

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Dirección de Proyectos**

Informe final de proyecto de investigación

**Evaluación de fuentes alternativas de resistencia genética hacia
la roya del café (*Hemileia vastatrix*)**

DOCUMENTO 1

Fabián Echeverría Beirute, investigador coordinador

Marzo, 2023

Tabla de Contenido

1	Datos generales	1
2	Resumen	2
3	Introducción	3
4	Marco Teórico	4
5	Materiales y Métodos	6
6	Resultados	10
7	Conclusiones	14
8	Recomendaciones.....	15
9	Referencias	15

1 Datos generales

Código del Proyecto: 2151078 y 2151082 (5401-1701-6140 en el año 2020)

Nombre del proyecto: Evaluación de fuentes alternativas de resistencia genética hacia la roya del café (*Hemileia vastatrix*).

Departamento académico responsable: Escuela de Agronomía

Otras escuelas participantes: Escuela de Biología (UCR)

Instituciones participantes externas al ITCR: UCR

Investigador coordinador: Fabián Echeverría Beirute, PhD.

Investigadores colaboradores*: Andrés Gatica Arias, PhD.

Período de ejecución: enero 2019- junio 2022 (incluyendo ampliación).

2 Resumen

La roya del café es la principal enfermedad que afecta la producción mundial del café. La más reciente pandemia en el 2012-2013 en América Central, ocasionó pérdidas estimadas en \$500 millones, debido a la reducción en un promedio del 17% con respecto a periodos anteriores. En Costa Rica, la alta temperatura especialmente de noche y la falta de adecuada fertilización debido a los altos costos, fueron las causas más probables del aumento en la severidad de la enfermedad. Debido a que el café es uno de los cultivos principales en Costa Rica y es hasta el momento en su totalidad del tipo arábigo (*Coffea arabica*) considerado entre los mejores del mundo, vulnerabiliza al país ante enfermedades como la roya, especialmente en épocas más calientes y con bajos precios de compra en el mercado internacional como los actuales.

La incorporación de genes que confieran características específicas de interés agronómico al genoma de las variedades comerciales de café mediante mejoramiento genético convencional, es un proceso largo y difícil de lograr, debido al prolongado ciclo de vida de las especies perennes, la heterogeneidad y extenso período de evaluación requerido. Al contrario, la alta abundancia, capacidad de transferencia de los factores de virulencia, mutaciones y ciclos cortos por parte del hongo *Hemileia vastatrix*, posibilita la aparición de diversidad patogénica que fácilmente sobrepasan las barreras genéticas de su hospedero café. Debido a ello, el desarrollo de nuevas técnicas para el mejoramiento tradicional, así como no tradicional, deben ser exploradas, validadas y continuamente mejoradas.

En el caso de *Coffea arabica*, los esfuerzos de mejoramiento genético se han enfocado a la hibridación, selección genealógica y selección por cruces y retrocruces interespecíficos, con el fin de transferir factores de resistencia a enfermedades y plagas, mejorar la adaptación y el rendimiento del cultivo. Además, en el mejoramiento genético convencional de café se ha utilizado la introducción y selección de plantas, cruces artificiales con parentales seleccionados, ensayos de mutagénesis y radiación en semillas.

A pesar de los esfuerzos por generar alternativas a los productores, los cultivares o no son obtenidos oportunamente, no cumplen con los perfiles de calidad de bebida y/o rendimiento, o pierden rápidamente la resistencia hacia la roya. Caso más reciente es la variedad Costa Rica 95, la cual en este año 2019, reveló la pérdida de su resistencia ante la roya. El Obata, Topazio y otras variedades en Brasil, también han sido reportadas.

El problema por ende que se desea resolver en la presente propuesta, es el encontrar mayores recursos genéticos con tolerancia a la roya, sea en colecciones, variedades ya liberadas, o materiales en desarrollo, tanto a nivel nacional como internacional.

Palabras clave: mutantes, café arábigo, mejoramiento, roya, innovación.

3 Introducción

La incorporación de genes que confieran características específicas de interés agronómico al genoma de las variedades comerciales de café mediante mejoramiento genético convencional, es un proceso largo y difícil de lograr, debido al prolongado ciclo de vida de las especies perennes, la heterogeneidad y al extenso período de evaluación requerido (Carneiro 1999). Al contrario, la alta abundancia, capacidad de transferencia de los factores de virulencia, mutaciones y ciclos cortos por parte del hongo *Hemileia vastatrix*, posibilita la aparición de diversidad patogénica que fácilmente sobrepasan las barreras genéticas de su hospedero café (Nuno et al. 2018). Debido a ello, el desarrollo de nuevas técnicas para el mejoramiento tradicional así como no tradicional, deben ser exploradas, validadas y continuamente mejoradas.

El sector cafetalero costarricense ha enfrentado una serie de problemas, tales como los efectos causados por enfermedades fúngicas (la roya), el cambio climático, los bajos precios internacionales del grano y la antigüedad de los cafetales. Por ende, la sostenibilidad y rentabilidad de la producción de café es un problema creciente. Asimismo, el café Arábica se caracteriza por las limitaciones que enfrentan los programas de mejoramiento genético debido a la escasez de diversidad de recursos genéticos o materiales promisorios.

Debido a que el café es uno de los cultivos principales en Costa Rica y es hasta el momento en su totalidad del tipo arábigo (*Coffea arabica*) considerado entre los mejores del mundo (Jiménez 2013; Mora 2008, citado por Vargas 2016), vulneraría al país ante enfermedades como la roya, especialmente en épocas más calientes y con bajos precios de compra en el mercado internacional como los actuales (Ramírez-Rojas, 2017). Evidencia de ello, recientemente el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y el Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE) indicaron que el 40% de la cosecha de café 2018-2019 de los cantones de Pérez Zeledón, Coto Brus y Turrialba están bajo la amenaza de la roya.

Así, esta propuesta se origina con la necesidad de contar en Costa Rica con nuevas alternativas de resistencia genéticas para el control de la roya. Debido a que el mejoramiento genético de los cultivos se basa en la búsqueda constante de nuevas fuentes de germoplasma que permitan la generación de variedades que se adapten progresivamente mejor a futuras condiciones naturales o de manejo del cultivo, la presente propuesta pretende: A) evaluar en campo diferentes fuentes de resistencia a la roya en bancos de germoplasma de *Coffea* sp., material experimental o mutaciones espontáneas; B) caracterizar las poblaciones actuales de roya y condiciones que posiblemente han predispuesto su variabilidad; y C) evaluar en ambiente controlado diferentes cultivares, accesiones promisorias y mutantes desarrollados por la Universidad de Costa Rica ante todos los posibles biotipos/razas de roya presentes en el país en procura de predecir cuál (es) genotipo(s) podrían ser empleados a futuro en un programa de mejoramiento genético.

4 Marco Teórico

El género *Coffea* fue propuesto en 1735 por Linnaeus, quien también describió la especie *Coffea arabica* en 1753 (Sondahl y Lauritis 1992 citados por Solano 2001). El café pertenece a la familia Rubiaceae, en la cual se han identificado dos géneros: *Coffea* y *Psilanthus*. El género *Coffea* incluye aproximadamente ciento veinte y tres especies, no obstante, cuatro de estas se mencionan como cultivadas comercialmente, destacándose las dos primeras que abarcan casi el 100% de la producción mundial según el siguiente orden: *C. arabica* (~60%), *C. canephora* (~40%), *C. liberica* y *C. dewevrei* (Talhinhas et al. 2017; Alvarado y Rojas 1998; León 2000).

Las plantaciones de *C. arabica* son apreciadas por su alta calidad, mientras que las otras especies, en especial *C. canephora*, han sido principalmente utilizadas como fuentes de genes de resistencia a factores bióticos, así como tolerancia a factores abióticos. Las variedades de *C. arabica* tienen una base genética muy estrecha debido al carácter autógamo y tetraploide ($2n=4x=44$), y por ende, son más susceptibles a diferentes plagas y enfermedades que la especie *C. canephora*, la cual es una especie alógama y por consecuencia presenta mayor variabilidad genética (Berthouly y Etienne 1999).

Diferentes enfermedades y plagas afectan al café, tales como la roya (*Hemileia vastatrix*), la antracnosis de los frutos (*Colletotrichum coffeanum* y *C. kahawae*), la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), nematodos (*Meloidogyne exigua*, *M. incognita*, *M. coffeicola*, *Pratylenchus brachyurus*, y *P. coffeae*), ojo de gallo (*Mycena citricolor*) y el minador de las hojas (*Perileucoptera coffeella*) (Berthouly y Etienne, 1999).

La roya del café es la principal enfermedad que afecta la producción mundial. La más reciente pandemia en el 2012-2013 en América Central, ocasionó pérdidas estimadas en \$500 millones, debido a la reducción en un promedio del 17% con respecto a periodos anteriores (FAO 2013). En Costa Rica, la alta temperatura especialmente de noche y la falta de adecuada fertilización debido a los altos costos, fueron las causas más probables del aumento en la severidad de la enfermedad (Barquero-Miranda 2013).

En el caso de *C. arabica* los esfuerzos de mejoramiento genético se han enfocado a la hibridación, selección genealógica y selección por cruces y retrocruces interespecíficos, con el fin de transferir factores de resistencia a enfermedades y plagas, mejorar la adaptación y el rendimiento del cultivo. Además, en el mejoramiento genético convencional de café se ha utilizado la introducción y selección de plantas, cruces artificiales con parentales seleccionados, ensayos de mutagénesis y radiación en semillas (Berthouly 1997; Solano 2001).

Desde los años 50's, el mejoramiento tradicional ha sido empleado a nivel mundial. Es así como el híbrido Timor (*C. arabica* x *C. canephora*) ha sido ampliamente utilizado por su resistencia a *Hemileia vastatrix* derivada de 4 genes mayores de resistencia completa de *C. canephora*. De esta manera, el cruce entre el híbrido Timor con variedades de *C. arabica* comercialmente utilizados, llevó al desarrollo de variedades como Costa Rica 95, Tupi, Obata, Catigua, Topazio, entre otros a nivel mundial. También desde 1991 en Centroamérica se desarrolla un programa de mejoramiento genético convencional de café, en el cual participan varias instituciones tales como PROMECAFE, los Institutos de Café de los países centroamericanos, instituciones nacionales de investigación en café, la cooperación francesa (CIRAD, ORSTOM, MAE) y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Dicho programa tuvo como finalidad cruzar variedades tradicionales de América Latina con individuos silvestres de Etiopía y Sudán, para recuperar una fuente de variabilidad y posteriormente propagar a gran escala los híbridos F1 de *C. arabica* obtenidos. A pesar de los esfuerzos por generar alternativas a los productores, los cultivares o no son obtenidos oportunamente, no cumplen con los perfiles de calidad de bebida/yo rendimiento, o pierden rápidamente la resistencia hacia la roya.

Parte de la problemática relacionada con la resistencia ante la roya, está dada por la diversidad genética de la roya y su huésped. De las más de 50 razas fisiológicas de roya hasta el momento encontradas, son 9 los genes de resistencia que se han encontrado en el huésped (*Coffea* sp). Por ejemplo, previo al 2012, se pensaba que en Costa Rica sólo existía la raza fisiológica II de roya, sin embargo, el ICAFE en conjunto con el Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), encontraron dos nuevas razas: XXIV (v2, v4 y v5) y XXXVI (v2, v4, v5, y v8). En Brasil, se han reportado más de 15 razas (Talhinhas et al. 2017), mientras en Perú y Colombia se reportan principalmente dos: II y XXII (Quispe et al. 2017). Se presume que la amplia distribución de hospederos con genes mayores de resistencia completa, son la causa del desarrollo de nuevas razas fisiológicas de la roya, y por ende, el descubrimiento de alternativas para la resistencia genética incompleta es indispensable.

Muchos otros cultivos además del café, han procurado el desarrollo de resistencias más duraderas, mediante la exploración de fuentes genéticas alternativas como los genes de resistencia de no-huéspedes o múltiples genes con resistencia parcial (Krattinger et al 2015). Dicha estrategia se visualiza como la mejor estrategia a largo plazo. Para ello, encontrar fuentes de resistencia parcial o incompleta, piramidar en diferentes genotipos y rotar los genes, son las tres estrategias que el mejoramiento genético puede aportar una vez descubiertas las diferentes fuentes de genes (Mundt 2014).

5 Materiales y Métodos

Objetivo específico 1: Identificar en campo diferentes genotipos con posible resistencia completa o incompleta hacia la roya.

Ubicación y material de estudio: se contactará al personal encargado de la colección del CATIE, extensionistas del MAG, así como los ingenieros extensionistas e investigadores de las diferentes sedes del ICAFE, y generará una lista sobre sitios con posible diversidad/mezcla de genotipos de café, así como alta/baja afectación de la roya. Se procurará de realizar al menos una gira de campo confirmatoria en el 2019 y 2020 a cada sitio, para valorar la identidad del/los genotipos(s) y características agronómicas, en miras de obtener/solicitar material propagativo para establecer como parte de este proyecto.

En campo, se valorará durante la época de mayor esporulación (época más seca según sitio de colecta), la presencia de lesiones y esporulación y anotará el grado de severidad de acuerdo con Capucho et al 2011 (Figura 1). Con base en los resultados, se procurará en el 2019 obtener material reproductivo para evaluar lo propuesto en el Objetivo específico 3 durante el 2020.

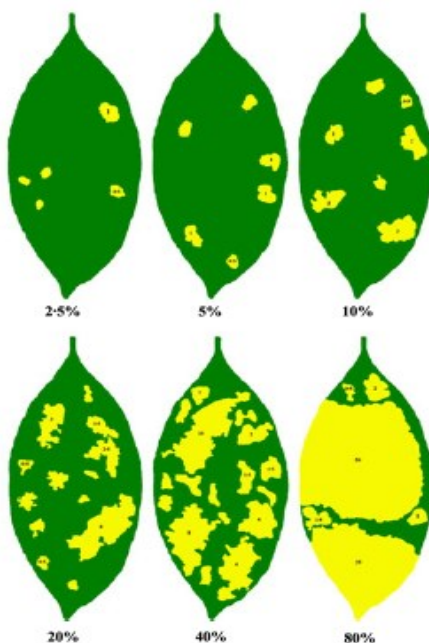


Figura 1. Escala estándar del área de la severidad de la roya (*H. vastatrix*) del café (*Coffea spp.*). Capucho *et al.* 2011.

Objetivo específico 2: Caracterizar molecularmente la diversidad genética de los aislamientos de la roya del café (*Hemileia vastratrix*) según condición agroclimática, hospedero y fenología de la planta.

En esta etapa, las actividades de biología molecular serán realizadas en las instalaciones de la UCR-Montes de Oca.

Ubicación y material de estudio: la colecta de las uredósporas se llevará a cabo en las 8 regiones cafetaleras indicadas por el ICAFE (Valle Central, Tres Ríos, Turrialba, Brunca, Guanacaste, Tarrazú, Orosí y Valle Occidental) de acuerdo a los sitios/fincas donde predomine la presión de inóculo de la roya y diferentes cultivares/hospederos. Se estima la colecta de uredósporas de entre 10-15 sitios por región cafetalera. Se recolectarán las uredósporas de lesiones del envés de las hojas con síntomas visibles, raspando con el tubo de microcentrífuga. Se tomarán cuantas hojas y plantas de la misma edad y genotipo posible por sitio de muestreo, hasta completar la colecta de al menos el equivalente a 1 ml de uredósporas. La recolección de material se llevará a cabo por duplicados, la primera en el 2019 y la segunda en el 2020. Una hoja de registro donde se indique las coordenadas GPS, elevación, ubicación distrital, condición agro-climática, manejo, edad del cultivo, variedad y porcentaje de distribución, entre otros datos, se mantiene vinculada al consecutivo de cada muestra.

Los aislamientos se llevarán dentro de una bolsa plástica adecuadamente rotulada al Laboratorio de Fitopatología de la UCR. Posteriormente cada aislamiento será repartido en tres tubos de microcentrífuga: una para almacenamiento, otra para las pruebas moleculares, y otra para las pruebas de inoculación. Las muestras para análisis moleculares serán llevadas al Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Escuela de Biología de la UCR.

Extracción de ADN genómico y MSLA (Multilocus Sequence Analysis): para el protocolo de extracción de ADN se utilizará el método CTAB (Trout et al. 1999). El ADN total extraído, se amplificará por PCR utilizando cebadores específicos ITS y SRAP (Kosaraju et al. 2017; Nuno et al. 2018). Todas las reacciones de PCR se llevarán a cabo en volúmenes de 25 L con los marcadores seleccionados. Las reacciones y las condiciones de los ciclos se llevarán a cabo en un termociclador automatizado [GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems)].

Secuenciación de ADN: la secuenciación del ADN se realizará en un secuenciador automático ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) según el método de terminadores didesoxi marcados por el método Sanger (1997), con la utilización de oligonucleótidos específicos; según métodos de la empresa Macrogen Inc., Seoul, Korea (www.macrogen.com) o BGI, China (www.bgi.com).

Análisis de los datos: las secuencias de las cadenas se reunirán utilizando el programa MEGA, Muscle y ClustalXver. Las pruebas con Máxima Parsimonia (MP), así como la

máxima probabilidad de (ML) y neighbor-joining (NJ), serán utilizadas para estimar los árboles filogenéticos y evaluar la variabilidad genética existente.

Selección de aislamientos más diversos: los aislamientos con mayor distanciamiento genético, serán mezclados en el laboratorio y reproducidos en el ITCR-Sede San Carlos, usando una planta de café altamente susceptible y cuarentenada. Dicha muestra será utilizada paralelamente al estudio de patogenicidad (Objetivo específico 3) para estudios de hospedero-patógeno en las plantas. A su vez, muestreos posteriores en las mismas regiones de donde fueron obtenidos permitirán aumentar la cantidad de aislamientos con mayores diferencias genéticas.

Objetivo específico 3: Evaluar la patogenicidad de una muestra compuesta de los aislamientos en diferentes hospederos de café con potencial uso comercial.

En esta etapa, las actividades serán realizadas en las instalaciones del ITCR-San Carlos.

Colecta/preparación de semillas: con base a lo identificado en el Objetivo 1, así como material F2 proveniente de los híbridos F1 liberados por el programa PROMECAFE-CATIE-ICAFE, y una población de M2 obtenidos a través de mutagénesis, junto con semilla de cultivares testigos de Catuai Rojo (susceptible), Obata (resistencia parcial), y Catigua MG2 (resistencia completa), se colectará semilla (300-600 semillas) obtenida de la autofecundación de cada genotipo, procesará en microbeneficio o manualmente, secará lentamente para evitar pérdida de la viabilidad, y dejará reposar por no más de un mes. Durante su reposo, se procederá a preparar las bolsas para sembrar un almácigo de 150-200 plantas/genotipo, para un máximo aproximado de 6.000 plantas. Las semillas podrán ser almacenadas en cámara fría (-15°C) durante más de un mes en caso de aquellas semillas obtenidas antes de tiempo hasta completar la totalidad de accesiones para establecimiento de los almácigos. A pesar que pueden existir muchos más genotipos con potencial niveles de resistencia, sólo entre 20 y 30 diferentes genotipos podrán ser evaluados.

Preparación de almácigos y manejo: se procederá a preparar el llenado de bolsas según las recomendaciones del ICAFE (2011). Se utilizarán bolsas de 15.2 x 20.32 cm y un sustrato de 50% suelo, 25% compost orgánico, y 25% de granza de arroz posteriormente esterilizado. Se dispondrá todo el almacigal en los ambientes controlados (>25°C, >80% HR), donde se manejará de acuerdo al manejo técnico, evitando la aplicación de fungicidas. El almácigo posterior a los 4 meses de establecimiento, permitiría la colecta de hojas de cada planta para el estudio de patogenicidad.

Efecto de la roya en hojas: en cámaras húmedas diseñadas en casa, se dispondrán 2-4 hojas por genotipo a comparar, además de los tres testigos comerciales, e inocularán con 0.25 ml de una suspensión con gotero. Se preparará la suspensión de esporas a partir de la incubación de uredosporas en agua destilada con Tween 20 al 0,05% como agente tensoactivo durante 20 minutos con una concentración de 1 mg de urediniosporas por 1,0 mL, el cual se aplicará

en el envés de cada hoja al aplicar 8 gotas de la suspensión agua (Granados 2015; Rozo y Cristancho 2010; Escobar y Cristancho 2007). Una vez inoculadas las hojas deben ser colocadas dentro de bandejas en las cámaras húmedas, mantener en la oscuridad por 48h y después se deben someter a un fotoperíodo de 12/12 a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad relativa de 65% (Roza y Cristancho 2010).

La solución de uredosporas provendrán primero de las diferentes plantaciones aisladas previamente (Objetivo específico 2), y posteriormente de las seleccionadas por ser genéticamente más distantes, conforme se vayan discriminando entre genotipos susceptibles y parciales o completamente resistentes.

La germinación del inóculo previamente será validado al colocar las uredosporas de roya en placas Petri con el medio agar agua al 2%, con una distribución homogénea. Posteriormente las placas se colocarán en la oscuridad a una temperatura de 22°C durante 12-13 h y contarán las uredosporas germinadas y no germinadas. Se seleccionarán cinco campos ópticos en el microscopio a 10X y se realizará el conteo. Se determinará el conteo según la siguiente fórmula:

$$\%Germinación = Ugx 100/Ut$$

Donde Ug y Ut corresponden a la cantidad de uredosporas germinadas y totales respectivamente. Donde se considera como adecuada una germinación superior al 30% (Granados 2015).

Evaluación de la severidad de la enfermedad: la medición de la severidad se basará en la escala de la roya desarrollada por Capucho et al. 2011 (Figura 1) y/o la escala de Eskes basada en grados de avance de la enfermedad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de la escala de Eskes para el desarrollo de roya en café (Roza y Cristancho 2010).

Grado de la escala	Descripción
0	Ausencia de lesión
1	Aparición de clorosis
2	Aumento en superficie de la clorosis
3	Tendencia de las lesiones a coalescer e intensificación de la decoloración
4	Aparición de las primeras esporas
5	Esporulación inferior al 25% de la lesión
6	Esporulación entre 25-50% de la lesión
7	Esporulación mayor al 50% de la lesión

Únicamente para el caso de las plantas M2 sometidas a mutagénesis, se realizará una primera selección de plantas en campo, de las cuales se procederá posteriormente a autofecundar para en el 2020, emplear sus poblaciones de semilla derivadas (M3), e incluir dentro de las evaluaciones de los demás materiales genéticos.

6 Resultados

Objetivo 1. Identificar en campo diferentes genotipos con posible resistencia completa o incompleta hacia la roya.

Se contactó a investigadores del CATIE, ICAFE y cooperativas, sobre campos de cultivo de café con poco o nula presencia de roya que pueda ser debida al componente genético.

Se visitaron al menos 15 campos de cultivo café con diferentes variedades, accesiones o especies donde se procedió a coleccionar las muestras de hojas infectadas. En el Cuadro 2 y la Figura 2, se resumen los sitios de colecta.

Cuadro2. Resumen de las localidades y sitios de colecta de roya. **Fuente:** TFG del estudiante Juan Miguel Zúñiga.

R02	2/7/2019	Coto Brus		San Marcos, Sabalito	Compañía Agrícola Río Brus
R03	2/7/2019	Coto Brus		La Esperanza, Sabalito	CATTICA
R04	2/7/2019	Coto Brus		San Francisco, Sabalito	Erick López
R06	2/7/2019	Coto Brus		Kamakiri de Pittier	Roger Naranjo
R08	3/7/2019	Pérez Zeledón		La Guaria, San Pedro	Edgar Cordero
R10	3/7/2019	Pérez Zeledón		San Rafael, San Pedro	Cruz Vargas
R11	9/7/2019	Pérez Zeledón		Cajón	Finca Monte box El Pilar
R13	9/7/2019	Pérez Zeledón		General Viejo (La Arepa)	Florita Mata
R20	17/7/2019	Turrialba		Cimarrón, Santa Teresita	Alexis Vega Brenes
R21	17/7/2019	Turrialba		La Suiza, Canadá, Pueblo Nuevo	Condominio Pueblo Real
R23	17/7/2019	Turrialba		Santa Teresita, Dulce Nombre	Manuel Aguilar Araya
R33	2/10/2019	Valle Central	1	Calle Solís	Teresita Murillo
R37	2/10/2019	Valle Central	1	El Sitio	Franklin Madrigal Chacón
R38	2/10/2019	Valle Central	1	Puente Salas	La Amada
R40	9/10/2019	Valle Occidental	1	San José, Grecia	Carlos Salazar
R41	9/10/2019	Valle Occidental	1	San Miguel, Naranjo	Francisco Ramirez
R47	15/10/2019	Coto Brus	2	Piedra Candela, Sabalito	El Arrempujón
R54	16/10/2019	Pérez Zeledón	2	La Palmira, San Isidro	Bonita
R55	16/10/2019	Pérez Zeledón	2	Pueblo Nuevo, Rivas	Ricardo Cordero
R57	16/10/2019	Pérez Zeledón	2	General Viejo (La Arepa)	Florita Mata
R61	22/10/2019	Los Santos	1	San Juan Sur, Corralillo, Cartago	Saúl Ureña

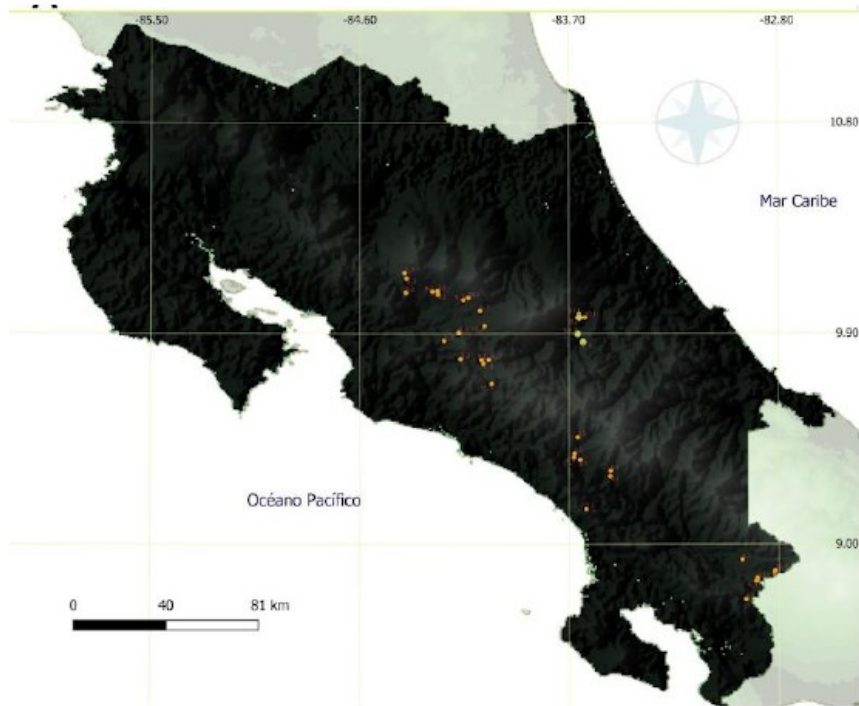


Figura 2. Sitios georreferenciados de las colectas de muestras de roya. **Fuente:** TFG del estudiante Juan Miguel Zúñiga.

Objetivo 2. Caracterizar molecularmente la diversidad genética de los aislamientos de la roya del café (*Hemileia vastratrix*) según condición agroclimática, hospedero y fenología de la planta.

Se colectó material propagativo y uredosporas de roya, en los sitios identificados previamente. Se realizó la evaluación de tres protocolos de extracción del ADN a partir de las uredosporas colectadas según la metodología antes descritas (Figura 3). Según las comparativas, la extracción de ADN varió en cantidad y calidad, siendo más homogéneo utilizando el protocolo número 3.

Se determinó la variabilidad genética de la roya mediante los marcadores moleculares ITS1 y se correlacionaron algunas variables morfológicas de las uredosporas de la roya con variables climáticas de los diferentes sitios de colecta (Figura 4). Se observó una tendencia de distribución genética según localidades o condiciones climáticas, las cuales, podrían ser validadas en futuros estudios para comprender si el clima o la localidad, son determinantes en la existencia de la distribución de genotipos diferentes de las muestras de roya, o bien, lo es el factor genético del huésped es el de mayor efecto.

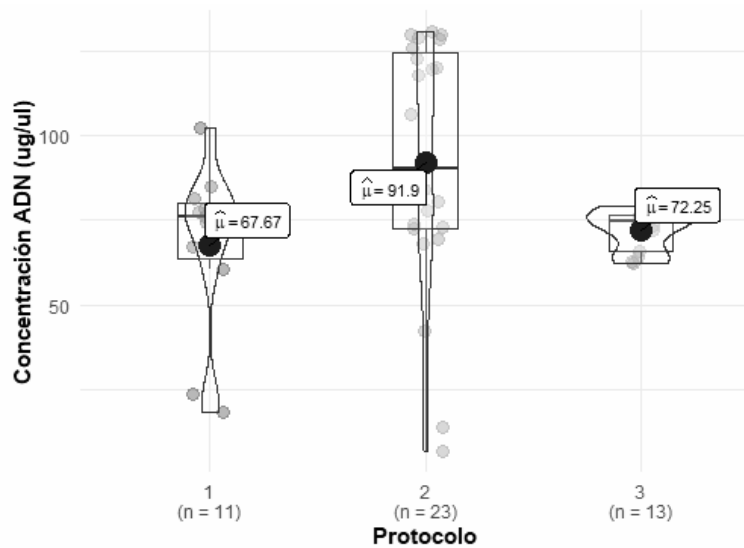


Figura 3. Concentración de ADN obtenido en muestras de uredosporas de roya mediante 3 distintos protocolos, 1=Cristancho *et al.* 2014, 2=Kosaraju *et al.* 2017, 3= kit de extracción de ADN de suelos (FastDNA™ Spin Kit for soil de MP, www.mpbio.com). χ^2 Kruskal-Wallis(2)= 6.28, $p=0.043$. **Fuente:** TFG del estudiante Juan Miguel Zúñiga.

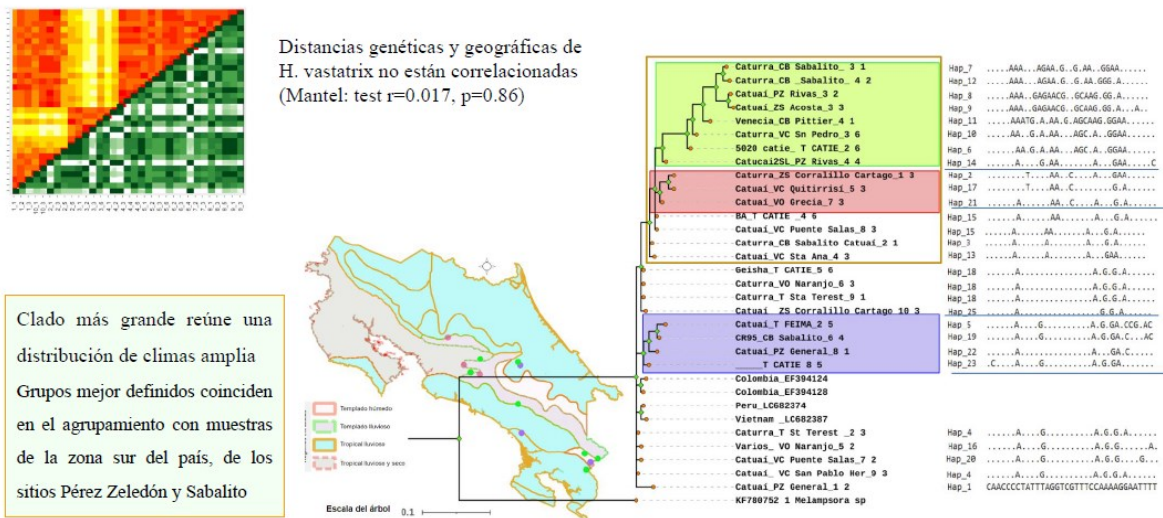


Figura 4. Relación entre la diversidad genética y geográfica de la roya del café determinada en el presente estudio. **Fuente:** TFG del estudiante Juan Miguel Zúñiga.

Objetivo 3. Evaluar la patogenicidad de una muestra compuesta de los aislamientos en diferentes hospederos de café con potencial uso comercial.

La colecta de muestras de uredosporas de roya, permitió la evaluación de diferentes genotipos huésped (mutantes y comerciales). Mediante una solución de trabajo, se inocularon las plantas bajo condiciones controladas y evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad (Figura 5).

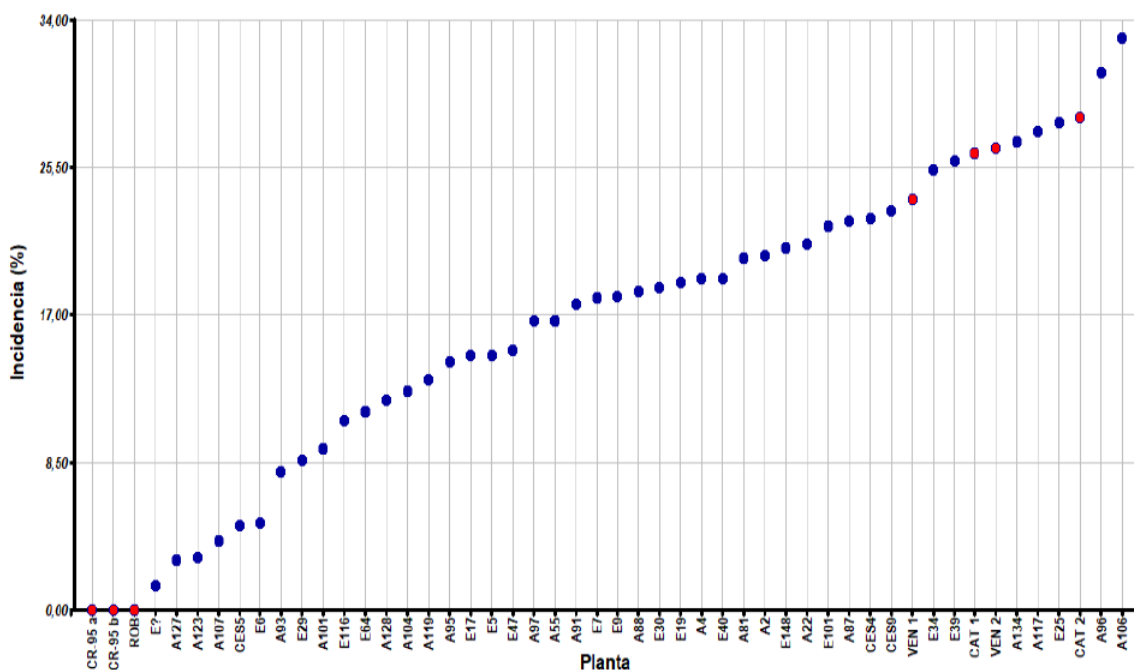


Figura 5. Porcentaje de incidencia de roya en discos foliares durante siete evaluaciones, en plantas de café M1 tratadas con azida de sodio (color azul) y testigos (color rojo). **Fuente:** TFG del estudiante José Andrés Rojas

Según los resultados, la presencia de plantas con diferentes niveles de tolerancia a la enfermedad fue posible de identificar, encontrando que algunas mutantes de café susceptible, presentaron algunos niveles de tolerancia o hasta resistencia (Figura 6).

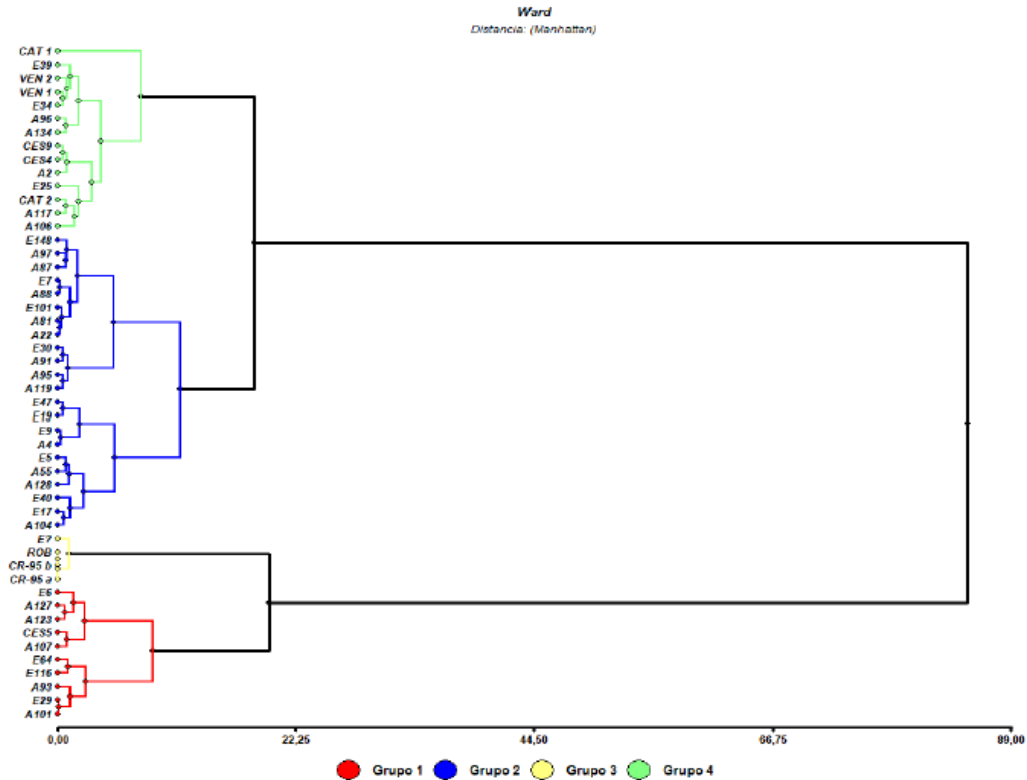


Figura 6. Dendrograma para la agrupación de plantas de café M1 y testigos, de acuerdo con el porcentaje de incidencia, severidad, periodo incubación y latencia de ante el hongo de la roya *Hemileia vastatrix*. **Fuente:** TFG del estudiante José Andrés Rojas

7 Conclusiones

- Se lograron aislar veinte aislamientos de roya de 6 localidades cafetaleras del país.
- Se obtuvo un protocolo optimizado para la extracción de ADN a partir de uredosporas de roya.
- Se obtuvo un protocolo de amplificación de las secuencias del ITS del hongo.
- Se logró la determinación de la diversidad genética de los aislamientos de roya colectados en el país mediante la amplificación de las secuencias del ITS.
- Se analizó la incidencia y severidad de la enfermedad provocada por la roya de café en plántulas de variedades comerciales (Catuaí, Caturra, CR-95, Venecia) y plantas mutantes M2 de la variedad Catuaí.

- Se logró obtener una metodología para evaluar la incidencia y severidad de la roya en el café bajo condiciones controladas.
- Se logró establecer una pequeña colección de materiales en campo, para futuros estudios, tanto de grado como posgrado.

8 Recomendaciones

- Evaluar en futuros ensayos la interacción causa-efecto de las variables clima, genotipo de huésped o localidad, en la presencia de diversidad de roya.
- Validar progenies M2 con diferentes niveles de resistencia ante la roya.

9 Referencias

- Alvarado, M y Rojas, G. 1998. El cultivo y beneficiado del café. San José, C.R. EUNED. 184 p.
- Capucho AS., Zambolim L., Duarte HSS. Vaz GRO. 2011. Development and validation of a standard área diagram set to estimate severity of leaf rust in Coffea Arabica and C. canephora. *Plant Pathology* (60). 1144-1150 pp.
- Escobar C., Cristancho MA. 2007. Estudio de metodologías para la conservación de urediniosporas de la roya del cafeto. *Cenicafé*. 58 (4): 324-332.
- FAO. 2013. FAO collaborates in fight against coffee rust disease in Central America (en línea). Consultado 29 de junio del 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/archive/from-the-field/detail/en/c/201817/>
- ICAFFE. 2011. Guía técnica para el cultivo del café. ICAFFE, Costa Rica, Heredia. 72 p.
- ICO (International Coffee Organization). 2013. Total production of exporting countries: crop years 2007-2012 (en línea). Consultado 11 marzo 2013. Disponible en: <http://www.ico.org/prices/po.htm>
- Kosaraju et al. 2017. Assessment of genetic diversity of coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* using SRAP markers. *Journal of Phytopathology*. 165:486–493.
- Krattinger, S. G., Sucher, J. , Selter, L. L., Chauhan, H. , Zhou, B. , Tang, M. , Upadhyaya, N. M., Mieulet, D. , Guiderdoni, E. , Weidenbach, D. , Schaffrath, U. , Lagudah, E. S. and Keller, B. 2016. The wheat durable, multipathogen resistance gene Lr34 confers partial blast resistance in rice. *Plant Biotechnol J*, 14: 1261-1268. doi:10.1111/pbi.12491

- Mundt, C. C. 2014. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution*. Volume 27. 446-455. ISSN 1567-1348. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.011>.
- NUNO S et al. (2018) Population genomic footprints of host adaptation, introgression and recombination in coffee leaf rust. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* (2018) 19(7) , 1742–1753
- Ramírez Rojas J (2017) Investigación para la adaptación del cafeto al cambio climático ¿Qué trabajos prioritarios están pendientes de realizar? *Comunicaciones Técnicas de Café*. Número 81. Disponible en <http://www.ramirezcaficulturadesdecostarica.com/ct-81>
- Rozo YI., Cristancho MA. 2010. Evaluación de la susceptibilidad de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., a fungicidas del grupo de los triazoles. *Cenicafé*. 61 (4): 297-314.
- Solano, W. 2001. Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en biorreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de *Coffea arabica* por embriogénesis somática. Tesis Licenciatura en Ingeniería en Agronomía con énfasis en Fitotecnia. Turrialba, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 87 p.
- Talhinhas, P. , Batista, D. , Diniz, I. , Vieira, A. , Silva, D. N., Loureiro, A. , Tavares, S. , Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimarães, L. , Várzea, V. and Silva, M. d. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18: 1039-1051. doi:10.1111/mpp.12512
- Vargas C. 2016. Generación de un protocolo para inducir variantes genéticas en café (*Coffea arabica* L.) mediante inducción de mutaciones con el uso de agentes químicos. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica.
- Carneiro, M.F. 1993. Induction of double haploids on *Coffea arabica* cultivars via anther or isolated microspores culture. 15th International Scientific Colloquium on Coffee. Montpellier, France. ASIC. p 133.
- Carneiro, M.F. 1997. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica*. 96: 167-172.
- Carneiro, M.F. 1999. Advances in coffee biotechnology. *AgBiotechNet*. 1: 1-7.
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3ª ed. San José, C. R. IICA. p 350-364.
- Barquero-Miranda, M. 2013. Las variaciones climáticas en el incremento inusual de la roya del cafeto. *Revista Informativa*. ICAFE Junio. pp 1-7.

Jiménez A. 2013. El café en Costa Rica: gran modelador del costarricense. Editorial UCR. San Jose. Costa Rica.

Granados E. 2015. Evaluación de la incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en plantas de café bajo diferentes intensidades de sombra y estrategias de manejo. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. Turrialba. Costa Rica.

ICAFE. 2018. Productores (en línea). Consultado 23 abril 2018. Disponible en: <http://www.icafe.cr/nuestro-cafe/estructura-del-sector/>

Silva, D. N., Várzea, V. , Paulo, O. S. and Batista, D. 2018. Population genomic footprints of host adaptation, introgression and recombination in coffee leaf rust. *Molecular Plant Pathology*, 19: 1742-1753. doi:10.1111/mpp.12657