

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

CARÁTULA

Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente

(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Diversidad genética y haplotípica de *Hemileia vastatrix* en Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa: bases para aprovechamiento de genotipos de café.

nombre del proyecto de investigación

B15-2022

código del proyecto de investigación

Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales

unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez

nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala 28 de febrero de 2023

Autoridades

Dra. Alice Patricia Burgos Paniagua
Director General de Investigación

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

MSc. Andera Eunice Rodas Morán
Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente

Autores

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez¹
Coordinador del proyecto

Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹
Investigador

José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}
Marie Kalousová²
Bohdan Lojká²
Carlos Enrique Villanueva González³
Colaboradores

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences Prague²
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, Universidad Rafael Landívar, Campus San Pedro
Claver S.J., San Juan Chamelco, Alta Verapaz, Guatemala³

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2022. 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 4.8.63.0.30 en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas.

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

1 Índice General

1	Índice General	3
	Índice de tablas	5
	Índice de figuras	5
2	Resumen	7
3	Introducción.....	9
4	Planteamiento del problema	11
5	Delimitación en tiempo y espacio	12
5.1	Delimitación en tiempo	12
5.2	Delimitación espacial	12
6	Marco teórico.....	12
6.1	El cultivo de café.....	12
6.2	La roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	14
6.3	Epidemia de la roya el café en el período 2010-2014.....	14
6.4	Diversidad fisiológica de la roya.....	15
7	Estado del arte	16
7.1	Diversidad genética de la roya	16
8	Objetivos.....	18
	General	18
9	Hipótesis	18
10	Materiales y métodos.....	18
10.1	Enfoque de la investigación	18
10.2	Recolección de la información.....	19
10.3	Técnicas e instrumentos	19

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

10.4	Procesamiento y análisis de la información	22
11	Resultados.....	24
11.1	Describir la estructura y diversidad genética de las poblaciones de <i>H. vastatrix</i> en la zona de estudio.....	24
11.2	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
11.3	Determinar el nivel de virulencia de los haplotipos de <i>H. vastatrix</i> identificados en la zona de estudio.....	35
11.4	Evaluar la resistencia de siete genotipos de café comercializados en Guatemala ante los haplotipos de <i>H. vastatrix</i> identificados.....	35
12	Discusión	39
13	Conclusiones.....	43
14	Referencias	44
15	Vinculación.....	50
16	Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual.....	50
17	Aporte de la propuesta de investigación a los ODS	50
18	Orden de pago final	50
19	Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación	51
20	Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario.....	51
21	Visado de la Dirección General de Investigación	52

Índice de tablas

Tabla 1. Índices de diversidad de los loci SSR utilizados.....	25
Tabla 2. Índices de diversidad de la población en los 17 loci SSR.....	26
Tabla 3. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para seis 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 de STRUCTURE de 64 aislados de <i>H. vastatrix</i> para 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. Resultados de las medidas descriptivas de la variabilidad de <i>Hemileia vastatrix</i> de las secuencias de la región ITS, relacionadas con muestras recolectadas en Guatemala	31
Tabla 7. Distribución regional de frecuencias de haplotipos de <i>H. vastatrix</i> generados a partir de las secuencias ITS.....	32

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 3. Análisis de componentes principales (PCA) para visualizar las relaciones genéticas entre 64 aislados de <i>H. vastatrix</i>	28
Figura 4. Dendrograma generado por el método UPGMA utilizando la distancia genética de Nei a partir del análisis de diecisiete marcadores SSR de 64 aislados de <i>H.vastatrix</i> procedentes de seis poblaciones.	29
Figura 5. Resultados del análisis STRUCTURE para 64 aislados de <i>H. vastatrix</i> basados en datos de 17 microsatélites.....	30
Figura 6. A) Red de haplotipos creada utilizando el método Median Joinig para 51 haplotipos identificado para la región ITS de <i>H. vastatrix</i> en seis zonas productoras de café en Guatemala. B)	

Relaciones filogenéticas basadas en los haplotipos ITS de <i>H. vastatrix</i> con valores bootstrap de máxima verosimilitud sobre las ramas (se muestran únicamente los valores > 95).....	34
Figura 7. Diagrama de caja del comportamiento del AUDPC en función de los tres haplotipos de <i>H. vastatrix</i> sobre la variedad Caturra..	35
Figura 8. Diagrama de cajas del índice del AUDPC ocasionado por <i>H. vastatrix</i> sobre las variedades de café evaluadas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.	36
Figura 9. Diagrama de cajas del comportamiento del AUDPC en las variedades de café.	37
Figura 10. Diagrama de cajas del comportamiento del AUDPC haciendo un agrupamiento por variedades de café.....	38

2 Resumen

La roya del café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, es la principal enfermedad que ataca al cultivo a nivel mundial. Una de las estrategias para el control de la enfermedad es el factor genético, desarrollado a través de programas de mejoramiento que resulta en genotipos de café resistentes al patógeno. Sin embargo, para lograr el mejor aprovechamiento de este factor, es primordial conocer el factor molecular del patógeno. A pesar de la importancia del cultivo del café para Guatemala, no se cuenta con ningún estudio de estructura poblacional, diversidad genética y haplotípica del patógeno. Este estudio evaluó la diversidad genética y estructura de las poblaciones de hongos de *H. vastatrix* en tres departamentos productores de café en Guatemala utilizando 17 marcadores polimórficos microsatélites e ITS. Se observaron entre 2 y 11 alelos por locus, con una media de 5.22. El índice de diversidad de Shannon, diversidad nucleotídica y haplotípica mostró valores de 0.86, 0.0051 y 0.985, respectivamente. Se observó una alta variación dentro de la población (92%). Además, se encontraron altos niveles de flujo genético entre poblaciones, lo que sugiere una baja diferenciación genética ($F_{st} = 0.024$) entre poblaciones. La red de haplotipos mostró que los aislados de *H. vastatrix* se comportan como una población grande sin diferenciación definida, en la que se detectaron haplotipos antiguos a partir de los cuales surgieron nuevas variantes del hongo. En general, las poblaciones de *H. vastatrix* en Guatemala son altamente variables y la variación genética se distribuye ampliamente en todos los departamentos estudiados. Se determinó que la diversidad haplotípica de *H. vastatrix* puede influir en la resistencia de los cultivares de café, pero la interacción entre el patógeno y la planta es compleja y otros factores ambientales también pueden influir en la resistencia

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

Abstract

Coffee rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, is the leading disease that attacks the crop worldwide. One of the strategies for controlling the disease is the genetic factor, developed through breeding programs that result in coffee genotypes resistant to the pathogen. However, to make the best use of this factor, it is essential to know the molecular factor of the pathogen. Despite the importance of coffee cultivation for Guatemala, there is no study of the pathogen's population structure, genetic diversity, and haplotypic diversity. This study evaluated the genetic diversity and population structure of *H. vastatrix* fungal populations in three coffee-producing departments in Guatemala using 17 microsatellite polymorphic markers and ITS. Between 2 and 11 alleles per locus were observed, with a mean of 5.22. The Shannon diversity index, nucleotide, and haplotypic diversity showed values of 0.86, 0.0051, and 0.985, respectively. High within-population variation was observed (92%). In addition, high levels of gene flow between populations were found, suggesting low genetic differentiation ($F_{st} = 0.024$) between populations. The haplotype network showed that *H. vastatrix* isolates behave as a large population without defined differentiation, in which ancient haplotypes were detected from which new variants of the fungus emerged. In general, *H. vastatrix* populations in Guatemala are highly variable, and genetic variation is widely distributed in all the departments studied. It was determined that the haplotypic diversity of *H. vastatrix* may influence the resistance of coffee cultivars. Still, the interaction between the pathogen and the plant is complex, and other environmental factors may also influence resistance.

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

3 Introducción

La roya es una de las principales enfermedades que afecta al cultivo de café, la cual se ha distribuido en todos los países productores en el mundo, ocasionando pérdidas de 20 – 80% de la producción, que a su vez generan pérdidas millonarias en la mayor parte de las regiones cafetaleras (McCook, 2006). El agente causal es el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome (Berkeley, 1869; Ward, 1882) el cual provoca severas defoliaciones y afecta a casi todos los cultivares de *Coffea arabica*.

Durante la epidemia de la roya en el 2010 - 2014, Guatemala fue el país centroamericano más afectado, reportando pérdidas por 730,000 sacos, lo que representó un 40% de la producción, llevando al país a declarar un estado de emergencia. Posteriormente, en el país se requirió la poda severa de 313,000 ha, dejando un 13.7 % de área no productiva para el año 2014 (Avelino et al., 2015). Esta epidemia impactó principalmente sobre los recolectores migrantes y los pequeños propietarios, ocasionando la pérdida de 115,000 empleos en los 204 municipios del país en donde se cultiva café. Una gran proporción de esta población no es autosuficiente en cuanto a alimentos y necesita comprarlos, siendo el café su única fuente de generación de ingresos. Por lo tanto, el problema de la roya del café tiene repercusiones en la capacidad de las personas para acceder a los alimentos, lo que afectó directamente a la seguridad alimentaria (Centro de Investigaciones en Café [CEDICAFE], 2015; Famine Early Warning Systems Network [FEWS NET] et al. 2014; Ruiz-García & Mendoza-Tijerino 2014).

Se conoce que el inoculo inicial de *Hemileia vastatrix* es la raza fisiológica II, que está ampliamente distribuida en todos los países productores de café, a partir de la cual se generaron otras razas genéticamente diferentes (Zambolim et al., 2005). La presión de selección provocada por el ambiente sobre el patógeno acelera la evolución y la formación de nuevas razas variantes (Várzea et al., 2005). Estos procesos se acentúan más en los lugares de uso continuo de fungicidas y en plantaciones a gran escala de genotipos de baja divergencia genética (Silva, 2000). Recientemente, un nuevo tipo de tecnología de marcadores denominada polimorfismo amplificado relacionado con la secuencia (SRAP) ha sido utilizado en el estudio de *H. Vastatrix* demostrando la existencia de variabilidad genética entre varias razas de roya (Kosaraju et al., 2017). El uso de las secuencias del espaciador interno transcrito ITS 1 e ITS 2 así como la secuencia del gen 5.8S también han sido utilizadas en el estudio de *H. Vastatrix*, concluyendo que este tipo de marcadores son altamente recomendados para el estudio poblacional de la roya. Realizar una caracterización molecular de las poblaciones de *H.*

vastatrix en la zonas cafetaleras de Guatemala es fundamental y de vital importancia para la elaboración de estrategias de control de la roya, estudios epidemiológicos de la enfermedad y la determinación del comportamiento evolutivo del hongo para hacer frente a futuros brotes del patógeno.

A pesar de la importancia de la roya para la producción de café en el Guatemala, no existen estudios sobre la variación a nivel molecular y estimaciones de la diversidad genética de *H. vastatrix* en el país. Se desconoce si existe o no flujo genético entre las poblaciones del hongo, si los haplotipos son independientes de la especie o región geográfica anfitriona, si hay dispersión de los aislados entre las especies de café o si se produce el apareamiento entre los aislados (Cabral et al., 2016). Por tanto, la presente investigación es el primer reporte de la diversidad genética, haplotípica y estructura de las poblaciones de *H. vastatrix* en Guatemala, específicamente en los departamentos de Santa Rosa, Jutipa y Jalapa, los cuales conforman la región administrativa IV de ANACAFE. Dicha región ha reportado alta incidencia de roya desde la epidemia 2013-2014 al último reporte disponible para el 2020 (CEDICAFE, 2020). Esto representará un aporte invaluable en el entendimiento sobre el comportamiento del patógeno al relacionar la diversidad genética con los distintos niveles de virulencia. Esta información será de beneficio para instituciones académicas, de investigación, asociaciones de productores, ONGs u otras relacionadas y comprometidas con el cultivo de café. Se podrá gestionar un mejor aprovechamiento de los genotipos de café disponibles, así como en el desarrollo de nuevos genotipos resistentes a los haplotipos de roya específicos para Guatemala.

Para lograr esto se presentan como objetivos específicos: describir la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *H. vastatrix*, identificar su evolución genética y red haplotípica, determinar el nivel de virulencia de los haplotipos y evaluar la resistencia de siete genotipos comerciales de café ante los haplotipos de *H. vastatrix*. Los estudios moleculares se realizaron mediante marcadores tipo microsatélite y la secuenciación de la región ITS de aislados *H. vastatrix*. El análisis de la información molecular generada se realizó mediante herramientas bioinformáticas. Para la evaluación de la virulencia se llevaron a cabo ensayos de inoculación in vitro sobre un genotipo de café susceptible, determinando el comportamiento de cada uno de los haplotipos identificados. Para la evaluación de la resistencia genética, las inoculaciones de cada haplotipo se realizaron sobre siete genotipos comerciales. Los resultados de los ensayos in vitro fueron analizados a través del área bajo la curva

del progreso de la enfermedad, aplicando un análisis de varianza y posterior prueba de comparación de medias. De esta forma se generó información importante para el desarrollo de estrategias de control de la roya del café en Guatemala.

4 Planteamiento del problema

La roya del café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, es la principal enfermedad que ataca al cultivo, causando pérdidas de 20 – 80 % en variedades susceptibles de *Coffea arabica* L. (Maia et al., 2013). En los últimos años, la roya ha alcanzado una escala epidémica causando pérdidas económicas sustanciales en países del sur y centro de América (Cressey, 2013; Cristancho et al., 2012; McCook & Vandermeer, 2015). Por lo tanto, actualmente, la roya es la mayor limitación en la producción de café arábigo en muchos países productores del cultivo. Se han identificado múltiples razas de *H. vastatrix* en todo el mundo (Rodrigues et al., 1975) y hasta la fecha, el Centro de Investigaciones sobre la Roya (CIFC), Portugal, ha identificado más de 47 razas fisiológicas de *H. vastatrix* en todos los países cafeteros del mundo (Kosaraju et al., 2017).

Durante la epidemia de roya en el 2013, Guatemala fue el país centroamericano más afectado, reportando pérdidas por 730,000 sacos, equivalentes al 40% de la producción, llevando al país a declarar un estado de emergencia. Posterior al año 2013, se requirió la poda severa de 313,000 ha, dejando un 13.7 % de área no productiva para el año 2014 (Avelino et al., 2015). Esta epidemia impactó principalmente sobre los recolectores migrantes y los pequeños propietarios, ocasionando la pérdida de 115,000 empleos en los 204 municipios productores de café. Una gran proporción de esta población depende del café como su única fuente de ingresos. Por lo tanto, la epidemia impactó sobre la capacidad de las personas para acceder a los alimentos, afectando directamente a la seguridad alimentaria (CEDICAFE, 2015; FEWS NET et al. 2014; Ruiz-García & Mendoza-Tijerino 2014).

Debido al alto potencial evolutivo de *H. vastatrix*, este hongo ha superado la resistencia de muchos genotipos de café, por lo que es crucial investigar sus patrones de variabilidad genética (Porto et al., 2019). A pesar de la importancia de la roya para la producción de café en el Guatemala, no existen estudios sobre la variación a nivel molecular y estimaciones de la diversidad genética de *H. vastatrix* en el país. Se desconocen aspectos como el flujo genético entre las poblaciones del hongo,

independencia de los haplotipos respecto al genotipo o región geográfica anfitriona, si hay dispersión de los aislados entre las especies de café o si se produce el apareamiento entre los aislados (Cabral et al., 2016).

Esta información será de vital importancia para la elaboración de estrategias de control de la roya, los estudios epidemiológicos de la enfermedad y la determinación del comportamiento evolutivo del hongo para hacer frente a futuros brotes del patógeno.

5 Delimitación en tiempo y espacio

- 5.1 Delimitación en tiempo: el proyecto fue ejecutado en un total de 11 meses, de febrero a diciembre del 2022. Posteriormente, se otorgó una prórroga hasta febrero del 2022, según el acuerdo el Acuerdo de Dirección DIGI P042-2022
- 5.2 Delimitación espacial: se muestrearon poblaciones de *H. vastatrix* en los departamentos de Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa.

6 Marco teórico

6.1 El cultivo de café

El café es el producto agrícola más importante, con un valor de venta al por menor estimado en 70.000 millones de dólares USD. Es crucial para la economía de más de 60 países y es la principal fuente de ingresos de más de 100 millones de personas (International Coffee Organization [ICO], 2016). La roya de la hoja del café es la principal enfermedad en este cultivo, causa pérdidas estimadas en dos mil millones de dólares USD anuales (McCook, 2006) y es uno de los principales factores limitantes de la producción de café Arábica (*Coffea arabica* L) en todo el mundo.

Las dos principales especies de café cultivadas, *C. canephora* (café Robusta) y *C. arabica*, representan, en promedio, el 40% y el 60%, respectivamente, de la producción mundial de café (ICO, 2016). La especie *C. arabica* es nativo de las zonas relativamente secas y de gran altitud de Etiopía y del norte de Kenya y se considera que su acervo genético tiene una baja diversidad (Steiger et al.,

2002). El café Arábica fue domesticado en Yemen, y su cultivo se extendió posteriormente a Asia, América y otras partes de África. Los graves cuellos de botella genéticos durante su domesticación han reducido aún más la diversidad genética del cultivo. Se cree que un solo cafeto del Jardín Botánico de Ámsterdam fue uno de los progenitores de la mayoría de los actuales cultivos de café. Estos cuellos de botella genéticos eran especialmente relevantes para los rasgos de respuesta a la enfermedad de la roya, ya que su domesticación en el Yemen, la zona de cultivo de café más seca del mundo condujo a la ausencia de presión de selección hacia la resistencia a la roya (Rodrigues et al., 1975).

El germoplasma de café diseminado desde Yemen probablemente no estaba contaminado de roya. La selección y adaptación a otras regiones y climas en diferentes partes de Asia y América durante los siglos XVII y XVIII se produjo en ausencia del patógeno, pero en condiciones favorables a la enfermedad. La epidemia del siglo XIX en Sri Lanka fue el resultado de esas circunstancias genéticas, biológicas y agronómicas (McCook, 2006; McCook & Vandermeer, 2015). Desde entonces, la roya se ha propagado a la mayoría de los países productores de café de todo el mundo, primero de 1870 a 1920 a través de las zonas cafeteras de la cuenca del Océano Índico y el Pacífico. Luego llegó a los países africanos del Atlántico en los decenios de 1950 y 1960 y, por último, cruzó el Océano Atlántico (Muller, 1971), presumiblemente llevada por las corrientes del viento (Bowden et al., 1971), extendiéndose por toda América del Sur y Central durante 1970 y 1980.

En la segunda mitad del siglo XX, la identificación y caracterización de las poblaciones de híbrido de Timor sirvió de base para un programa de mejoramiento que permitió la liberación de cultivares resistentes a la roya en diferentes países productores de café, incluido el continente de América (Rodrigues et al., 1975; Silva et al., 2006). Recientemente la roya del café ha recuperado notoriedad debido a una grave y generalizada epidemia en toda América Central, Colombia, Perú y Ecuador, como resultado de la convergencia de varios factores agronómicos, climáticos y económicos (Avelino et al., 2015; Cressey, 2013; Roza et al., 2012). Las pérdidas de rendimiento llegaron a ser de hasta el 35%, lo que repercutió directamente en los ingresos y los medios de vida de cientos de miles de agricultores y trabajadores (Talhinhas et al., 2017).

6.2 La roya del café (*Hemileia vastatrix*)

El género *Hemileia* es un miembro del filo Basidiomycota, clase Pucciniomycetes, orden Pucciniales. Está compuesto por 42 especies que se encuentran principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de África y Asia, sobre todo en plantas no cultivadas de Rubiaceae y Apocynaceae (Talhinhas et al., 2017). *Hemileia vastatrix* presenta urediniosporas reniformes, 18-28 mm; la pared de la urediniospora es hialina, fuertemente deformada en la cara convexa, lisa en la cara recta o cóncava, y de 1 mm de espesor. Las teliosporas son esféricas, subglobosas a napiformes, de 20 a 28 mm de diámetro; la pared de la teliospora es hialina, lisa y de 1 mm de espesor. *Hemileia vastatrix* puede distinguirse de la *H. coffeicola*, ya que esta última produce soros dispersos por toda la hoja y presenta urediniosporas con menos espinas, pero más grandes. Ambas royas tienen como huéspedes a *C. arabica* y a otras especies de *Coffea*, pero *H. coffeicola* tiene poca importancia económica y está geográficamente confinada (Ritschel, 2005)

Las infecciones de roya rara vez matan a la planta huésped, aunque las infecciones graves afectan al rendimiento en los años siguientes porque obstaculizan el desarrollo vegetativo y pueden generar epidemias poliéticas en las estaciones sucesivas. El clima (incluido el efecto de la altitud), la sombra, la fertilidad del suelo y la arquitectura del dosel influyen en la gravedad de la enfermedad. Aunque se han acumulado muchos conocimientos sobre la epidemia y la elaboración de modelos, las estrategias de gestión de las enfermedades siguen siendo con frecuencia ineficaces. Esto puede explicarse por el gran número de variables ambientales, su interacción en un momento dado y su efecto acumulativo a lo largo del tiempo (Avelino et al., 2004). Las fluctuaciones del precio del café influyen en las decisiones de los productores en cuanto al manejo del cultivo, lo que a su vez condiciona la incidencia y la gravedad de la roya. Este proceso parece haberse agudizado en las últimas décadas con la liberalización de los precios y de las cuotas de cosecha, y una fuerte disminución del apoyo a la investigación y la extensión agrícola (McCook & Vandermeer, 2015).

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

Todos los países centroamericanos fueron fuertemente afectados por la epidemia de roya anaranjada del 2012, así como países del Caribe y México. Además, en la cosecha del 2013, el Perú y Ecuador también fueron impactados severamente por la enfermedad. Si se agregan las epidemias previas de

Colombia del 2008 al 2011, se puede decir que la roya anaranjada tuvo un impacto casi continental en pocos años, a diferencia de las epidemias anteriores que fueron aparentemente epidemias a nivel nacional (Cristancho et al., 2012). En Guatemala, las pérdidas reportadas fueron de 730,000 sacos de lo que representó un 21% de la producción, llevando al país a declarar un estado de emergencia. Posterior al año 2013, se requirió la poda severa de 313,000 ha de, dejando un 13.7 % de área no productiva para el año 2014 (Avelino et al., 2015).

Las epidemias de la roya del café en Colombia y América Central tuvieron fuertes repercusiones sociales y dieron lugar a problemas de seguridad alimentaria, como resultado de la gran dependencia del café por parte de la mayoría de los caficultores y trabajadores del sector. En América Central, el café es el medio de vida de unas 2.053.000 personas (Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y Modernización de la Caficultura [PROMECAFE], 2014). La roya del café ha tenido repercusiones sociales y económicas en dos grupos en particular en América Central: los recolectores migrantes y los pequeños propietarios que poseen menos de 7 hectáreas de tierra. Una gran proporción de esta población no es autosuficiente en cuanto a alimentos y necesita comprarlos. Además, existen pocas opciones para la generación de ingresos. Por lo tanto, el problema de la roya del café tuvo repercusiones en la capacidad de las personas para acceder a los alimentos, lo que afectó directamente a la seguridad alimentaria (FEWS NET et al. 2014; Ruiz García & Mendoza Tijerino 2014).

6.4 Diversidad fisiológica de la roya

La evidencia de la alta variabilidad patógena en la roya del café se reconoció en una etapa temprana y se asoció con la ruptura de la resistencia genética. La especialización fisiológica identificó cuatro razas de roya (Mayne, 1932). Desde entonces, los estudios mundiales de las razas de la roya del café han sido históricamente perseguidos y ampliados por el Centro de Investigaçãõ das Ferrugens do Cafeeiro CIFC desde 1952, basándose en muestras de esporas de *H. vastatrix* de las más diversas regiones productoras de café del mundo. Se han identificado regularmente razas o patotipos distintos mediante la diferenciación de aislamientos en un conjunto de materiales huéspedes de café que llevan diferentes combinaciones de genes de resistencia en condiciones de prueba prescritas (d'Oliveira, 1954:257).

Actualmente se han identificado más de 50 razas fisiológicas de la roya (Rodrigues et al., 1975; Varzea et al., 2009).

Se ha descrito que la raza II presenta el espectro de infección más restringido y se considera la raza de roya más común y extendida en el mundo, adquiriendo un carácter generalizado, probablemente como consecuencia del fondo genético uniforme de la mayoría de los cultivares de *C. arabica* en todo el mundo (Bettencourt, 1981). Sin embargo, la distribución geográfica de las razas de la roya parece depender enteramente de los genotipos de café plantados localmente, y la prevalencia de ciertas razas en una zona determinada parece darse en consecuencia (Bettencourt, 1981).

Es fácil encontrar pruebas de la presión de selección ejercida por los genes de resistencia del café sobre el origen y la distribución de los patotipos (Talhinhas et al., 2017) pero es en la India donde se registra el mayor número de razas de la roya. Este país tiene el programa de mejoramiento de la resistencia a la roya más antiguo del mundo, que consiste en la introducción regular y masiva de materiales de café resistentes nuevos o experimentales en el campo, a lo que suele seguir la aparición de nuevos patotipos con espectros de virulencia ampliados (Varzea & Marques, 2005). Este proceso ha dado lugar a la reciente identificación de roya en genotipos de café resistentes desarrollados en la India, los cuales se asumía que eran resistentes todas las razas fisiológicas de roya conocidas, sin embargo, esta resistencia ha sido nuevamente superada por el patógeno (Prakash et al., 2004). Actualmente, la gama de perfiles de virulencia de la roya del café probablemente va mucho más allá de los de las razas caracterizadas hasta ahora (Talhinhas et al., 2017).

7 Estado del arte

7.1 Diversidad genética de la roya

Tradicionalmente, la identificación y caracterización de las razas de *H. vastatrix* se realizaba utilizando genotipos diferenciales de café. Sin embargo, este método es laborioso y lleva mucho tiempo. Actualmente, los marcadores moleculares se utilizan cada vez más para evaluar la variabilidad genética de muchas cepas de hongos (Dubey et al., 2012; Zhang et al., 2015). Con el uso del marcador RAPD se analizó la diversidad genética de *H. vastatrix* procedentes de diversos países, observándose una diversidad genética moderadamente baja entre la población (Gouveia et al., 2005). El mismo

marcador molecular fue útil para determinar una alta diversidad genética entre las poblaciones de roya en Mina Gerais, Brasil (Nunes et al., 2009).

El uso de AFLP también fue reportado en Colombia, el cual fue útil para determinar que la epidemia del 2011 fue debida al exceso de lluvia y no a la llegada de nuevos genotipos de roya (Rozo et al., 2012). En otro estudio se analizó la estructura de la población de *H. vastatrix* de Brasil determinando un alto nivel de diversidad genotípica utilizando el marcador AFLP (Maia et al., 2013). En otra región de Brasil se estudió la influencia del huésped y el origen geográfico en la diversidad genética y la estructura de la población de *H. vastatrix* utilizando marcadores AFLP, sugiriendo que la población de hongos revelaba bajos niveles de diversidad genotípica (Cabral et al., 2016). Esto evidencia que el proceso evolutivo del patógeno varía en cada zona de estudio, razón que justifica la necesidad de la caracterización molecular en cada zona con presencia del patógeno.

Recientemente, un nuevo tipo de tecnología de marcadores denominada polimorfismo amplificado relacionado con la secuencia (SRAP) ha sido utilizado en el estudio de *H. Vastatrix* demostrando la existencia de variabilidad genética entre y dentro de varias razas de roya (Kosaraju et al., 2017). Actualmente, el uso de marcadores microsatélites han sido útiles para identificar la diversidad y procedencia del patógeno en Hawaii, la cual se consideraba como una de las últimas zonas de producción de café libre de roya (Ramírez-Camejo et al., 2022). El uso de las secuencias del espaciador interno transcrito ITS 1 e ITS 2 así como la secuencia del gen 5.8S fueron empleados en Brasil para el estudio de *H. Vastatrix* concluyendo que este tipo de marcadores son altamente recomendados para el estudio poblacional de la roya.

Dicho estudio determinó que la mayor parte de la diversidad se encuentre dentro las poblaciones y no entre las poblaciones (Santana et al., 2018). En Perú, con el uso del ITS 1 e ITS 2 la red de haplotipos obtenida permitió evidenciar la estructura de las poblaciones de *H. vastatrix* para cada zona, las que juntas se comportan como una gran población indiferenciada con presencia de haplotipos ancestrales a partir de los cuales se fueron generando nuevas variantes del hongo, además, se determinó que las poblaciones de *H. vastatrix* peruanas presentan haplotipos similares a los de Colombia y a las razas II y XXII (Quispe-Apaza et al., 2017).

8 Objetivos

General

1. Identificar la estructura poblacional y diversidad genética de *Hemileia vastatrix* en los departamentos de Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa.
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 investigación es cuantitativa ya que se determinarán los niveles de diversidad genética inter e intra poblacional de *H.vastatrix* así como el efecto de esta sobre la resistencia de genotipos comerciales de café.

10.2 Recolección de la información

Basado en la información provista por ANACAFE sobre los niveles de incidencia de roya, se colectaron muestras en los departamentos de Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa. Cada muestra consistió de una hoja tomada de una planta que presente pústulas de roya. De cada finca se muestrearon cinco plantas. Cada muestra fue almacenada de forma individual dentro de una bolsa plástica y puesta en condiciones de frío para su traslado. Además, de cada muestra se tomaron las coordenadas geográficas del punto de colecta.

10.3 Técnicas e instrumentos

*Aislamiento de *H. vastatrix**

Se realizó una suspensión de uredosporas a una concentración de 10^3 /mL con la cual se llevó a cabo la inoculación sobre una hoja de café de la variedad Caturra. La aplicación se realizó por medio de atomizador para garantizar la dispersión del inóculo sobre la superficie de la hoja. El volumen aplicado de la suspensión concentrada fue de 100 uL para hacer una aplicación de 100 uredosporas por hoja. Las hojas inoculadas se examinaron periódicamente para observar el desarrollo de *H. vastatrix*. Una vez identificados los signos característicos del patógeno, se trasladó a una nueva hoja sana y esto representó un aislado puro de *H. vastatrix*.

Este proceso de aislamiento fue realizado bajo condiciones in vitro. Para esto se tomaron hojas de plantas de café de la variedad Caturra a las cuales se les realizaron aplicaciones de fungicidas preventivos para garantizar la inocuidad del material foliar. Las aplicaciones de fungicidas se suspendieron 10 días antes de iniciar el proceso de aislamiento. Las hojas de café que fueron utilizadas para el aislamiento del patógeno se sometieron a un proceso de desinfección con etanol al 70% durante 1 min, agua esteril, solución de hipoclorito de sodio 10% v/v (a partir de un blanqueador comercial) y finalmente tres lavados en agua estéril. Las hojas de café se colocaron dentro de cajas de Petri las cuales contendrán agar-agua como medio de soporte. Con esto se garantizó la sobrevivencia de la hoja durante el tiempo que dure el proceso de aislamiento de *H. vastatrix*.

Extracción de ADN de *H. vastatrix*

Se obtuvo de una porción de uredosporas tras un raspado sobre la superficie de la hoja con el aislado correspondiente. Se colocó en un mortero y se agregó nitrógeno líquido para su maceración con un pistilo, garantizando así la ruptura de las células y la eliminación de metabolitos secundarios. Para extraer y purificar el ADN, se siguió el protocolo CTAB 2X descrito por Doyle, (1987) (CTAB 2%, NaCl 5M, Tris HCl 1M, EDTA 0.5M, 1% PVP, 0.2% β mercaptoetanol). La integridad del ADN se verificó mediante geles de agarosa-TAE y su concentración y calidad se midieron con un fluorómetro Quantus™. El ADN se guardó en un congelador a -20°C después de ser eluido en 100 μL de tampón TE 1X.

Amplificación de los microsatélites

Se utilizaron diecisiete pares de marcadores de repetición simple de secuencia (SSR) (Ramírez-Camejo et al. 2021), que mostraron polimorfismos en *H. vastatrix*, para analizar la diversidad genética y la estructura de la población. La amplificación por PCR se llevó a cabo como se describe en Koch y Aime (2018) en un volumen total de 12.5 μL de reacción de PCR que consistió en 6.25 μL de Promega 2 \times Taq DNA Polymerase PCR Master Mix (Promega Co, Madison, WI, EE.UU.), 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, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y 0.63 μL del cebador inverso (todos a una concentración de 10 μM), 0.5 μL de molde de ADN y 4.5 μL de agua.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min; 30 ciclos de 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 s, o bien 49 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 s; ocho ciclos de 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Los productos de la PCR se resolvieron de la siguiente manera: 2 μL de productos de PCR se mezclaron con 10 μL de Hi Di formamide (Thermo Fisher Scientific) y 12.5 μL de GeneScan 500LIZ estándar de tamaño (Thermo Fisher Scientific) y se separaron por electroforesis capilar en un ABI 3500

Secuenciación de la región ITS e identificación de haplotipos de *H. vastatrix*

A partir de las muestras de ADN, se amplificó la región ITS mediante una PCR utilizando los cebadores universales ITS1L e ITS4R (White et al., 1990). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 10 μ L conteniendo 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 μ M 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 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.

Ensayo de virulencia de los haplotipos de *H. vastatrix* sobre la variedad de café Caturra.

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 garantizar la disposición de material vegetal, se obtuvo semilla certificada de dicha variedad con la cual se desarrolló un almácigo en las instalaciones del Centro Experimental Docente de Agronomía de la USAC. Para asegurar el desarrollo de las plantas, se realizaron aplicaciones de fungicidas de acción preventiva, las cuales fueron suspendidas 10 días antes de obtener el material foliar para iniciar el ensayo in vitro.

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 μ L 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 de 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) Catuaí

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 consistirá de una caja de Petri con un disco de hoja de café inoculada. Se realizaron cinco repeticiones. Los factores a evaluar serán (a) haplotipos identificados (hasta un máximo de 20) en la fase molecular y (b) genotipos de café (7 genotipos). Se utilizará un diseño completamente al azar. La variable de respuesta será (a) área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

10.4 Procesamiento y análisis de la información

Diversidad genética y estructura poblacional

El análisis de coordenadas principales (PCoA) se calculó para individuos y poblaciones mediante GenAlEx v6.52 (Peakall & Smouse, 2012), utilizando la matriz G'ST por pares. También se construyeron árboles UPGMA para poblaciones y muestras individuales utilizando el paquete poppr

(Kamvar et al., 2014) para determinar la relación entre poblaciones, así como entre muestras dentro de una población. El porcentaje de loci polimórficos, el número observado de alelos, el número efectivo de alelos, la diversidad genética de Nei (Nei, 1973) y el análisis de la varianza molecular (AMOVA) se calcularon utilizando el software GenAlEx v6.52. Se estimaron los componentes de la varianza entre las poblaciones aisladas y dentro de ellas. El AMOVA se realizó según los procedimientos descritos por Excoffier et al. (1992) y Peakall y Smouse (2012). Se calculó la distancia genética de Nei por pares y la estadística de Nei (h) como estimación de la diversidad genética (Nei, 1978) para las poblaciones utilizando GenAlEx v6.52.

La estructura genética de la población de *H. vastatrix* se determinó mediante 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 1-8. El valor K más probable se determinó mediante Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012), basado en la web, utilizando la probabilidad logarítmica de los datos [$\ln P(D)$] y delta K (ΔK) basado en la tasa de cambio de [$\ln P(D)$] entre valores K sucesivos (Evanno et al., 2005). Además, se determinó la diversidad genética espacial de la población de *H. vastatrix* (es decir, el aislamiento por distancia) o la relación entre las distancias genéticas y geográficas aplicando la prueba de Mantel (Mantel, 1967). Los cromatogramas resultantes fueron ensamblados y corregidos manualmente para generar las secuencias consenso utilizando el programa Geneious Prime v.2022.1.2 (Kearse et al., 2012). El alineamiento múltiple se realizó con el método MAFFT (Katoh & Standley, 2013) implementado en el programa UGENE v.1.32.0 (Okonechnikov et al., 2012). Las secuencias de ADN de la región ITS de *H. vastatrix* disponibles en el GenBank (Cristancho et al., 2012) fueron utilizadas como referencia para el alineamiento. La diversidad nucleotídica y haplotípica será calculada con el programa DNAsp v.5 (Librado & Rozas, 2009). Para observar la semejanza y distribución entre los haplotipos se elaborará una red utilizando el programa PopART (Leigh & Bryant, 2015) excluyendo los posibles gaps. Posterior se analizarán las secuencias con otras disponibles en el GenBank generadas en otros estudios como Colombia y Brasil para establecer la relación filogenética con los haplotipos guatemaltecos.

Ensayos de virulencia de resistencia genética

Con los datos obtenidos del ensayo de virulencia de los haplotipos de roya, así como el ensayo de resistencia de genotipos de café, se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 %, con base en el diseño experimental propuesto en la metodología (DCA), empleando el programa R v4.2.0 con el paquete stats (R core Team, 2022) y agricolae (de Mendiburu, 2020) mientras que los diagramas de cajas se realizarán con la biblioteca ggplot2 (Wickham, 2016) y ggstatsplot (Patil, 2021), para determinar si existe diferencia significativa entre las variables de respuesta.

11 Resultados

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

Polimorfismo y diversidad de los marcadores microsatélites

Los 17 marcadores produjeron bandas reproducibles y polimórficas. El tamaño de los fragmentos amplificados osciló entre 105 y 296 pb. Se detectaron entre 2 y 11 alelos por locus (Tabla 1), con una media de 4.06 alelos por locus. El menor número de alelos se observó utilizando el conjunto de cebadores SSR para los loci SSR01, SSR04, SSR06 SSR9 y SSR10, mostrando dos alelos por genotipo. Los alelos más altos se observaron en los loci SSR07, SSR05 y SSR16 con un número de alelos de 11, 6 y 6 respectivamente (Tabla 1). El índice medio de información de Shannon (I), que se calculó a partir de un solo locus para medir la diversidad alélica y genética fue de 0.86 (Tabla 1). También se registró una alta heterocigosidad observada ($H_o = 0.98$) en los loci SSR07 y SSR16, mientras que en el loci SSR177 se observó una alta heterocigosidad esperada ($H_e = 0.70$). Estos SSR polimórficos mostraron distintos niveles de flujo genético (Nm) entre poblaciones. El mayor Nm se detectó en los loci SSR02 (124.75) y SSR09 (118), mientras que el menor Nm lo mostraron los loci SSR08 (2.15) y SSR07 (3.37) (Tabla 1).

Tabla 1. Índices de diversidad de los loci SSR utilizados.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	F	Fst	Nm
SSR01	2.00	1.75	0.69	0.92	0.55	-0.63	0.050	4.75
SSR02	5.00	2.88	0.92	0.95	0.57	-0.66	0.002	124.75
SSR03	4.00	2.50	0.77	0.92	0.55	-0.52	0.003	83.08
SSR04	2.00	1.75	0.67	0.95	0.59	-0.89	0.003	83.08
SSR05	6.00	4.13	1.20	0.93	0.61	-0.83	0.035	6.89
SSR06	2.00	1.75	0.69	0.89	0.59	-0.71	0.039	6.16
SSR07	11.00	5.72	1.83	0.98	0.65	-0.63	0.069	3.37
SSR08	5.00	2.63	0.83	0.91	0.60	-0.56	0.104	2.15
SSR09	2.00	1.65	0.67	0.90	0.57	-0.55	0.002	118
SSR10	2.00	1.88	0.67	0.93	0.59	-0.73	0.009	27.53
SSR11	5.00	2.89	1.19	0.89	0.49	-0.31	0.051	4.65
SSR12	3.00	1.56	0.72	0.96	0.55	-0.88	0.070	3.32
SSR13	4.00	2.50	0.77	0.53	0.37	-0.29	0.043	5.56
SSR14	4.00	2.50	0.77	0.92	0.51	-0.82	0.035	6.89
SSR15	3.00	2.13	0.72	0.94	0.53	-0.85	0.043	5.56
SSR16	6.00	4.50	0.78	0.98	0.68	-0.91	0.049	4.85
SSR17	3.00	2.13	0.70	0.96	0.70	-0.87	0.017	14.46
Media	4.06	2.64	0.86	0.91	0.57	-0.68	0.04	32.56

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; Fst = coeficiente de endogamia dentro de las subpoblaciones en relación con el total (diferenciación genética entre las subpoblaciones); Nm = flujo genético estimado a partir de Fst, $0,25(1 - Fst)/Fst$

Diversidad genética de las poblaciones

En la Tabla 2 se describen los índices de diversidad genética de las seis poblaciones de *H. vastatrix*. La heterocigosidad esperada (uHe) más baja se observó en la población JAL01 (He =0.47) y la más alta en JUT01 (He =0.69), con una media de He= 0.57. El porcentaje de loci polimórficos osciló entre el 94.1% y 100% con una media del 98,05%. La mayor diversidad basada en el índice de información de Shannon (I) se registró en la población de JUT01(I = 1.11), mientras que la menor se registró en la población de JAL02(I = 0.74) (Tabla 2).

Tabla 2. Índices de diversidad de la población en los 17 loci SSR

Pop	N	Ng	Na	Ne	I	Ho	He	P (%)	F
STA01	11	5.78	3.66	2.38	0.79	0.93	0.55	100.0	-0.6
STA02	09	4.35	5.25	2.54	0.85	0.92	0.59	100.0	-0.81
JUT01	13	9.03	3	3.33	1.11	0.93	0.69	94.1	-0.58
JUT02	11	7.34	4	2.11	0.86	0.91	0.54	97.1	-0.64
JAL01	07	7.18	4.33	2.38	0.75	0.81	0.47	97.1	-0.65
JAL02	13	6.13	4.1	3.15	0.74	0.97	0.61	100.0	-0.89
Promedio	-	6.63	4.06	2.64	0.86	0.91	0.57	98.05	-0.68

Na = número de alelos; Ng = genotipos diferentes tipo SSR; Ne = número efectivo de alelos; I = índice de información de Shannon; Ho = heterocigosidad observada; He = heterocigosidad esperada; P (%) = porcentaje de loci polimórficos; F = índice de fijación

Estructura genética de las poblaciones

El dendrograma UPGMA desarrollado a partir de la distancia genética insesgada de Nei entre seis poblaciones de *H. vastatrix* mostró tres grupos principales, independientemente de las regiones de origen. Tres poblaciones -JAL02, STA02 y JUT02- en el primer grupo, dos poblaciones -JUT01 y STA01- en el segundo grupo y la población JAL01 en el tercero (Figura 2). El análisis molecular de varianza (AMOVA) que comparó las seis poblaciones mostró que el 1% y 7% de la varianza total se distribuían entre regiones y entre poblaciones, respectivamente (Tabla 5). Una mayor proporción (92%) de la variación se encontró entre muestras individuales. La variación genética entre las regiones productoras de café ($F_{ST} = 0.017$, $P \leq 0.05$), entre los distritos de cultivo (poblaciones) ($F_{ST} = 0.024$, $P \leq 0,001$) y entre las muestras individuales ($F_{ST} = 0.04$ $P \leq 0,001$) se muestra en el Tabla 4. Los valores Nei y F_{ST} de distancia genética por pares más altos se observaron entre las poblaciones de JUT02 y JAL01 (Nei = 0.091 y $F_{ST} = 0.061$), mientras que los más bajos se registraron entre las poblaciones de JUT01 y STA01 (Nei = 0.038 y $F_{ST} = 0.023$) (Tabla 5).

Figura 1. Dendrograma UPGMA utilizando la distancia genética insesgada de Nei entre ocho poblaciones de *Hemileia vastatrix* en Guatemala.

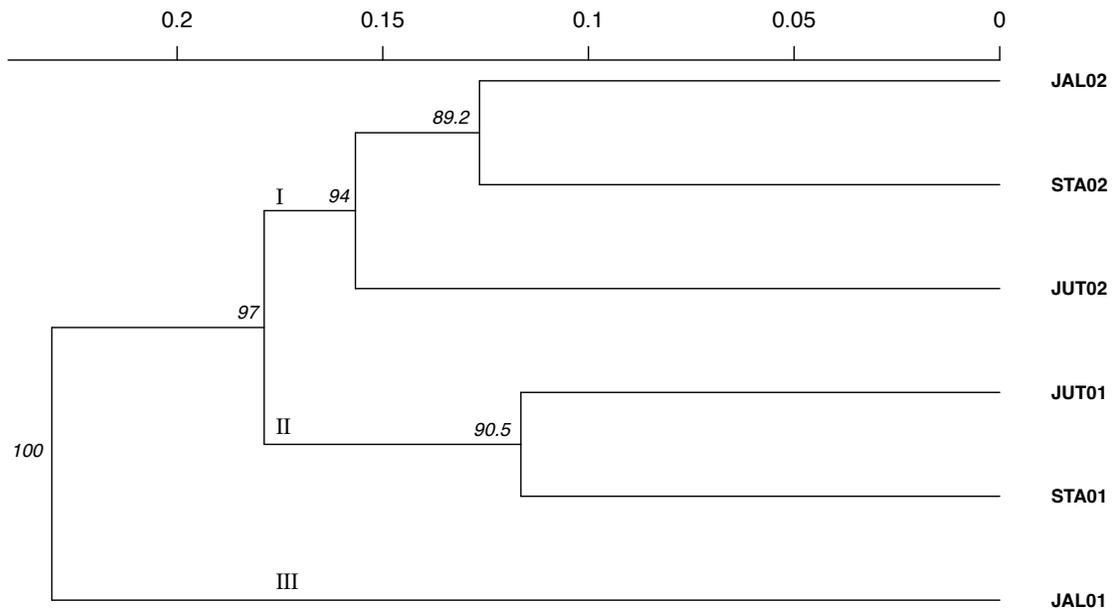


Tabla 3. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para seis poblaciones de *H. vastatrix*.

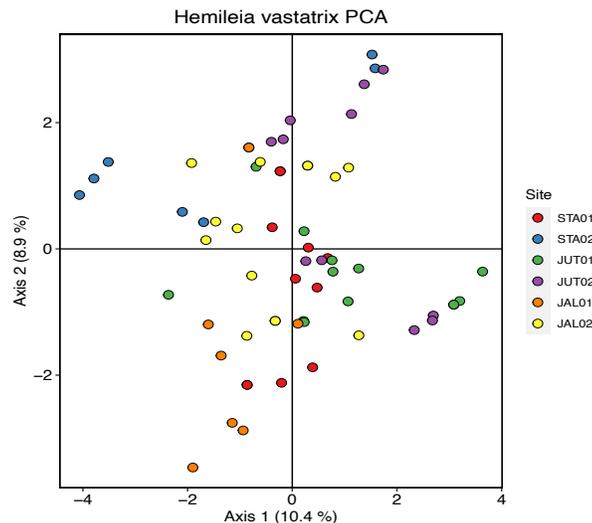
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Fst	p-valor
Entre regiones	1	10.858	10.858	0.02	1%	0.017	0.019
Entre poblaciones	4	57.300	14.325	0.48	7%	0.024	0.001
Dentro de poblaciones	122	491.943	4.032	4.032	92%	0.004	0.001
Total	127	560.102	-	4.518	100%	-	-

Tabla 4. Distancia genética Nei (encima de la diagonal) y diferenciación genética (Fst) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de *H. vastatrix* estudiadas.

Población	STA01	STA02	JUT01	JUT02	JAL01	JAL02
STA01	0.000	0.038	0.050	0.078	0.084	0.060
STA02	0.044	0.000	0.105	0.082	0.043	0.062
JUT01	0.023	0.048	0.000	0.056	0.091	0.052
JUT02	0.039	0.030	0.024	0.000	0.134	0.067
JAL01	0.034	0.052	0.047	0.061	0.000	0.081
JAL02	0.030	0.025	0.026	0.032	0.034	0.000

Todos los valores de Fst por pares son significativos a P = 0.05.

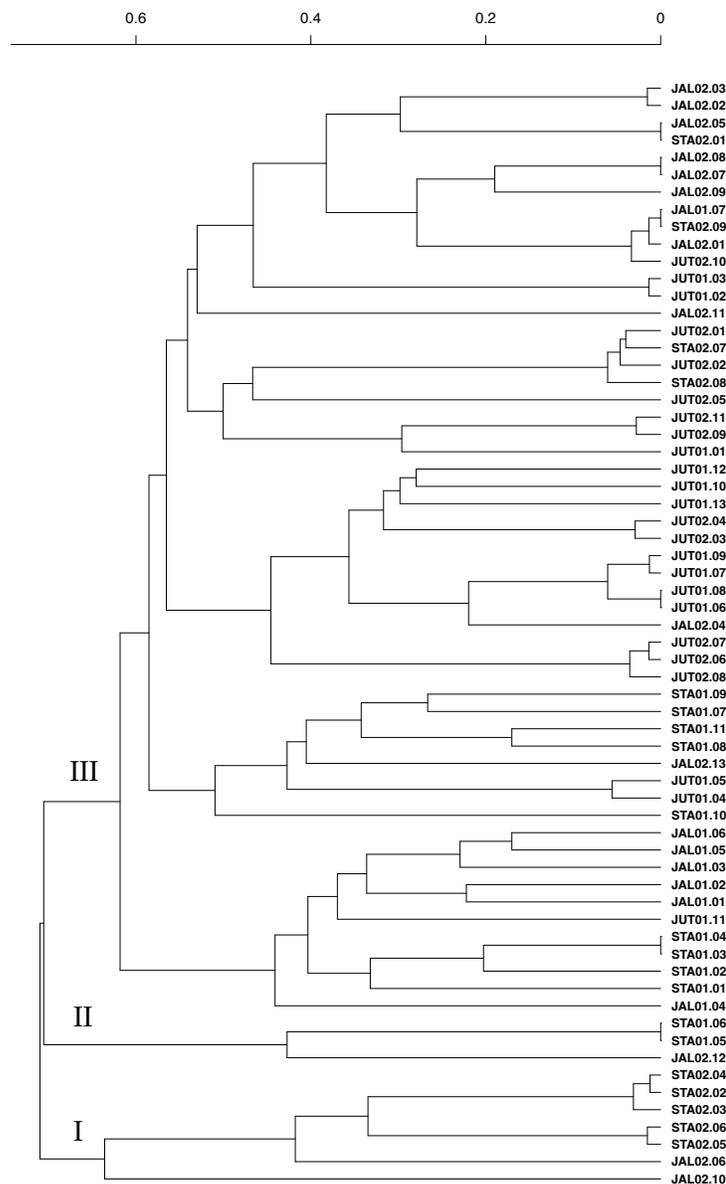
Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) para visualizar las relaciones genéticas entre 64 aislados de *H. vastatrix*.



El análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 3) y el dendrograma basado en el método UPGMA (Figura 4) de los 64 individuos que representaban las seis poblaciones mostraron la agrupación de las muestras. Entre el total de muestras individuales, se obtuvieron tres grupos principales, siendo el grupo I con siete muestras de STA02 y JAL02. El grupo II estuvo formado por tres muestras de las poblaciones STA01 y JAL02. Las 54 muestras restantes conformaron el grupo III el cual estuvo formado por muestras de todas las poblaciones (Figura 4). Algunos pares de muestras

de *H. vastatrix* no se discriminaron: JAL02.05 y STA02.01; JAL02.07 y JAL02.08; JAL01.07 y STA02.09; JUT01.08 y JUT01.06; STA01.04 y STA01.03; STA01.06 y STA01.05 (Figura 3).

Figura 3. Dendrograma generado por el método UPGMA utilizando la distancia genética de Nei a partir del análisis de diecisiete marcadores SSR de 64 aislados de *H.vastatrix* procedentes de seis poblaciones.

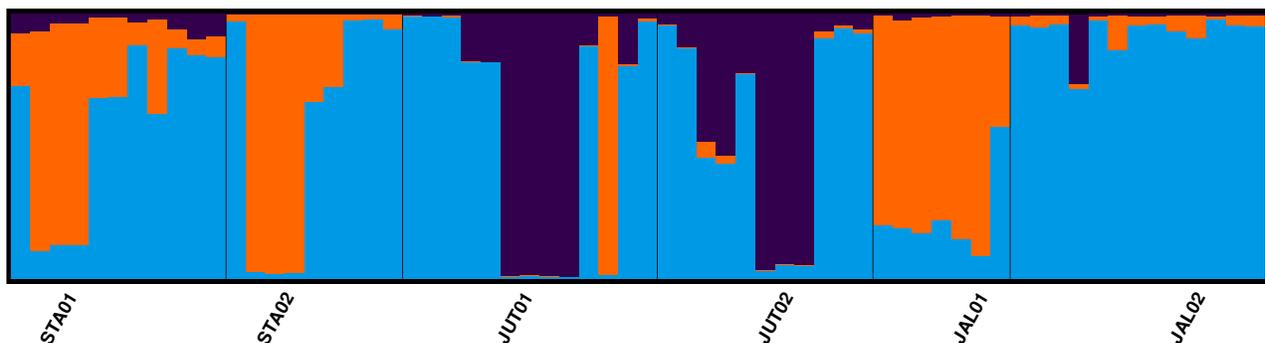


Se aplicó un enfoque basado en un modelo de mezcla para evaluar la estructura de la población de las 64 muestras de *H. vastatrix*. El número óptimo de conglomerados (K) fue tres, con los mayores valores de lnP (D) (probabilidad logarítmica de los datos) y delta K obtenidos del sitio web StructureHarvester (Figura 5a,b). La subestructura de la relación genética entre las muestras individuales, con las dos poblaciones de conglomerados (pop1 y pop 2) se muestran en la Tabla 5. De las 64 muestras 7, 40 y 16 se agruparon en las poblaciones 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 5). En el gráfico, el morado (población 1), el celeste (población 2) y el naranja (población 3) representan tres subpoblaciones y los segmentos negros separan los aislados de distinto origen geográfico. Cada color muestra la proporción de pertenencia de los aislados, representada por una línea vertical, a las tres subpoblaciones.

Tabla 5. Resultados de STRUCTURE de 64 aislados de *H. vastatrix* para el índice medio de fijación (Fst), las distancias (heterocigosidad esperada/He) y el número de aislados asignados a cada subpoblación.

Population	Fst promedio	He	No. de aislados
Pop 1	0.435	0.512	7
Pop 2	0.032	0.747	40
Pop 3	0.202	0.651	16

Figura 4. Resultados del análisis STRUCTURE para 64 aislados de *H. vastatrix* basados en datos de 17 microsatélites.



El análisis de Mantel (el análisis de aislamiento por distancia) mostró la relación entre la distancia genética insesgada de Nei y la distancia geográfica entre poblaciones. El resultado no reveló ninguna relación entre la distancia genética y la distancia geográfica ($R_{xy} = -0.139$, $P = 0,230$). Estos datos sugieren que las diferencias genéticas entre las poblaciones se atribuyen más a la distancia genética que a la geográfica.

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

Analisis de variabilidad genética basado en la región ITS

A partir de los aislados de *H. vastatrix* obtenidos de las seis poblaciones, se obtuvieron 64 secuencias de ADN de la región ITS. La longitud de las secuencias osciló entre 934 pb y 953 pb. Al alinear estas secuencias, se obtuvieron 953 sitios alineados, de los cuales 3 fueron gaps (inserciones o deleciones). También se encontraron 87 sitios variantes (polimórficos) con 22 posiciones parsimoniosas informativas (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de las medidas descriptivas de la variabilidad de *Hemileia vastatrix* de las secuencias de la región ITS, relacionadas con muestras recolectadas en Guatemala

Pop	No. Secuencias	Pi	H	Hs	D	SV	SVS	SPI
STA01	11	0.0044	10	0.987	-1.251	17	13	4
STA02	9	0.0057	8	0.975	-0.869	18	12	6
JUT01	13	0.0037	9	0.944	-0.589	13	7	6
JUT02	11	0.0071	10	0.981	-1.246	27	16	11
JAL01	7	0.0059	7	1	-1.314	18	16	2
JAL02	13	0.0043	11	0.972	-1.080	17	10	7
Total	64	0.0051	51	0.985	-2.532	87	65	22

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 sies poblaciones analizadas, se encontraron 51 haplotipos con diversidad haplotípica ($H_d = 0.985$) y nucleotídica ($P_i =$ de 0.0051); 45 haplotipos mostraron secuencias únicas y 6 haplotipos consistieron en más de dos secuencias (Tabla 7). Los haplotipos Hap_8, y Hap_09 se encontraron con mayor frecuencia y se consideran ancestros (Figura 6A); también se distribuyen en la mayor parte de poblaciones. La filogenia mostró la formación de dos haplogrupos, los cuales incluyeron haplotipos distribuidos en todas las poblaciones sin mostrar una relación con su origen geográfico (Figura 6B). Se utilizó la prueba de neutralidad de Tajima de forma individual así como para todas las poblaciones de *H. vastatrix* juntas. Estos valores son inferiores a 0 ($p < 0.001$), lo que indica que las poblaciones del patógeno están en proceso de expansión.

Tabla 7. Distribución regional de frecuencias de haplotipos de *H. vastatrix* generados a partir de las secuencias ITS.

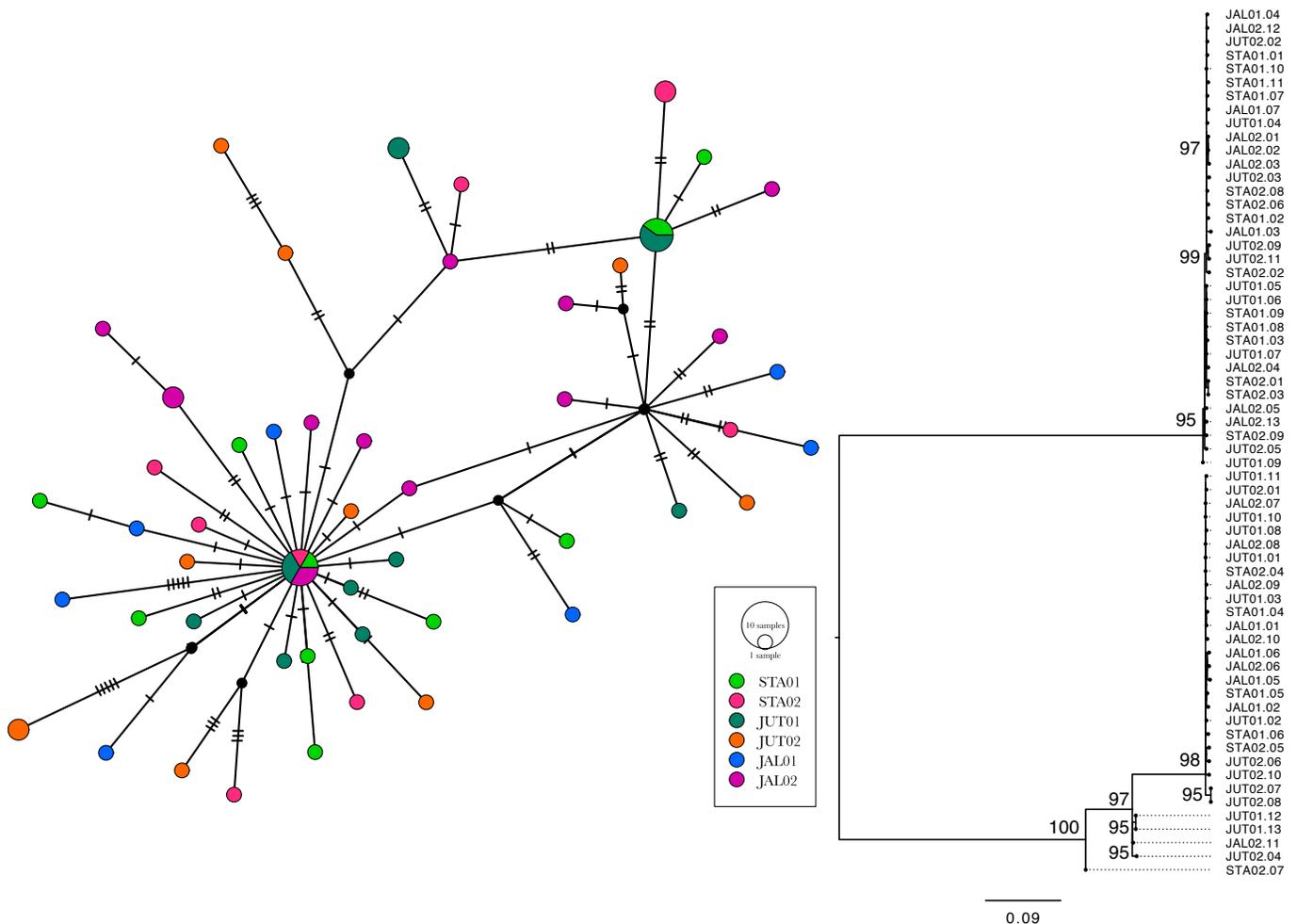
Haplotipo	Frecuencia	Secuencias
Hap_1:	1	STA01.01
Hap_2:	1	STA01.02
Hap_3:	1	STA01.03
Hap_4:	1	STA01.04
Hap_5:	1	STA01.05
Hap_6:	1	STA01.06
Hap_7:	1	STA01.07
Hap_8:	5	STA01.08; STA01.09; JUT01.05; JUT01.06; JUT01.07
Hap_9:	6	STA01.10; STA02.04; JUT01.01; JUT01.10; JAL02.07; JAL02.08
Hap_10:	1	STA01.11
Hap_11:	2	STA02.01; STA02.03
Hap_12:	1	STA02.02
Hap_13:	1	STA02.05
Hap_14:	1	STA02.06
Hap_15:	1	STA02.07
Hap_16:	1	STA02.08
Hap_17:	1	STA02.09
Hap_18:	1	JUT01.02

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

Hap_19:	1	JUT01.03
Hap_20:	1	JUT01.04
Hap_21:	1	JUT01.08
Hap_22:	1	JUT01.09
Hap_23:	1	JUT01.11
Hap_24:	2	JUT01.12; JUT01.13
Hap_25:	1	JUT02.01
Hap_26:	1	JUT02.02
Hap_27:	1	JUT02.03
Hap_28:	1	JUT02.04
Hap_29:	1	JUT02.05
Hap_30:	1	JUT02.06
Hap_31:	2	JUT02.07; JUT02.08
Hap_32:	1	JUT02.09
Hap_33:	1	JUT02.10
Hap_34:	1	JUT02.11
Hap_35:	1	JAL01.01
Hap_36:	1	JAL01.02
Hap_37:	1	JAL01.03
Hap_38:	1	JAL01.04
Hap_39:	1	JAL01.05
Hap_40:	1	JAL01.06
Hap_41:	1	JAL01.07
Hap_42:	2	JAL02.01; JAL02.02
Hap_43:	1	JAL02.03
Hap_44:	1	JAL02.04
Hap_45:	1	JAL02.05
Hap_46:	1	JAL02.06
Hap_47:	1	JAL02.09
Hap_48:	1	JAL02.10
Hap_49:	1	JAL02.11
Hap_50:	1	JAL02.12
Hap_51:	1	JAL02.13

Figura 5. A) Red de haplotipos creada utilizando el método Median Joinig para 51 haplotipos identificado para la región ITS de *H. vastatrix* en seis zonas productoras de café en Guatemala. Los círculos representan un haplotipo único; el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias de un haplotipo; las líneas transversales representan los eventos de mutaciones simples, y los nodos negros los haplotipos perdidos o no muestreados. B) Relaciones filogenéticas basadas en los haplotipos ITS de *H. vastatrix* con valores bootstrap de máxima verosimilitud sobre las ramas (se muestran únicamente los valores > 95)



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

Cuando se analizó la gravedad del daño causado por cada haplotipo sobre la variedad susceptible Caturra, se encontró que existía una diferencia altamente significativa entre ellos ($p < 0.001$). La Figura 7 muestra que el Hap_02 fue el haplotipo que causó los mayores valores de AUDPC, seguido del Hap_03 y, finalmente, el Hap_01.

11.4 Evaluar la resistencia de siete genotipos de café comercializados en Guatemala ante los haplotipos de *H. vastatrix* identificados.

Después de verificar los distintos haplotipos, se observó que estos afectaron de manera diferente las ocho variedades de café evaluadas. Las pruebas de severidad exhibieron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en el AUDPC entre las ocho variedades evaluadas, tal como se muestra en la Figura 8.

Figura 6. Diagrama de caja del comportamiento del AUDPC en función de los tres haplotipos de *H. vastatrix* sobre la variedad Caturra. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

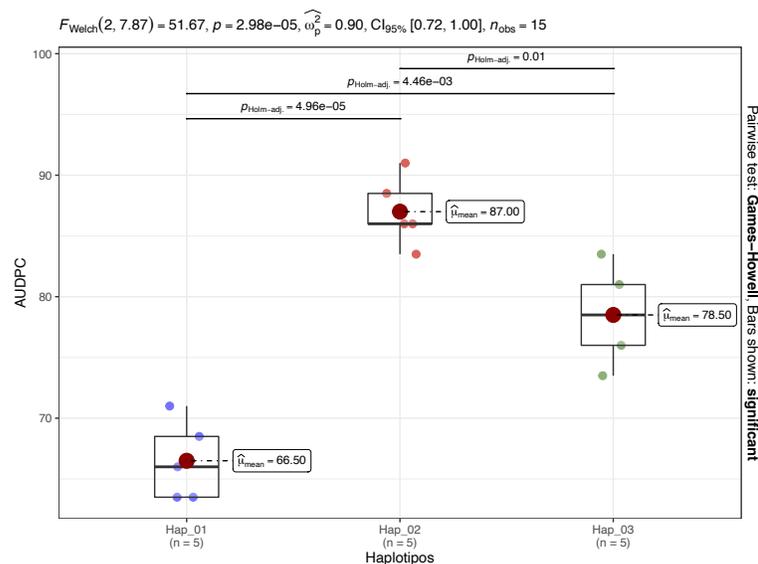
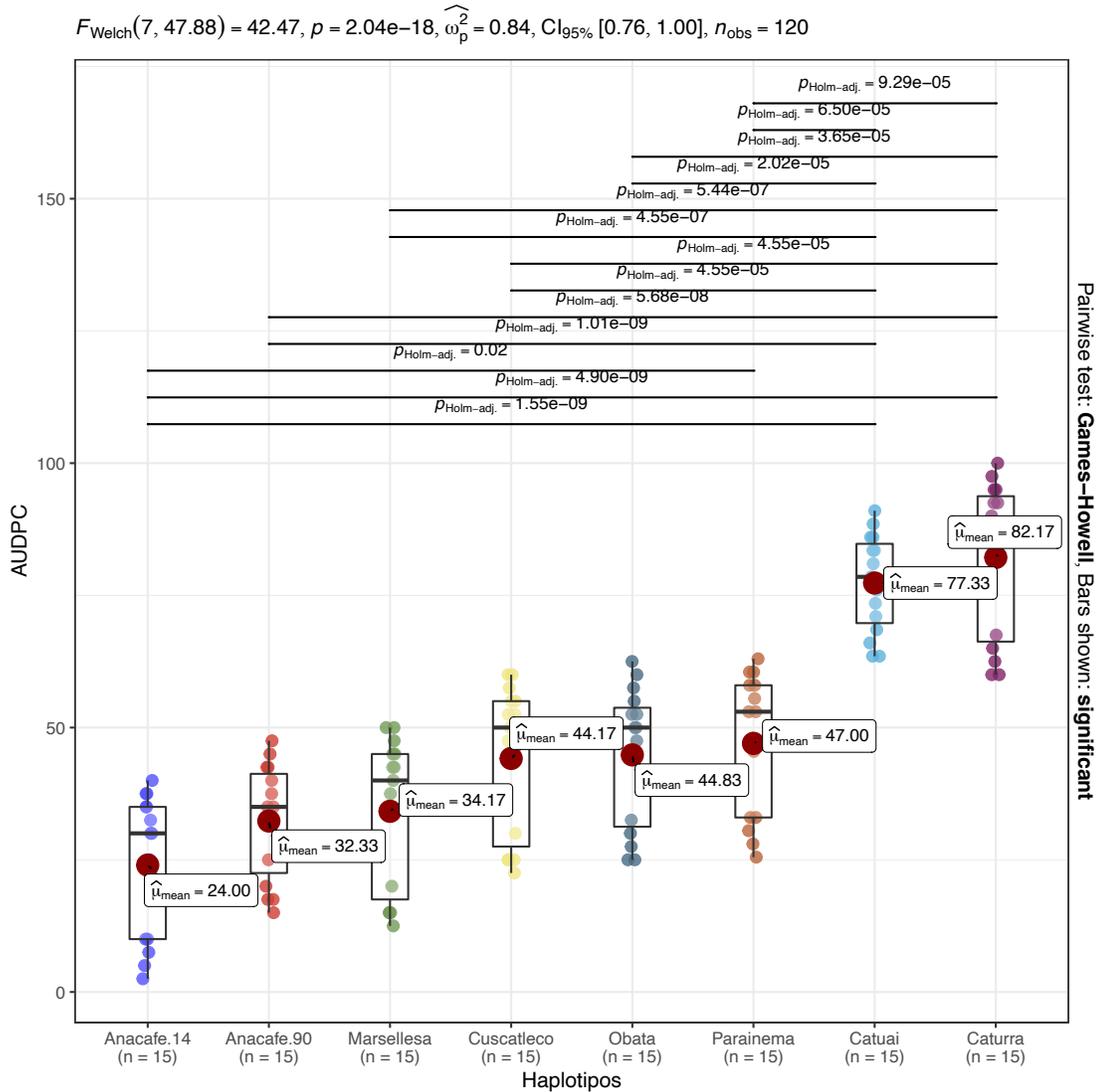


Figura 7. Diagrama de cajas del índice del AUDPC ocasionado por *H. vastatrix* sobre las variedades de café evaluadas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.



Se observó que todas las variedades de café evaluadas fueron afectadas de manera diferente por los diferentes haplotipos de *H. vastatrix*. Los valores de AUDPC fueron significativamente diferentes ($p < 0.001$) para todas las interacciones variedad*haplotipo. El haplotipo Hap_02 tuvo el mayor efecto en el AUDPC en todos los casos, siendo el más agresivo, independientemente de la variedad de café. El haplotipo Hap_03 se ubicó en segundo lugar en todas las evaluaciones, y fue estadísticamente diferente del Hap_02. El Hap_01 demostró ser el haplotipo menos agresivo para todas las variedades de

café, con el valor más bajo de AUDPC, y fue estadísticamente diferente de los otros dos haplotipos. La Figura 9 y 10 muestra los detalles de cada prueba.

Figura 8. Diagrama de cajas del comportamiento del AUDPC en las variedades de café. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones significativas $p < .05$.

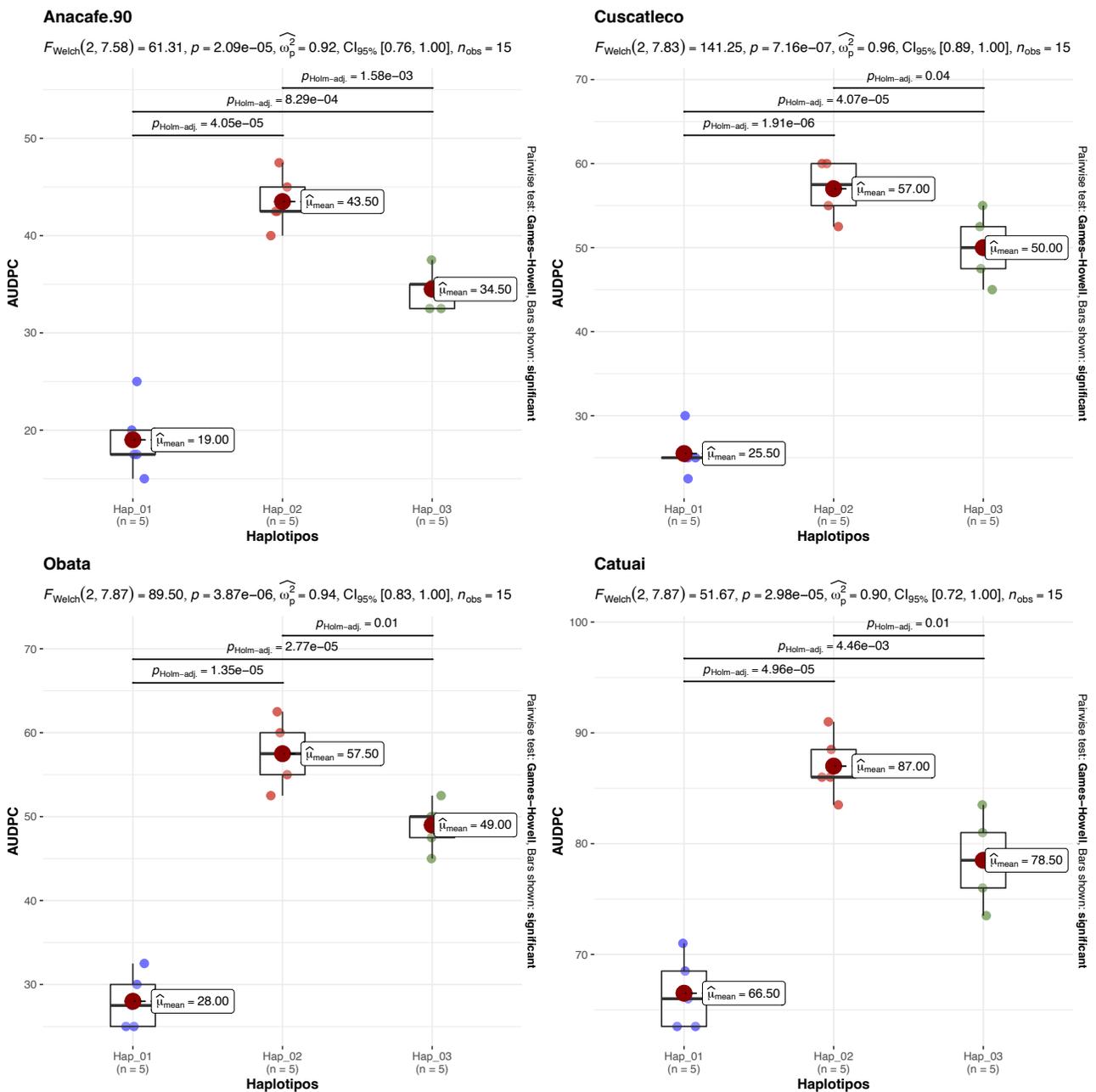
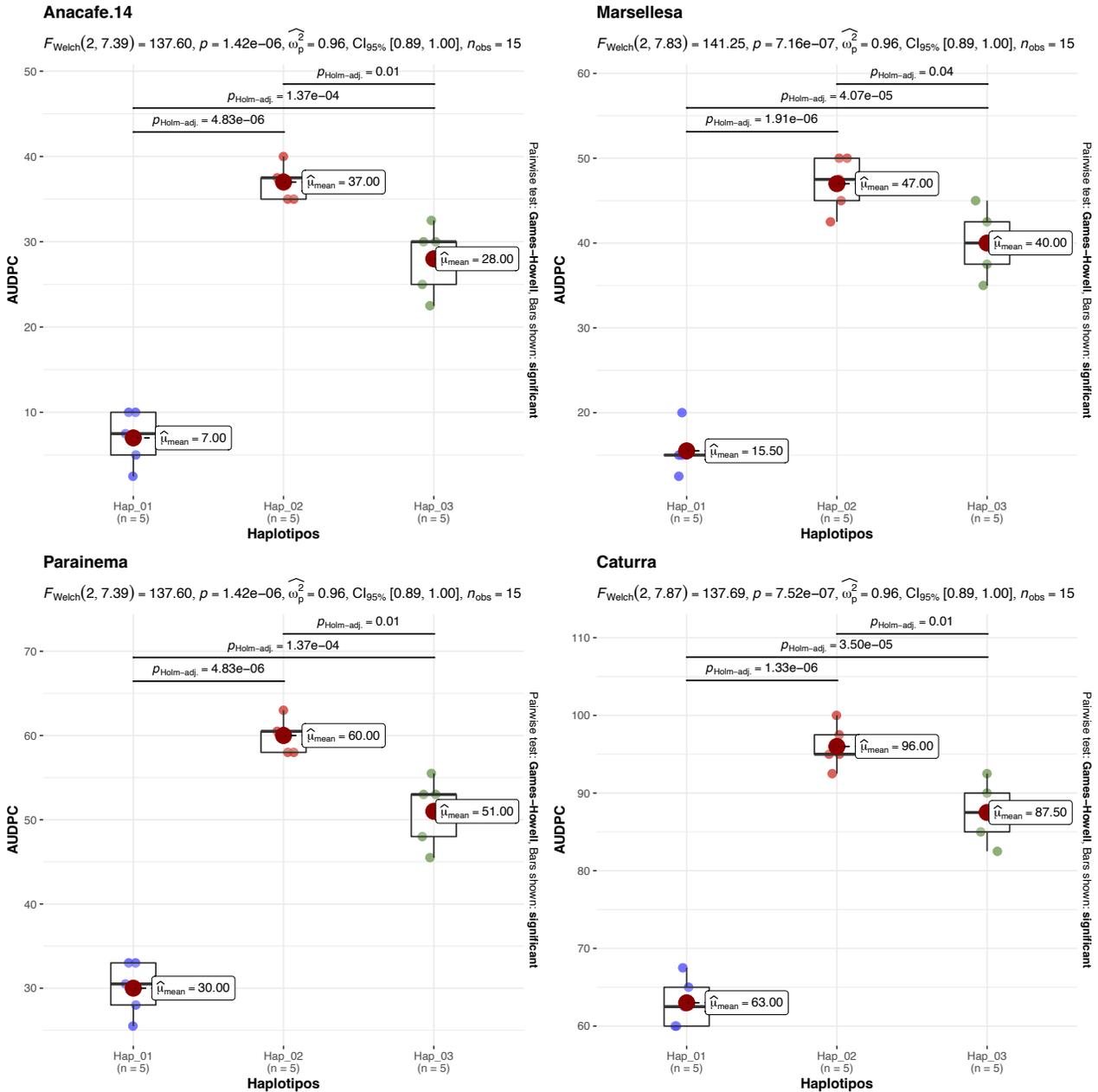


Figura 9. Diagrama de cajas del comportamiento del AUDPC haciendo un agrupamiento por variedades de café. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.



12 Discusión

Para el uso de marcadores SSR en especies fúngicas es necesario seleccionar cebadores adecuados que proporcionen información confiable (Talhinhas et al., 2017). En este estudio se probaron 17 SSR en aislados de *H. vastatrix*, y se encontraron alelos únicos y un porcentaje promedio de polimorfismo del 98,05%, lo que indica una alta diversidad genética. Otros estudios han utilizado diferentes tipos de marcadores, como SRAP con aislado de la India (Kosaraju et al., 2017) y AFLP en Brasil (Cabral et al., 2016) y Colombia (Rozo et al., 2012), y encontraron porcentajes de polimorfismo más bajos; 51.7, 46.7 y 13.2 respectivamente. Por lo tanto, los marcadores SSR son más informativos y permitieron observar un mayor polimorfismo en el análisis de *H. vastatrix*.

Los resultados indican que cada marcador SSR detectó un número diferente de alelos, entre 2 y 11. Esto podría deberse a diferencias en el tipo de motivo SSR (por ejemplo, los SSR de repetición dinucleótida pueden detectar más alelos) (Zhong et al. 2008). Los marcadores SSR también detectaron diferentes niveles de flujo genético (Nm) entre las poblaciones analizadas, lo que sugiere una selección eficiente de marcadores (Tabla 3). En comparación con los resultados obtenidos por Cabral et al. (2016) (Nm = 22.14), quienes trabajaron con aislados brasileños, el presente estudio encontró valores más altos de flujo genético, lo que sugiere una mayor dispersión de las urediniosporas de *H. vastatrix* en Guatemala.

El análisis de la estructura genética de las poblaciones de *H. vastatrix* mostró que poblaciones genéticamente diversas del hongo son responsables de las epidemias de la roya de la hoja del café - CLR- en Guatemala. La subestructuración de 64 muestras individuales en tres poblaciones sugiere que la relación genética entre las muestras no es específica de su origen regional, altitud o sistema de producción. Estos resultados están respaldados por estudios anteriores que muestran que las poblaciones de *H. vastatrix* no estaban estructuradas con respecto al hospedador y los orígenes geográficos (Cabral et al., 2016; Gouveia et al., 2005; Maia et al., 2013; Santana et al., 2018). Además, la variación genética de los aislados es independiente de la ubicación geográfica de donde se recogieron los aislados, lo que significa que las muestras no se agruparon por sus orígenes geográficos y de hospedero.

La falta de correlación entre la diversidad genética y las distancias geográficas también se informó para otros hongos de la roya, como *Melampsora epitea*, *Cronartium bicola*, *Puccinia triticina*

(Hamelin et al., 2005; Hurtado & Ramstedt, 2002; Mebrate et al., 2006). Por ejemplo, la importancia del viento en el transporte de *H. vastatrix* ha quedado demostrada por la presencia de urediniosporas a una altura de 1,000 m, que podrían dispersar las esporas a grandes distancias (Bowden et al., 1971; Kushalappa & Eskes, 1989). También se sugirió que este modelo de dispersión por corrientes de viento era la causa de la introducción de la CLR en Sudamérica y de su rápida propagación por los países productores de café (Bowden et al., 1971; Schieber, 1972; Schieber & Zentmyer, 1984).

Otro factor que facilita el flujo genético de *H. vastatrix* es la presencia de cafetos en todas las ubicaciones geográficas de las principales zonas cafetaleras del país y la intervención humana en las fincas cafetaleras. La cobertura continua del área con plantaciones de café también puede crear un movimiento "paso a paso" de las esporas de la roya para las epidemias de la enfermedad y la distribución del genotipo. Dado esto, la presencia de altos niveles de flujo genético entre las poblaciones condujo a una muy pequeña diferenciación genética entre las poblaciones de *H. vastatrix*. Una situación similar se reportó en el estudio realizado en plantaciones de café orgánico y convencional en Brasil (Nunes et al., 2009).

Las poblaciones de *H. vastatrix* de los cafetales guatemaltecos mostraron una variabilidad genética significativa ($p < 0.001$) entre las poblaciones y dentro de las poblaciones ($p < 0.001$), lo que indica que la gran variación genética se distribuyó en todas las poblaciones analizadas. Esto contrasta con la baja diversidad genética notificada en otras poblaciones de *H. vastatrix* de regiones cafeteras de todo el mundo utilizando marcadores RAPD (Gouveia et al., 2005). La alta diversidad genética en poblaciones de hongos se correlaciona con un alto flujo genético, recombinación sexual y/o mayores tasas de mutación (McDonald & Linde, 2002).

Además de los factores genéticos, otros factores que pueden favorecer el aumento de la diversidad genética del patógeno en Guatemala son la existencia de las extensas explotaciones de café con diferentes sistemas de producción, la variabilidad genética de los cultivares de café en cuanto al nivel de resistencia a la roya del café, los cultivos de producción orgánica y la variabilidad de los factores ambientales en Guatemala. Además, el gran tamaño de la población de patógenos tiende a mostrar una gran diversidad genética al ganar muchos alelos por mutación o perder pocos alelos por deriva genética aleatoria (Kimura 1983; McDonald y Linde 2002).

Al no haber nodos exclusivos por población geográfica en la red haplotípica (Figura 6), se sugiere que la población de *H. vastatrix* es grande y sin diferenciación, lo que puede ser el resultado de la dispersión de las esporas del hongo a través del movimiento de personas, semillas o plantas infectadas. Los resultados obtenidos son similares a los informados por Cabral et al. (2016) en Brasil, quienes no encontraron una estructuración de la población de *H. vastatrix* con respecto a su origen, hospedero ni razas fisiológicas, aunque la diversidad genética fue menor que la encontrada en este estudio. Maia et al. (2013), también en Brasil, obtuvieron resultados similares, y proponen que *H. vastatrix* es una gran población indiferenciada con alta diversidad genotípica, sin estructuración en relación a su origen geográfico o 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 que están en proceso de expansión y se originaron a partir de pocos genotipos o de la raza II que se identificó 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. Estos valores también son una indicación de que la diversidad genética en la población es mayor de lo que se esperaría bajo un modelo neutral de evolución, lo que puede deberse 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. Estos hallazgos son similares a los de otros estudios que también sugieren que *H. vastatrix* es una población grande y no estructurada (Cristancho et al., 2012). Se desconocen los mecanismos que causan el aumento de la variabilidad y la creación de nuevas razas de *H. vastatrix*. Las mutaciones espontáneas podrían ser el principal mecanismo responsable de la creación de variabilidad en el hongo, especialmente durante los períodos de mayor incidencia de la enfermedad. Además, la presión selectiva ejercida por el medio ambiente, como la presencia de genes de resistencia de algunas variedades en el hospedero, también puede aumentar el número de mutantes virulentos en la población. La criptosexualidad (Carvalho et al., 2011) también podría explicar el surgimiento frecuente y rápido de nuevas variantes y desempeñar un papel importante en la generación de variabilidad genética de *H. vastatrix*.

El conocimiento de la diversidad genética y la estructura de las poblaciones de patógenos, incluido *H. vastatrix*, es fundamental en cualquier programa de gestión de enfermedades de las plantas. Este

estudio proporciona información valiosa para el desarrollo de programas de mejoramiento genético de la resistencia del café en Guatemala y para futuros estudios sobre la biología de la población de *H. vastatrix*. Debido a que la diversidad genética de los individuos de *H. vastatrix* puede influir en los niveles de resistencia de las variedades contra la enfermedad, dependiendo de la población del patógeno, se debe utilizar una amplia selección de aislados de roya para seleccionar germoplasmas de café resistentes en una ubicación geográfica particular. El estudio proporciona información de referencia sobre dónde centrarse para realizar un cribado más eficaz de genotipos de café resistentes a la roya del café en Guatemala. Además, se trata del primer informe sobre la diversidad genética y la estructura de la población de *H. vastatrix* en Guatemala. Este trabajo es muy importante para el futuro estudio de la biología de la población de la roya del café.

La diversidad haplotípica de *H. vastatrix* puede tener un impacto en la resistencia que presentan los cultivares de café. Los haplotipos que presentan mayores niveles de diversidad pueden estar asociados a una mayor capacidad de adaptación y virulencia del patógeno, lo que podría comprometer la eficacia de la resistencia de los cultivares de café. En contraste, haplotipos con niveles de diversidad más bajos pueden estar asociados con una menor capacidad de adaptación y virulencia, lo que podría ser una ventaja para la resistencia de los cultivares de café. Además, los cultivares de café que tienen genes de resistencia específicos pueden interactuar de manera diferente con los diferentes haplotipos de *H. vastatrix*. Por lo tanto, es posible que ciertos haplotipos puedan superar la resistencia de ciertos cultivares de café, mientras que otros haplotipos pueden ser susceptibles a los mismos cultivares.

Es importante tener en cuenta que la resistencia de los cultivares de café es el resultado de una interacción compleja entre el patógeno y la planta. Además, los niveles de resistencia también pueden ser influenciados por factores ambientales, como la temperatura y la humedad. Por lo tanto, la diversidad haplotípica de *H. vastatrix* es solo uno de los muchos factores que pueden afectar la resistencia de los cultivares de café. En resumen, la diversidad haplotípica de *H. vastatrix* puede tener un impacto en la resistencia que presentan los cultivares de café. Sin embargo, es necesario considerar muchos otros factores antes de determinar el nivel de resistencia de un cultivar específico. Estudios adicionales sobre la interacción entre los diferentes haplotipos de *H. vastatrix* y los cultivares de café son necesarios para comprender completamente cómo estos factores afectan la resistencia de los cultivares de café.

13 Conclusiones

El análisis de marcadores SSR en *H. vastatrix* de Guatemala reveló alta diversidad genética (98,05% de polimorfismo) y estructura genética diversa. No hubo correlación entre la diversidad y las distancias geográficas, sugiriendo la dispersión de la roya del café por el viento y el flujo genético facilitado por y la intervención humana. Este flujo genético generó poca diferenciación genética entre las poblaciones de *H. vastatrix*, y es posible que los altos niveles de diversidad se deban a mutaciones espontáneas, selección natural y criptosexualidad.

Los resultados indican una gran población de *H. vastatrix* sin diferenciación y alta variabilidad genética debido a mutaciones y presiones ambientales. Los valores negativos de D de Tajima indican que la población está en expansión y se originó a partir de pocos genotipos, lo que puede explicar la presencia de muchos haplotipos únicos. En general, *H. vastatrix* es una población grande e indiferenciada con alta diversidad genotípica y sin estructuración geográfica o de hospedero.

La diversidad haplotípica de *H. vastatrix* puede influir en la resistencia de los cultivares de café, pero la interacción entre el patógeno y la planta es compleja y otros factores ambientales también pueden influir en la resistencia. Se necesitan estudios adicionales para comprender cómo diferentes haplotipos de *H. vastatrix* interactúan con los cultivares de café y cómo afectan la resistencia.

Los genotipos de café evaluados presentaron niveles variados de resistencia a los diferentes haplotipos. De forma general, los genotipos Anacafe 14, Anacafe 90 y Marsellesa mostraron los mejores niveles de resistencia genética en los ensayos de inoculación. No obstante, cada genotipo evaluado mostró valores de AUDPC diferentes ante cada haplotipo de *H. vastatrix*, lo que resalta el hecho de que la diversidad genética del patógeno es un factor que influye directamente sobre la resistencia que pueden mostrar los genotipos de café.

14 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>
- Bettencourt, A. J. (1981). *Melhoramento genético do cafeeiro. Transferencia de factores de resistencia a H. vastatrix Berk & Br. para as principais cultivares de Coffea arabica L.* Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC/IICT).
- Bowden, J., Gregory, P., & Johnson, C. (1971). Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature*, 229, 500–501.
- 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>
- Cressey, D. (2013). Coffee rust regains foothold. *Nature*, 493, 587.
- Cristancho, M. A., Roza, 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)

- 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 multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, *164*, 1567–1587. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- 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>
- Hamelin, R. C., Allaire, M., Bergeron, M. J., Nicole, M. C., & Lecours, N. (2005). Molecular epidemiology of white pine blister rust: Recombination and spatial distribution. *Phytopathology*, *95*(7), 793–799. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0793>
- Hurtado, S., & Ramstedt, M. (2002). AFLP comparison of distant *Melampsora epitea* (willow rust) populations. *Mycological Research*, *106*(12), 1400–1407. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006846>

- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- 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>
- Kushalappa, A. C., & Eskes, A. B. (1989). Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 503–531. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.002443>
- 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
- Mayne, W. W. (1932). Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* B. & Br. *Nature*, 129, 150.
- 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. <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>
- Mebrate, S. A., Dehne, H. W., Pillen, K., & Oerke, E. C. (2006). Molecular diversity in *Puccinia triticina* isolates from Ethiopia and Germany. *Journal of Phytopathology*, 154(11–12), 701–710. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01177.x>
- Muller, R. (1971). La rouille du caféier (*Hemileia vastatrix*) sur le continent Américain. *Café, Cacao, Thé*, 15, 25.
- 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>
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583–590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>
- 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.
- Porto, B. N., Caixeta, E. T., Mathioni, S. M., Vidigal, P. M. P., Zambolim, L., Zambolim, E. M., Donofrio, N., Polson, S. W., Maia, T. A., Chen, C., Adetunji, M., Kingham, B., Dalio, R. J. D., & de Resende, M. L. V. (2019). Genome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* reveal expression dynamics of candidate effectors dependent on host compatibility. *PLoS ONE*, 14(4), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215598>
- 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>
- 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>
- Ritschel, A. (2005). Monograph of the genus *Hemileia* (Uredinales). In A. Bresinsky, H. Butin, & P. Tudzinski (Eds.), *Bibliotheca Mycologica* (pp. 3–132). J. Cramer.
- 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>
- 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. (1972). Economic Impact of Coffee Rust in Latin America. *Annual Review of*

- Phytopathology*, 10(1), 491–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.002423>
- 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>
- Schieber, E., & Zentmyer, G. A. (1984). Coffee Rust in the Western Hemisphere. In *Plant Disease* (Vol. 68, Issue 2, p. 89). <https://doi.org/10.1094/pd-69-89>
- 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.
- 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>
- 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>
- 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>

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

15 Vinculación

La vinculación se realizó principalmente con la Asociación Nacional del Café -ANACAFE- a través del apoyo en la identificación de fincas con incidencia de Roya en los departamentos de Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa, la cual es una entidad que ha mostrado interés en el manejo de la enfermedad de la roya del café y aprovechamiento de las variedades comerciales de cafetos.

16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Los resultados de investigación se difundieron principalmente por medio de un manuscrito científico. Adicionalmente, se difundió información por el portal web del instituto de investigaciones y por las redes sociales del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUSAC.

17 Aporte de la propuesta de investigación a los ODS

Este estudio es el primero en su área, ya que se diagnostica la situación genética de una especie de patógeno de interés biológico y comercial. Al trabajar con poblaciones de *H. vastatrix* en zonas cafetaleras, se aportan datos de importancia para detallar el aspecto genético y conocer su impacto en la severidad de la enfermedad. Adicionalmente, este estudio sirve como base para la elaboración de un plan de manejo de la enfermedad así como la mejora de nuevos genotipos de cafetos resistentes a *H. vastatrix* en Guatemala.

18 Orden de pago final

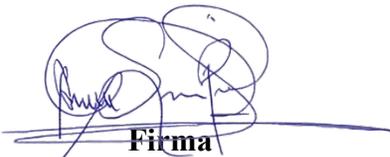
Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Julio Ernesto Berdúo Sandoval	Investigador	20101034	Si	

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

19 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.

Gregorio Amílcar Sánchez Pérez Coordinador del proyecto de investigación	 Firma
Fecha: 28/02/2023	

20 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 y haplotípica de *Hemileia vastatrix* en Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa: bases para aprovechamiento de genotipos de café de Coordinador del Insituto de Investigaciones Agrícolas y Ambientales, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

Vo.Bo. Carlos López Búcaro Director del Insituto de Investigaciones Agrícolas y Ambientales Facultad de Agronomía	 Firma
Fecha: 28/03/2022	

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

21 Visado de la Dirección General de Investigación

Vo.Bo. M.Sc. Andrea Rodas Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente	Firma
Fecha: 28/02/23	

Vo.Bo. Ing. Agr. Julio Rufino Salazar Nombre Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación	Firma
Fecha: 28/02/23	