



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

**IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS RESISTENTES A
ROYA DENTRO DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE
CAFÉ DEL CRUO-UACH**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA

Leticia Reyes Márquez

**BAJO LA SUPERVISIÓN DE:
Dra. Margarita Gisela Peña Ortega**



**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
ORIGINA DE EXÁMENES PROFESIONALES**

Chapingo, México, junio de 2019



**IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS RESISTENTES A ROYA DENTRO DEL
BANCO DE GERMOPLASMA DE CAFÉ DEL CRUO-UACH**

Tesis realizada por Leticia Reyes Márquez bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

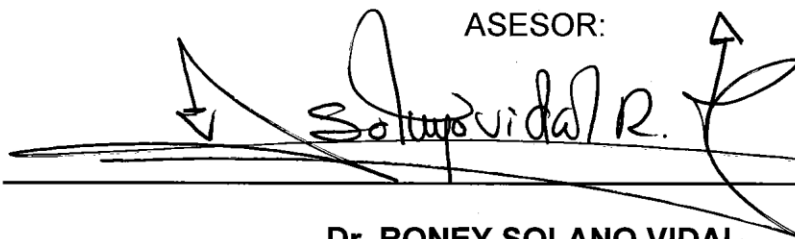
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



Dra. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

ASESOR:



Dr. RONEY SOLANO VIDAL

ASESOR:



Dr. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
DATOS BIOGRÁFICOS	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo	2
Hipótesis	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Importancia del café	3
2.2. Enfermedades del café.....	4
2.3. La roya del café.....	5
2.4. Control de la roya	7
2.5. Resistencia genética del café a la roya.....	8
2.6. Mejoramiento genético asistido ante la roya del café	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Material vegetal	14
3.2. Extracción de ADN.....	14
3.3. Evaluación de cantidad y calidad de ADN.....	15
3.4. Detección de genes de resistencia a roya en variedades de café.	16

3.4.1. Iniciadores	16
3.4.2. Componentes y condiciones de reacción	17
3.5. Observación de síntomas de roya en campo	19
3.6. Purificación y secuenciación de productos de PCR	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Calidad de ADN	21
4.2. Detección de genes de resistencia	23
4.3. Síntomas de roya en campo	33
4.4. Análisis de secuencias	35
5. CONCLUSIONES	43
6. LITERATURA CITADA	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores utilizados en café para la detección de genes de resistencia a <i>Hemileia vastatrix</i>	18
Cuadro 2. Componentes de la mezcla de reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction) para la amplificación de secuencias ligadas a genes de resistencia a roya del café.	19
Cuadro 3. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación por PCR de secuencias ligadas a genes de resistencia a roya del café.	19
Cuadro 4 Presencia/ausencia de bandas amplificadas asociadas a genes de resistencia a <i>H. vastatrix</i> obtenidas mediante el uso de 5 pares de iniciadores en 95 accesiones de café.....	30
Cuadro 5. Presencia (1)/ausencia (0) de síntomas de roya de la hoja (<i>Hemileia vastatrix</i>) en el Banco de Germoplasma del CRUO, en Huatusco, Veracruz.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel de calidad de ADN nuclear de 95 colectas de café obtenido con la metodología de extracción CTAB.	23
Figura 2. Amplificación del gen ribosomal cloroplástico 16S en 95 colectas de café.	23
Figura 3. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a <i>H. vastatrix</i> obtenido mediante el uso de iniciadores SCAR's HVD1-F/HVD1-R.	25
Figura 4. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a <i>H. vastatrix</i> obtenido mediante el uso de iniciadores SCAR's HVD2-F/HVD2-R.	26
Figura 5. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a <i>H. vastatrix</i> obtenido mediante el uso de iniciadores SCAR's HVD5-F/HVD5-R.	27
Figura 6. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a <i>H. vastatrix</i> obtenido mediante el uso de iniciadores SCAR's HVD6-F/HVD6-R.	27
Figura 7. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a <i>H. vastatrix</i> obtenido mediante el uso de los iniciadores HVP1-F/HVP1-R.	28
Figura 8. Alineamiento de secuencias amplificadas por el par de iniciadores HVD2-F/HVD2-R.	38
Figura 9. Alineamiento de secuencias amplificadas con el par de iniciadores HVD5-F/HVD5-R.	39
Figura 10. Alineamiento de secuencias amplificadas con el par de iniciadores HVD6-F/HVD6-R.	41

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de culminar una etapa más.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para realizar los estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por darme la oportunidad de realizar y culminar mis estudios de maestría formándome profesional y personalmente.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega, por su incondicional apoyo, su gran paciencia, y excelente guía en la realización de este trabajo.

Al Dr. Roney Solano Vidal, por sus sabios consejos, apoyo y palabras de aliento para la culminación de este trabajo.

Al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por sus excelentes consejos para la redacción final de este trabajo y apoyo total en este proceso.

Al Dr. Esteban Escamilla Prado, y al personal del Centro Regional Universitario Oriente, por las facilidades otorgadas para el acceso al Banco de Germoplasma de Café.

A la M. C. María Elisa Cano Alvarado por su excelente apoyo y amistad brindada en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Fitotecnia.

A los amigos que conocí en este proceso; a Hebert y Francisco porque a pesar de todo formamos una sólida amistad.

DEDICATORIA

A mis padres, que son mi ejemplo de lucha en esta vida; su amor, dedicación, apoyo y confianza son el pilar que me sostiene. Porque este logro también es de ustedes.

A mis hermanos, Estefanía, Efraín y Noé y Aurora quienes, aunque desde lejos, siempre están conmigo cuando los necesito y porque cuando estamos juntos sucede lo mejor.

A mi abuela, por ser un ejemplo de fortaleza humana, y que a pesar de las adversidades siempre quedan esperanzas para seguir adelante.

A mis amigos, Oscar, Trino, Montse, quienes reafirman que la familia no solo está construida a base de lazos de sangre y que la vida se hace más amena con su compañía.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Leticia Reyes Márquez

Fecha de nacimiento: 02 de agosto de 1994

Lugar de nacimiento: Tepango de Rodríguez, Puebla.

CURP: REML940802MPLYRT06

Profesión: Ing. Agrónomo Especialista en Fitotecnia

Cédula Profesional: 11382299



Desarrollo académico

Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Estado de México. Período 2009-2012

Licenciatura en Ingeniería Agronómica Especialista en Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Estado de México. Período: 2012-2016.

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS RESISTENTES A ROYA DENTRO DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE CAFÉ DEL CRUO-UACH

El cultivo de café es importante ya que es un producto de exportación y proporciona un medio de vida para millones de personas en todo el mundo; México es un importante país productor y exportador de café. La roya de la hoja (*Hemileia vastatrix*) es la enfermedad más destructiva del cultivo y la de mayor importancia económica a nivel mundial. El objetivo de este trabajo fue Identificar accesiones de café con resistencia genética a roya dentro del Banco de Germoplasma del CRUO de la UACH para su uso dentro de un programa de mejoramiento genético. Para ello se evaluaron 89 variedades catalogadas como resistentes y 6 susceptibles. Se realizó extracción de ADN y se utilizaron 10 pares de iniciadores SCAR's para amplificar bandas correspondientes a secuencias ligadas a genes de resistencia a *Hemileia vastatrix*. Se efectuaron observaciones de campo para corroborar la presencia y/o ausencia de síntomas de roya en las variedades colectadas y finalmente se llevó a cabo la secuenciación de bandas presentes en 12 variedades seleccionadas para su posterior análisis. De los 10 pares de iniciadores probados, solo cinco de ellos mostraron amplificación de fragmentos en las variedades analizadas. Del total de variedades de café evaluadas en el presente estudio 32 de ellas no mostraron síntomas de roya, lo que las sitúa como valiosos progenitores potenciales para la incorporación de resistencia genética a la roya. La secuenciación de las bandas amplificadas mostró relativamente pocas diferencias entre ellas, por lo que se concluye que los iniciadores evaluados en el presente estudio fueron efectivos para amplificar regiones asociadas con genes de resistencia a la roya del café.

Palabras clave: *Hemileia vastatrix*, resistencia genética, SCAR's.

Autor: Leticia Reyes Márquez

Directora de Tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF RUST RESISTANCE GENOTYPES AT CRUO-UACH COFFEE GERMPLASM BANK

Mexico is an important coffee producer and exporter. Coffee is an important export product around the world and it represents a way of life for millions of people. Coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix* is the most destructive disease for this crop, causing important economic losses. The main objective of this study was to identify accessions that carry genetic resistance to the fungus within CRUO-UACH Coffee Germplasm Bank, to be used as progenitors in a rust resistance breeding program. A total of 89 coffee registered varieties as rust resistant and 6 susceptible were studied. Leaf DNA extractions were performed and 10 pairs of SCAR's were used to amplify sequences associated to *Hemileia vastatrix* resistance genes. To corroborate field resistance, observations of presence or absence of disease symptoms were recorded. present in 12 selected varieties. Amplified bands present in 12 selected varieties were sequenced. Only five pairs out of the considered 10 showed amplification. Field and laboratory results identified 32 coffee varieties without visible leaf rust symptoms; therefore, these varieties would be valuable potential progenitors to incorporate genetic rust resistance to susceptible cultivars in a breeding program. Sequencing of amplified bands showed minor differences among them; then, it is concluded that the SSR primers used in this study were effective to amplify regions associated to leaf rust resistance genes.

Keywords: *Hemileia vastatrix*, genetic resistance, SCARs.

Author: Leticia Reyes Márquez

Thesis director: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

1. INTRODUCCIÓN

El grano del cultivo de cafeto es usado para preparar bebidas y es un producto de exportación importante en muchos países de África, América Latina y Asia; además de que proporciona un medio de vida para más de 120 millones de personas en todo el mundo (Osorio, 2002).

A nivel mundial México se posiciona en el onceavo lugar en cuanto a producción (FAOSTAT, 2019b). Durante 2018 se sembraron 711 526 has de café, con un promedio de 1.353 toneladas por hectárea (SIAP, 2019).

Los factores limitantes de la producción de café incluyen enfermedades graves, como la roya de la hoja del café (o roya naranja) causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Silva *et al.*, 2006); la roya es la enfermedad más destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a que provoca la caída prematura de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte progresiva en ramas e incluso la muerte de árboles, por lo que resulta estratégico para el país identificar fuentes de resistencia genética a este patógeno, entre otras medidas de control.

Actualmente existe un gran número de colecciones de germoplasma que contienen genotipos con un alto valor agronómico, con potencial para ser usadas en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, en muchas ocasiones el conocimiento sobre estas fuentes genéticas es escaso, lo cual dificulta su utilización eficiente en fitomejoramiento.

El hongo causante de la roya del café ha demostrado una alta capacidad para evolucionar y superar los genes de resistencia en la planta. Por lo que en los programas de mejoramiento, el uso de la resistencia parcial y la resistencia efectiva proporcionada por genes mayores debe ser una prioridad. La disponibilidad de marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia podría ser extremadamente útil para el análisis rápido de los espectros de

resistencia y el seguimiento de genes de resistencia individuales, facilitando la mejora asistida por marcadores para el desarrollo de cultivares con resistencia duradera al patógeno de la roya del café.

Por lo que la utilización de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia constituye una herramienta esencial para su aplicación en la selección asistida por marcadores (MAS). En el Centro Regional Universitario Oriente (CRUO) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) localizado en Huatusco, Veracruz, se encuentra el banco de germoplasma de café de México, en el cual no se han realizado estudios para identificar genotipos con resistencia genética a roya, razón por la cual el presente trabajo resulta estratégico para proveer una base de información accesible para la implementación de programas nacionales de mejoramiento genético para resistencia a la roya del café.

Objetivo

Identificar accesiones de café con resistencia genética a *Hemileia vastatrix* dentro del Banco de Germoplasma del CRUO de la UACH para su uso dentro de un programa de mejoramiento genético de resistencia a roya del café.

Hipótesis

Se espera que la utilización de iniciadores específicos permita detectar la presencia de genes de resistencia a roya del café en accesiones de *Coffea* del Banco de Germoplasma del CRUO-UACH.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del café

El grano del cultivo de cafeto es usado para preparar bebidas y es un producto de exportación importante en muchos países de África, América Latina y Asia; además de que proporciona un medio de vida para más de 120 millones de personas en todo el mundo (Osorio, 2002).

El café se produce en 70 países, sin embargo tres de ellos han contribuido con el 55 % de la producción mundial durante los últimos años: Brasil (32-34 %), Vietnam (12-13 %) y Colombia (8-9 %) (ITC, 2011).

La especie *Coffea arabica* L., representa el 63 % de la producción total mundial de café, mientras que el 37 % restante corresponde a *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (sin. *Coffea robusta*) (Gichuru *et al.*, 2008).

El cultivo, procesamiento, comercio, transporte y comercialización del café proporciona empleo a millones de personas en todo el mundo. El café tiene una importancia crucial para la economía y la política de muchos países en desarrollo ya que las exportaciones de café representan una parte sustancial de sus ingresos en divisas, en algunos casos más del 80 %. El café es un producto básico que se comercia en los principales mercados de materias primas y de futuros, muy en especial en Londres y Nueva York (ICO, 2019b).

La Organización Internacional del Café (2019a) reporta que para el año 2018 la producción mundial de los países exportadores de café fue de 169 063 miles de quintales, lo que representó un incremento del 5.1 % en relación con el año 2017.

De acuerdo con las estadísticas elaboradas por la FAOSTAT (2019a), el café verde ocupó el lugar 16 en importancia dentro de los principales productos de importación a nivel mundial durante 2016, con 20 084 964.00 miles de dólares, siendo Estados Unidos el principal importador.

El cafeto llegó a México a finales del siglo XVIII y se desarrolló y expandió durante el siglo XIX como cultivo de plantación. La cafecultura es una actividad de gran importancia económica, social, cultural y ambiental en México. Entre los beneficios más relevantes del cafeto están la generación de divisas y empleos, el desarrollo de diversas zonas productoras distribuidas en la región centro sur y los beneficios ambientales asociados al cultivo que se desarrolla bajo sombra (Zamarripa-Colmenaro y Escamilla-Prado, 2002).

De acuerdo con las estadísticas de la FAOSTAT (2019b), México se posiciona en el onceavo lugar como productor a nivel mundial con un promedio de 153 mil 794 toneladas anuales en el año 2017.

Asimismo, México es un país exportador de café; de 2016 a 2017 la producción exportada se incrementó en 22.01 %, la cual fue de 3 057 miles de quintales en relación con el año 2016 (ICO, 2019c). Dentro de los alimentos principales que México exporta al mundo, el café ocupa el lugar número 44 en cuanto a cantidad. Sin embargo, a nivel mundial ocupa el lugar número 16 en relación con el valor generado por las exportaciones, con 300.984 millones de dólares en el año 2016 (FAOSTAT, 2019a).

Respecto a la situación actual de este cultivo, los últimos datos del SIAP (2019) muestran que en México durante el año 2018 se sembraron 711 526 has de café, con un rendimiento promedio de 1.353 toneladas por hectárea.

2.2. Enfermedades del café

Las enfermedades disminuyen los rendimientos de los cultivos, lo que provoca que los agricultores sufran pérdidas económicas. El tipo y monto de las pérdidas ocasionadas por las enfermedades de las plantas varía de acuerdo con la especie de planta o los productos que se obtienen de ella, así como del agente patógeno, la localidad, el medio ambiente, las medidas de control, etc.; el monto de las pérdidas puede ser mínimo o representar hasta el 100 % en casos extremos (Agrios, 2005).

Muchas de las enfermedades que afectan al cultivo de café son causadas por patógenos co-evolucionados que se han desarrollado y especializado con la evolución del género *Coffea* en su centro de diversidad en África. Adicionalmente existen los patógenos no co-evolucionados, los cuales son hospedantes menos específicos, sin embargo, pueden causar daños significativos, tales como el hongo *Mycena citricolor* causante de la enfermedad conocida como ojo de gallo y algunos nemátodos (Waller *et al.*, 2007).

Otras enfermedades importantes en el cultivo del café son la enfermedad de las cerezas (*Colletotrichum kahawae*), marchitez del café (*Fusarium xylarioides*, teleomorfo: *Gibberella xylarioides*), y la roya de la hoja del café (*Hemileia vastatrix*) (Avelino *et al.*, 2018).

El impacto de los agentes causantes de enfermedades en el café varía considerablemente debido a las diferentes reacciones frente a condiciones ambientales específicas (Muller *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Granados *et al.* (2014) sobre la variación climática en México, se prevé que las condiciones de humedad que se presentarán a futuro favorecerán la proliferación de plagas, hongos y enfermedades en las regiones del Golfo de México que actualmente se dedican a la producción de café. Por lo que resulta adecuado definir estrategias efectivas para el control de estos agentes que reducen de manera significativa la producción cafetalera.

2.3. La roya del café

La roya del café es la enfermedad de mayor importancia económica que afecta a este cultivo en el mundo, ocasionando fuertes pérdidas debido a que el café es uno de los productos agrícolas más importantes en el comercio internacional. Por lo que una pequeña reducción en la producción de café o un modesto aumento en los costos de producción para el control químico de la roya tienen un gran impacto en los productores de café, en los servicios de apoyo, e incluso en los sistemas bancarios de los países cuyas economías dependen en gran medida de las exportaciones de café (APS, 2011).

La roya del café es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, un parásito obligado que afecta la vida de las hojas del género *Coffea*. El hongo es un patógeno co-evolucionado en África y ataca las especies de *Coffea*, cultivadas y silvestres; sin embargo, afecta de manera más severa a *C. arabica* (CMI, 1989; citado por Waller y Hillocks, 2007).

Uno de los principales síntomas de esta enfermedad es la defoliación, que cuando se agudiza, puede causar la muerte de ramas y con ello generar grandes pérdidas en el cultivo. La forma infecciosa de la enfermedad es la uredospora. Los primeros síntomas son lesiones pequeñas amarillas que aparecen en el envés de las hojas, que se producen cuando el hongo ha penetrado a través del estoma. Estas lesiones crecen, coalescen y producen uredoporas de un distintivo color naranja. Asimismo, se observan manchas cloróticas sobre la superficie de las hojas. Durante el último estado de la enfermedad, estas lesiones llegan a ser necróticas (Avelino *et al.*, 2015).

El desprendimiento prematuro de las hojas reduce la capacidad fotosintética de la planta y con ello restringe el crecimiento de nuevos tallos sobre los cuales se cultivaría la cosecha de la siguiente estación. Por lo que la severidad de la enfermedad durante el año afectará directamente el potencial de cultivo del año siguiente; la enfermedad tiene un efecto debilitante insidioso en la planta, el cual se expresa durante las estaciones subsecuentes. Por lo que cuando la incidencia de este hongo alcanza proporciones epidémicas puede ocasionar que el cultivo de café en esas regiones deje de ser rentable en las áreas infestadas (Kushalappa, 1989; citado por CABI, 2017).

La roya de la hoja afecta a varios países productores de café y puede causar pérdidas económicas de entre 10 a 40 % (Silva *et al.*, 2006). En México, el primer reporte de la presencia de roya fue en el año 1981, en el estado de Chiapas, presentándose en 180 localidades del estado (Vázquez, 1983). El incremento de la presencia de roya en México se evidenció a finales del año 2012, con tasas epidémicas e incidencias estimadas hasta del 100 % (Mora *et al.*, 2014).

En nuestro país la roya del café cumple con la definición de plaga cuarentenaria, ya que se encuentra presente bajo control oficial en el país y puede causar pérdidas económicas en cultivos hospedantes. Esta plaga se encuentra regulada desde diciembre de 1996 por la NOM-019-FITO-1996, en la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del café (SENASICA, 2016).

2.4. Control de la roya

Las estrategias para el control de la roya del café han seguido cuatro líneas principales: bioprospección, control químico, mejora genética para la resistencia y control agroecológico.

A medida que la roya se extendió a través de la cuenca del Océano Índico a fines del siglo XIX, científicos y agricultores se embarcaron en un proceso de bioprospección local y mundial. La búsqueda de plantas de café resistentes a la roya comenzó en los inicios de la epidemia; esta búsqueda de resistencia genética transformó la economía mundial del café mediante la creación de un nuevo segmento en el mercado mundial basado en el café Robusta (*C. canephora*). Los agricultores tuvieron que adoptar el control químico para poder seguir cultivando arábicas susceptibles. Aunque el control químico de la roya del café tiene sus raíces en el siglo XIX, los agricultores sólo lo adoptaron ampliamente después de 1945. Anteriormente, los plantadores de café en algunas áreas habían usado fungicidas de azufre y cobre para controlar la roya, sin embargo esta forma de control sólo era viable en áreas pequeñas. Corporaciones químicas globales como Bayer, BASF y Syngenta han desarrollado una amplia gama de fungicidas, algunos de los cuales han demostrado ser efectivos para controlar la roya del café. El surgimiento de la genética mendeliana dio a los mejoradores un nuevo modelo de herencia y, por lo tanto, nuevas herramientas para el mejoramiento de cultivos. El mejoramiento genético del café de manera sistematizada comenzó en serio a mediados del siglo XX, una vez que se establecieron las instituciones permanentes de investigación del café. Los enfoques agroecológicos para el control de la

enfermedad se han centrado en la modificación del ecosistema agrícola, por ejemplo, mediante el uso de sombra, cultivos intercalados o a través de control biológico; estos enfoques, así como la búsqueda continua de material más resistente para contrarrestar la evolución casi inevitable de la roya, han sido los principales enfoques entre los investigadores (McCook & Vandermeer, 2015).

2.5. Resistencia genética del café a la roya

Uno de los roles más importantes en el desarrollo y distribución de materiales resistentes a roya ha sido llevado a cabo por el Centro de Investigaciones de la Roya de Café (CIFC por sus siglas en portugués). Este centro fue establecido en 1955 y sus objetivos han sido realizar estudios fundamentales sobre especialización fisiológica de *H. vastatrix*, incluyendo selección y mantenimiento de plantas diferenciales de café y razas de roya; de manera que se llevan a cabo investigaciones sobre genética y fisiología de la resistencia a roya, sobre el ciclo de vida de la roya del café y también tienen como funciones llevar a cabo revisiones de rutina y distribuir materiales de café a programas de mejoramiento (Kushalappa y Eskes, 1989).

Un gran avance en el programa de mejoramiento de plantas del CIFC fue el descubrimiento a finales de los años cincuenta del Híbrido de Timor (HDT), una sola planta encontrada en la antigua colonia portuguesa de Timor. Sorprendentemente, la mayoría de los descendientes de HDT mostraron resistencia a algunas o a todas las razas de roya conocidas. Se ha demostrado que el HDT es un híbrido natural entre *C. arabica* y *C. canephora* y que ha recibido de ésta los genes responsables de la resistencia a la roya. Este híbrido interespecífico tiene el mismo número de cromosomas que *C. arabica* y los cruces con esta especie son fértiles. El programa de mejoramiento del CIFC se basó esencialmente en la utilización de HDT como un padre donador resistente. La investigación fundamental y aplicada desarrollada en el CIFC sobre la roya, así como los estudios realizados en varios países productores de café, condujeron a avances sustanciales hacia la obtención de resistencia duradera a esta enfermedad en *C. arabica* (Silva *et al.*, 2006).

La interacción planta-patógeno es un mecanismo que implica la activación de señales que a veces da como resultado una respuesta de defensa rápida de la planta contra una serie de patógenos. Esta respuesta ayuda a la planta huésped a evitar una mayor infección del agente causal. Los fitopatógenos producen ciertas moléculas llamadas “efectores”, codificadas por los genes Avr (avirulencia), que se administran directamente a las células de la planta durante la etapa inicial de la infección. Estos efectores cambian el estado fisiológico de la planta huésped para favorecer la colonización por parte de los patógenos o pueden actuar interrumpiendo la activación de las defensas de la planta huésped. Sin embargo, algunas plantas han desarrollado una forma de inmunidad que se basa en la percepción de estas sustancias por proteínas de resistencia del hospedante, llamada resistencia a patógenos mediada por genes R. En las relaciones gen por gen, una planta que porta un gen de resistencia resiste las razas de los patógenos con los efectores correspondientes. Por lo que los efectores que se encuentran en bacterias, virus, nematodos, hongos, oomicetos e insectos pueden provocar una respuesta de resistencia en una planta huésped (Gururani *et al.* 2012).

Los estudios de herencia de la resistencia a la roya llevados a cabo en CIFC han demostrado que la teoría del gen-a-gen es aplicable a las interacciones café-roya (Noronha-Wagner y Bettencourt 1967; citados por Silva *et al.*, 2006). La resistencia de las plantas de café está condicionada por al menos nueve genes dominantes mayores (SH1-SH9), solos o asociados. Por lo que la teoría gen a gen permite inferir que deben existir 9 genes de avirulencia (v1-v9) en *H. vastatrix*. Los genes SH1, SH2, SH4 y SH5 se han encontrado en materiales de *C. arabica* procedentes de Etiopía; se considera que el gen SH3 proviene de *C. liberica*, mientras que los genes SH6, SH7, SH8 y SH9 sólo se han encontrado en el Híbrido de Timor (HDT: *C. arabica* x *C. canephora*), donde se ha propuesto que los genes de resistencia proceden de la especie *C. canephora* (café tipo Robusta). Se ha planteado que además de los genes SH es probable que otros genes mayores y menores puedan condicionar las interacciones café-roya (Bettencourt y Rodrigues Jr., 1988; citados por Silva *et al.*, 2006).

Los genotipos de café se han clasificado en grupos fisiológicos que se distinguen entre sí esencialmente por sus respuestas que implican resistencia completa o susceptibilidad (tipo de infección baja o alta) a varias razas de roya (Silva *et al.*, 2006). La mayoría de los arábicas cultivados poseen el gen SH5, y constituyen lo que se ha llamado el grupo de resistencia E. La resistencia proporcionada por el gen SH5 es vencida por el factor de virulencia v5 presente en la raza II, así como en otras razas donde este factor se encuentra asociado de diferentes formas a otros factores de virulencia. Por estas razones se considera que el gen SH5 tiene poco valor para el mejoramiento genético. Se ha visto que la variedad hindú “Kent” es portadora del gen de resistencia SH2, el cual se asocia suplementariamente a SH5. Este gen fue encontrado también en otras accesiones que conforman en conjunto el grupo de resistencia denominado D. En Etiopía, se han encontrado los otros dos genes de resistencia SH1 y SH4, solos o en combinaciones con SH5. Por lo que constituyen los siguientes grupos de resistencia: α (SH1), C (SH1, SH5), γ (SH4), J (SH4, SH5), I (SH1, SH4), W (SH1, SH4, SH5), y L (SH1, SH2, SH5). El gen de resistencia SH3 proviene del *C. liberica*. Cuando se asocia a SH5, éste conforma el grupo de resistencia G, mientras que en asociación con SH5 y SH2, integra el grupo H. Los últimos cuatro genes de resistencia: SH6, SH7, SH8 y SH9 tienen su origen en *C. canephora*. A la fecha se han identificado Varios grupos de resistencia que poseen estos cuatro genes. El grupo de resistencia A es representado por el híbrido de Timor 832/1 (híbrido natural entre un *C. arabica* y un *C. canephora* originario de la isla de Timor). Éste tiene al menos los cuatro genes de resistencia identificados en *C. canephora* y posiblemente otros más no identificados. Esto lo ha convertido en una fuente de resistencia privilegiada para los programas de mejoramiento. Diferentes combinaciones de estos cuatro genes conforman los grupos denominados R, 1, 2, y 3 (Avelino y Rivas, 2013).

En contraste, los genes de resistencia identificados en el tetraploide *C. arabica*, ya sea solos o en combinaciones, no han proporcionado una resistencia duradera a la mayoría de las razas de roya. Mientras que, los genes

introgresados a partir de las especies diploides, como es el caso del gen SH3 procedente de *C. liberica*, así como ciertos genes provenientes de *C. canephora*, proporcionan una protección más duradera en campo. Por lo que algunos de los enfoques prometedores para la obtención de resistencia genética duradera a la roya serían la piramidalización de genes de resistencia introgresados de especies diploides de café en los genotipos más productivos de *C. arabica* seleccionados o su uso en variedades compuestas. Sin embargo, la introgresión combinada de varios genes de resistencia en cultivares excepcionales siguiendo enfoques de reproducción tradicionales parece ser una tarea difícil de realizar en un plazo aceptable. Además, la caracterización de los genes que confieren resistencia en genotipos individuales por medios convencionales es un proceso laborioso y que requiere tiempo, debido a la serie de inoculaciones que deben realizarse a los clones diferenciales de café (Prakash *et al.*, 2011).

2.6. Mejoramiento genético asistido ante la roya del café

La conservación y utilización de los recursos genéticos es de importancia estratégica para la humanidad. Actualmente existe un gran número de colecciones de germoplasma que contienen genotipos con un alto valor agronómico, con potencial para ser usados en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, en muchas ocasiones el conocimiento de la organización genética y la relación existente entre el material disponible es escaso, lo que limita su utilización en fitomejoramiento (Becerra y Paredes, 2000).

En el caso de la resistencia genética a la roya del café es conveniente implementar una iniciativa a nivel mundial concebida con el objetivo de desarrollar variedades resistentes a la enfermedad. Este hongo ha demostrado una alta capacidad para evolucionar y superar los genes de resistencia en la planta. Sin embargo, el desarrollo de cultivares resistentes sigue siendo probablemente la mejor estrategia a largo plazo para controlar esta enfermedad. Por lo que el uso de la resistencia parcial y la resistencia efectiva

proporcionada por los principales genes debe ser una prioridad en los programas de mejoramiento (Avelino *et al.*, 2015). La disponibilidad de marcadores moleculares ligados a los genes SH podría ser extremadamente útil para el análisis rápido de los espectros de resistencia y el seguimiento de genes de resistencia individuales, facilitando la mejora asistida por marcadores para el desarrollo de cultivares con resistencia duradera al patógeno de la roya del café (Prakash *et al.*, 2011).

Existen varios estudios sobre la utilización de marcadores moleculares en la selección de genotipos resistentes a roya; así, González *et al.* (2009) reportan la validación de dos SCAR's y un microsatélite que estuvieron ligados consistentemente al gen SH3. Estos investigadores señalan que la selección asistida por marcadores, complementada por evaluaciones de otras características agronómicas y de calidad de taza, deberán conducir a la obtención de líneas élite de elevado valor comercial. Romero *et al.* (2014) analizaron la generación F₂ de la cruce entre la variedad Caturra (susceptible) y el Híbrido de Timor (resistente) y mediante la utilización de 4 SSR's identificaron un QTL en el cromosoma 4 de *Canephora* correspondiente a un nuevo locus de SH que podría ser piramidado junto con los genes de resistencia previamente identificados. Por su parte Mahé *et al.* (2008) desarrollaron 10 marcadores caracterizados por secuencia que incluyeron SCAR's y SSR's a partir de marcadores AFLP usados previamente por Prakash *et al.* (2004). Éstos parecen estar estrechamente relacionados con el gen de resistencia a la roya de la hoja SH3, por lo que los proponen como útiles para el MAS y en estudios de mapeo fino, así como para clonar el gen o genes SH3. Por su parte de Brito *et al.* (2010) identificaron 3 marcadores moleculares tipo AFLPs asociados al gen de resistencia a la raza II, indicando que estos marcadores son los primeros identificados en el Híbrido de Timor que pueden ser usados para la selección asistida en programas de mejoramiento genético.

Diola *et al.* (2010) desarrollaron 6 marcadores tipo SCAR a partir de 25 marcadores AFLP's estrechamente vinculados a un gen dominante de

resistencia a la raza II de la roya del café, por lo que dichos marcadores constituyen una herramienta esencial para su aplicación en la selección asistida por marcadores (MAS) para aumentar la eficiencia de la selección. Por su parte Prakash *et al.* (2011) trabajaron con dos marcadores de ADN caracterizados por secuencia estrechamente relacionados con el gen SH3, el análisis con ambos marcadores SCAR proporcionó perfiles de amplificación claros que podían distinguir la presencia o ausencia del gen SH3. La relación de los marcadores con el gen y el rasgo de interés se confirmó mediante bioensayos al detectar la reacción de las plantas contra razas de roya específicas (razas I y VIII). En otro trabajo Alkimin *et al.* (2017), validaron 3 marcadores tipo SCAR propuestos por Diola *et al.* (2010), así como 3 marcadores SCAR y un SSR ligados al gen SH3 propuestos por Mahé *et al.* (2008). Ellos encontraron que dichos marcadores permitieron seleccionar eficientemente individuos de *C. arabica* homocigóticos para el gen de resistencia SH3 (introducido de *C. liberica*) y otro gen mayor de resistencia SH? proveniente del Híbrido de Timor.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

El material utilizado en el presente trabajo fueron 95 variedades de café del banco de germoplasma del Centro Regional Universitario Oriente (CRUO) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), ubicado en Huatusco, Veracruz. De cada variedad seleccionada se colectaron folíolos jóvenes o primordios de hoja, de tal manera que al menos se obtuvieran 0.9 gramos de cada variedad. En total se colectaron 89 variedades catalogadas como resistentes y 6 susceptibles a roya para que actuaran como control.

Las muestras obtenidas se etiquetaron debidamente y se trasladaron bajo condiciones de refrigeración al laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Departamento de Fitotecnia para ser procesadas.

3.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó la metodología CTAB establecida por Doyle y Doyle (1987), con algunas modificaciones. Al amortiguador de extracción se le agregó 2-mercaptoetanol de tal manera que se tuviera una concentración final de 0.2 %.

El material vegetal se lavó con alcohol al 70 % para posteriormente pesar 0.3 g de muestra vegetal seca. Esta cantidad se procesó con nitrógeno líquido y se molió en un mortero hasta obtener un polvo fino el cual se transfirió a un microtubo de 1.5 mL, con 600 µL de amortiguador precalentado a 65°C en un termoblock Thermo Scientific®. Se realizó agitación de los tubos para homogeneizar la mezcla, y se volvieron a colocar en el termoblock a 65° C por 20 minutos.

Posteriormente se agregó a cada muestra 200 µL de acetato de potasio 5 M y se enfrió en hielo por 30 minutos. Una vez realizado lo anterior, cada muestra se colocó en una centrifuga Thermo Scientific® durante 15 minutos a 12 000 xg. Se rescató y transfirió el sobrenadante a otro microtubo con 600 µL de

cloroformo, la mezcla se homogeneizó con agitación suave durante 2 minutos. Se volvió a centrifugar a 10 000 xg por 10 minutos; el sobrenadante se transfirió a un microtubo con 600 µL de isopropanol frío, se agitó suavemente por inversión y se dejó a -20° C por 30 minutos para precipitar el ADN.

Después se volvió a centrifugar cada muestra a 6 000 xg durante 5 minutos y se decantó, cuidando de no perder la pastilla precipitada, para después agregar 700 µL de STE para disolver la pastilla de ADN. Posteriormente se agregaron 4 µL de ARNasa y se incubó en el termoblock a 37° C durante una hora; después de esto se precipitó el ADN por dos horas con 75 µL de acetato de sodio 3 M y 500 µL de isopropanol frío. Se volvió a centrifugar cada muestra a 8 000 xg por 5 minutos, se decantó y se agregó etanol grado reactivo al 70 % para lavar la pastilla. Otra vez se centrifugó cada muestra a 8 000 xg por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el microtubo a temperatura ambiente y después se colocó un momento en el termoblock a 37° C para que las paredes del tubo quedaran completamente secas. Por último, a cada muestra se le agregaron 50 µL de TE para que se disolviera el ADN y se almacenó a 4° C.

3.3. Evaluación de cantidad y calidad de ADN

Para determinar la cantidad de ADN (ng µl⁻¹) en cada una de las muestras procesadas se utilizó un Nanodrop Lite marca Thermo Scientific®, una vez determinadas las cantidades se procedió a realizar los cálculos necesarios para hacer diluciones y obtener una concentración final homogénea en todas las muestras de 10 ng µl⁻¹ de ADN.

La calidad de ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, éste fue teñido con bromuro de etidio y documentado en un fotodocumentador Digidoc-It® Imaging System. Asimismo, se realizó una prueba con el gen 16S para comprobar la integridad del ADN vegetal de las muestras; para visualizar la amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % por 1 hora a 180 voltios, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se documentó.

El gen 16S se amplificó con un volumen total de reacción de 25 µL por muestra conteniendo 200 µM de dNTPs (10 µL), 1x de amortiguador (2.5 µL), 3 mM de MgCl₂ (1.5 µL), 1.5 u/reacción de enzima (Taq polimerasa marca Invitrogen®, 0.3 µL), 10 ng/reacción de cada iniciador (Forward y Reverse), 25 ng/reacción de ADN (2.5 µL) con concentración de 10 ng·µl⁻¹ y 6.2 µL de agua grado biología molecular.

3.4. Detección de genes de resistencia a roya en variedades de café

3.4.1. Iniciadores

Para la detección de genes de resistencia a la roya del café, en el presente estudio se utilizaron 10 pares de iniciadores (9 SCAR's y 1 ISSR) que fueron probados en otros trabajos de investigación sobre este tema y que permitieron amplificar exitosamente la banda correspondiente o asociada con un gen de resistencia a *Hemileia vastatrix*. Las secuencias y su fuente se presentan en el Cuadro 1.

Con objeto de obtener bandas bien definidas, fue necesario variar las temperaturas de alineamiento tomando como referencia la temperatura reportada en el estudio de origen.

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores utilizados en café para la detección de genes de resistencia a *Hemileia vastatrix*.

Secuencias (5'→3')		Descripción	Fuente
HVD1-F	F: CAAGCCGATCATAACTTATC	SCAR obtenidos de AFLP's.	Diola <i>et al.</i> (2011)
HVD1-R	R: TGGTGGAGAATTCCTTCAG		
HVD2-F	F: CATCGCCAGGTCATGTTC		
HVD2-R	R: ATCTTCAATCGGAGTAACAC		
HVD3-F	F: CTGATACGGGCAATCTTATC		
HVD3-R	R: GTAGATCTGGAAGCTCTTC		
HVD4-F	F: GATATCGCGCTTATGACAC		
HVD4-R	R: CTGATTGGATACTCTGACG		
HVD5-F	F: CAACACTGGTAGACTCGG		
HVD5-R	R: ACTACTGACTTCAGGACAC		
HVD6-F	F: CTCAAAGACAATCTCAGTGG	SSR y SCAR obtenido de BACs ligados en acoplamiento al gen SH3.	Prakash <i>et al.</i> (2011)
HVD6-R	R: CGTTGGTTGCCGATGATG		
HVP1-F	F: GCATGTGCTTTTGTATGTCGT		
HVP1-R	R: GCATACTAAGGAAATTATCTGACTGCT	SCAR's obtenidos de BAC's ligados al gen SH3.	Ribas <i>et al.</i> (2011)
HVP2-F	F: TGATTCGCTTGTGTGTCGAG		
HVP2-R	R: TGCAGATTGATGGCACGTTA		
HVRib1-F	F: CCTTGATAAGAAACATGAATGAAATACACGA		
HVRib1-R	R: AAGGATAAATGAGAAGAACTACTGAGCCTG		
HVRib2-F	F: CGACAGTGGGAACGAAACCC		
HVRib2-R	R: TGGAGGACCGGATCATGAACA		

3.4.2. Componentes y condiciones de reacción

Los componentes de la PCR fueron los mismos para todos los iniciadores con un volumen final de 25 µl (Cuadro 2). Los ciclos y temperaturas para la amplificación también fueron los mismos con excepción de la temperatura de alineamiento, la cual fue específica para cada par de iniciadores (Cuadro 3).

Cuadro 2. Componentes de la mezcla de reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction) para la amplificación de secuencias ligadas a genes de resistencia a roya del café.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Reacción 1X (Vol final 25 μ L)
H ₂ O			4.2 μ L
dNTPs	500 μ M	200 μ M	10.0 μ L
Amortiguador	10x	1x	2.5 μ L
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1.5 μ L
Iniciador F (Forward)	10 ng. μ L ⁻¹	20 ng/reacción	2 μ L
Iniciador R (Reverse)	10 ng. μ L ⁻¹	20 ng/reacción	2 μ L
Taq ADN polimerasa	5 U. μ L ⁻¹	1.5 U/reacción	0.3 μ L
ADN	10 ng. μ L ⁻¹	25 ng/reacción	2.5 μ L

Cuadro 3. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación por PCR de secuencias ligadas a genes de resistencia a roya del café.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Presdesnaturalización	94	1 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	40
Alineamiento	...	1 min	40
Extensión	72	20 seg	40
Extensión final	72	6 min	1
Enfriamiento	4	∞	

En el presente estudio, además de las 89 variedades a evaluar para detectar la presencia de genes de resistencia a roya del café, se incluyeron como control negativo 6 variedades reportadas como susceptibles a este patógeno, las cuales fueron: Typica Xanthocarpa, Caturra Rojo, Blue Mountain, Bourbon rojo, Pluma Hidalgo y Maragogipe. Estas variedades se evaluaron en las mismas condiciones y con los mismos iniciadores que para el resto de las accesiones.

Las bandas amplificadas se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Como referencia en el primero y último pozos se cargó un marcador de peso molecular de 1 Kb Ladder de Invitrogen®. En cada pozo del gel se cargó 8 μ l del producto de amplificación más 2 μ L del colorante azul de

bromofenol. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con un fotodocumentador.

3.5. Observación de síntomas de roya en campo

Con objeto de corroborar que la presencia de genes de resistencia detectada en el laboratorio coincidiera con el comportamiento de las variedades en campo, durante el mes de octubre de 2018 se realizaron observaciones dentro del banco de Germoplasma de Café del CRUO, con sede en Huatusco, Veracruz.

Las observaciones de presencia de roya se realizaron tratando de cubrir toda el área foliar en cada planta; los resultados se reportaron utilizando el sistema binario de presencia (1) y ausencia (0), catalogando como presente al observar la presencia de síntomas en al menos una hoja de alguna planta.

3.6. Purificación y secuenciación de productos de PCR

A partir de los resultados obtenidos de las observaciones en campo de la presencia de síntomas de roya de la hoja se realizó la selección de variedades que presentaron en laboratorio la amplificación de secuencias ligadas a genes de resistencia a roya y que en campo no exhibieran síntomas ocasionados por la roya del café. Posteriormente se realizó una segunda selección con base en la importancia comercial de las variedades. Adicionalmente se escogieron las variedades de café catalogadas como susceptibles que presentaron algún fragmento amplificado en el laboratorio. En los materiales seleccionados se procedió a realizar una segunda amplificación utilizando los mismos componentes de la mezcla de reacción de PCR y ciclos de amplificación detallados anteriormente. Sin embargo, como el objetivo de esta segunda amplificación era realizar la secuenciación de los fragmentos amplificados, para la PCR se empleó una enzima polimerasa de alta fidelidad (Platinum Taq High Fidelity marca Invitrogen™). La presencia de los productos de amplificación se visualizó en geles de agarosa al 1.5 %.

Una vez realizada la PCR se procedió a purificar los amplicones mediante el kit de purificación Pure Link ® marca Invitrogen™. Los productos purificados se enviaron a MacroGen Corp USA para obtener las secuencias de los fragmentos obtenidos en ambas direcciones (Forward y Reverse).

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación se analizaron y editaron mediante el programa Chromas versión 2.6.6. Posteriormente, las secuencias se ensamblaron con la opción SeqMan Pro 15 y se alinearon con la opción MegAlign Pro 15, del programa DNASTAR Lasergene 15.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Calidad de ADN

Como paso previo a la amplificación del ADN para la búsqueda de genes de resistencia, se procedió a evaluar la calidad de ADN nuclear obtenido a partir del método de extracción CTAB (Doyle y Doyle, 1987) en un gel de agarosa al 0.8 %. Los resultados alcanzados se presentan en la Figura 1. En ella se aprecia que en varias colectas no se observó la presencia de la banda de ADN esperada. Este resultado coincide con lo establecido por Haley *et al.* (2014), quienes señalan que las hojas de especies del género *Coffea* acumulan contaminantes (polisacáridos y fenoles) que dificultan la acción de la taq ADN polimerasa durante el proceso de la PCR. Por lo que se decidió utilizar una estrategia alternativa que fue realizar la amplificación del gen ribosomal cloroplástico 16S, la cual es más sencilla de ejecutar ya que se lleva a cabo dentro de un amplio rango de temperaturas (Heinze, 2007). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2, en la cual se observa que la mayoría de las colectas presentaron amplificación.

Estos resultados sugieren que el método CTAB de extracción de ADN no fue eficiente para obtener ADN de buena calidad en plantas de café, por lo que para estudios posteriores se podrá mejorar su efectividad mediante la adición de polímeros como la polivinilpilorridona (PVP).

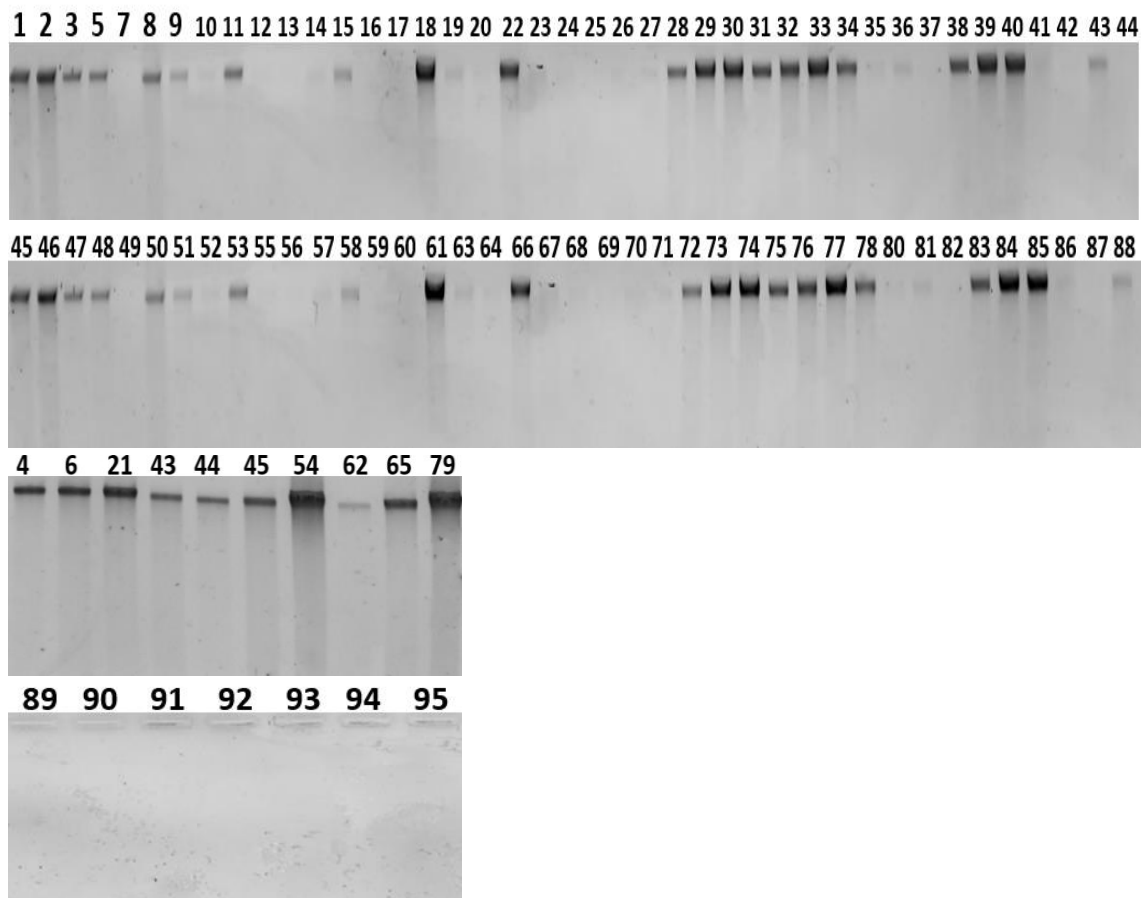


Figura 1. Gel de calidad de ADN nuclear de 95 colectas de café obtenido con la metodología de extracción CTAB.

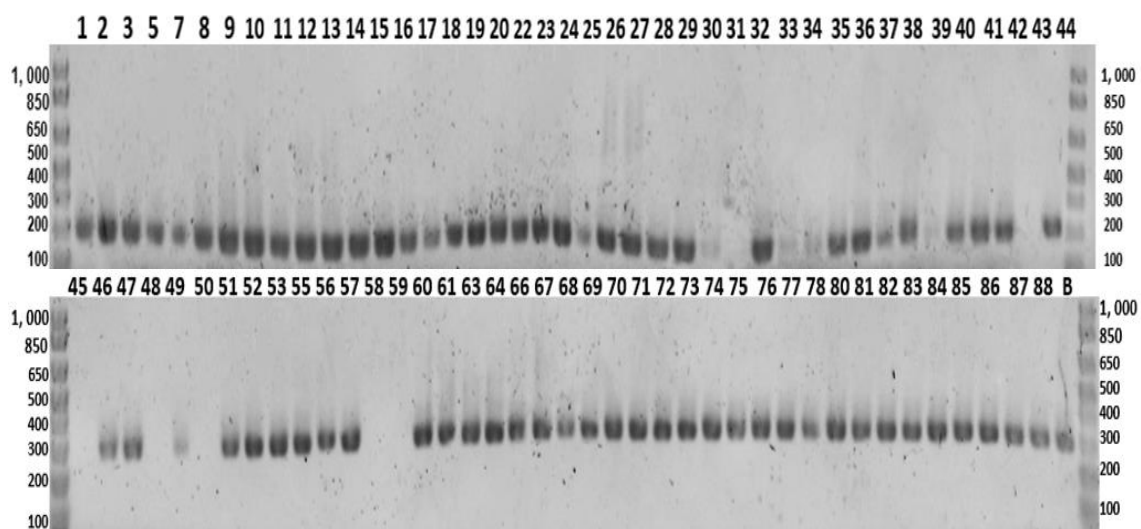


Figura 2. Amplificación del gen ribosomal cloroplástico 16S en 95 colectas de café.

4.2. Detección de genes de resistencia

Como primer paso para la detección de genes de resistencia se procedió a probar en 10 de las accesiones de café los 10 pares de iniciadores (Forward y Reverse) presentados en el Cuadro 1. Sin embargo, al realizar el protocolo de PCR se observó que cinco de ellos no produjeron amplificación, incluso probando con distintas temperaturas de alineamiento, por lo que se procedió a evaluar las 95 accesiones sólo con los cinco pares de iniciadores que mostraron amplificación en las pruebas iniciales. La nula amplificación o amplificación inespecífica que se observa en ocasiones al usar algunos iniciadores sugiere problemas de reproducibilidad de éstos, los cuales, de acuerdo con Singh y Singh (2015) pueden deberse a la formación de "amplicones híbridos" y dímeros de iniciadores, los cuales pueden producir resultados erróneos debido a problemas de contaminación del ADN, ya que algunos contaminantes actúan como inhibidores de PCR, tal como las partículas de ácido húmico que pueden acarrear algunas muestras y/o reactivos, pues según lo indicado por Opel *et al.* (2010), puede inhibir la reacción de PCR mediante la unión específica de secuencia al ADN, limitando la concentración de plantilla disponible. Asimismo, el daño térmico puede explicar la reducción en los rendimientos de la PCR, siendo la depurinación una reacción que juega un papel importante cuando hay daño térmico en el ADN, resultando en la inserción de nucleótidos incorrectos en la cadena complementaria de ADN durante la amplificación (Pienaar *et al.*, 2006).

El uso de los iniciadores SCAR's (Regiones Amplificadas Caracterizadas y Secuenciadas) HVD1-F/HVD1-R permitió obtener la amplificación de una banda de aproximadamente 100 pb en 47 de las 95 accesiones, la cual no estuvo presente en ninguna de las 6 accesiones susceptibles (Figura 3). Por lo que a pesar de que la banda blanco reportada por Diola *et al.* (2011) es de 533 pb, se puede pensar que la banda obtenida en el presente estudio representa un segmento de ADN ligado a algún gen de resistencia a *H. vastatrix*.

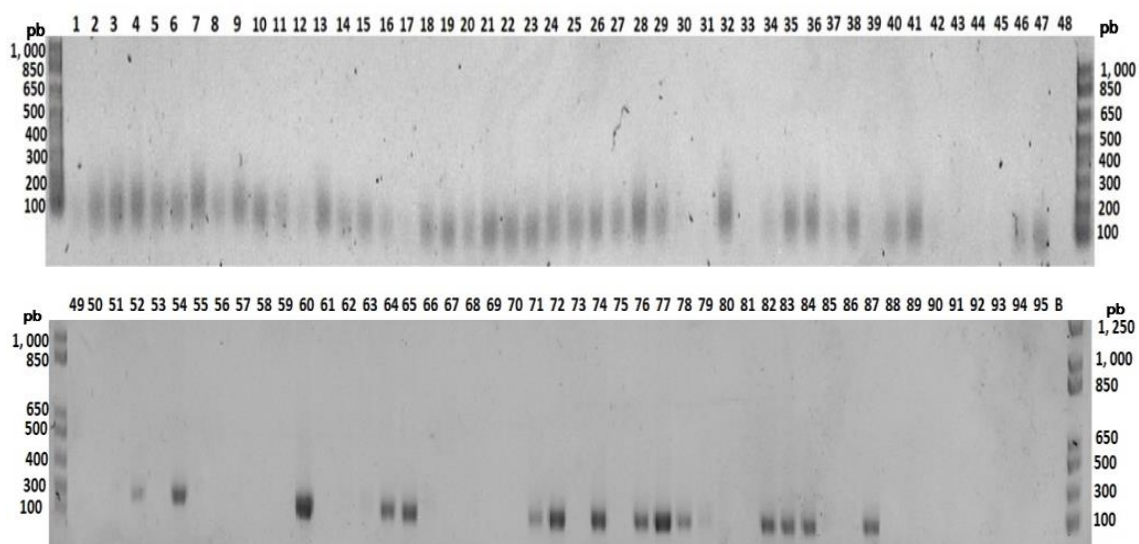


Figura 3. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a *H. vastatrix* obtenido mediante el uso de iniciadores SCAR's HVD1-F/HVD1-R

La utilización de los iniciadores SCAR's HVD2-F/HVD2-R permitió la amplificación de una banda de 298 pb reportada por Diola *et al.* (2011) como asociada a algún gen de resistencia en café (Figura 4). En el patrón electroforético se observa que en 79 de las 89 accesiones reportadas como resistentes se presenta esta banda, lo cual sugiere que todos estos materiales contienen algún gen de resistencia de la serie SH. Sin embargo, las accesiones 89 (Typica Xantocarpa) y 93 (Pluma Hidalgo) reportadas como susceptibles a esta enfermedad, presentaron también la banda de resistencia. Este resultado pudo deberse a errores durante la ejecución de la PCR, ya que de acuerdo con Potapov y Ong (2017), durante el proceso de amplificación se pueden producir errores en la acción de la Taq polimerasa, los cuales aunque en su mayoría son sustituciones, también con una frecuencia del 0.1 % pueden presentarse inserciones que conducen a una amplificación inespecífica. Con objeto de comprobar si se trató de amplificaciones inespecíficas se extrajeron las bandas amplificadas en estas dos accesiones y se mandaron a secuenciar. Asimismo, de acuerdo con Souza (2008), las variedades de *C. arabica* a pesar de ser autógamas, pueden llegar a presentar hasta un 10 % de polinización cruzada. Si se considera la polinización entomófila ésta se lleva a cabo por diferentes

especies de abejas (Ngo *et al.*, 2011), por lo que se podría haber presentado recombinación genética que hubiese resultado en resistencia a la enfermedad. De manera que para descartar esta última posibilidad se decidió realizar la inspección de las variedades de café en campo. Sin embargo, en ésta se corroboró que ambas accesiones (89 y 93) presentaron síntomas de roya (Cuadro 5).

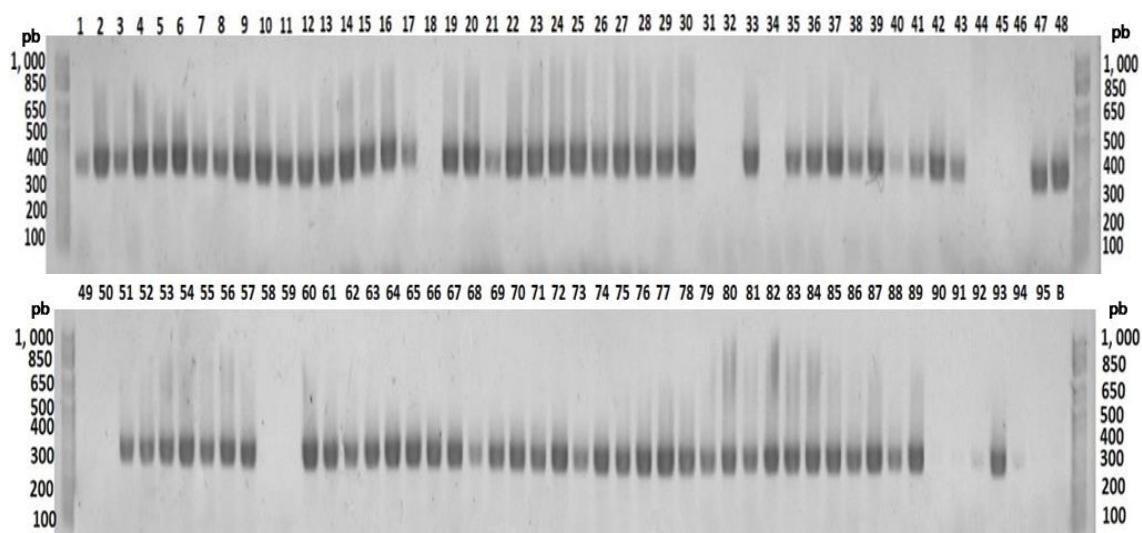


Figura 4. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a *H. vastatrix* obtenido mediante el uso de iniciadores SCAR's HVD2-F/HVD2-R.

El par de iniciadores SCAR's HVD5-F/HVD5-R amplificaron una banda de 264 pb que de acuerdo con Diola *et al.* (2011) está asociada a algún gen de resistencia a la roya del café (Figura 5). Esta banda se presentó en 66 de las 89 variedades reportadas como resistentes; sin embargo, también se presentó nuevamente en las variedades susceptibles Typica Xantocarpa (accesión 89) y Pluma Hidalgo (accesión 93).

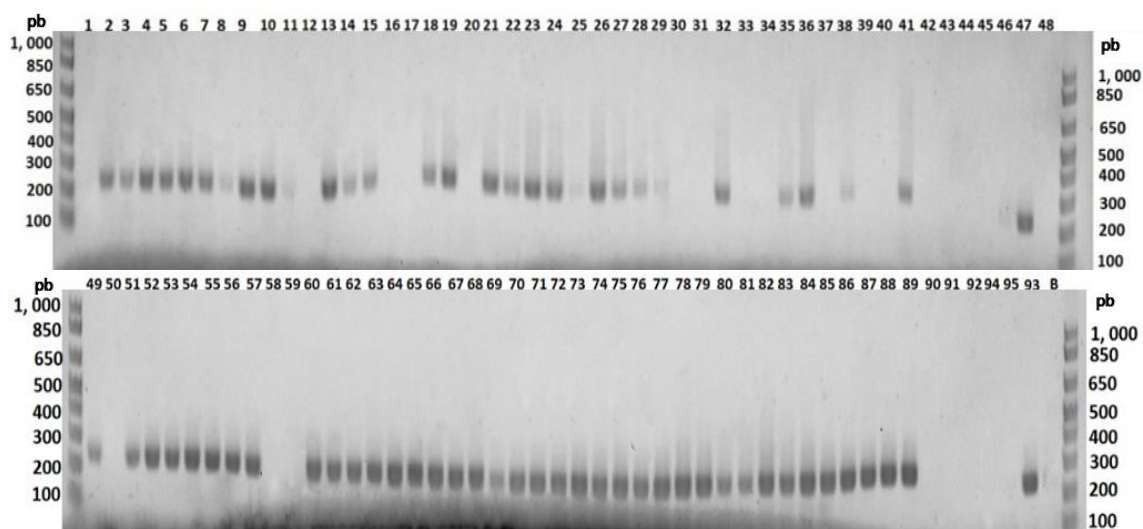


Figura 5. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a *H. vastatrix* obtenido mediante el uso de iniciadores SCAR's HVD5-F/HVD5-R.

Los iniciadores SCAR's HVD6-F/HVD6-R produjeron la amplificación de una banda de 437 pb que de acuerdo con Diola *et al.*, (2011) cosegrega con un gen de resistencia a *H. vastatrix* (Figura 6). Esta banda estuvo presente en 74 de las 89 variedades reportadas como resistentes, pero al igual que en los dos pares de iniciadores previamente discutidos, también se presentó en el cultivar susceptible Pluma Hidalgo.

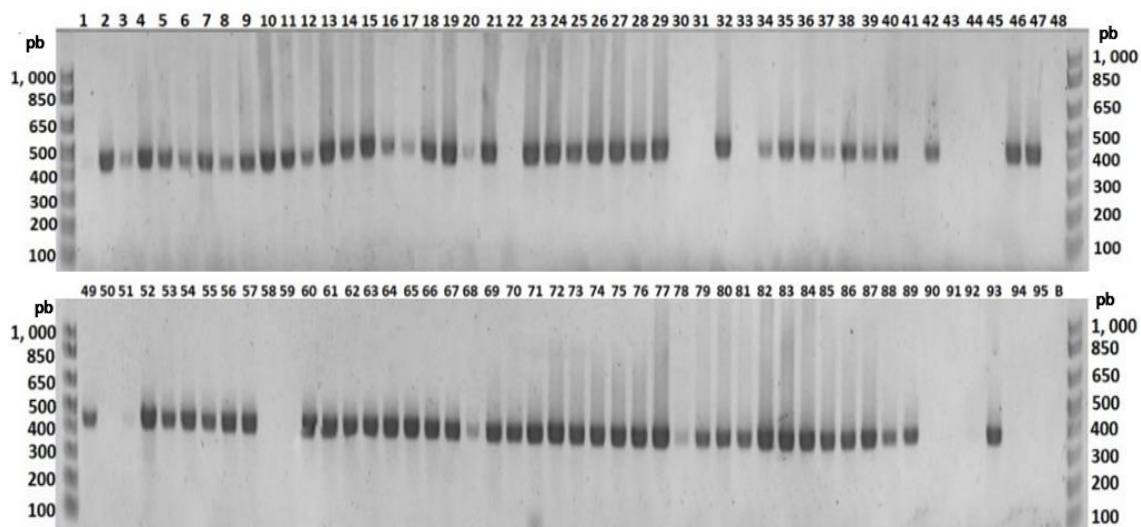


Figura 6. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a *H. vastatrix* obtenido mediante el uso de iniciadores SCAR's HVD6-F/HVD6-R.

Los microsatélites HVP1-F/HVP1-R asociados en acoplamiento al gen de resistencia a la roya del café SH3 (Prakash *et al.*, 2011) produjeron la

amplificación de la banda objetivo de 300 pb en 70 de los 89 materiales reportados como resistentes a esta enfermedad. Nuevamente, como sucedió en el caso de los iniciadores tipo SCAR's, esta banda se obtuvo también en los materiales susceptibles *Typica Xanthocarpa* y *Pluma Hidalgo*. Estas variedades, al pertenecer a la especie *C. arabica* portan el gen de resistencia SH5, el cual aún en combinación con otros genes de resistencia es vencido por la raza II de roya, presentándose la enfermedad (Cabral *et al.*, 2009). La presencia de síntomas de roya del café en estas dos accesiones a pesar de haberse amplificado una banda de resistencia pudiera explicarse considerando que los iniciadores probados pudieron asociarse a una secuencia génica que en algún momento pudo haber formado parte de un gen de resistencia que con el tiempo fue vencido. Debido a que no se cuenta con información sobre las razas de *Hemileia vastatrix* presentes en el Banco de Germoplasma del CRUO, no es posible determinar si sólo se presenta la raza II o existen otras razas parasitando a las plantas de café.

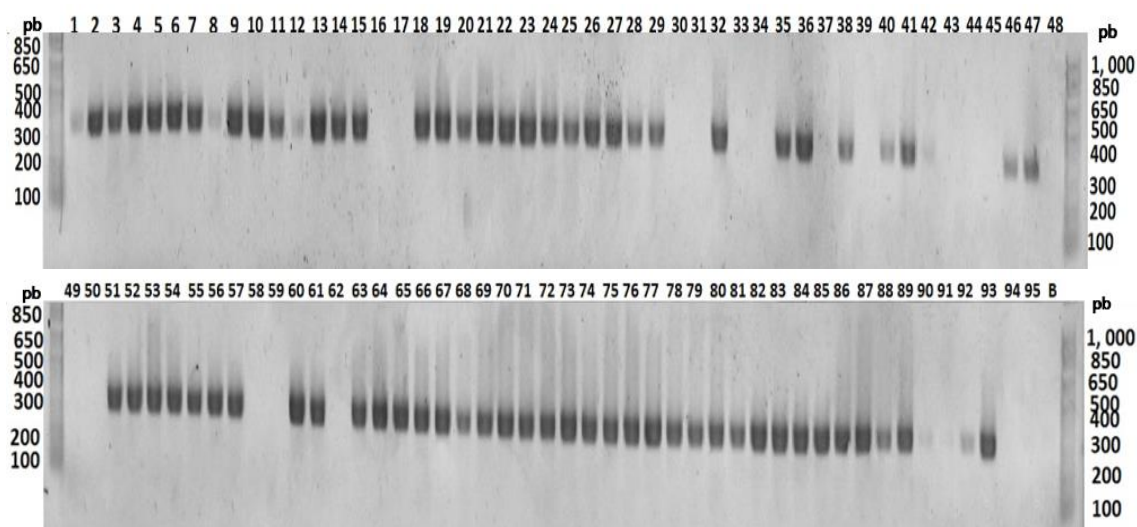


Figura 7. Polimorfismo de 95 accesiones de café resistentes y susceptibles a *H. vastatrix* obtenido mediante el uso de los iniciadores HVP1-F/HVP1-R.

En el Cuadro 4 se presenta un resumen de los resultados de la amplificación obtenida mediante el uso de los 5 pares de iniciadores probados en el presente estudio. En él se observa que hubo accesiones que mostraron la presencia de la banda asociada con la resistencia a *H. vastatrix* para los 5 pares de

iniciadores. La mayoría de estas accesiones pertenecen a las variedades de “Catimores”, las cuales se originaron de la cruce entre el Híbrido de Timor T1 (CIFC 832/1) con resistencia a la roya y la variedad Caturra Rojo, de porte bajo, con buen potencial de rendimiento y calidad estándar pero muy susceptible a la roya. Las variedades Catimor T5175 son introgresiones provenientes de la familia de Híbrido de Timor 832/1 x Caturra obtenidas por el Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE), las cuales se consideran resistentes a roya; sin embargo, tienen un potencial productivo bajo, lo cual resta apreciación a estas variedades. Asimismo, destacan algunas variedades del tipo “Sarchimores”, las cuales fueron obtenidas en Portugal por el Centro Internacional de la Roya del Cafeto (CIFC) realizando la cruce entre el Híbrido de Timor 2 (CIFC 325/2) por la variedad Villa Sarchí, la cual se originó como una mutación espontánea de la variedad Borbón, de porte bajo, rendimiento intermedio, pero susceptible a *H. vastatrix*. Dentro de este grupo se encontraron las variedades Iapar 5 (desarrollada por el Instituto Agronómico de Paraná), Sarchimor, Abrasamuelle y algunas líneas generadas por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). Iapar 59 tiene un rendimiento alto en campo, así como resistencia a roya, proviene de selección por pedigrí (selección de plantas individuales a través de generaciones sucesivas) del cruce entre el Híbrido de Timor 832/2 y la variedad Villa Sarchí, lo mismo se puede mencionar para la variedad Limani obtenida en Puerto Rico. Geisha proviene del grupo de variedades locales de Etiopía, que presenta un rendimiento promedio, pero es tolerante a roya. Costa Rica 95 es una variedad obtenida por ICAFE, perteneciente a la familia de introgresiones de Catimor, puesto que se obtuvo mediante la cruce del Híbrido de Timor 832/1 x Caturra, con características de rendimiento estándar pero resistente a la roya. Oro Azteca es una variedad con las mismas características de Costa Rica 95, obtenida mediante selección por pedigrí realizada por INIFAP en México; esta es una variedad que ha sido proporcionada por el gobierno a los cafeticultores dentro de los programas de sustitución de variedades de café en México. Otra variedad con presencia de genes de resistencia a la roya del café fue Robusta, la cual pertenece a la

especie *C. canephora*, mientras que la variedad Nemaya perteneciente a esta misma especie no presentó amplificación de bandas relacionadas con los iniciadores evaluados.

Cuadro 4. Presencia/ausencia de bandas amplificadas asociadas a genes de resistencia a *H. vastatrix* obtenidas mediante el uso de 5 pares de iniciadores en 95 accesiones de café.

	Variedad	HVD1- F/HVD1- R	HVD2- F/HVD2- R	HVD5- F/HVD5- R	HVD6- F/HVD6- R	HVP1- F/HVP2- R	Total	%
1	Colombia BV		X			X	2	40
2	Catimor T5175-4	X	X	X	X	X	5	100
3	Catimor T5269	X	X	X	X	X	5	100
4	Catimor 5	X	X	X	X	X	5	100
5	Catimor 717	X	X	X	X	X	5	100
6	Catimor 815	X	X	X	X	X	5	100
7	Catimor 1	X	X	X	X	X	5	100
8	Catimor 4	X	X	X	X	X	5	100
9	Catimor T5175-29	X	X	X	X	X	5	100
10	Catimor T5175-52	X	X	X	X	X	5	100
11	Limani	X	X		X	X	4	80
12	Catimor Masal T5175- 59	X	X		X	X	4	80
13	Catimor T5175-59	X	X	X	X	X	5	100
14	Catimor 35-7	X	X	X	X	X	5	100
15	Costa Rica 95	X	X	X	X	X	5	100
16	Colombia BC		X		X		2	40
17	Oroazteca	X	X		X		3	60
18	Catimor CIFC 9000	X		X	X	X	4	80
19	Catimor T5175-43	X	X	X	X	X	5	100
20	Catimor T5175-41	X	X		X	X	4	80
21	Catimor T5175- Nicaragua	X	X	X	X	X	5	100
22	Catimor 2	X	X	X		X	4	80
23	Catimor T5175-46	X	X	X	X	X	5	100
24	Catimor T5175-45	X	X	X	X	X	5	100

Cuadro 4. Continuación

	Variedad	HVD1- F/HVD1- R	HVD2- F/HVD2- R	HVD5- F/HVD5- R	HVD6- F/HVD6- R	HVP1- F/HVP2- R	Total	%
25	Catimor 8667	X	X		X	X	4	80
26	Catimor 8667	X	X	X	X	X	5	100
27	Catimor T5175-5	X	X	X	X	X	5	100
28	Catimor 3537f3	X	X	X	X	X	5	100
29	Sarchimor 31gf4	X	X	X	X	X	5	100
30	Colombia Amarillo		X				1	20
31	lapar Comercial						0	0
32	Colombia Rojo	X		X	X	X	4	80
33	Colombia Original		X				1	20
34	Catimor 9026-35	X			X		2	40
35	Catucari	X	X	X	X	X	5	100
36	Catimor Valdez	X	X	X	X	X	5	100
37	Catimor 9034-28	X	X		X		3	60
38	lapar 5	X	X	X	X	X	5	100
39	Saichimor		X		X		2	40
40	Catimor 3	X	X		X	X	4	80
41	Aus Bris	X	X	X		X	4	80
42	Cera miel		X		X		2	40
43	Castillo Antioquio		X				1	20
44	Chichon Paa						0	0
45	Marsellesa						0	0
46	Catucari Amarillo	X			X	X	3	60
47	Catucari Rojo	X	X	X	X	X	5	100
48	lapar 59-1		X				1	20
49	Robusta			X	X		2	40
50	Nemaya						0	0
51	17 INIFAP		X	X		X	3	60
52	19 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
53	20 INIFAP		X	X	X	X	4	80
54	22 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
55	21 INIFAP		X	X	X	X	4	80
56	Mibrizi		X	X	X	X	4	80
57	Murta		X	X	X	X	4	80

Cuadro 4. Continuación

	Variedad	HVD1- F/HVD1- R	HVD2- F/HVD2- R	HVD5- F/HVD5- R	HVD6- F/HVD6- R	HVP1- F/HVP2- R	Total	%
58	8L 16						0	0
59	Padang 2						0	0
60	Anphilo	X	X	X	X	X	5	100
61	Guadalupe		X	X	X	X	4	80
62	Geisha		X	X	X		3	60
63	Dessie		X	X	X	X	4	80
64	Laurina	X	X	X	X	X	5	100
65	Abrasamuelle	X	X	X	X	X	5	100
66	Pinto		X	X	X	X	4	80
67	Oro Azteca grano grande		X	X	X	X	4	80
68	Maracatú		X	X	X	X	4	80
69	13 INIFAP		X	X	X	X	4	80
70	8 INIFAP		X	X	X	X	4	80
71	26 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
72	6 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
73	3 INIFAP		X	X	X	X	4	80
74	5 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
75	4 INIFAP		X	X	X	X	4	80
76	9 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
77	12 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
78	15 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
79	10 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
80	25 INIFAP		X	X	X	X	4	80
81	16 INIFAP		X	X	X	X	4	80
82	18 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
83	1 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
84	2 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
85	11 INIFAP		X	X	X	X	4	80
86	7 INIFAP		X	X	X	X	4	80
87	24 INIFAP	X	X	X	X	X	5	100
88	14 INIFAP		X	X	X	X	4	80
89	Typica Xanthocarpa		X	X	X	X	3	60
90	Caturra Rojo						0	0
91	Blue Montain						0	0
92	Bourbon Rojo						0	0
93	Pluma Hidalgo		X	X	X	X	4	80
94	Mundo Novo						0	0

Cuadro 4. Continuación

	Variedad	HVD1- F/HVD1- R	HVD2- F/HVD2- R	HVD5- F/HVD5- R	HVD6- F/HVD6- R	HVP1- F/HVP2- R	Total	%
95	Maragogipe						0	0

Los resultados obtenidos confirman la acumulación de genes de resistencia por piramidación en café para la resistencia a la roya. Periyannan *et al.* (2017) sugieren que es importante entender las interacciones aditivas y el potencial de los genes de resistencia para encontrar aquellas combinaciones eficaces; asimismo, señalan la conveniencia de realizar estudios para la identificación de genes de virulencia en la roya con el objetivo de poder dilucidar la evolución de este patógeno.

Cabe mencionar que hay variedades que amplificaron bandas con el marcador HVP1-F/HVP2-R el cual se reporta como relacionado al gen de resistencia SH3 (Ver Cuadro 1), gen que es considerado fuente importante de resistencia a la roya del café (Hiroshi *et al.* 2007), por lo que estas variedades pueden ser objeto de futuros estudios para confirmar la presencia de este gen. Aunque no se mencionan los genes R (SH1-SH9) relacionados con los demás marcadores (Diola *et al.* 2011), en este estudio destacan algunos marcadores que pueden ser utilizados en futuras investigaciones para confirmar fuentes de resistencia, ejemplo es el caso de la variedad Iapar 59-1 que es resistente a la roya del café y solo mostró amplificación con el marcador HVD2-F/HVD2-R, lo que da una primera impresión de que se relaciona con un gen que puede ser una fuente valiosa de resistencia.

En este Cuadro 4 también se puede observar que hubo variedades de café que no mostraron la presencia de alguna banda de resistencia para los cinco pares de iniciadores evaluados lo cual sugiere que estos materiales carecen de genes de resistencia a la roya, de tal manera que deberían ser descartadas dentro de un programa de mejoramiento genético de resistencia a la roya del café. Dentro de estas variedades se encuentran Iapar comercial y Padang, las cuales presentan poca demanda por parte de los cafeticultores para su establecimiento

en campo. Otro ejemplo es la variedad Caturra Rojo, la cual a pesar de presentar buena calidad en taza es susceptible a *Hemileia vastatrix*. Debido a que como se señaló anteriormente las variedades Typica Xanthocarapa y Pluma Hidalgo catalogadas como susceptibles a roya mostraron amplificación de bandas de resistencia con algunos iniciadores sería necesario realizar estudios específicos que permitan afirmar o descartar la presencia de estas regiones ligadas a genes de resistencia, e indagar las consecuencias de estos resultados, que sin duda son de interés dentro de la búsqueda de conocimiento sobre la resistencia genética a la roya del café.

4.3. Síntomas de roya en campo

Con objeto de corroborar en campo la resistencia genética a la roya sugerida en diversas variedades de café por la amplificación de bandas a partir de los cinco pares de iniciadores utilizados en el presente estudio, se procedió a realizar observaciones en las accesiones directamente en el Banco de Germoplasma de Café del CRUO, con sede en Huatusco, Veracruz. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Presencia (1)/ausencia (0) de síntomas de roya de la hoja (*Hemileia vastatrix*) en el Banco de Germoplasma del CRUO, en Huatusco, Veracruz.

Variedad	Presencia /ausencia	Variedad	Presencia /ausencia	Variedad	Presencia/ ausencia
Colombia BV	1	Colombia Original	1	Abrasamuelle	1
Catimor T5175-4	0	Catimor 9026-35	0	Pinto	1
Catimor T5269	0	Catucai	1	Oro Azteca grano grande	1
Catimor 5	1	Catimor Valdez	1	Maracatú	1
Catimor 717	0	Catimor 9034-28	1	13 INIFAP	1
Catimor 815	0	Iapar 5	1	8 INIFAP	1
Catimor 1	0	Sarchimor	0	26 INIFAP	0
Catimor 4	1	Catimor 3	1	6 INIFAP	1
Catimor T5175-29	1	Aus Bris (Australia Brisbane)	1	3 INIFAP	0
Catimor T5175-52	0	Cera miel	1	5 INIFAP	0

Cuadro 5. Continuación

Variedad	Presencia /ausencia	Variedad	Presencia /ausencia	Variedad	Presencia/ ausencia
Limani	1	Castillo Antioquio	1	4 INIFAP	1
Catimor Masal T5175-59	0	Chichon Paa	1	9 INIFAP	1
Catimor T5175- 59	0	Marsella	1	12 INIFAP	0
Catimor 35-7	0	Catucái Amarillo	0	15 INIFAP	1
Costa Rica 95	1	Catucái Rojo	1	10 INIFAP	1
Colombia BC	1	Iapar 59-1	0	25 INIFAP	0
Oro Azteca	1	Robusta	0	16 INIFAP	1
Catimor CIFC 9000	0	Nemaya	0	18 INIFAP	1
Catimor T5175- 43	0	17 INIFAP	1	1 INIFAP	1
Catimor T5175- 41	1	19 INIFAP	0	2 INIFAP	0
Catimor T5175- Nicaragua	1	20 INIFAP	1	11 INIFAP	1
CATIMOR 2	1	22 INIFAP	1	7 INIFAP	1
Catimor T5175- 46	0	21 INIFAP	1	24 INIFAP	0
Catimor T5175- 45	1	Mibrizi	1	14 INIFAP	1
Catimor 8667	0	Murta	1	Typica Xantocarpa	1
Catimor 8667	0	8L 16	1	Caturra Rojo	1
Catimor T5175- 5	1	Padang 2	1	Blue Montain	1
Catimor 3537f3	1	Anphilo	1	Bourbon Rojo	1
Sarchimor 31gf4	0	Guadalupe	1	Pluma Hidalgo	1
Colombia Amarillo	1	Geisha	0	Mundo Novo	1
Iapar Comercial	1	Dessie	1	Maragogipe	1
Colombia Rojo	1	Laurina	1		

Las observaciones realizadas bajo condiciones de campo muestran que sólo 32 del total de variedades de café evaluadas en el presente estudio no mostraron síntomas de roya; puesto que todas ellas mostraron amplificación de regiones ligadas a genes de resistencia a *H. vastatrix*, esto las ratifica como valiosos progenitores potenciales para la incorporación de resistencia genética a la roya a materiales susceptibles dentro de un programa de mejoramiento genético contra esta enfermedad, cumpliéndose con el objetivo principal de este trabajo.

En el Cuadro 5 también se puede apreciar que tanto la variedad Costa Rica 95 como Oro Azteca mostraron la presencia de síntomas de roya. Esta situación es preocupante ya que ambas variedades han sido distribuidas entre los cafecultores con fines de renovación de plantaciones como variedades resistentes. Sin embargo las observaciones realizadas indican que el hongo ha roto la resistencia.

En este mismo cuadro puede observarse que las variedades Typica Xanthocarpa y Pluma Hidalgo, clasificadas como susceptibles a la roya, mostraron síntomas de la enfermedad en campo, a pesar de que en el laboratorio se obtuvieron bandas amplificadas correspondientes a regiones aledañas a genes de resistencia.

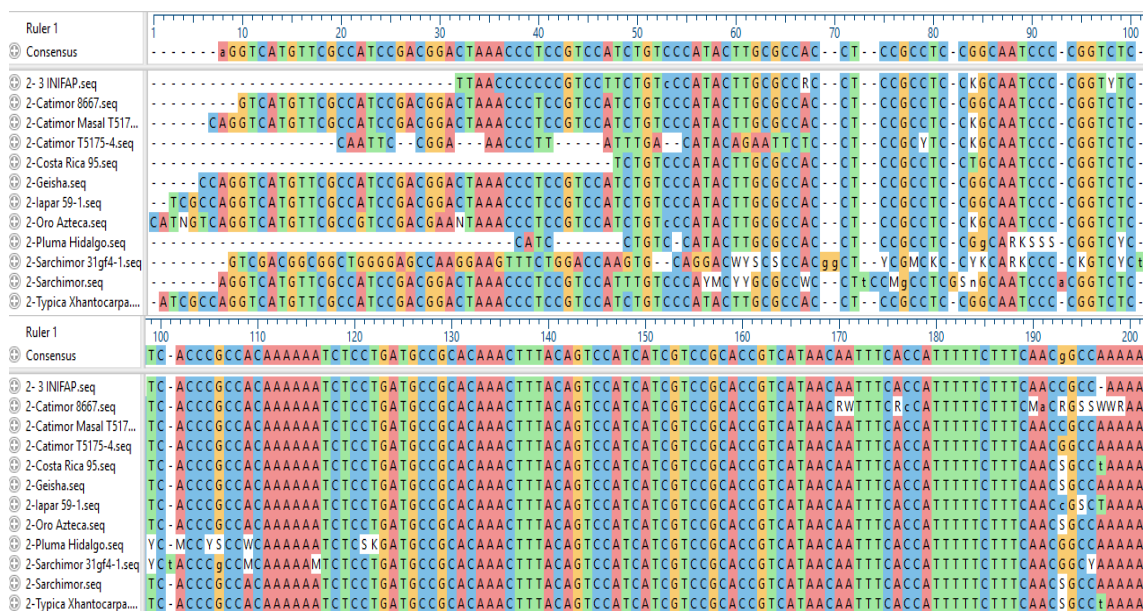
El hecho de que los pares de iniciadores utilizados en este estudio buscaran amplificar regiones cercanas a los genes de resistencia a la roya y no específicamente las secuencias correspondientes a dichos genes, podría haber contribuido a la obtención de estos falsos positivos si se presentó recombinación entre el marcador y el gen de resistencia pasando la relación marcador-gen de resistencia de M-R (resistente) a M-r (fenotipo susceptible). Así, si el marcador y el gen de resistencia están separados por 5 cM y la selección se basa en el patrón del marcador, existiría una posibilidad del 5 % de seleccionar la planta errónea; ésta es una de las principales desventajas de la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) (Xu, 2010). Asimismo, las mutaciones del marcador son fuente de errores en la detección, pues en ocasiones la relación marcador-gen de resistencia estaría pasando a m-R (el marcador no detecta el gen, pero el fenotipo es resistente); este es el caso de los SSR's que presentan altas tasas de mutación debido a deslizamientos durante la replicación del ADN (Singh y Singh, 2015).

4.4. Análisis de secuencias

La falta de concordancia para algunas de las variedades de café evaluadas entre los resultados moleculares y la incidencia de la roya de la hoja en campo,

así como la importancia de corroborar la homología de las regiones amplificadas en las variedades para cada iniciador motivó el que se seleccionaran 12 variedades para volver a amplificar su ADN con los 5 pares de iniciadores, extraer las bandas amplificadas y secuenciarlas. Dentro de las variedades elegidas se incluyeron Oro Azteca y Costa Rica 95, debido a que éstas han sido promocionadas comercialmente como resistentes a roya, cuando resultaron susceptibles en campo y no mostraron bandas amplificadas asociadas a genes de resistencia. Otras variedades de café seleccionadas para secuenciación fueron Typica Xanthocarpa y Pluma Hidalgo las cuales mostraron amplificación de bandas con algunos iniciadores evaluados. El alineamiento obtenido con las secuencias para cada iniciador se muestra a continuación.

En la Figura 8 se presenta la alineación de las secuencias amplificadas por el par de iniciadores HVD2-F/HVD2-R de 12 variedades de café. La comparación de las secuencias permite apreciar que la variedad Typica Xanthocarpa presenta 6 inserciones al inicio de la secuencia, así como en la ubicación 312 a 415, mientras que en Pluma Hidalgo se presentaron varias deleciones (1-37, 42-48, 54, 239 y de 277-478), una sustitución en el lugar 49 (C por A) y una inserción de C en 222.



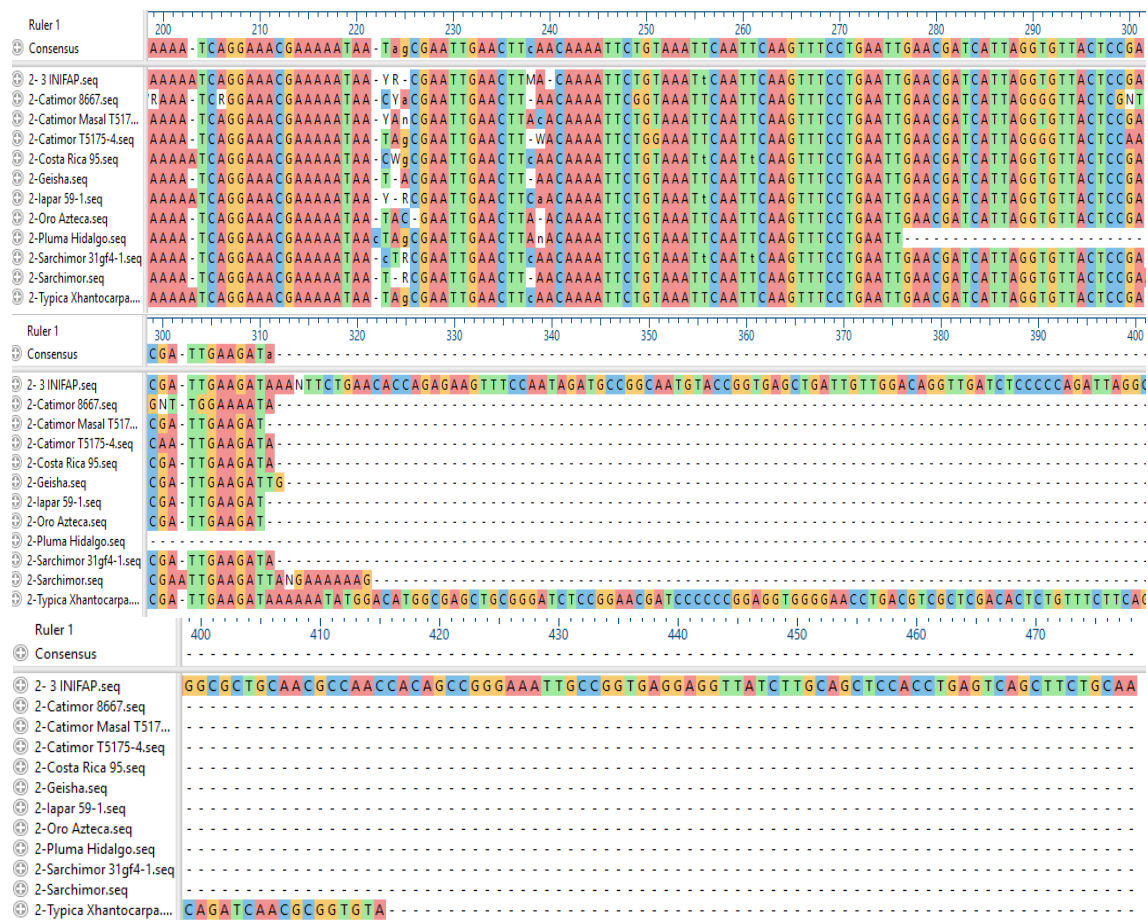


Figura 8. Alineamiento de secuencias amplificadas por el par de iniciadores HVD2-F/HVD2-R.

La variedad Costa Rica 95 presenta deleciones desde el inicio de la secuencia hasta el lugar 47, inserción de A en el lugar 203 y sustituciones de T por G en la ubicación 84, T por A en 197 y C por T en 223, mientras que Oro Azteca presenta 7 inserciones al inicio, una deleción de C en el lugar 226 y otra de A en 239, sustitución de G por A en el lugar 22, A por G en 30 y C por G en posición 225. Por su parte la variedad lapar-59, perteneciente al grupo A (resistente a todas las razas fisiológicas de *H. vastatrix*) sorprendentemente sólo amplificó para este par de iniciadores, pero sí mostró resistencia en campo; en el alineamiento se observa que presenta 5 inserciones al inicio de la secuencia y una A en el lugar 203, sustituciones de C por G en 193 y T por A en 297. Estos cambios realmente no representan diferencias significativas por lo que se puede decir que si corresponde a una secuencia asociada a algún gen

de resistencia. Este resultado era de esperarse ya que debido a que la variedad lapar 59-1 se originó a partir de la cruce del Híbrido de Timor CIFIC832/2 por Villa Sarchí CIFIC971/10, debe portar los genes de resistencia SH6, SH7, SH8 y SH9 (Diola *et al.*, 2011)

De acuerdo con lo indicado en el alineamiento de las secuencias de las amplificaciones obtenidas con los iniciadores HVD5-F/HVD5-R (Figura 9), la variedad Robusta fue la que más se alejó de las demás secuencias, teniendo así una inserción de T en el lugar 1 de la secuencia y otra de C en el lugar 175, sustituciones en las ubicaciones 60 (C por T), 108 (G por A), 162 (G por A) y una delección de A en 176.

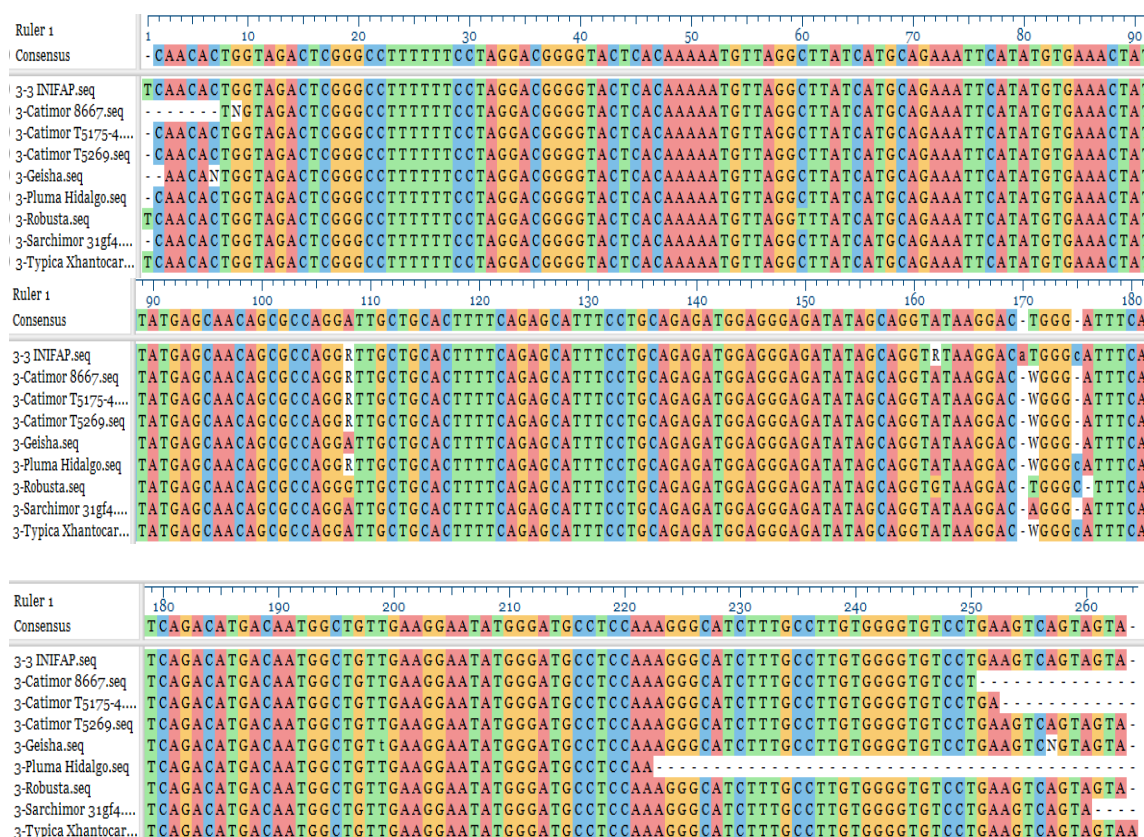


Figura 9. Alineamiento de secuencias amplificadas por el par de iniciadores HVD5-F/HVD5-R.

Asimismo, las variedades 3 INIFAP y Typica Xanthocarpa, presentan inserciones en la ubicación 1, mientras que la variedad Geisha presenta una

delección en la ubicación 2, y se observan 6 deleciones en las posiciones 2 a 7 en la variedad Catimor 8667. Las variedades Pluma Hidalgo y Typica Xanthocarpa presentan una inserción de C en posición 175 al igual que las variedades Robusta y 3 INIFAP. También se observa una sustitución de A por T en posición 171 en la variedad Sarchimor 31gf4 así como una delección de 42 pb de la posición 222 en adelante para la variedad Pluma Hidalgo. El hecho de que la variedad Pluma Hidalgo exhiba parte de la banda asociada a la resistencia a *H. vastatrix* a pesar de ser susceptible, parece reforzar la teoría de que la susceptibilidad puede presentarse debido a la anulación incompleta de los genes SH (Varzea y Marques, 2005), la cual tomó como base la hipótesis de Nelson (1978), quien postuló que los genes menores que controlan la resistencia horizontal pudieron haber sido ancestralmente genes mayores vencidos por el patógeno.

En la Figura 10 se presentan las secuencias de las bandas amplificadas por los iniciadores HVD6-F/HVD6-R. En ella se observa que las variedades Pluma Hidalgo y Typica Xanthocarpa presentan inserciones desde la base 1 hasta la 83, región en donde también se notan inserciones de bases en las secuencias de otras variedades como Geisha, Sarchimor 31gf4 y Catimor T5175-4. Adicionalmente, Pluma Hidalgo presenta una sustitución de G por A en la posición 518 y una delección en la posición 522 que no se observa dentro de las demás secuencias; por su parte la variedad Typica Xanthocarpa presenta una inserción en la posición 440. Oro Azteca es una variedad que no se diferencia significativamente de las demás en esta región, alejándose principalmente de la variedad Catimor Masal T5175-59, con una distancia máxima de 0.06. La secuencia de la banda amplificada en esta última variedad fue la más distinta de todas presentando sustituciones en las posiciones 110 (C por T), 118 (C por A), y de G por T en 124 y 126. Estos resultados corroboran que las razas fisiológicas de *H. vastatrix* presentes en la región de Huatusco, Ver., no han sido capaces de romper la resistencia proporcionada por los genes SH introgresados a esta variedad a partir del Híbrido de Timor 832/1.



Figura 10. Alineamiento de secuencias amplificadas con el par de iniciadores HVD6-F/HVD6-R.

Si se considera en conjunto los resultados presentados en las Figuras 8, 9 y 10 se observan relativamente pocas diferencias entre las secuencias analizadas, lo cual sugiere que los iniciadores evaluados en el presente estudio fueron efectivos para amplificar regiones asociadas con genes de resistencia a la roya del café, por lo que podrían ser de utilidad en estudios futuros para la detección de resistencia genética.

Sin embargo, si se desea estudiar la interacción específica entre las variedades y las diferentes razas fisiológicas de la roya del café, otro tipo de marcadores moleculares como los SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) podrían ser muy informativos ya que de acuerdo con Jehan *et al.* (2006), los cambios de un solo nucleótido en las regiones de codificación (cSNPs) pueden tener importancia funcional ya que el cambio de aminoácidos resultante puede causar un fenotipo alterado. Igualmente será útil secuenciar fracciones específicas de los genotipos resistentes en lugar del genoma completo utilizando enfoques como el de Genotyping by Sequencing (GBS) (Narum *et al.*, 2013), facilitando así la localización de genes candidatos con el mapeo denso de regiones específicas y el descubrimiento abundante de SNP, que consecuentemente acelerará la selección de plantas en programas de fitomejoramiento (Kim *et al.*, 2016).

Sería conveniente complementar estos estudios con pruebas de campo, en donde se hagan evaluaciones más precisas de la severidad del ataque del patógeno, así como pruebas de patogenicidad controladas para corroborar la resistencia de las variedades que de acuerdo con el estudio genético realizado en el presente trabajo pudieran portar genes de resistencia.

Otro aspecto a considerar es que la técnica de amplificación por PCR no está exenta de errores, los cuales pueden reflejarse en los datos de secuenciación y sugerir falsas mutaciones que en última instancia confunden el análisis genético. Una fuente de estos errores es la ADN polimerasa que se utiliza durante el proceso, ya que por ejemplo en el caso de la enzima Kapa HiFi HotStart ReadyMix similar a la que se usó en este estudio, se reconoce una

tasa de error de 1.6×10^{-5} sustitución/ base / duplicación (Potapov y Ong, 2017), situación que puede llegar a influenciar los resultados, por lo que sería deseable realizar nuevamente la amplificación y secuenciación con objeto de minimizar posibles errores.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron corroborar la existencia de loci polimórficos ligados a genes de resistencia a la roya de la hoja del café (*Hemileia vastatrix*) en algunas de las variedades depositadas en el Banco de Germoplasma del CRUO-UACH, localizado en Huatusco, Veracruz, por lo que éstas pueden ser prometedoras para selección y uso en futuros programas de mejoramiento genético, aunque es conveniente hacer estudios de atributos de interés agronómico y comercial para elegir las variedades más deseables.

Se detectó la presencia de regiones ligadas al gen de resistencia SH3 en algunas de las variedades evaluadas, por lo que estas pueden ser utilizadas en futuras investigaciones para buscar de fuentes valiosas de resistencia a la roya del café.

Este trabajo de investigación representa un primer paso dentro de la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) en la búsqueda de obtener variedades con resistencia duradera a roya, con características agronómicas y organolépticas deseables para mejorar la producción y con ende la rentabilidad para los productores de café en México.

6. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th Ed. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America. 952 p.
- Alkimim, E.R., Caixeta, E. T., Sousa, T. V., Pereira, A. A., de Oliveira, A. C. B., Zambolim, L., Sakiyama, N. S. (2017). Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. Mol. Breed. 37: 6. doi: 10.1007/s11032-016-0609-1
- American Phytopathological Society (APS). (2011). Coffee rust (*Hemileia vastatrix*).
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRustspan.aspx>, consultado el 04 de septiembre de 2018.
- Avelino, J., Rivas, G. (2013). La roya anaranjada del cafeto. 47.
https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/file/LA_ROYA_ANARANJADA_DEL_CAFETO_V1.pdf
- Avelino, J., Allinne, C., Cerda, R., Willocquet, L., Savary, S. (2018). Multiple-disease system in coffee: From crop loss assessment to sustainable management. Annual Review of Phytopathology 56: 611-635.
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. Food Security 7 (2): 303-321.
- Becerra, V., Paredes, C. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica 60 (3): 270-281.
- Brito, G. G., Caixeta, E. T., Gallina, A. P., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Diola, V., Loureiro, M. E. (2010). Inheritance of coffee leaf rust resistance and

identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica* 173 (2): 255-264.

Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). (2017). Plantwise Bank of Knowledge: Coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). En línea: <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=26865>, consultado el 03 de septiembre de 2018.

Cabral, P.G.C., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Lelis, T.P., Capucho, A.S., Caixeta, E.T. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australian Plant Disease Notes* 4:129-130.

Diola, V., Brito, G. G., Caixeta, E. T., Maciel-Zambolim, E., Sakiyama, N. S., Loureiro, M. E. (2011). High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. *Tree Genetics & Genomes* 7 (6): 1199-1208.

Doyle, J.J. Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

FAOSTAT. (2019a). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Dirección de Estadística: Comercio. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#data/TP>. Consultado el 15 de mayo de 2019.

FAOSTAT. (2019b). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Dirección de Estadística: Producción. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Consultado el 15 de mayo de 2019.

Gichuru, E. K., Agwanda, C. O., Combes, M. C., Mutitu, E. W., Ngugi, E. C. K., Bertrand, B. Lashermes, P. (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 57: 1117-1124. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01846.x

- González, L., Cortina, H., Herrera, J. (2009). Validación de marcadores moleculares ligados al gen SH3 de resistencia contra la roya en introducciones de la colección colombiana de café. *Cenicafé* 60 (4): 314-389.
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K., Park, S. W. (2012). Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78: 51-65.
- Granados, R. R., Medina, B. M., Peña, M. V. (2014). Variación y cambio climático en la vertiente del Golfo de México: Impactos en la cafecultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5 (3): 473-485.
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., Henry, R.J. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10 (1): 21 DOI:10.1186/1746-4811-10-21
- Heinze, B. (2007). A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods* 3: 4 doi:10.1186/1746-4811-3-4.
- Hiroshi, S. G., Sera, T., Shiguer, D. I., Alves, J., Siqueira, J., Dói, D. S., Ribeiro, F. C., Kanayama, F. S. Resistance to leaf rust in coffee carrying SH3 gene and others SH genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50 (5): 753-757
- International Organization of Coffee (ICO). (2019a). Exports of all forms of coffee by all exporting countries. Disponible en <http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/2a-exports.pdf>. Consultado el 15 de mayo de 2019.
- International Organization of Coffee (ICO). (2019b). Historia del café. Disponible en http://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp. Consultado el 10 de febrero de 2019.

- International Organization of Coffee (ICO). (2019c). Total production by all exporting countries. Disponible en <http://www.ico.org/prices/production.pdf>. Consultado el 15 de mayo de 2019.
- International Trade Center (ITC). (2011). An Exporters Guide. Third edition. UNSTAD / WTO. Geneva, Switzerland.
- Jehan, T., Lakhanpaul, S. 2006. Single nucleotide polymorphism (SNP)-methods and applications in plant genetics: a review. Indian Journal of Biotechnology 5: 435-459.
- Kim, C., Guo, H., Kong, W., Chandnani, R., Shuang, L. S., Paterson, A. H. (2016). Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. Plant Science 242: 14-22.
- Kushalappa, A. C., Eskes, A. B. (1989). Coffee rust: epidemiology, resistance, and management. CRC Taylor & Francis Group. 357 p.
- McCook, S., Vandermeer, J. (2015). The big rust and the red queen: long-term perspectives on coffee rust research. Phytopathology 105 (9): 1164-1173.
- Mahé, L., Combes, M. C., Várzea, V. M., Guilhaumon, C., Lashermes, P. (2008). Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). Molecular Breeding 21 (1): 105-113.
- Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Calderón-Estrada, G., Flores-Sánchez, J., Domínguez-Monge, S., Baker, P., González-Gómez, R. (2014). Consideraciones epidemiológicas del cambio climático en la fitosanidad de cultivos tropicales. Revista Mexicana de Fitopatología 32 (2): 147-167.
- Muller, R.A., Berry, D., Avelino, J., Bieysse, D. (2009). Coffee diseases. In: Wintgens, J. N. (ed.). Coffee: growing, processing, sustainable

production: A guidebook for growers, processors, traders, and researchers. Wiley, Ed. pp. 495-549.

Narum, S. R., Buerkle, C. A., Davey, J. W., Miller, M. R., Hohenlohe, P. A. (2013). Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular Ecology* 22 (11): 2841-2847. doi:10.1111/mec.12350

Nelson, R.R. 1978. Genetic of horizontal resistance to plant diseases. *Ann. Rev. Phytopatol.* 16: 359-378.

Ngo, H. T., Mojica, A. C., Packer, L. (2011). Coffee plant–pollinator interactions: a review. *Canadian Journal of Zoology* 89 (8): 647-660.

Opel, K. L., Chung, D., McCord, B. R. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences* 55 (1): 25-33. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x

Osorio, N. (2002). The global coffee crisis: A threat to sustainable development. International Coffee Organization. London, U. K. p 4.

Periyannan, S., Milne, R. J., Figueroa, M., Lagudah, E. S., Dodds, P. N. (2017). An overview of genetic rust resistance: from broad to specific mechanisms. *PLoS Pathogens*, 13 (7): e1006380. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006380>

Pienaar, E., Theron, M., Nelson, M., Viljoen, H. J. (2006). A quantitative model of error accumulation during PCR amplification. *Computational Biology and Chemistry*, 30 (2): 102-111. doi:10.1016/j.compbiolchem.2005.11.002

Prakash, N. S., Marques, D. V., Varzea, V. M. P., Silva, M. C., Combes, M. C., Lashermes, P. (2004) Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1311–1317

- Prakash, N. S., Muniswamy, B., Hanumantha, B. T., Sreenath, H. L., Kumar, D., Suresh, N., Bhat, S. S. (2011). Marker assisted selection and breeding for leaf rust resistance in coffee (*Coffea arabica* L.)-some recent leads. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 71 (2): 185-189.
- Potapov, V., Ong, J. L. (2017). Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. PloS one 12 (1): e0169774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169774>
- Ribas, A. F., Cenci, A., Combes, M. C., Etienne, H., Lashermes, P. (2011). Organization and molecular evolution of a disease-resistance gene cluster in coffee trees. BMC genomics, 12: 240. doi:10.1186/1471-2164-12-240
- Romero, G., Vásquez, L. M., Lashermes, P., Herrera, J. C. (2014). Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor Hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). Plant Breeding 133 (1): 121-129.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Resumen nacional por cultivo 2018. Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera, México, D.F. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do. Consultado el 15 de mayo de 2019.
- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2016). Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 40. 23 p.
- Silva, M. D. C., Várzea, V., Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H. G., Fernandez, D., Petitot, A. S., Nicole, M. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. Brazilian Journal of Plant Physiology 18 (1): 119-147.

- Singh, B. D., Singh, A. K. (2015). Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices. Springer. New Delhi, India. pp. 77-122.
- Souza, R. M. (2008). Plant–parasitic nematodes of coffee. Springer Science, Dordrecht, The Netherlands. 340 p.
- Varzea, V. M. P.; Marques, D. V. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. *In*: Zambolim, L.; Zambolim, E. M.; Várzea, V. M. P. (Eds.). Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Universidade Federal de Viçosa, Brazil. pp. 53-74.
- Vazquez, G. F. (1983). Coffee rust in Mexico. *Plant Disease* 67(4): 450-451.
- Waller, J. M., Bigger, M., Hillocks, R. J. (Eds.). (2007). Coffee Pests, Diseases and their Management. CABI. Wallingford, UK. 334 p.
- Xu, Y. 2010. Molecular Plant Breeding. CABI Publishing. UK. pp. 293-307.
- Zamarripa-Colmenero, A., Escamilla-Prado, E. (2002). Variedades de Café en México. Origen, Características y Perspectivas, Huatusco. CRUO-Universidad Autónoma Chapingo/Fundación Produce de Veracruz A. C., México. 39 p.