



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala

FACULTAD DE
AGRONOMÍA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Guatemala, 20 de noviembre del 2023
Ref. IIA. 087.2023

Doctora
Alice Patricia Burgos Paniagua
Dirección General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Respetable Doctora Burgos:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para hacer entrega en versión impresa y electrónica del informe final del proyecto de investigación titulado Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* en Chimaltenango, Escuintla y Sacatepéquez: bases para aprovechamiento de genotipos de café, fase II partida presupuestaria: 4.8.63.4.51 coordinado por Gregorio Amílcar Sánchez Pérez

Sin otro particular, me suscribo de usted,

Atentamente,

F. _____
Dr. José Vicente Martínez Arévalo

Director del Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales
Facultad de Agronomía



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Carátula

Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial
(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* en Chimaltenango, Escuintla y Sacatepéquez:
bases para aprovechamiento de genotipos de café, fase II.
nombre del proyecto de investigación

4.8.63.4.51
Partida presupuestaria

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales
-IIA-
unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez
José Alejandro Ruiz Chután
Edna Sofía Colocho Hernández
Julio Ernesto Berdúo Sandoval
nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala 20 de noviembre de 2023

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Autoridades

Dra. Alice Burgos Paniagua
Directora General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Liuba Cabrera
Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial

Autores

Gregorio Amilcar Sánchez Pérez
Nombre del coordinador del proyecto

José Alejandro Ruiz Chután
Julio Ernesto Berdúo Sandoval
Nombre de los investigadores

Edna Sofia Colocho Hernández
Nombre del auxiliar de investigación II

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2023. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida presupuestaria 4.8.63.4.51 en el Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

1 Índice general

1	Índice general.....	3
2	Resumen.....	7
3	Introducción	9
4	Antecedentes	11
5	Planteamiento del problema.....	12
6	Marco teórico	13
6.1	El cultivo de café.....	13
6.2	La roya del café (Hemileia vastatrix).....	14
6.3	Epidemia de la roya del café en el período 2010-2014.....	14
6.4	Diversidad fisiológica de la roya.....	15
7	Estado del arte.....	15
7.1	Diversidad genética de la roya	15
8	Objetivos	17
	General	17
9	Hipótesis	17
10	Materiales y Métodos.....	17
10.1	Enfoque de la Investigación	17
10.2	Recolección de la Información.....	18
10.3	Técnicas e Instrumentos	18

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

11	Procesamiento de la información.....	21
11.1	Diversidad Genética y Estructura Poblacional.....	21
11.2	Ensayos de Virulencia y Resistencia Genética	22
12	Resultados	23
12.1	Describir la estructura y diversidad genética de las poblaciones de <i>H. vastatrix</i> en la zona de estudio.	23
	Polimorfismo y diversidad de los marcadores microsatélites	23
12.2	Identificar la evolución genética y la red haplotípica <i>H. vastatrix</i> a partir de aislados del patógeno provenientes de la zona de estudio.....	31
12.3	Determinar el nivel de virulencia de los haplotipos de <i>H. vastatrix</i> identificados en la zona de estudio.	33
13	Discusión.....	38
14	Conclusiones	41
15	Recomendaciones	42
16	Referencias.....	43
17	Vinculación.....	48
18	Estrategias de difusión. Divulgación y protección intelectual.....	49
19	Aporte de la propuesta de investigación a los Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND) identificando su meta correspondiente	49
20	Orden de pago final.....	49
21	Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación.....	50
22	Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario	50

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

23	Visado de la Dirección General de Investigación.....	51
----	--	----

Índice de tablas

Tabla 1.	Índices de diversidad de los loci SSR utilizados.	24
Tabla 2.	Índices de diversidad de la población en los 17 loci SSR	25
Tabla 3.	Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de <i>H. vastatrix</i> . 27	
Tabla 4.	Distancia genética Nei (encima de la diagonal) y diferenciación genética (F_{ST}) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de <i>H. vastatrix</i> estudiadas.	28
Tabla 5.	Resultados del análisis STRUCTURE para 64 aislados de <i>H. vastatrix</i> , que incluyen el índice medio de fijación (F_{ST}), las distancias (Heterocigosidad esperada/ H_e) y el número de aislados asignados a cada subpoblación.	30
Tabla 6.	Datos de diversidad genética de seis poblaciones de <i>H. vastatrix</i> basados en la región ITS.....	32
Tabla 7.	Listado y frecuencia de haplotipos de la región ITS de <i>H. vastatrix</i>	33

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Índice de figuras

Figura 1. Dendrograma UPGMA utilizando la distancia genética insesgada de Nei entre ocho poblaciones de <i>Hemileia vastatrix</i> en Guatemala.	27
Figura 2. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para visualizar las relaciones genéticas entre 64 aislados de <i>H. vastatrix</i>	28
Figura 3. Clasificación genética de poblaciones de <i>H. vastatrix</i> mediante UPGMA utilizando 17 Marcadores SSR. Se muestran valores de Bootstrap superiores a 70 luego de 1000 permutaciones.	29
Figura 4. Análisis de estructuración genética basado en STRUCTURE utilizando 17 microsatélites.	31
Figura 5. Análisis comparativo del AUDPC entre tres haplotipos de <i>H. vastatrix</i> en la variedad caturra: resultados del análisis de varianza y comparaciones estadísticas significativas ($p < 0.05$)	34
Figura 6. Comparación del índice del AUDPC de <i>H. vastatrix</i> en variadas variedades de café	35
Figura 7. Diagrama de cajas del comportamiento del índice AUDPC agrupado por variedades de café: detalle del análisis de varianza con comparaciones significativas ($p < 0.05$).	36
Figura 8. Diagrama de cajas del AUDPC agrupado por variedades de café: detalles del análisis de varianza con comparaciones significativas ($p < 0.05$)	37

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

2 Resumen

La roya del café, ocasionada por el hongo *Hemileia vastatrix*, representa la principal amenaza para el cultivo de café a nivel mundial. Para contrarrestar esta enfermedad, se ha implementado la estrategia genética mediante programas de mejoramiento que generan genotipos de café resistentes al patógeno. No obstante, para optimizar la utilización de este enfoque, es esencial comprender el componente molecular del patógeno. A pesar de la significativa importancia del café en Guatemala, aún se desconocen los detalles sobre la estructura poblacional, la diversidad genética y haplotípica de este patógeno. Este estudio abordó la evaluación de la diversidad genética y la estructura poblacional del hongo *H. vastatrix* en tres departamentos cafetaleros guatemaltecos mediante el uso de 17 marcadores microsatélites e ITS. Se identificaron entre 2 y 6 alelos por locus, con una media de 3. Los índices de diversidad de Shannon, diversidad nucleotídica y haplotípica registraron valores de 0.84, 0.0049 y 0.986, respectivamente. La variabilidad inter-poblacional fue significativa, representando el 91.2%. Además, se evidenciaron elevados niveles de flujo genético entre las poblaciones, indicando una baja diferenciación genética ($F_{ST} = 0.02$) entre estas. El análisis de haplotipos reveló que los aislados de *H. vastatrix* constituyen una población extensa sin una diferenciación clara, donde se identificaron haplotipos antiguos que dieron origen a nuevas variantes del hongo. En resumen, las poblaciones de *H. vastatrix* en Guatemala exhiben una marcada variabilidad y la diversidad genética se distribuye de manera extensa en los departamentos examinados. Aunque se sugiere que la diversidad haplotípica podría incidir en la resistencia de los cultivares de café, es fundamental considerar la complejidad de la interacción entre el patógeno y la planta, así como la posible influencia de factores ambientales en la resistencia.

Palabras clave: diversidad genética, estructura poblacional, red de haplotipos, ITS, microsatélites, flujo genético.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Abstract

Coffee leaf rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, represents the main threat to coffee cultivation worldwide. To counteract this disease, a genetic strategy has been implemented through improvement programs that generate coffee genotypes resistant to the pathogen. However, to optimize the use of this approach, it is essential to understand the molecular component of the pathogen. Despite the significant importance of coffee in Guatemala, details regarding the population structure, genetic diversity, and haplotype diversity of this pathogen are still unknown. This study addressed the evaluation of genetic diversity and population structure of the *H. vastatrix* fungus in three Guatemalan coffee-producing departments using 17 microsatellite markers and ITS. Between 2 and 6 alleles per locus were identified, with an average of 3. Shannon's diversity index, nucleotide diversity, and haplotype diversity indices recorded values of 0.84, 0.0049, and 0.986, respectively. Intra-population variability was significant, representing 91.2%. Additionally, high levels of gene flow between populations were evident, indicating low genetic differentiation ($F_{ST} = 0.02$) among them. The haplotype network revealed that *H. vastatrix* isolates form an extensive population without clear differentiation, where ancient haplotypes were identified as the origin of new variants of the fungus. In summary, *H. vastatrix* populations in Guatemala exhibit marked variability, and genetic diversity is widely distributed in the examined departments. Although it is suggested that haplotype diversity could impact the resistance of coffee cultivars, it is crucial to consider the complexity of the interaction between the pathogen and the plant, as well as the potential influence of environmental factors on resistance.

Keywords: genetic diversity, population structure, haplotype network, ITS, microsatellites, gene flow.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

3 Introducción

La roya es una enfermedad devastadora que afecta la producción de café a nivel mundial, habiéndose propagado en todos los países productores, causando pérdidas que oscilan entre el 20% y el 80% de la producción total. Estas pérdidas millonarias han impactado gravemente las regiones cafetaleras, generando consecuencias económicas significativas (McCook, 2006). El agente causal de esta enfermedad es el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome (Berkeley, 1869; Ward, 1882), que causa defoliaciones severas y afecta prácticamente a todas las variedades de *Coffea arabica*.

Durante la epidemia de roya que azotó entre 2010 y 2014, Guatemala sufrió las mayores consecuencias en América Central, con pérdidas equivalentes a 730,000 sacos, representando el 40% de la producción total. Esta situación llevó al país a declarar estado de emergencia y a realizar podas drásticas en 313,000 hectáreas, dejando un 13.7% del área cafetalera inutilizada para 2014 (Avelino et al., 2015). Los más afectados fueron los recolectores migrantes y los pequeños propietarios, con la pérdida de 115,000 empleos en 204 municipios cafetaleros. Esta población, en gran medida, depende del café como fuente principal de ingresos y alimento. Por ende, la crisis de la roya impactó directamente en la seguridad alimentaria, limitando el acceso a alimentos básicos para estas personas (Centro de Investigaciones en Café [CEDICAFE], 2015; Famine Early Warning Systems Network [FEWS NET] et al., 2014; Ruiz-García & Mendoza-Tijerino, 2014).

Se ha identificado que la raza fisiológica II de *H. vastatrix* es el inóculo inicial y se encuentra ampliamente distribuida en los países productores de café. A partir de esta raza, han surgido otras razas genéticamente diversas debido a la presión de selección del entorno sobre el patógeno, acelerando la evolución y la aparición de nuevas variantes. Esta evolución se intensifica en áreas donde se usan fungicidas de forma continua y en plantaciones con genotipos de baja diversidad genética (Silva, 2006). Recientemente, se ha aplicado una tecnología de marcadores llamada Polimorfismo Amplificado Relacionado con la Secuencia (SRAP) en el estudio de *H. vastatrix*, demostrando la existencia de variabilidad genética entre

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

diversas razas de roya (Kosaraju et al., 2017). Además, las secuencias del espaciador interno transcrito ITS 1 e ITS 2, así como la secuencia del gen 5.8S, se han empleado en el estudio de *H. vastatrix*, concluyendo que estos marcadores son fundamentales para investigaciones poblacionales sobre la roya.

A pesar de la importancia de la roya para la producción de café en Guatemala, no se han llevado a cabo estudios detallados sobre la variación molecular y las estimaciones de la diversidad genética de *H. vastatrix* en el país. La presente investigación representa el primer análisis de la diversidad genética y haplotípica, así como de la estructura poblacional de *H. vastatrix* en Guatemala, específicamente en los departamentos de Escuintla, Sacatepéquez y Chimaltenango, que conforman la región administrativa IV de ANACAFE. Esta región ha experimentado una alta incidencia de roya desde la epidemia de 2013-2014 hasta el último informe disponible en 2020 (CEDICAFE, 2020). Este estudio proporcionará información invaluable para comprender el comportamiento del patógeno, al relacionar la diversidad genética con los distintos niveles de virulencia. Estos hallazgos beneficiarán a instituciones académicas, de investigación, asociaciones de productores, ONG y otras entidades involucradas en el cultivo de café, permitiendo una mejor gestión de los genotipos de café existentes y el desarrollo de nuevas variedades resistentes a los haplotipos específicos de roya presentes en Guatemala.

Con el fin de alcanzar estos objetivos, se llevaron a cabo estudios moleculares utilizando marcadores de tipo microsatélite y secuenciación de la región ITS de aislados de *H. vastatrix*. La información molecular obtenida fue analizada mediante herramientas bioinformáticas. Además, se realizaron ensayos de inoculación in vitro sobre un genotipo de café susceptible para evaluar el comportamiento de cada haplotipo identificado. Asimismo, se realizaron inoculaciones de cada haplotipo en siete genotipos comerciales para evaluar la resistencia genética. Los resultados de estos ensayos in vitro fueron analizados mediante el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, aplicando análisis de varianza y pruebas de comparación de medias. Estos datos proporcionarán información crucial para el desarrollo de estrategias efectivas de control de la roya del café en Guatemala.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

4 Antecedentes

Hemileia vastatrix es un hongo patógeno causante de la roya del café, una de las enfermedades más importantes que afectan al café arábica en todo el mundo. La enfermedad provoca importantes pérdidas de rendimiento si no se aplican medidas de control (Silva et al., 2022). La diversidad genética de *H. vastatrix* se ha estudiado en diferentes sistemas de gestión del café en Etiopía, donde el hongo supone una amenaza cada vez mayor para la producción de café (Daba et al. 2023). Sin embargo, se carece de información sobre la diversidad genética de *H. vastatrix*. Sin embargo, falta información sobre la diversidad genética de *H. vastatrix* y su efecto en la agresividad de las variedades comerciales de café.

La diversidad genética de *H. vastatrix* se ha estudiado en diferentes sistemas de gestión del café en Etiopía, donde el hongo supone una amenaza cada vez mayor para la producción de café. En el estudio se halló un aislamiento significativo por distancia en todas las muestras investigadas y se detectaron diferencias significativas en la composición genética del hongo entre el café de plantación y el café de huerto casero y una diferencia marginalmente significativa entre el café de plantación y el café de bosque. La diversidad genética de *H. vastatrix* es un factor importante a tener en cuenta a la hora de seleccionar genotipos de café etíope para la mejora del cultivo (Daba et al. 2023).

No se conoce bien el efecto de la diversidad genética de *H. vastatrix* en la agresividad de las variedades comerciales de café. Sin embargo, un estudio sobre la ecofisiología del crecimiento y la producción del café descubrió que la susceptibilidad de las plantas de café a la RLC está influida por factores ambientales como la temperatura, la humedad y las precipitaciones (Cabral, 2016). El estudio también concluyó que la susceptibilidad de las plantas de café a la roya del cafeto está influida por la composición genética de la planta. Por lo tanto, es razonable suponer que la diversidad genética de *H. vastatrix* podría tener un efecto sobre la agresividad del patógeno en las variedades comerciales de café.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

5 Planteamiento del problema

La roya del café, causada por *H. vastatrix*, es la principal amenaza para el cultivo, provocando pérdidas entre el 20% y el 80% en variedades susceptibles de *Coffea arabica* L. (Maia et al., 2013). En los últimos años, esta enfermedad ha alcanzado proporciones epidémicas, generando importantes pérdidas económicas en América del Sur y Central (Cressey, 2013; Cristancho et al., 2012; McCook & Vandermeer, 2015). Actualmente, la roya representa la mayor limitación en la producción de café arábigo en numerosos países cafetaleros. Se han identificado diversas razas de *H. vastatrix* a nivel mundial (Rodrigues et al., 1975), y hasta la fecha, el Centro de Investigaciones sobre la Roya (CIFC) de Portugal ha documentado más de 47 razas fisiológicas de *H. vastatrix* en países productores de café (Kosaraju et al., 2017).

Durante la epidemia de roya en 2013, Guatemala sufrió pérdidas significativas, declarando estado de emergencia y llevando a cabo una poda drástica en 313,000 hectáreas, con consecuencias devastadoras para los recolectores migrantes y pequeños propietarios. La crisis afectó la seguridad alimentaria de la población dependiente del café como única fuente de ingresos. A pesar de la relevancia de la roya para la producción de café en Guatemala, no existen estudios detallados sobre la variación molecular y las estimaciones de la diversidad genética de *H. vastatrix* en el país. Aspectos cruciales como el flujo genético entre las poblaciones del hongo y la dispersión de aislados entre especies de café permanecen desconocidos (Cabral et al., 2016).

Esta información será fundamental para desarrollar estrategias efectivas de control, realizar estudios epidemiológicos y comprender el comportamiento evolutivo del hongo ante futuros brotes. Esta información resultará fundamental para desarrollar estrategias efectivas de control de la roya, realizar estudios epidemiológicos de la enfermedad y comprender el comportamiento evolutivo del hongo para hacer frente a futuros brotes del patógeno.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

6 Marco teórico

6.1 El cultivo de café

El café, considerado el producto agrícola más crucial, tiene un valor de venta al por menor estimado de 70.000 millones de dólares USD y es fundamental para la economía de más de 60 países, siendo la principal fuente de ingresos para más de 100 millones de personas (International Coffee Organization [ICO], 2016). Sin embargo, el cultivo de café enfrenta desafíos significativos, siendo la roya de la hoja del café una de las principales amenazas. Esta enfermedad, que causa pérdidas anuales estimadas en dos mil millones de dólares USD, es especialmente limitante para la producción de café Arábica (*Coffea arabica* L) a nivel global.

Las dos especies principales de café, *C. canephora* (café Robusta) y *C. arabica*, representan aproximadamente el 40% y el 60%, respectivamente, de la producción mundial de café (ICO, 2016). *C. arabica*, originaria de las zonas secas y elevadas de Etiopía y el norte de Kenia, ha experimentado graves cuellos de botella genéticos durante su domesticación, lo que ha reducido aún más su diversidad genética. Estos cuellos de botella genéticos, especialmente relevantes para los rasgos de resistencia a la enfermedad, se deben en parte a la ausencia de presión de selección para la resistencia a la roya durante su domesticación en Yemen, la región cafetalera más seca del mundo (Rodrigues et al., 1975).

Desde su propagación desde Yemen en el siglo XVII, la roya se ha convertido en una amenaza omnipresente para los cultivos de café en todo el mundo. A pesar de los esfuerzos de mejoramiento, la enfermedad ha persistido y se ha exacerbado en las últimas décadas debido a una serie de factores agronómicos, climáticos y económicos, causando pérdidas significativas de rendimiento y afectando negativamente los medios de vida de numerosos agricultores y trabajadores (Talhinhas et al., 2017).

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

6.2 La roya del café (*Hemileia vastatrix*)

H. vastatrix, responsable de la roya del café, pertenece al género *Hemileia* del filo Basidiomycota, clase Pucciniomycetes, orden Pucciniales. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de urediniosporas reniformes de 18-28 μ m, con una pared hialina deformada en la cara convexa y lisa en la cara recta o cóncava, y teliosporas esféricas o subglobosas de 20 a 28 μ m de diámetro (Talhinhas et al., 2017). Aunque las infecciones graves rara vez son letales para la planta huésped, obstaculizan el desarrollo vegetativo y pueden provocar epidemias poliéticas en las estaciones siguientes. La gravedad de la enfermedad está influenciada por varios factores, como el clima, la altitud, la sombra, la fertilidad del suelo y la arquitectura del dosel. A pesar del conocimiento acumulado sobre la epidemia y los modelos elaborados, las estrategias de gestión siguen siendo ineficaces debido a la complejidad de las variables ambientales y su interacción (Avelino et al., 2004).

6.3 Epidemia de la roya del café en el período 2010-2014

La roya anaranjada del café afectó fuertemente a los países centroamericanos, el Caribe, México, Perú y Ecuador durante el período 2010-2014, generando pérdidas masivas de producción. Esta epidemia se destacó por su alcance casi continental en pocos años, a diferencia de las epidemias anteriores que se limitaban a nivel nacional (Cristancho et al., 2012). Las pérdidas fueron especialmente devastadoras en Guatemala, donde se reportaron 730,000 sacos de café, representando el 21% de la producción y llevando al país a declarar un estado de emergencia. La respuesta a la epidemia incluyó la poda severa de 313,000 hectáreas, dejando un 13.7% del área productiva inutilizable para 2014 (Avelino et al., 2015). Esta crisis tuvo profundas repercusiones sociales y económicas, especialmente para los recolectores migrantes y los pequeños propietarios, afectando negativamente la seguridad alimentaria en América Central (FEWS NET et al., 2014; Ruiz García & Mendoza Tijerino, 2014).

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

6.4 Diversidad fisiológica de la roya

La roya del café exhibe una alta variabilidad patógena, lo que ha llevado a la identificación de más de 50 razas fisiológicas, especialmente en la India, que alberga el programa de mejoramiento de resistencia a la roya más antiguo del mundo (Varzea & Marques, 2005). Estas razas han evolucionado en respuesta a la presión de selección ejercida por los genes de resistencia del café, lo que ha llevado a la aparición de nuevos patotipos con espectros de virulencia ampliados (Prakash et al., 2004; Talhinhos et al., 2017). Este proceso continuo ha desafiado los esfuerzos de desarrollo de variedades resistentes, revelando la necesidad de estrategias de manejo más sofisticadas y adaptativas para combatir esta enfermedad devastadora.

7 Estado del arte

7.1 Diversidad genética de la roya

Tradicionalmente, la identificación y caracterización de las razas de *H. vastatrix* implicaba el uso de genotipos diferenciales de café, un enfoque que resulta laborioso y requiere mucho tiempo. Sin embargo, en la actualidad, se ha observado un creciente uso de marcadores moleculares para evaluar la variabilidad genética de múltiples cepas de hongos (Dubey et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Utilizando el marcador RAPD, se llevó a cabo un análisis de la diversidad genética de *H. vastatrix* procedente de diversas regiones geográficas, revelando una moderada diversidad genética en la población (Gouveia et al., 2005). Este mismo marcador molecular demostró ser útil para identificar una alta diversidad genética entre las poblaciones de roya en Mina Gerais, Brasil (Nunes et al., 2009).

El uso de AFLP también ha sido documentado en Colombia, permitiendo determinar que la epidemia de 2011 se debió al exceso de lluvia en lugar de la llegada de nuevos genotipos de roya (Rozo et al., 2012). Asimismo, un estudio realizado en Brasil analizó la estructura de la población de *H. vastatrix*, demostrando un alto nivel de diversidad genotípica mediante el

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

marcador AFLP (Maia et al., 2013). En otra región de Brasil, se investigó la influencia del huésped y el origen geográfico en la diversidad genética y estructura de la población de *H. vastatrix* utilizando marcadores AFLP, lo que sugirió que la población de hongos presentaba bajos niveles de diversidad genotípica (Cabral et al., 2016).

Un enfoque más reciente ha involucrado la aplicación de una tecnología de marcadores denominada polimorfismo amplificado relacionado con la secuencia (SRAP) en el estudio de *H. vastatrix*, lo que ha revelado variabilidad genética tanto entre como dentro de varias razas de roya (Kosaraju et al., 2017). En la actualidad, los marcadores microsatélites han demostrado ser valiosos para identificar la diversidad y procedencia del patógeno en Hawaii, incluso en regiones que se consideraban libres de roya hasta hace poco (Ramírez-Camejo et al., 2022).

Se han empleado las secuencias del espaciador interno transcrito ITS 1 e ITS 2, así como la secuencia del gen 5.8S en Brasil para el estudio de *H. vastatrix*, y se ha concluido que estos marcadores son altamente recomendados para el estudio poblacional de la roya. Este estudio ha revelado que la mayor parte de la diversidad genética reside dentro de las poblaciones en lugar de entre ellas (Santana et al., 2018). En Perú, el uso de ITS 1 e ITS 2 ha permitido identificar una red de haplotipos que evidencia la estructura de las poblaciones de *H. vastatrix* en cada zona. Estas poblaciones actúan como una gran población indiferenciada, con la presencia de haplotipos ancestrales a partir de los cuales se generan nuevas variantes del hongo. Además, se ha determinado que las poblaciones de *H. vastatrix* en Perú presentan haplotipos similares a los de Colombia, así como a las razas II y XXII (Quispe-Apaza et al., 2017).

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

8 Objetivos

General

1. Identificar la estructura poblacional y diversidad genética de *Hemileia vastatrix* en los departamentos de Escuintla, Sacatepéquez y Chimaltenango.
2. Determinar la relación entre la diversidad haplotípica de *Hemileia vastatrix* y su agresividad ante genotipos comerciales de café comercializados en Guatemala.

Específicos

1. Describir la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *H. vastatrix* en la zona de estudio.
2. Identificar la evolución genética y la red haplotípica *H. vastatrix* a partir de aislados del patógeno provenientes de la zona de estudio.
3. Determinar el nivel de virulencia de los haplotipos de *H. vastatrix* identificados en la zona de estudio.
4. Evaluar la resistencia de siete genotipos de café comercializados en Guatemala ante los haplotipos de *H. vastatrix* identificados.

9 Hipótesis

Las poblaciones de *H. vastatrix* presentan una alta diversidad y conectividad genética comportándose como una sola población poco diferenciada, existiendo haplotipos antiguos de los cuales derivó la actual diversidad genética.

10 Materiales y Métodos

10.1 Enfoque de la Investigación

La presente investigación adopta un enfoque cuantitativo para evaluar la diversidad genética inter e intra poblacional de *H. vastatrix*, así como su impacto en la resistencia de genotipos comerciales de café.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

10.2 Recolección de la Información

La recolección de datos se basó en información proporcionada por ANACAFE sobre la incidencia de la roya. Se llevaron a cabo muestreos en los departamentos de Escuintla, Sacatepéquez y Chimaltenango. Cada muestra consistió en una hoja de café que presentaba pústulas de roya. Se recolectaron cinco plantas de cada finca, y cada muestra se almacenó de manera individual en bolsas plásticas y se mantuvo en condiciones de frío para su posterior transporte. Además, se registraron las coordenadas geográficas de cada punto de muestreo.

10.3 Técnicas e Instrumentos

- Aislamiento de *H. vastatrix*

Se realizó un aislamiento de *H. vastatrix* mediante la preparación de una suspensión de uredosporas con una concentración de $10^3/\text{mL}$. Esta suspensión se aplicó en hojas de la variedad Caturra de café utilizando un atomizador para asegurar una dispersión uniforme del inóculo en la superficie de las hojas. Se aplicaron 100 uL de la suspensión concentrada para alcanzar una densidad de 100 uredosporas por hoja. Las hojas inoculadas se monitorearon regularmente para seguir el desarrollo de *H. vastatrix*. Una vez identificados los signos característicos del patógeno, se trasplantaron a nuevas hojas sanas, lo que representó un aislado puro de *H. vastatrix*. Todo este proceso se llevó a cabo bajo condiciones in vitro. Se utilizaron hojas de la variedad Caturra que previamente habían sido tratadas con fungicidas preventivos para garantizar la inocuidad del material foliar. Estos tratamientos se suspendieron 10 días antes de iniciar el proceso de aislamiento. Las hojas se sometieron a un proceso de desinfección que incluyó etanol al 70%, agua estéril, solución de hipoclorito de sodio al 10% v/v (a partir de un blanqueador comercial) y tres lavados adicionales con agua estéril. Las hojas se colocaron en cajas de Petri con agar-agua como medio de soporte para asegurar su supervivencia durante el proceso de aislamiento de *H. vastatrix*.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- Extracción de ADN de *H. vastatrix*

Se extrajo el ADN a partir de una porción de uredosporas mediante raspado de la superficie de la hoja con el aislado correspondiente. Este material se maceró en un mortero con nitrógeno líquido para garantizar la ruptura de las células y la eliminación de metabolitos secundarios. La extracción y purificación del ADN se realizó siguiendo el protocolo CTAB 2X descrito por Doyle (1987), que incluye CTAB al 2%, NaCl al 5M, Tris HCl al 1M, EDTA al 0.5M, 1% de PVP y 0.2% de β -mercaptoetanol. La integridad del ADN se verificó mediante geles de agarosa-TAE, y su concentración y calidad se midieron utilizando un fluorómetro Quantus™. El ADN se almacenó a -20°C después de ser eluido en 100 μL de tampón TE 1X.

- Amplificación de los Microsatélites

Se emplearon diecisiete pares de marcadores de repetición simple de secuencia (SSR) previamente reportados por Ramírez-Camejo et al. (2021), que mostraron polimorfismos en *H. vastatrix*. La amplificación por PCR se realizó según el protocolo descrito por Koch y Aime (2018), en un volumen total de 12.5 μL de reacción de PCR. Esta consistió en 6.25 μL de Promega 2 \times Taq DNA Polymerase PCR Master Mix, 0.16 μL del cebador delantero con la cola M13, 0.47 μL del cebador M13 con uno de los cuatro colorantes fluorescentes (6FAM, NED, PET y VIC), 0.63 μL del cebador inverso, 0.5 μL de molde de ADN y 4.5 μL de agua. Las condiciones de amplificación incluyeron ciclos de desnaturalización a 94°C , alineamiento a 49°C y extensión a 72°C . Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis capilar en un ABI 3500.

- Secuenciación de la Región ITS e Identificación de Haplotipos de *H. vastatrix*

La región ITS se amplificó a partir de las muestras de ADN utilizando cebadores universales ITS1L e ITS4R (White et al., 1990). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 10 μL conteniendo 2 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de dNTPs, 0.4 μM de cada cebador, buffer de PCR 1X, 1.5 Unidades de Taq ADN polimerasa y 40 ng de ADN. El programa de amplificación consistió en una etapa inicial a 95°C por 5 min; seguido de 30

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1.5 min, alineamiento a 60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2min; y un paso final de extensión a 72 °C por 5 min.

- Ensayos de Virulencia de Resistencia Genética

Para este ensayo se utilizó material foliar de la variedad de café Caturra por su característica de alta susceptibilidad, lo cual permitió observar de mejor manera la virulencia de cada haplotipo de *H. vastatrix*.

Para la preparación del inóculo se seleccionaron 3 haplotipos que representaron cada uno de los haplogrupos identificados (ver resultados). Cada haplotipo se multiplicó bajo condiciones in vitro atendiendo a la metodología previamente descrita en la fase de aislamiento. De cada haplotipo se colectaron las uredosporas que mostraron un color naranja intenso en etapa de esporulación (pústula). Para la preparación del inóculo se preparó una suspensión de uredosporas a una concentración de 75×10^3 uredosporas/mL (Álvarez-Lemus & Alvarado-Alvarado, 2001). Para la prueba de virulencia se siguió el protocolo descrito por Eskes (1983) que se basa en la inoculación de uredosporas de *H. vastatrix* sobre discos de hojas de café (3 cm de diámetro) ya que el hongo debe ser inoculado sobre material vivo.

Del inóculo se aplicaron 10 uL sobre las hojas y estas se incubaron en oscuridad a 24 °C. A partir de los primeros signos de desarrollo del hongo se tomaron las lecturas cada 2 días por un periodo de 10 días. Cada unidad experimental consistió en una caja de Petri con un disco de hoja de café inoculada. Se realizarán 5 repeticiones. El factor a evaluado fueron los haplotipos. Se utilizará un diseño completamente al azar. Se tomó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad como variable de respuesta.

- Ensayo de resistencia de siete genotipos comerciales de café a los haplotipos de *H. vastatrix*

Para este ensayo se utilizó material foliar de las variedades (genotipos) de café que se listan a continuación: 1) Anacafe 90 2) Anacafe 14 3) Cuscatleco 4) Obata 5) Marsellesa, 6) Parainema, 7) Caturra 8) Catuai

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Para la preparación del inóculo de cada haplotipo se siguió la misma metodología ya descrita en el ensayo de virulencia, basado en el mismo protocolo (Álvarez-Lemus & Alvarado-Alvarado, 2001). Para la prueba de resistencia de genotipos se utilizó el protocolo descrito por Eskes (1983) que se basa en la inoculación de uredosporas de *H. vastatrix* sobre discos de hojas de café (3 cm de diámetro) ya que el hongo debe ser inoculado sobre material vivo.

Del inóculo se aplicarán 10 uL sobre las hojas y estas se incubaron en oscuridad a 24 °C. A partir de los primeros signos de desarrollo del hongo se tomarán las lecturas cada 2 días por un periodo de 10 días. Cada unidad experimental consistió de una caja de Petri con un disco de hoja de café inoculada. Se realizaron cinco repeticiones. Los factores a evaluar fueron (a) haplotipos identificados (hasta un máximo de 20) en la fase molecular y (b) genotipos de café (7 genotipos). Se usó un diseño completamente al azar. La variable de respuesta fue (a) área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

11 Procesamiento de la información

11.1 Diversidad Genética y Estructura Poblacional

El análisis de la diversidad genética y la estructura poblacional de *H. vastatrix* se llevó a cabo utilizando diversas técnicas. Inicialmente, se realizaron análisis de coordenadas principales (PCoA) y árboles UPGMA para evaluar las relaciones entre individuos y poblaciones respectivamente. Estos análisis se calcularon mediante GenAlEx v6.52 (Peakall & Smouse, 2012) utilizando la matriz G_{ST} por pares. Además, se calcularon medidas clave como el porcentaje de loci polimórficos, el número observado de alelos, el número efectivo de alelos y la diversidad genética de Nei (Nei, 1973). La estructura genética de las poblaciones se evaluó utilizando el análisis de la varianza molecular (AMOVA) según los procedimientos descritos por Excoffier et al. (1992) y Peakall y Smouse (2012). La distancia genética de Nei por pares y la estadística de Nei (h) se calcularon para las poblaciones utilizando GenAlEx v6.52. La relación entre las distancias genéticas y geográficas se examinó mediante la prueba

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

de Mantel (Mantel, 1967), lo que permitió determinar la diversidad genética espacial de la población de *H. vastatrix*.

La estructura genética poblacional se investigó más a fondo utilizando un modelo bayesiano de Monte Carlo con cadena de Markov (MCMC) implementado en STRUCTURE v2.3.4 (Falush et al., 2003). Se realizaron cinco ejecuciones para cada número de poblaciones (K) establecido entre 1 y 8. El valor K más probable se determinó utilizando Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012) basado en la probabilidad logarítmica de los datos [LnP(D)] y delta K (ΔK) basado en la tasa de cambio de [LnP(D)] entre valores K sucesivos (Evanno et al., 2005). Además, se generó una red de haplotipos para observar la semejanza y distribución entre ellos, excluyendo posibles gaps, utilizando el programa PopART (Leigh & Bryant, 2015). Para establecer relaciones filogenéticas, las secuencias de la región ITS de *H. vastatrix* obtenidas se compararon con aquellas disponibles en el GenBank, incluyendo datos de estudios previos en Colombia y Brasil. El alineamiento múltiple se realizó con el método MAFFT implementado en el programa UGENE v.1.32.0 (Okonechnikov et al., 2012) utilizando las secuencias de ADN de la región ITS como referencia.

11.2 Ensayos de Virulencia y Resistencia Genética

Los datos obtenidos de los ensayos de virulencia de los haplotipos de roya y de resistencia de genotipos de café se sometieron a un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 %, siguiendo el diseño experimental propuesto en la metodología (DCA). Para este análisis, se utilizó el programa R v4.2.0 con los paquetes stats (R Core Team, 2022) y agricolae (de Mendiburu, 2020). Los resultados se representaron gráficamente mediante diagramas de cajas utilizando las bibliotecas ggplot2 (Wickham, 2016) y ggstatsplot (Patil, 2021) para visualizar cualquier diferencia significativa entre las variables de respuesta. Este análisis permitió determinar si existían diferencias significativas en la virulencia de los haplotipos de roya y la resistencia de los genotipos de café evaluados.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

12 Resultados

12.1 Describir la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *H. vastatrix* en la zona de estudio.

Polimorfismo y diversidad de los marcadores microsatélites

En la Tabla 1 se presentan los índices de diversidad de los loci SSR (Simple Sequence Repeat) utilizados en el estudio. Los 17 marcadores SSR analizados revelaron una variabilidad genética considerable en la población bajo investigación. La cantidad de alelos (N_a) por locus osciló entre 2 y 6, con una media de 3 alelos por locus. La diversidad alélica se evaluó mediante el número efectivo de alelos (N_e), que varió de 1.23 a 3.35 con un promedio de 1.87. El índice de información de Shannon (I) indicó la diversidad genética promedio, con un valor medio de 0.78, señalando una variabilidad significativa en los loci SSR estudiados.

Además, se calcularon las heterocigosidades observada (H_o) y esperada (H_e) para evaluar la diversidad dentro de la población. La H_o varió de 0.48 a 0.97, indicando una variabilidad considerable en los genotipos de la población. Por otro lado, la H_e fluctuó entre 0.50 y 0.69, lo que sugiere una diversidad genética esperada en la población. Los coeficientes de fijación (F) proporcionaron información sobre la estructura genética y la endogamia en las subpoblaciones. Los valores de F_{ST} , que miden la diferenciación genética entre las subpoblaciones en relación con el total, variaron desde -0.90 hasta -0.28. El flujo genético estimado (Nm) a partir de F_{ST} mostró valores que oscilaron entre 2.17 y 125.00, lo que indica una variabilidad significativa en la dispersión genética entre las subpoblaciones.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Tabla 1.

Índices de diversidad de los loci SSR utilizados.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	F	F _{ST}	Nm
SSR01	2	1.30	0.70	0.91	0.54	-0.60	0.048	4.80
SSR02	5	2.22	0.93	0.94	0.56	-0.65	0.001	125.00
SSR03	3	1.48	0.75	0.91	0.56	-0.51	0.002	83.33
SSR04	2	1.37	0.68	0.94	0.58	-0.88	0.002	83.33
SSR05	5	2.10	1.18	0.92	0.60	-0.81	0.034	6.95
SSR06	2	1.56	0.70	0.88	0.58	-0.69	0.038	6.20
SSR07	6	3.35	1.85	0.97	0.64	-0.61	0.068	3.39
SSR08	3	1.91	0.85	0.90	0.59	-0.54	0.101	2.17
SSR09	2	1.23	0.69	0.89	0.56	-0.54	0.001	119.00
SSR10	2	1.28	0.68	0.92	0.58	-0.71	0.008	27.78
SSR11	4	1.14	1.20	0.88	0.48	-0.30	0.049	4.72
SSR12	3	1.25	0.73	0.95	0.54	-0.87	0.068	3.34
SSR13	4	2.14	0.76	0.52	0.36	-0.28	0.041	5.62
SSR14	3	2.54	0.75	0.91	0.50	-0.80	0.034	6.95
SSR15	2	1.26	0.73	0.93	0.52	-0.84	0.042	5.62
SSR16	4	2.06	0.80	0.97	0.67	-0.90	0.048	4.88
SSR17	3	1.94	0.72	0.95	0.69	-0.86	0.016	14.55
Media	3	1.87	0.78	0.92	0.55	-0.68	0.036	32.69

Nota. Na = número de alelos; Ne = número efectivo de alelos; I = índice de información de Shannon; Ho = heterocigosidad observada; He = heterocigosidad esperada; F = índice de fijación; F_{ST} = coeficiente de endogamia dentro de las subpoblaciones en relación con el total (diferenciación genética entre las subpoblaciones); Nm = flujo genético estimado a partir de $F_{ST} 0,25(1 - F_{ST})/F_{ST}$

Diversidad genética de las poblaciones

La Tabla 2 muestra los resultados de los análisis de diversidad genética para diferentes poblaciones (ESC01, ESC02, SAC01, SAC02, CHI01 y CHI02) basados en marcadores SSR. Se evaluaron varias medidas de diversidad genética para cada población, proporcionando una visión detallada de su estructura genética.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

El número de alelos (N_a) varía entre 3.1 y 5.1, con una media de 4, indicando una diversidad genética significativa en estas poblaciones. La diversidad genética efectiva (N_e) varió desde 2.2 hasta 3.3, con un promedio de 2.55, lo que sugiere un nivel moderado de variabilidad genética dentro de las poblaciones estudiadas. El índice de información de Shannon (I), que mide la cantidad de información que proporcionan los marcadores genéticos, varía de 0.73 a 1.12, con un promedio de 0.84. Estos valores indican un nivel moderado a alto de diversidad genética en las poblaciones, lo que es fundamental para la adaptabilidad y la supervivencia a largo plazo de las especies.

Las heterocigosidades observadas (H_o) se encuentran entre 0.73 y 0.85, mientras que las heterocigosidades esperadas (H_e) varían de 0.82 a 0.96, mostrando una buena concordancia entre la variabilidad genética esperada y observada en estas poblaciones. El porcentaje de loci polimórficos (P %) para las poblaciones varía del 94.5% al 98.5%, indicando una alta proporción de loci polimórficos en estas poblaciones. Además, los valores del índice de fijación (F) oscilan entre -0.85 y -0.62, lo que sugiere una baja estructuración genética y una alta diversidad genética dentro de las poblaciones.

Tabla 2.

Índices de diversidad de la población en los 17 loci SSR

Pop	N	Ng	N_a	N_e	I	H_o	H_e	P (%)	F
ESC01	10	5.5	3.6	2.3	0.8	0.92	0.58	98.5	-0.7
ESC02	8	4.2	5.1	2.6	0.85	0.91	0.57	99	-0.75
SAC01	12	8.9	3.1	3.3	1.12	0.94	0.68	94.5	-0.62
SAC02	10	7.2	4	2.2	0.86	0.9	0.56	97	-0.67
CHI01	6	7.5	4.5	2.35	0.73	0.82	0.48	97.5	-0.69
CHI02	12	6.3	4.15	3.25	0.75	0.96	0.6	98	-0.85
Promedio	-	7.27	4	2.55	0.84	0.91	0.58	97.5	-0.7

Nota. N_a = número de alelos; Ng =genotipos diferentes tipo SSR; N_e = número efectivo de alelos; I = índice de información de Shannon; H_o = heterocigosidad observada; H_e = heterocigosidad esperada; P (%) = porcentaje de loci polimórficos; F = índice de fijación

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Estructura genética de las poblaciones

El dendrograma UPGMA, reveló la existencia de tres grupos distintos, sin importar su procedencia geográfica. En el primer grupo se encuentran tres poblaciones: SAC01, ESC01 y SAC02. En el segundo grupo están dos poblaciones: CHI02 y SAC02. Finalmente, la población CHI01 forma el tercer grupo (Figura 1). Este patrón de agrupación genética proporciona una visión clara de la estructura poblacional de *H. vastatrix* en el área estudiada.

Los resultados del AMOVA (Tabla 3) revelan la distribución de la variación genética entre diferentes niveles de estructura poblacional. La variación genética entre regiones contribuye con un 1.6% al total de la variación genética, mientras que la variación entre poblaciones representa el 7.8% de la variación total. La mayoría de la variación (91.2%) se encuentra dentro de las poblaciones. Los valores de F_{ST} indican la diferenciación genética entre las poblaciones, siendo 0.015 para la variación entre regiones y 0.020 para la variación entre poblaciones. Ambos valores son estadísticamente significativos ($p < 0.05$), lo que sugiere una estructura genética significativa en las poblaciones de *H. vastatrix*.

Se observa que todos los valores de F_{ST} son significativos a un nivel de confianza del 95% ($p = 0.05$) (Tabla 4), lo que indica que existe una diferenciación genética significativa entre todas las poblaciones analizadas. Esto sugiere que las poblaciones de *H. vastatrix* estudiadas presentan diferencias genéticas sustanciales y no están en equilibrio genético.

Los valores de distancia genética de Nei varían entre 0.049 y 0.142, lo que refleja la diversidad genética entre las poblaciones. Por ejemplo, la población CHI01 muestra la mayor diferenciación genética con respecto a las otras poblaciones, con un valor de F_{ST} de 0.066. Esto indica que CHI01 ha experimentado una mayor separación genética con respecto a las demás poblaciones y podría estar sujeta a influencias genéticas únicas o aislamiento geográfico.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Figura 1.

Dendrograma UPGMA utilizando la distancia genética insesgada de Nei entre ocho poblaciones de *Hemileia vastatrix* en Guatemala.

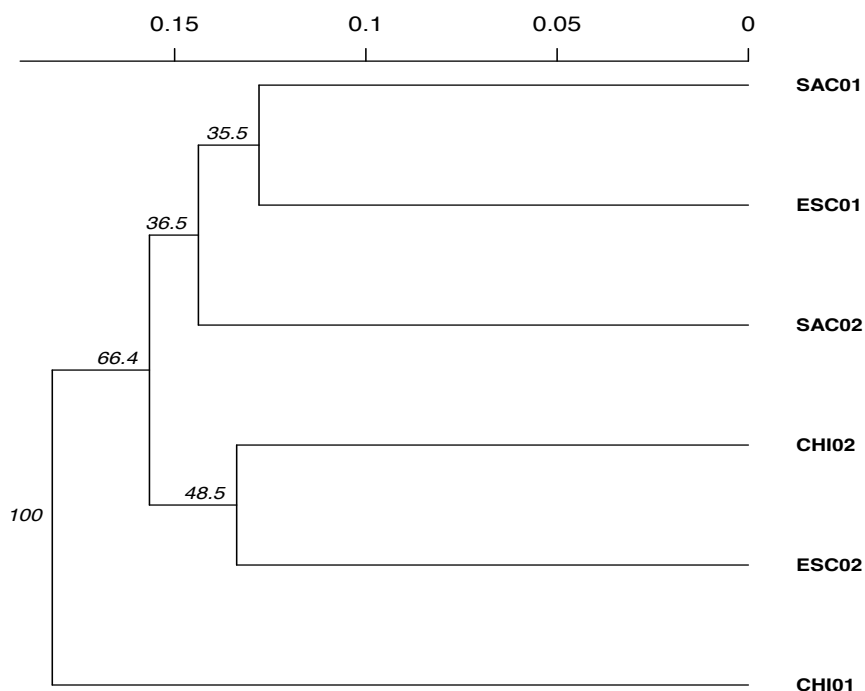


Tabla 3.

Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de *H. vastatrix*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	F _{ST}	p-valor
Entre regiones	1	12.793	12.793	0.018	1.60%	0.015	0.018
Entre poblaciones	4	59.211	14.803	0.45	7.80%	0.02	0.001
Dentro de poblaciones	122	490.098	4.016	4.016	91.20%	0.004	0.001
Total	127	562.102	-	4.484	100%	-	-

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Tabla 4.

Distancia genética Nei (encima de la diagonal) y diferenciación genética (F_{ST}) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de *H. vastatrix* estudiadas.

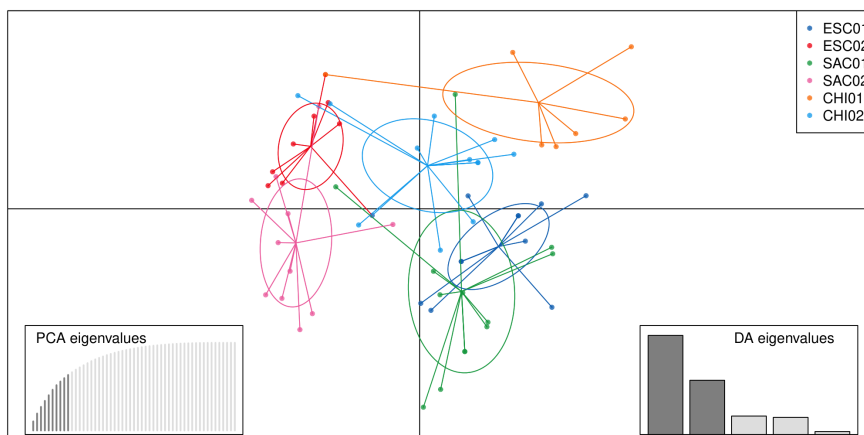
Población	ESC01	ESC02	SAC01	SAC02	CHI01	CHI02
ESC01	0	0.042	0.055	0.083	0.078	0.064
ESC02	0.045	0	0.109	0.088	0.049	0.071
SAC01	0.028	0.051	0	0.059	0.095	0.055
SAC02	0.041	0.035	0.027	0	0.142	0.072
CHI01	0.036	0.055	0.05	0.066	0	0.087
CHI02	0.032	0.028	0.029	0.036	0.038	0

Nota. Todos los valores de F_{ST} por pares son significativos a $p = 0.05$.

El análisis discriminante de componente principales (Figura 2) y el dendrograma UPGMA (Figura 3) a nivel de individuos mostraron una débil estructuración poblacional ya que los grupos identificados no responden a su ubicación geográfica. Ambos métodos de estructuración identificaron un evidente flujo genético entre las poblaciones analizadas, homogenizando la composición genética de los aislados del patógeno.

Figura 2.

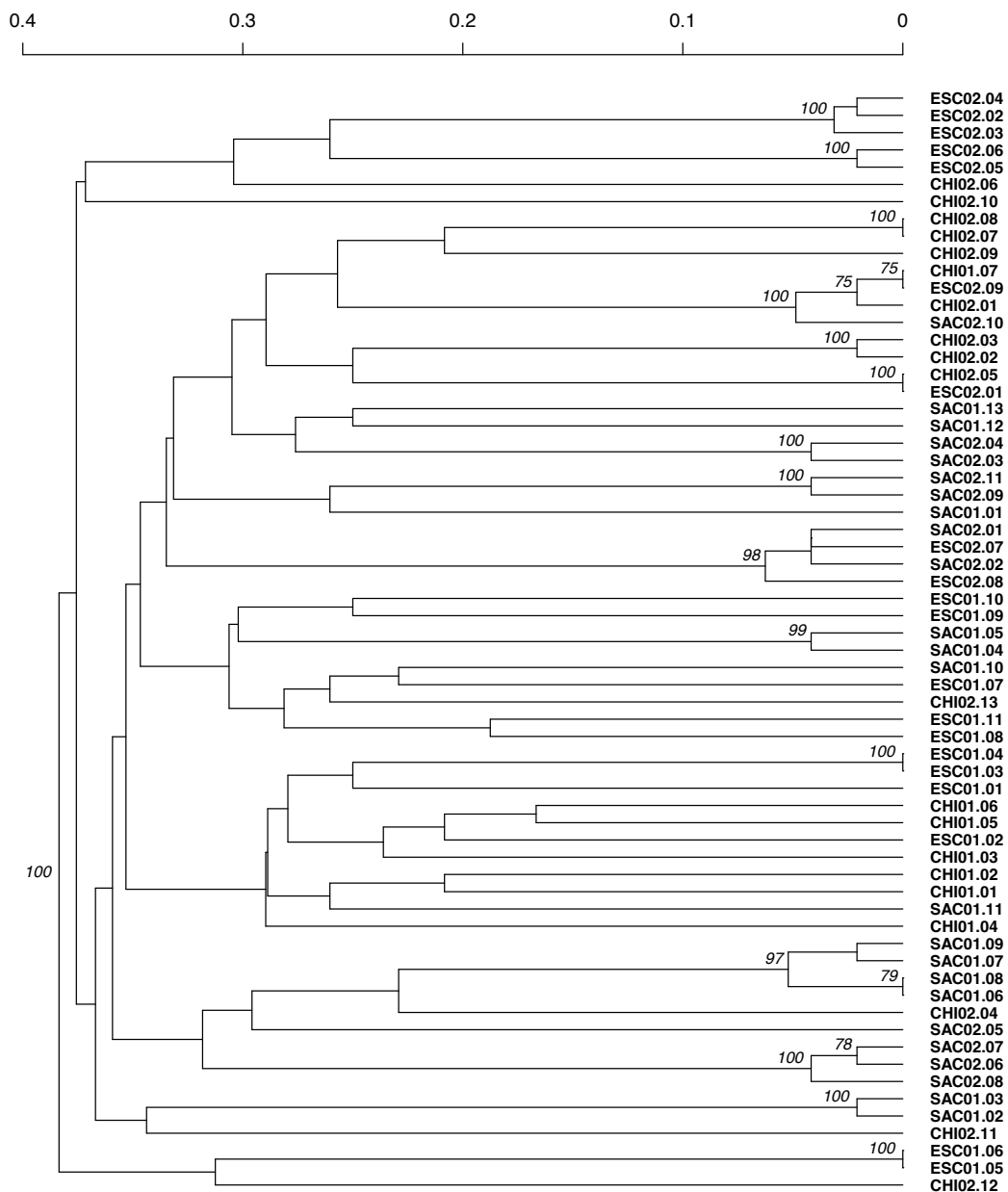
Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para visualizar las relaciones genéticas entre 64 aislados de *H. vastatrix*.



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Figura 3.

Clasificación genética de poblaciones de *H. vastatrix* mediante UPGMA utilizando 17 Marcadores SSR. Se muestran valores de Bootstrap superiores a 70 luego de 1000 permutaciones.



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Se empleó un enfoque bayesiano para investigar la estructura poblacional de los aislados de *H. vastatrix*. Según los resultados obtenidos del análisis Bayesiano, el número óptimo de conglomerados (K) fue tres, determinado mediante los mayores valores de lnP (D) (probabilidad logarítmica de los datos) y delta K. La subestructura de las relaciones genéticas entre las muestras individuales se presenta en la Tabla 5, donde se observa que 10, 31 y 19 muestras se agruparon en las poblaciones 1, 2 y 3 respectivamente. En el gráfico, el color verde (población 1), celeste (población 2) y rojo (población 3) representan las tres subpoblaciones, mientras que los segmentos negros separan los aislados de diferentes regiones geográficas. Cada color indica la proporción de ascendencia de los aislados a las tres subpoblaciones, representada por líneas verticales en el gráfico (Figura 4).

Tabla 5.

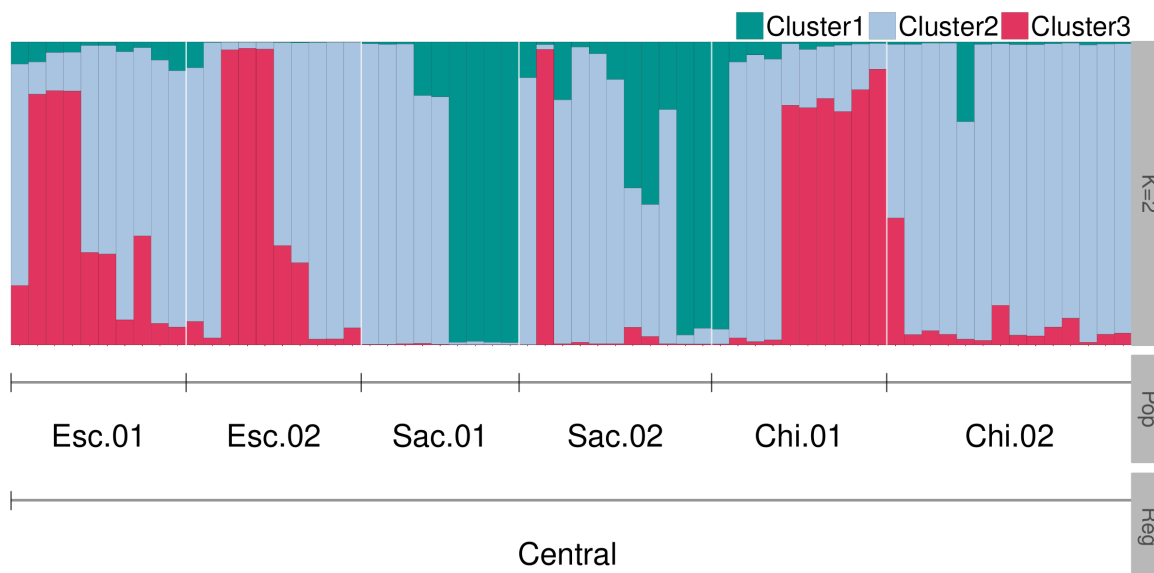
Resultados del análisis STRUCTURE para 64 aislados de *H. vastatrix*, que incluyen el índice medio de fijación (F_{ST}), las distancias (Heterocigosidad esperada/ H_e) y el número de aislados asignados a cada subpoblación.

Población	F_{ST} promedio	H_e	No. de aislados
Pop 1	0.346	0.401	10
Pop 2	0.029	0.671	31
Pop 3	0.231	0.615	19

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Figura 4.

Análisis de estructuración genética basado en STRUCTURE utilizando 17 microsátelites.



El análisis de Mantel, que examina la relación entre la distancia genética de Nei y la distancia geográfica entre poblaciones, no reveló ninguna correlación significativa entre ambas ($R_{xy} = -0.121$, $P = 0.167$). Estos resultados sugieren que las diferencias genéticas entre las poblaciones se deben más a factores genéticos que a la proximidad geográfica

12.2 Identificar la evolución genética y la red haplotípica *H. vastatrix* a partir de aislados del patógeno provenientes de la zona de estudio.

Se secuenciaron 62 muestras de ADN de *H. vastatrix* provenientes de seis poblaciones, generando secuencias de la región ITS con longitudes entre 927 pb y 955 pb. Tras el alineamiento, se identificaron 955 sitios, de los cuales 5 presentaron gaps y 112 fueron polimórficos. Además, se identificaron 36 posiciones informativas según la Tabla 6.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Tabla 6.

Datos de diversidad genética de seis poblaciones de *H. vastatrix* basados en la región ITS.

Pop	No. Secuencias	Pi	H	Hs	D	SV	SVS	SPI
ESC01	12	0.0042	9	0.983	-1.26	16	12	4
ESC02	8	0.0056	7	0.974	-0.86	19	13	6
SAC01	14	0.0039	6	0.948	-0.595	14	8	6
SAC02	10	0.007	9	0.982	-1.24	28	17	11
CHI01	6	0.0062	6	1.001	-1.32	19	17	2
CHI02	12	0.0045	5	0.976	-1.09	16	9	7
Total	62	0.0049	42	0.986	-2.525	112	76	36

Nota. Pi = diversidad nucleotídica; H = número de haplotipos; Hs = diversidad haplotípica; D = prueba de Tajima, SV = sitios variables; SVS = sitios variables Singleton; SPI = sitios parsimoniosos informativos

En las seis poblaciones examinadas, se identificaron 42 haplotipos que exhibieron diversidad tanto haplotípica ($H_s = 0.986$) como nucleotídica ($P_i = 0.0049$). De estos, 42 haplotipos fueron caracterizados por secuencias únicas, mientras que 8 haplotipos presentaron más de dos secuencias (Tabla 7). Destacaron los haplotipos Hap_14 y Hap_35 por su frecuencia elevada, considerándose como ancestros y su distribución abarcó la mayoría de las poblaciones analizadas sin evidenciar una correlación con su ubicación. Con el objetivo de analizar los patrones de expansión, se implementó la prueba de neutralidad de Tajima tanto a nivel individual como para el conjunto de poblaciones de *H. vastatrix*. Los resultados obtenidos mostraron de manera consistente valores inferiores a 0 ($p < 0.001$), lo que sugiere que las poblaciones del patógeno están experimentando un proceso de expansión.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Tabla 7.

Listado y frecuencia de haplotipos de la región ITS de *H. vastatrix*.

Haplotipo	Frecuencia	Haplotipo	Frecuencia	Haplotipo	Frecuencia
Hap_1:	1	Hap_15:	1	Hap_29:	1
Hap_2:	1	Hap_16:	1	Hap_30:	1
Hap_3:	1	Hap_17:	1	Hap_31:	2
Hap_4:	1	Hap_18:	3	Hap_32:	1
Hap_5:	1	Hap_19:	1	Hap_33:	1
Hap_6:	1	Hap_20:	2	Hap_34:	1
Hap_7:	1	Hap_21:	1	Hap_35:	6
Hap_8:	1	Hap_22:	1	Hap_36:	1
Hap_9:	1	Hap_23:	1	Hap_37:	1
Hap_10:	1	Hap_24:	2	Hap_38:	1
Hap_11:	2	Hap_25:	1	Hap_39:	1
Hap_12:	1	Hap_26:	1	Hap_40:	1
Hap_13:	1	Hap_27:	1	Hap_41:	1
Hap_14:	9	Hap_28:	1	Hap_42:	2

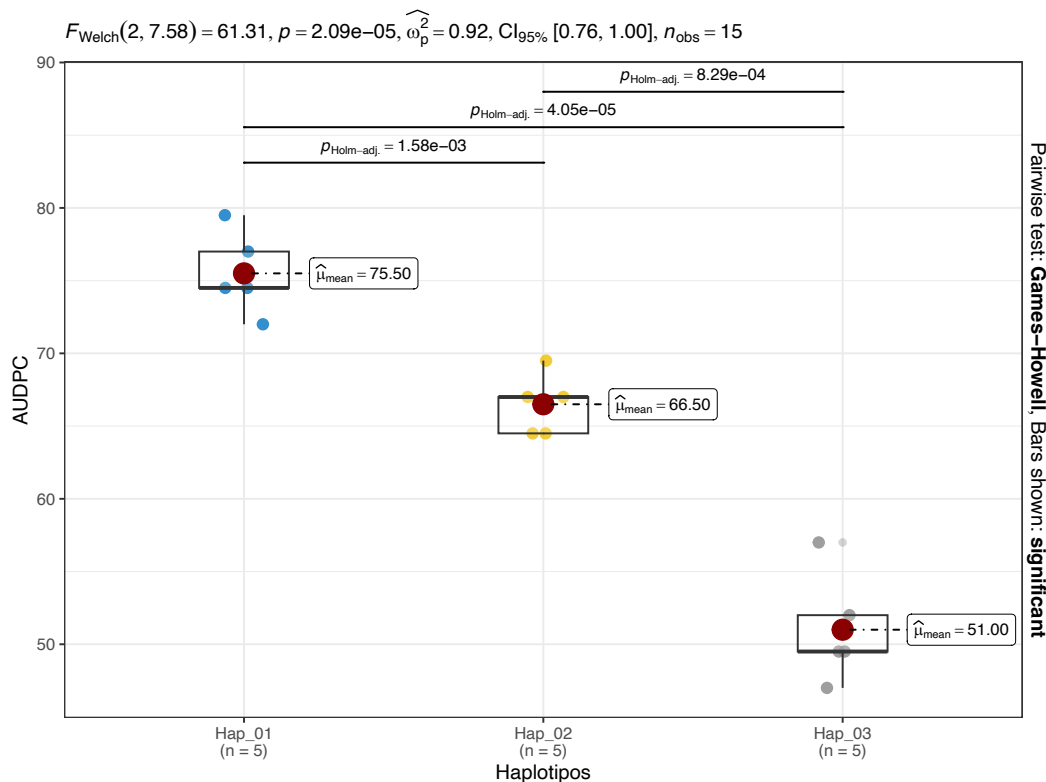
12.3 Determinar el nivel de virulencia de los haplotipos de *H. vastatrix* identificados en la zona de estudio.

Los resultados del análisis de varianza muestran una diferencia estadísticamente significativa entre los haplotipos de *H. vastatrix* en términos del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC). La prueba F de Welch arrojó un valor de 61.31 con un p-valor < 0.05 (Figura 5), indicando una fuerte evidencia en contra de la hipótesis nula de igualdad de medias entre los grupos de haplotipos. Además, el coeficiente de determinación omega cuadrado (ω^2) revela que aproximadamente el 92% de la variabilidad en la variable de respuesta puede ser atribuida a las diferencias entre los haplotipos. Estos hallazgos subrayan la importancia de la variabilidad genética de *H. vastatrix* en la susceptibilidad al progreso de la enfermedad, destacando la necesidad de considerar estos haplotipos en estrategias de manejo y control.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Figura 5.

Análisis comparativo del AUDPC entre tres haplotipos de *H. vastatrix* en la variedad catarra: resultados del análisis de varianza y comparaciones estadísticas significativas ($p < 0.05$)

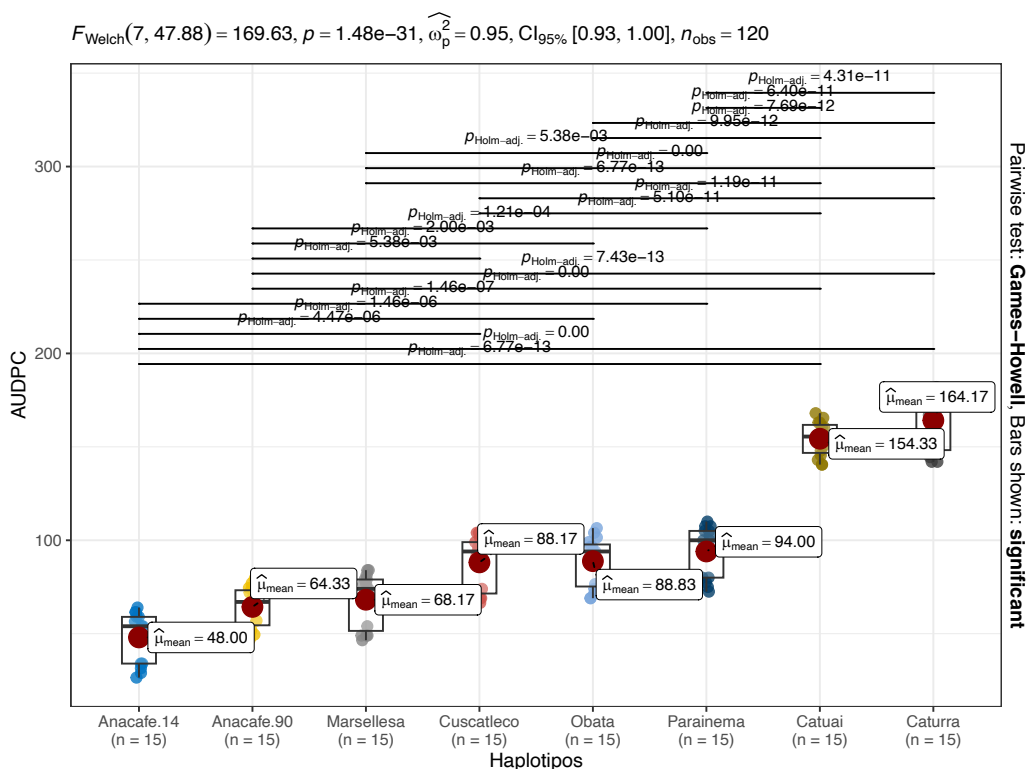


Los resultados del análisis de varianza revelaron diferencias significativas en el AUDPC entre las ocho variedades comerciales de café (**Figura 6**). La alta magnitud del estadístico F y el valor extremadamente bajo de p indican una robusta asociación entre la variabilidad en las variedades comerciales y las disparidades en el desarrollo de la enfermedad. Además, el omega cuadrado de 0.95 señala que el 95% de la variabilidad en el área bajo la curva puede atribuirse a las variaciones entre las variedades comerciales. Estos hallazgos subrayan la importancia de la variable categórica, las variedades comerciales de café, en la explicación de las disparidades observadas en la progresión de la enfermedad.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Figura 6.

Comparación del índice del AUDPC de *H. vastatrix* en variadas variedades de café

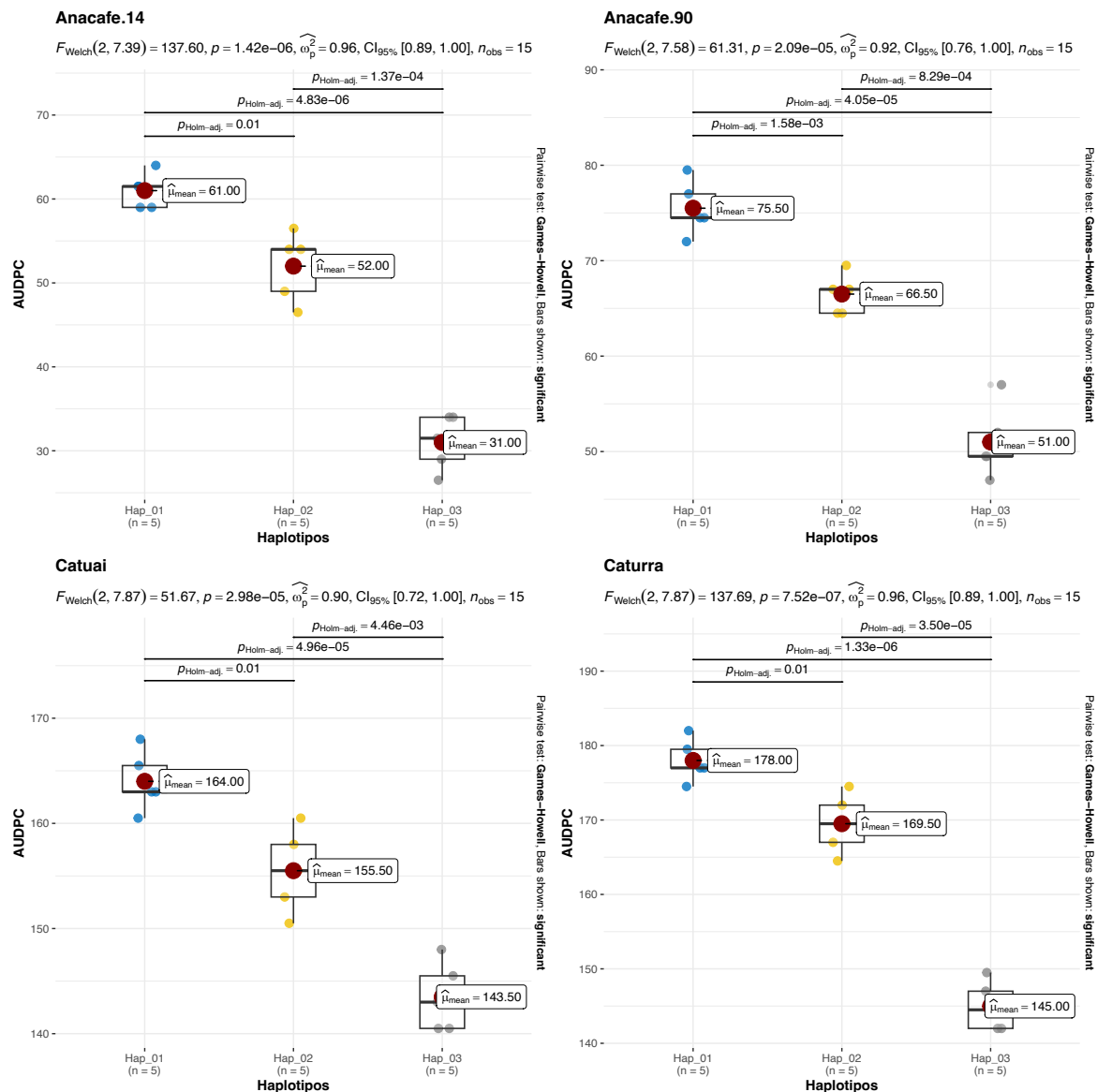


Se evidenció una respuesta diferencial de las variedades de café ante los distintos haplotipos de *H. vastatrix*, observándose diferencias significativas ($p < 0.001$) en los valores del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (AUDPC) en todas las interacciones entre variedad y haplotipo. El haplotipo Hap_01 exhibió el mayor impacto en el AUDPC en todos los casos, destacándose como el más virulento, independientemente de la variedad de café. En todas las evaluaciones, el Hap_02 ocupó la segunda posición y mostró diferencias estadísticas con respecto al Hap_01. Por otro lado, el Hap_03 demostró ser el haplotipo menos agresivo para todas las variedades de café, exhibiendo el valor más bajo de AUDPC y siendo estadísticamente diferente de los otros dos haplotipos (Figura 7, Figura 8). Para obtener detalles específicos de cada prueba, se remite a las Figuras 9 y 10."

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Figura 7.

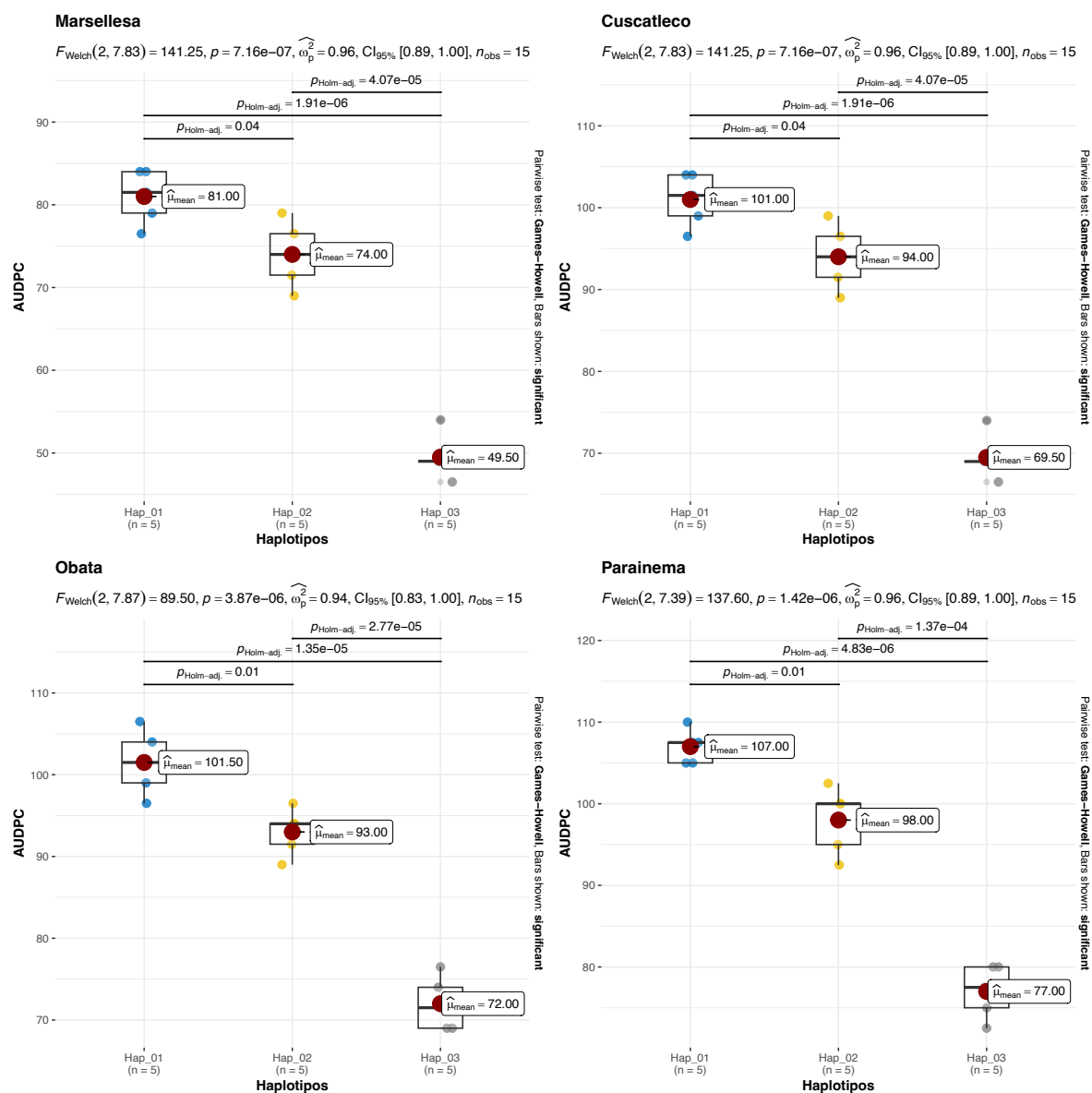
Diagrama de cajas del comportamiento del índice AUDPC agrupado por variedades de café: detalle del análisis de varianza con comparaciones significativas ($p < 0.05$).



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Figura 8.

Diagrama de cajas del AUDPC agrupado por variedades de café: detalles del análisis de varianza con comparaciones significativas ($p < 0.05$)



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

13 Discusión

El empleo de marcadores SSR en especies fúngicas demanda la selección precisa de cebadores para obtener información fiable (Talhinhas et al., 2017). En este estudio, se evaluaron 17 SSR en aislados de *H. vastatrix*, identificándose alelos únicos y un alto porcentaje promedio de polimorfismo del 97.5%, indicativo de una elevada diversidad genética. En comparación con estudios previos que utilizaron marcadores diferentes, como SRAP en aislados de la India (Kosaraju et al., 2017) y AFLP en Brasil (Cabral et al., 2016) y Colombia (Rozo et al., 2012), los marcadores SSR demostraron ser más informativos, revelando un mayor polimorfismo en *H. vastatrix*.

Los resultados también evidenciaron que cada marcador SSR detectó un número variable de alelos (6 a 12), posiblemente relacionado con el tipo de motivo SSR empleado (Zhong et al., 2008). Además, los marcadores SSR exhibieron distintos niveles de flujo genético (Nm) entre las poblaciones, indicando una eficiente selección de marcadores. Comparado con estudios previos (Cabral et al., 2016), que reportaron un Nm de 22.14 para aislados brasileños, este estudio encontró valores más elevados, sugiriendo una mayor dispersión de urediniosporas de *H. vastatrix* en Guatemala.

El análisis de la estructura genética reveló poblaciones genéticamente diversas de *H. vastatrix* asociadas a las epidemias de roya en Guatemala. La subestructuración de las muestras en tres poblaciones sugiere que la relación genética no está vinculada a factores geográficos, altitudinales o de producción. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que indican que las poblaciones de *H. vastatrix* no se estructuran según el hospedador o la ubicación geográfica (Cabral et al., 2016; Gouveia et al., 2005; Maia et al., 2013; Santana et al., 2018).

La ausencia de correlación entre la diversidad genética y las distancias geográficas se alinea con estudios de otros patógenos de la roya, respaldando la hipótesis de la dispersión por viento de *H. vastatrix*. La presencia omnipresente de cafetos en las principales zonas cafetaleras guatemaltecas, junto con la intervención humana en las fincas, facilita el flujo genético y minimiza la diferenciación genética entre las poblaciones. Este escenario, similar a

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

estudios en Brasil (Nunes et al., 2009), sugiere que la variación genética es independiente de la ubicación geográfica y el hospedero.

Las poblaciones de *H. vastatrix* en los cafetales guatemaltecos exhibieron una variabilidad genética significativa entre y dentro de las poblaciones, indicando una distribución homogénea de la variación genética. Este contraste con la baja diversidad genética informada en otras poblaciones de *H. vastatrix* a nivel mundial mediante marcadores RAPD (Gouveia et al., 2005) sugiere una relación entre alta diversidad genética, flujo genético y/o tasas de mutación más elevadas (McDonald & Linde, 2002). Factores adicionales que contribuyen a la diversidad genética en Guatemala incluyen extensas plantaciones de café con distintos sistemas de producción, variabilidad genética de los cultivares de café, prácticas de cultivo orgánico y la variabilidad ambiental en la región. En conjunto, estos factores promueven la expansión de la diversidad genética de *H. vastatrix* en Guatemala (Kimura, 1983; McDonald & Linde, 2002).

La ausencia de nodos exclusivos por población geográfica en la red haplotípica sugiere que la población de *H. vastatrix* es extensa y sin diferenciación, probablemente debido a la dispersión de esporas a través del movimiento de personas, semillas o plantas infectadas. Estos resultados concuerdan con hallazgos en Brasil, donde Cabral et al. (2016) no encontraron una estructuración de la población de *H. vastatrix* respecto a su origen, hospedero ni razas fisiológicas, aunque con menor diversidad genética que la presente investigación. Resultados similares se obtuvieron en Brasil por Maia et al. (2013), quienes sugirieron que *H. vastatrix* constituye una población grande e indiferenciada, con alta diversidad genotípica y sin estructuración geográfica ni de hospedero. Por lo tanto, la falta de estructuración de las poblaciones de *H. vastatrix* podría explicarse por la dispersión del hongo a largas distancias.

Los valores negativos de D de Tajima en las poblaciones de *H. vastatrix* indican un proceso de expansión originado a partir de pocos genotipos o de la raza II identificada en Guatemala desde 1980 (Schieber & Sanchez de Leon, 1982). Esto explica la presencia de un gran número de haplotipos únicos en la red haplotípica y el aumento de la variabilidad debido al rápido crecimiento de la población. Tales valores también sugieren que la diversidad genética es mayor de lo esperado bajo un modelo neutral de evolución, lo que podría deberse

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

a procesos como selección natural o expansión poblacional reciente. No se encontró evidencia de un efecto de la altitud en la estructura de la población, coincidiendo con estudios que sugieren que *H. vastatrix* constituye una población grande y no estructurada (Cristancho et al., 2012).

Los mecanismos que impulsan el aumento de la variabilidad y la creación de nuevas razas de *H. vastatrix* aún son desconocidos. Se postula que las mutaciones espontáneas, especialmente durante períodos de alta incidencia de la enfermedad, podrían ser el principal mecanismo responsable de la variabilidad en el hongo. La presión selectiva del medio ambiente, como la presencia de genes de resistencia en algunas variedades, podría aumentar la presencia de mutantes virulentos en la población. La criptosexualidad (Carvalho et al., 2011) también podría contribuir al surgimiento rápido y frecuente de nuevas variantes y desempeñar un papel crucial en la generación de variabilidad genética de *H. vastatrix*.

El conocimiento detallado de la diversidad genética y la estructura poblacional es esencial para programas de gestión de enfermedades y mejoramiento genético. Este estudio proporciona valiosa información para el desarrollo de programas de resistencia en el café en Guatemala y futuros estudios sobre la biología de la población de *H. vastatrix*. La diversidad haplotípica del patógeno podría influir en la resistencia de los cultivares de café, pero se requieren más investigaciones para comprender completamente estas interacciones. En resumen, la diversidad haplotípica de *H. vastatrix* podría afectar la resistencia de los cultivares de café, aunque se deben considerar diversos factores antes de determinar el nivel de resistencia de un cultivar específico, incluyendo la compleja interacción entre el patógeno y la planta, así como factores ambientales como temperatura y humedad. Estudios adicionales son necesarios para comprender completamente estos factores y su impacto en la resistencia de los cultivares de café.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

14 Conclusiones

En este estudio, el uso de marcadores SSR reveló una alta diversidad genética en las poblaciones de *H. vastatrix* en Guatemala, con un 97.5% de polimorfismo. A diferencia de estudios anteriores que emplearon diferentes marcadores, los SSR demostraron ser más informativos. La ausencia de correlación entre diversidad genética y distancias geográficas respalda la hipótesis de la dispersión por viento de *H. vastatrix*. La variabilidad genética significativa entre y dentro de las poblaciones sugiere una distribución homogénea de la variación genética, posiblemente impulsada por factores como la intervención humana y extensas plantaciones de café.

La falta de nodos exclusivos por población en la red haplotípica sugiere una población extensa y sin diferenciación geográfica. Los valores negativos de D de Tajima indican un proceso de expansión, posiblemente originado desde la identificación de la raza II en Guatemala en 1980. Se postula que las mutaciones espontáneas y la presión selectiva del medio ambiente podrían ser los principales impulsores de la variabilidad genética. La criptosexualidad también podría contribuir al surgimiento frecuente de nuevas variantes.

Aunque el estudio proporciona información valiosa sobre la diversidad haplotípica, la relación directa entre esta diversidad y la virulencia de *H. vastatrix* no se ha esclarecido completamente. Se destaca la importancia de comprender completamente las interacciones entre el patógeno y la planta, así como los factores ambientales, para evaluar el nivel de resistencia de los cultivares de café.

Se reconoce la importancia de futuras investigaciones que evalúen la resistencia de genotipos específicos de café frente a los haplotipos identificados. Aunque se sugiere que la diversidad haplotípica podría afectar la resistencia de los cultivares de café, se enfatiza la complejidad de la interacción entre el patógeno y la planta, así como la influencia de factores ambientales.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

15 Recomendaciones

Dado que la diversidad genética de *H. vastatrix* parece estar relacionada con la presencia de extensas plantaciones de café, sistemas de producción y variabilidad ambiental en la región, se sugiere realizar estudios más detallados sobre cómo factores ambientales específicos, como temperatura y humedad, pueden afectar la diversidad genética y la virulencia del patógeno.

Dado que los mecanismos que impulsan el aumento de la variabilidad genética, como las mutaciones espontáneas y la criptosexualidad, aún no se comprenden completamente, se sugiere realizar investigaciones más detalladas para identificar y entender estos procesos. Esto podría incluir experimentos controlados para simular condiciones de alta incidencia de la enfermedad y evaluar la aparición de nuevas variantes.

La compleja interacción entre el patógeno y la planta es mencionada como un factor clave en la resistencia de los cultivares de café. Futuros estudios deberían centrarse en desentrañar los detalles de esta interacción, incluyendo la identificación de genes de resistencia en variedades de café y cómo estos interactúan con la variabilidad genética de *H. vastatrix*.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

16 Referencias

- Álvarez-Lemus, D. F., & Alvarado-Alvarado, G. (2001). Evaluación de la resistencia completa de café a *Hemileia vastatrix* razas II y XXII en progenies de caturra X híbrido Timor del grupo fisiológico E, en condiciones de almácigo. *Cenicafé*, 52(4), 270–288. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/935/1/arc052%2804%29270-288.pdf>
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgious, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderach, P., Anzueto, F., Hruska, A., & Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7, 303–321.
- Avelino, J., Willocquet, L., & Savary, S. (2004). Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. *Plant Pathology*, 53(5), 541–547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01067.x>
- Cabral, P. G. C., Maciel-Zambolim, E., Oliveira, S. A. S., Caixeta, E. T., & Zambolim, L. (2016). Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*, 65(2), 196–204. <https://doi.org/10.1111/ppa.12411>
- Carvalho, C. R., Fernandes, R. C., Carvalho, G. M. A., Barreto, R. W., & Evans, H. C. (2011). Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE*, 6(11), e26387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026387>
- CEDICAFE Centro de Investigaciones en Café. (2020). Situación actual de la roya *Hemileia vastatrix* Berk & Br. y perspectivas del clima para el periodo mayo-julio 2020. Recuperado de: <https://www.anacafe.org/uploads/file/c161cff096464df7bdd93f88ef9aea41/Boletin-Roya-Mayo2020.pdf>
- Cressey, D. (2013). Coffee rust regains foothold. *Nature*, 493, 587.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- Cristancho, M. A., Rozo, Y., Escobar, C., Rivillas, C. A., & Gaitán, A. L. (2012). Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. *New Disease Reports*, 25, 19. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(62\)80068-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(62)80068-0)
- Daba, G., Daelemans, R., Berecha, G., Geerinck, M. W. J., Verreth, C., Crauwels, S., Lievens, B., & Honnay, O. (2023). Genetic diversity and structure of the coffee leaf rust fungus *Hemileia vastatrix* across different coffee management systems in Ethiopia. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00409-2>
- De Mendiburu, F. (2020) *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin Botanical Society of America*, 19, 11–15.
- Dubey, S. C., Tripathi, A., & Upadhyay, B. K. (2012). Molecular diversity analysis of *Rhizoctonia solani* isolates infecting various pulse crops in different agro-ecological regions of India. *Folia Microbiologica*, 57(6), 513–524. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0165-y>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Smouse, P., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- FEWS NET, RUTA, & PROMECAFE (2014). Coffee producer and laborer income to decline for a second consecutive year. Special Report Central America (pp. 7).
- Gouveia, M. M. C., Ribeiro, A., Várzea, V. M. P., & Rodrigues, C. J. (2005). Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia*, 97(2), 396–404. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.2.396>
- Kimura, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511623486
- Koch RA, Aime MC. 2018. Population structure of *Guyanagaster necrorhizus* supports termite dispersal for this enigmatic fungus. *Mol Ecol* 27: 2667-2679
- Kosaraju, B., Sannasi, S., Mishra, M. K., Subramani, D., & Bychappa, M. (2017). Assessment of genetic diversity of coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* using SRAP markers. *Journal of Phytopathology*, 165(7–8), 486–493. <https://doi.org/10.1111/jph.12583>
- Leigh, J., & Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Maia, T. A., Maciel-Zambolim, E., Caixeta, E. T., Mizubuti, E. S. G., & Zambolim, L. (2013). The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology*, 42(5), 533–542. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0213-3>
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2), 209–220. <https://doi.org/35/913/979> [pii]r10.1126/science.35.913.979
- McCook, S. (2006). Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *Journal of Global History*, 1(2), 177–195.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

<https://doi.org/10.1017/S174002280600012X>

McCook, S., & Vandermeer, J. (2015). The big rust and the Red Queen: long-term perspectives on coffee rust research. *Phytopathology*, *105*, 1164–1173.

McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, *40*, 349–379.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(12), 3321–3323.
<https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>

Nunes, C. C., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Brommonschenkel, S. H., & Silva, J. C. (2009). Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, *38*(5), 445–452.
<https://doi.org/10.1071/AP09021>

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, *28*(8), 1166–1167.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

Patil, I. (2021). Visualizations with statistical details: The “ggstatsplot” approach. *Journal of Open Source Software*, *6*(61), 3167. <https://doi.org/10.21105/joss.03167>

Peakall, R., & Smouse, P. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, *28*, 2537–2539.

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 *C. arabica* L. *Theoretical and Applied Genetics*, *109*(6), 1311–1317.
<https://doi.org/10.1007/s00122-004-1748-z>

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- Quispe-Apaza, C. S., Mansilla-Samaniego, R. C., López-Bonilla, C. F., Espejo-Joya, R., Villanueva-Caceda, J., & Monzón, C. (2017). Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos Zonas productoras de café en el Perú. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3), 418–436. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1612-7>
- Ramírez-Camejo, L. A., Keith, L. M., Matsumoto, T., Sugiyama, L., Fukada, M., Brann, M., Moffitt, A., Liu, J., & Aime, M. C. (2022). Coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) from the recent Invasion into Hawaii shares a genotypic relationship with Latin American populations. *Journal of Fungi*, 8(2), 189. Doi:10.3390/jof8020189
- Rodrigues, C., Bettencourt, A., & Rijo, L. (1975). Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual Review of Phytopathology*, 13, 49–70.
- Rozo, Y., Escobar, C., Gaitán, A., & Cristancho, M. (2012). Aggressiveness and genetic diversity of *Hemileia vastatrix* during an epidemic in Colombia. *Journal of Phytopathology*, 160, 732–740. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jph.12024>
- Ruiz-García, A., & Mendoza Tijerino, F. (2014). Impacto de la roya en los medios de vida de familias productoras y jornaleros del café en Nicaragua, 2nd Edition. (pp. 72): Nitlapan, Oxfam, Echo.
- Santana, M. F., Zambolim, E. M., Caixeta, E. T., & Zambolim, L. (2018). Population genetic structure of the coffee pathogen *Hemileia vastatrix* in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43(5), 473–476. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0246-9>
- Schieber, E., & Sanchez de Leon, A. (1982). First report of coffee rust in Guatemala. *Plant Disease*, 66, 855–856. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/pd-66-855>
- Silva, M., Várzea, V., Guerra-Guimaraes, L., Azinheira, H., Fernandez, D., Petitot, A., Bertrand, B., Lashermes, P., & Nicole, M. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 119–147.
- Silva, M. do C., Guerra-Guimarães, L., Diniz, I., Loureiro, A., Azinheira, H., Pereira, A. P., Tavares, S., Batista, D., & Várzea, V. (2022). An Overview of the Mechanisms Involved

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

in Coffee-Hemileia vastatrix Interactions: Plant and Pathogen Perspectives. *Agronomy*, 12(2), 326. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020326>

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., & Silva, M. do C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 18, Issue 8, pp. 1039–1051). <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>

Varzea V and Marques DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs Coffee durable resistance. In Zambolim L Zambolim E Várzea VMP Eds Durable resistance to coffee leaf rust. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa Brasil. 53-74p.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Zhang, Y. Y., Huang, N., Xiao, X. H., Huang, L., Liu, F., Su, W. H., & Que, Y. X. (2015). Molecular variation of *Sporisorium scitamineum* in Mainland China revealed by internal transcribed spacers. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 7894–7909. <https://doi.org/10.4238/2015.July.14.15>

17 Vinculación

La vinculación se estableció principalmente con la Asociación Nacional del Café (ANACAFE), que colaboró en la identificación de fincas afectadas por la Roya en los departamentos de Escuintla, Sacatepéquez y Chimaltenango. ANACAFE ha demostrado un interés significativo en abordar el manejo de la enfermedad de la Roya en cafetales, así como en aprovechar las variedades comerciales de cafetos.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023




18 Estrategias de difusión. Divulgación y protección intelectual

Los hallazgos de la investigación fueron ampliamente compartidos a través de un artículo científico. Además, se difundió información tanto en el sitio web del instituto de investigaciones como en las redes sociales del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUSAC.

19 Aporte de la propuesta de investigación a los Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND) identificando su meta correspondiente

Este estudio marca un hito en su campo al abordar el diagnóstico de la situación genética de una especie de patógeno con relevancia biológica y comercial. Al centrarse en poblaciones de *H. vastatrix* en áreas cafetaleras, se aporta información crucial para comprender a fondo los aspectos genéticos y su impacto en la severidad de la enfermedad. Además, este trabajo sienta las bases para el desarrollo de un plan de manejo de la enfermedad y la mejora de nuevos genotipos de cafetos con resistencia a *H. vastatrix* en Guatemala aportando en la seguridad alimentaria de la población que depende de las actividades económicas relacionadas a la producción de café.


20 Orden de pago final

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Edna Sofia Colocho Hernández	Auxiliar II	20230480	Si	
Julio Ernesto Berdúo Sandoval	Investigador	20101438	Si	
José Alejandro Ruiz Chután	Investigador	20101034	Si	

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

21 Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación

El coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

<p style="text-align: center;">Gregorio Amílcar Sánchez Pérez Coordinador del proyecto de investigación</p>	 <p style="text-align: center;">Firma</p>
<p>Fecha: 20/11/2023</p>	


22 Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario


De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* en Chimaltenango, Escuintla y Sacatepéquez: bases para aprovechamiento de genotipos de café, fase II de Coordinador del Instituto de Investigaciones Agrícolas y Ambientales, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

<p style="text-align: center;">Vo.Bo. Vicente Martínez Director del Insituto de Investigaciones Agrícolas y Ambientales Facultad de Agronomía</p>	  <p style="text-align: center;">Firma</p>
<p>Fecha: 20/11/2023</p>	

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

23 Visado de la Dirección General de Investigación

<p style="text-align: center;">Vo.Bo. Liuba Cabrera</p> <p style="text-align: center;">Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial</p>	 <p style="text-align: center;">Firma</p>
<p>Fecha: 20/11/2023</p>	

<p style="text-align: center;">Vo.Bo. Julio Rufino Salazar</p> <p style="text-align: center;">Nombre Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación</p>	 <p style="text-align: center;">Firma</p> <p style="text-align: center;"><small>Ing. MARIANO Julio Rufino Salazar Pérez Coordinador General de Programas de Investigación, Digi-Usac</small></p>
<p>Fecha: 20/11/2023</p>	