivos permite amplificar una región de ADN de interés (Velázquez et al., 2014; Maddocks y Jenkins, 2017). La región que se utiliza para la identificación de hongos son conocidas como *Internal transcribed spacer* (ITS) las cuales se consideran universales para este grupo de organismos, y en el caso de la roya del café se han utilizado principalmente los ITS 1 y 4 (Schoch et al., 2012; Santana et al., 2018).

Por otro lado, estudios más específicos se han implementado en las poblaciones *H. vastatrix*, ejemplo de ello, son los marcadores moleculares como SRAP, AFLP, microsatélites (Kosaraju et al., 2017; Herrera et al., 2009). Además de estas metodologías se pueden derivar análisis estadísticos como redes de haplotipos que determinan variaciones genéticas a nivel poblacional o el uso de enzimas de

restricción, estas últimas permiten diferenciar visualmente y estadísticamente las poblaciones de organismos (Quispe-Apaza et al., 2017). El mecanismo de las enzimas o endonucleasas de restricción se da mediante la unión a sitios específicos en este caso a un patrón de secuencia específico de ADN en donde realizan un corte, para el caso de *H. vastatrix* se han utilizado las enzimas EcoRI, MseI para realizar análisis de diversidad genética (González y Bueno, 2013; Cabral et al., 2016; Quispe-Apaza et al., 2017; Villanueva, 2018).

3. LITERATURA CITADA.

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. San Diego, USA: Academic Press.
- Alvarado, A. G., y Moreno, R. L. G. (2005). Cambio de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de Caturra X Híbrido de Timor. *Cenicafé*, 56 (2), 110 - 126.
- Anthony, F., Bertrand, B., Etienne, H., and Lashermes, P. (2011). *Coffea* and *Psilanthus*. In Kole, C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Plantation and Ornamental Crops* (pp. 41 - 60). Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Avelino, J., Allinne, C., Cerda, R., Willocquet, L., and Savary, S. (2018). Multiple-Disease System in Coffee: From Crop Loss Assessment to Sustainable Management. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 611 - 35.
- Barrera, J.F. (2017). Principales plagas y enfermedades del café en México. *Claridades Agropecuarias*, 280, 1-21.
- Bertrand, B., Anthony, F., and Lashermes, P. (2008) Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. *Plant Pathology*, 50 (5), 637-643.
- Bettencourt, A. J., and Noronha-Wagner, M. (1971). Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk and Br. *Agronomia Lusitana*, 31, 285-292.
- Bettencourt, A. J., Noronha-Wagner, M., and Lopes, M. (1980). Factor genético que condiciona a resistencia do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. and Br. *Brotéria Genética*, 76 (1), 53 - 58.
- Bhat, S. S., Hanumantha, B. T., Sounnderrajan, S., Barman, B., Varzea, B. M. P., and Jayarama (2013). Characterization of virulent rust races of *Hemileia vastatrix* from traditional coffee regions of south India. *Journal of coffee Research*, 41, 61 - 74.
- Cabral, P. G. C., Maciel-Zambolim, E., Oliveira, S. A. S., Caixeta, E. T., and Zambolim, L. (2016). Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*, 65: 196–204.
- Carvalho, C. R., Fernandes, R. C., Almeida, C. G., Barreto, R. W., and Evans, H. C. (2011). Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE* 6(11), e26387.

- Carvalho, G. M. A., Carvalho, C. R., Barreto, R. W., and Evans, H. C. (2014). Coffee rust genome measured using flow cytometry: does size matter?. *Plant Pathology*, 63, 1022–1026.
- Castro-Caicedo, B., Cortina-Guerrero, H., Roux, J., and Wingfield, M. J. (2013). New coffee (*Coffea arabica*) genotypes derived from *Coffea canephora* exhibiting high levels of resistance to leaf rust and *Ceratocystis canker*. *Tropical Plant Pathology*, 38 (6), 485 - 494.
- Chaves, G. M. (1976). Melhoramento do cafeeiro visando à obtenção de cultivares resistentes à *Hemileia vastatrix* Berk et Br. *Revista Ceres*, 23, 321-332.
- Cressy, D. (2013). Coffee rust regains foothold. Researchers marshal technology in bid to thwart fungal outbreak in Central America. *Nature*, 493, 587.
- Clifford, M. N., y Willson, K. C (Eds.). (1985). *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*. Westport, Connecticut, US: THE AVI PUBLISHING COMPANY, INC.
- Davis, A. P., and Rakotonasolo, F. (2008) A taxonomic revision of the baracoffea alliance: nine remarkable *Coffea* species from western Madagascar. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158, 355 - 390.
- Ejea-Mendoza, M. (2009). Café y cultura productiva en una región de Veracruz. *Nueva Antropología*, 70 (22), 33 – 56.
- Escamilla, P. E., Barrera, N. M., y Cornejo, C. C. (2016). *Variedades comerciales de café: Una guía descriptiva*. Veracruz, México: CENACAFE.
- FAOSTAT. (2020). Datos: Producción – Cantidad de café verde a nivel mundial. Recuperado el 1 de abril de 2020 de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Fetzner Jr, W. J., and Crandall, A. K. (2001). Genetic Variation. In Holdich, D. M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish* (pp. 291 – 326): Nottingham, UK: Blackwell Science.
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275 - 296.
- Flores, V. E. (2015). La producción de café en México: Ventana de oportunidad para el sector agrícola del estado de Chiapas. *Revista Digital de la Universidad Autónoma de Chiapas*, 4 (7), 175 - 0194.
- Gichimu, B. M., Gicheru, E. K., Mamati, G. E., and Nyende, A. B. (2014). Variation and association of cup quality attributes and resistance to Coffee Berry Disease in *Coffea arabica* L. composite cultivar, Ruiru 11. *Afr. J. Hortic. Sci.*, 7, 22-35.
- González, C. J., y Bueno, T. M. (2013). Enzimas de restricción. En Salazar, M. A., Sandoval, R. A., y Armendáriz, B. J. (Ed.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (pp. 120 - 126). Ciudad de México, México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.
- Gouveia, M., Ribeiro, A., Várzea, V., and Rodrigues Jr, C. (2005). Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia*, 97(2), 396 - 404.
- Hernández-Solabac, J.M., Nava-Tablada, M., Díaz-Cárdenas, S., Pérez-Portilla, E., and Escamilla-Prado, E. (2011). Migración internacional y manejo

- tecnológico del café en dos comunidades del centro de Veracruz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 807 - 818.
- Herrera, P. J., Alvarado, A. G., Cortina, G. H., Combes, M., Romero, G., and 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, 57 - 67.
- Hindorf, H., and Omondi, C.O. (2011). A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of Advanced Research*. 2(2), 109 - 120.
- Hiroshi-Sera, G., Sera, T., Shiguer-Ito, D., Alves de Azevedo, J., Siqueira da Mata, J., Saori-Dói, D., Ribeiro-Filho, C., and Seidi-Kanayama, F. (2007). Resistance to Leaf Rust in Coffee Carrying Sh3 Gene and others Sh Genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50 (5), 753 - 757.
- INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2013). *CAFETICULTURA EN LA ZONA CENTRO DEL ESTADO DE VERACRUZ Diagnóstico, productividad y servicios ambientales*. Medellín de Bravo, Ver., México: INIFAP.
- Ito, D. S., Sera, T., Hiroshi-Sera, G., Del Grossi, L., and Seidi-Kanayama, F. (2008). Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8, 99 - 103.
- Kosaraju, B., Sannasi, S., Mishra, M. K., Subramani, D., and Bychappa, M. (2017). Assessment of genetic diversity of coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* using SRAP markers. *Journal of Phytopathology*, 165, 486 - 493.
- Lashermes, P., Combres, M. C., Robert, J., Trouslot, P., D'Hont, A., Anthony, F., and Charrier, A. (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet*, 261, 259 - 266.
- Lécolier, A., Besse, P., Charrier, A., Tchakalo, T., and Noirot, M. (2009). Unraveling the origin of *Coffea arabica* "Bourbon pointu" from La Réunion: a historical and scientific perspective. *Euphytica*, 168, 1 - 10.
- López-García, F. J., Escamilla-Prado, E., Zamarripa-Colmenero, A., y Cruz-Castillo, G. (2016). Producción y calidad de variedades de café (*Coffea arabica* L.) en Veracruz, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 39 (3), 297 - 304.
- Louarn, J. (1972). Introduction à l'étude génétique des MascarocoVea: nouvelles déterminations de leurs nombres chromosomiques. *Cafe, Cacao, Thé (Paris)*, 16, 312–316.
- Maddocks, S., and Jenkins, R. (2017). *Understanding PCR A Practical Bench-Top Guide*. London, United Kingdom: Elsevier Inc.
- Moguel, P., y Toledo, V. M. (1996). El café en México, ecología, cultura indígena y sustentabilidad. *Ciencias*, 43, 40 - 51.
- Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Calderón-Estrada, G., Flores-Sánchez, J., Domínguez-Monge, S., Baker, P., y González-Gómez, R. (2013). Influencia del Cambio Climático en la Fitosanidad Tropical. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31, S46 - S56.
- Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sanchez, G., Calderon-Estrada, G., Flores-Sanchez, J., Dominguez-Monje, S., Baker, P., y Gonzalez-Gomez, R. (2014).

- Influencia del Cambio Climático en la Fitosanidad Tropical. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, 147-167.
- Moreira-Sobreira, F., Baião de Oliveira, A., Alves-Pereira, A., and Sussumu-Sakyama, N. (2015). Potential of Híbrido de Timor germplasm and its derived progenies for coffee quality improvement. *Australian Journal of Crop Science*, 9 (4), 289 – 295.
- NOM-019-FITO-1995. Diario Oficial de la Federación: NORMA Oficial Mexicana. Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del café. México, D.F., a 11 de noviembre de 1996.
- Noronha-Wagner, M., and Bettencourt, A. J. (1967). Genetic study of the resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. *Canadian Journal of Botany*, 45, 2021 - 2031.
- Nunes, C. C., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Brommonschenkel, S. H., and Silva, J. C. (2009). Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, 38, 445 - 452.
- Pay, E. (2009). *The market for organic and fair-trade coffee*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization.
- Pelayo-Sánchez, G., Yáñez-Morales, H., Rojas, S., Solano-Vidal, R., Sergio Sandoval, I., y Alvarado-Rosales, D. (2016). Análisis de las uredosporas de la roya del cafeto. XVIII CONGRESO INTERNACIONAL Y XLIII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34, S3 - S4.
- Quezada, P. J. (2010). El café orgánico, una ventaja competitiva para los productores cafetaleros del estado de Veracruz. *Investigación Administrativa*, 15, 23 - 39.
- Quispe-Apaza, C., Mansilla-Samaniego, R., López-Bonilla, C., Espejo-Joya, R., Villanueva-Caceda, J., y Monzón, C. (2017). Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (3), 418 - 436.
- Rezende, R. M., Salgado, S. M. L., Rezende, J. C., Carvalho, G.R., Pereira, A.A., Lima, R. R., and Ferreira, A. D. (2013) Resistance of *Coffea arabica* progenies in field conditions infested by *Meloidogyne exigua*. *Nematropica*, 43, 233 - 240.
- Rivillas, C., Serna, C., Cristancho, M., y Gaitán, A. (2011). *La roya del cafeto en Colombia: Impacto, manejo y costos del control*. Chinchiná-Caldas, Colombia: FNC - CENICAFE.
- Rodrigues Jr., C. J., Bettencourt, A. J., and Rijo, L. (1975). Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annu. Rev. Phytopathol*, 13, 49 - 70.
- Rodrigues Jr. et al., 1993. In: Colloque Scientific International Sur le Café 15. Montpellier, Francia. Pp. 318-321.
- Romero, G., Vásquez, L. M., Lashermes, P., and 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.

- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (1993). *Enfermedades del cafeto y su control en México. Folleto Técnico No. 4*. Veracruz, México: SARH.
- Santana, M. F., Zambolim, E. M., Caixeta, E. T., and Zambolim, L. (2018). Population genetic structure of the coffee pathogen *Hemileia vastatrix* in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43 (5), 473 - 476.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, A. A., Chen, W., and Barcoding, C. F. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109 (16), 6241 - 6246.
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.. (2017). *Situación epidemiológica de la roya del cafeto y otros riesgos fitosanitarios asociados al cultivo del café en las 11 entidades productoras. Informe Epidemiológico del Cafeto, N° 49*. México, DF. SAGARPA.
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2019). *Roya del cafeto, Ficha Técnica No. 40*. Ciudad de México, México: SENASICA.
- Serrato-Díaz, A., Y Ramos-Ortiz, S. (2014). AFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados. En Cornejo, R. A., Serrato-Díaz, A., Rendín, A. B., y Rocha, M. M. (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 127 - 147). Ciudad de México, México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). *Atlas Agroalimentario*. Ciudad de México, México: SIAP.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). *Panorama Agroalimentario*. Ciudad de México, México: SIAP.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2020). Plataformas de información. Recuperado el 1 de abril de 2020 de <http://www.cenacafe.org.mx/plataformas.html>.
- Solano, V. R. (1996). Análisis del valor de la resistencia vertical en el control de la roya (*Hemileia vastatrix* NERK. Y BR.) del cafeto en México (Tesis doctoral). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Sosa, M. L., Escamilla, P. E., and Díaz, C. S. (2004). Organic Coffee. In Wintgens, J. N. (Ed.), *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production: A Guidebook for Growers, Processors, Traders, and Researchers* (pp. 339 - 354). Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V. and Silva, M. d. C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18, 1039 - 1051.
- Van der Vossen, H., Bertrand, B., and Charrier, A. (2015). Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. *Euphytica*, 204 (2), 243 - 256.
- Várzea, V. M. P., and Marques, D. V. (2005). Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim, L., Zambolim, E.,

- Várzea, V. M. P. (Eds.). *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa (pp. 53 - 74). Viçosa, Brasil: UFV.
- Velázquez, A. L., Aragón, M. M., y Cornejo, R. A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A. B., y Rocha, M. M. (Eds.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-27). Ciudad de México, México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Villanueva, C. J. (2018). Análisis de la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de Quillabamba mediante secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Waller, J. M. (1972). Coffee Rust in Latin America. *PANS Pest Articles & News Summaries*, 18(4), 402 - 408.
- Waller, J.M., Bigger, M., and Hillocks, R. J. (2007). *Coffee pests, diseases and their management*. London, UK: CAB International.
- Ward, H. M. (1882). Researches on the Life-history of *Hemileia vastatrix*, the Fungus of the "Coffee-leaf Disease." *Journal of the Linnean Society of London Botany*, 19 (121), 299 - 335.
- Wintgens, J. N. (Ed.). (2004). *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production: A Guidebook for Growers, Processors, Traders, and Researchers*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- World Coffee Research. (2018). *Arabica coffee varieties*. Portland, United States: World Coffee Research.
- Zamarripa, C. A., y Escamilla, P. E. (2016). *Variedades de café en México: Origen, características y perspectivas*. Veracruz, México: CENACAFE.

CAPITULO 3. VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix* (BERK. & BR.) EN ZONAS CAFETALERAS DE VERACRUZ, MÉXICO

Resumen

Las exportaciones de café en México representan junto a las de Centro América la tercera parte de la producción mundial, las especies que más se siembran son *Coffea arabica* y *C. canephora*. La principal plaga que afecta al cultivo, es *Hemileia vastatrix*, la especialización de este patógeno se debe a la gran variabilidad genética que presenta, logrando romper las barreras de la resistencia que ciertas variedades comerciales de *Coffea* sp. presentan. Por lo que es necesario conocer si existe variabilidad genética en países donde no se han reportado nuevas razas. El objetivo de esta investigación fue determinar la posible variabilidad genética de *Hemileia vastatrix* en variedades de café en el estado de Veracruz, México. Mediante la amplificación de las regiones ITSs, sometidos a análisis filogenéticos y de haplotipos, los resultados mostraron evidencia de variabilidad genética, el dendograma presentó seis clústeres entre las secuencias de ADN del hongo presente en las variedades Bourbon Amarillo/Rojo, Catuai, Geisha, Oro Azteca, Typica y colectas de campo, así como secuencias de Brasil, Colombia y México, se observa similitud entre las secuencias de las razas II y XXII con la secuencia de la variedad Garnica; las secuencias del resto de las variedades y colectas de campo son agrupadas en otros clados, lo anterior aunado a los genes de resistencia presentes en Oro Azteca y Geisha podría indicar la presencia de otras razas diferentes a la II; además se presentaron doce haplotipos entre secuencias del patógeno en Veracruz, el análisis expresó un grado de diversidad alta 0.978 y una diversidad nucleotídica de 0.049, lo que significa que las poblaciones del hongo son diferentes entre cada colecta. Las endonucleasas MscI y KpnI no mostraron sitios de corte, mientras que la EcoRI presenta un sitio de corte, sin embargo con estas enzimas no se logró evidenciar diferencias visuales entre las poblaciones del patógeno cada variedad y plantaciones de campo.

Palabras clave: Variedades, secuencias de ADN, filogenia, resistencia y endonucleasas.

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Elena Selik Pérez Viveros.
Director de Tesis: Marcelo Acosta Ramos.

CHAPTER 3. GENETIC VARIABILITY OF *Hemileia vastatrix* (BERK. & BR.) IN COFFEE ZONES OF VERACRUZ, MEXICO

Abstract

Coffee exports in Mexico represent, along with those of Central America, a third of world production, the most widely planted species are *Coffea arabica* and *C. canephora*. The main pest that affects the crop is *Hemileia vastatrix*, the specialization of this pathogen is due to the great genetic variability it presents, managing to break the resistance barriers that certain commercial varieties of *Coffea* sp. present. Therefore, it is necessary to know if there is genetic variability in countries where any new breeds have been reported. The objective of this research is to determine the possible genetic variability of *Hemileia vastatrix* in coffee varieties in the state of Veracruz, Mexico. Through the amplification of the ITSs regions, subjected to phylogenetic and haplotype analyzes, the results showed evidence of genetic variability, the dendrogram showed six clusters between the DNA sequences of the fungus present in the Bourbon Yellow / Red, Catuai, Geisha, Gold varieties Azteca, Typica and field collections, as well as sequences from Brazil, Colombia and Mexico, there is a similarity between the sequences of races II and XXII with the sequence of the Garnica variety; the sequences of the rest of the varieties and field collections are grouped into other clades, the above added to the resistance genes present in Oro Azteca and Geisha could indicate the presence of other different races from race II; In addition, twelve haplotypes were presented between pathogen sequences in Veracruz, the analysis expressed a high degree of diversity of 0.978 and a nucleotide diversity of 0.049, which means that, the populations of the fungus are different between each collection. The endonucleases *MscI* and *KpnI* did not show cut sites, while the *EcoRI* presented a cut site, however with these enzymes it was not possible to show visual differences between the populations of the pathogen for each variety and field plantations. Key words: Varieties, DNA sequences, phylogeny, resistance and endonucleases.

Key words: Varieties, DNA sequences, phylogeny, resistance and endonucleases.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Elena Selik Pérez Viveros.
Advisor: Marcelo Acosta Ramos.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, durante el ciclo 2018/2019 se tuvo una producción de café de 170 millones de sacos (60 kg), Brasil es el principal país productor y exportador, Vietnam ocupa el segundo lugar, Centro América y México el tercero, seguidos de Colombia e Indonesia (USDA, 2019). *Coffea arabica* y *C. canephora*, son las especies que mayoritariamente se cultivan en el mundo (Waller et al., 2007). La roya del café es la principal enfermedad que condiciona la producción cada cosecha, *Hemileia vastatrix*, es un hongo biotrófico, agente causal de esta enfermedad (Kosaraju et al., 2017). Aunque existen cultivares resistentes a la enfermedad, estos se vuelven susceptibles a causa de la gran diversidad genética que presenta el patógeno (Várzea y Marques, 2005). A pesar de la importancia de la variabilidad genética en las poblaciones de *H. vastatrix*, el conocimiento acerca de la diversidad en las diferentes variedades de café, aislamientos o sitios geográficos es limitado (Cabral et al., 2016).

Las plantas diferenciales de café se utilizan para identificar las razas del patógeno, sin embargo este tipo de estudios requieren demasiado tiempo (Kosaraju et al., 2017). Los análisis moleculares son una alternativa a los procedimientos tradicionales de identificación del hongo, así como estudios más específicos de diversidad genética (Gautam, et al., 2016; Garfinkel et al., 2019; Hamouda, 2019); ejemplo de ello son análisis filogenéticos y de haplotipos, implementando secuencias de ADN, los cuales permiten agrupar secuencias obtenidas de diferentes organismos o sitios (Yang y Rannala, 2012; Aragón-Magadán, 2019).

El uso de espaciadores transcritos internos (ITS: Internal transcribed spacer) en análisis filogenéticos, así como en redes de haplotipos para el estudio de análisis de diversidad genética se han utilizado en *H. vastatrix* (Cristancho et al., 2007; Santana et al., 2007; Quispe-Apaza et al., 2017; Santana et al., 2018), además este tipo de estudios se pueden combinar con el uso de enzimas de restricción para un análisis más discriminativo y confiable ya que solo reconocen secuencias específicas en el ADN de un organismo (Ewens et al., 1981; Moysés y Almeida-

Toledo, 2002; González y Bueno, 2013), lo que favorece el estudio del patógeno a mayor escala y menor tiempo, es por ello que los objetivos de este estudio fueron determinar si existe variabilidad genética en poblaciones *H. vastatrix* presentes en cultivos de café y de seis variedades de un banco de germoplasma, así como utilizar enzimas de restricción para visualizar diferencias entre las poblaciones de cada colecta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La zona de estudio se ubicó en el estado de Veracruz, en la zona perteneciente a los municipios de Coatepec, Huatusco, Teocelo y Xico, así como en el banco de germoplasma del Centro Regional Universitario Oriente (CRUO) ubicando también en esa región (Figura 6). El CRUO tiene introducciones de café de diferentes variedades resistentes y susceptibles a la roya del café y se encuentran establecidas en lotes bien diferenciados. La colecta de las muestras se realizó en dos etapas, la primera durante el periodo septiembre – octubre de 2019, la cual correspondió a la fase de campo para tener hojas infectadas por *H. vastatrix* y la otra en laboratorio para la recolección de uredosporas durante el mismo periodo.

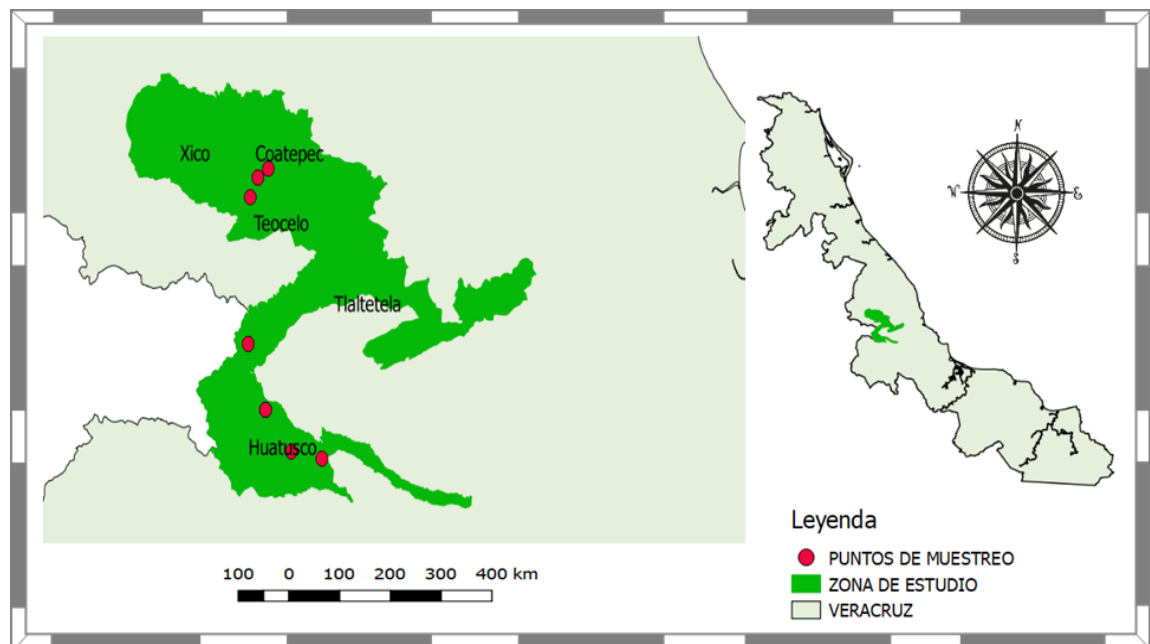


Figura 6. Sitio de estudio. Mapa de los municipios muestreados, el Centro de germoplasma CRUO se ubica en el municipio de Huatusco.

2.1. Etapa de campo

La colecta de hojas se inició en el banco de germoplasma del CRUO, estas parcelas no tenían historial de aplicación de fungicidas para ese ciclo productivo, los muestreos se realizaron de forma dirigida en cafetos de las variedades Bourbon rojo, Catuaí, Garnica, Geisha, Oro azteca y Typica, con hojas infectadas de roya, los síntomas presentes en las hojas fueron pústulas de color amarillo o anaranjado, descartando las hojas infectadas con presencia de hiperparásitos. El total de hojas recolectadas fueron 50 por variedad y fueron colocadas en bolsas de plástico herméticas y etiquetadas con los campos: origen y nombre de la variedad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentrado de muestras. Etiquetas utilizadas para identificar las muestras en campo y laboratorio clasificadas de acuerdo al sitio de colecta.

Origen	Coordenadas	Nombre	Código	Etiqueta
CRUO	LT: 19° 10' 35.353" N LG: 96° 57' 45.794 O	Typica	Ty	Ty
CRUO	LT: 19° 10' 35.353" N LG: 96° 57' 45.794 O	Geisha	GH	GH
CRUO	LT: 19° 10' 35.353" N LG: 96° 57' 45.794 O	Bourbon rojo	Br	Br
CRUO	LT: 19° 10' 35.353" N LG: 96° 57' 45.794 O	Catuai 20	Ct20	27
CRUO	LT: 19° 10' 35.353" N LG: 96° 57' 45.794 O	Garnica 20	Gr20	26
CRUO	LT: 19° 10' 35.353" N LG: 96° 57' 45.794 O	Bourbon Amarillo 20	Ba20_a_b	20
CRUO	LT: 19° 10' 35.353" N LG: 96° 57' 45.794 O	Oro Azteca	Oa20_H1_H2	5
CAMPO	LT: 19° 7' 56.76" N LG: 96° 55' 40.56" O	Sabana-Typica- Huatusco - 20 SEP 19	SaTH20	33
CAMPO	LT: 19° 24' 04.08" N LG: 96° 59' 0.6" O	Lote 6-Teocelo	LgT21_N	30
CAMPO	LT: 19° 14' 45.18" N LG: 96° 59' 12.66" O	Typica Huguapa	HgT21_a_b	28

Continuación. Cuadro 2.

Origen	Coordenadas	Nombre	Código	Etiqueta
CAMPO	LT: 19° 14' 45.18" N LG: 96° 59' 12.66" O	Huguapa - Bourbon - 21 SEP 2019	HgBr21_a_b	12
CAMPO	LT: 19° 25' 19.80" N LG: 96° 58' 22.14" O	Variedad 2 - Lote 5 - 21 SEP 2019	Va2L521_a	11
CAMPO	LT: 19° 07' 29.58" N LG: 96° 53' 11.52" O	Ocote Lote 3 - 21 SEP 2019	OcL321_a_b	9
CAMPO	LT: 19° 25' 52.68" N LG: 96° 57' 34.02" O	VARIEDAD A - 21 SEP 19 -Lote 4	A21L4_a_b	7
CAMPO	LT: 19° 25' 19.80" N LG: 96° 58' 22.14" O	Variedad 1- Lote 5- 21 SEP 2019	Va1L521_a_b	1

Posteriormente se realizó un muestreo en la zona Coatepec – Huatusco en parcelas establecidas por productores, debido a que en estos sitios es difícil diferenciar por variedades las etiquetas tuvieron los siguientes campos: origen, coordenadas geográficas y nombre (posible variedad). Los datos de identificación fueron ordenadas en base a las características antes mencionadas y a la forma en que serían a ser identificadas en laboratorio (Cuadro 2). Una vez conjuntadas todas las muestras fueron almacenadas bajo refrigeración a temperatura estándar ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) del equipo en los laboratorios pertenecientes al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

2.2. Etapa de laboratorio

Se procedió a la colecta de esporas de *H. vastatrix*, para este proceso se seleccionaron hojas que tuvieran pústulas libres de basura, hiperparásitos o cualquier insecto, para lo cual se utilizó un estereoscopio marca OLYMPUS; con ayuda de cápsulas de plástico se realizó un barrido en la superficie de las pústulas, colectando las uredosporas del hongo para colocarlas en un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente etiquetado (Figura 7).

2.2.1. Extracción de ADN

Las esporas colectadas en los tubos se procesaron mediante el protocolo Dellaporta Mini (Dellaporta y Hicks, 1983) con modificaciones, el cual también ha

sido utilizado para extracción de DNA en hongos (Laurentin y Martínez-Hilders, 2012). La extracción de ADN se realizó de la siguiente manera:

1. En los tubos eppendorf se adicionó 1 mL de buffer de lisis (urea 3M; NaCl 0.35 M; tris 0.05 M; EDTA 0.02 M y 1% sarcosina), y se dejaron en reposo durante 10 minutos, los tubos se colocaron en un ultracongelador a una temperatura de -70 °C por 12 horas.
2. Las muestras fueron colocadas a temperatura ambiente y se agitaron con ayuda de un Vortex durante un minuto. Posteriormente fueron colocadas a centrifugación a una velocidad de 12 000 rpm por 1 minuto.
3. El sobrenadante fue colocado en un tubo nuevo y se adicionaron 500 µL de fenol cloroformo (12:4), se mezclaron ejerciendo cinco vueltas de campana. Se aplicó otra centrifugación a la misma velocidad durante tres minutos.
4. Se agregaron 2 µL de ARNasa para eliminar moléculas de ARN en las muestras y se incubaron a 37 °C por 20 minutos, posteriormente se colocaron en la centrifugadora a 12 000 revoluciones durante cinco minutos.
5. El contenido del tubo se dividió en tres fases, la fase acuosa fue recuperada y se colocó en un tubo nuevo al que se le agregaron 200 µL de cloroformo y se centrifugó por 20 minutos.
6. Los ácidos nucleicos fueron recuperados a un tubo nuevo y precipitados con 500 µL isopropanol y 50 µL de acetato de sodio (10 M) e incubados por 20 minutos en frío.
7. Al término del periodo las muestras se volvieron a centrifugar durante 15 minutos a 12 000 rpm; al sacar las muestras se observó en algunas muestras una pastilla (ADN). El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente.
8. La pastilla fue lavada con 50 µL de etanol al 70 % y se centrifugó (12 000 rpm) por cinco minutos, y nuevamente se eliminó el sobrenadante, este proceso se realizó dos veces.

9. Finalmente se adicionaron 50 μL de agua grado PCR. Las muestras fueron conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez terminada la extracción de ácidos nucleicos se procedió a verificar la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Sambrook y Russell, 2001; Velázquez et al., 2014). Conjuntamente se verificó la concentración y pureza del ADN en un NanoDrop marca Thermo Scientific Spectrophotometer.

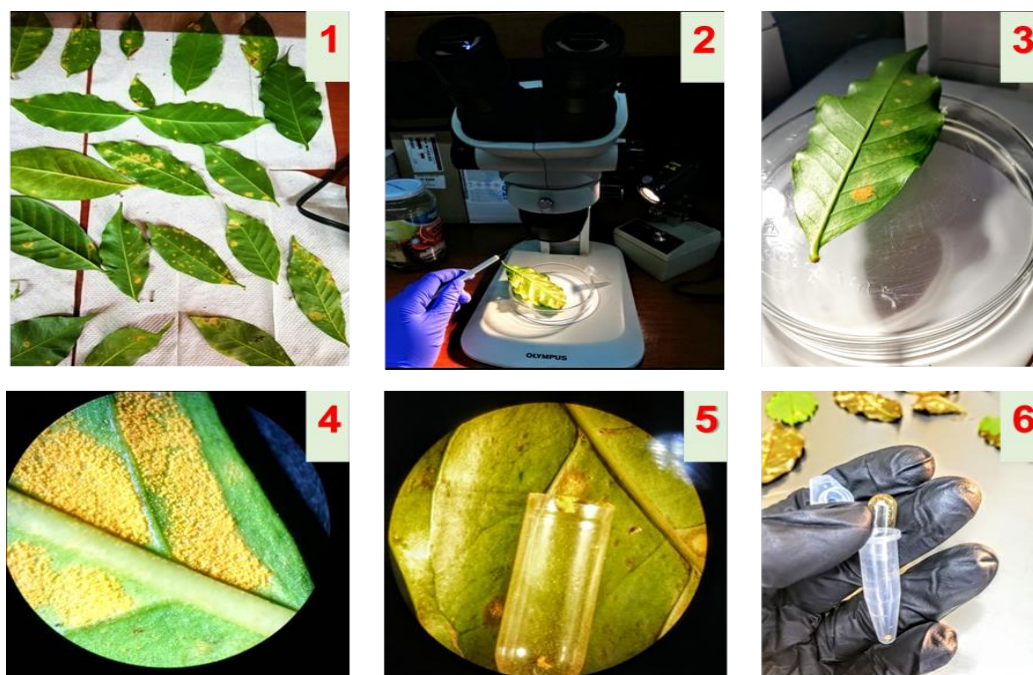


Figura 7. Recolecta de uredosporas de *H. vastatrix*. Procesamiento de muestras 1) Secado de las hojas después de sacarlas de refrigeración, 2/3) observación de pústulas en el microscopio estereoscopio (4X), 4) uredosporas observadas al microscopio estereoscopio (4X), 5) recolecta de uredosporas con la cápsula y 6) transferencia de las esporas al tubo eppendorf.

2.2.2. Secuenciación de ITSs

Las regiones amplificadas fueron las zonas conocidas como Espaciadores Internos Transcritos (ITS), que se utilizan para identificación molecular de hongos, en este caso para *H. vastatrix* correspondientes a las regiones del espaciador interno transcrito 1, 58S y el ITS 2, y parte de la región 28S (White et al., 1990; Cristancho et al., 2007; Quispe-Apaza et al., 2017). La mezcla de reacción fue calculada a 25 μL y se utilizaron los iniciadores ITS 1 (5'-

CTTGGTCATTTAGAGGGAAGTAA-3') e ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones para la reacción de la PCR.

Reactivo	Concentración	Cantidad por reacción (µL)
Buffer	1 X	5 µL
dNTP's	0.2 mM	0.5 µL
MgCl ₂	2 mM	2 µL
ITS 1	10 mM	0.5 µL
ITS 4	10 mM	0.5 µL
GoTaq DNA polimerasa	2 Unidades	0.4 µL
Agua grado PCR		14.1 µL
ADN*	80 nanogramos	2 µL

* Se utilizaron 16 muestras, de las cuales 15 correspondieron al patógeno y una muestra blanco a un volumen total de 25 microlitros.

Las condiciones de amplificación fueron modificadas, tomando como base a lo propuesto por Cristancho et al., (2007): una desnaturalización inicial 94 °C durante 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 55 °C por 1 minuto, extensión de 72 °C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C por 6 minutos (termociclador BIO-RAD T100 Thermal Cycler). Posteriormente se comprobó la calidad de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (Sambrook y Russell, 2001). Las muestras fueron enviadas a secuenciar al laboratorio MacroGen © Korea,

2.2.3. Análisis de datos.

Una vez recibidas las secuencias, se utilizó el programa DNA Baser Assembler v5.15.0 para la limpieza de secuencias, posteriormente se compararon las secuencias con las disponibles en el banco de genes en la plataforma GenBank de la National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante alineamiento básico local (Basic Local Alignment Search Tool) en la sección Nucleotide BLAST (Altschul et al., 1990). Se consideraron los de mayor porcentaje de similitud y cobertura, además de la información disponible de cada secuencia.

Las secuencias del GenBank previamente obtenidas, así como las de campo y el CRUO, fueron utilizadas para realizar un análisis filogenético mediante el programa MEGA 7.026, para lo cual, inicialmente fueron alineadas con la herramienta MUSCLE de dicho programa, posteriormente se procesaron mediante el análisis estadístico de Máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Tree) con 1000 repeticiones (bootstrap)

Adicionalmente se realizó un análisis de haplotipos mediante el programa DnaSP 5.10 DNA Sequence Polymorphism con el paquete DNA polymorphism y los resultados fueron visualizados en el programa PopART.

2.2.4. Enzimas de restricción

Se realizó la digestión de la región ITS del hongo para diferenciar las poblaciones por variedad de café, tanto de las muestras obtenidas del CRUO como de las obtenidas en campo debidamente etiquetadas, las enzimas utilizadas fueron las EcoRI-HF (N° Catalogo: R3101T, 10000 Unidades), MscI (N° Catalogo: R0534S, 250 U) y KpnI-HF (N° Catalogo: R3142S, 4000 U) de la marca NEW ENGLAND BioLabs Inc. La metodología seguida fue la establecida por el fabricante (Cuadro 5). La enzima EcoRI se ha utilizado en estudios de diversidad genética en *H. vastatrix* (Maia et al., 2009; Cabral et al., 2016; Quispe-Apaza et al., 2017) mientras que la MscI y la KpnI, se agrega en este estudio (Cuadro 4).

Cuadro 4. Protocolo de endonucleasas. Cantidad por reacción a 25 µL volumen total.

Reactivo / orden	Condiciones de la reacción
Enzima de restricción	1µL
ADN	1 µg
10 X NEBuffer	5 µL (1X)
Total de la reacción	50 µL*
Temperatura de incubación	37 °C
Tiempo de incubación	5 – 15 minutos **
Stop de la reacción	MscI: 60 minutos a 80° C. EcoRI-HF: 20 minutos a 65 °C. KpnI-HF: 10 µL de 6X gel loading dye.

La mezcla de reacción de cada muestra fue colocada en un tubo para PCR y puestas a incubar en un termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler), posteriormente las muestras fueron almacenadas en refrigeración a -20°C para su posterior análisis.

Obtenidas todas las reacciones de cada enzima se procedió a realizar un gel de agarosa al 2 %, el gel fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ según lo recomendado por Sambrook y Russell (2001). Posteriormente los geles fueron visualizados en un foto documentador MiniBIS PRO para observar las bandas formadas a partir de la digestión del ADN por las enzimas de restricción.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 8 se muestran las hojas colectadas por variedad en campo y en el Centro Regional Universitario de Oriente (CRUO), con síntomas de roya, pústulas amarillas/anaranjadas en el envés de la hoja.

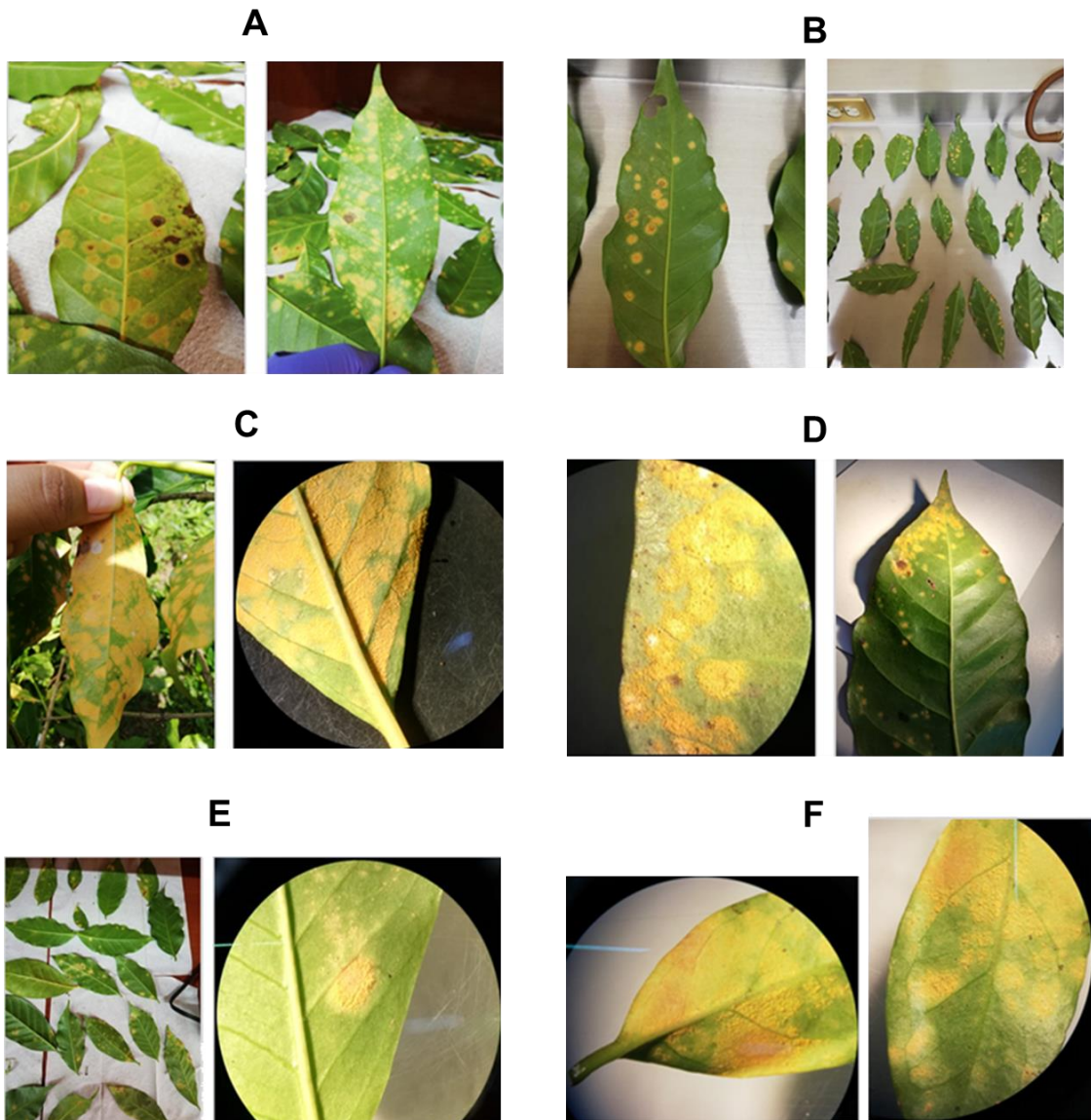


Figura 8. Variedades colectadas. Hojas de café con síntomas provocados por *H. vastatrix*, A) Geisha, B) Lote 2 (campo), C) Typica, D) Oro Azteca, E) Select 12 y F) Catuai.

Lo observado en el banco de germoplasma (CRUO) para el caso de Oro Azteca, difiere con lo reportado por la literatura, ya que esta variedad se considera

resistente a la roya del café, debido a que su linaje proviene del Híbrido de Timor el cual ha sido la fuente principal del desarrollo de variedades resistentes a *H. vastatrix* (Cortina y Castro, 2015; Escamilla et al., 2015; World Coffee Research, 2018); para el caso Geisha (Figura 8), se infiere la susceptibilidad a raza o razas fisiológicas diferentes a la II, debido a que esta variedad presenta los genes Sh1 y Sh5, los cuales otorgan la resistencia a esta raza (Hiroshi-Sera et al., 2007).

En México solo se ha reportado la presencia de la raza II (NOM-019-FITO-1995) pero se sabe que este hongo tiene distintos mecanismos que le confieren gran variabilidad genética, por lo que sus poblaciones están en constante cambio (Várzea y Marques, 2005; Cristancho et al., 2007; Carvalho et al., 2011; Santana et al., 2018). La raza II tiene la mayor distribución a nivel mundial y en la mayoría de los reportes de presencia de otras razas, fue la inicialmente reportada, por lo que en todos los países cafetaleros este comportamiento ha sido generalizado (Zambolim et al., 2005). En este sentido y de acuerdo con lo observado se puede inferir que en México el comportamiento sería similar, por lo que es necesario encontrar metodologías que permitan identificar la posible evolución de las poblaciones del patógeno, por lo que este trabajo es una contribución a esta búsqueda.

La identificación y caracterización de razas a nivel mundial se ha reportado mediante genotipos diferenciales de café, sin embargo estos análisis resultan complicados debido a que las variedades diferenciales se encuentran en otros países, además de llevar demasiado tiempo para su realización (Kosaraju et al., 2017), en este sentido, se buscó caracterizar las poblaciones de *H. vastatrix* mediante el uso de técnicas moleculares, las pruebas realizadas por medio de la PCR resultaron positivas a las bandas amplificadas con las regiones ITS 1 y 4 de otros trabajos y que corresponden a *H. vastatrix* (Cristancho et al., 2007; Santana et al., 2018; Villanueva, 2018), en la figura 9 se presentan los resultados obtenidos del producto de PCR que amplificó las regiones ITS-rDNA visualizados en el gel de agarosa de las variedades obtenidas del muestreo en campo y en el

CRUO, obteniendo bandas de peso molecular de entre 900 a 1000 pares de bases, en los carriles se observa las bandas amplificadas para cada variedad.

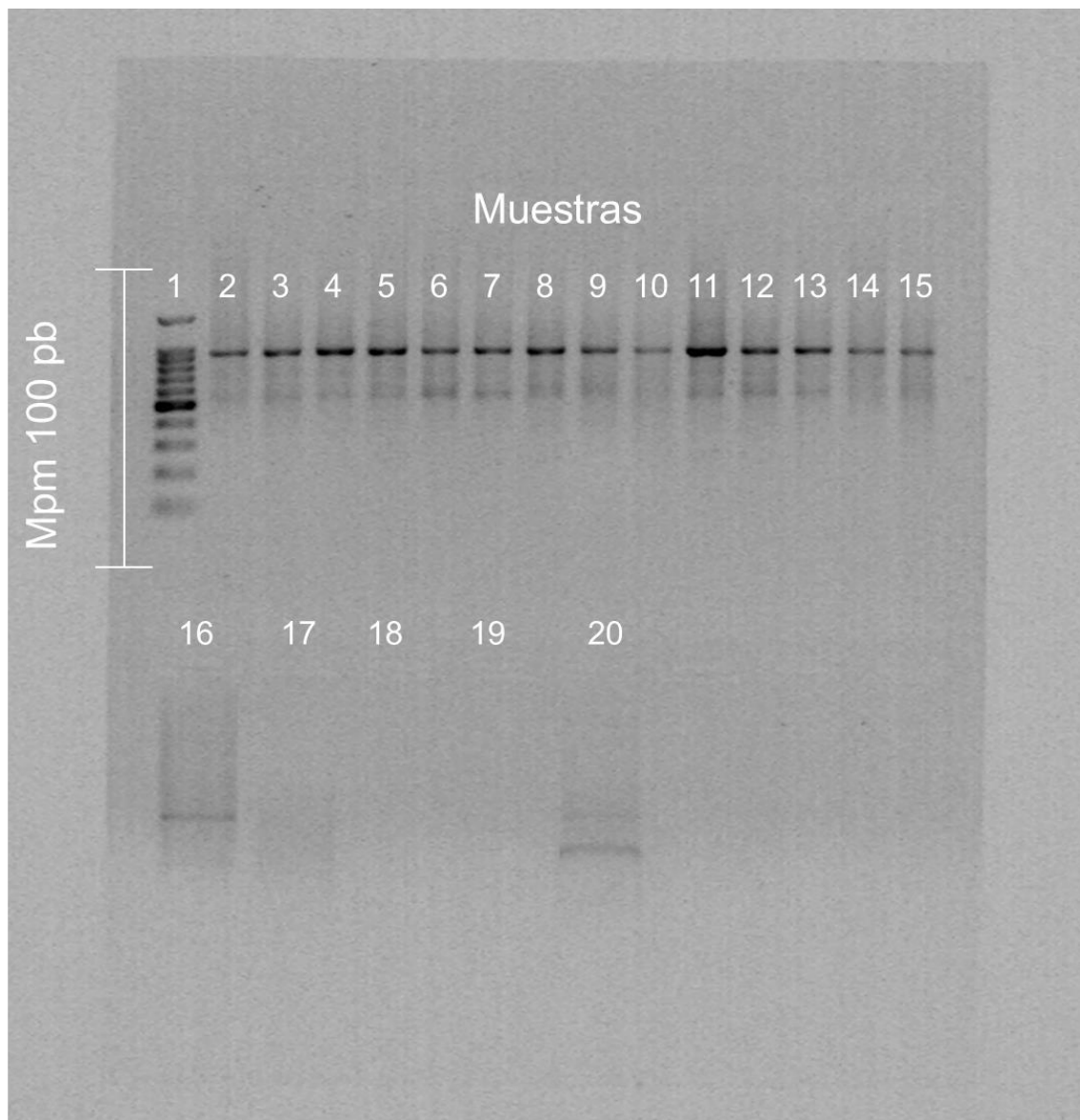


Figura 9. Gel de agarosa al 1.5 % de las regiones ITS 1 Y 4. Carril 1 marcador de peso molecular (Mpm) de 100 pares base (pb), carril 2 (positivo), carril 3 (1_campo), carril 4 (5_Oro azteca), carril 5 (7_campo), carril 6 (9_campo), carril 7 (11_campo), carril 8 (12_campo), carril 9 (20_Bourbon Amarillo), carril 10 (26_Garnica), carril 11 (27_Catuai), carril 12 (28_campo); carril 13 (30_campo), carril 14 (33 campo), carril 15 (Br Bourbon Rojo), carril 16 (GH Geisha), carril 17 (blanco), carril 18 (negativo), carril 20 (Ty Typica).

Los resultados procedentes de la secuenciación del laboratorio, así como del alineamiento en el banco de genes del NCBI (Zheng - Zhang et al., 2000; Morgulis

et al., 2008) determinó secuencias similares a *H. vastatrix*, las secuencias con las que fueron comparadas provenían de México, Brasil y Colombia, en el cuadro 5 se muestran los porcentajes de similitud (Per. Ident.) y cobertura (Query Cover) de cada una de las muestras.

Cuadro 5. Porcentajes de cobertura e identidad.

Muestra	Cobertura (%)	Identidad (%)
1_Campo_ITS 1	99	85.52
5_Oro Azteca_ITS 1	100	87.54
7_Campo_ITS4	100	97.96
9_Campo_ITS4	100	92.34
11_Campo_ITS1	100	85.61
12_Campo_ITS4	92	89.81
20_Bourbon Amarillo_ITS4	100	92.45
26_Garnica_ITS1	100	86.57
27_Catuai_ITS4	99	97.98
28_Campo_ITS4	100	98.77
30_Campo_ITS1	99	88.96
33_Campo_ITS1	98	88.76
Br_Bourbon Rojo_ITS1	100	98.75
GH_Geisha_ITS1	99	99.69

Con base a lo anterior, el árbol filogenético construido con el Test Maximum Likelihood Tree (Figura 10), donde se incluyeron las secuencias de campo y del CRUO, así como las depositadas en la plataforma del NCBI de los países antes mencionados, dentro de las cuales se tenían dos secuencias correspondientes a la raza XXII (genes de virulencia 5, 6) y a la raza II (gene de virulencia 5), además se agregaron dos secuencias del hongo *Fusarium oxysporum* como grupo externo para buscar y separar las relaciones evolutivas del clado interno.

Cómo se puede observar las secuencias se agruparon en seis clústeres (Figura10), las muestras de campo se distribuyeron en diferentes grupos, lo que indica que cada población (alineamiento) de *H. vastatrix* tiene una relación filogenética, ejemplo de ello es el clúster donde se encuentra la variedad Catuai,

la cual esta emparentada con una secuencia de campo, lo mismo sucede con la variedad Bourbon Rojo, con lo que se infiere que tienen relación filogenética con las variedades que se encuentran en ese clúster, siendo estas las de historia evolutiva más reciente.

Por otro lado, la variedad Garnica se encuentra en el clúster con las secuencias descargadas del GenBank, lo que sugiere que la población que infecta a esta variedad se encuentra relacionada genéticamente con esos aislamientos y como se observa en la figura 10, las secuencias pertenecen a las razas II y XXII. Estas razas fueron reportadas por Cristancho et al., (2007), los cuales realizaron un estudio de caracterización de razas con el set de plantas diferenciales, sus resultados indicaron la presencia de ambas razas en las poblaciones de *H. vastatrix*, aunado a ello, secuenciaron las regiones ITS 1 y 4, mismas regiones que fueron secuenciadas en este trabajo, es por ello que la secuencia de la variedad Garnica obtenida en esta investigación se agrupa con las secuencias obtenidas por el trabajo anteriormente mencionado. Además estos resultados son reforzados con el genotipo de esta variedad, ya que la raza XXII puede romper resistencia al gen SH6 y las variedades como Garnica solo presentan genes de resistencia a las razas que posean genes SH1, SH2, SH4 y SH5 (Bettencourt y Carvalho, 1968; Noronha-Wagner y Bettencourt, 1967) por lo que se presume la presencia de la raza XXII en México, además de la raza II (NOM-019-FITO-1995).

Todos los agrupamientos observados en el dendograma muestran una gran variabilidad genética, principalmente en los aislamientos de las variedades identificadas en el CRUO, la mayoría de las muestras de campo se agruparon con al menos una de las variedades identificadas, ejemplo de ello es el clúster II en donde se encuentran las variedades Oro Azteca y Geisha, en este también se observa un aislamiento de campo (11_Campo_ITS1), lo que representa una relación filogenética estrecha entre estas secuencias. El dendograma sugiere una relación filogenética alejada entre las secuencias comparadas con las de otros países, por lo que se deduce un distanciamiento genético entre las

secuencias; sin embargo también podría deberse a la falta de estudios enfocados a este tipo de análisis; Garfnkel et al., (2019) realizaron un estudio utilizando el mismo método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood Tree) en el género *Botrytis*, en el cual encontraron diferencias entre los aislados del mismo huésped, teniendo una gran diversidad entre sus poblaciones.

La presencia *H. vastatrix* en estas variedades representa el rompimiento de resistencia en estos cultivares para algunas razas, por lo que, al no tener variedades diferenciales resulta difícil identificar la o las razas fisiológicas presentes en estas variedades, es por ello que Solano (1996) describió modelos basados en patotipos en los cuales toma 10 genes de resistencia vertical, nueve conocidos y uno desconocido, reportando al menos 1024 combinaciones de genes. Si se consideran solo 9 genes de resistencia conocidos, se obtendrían 512 razas fisiológicas posibles, con los genes de virulencia en diferentes combinaciones, si la variedad Geisha presenta los genes SH1 y SH5 (Hiroshi-Sera et al., 2007) los patotipos correspondientes serían 128.

Dentro de ese mismo clúster (II), las secuencias del hongo pertenecientes al aislado 11_campo y a Oro Azteca presentan una gran similitud y una historia evolutiva más alejada al clúster o clado I, lo que expresa una diferenciación entre esas secuencias. Siguiendo lo reportado por Solano (1996), se puede inferir, que la variedad Oro azteca al derivar del Híbrido de Timor, el cual tiene presente los genes de resistencia SH5 – 9 (Bettencourt, 1973; Clarindo et al., 2013; Moreira-Sobreira et al., 2015), las posibles razas presentes serían 16, de las cuales podemos descartar la raza II y XXII, dado que el dendograma las separa de esas poblaciones (Figura 10), además que no posee los genes de virulencia 6, 7, 8, 9 y otro desconocido.

La gran diversidad genética que se presenta en las poblaciones de *H. vastatrix* evaluadas en este estudio corresponde al comportamiento que el patógeno tiene en los sitios donde se han reportado nuevas razas, así como la presencia de las mismas variedades como hospedantes (Rodrigues JR et al., 1975; Cristancho et al., 2007; Garfnkel et al., 2019).

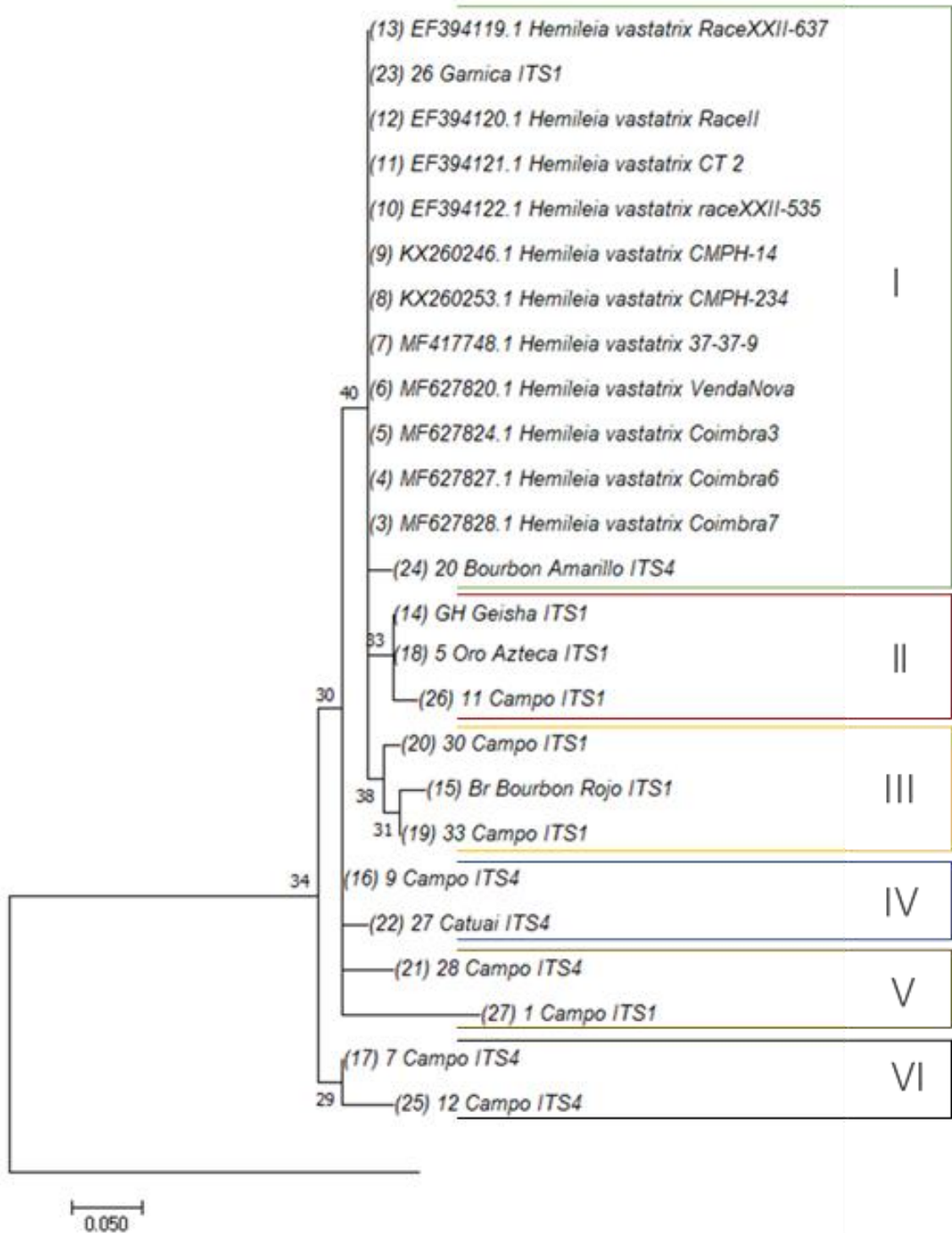


Figura 10. Análisis filogenético de ITSs de *Hemileia vastatrix* por el método de Máxima Verosimilitud con 1000 bootstrap. Historia evolutiva que se infiere utilizando el modelo de Jukes-Cantor. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-237.66).

Sin embargo, la teoría de Selección estabilizante propone que los patotipos con mayor complejidad, es decir los que mayor genes de virulencia presentan, son menos capaces de sobrevivir que los que son más simples (Van der Plank, 1968; Rodríguez y Moreno, 2002), por lo que en los genotipos descritos en este trabajo, las razas con mayor supervivencia, serían las menos complejas, es decir las que tienen menos genes de virulencia en su genoma.

Por otro lado, al analizar la estructura genética mediante los análisis de haplotipos de cada aislamiento de *H. vastatrix* por cada variedad, los resultados mostraron una diversidad de haplotipos igual 0.978 y una diversidad nucleotídica de 0.04900 lo que indica que las poblaciones del patógeno tienen un alto grado de cruzamiento así como una gran diversidad, en el cuadro 8 se presenta el agrupamiento por haplotipos presentes en campo y en el CRUO, los haplotipos con mayor frecuencia son los Hap_5 y Hap_9, Garnica - Catuaí y Oro Azteca - Geisha respectivamente.

Cuadro 6. Haplotipos presentes en Campo y CRUO. Haplotipos distribuidos en los sitios de recolecta.

Hap	Frec	Secuencia	Bases nucleotídicas													
Hap_1	1	11_Campo	A	A	C	A	A	A	G	G	T	G	T	C	T	
Hap_2	1	12_Campo	G	G	C	C	C	A	G	T	G	G	T	C	G	
Hap_3	1	1_Campo	A	A	C	A	A	G	T	T	T	G	T	C	T	
Hap_4	1	20_Bourbon Amarillo	A	G	C	A	A	A	G	T	T	G	T	T	T	
Hap_5	2	26_Garnica; 27_Catuai	A	G	C	A	A	A	G	T	T	G	T	C	T	
Hap_6	1	28_Campo	A	G	A	A	C	A	G	T	T	T	T	C	T	
Hap_7	1	30_Campo	A	G	C	A	A	A	G	T	T	G	G	C	T	
Hap_8	1	33_Campo	A	G	C	A	A	A	G	T	T	G	C	C	T	
Hap_9	2	5_Oro Azteca; GH_Geisha	A	A	C	A	A	A	G	T	T	G	T	C	T	
Hap_10	1	7_Campo	A	G	C	A	C	A	G	T	G	G	T	C	G	
Hap_11	1	9_Campo	A	G	C	A	C	A	G	T	T	G	T	C	T	
Hap_12	1	Br Bourbon Rojo	A	A	C	A	A	A	G	T	T	G	C	C	T	

La estructura genética de las poblaciones se puede observar en la figura 12, la distribución de los haplotipos muestran cómo se han ido derivando; esta red de haplotipos permite observar las relaciones entre las secuencias (Paradis, 2018),

por lo que se presenta la genealogía de cada una de las regiones ITS, los haplotipos con mayor frecuencia (Cuadro 8) se consideran las poblaciones iniciales, y los restantes son los haplotipos que derivaron de ellos, es decir todas las veces que dos o más poblaciones diferentes han intercambiado genomas y las rutas genéticas que han seguido estas poblaciones (Tajíma, 1989). Los resultados indican que a partir de los haplotipos ancestrales se registraron varios cambios en las poblaciones, para el Hap_5 se observa un cambio para generar el Hap_11, el cual dio origen a las poblaciones en campo (Hap_10, Hap_2 y Hap_6), el Hap_11 formó las poblaciones de los haplotipos 1 y 3 también correspondientes a muestras de campo; sin embargo para el resto de los haplotipos comparten parecidos con las secuencias de campo y de las variedades restantes del CRUO.

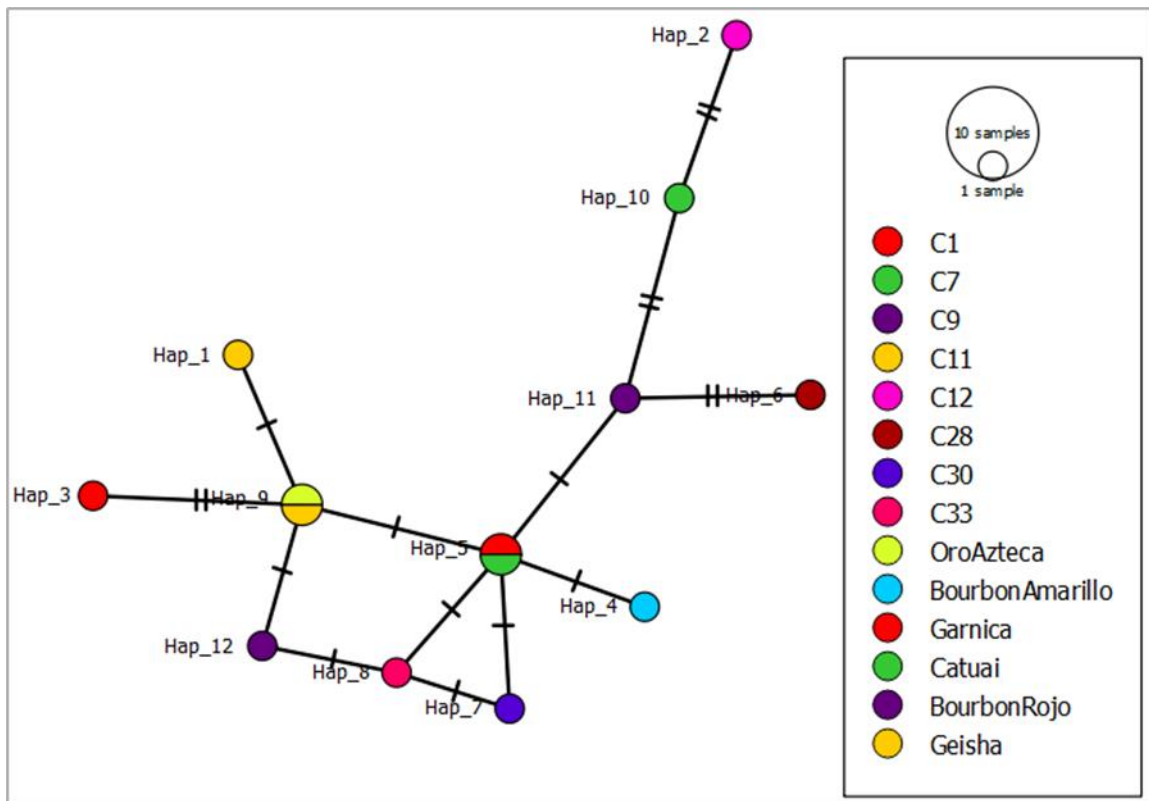


Figura 11. Red de Haplotipos de poblaciones de *H. vastatrix*. Estructura genética del hongo, los haplotipos 5 y 9 como poblaciones ancestrales de las que derivaron otras poblaciones, las líneas transversales negras indican el número de cambios que ha sufrido cada haplotipo.

Quispe-Apaza et al., (2017) realizaron un estudio de diversidad genética en poblaciones cafetaleras del Perú, en el que analizaron las mismas regiones ITS para *H. vastatrix*, teniendo tasas similares de diversidad haplotípica.

En la literatura se reportan estudios en los que se realizan análisis de haplotipos en aislamientos de roya, en ellos se ha observado que los mayores índices de diversidad se han dado en los sitios en donde el patógeno comenzó a diversificarse debido a las variedades de café presentes (Gouveia et al., 2005; Maia et al., 2009; Cabral et al., 2016).

Aunado a los análisis anteriores también se realizó un corte enzimático para determinar visualmente la posible variación que existe en los fragmentos de ADN de las regiones ITS 1 y 4 de las poblaciones de *H. vastatrix* (Figura 13). Aunque inicialmente se habían propuesto tres enzimas de restricción se reporta que las endonucleasas MscI y la KpnI – HF no tuvieron sitios de corte en la región analizada, esto podría deberse a que no se encuentran sitios específicos de digestión en las regiones ITSs amplificadas en el presente estudio.

La enzima EcoRI fue la única enzima con la que se observó un sitio de corte, Quispe-Apaza et al., (2017) y Cabral et al., 2016 utilizaron esta endonucleasa para realizar la red de haplotipos que reportaron, por lo que se sabe que si tiene sitios de corte en las secuencias ITSs de *H. vastatrix*, sin embargo en este estudio no se observaron diferencias visuales, todas las muestras presentan el mismo sitio de corte, por lo que no se pueden diferenciar las poblaciones al realizar la digestión con esta enzima, sin embargo esto podría deberse a que el sitio de variación se encuentre entre los cortes enzimáticos debido a que se obtuvieron dos bandas con pesos moleculares entre 600 y 700 así como la de menor tamaño de 300 a 400 pares base, y el fragmento completo mide entre 900 y 1000 pares de bases.

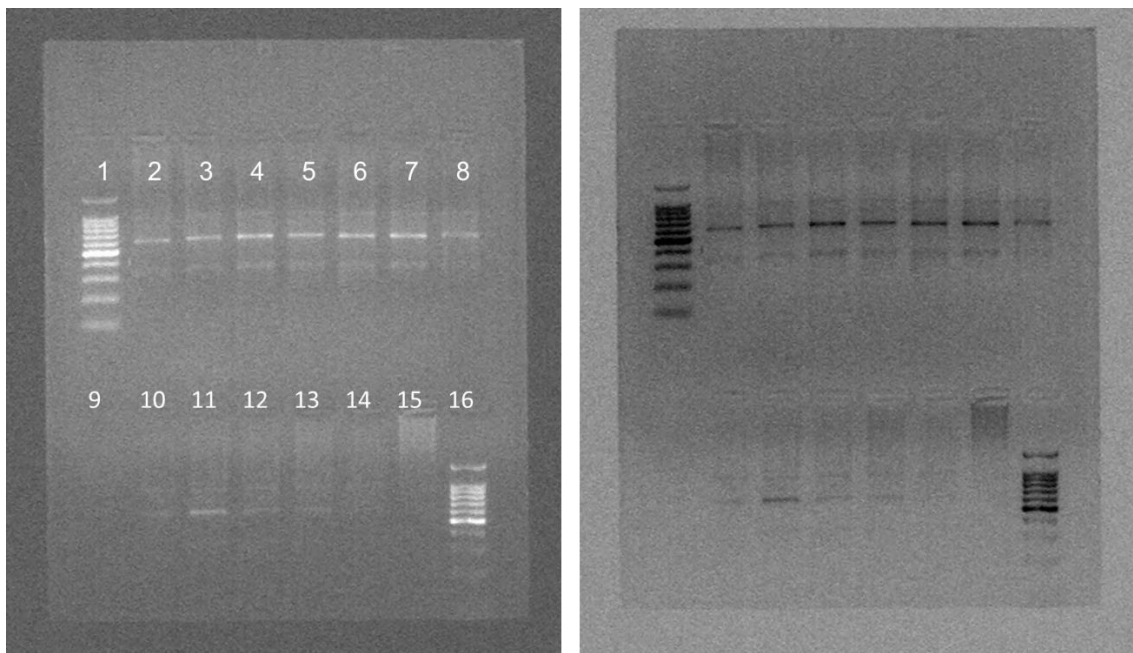


Figura 12. Endonucleasa *Eco RI*. Cortes enzimáticos de la enzima *Eco RI* en poblaciones por variedad de *H. vastatrix*. Las muestras se observan en el orden : Carril 1 (marcador de peso molecular 100 pb), carril 2 (1 campo), carril 3 (5 Oro azteca), carril 4 (7 campo), carril 5 (9 campo), carril 6 (11 campo), carril 7 (12 campo), carril 8 (20 Bourbon Amarillo), carril 9 (26 Garnica), carril 10 (27 Catuai), carril 11 (28 campo); carril 12 (30 campo), carril 13 (33 campo), carril 14 (Bourbon Rojo), carril 15 (Geisha), carril 16 (marcador de peso molecular 100 pb.). Se observan dos fotografías del mismo gel para observar con mayor precisión las bandas.

Finalmente es necesario realizar más estudios a nivel molecular en poblaciones de roya a nivel nacional, para conocer el grado diversidad que se presenta, ya que se espera se tenga el mismo comportamiento que en el estado de Veracruz.

3.1. Sugerencias

- ✓ Se sugiere continuar con estudios enfocados a distribuciones geográficas, por estados así como aislamientos por variedades resistentes y susceptibles.
- ✓ Utilizar otras enzimas de restricción que permitan diferenciar visualmente entre poblaciones de roya de manera sencilla y rápida.

4. CONCLUSIONES

El análisis filogenético de *H. vastatrix* mostró una gran variabilidad genética entre las colectas obtenidas del CRUO y de plantaciones de campo (1_Campo, 7_Campo, 9_Campo, 11_Campo, 12_Campo, 28_Campo, 30_Campo y 33_Campo). De acuerdo con el análisis de secuencias, las variedades Oro azteca y Geisha fueron atacadas por razas diferentes a las razas II y XXII.

Las poblaciones de *H. vastatrix* mostraron una alta tasa de intercambio genético dentro del banco de germoplasma (CRUO) y las plantaciones comerciales de café (campo) cultivadas en el estado de Veracruz.

En concordancia con lo anterior, la red de haplotipos indicó una gran diversidad en las poblaciones del hongo en el CRUO y en campo, los resultados muestran una diversidad de haplotipos: 0.978 y diversidad nucleotídica de 0.049 siendo los aislamientos de las variedades Garnica, Catuai, Oro Azteca y Geisha los haplotipos (Hap_5 y Hap_9) más ancestrales mientras que los obtenidos en campo así como de las variedades Bourbon Amarillo y Rojo las poblaciones más recientes (Hap_1, Hap_2, Hap_3, Hap_4, Hap_6, Hap_7, Hap_8, Hap_10, Hap_11 y Hap_12).

Las enzimas MscI y la KpnI no tuvieron sitios de corte, mientras que con la enzima EcoRI solo se observó un sitio de corte en las regiones ITS 1 y 4 de todas las muestras. Esto indica que con la enzima EcoRI no se observaron diferencias visuales entre cada población.

5. LITERATURA CITADA.

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, 215, (3), 403 - 410.
- Aragón-Magadán, M. (2019). DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* DE MÉXICO. (Tesis Maestría en Ciencias). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Bettencourt, A. J. & A. Carvalho, 1968. Melhoramento visando a resistência do cafeeiro a ferrugem. *Bragantia*, 27, 35 - 68.
- Bettencourt, A. J. (1973). *Considerações gerais sobre o “Híbrido de Timor”*. Campinas, Brazil: Instituto Agrônomo de Campinas.
- Cabral, P. G. C., Maciel-Zambolim, E., Oliveira, S. A. S., Caixeta, E. T., and Zambolim, L. (2016). Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*, 65: 196 - 204.
- Clarindo, W. R., Carvalho, C. R., Caixeta, E. T., and Koehler, A. D. (2013) Following the track of “Híbrido de Timor” origin by cytogenetic and flow cytometry approaches. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 2253 - 2259.
- Cristancho, A. M., Escobar O. C., y Ocampo, J.D. (2007).Evolución de razas de *H. vastatrix* en Colombia. *Cenicafé* 58(4), 340 - 359.
- Cortina, G. H. A., y Castro, C. B. L. (2015). Evaluación de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* x *Coffea canephora* con resistencia a *Hemileia vastatrix* y *Ceratocystis colombiana*. *Cenicafé*, 66, (2), 17 - 29.
- Carvalho, C. R., Fernandes, R. C., Almeida, C. G., Barreto, R. W., and Evans, H. C. (2011). Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE* 6 (11), e26387.
- DELLAPORTA, S. J. and HICKS, J. (1983). A plant DNA miniprep. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1,19-21.
- Escamilla, P. E., Ruiz, R. O., Zamarripa, C. AL, Y González, H. V. (2015). Calidad en variedades de café orgánico en tres regiones de México. *Revista de Geografía Agrícola*, 55, 45 - 55.
- Ewens, W. J., Spielman, R. S., & Harris, H. (1981). Estimation of genetic variation at the DNA level from restriction endonuclease data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(6), 3748–3750.
- Garfinkel, A. R., Coats, K. P., Sherry, D. L., and Chastagner, G. A. (2019). Genetic analysis reveals unprecedented diversity of a globally-important plant pathogenic genus. *Scientific Reports*, 9(1).
- Gautam, Ragini, Singh, S. K., & Sharma, Vinay. (2016). Molecular diagnosis and intraspecific genetic variability of root pathogens of arid legumes in Western Rajasthan, India. *Revista Biología Tropical*, 64(4), 1505-1518.
- González, C. J., y Bueno, T. M. (2013). Enzimas de restricción. En Salazar, M. A., Sandoval, R. A., y Armendáriz, B. J. (Ed.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (pp. 120 - 126). Ciudad de México, México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.

- Gouveia, M., Ribeiro, A., Várzea, V., and Rodrigues Jr, C. (2005). Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia*, 97(2), 396 - 404.
- Hamouda, M. (2019). Molecular analysis of genetic diversity in population of *Silybum marianum* (L.) Gaertn in Egypt. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 17(1), 12 (1 - 9).
- Hiroshi-Sera, G., Sera, T., Shiguer-Ito, D., Alves de Azevedo, J., Siqueira da Mata, J., Saori-Dói, D., Ribeiro-Filho, C., and Seidi-Kanayama, F. (2007). Resistance to Leaf Rust in Coffee Carrying Sh3 Gene and others SH Genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50 (5), 753 - 757.
- Kosaraju, B., Sannasi, S., Mishra, M. K., Subramani, D., and Bychappa, M. (2017). Assessment of genetic diversity of coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* using SRAP markers. *Journal of Phytopathology*, 165, 486 - 493.
- Laurentin, H., y Martínez-Hilders, A. (2012). Optimización de protocolo para extracción de ADN del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* (TASSI) GOID. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 46 (3), 297 - 309.
- Maia, T. A., Zambolim, E. M., Caixeta, T. E., Mizubuti, E. S., Santana, M. F., e Zambolim, L. (2009). ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Hemileia vastatrix* COM BASE NO MARCADOR AFLP. VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. *Embrapa Café*, 269 - 1.
- Moreira-Sobreira, F., Baião de Oliveira, A., Alves-Pereira, A., and Sussumu-Sakyama, N. (2015). Potential of Híbrido de Timor germplasm and its derived progenies for coffee quality improvement. *Australian Journal of Crop Science*, 9 (4), 289 - 295.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., and Schäffer, A. (2008). Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics*, 24, 1757 - 1764.
- Moysés, C. B., & Almeida-Toledo, L. F. de. (2002). Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 25(4), 401–407.
- NOM-019-FITO-1995. Diario Oficial de la Federación: NORMA Oficial Mexicana. Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del café. México, D.F., a 11 de noviembre de 1996.
- Noronha-Wagner, M., and Bettencourt, A. J. (1967). Genetic study of the resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. *Canadian Journal of Botany*, 45, 2021 - 2031.
- Paradis, E. (2018). Analysis of haplotype networks: The randomized minimum spanning tree method. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(5), 1308 - 1317.
- Quispe-Apaza, C., Mansilla-Samaniego, R., López-Bonilla, C., Espejo-Joya, R., Villanueva-Caceda, J., y Monzón, C. (2017). Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (3), 418 - 436.

- Rodrigues JR, C. J., Bettencourt, A. J., RIJO, L. (1975). Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual Review Phytopathology*, 14, 49 - 70.
- Rodríguez, M, K., y Moreno, R. G. (2002). SUPERVIVENCIA RELATIVA DE LAS RAZAS II Y XXII DE *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé*, 53 (3), 252 - 265.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL*. Ney York, EU: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santana, F. M., Zambolim, E. M., De Oliveira, L., Caixeta, T. E., e Zambolim, L. (2007). ANÁLISE MOLECULAR DO rDNA DE *Hemileia vastatrix*, EN SIMPOSIO DE INVESTIGACIÓN CAFÉS DO BRASIL. Anales del Congreso. *Embrapa Café*, 439 - 1.
- Santana, M. F., Zambolim, E. M., Caixeta, T. E., and Zambolim, L. (2018). Population genetic structure of the coffee pathogen *Hemileia vastatrix* in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43 (5), 473 - 476.
- Solano, V. R. (1996). Análisis del valor de la resistencia vertical en el control de la roya (*Hemileia vastatrix* NERK. Y BR.) del cafeto en México (Tesis doctoral). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123, 585 - 595.
- USDA, United States Department of Agriculture. (2019). Coffee: World Markets and Trade. Recuperado el 1 de abril de 2020 de <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>
- Van Der Plank, J. E. (1968). *Disease resistance in plants*. New York, EEUU: Academic Press.
- Várzea, V. M. P., and Marques, D. V. (2005). Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim, L., Zambolim, E., Várzea, V. M. P. (Eds.). *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa (pp. 53 - 74). Viçosa, Brasil: UFV.
- Velázquez, A. L., Aragón, M. M., y Cornejo, R. A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A. B., y Rocha, M. M. (Eds.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-27). México, D. F. : Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Villanueva, C. J. (2018). Análisis de la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de quillabamba mediante secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Waller, J.M., Bigger, M., and Hillocks, R. J. (2007). *Coffee pests, diseases and their management*. London, UK: CAB International.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (Eds.). *PCR protocols a guide to methods and applications* (pp. 315 - 322). London, United Kingdom: Academic Press, London.
- World Coffee Research. (2018). *Arabica coffee varieties*. Portland, United States: World Coffee Research.
- Yang, Z., and Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* 13, 303–314.

- Zambolim, L., Zambolim, E. M., and Várzea, V. M. P. (2005). *Durable resistance to coffee leaf rust*. Oeiras, Brazil: CIFC.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7(1-2), 203 - 14.