

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA  
BIOLÓGICAS**



**“DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE  
*Hemileia vastatrix* EN DOS ZONAS  
PRODUCTORAS DE CAFÉ DEL PERÚ”**

**Presentada por:**

**CINTHIA SHEILA QUISPE APAZA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE* EN CIENCIAS E INGENIERÍA  
BIOLÓGICAS**

**Lima – Perú**

**2023**

## Document Information

Analyzed document	TESIS_Doctorado_Cinthia Quispe Apaza_Final.pdf (D159734244)
Submitted	2/28/2023 9:51:00 PM
Submitted by	Rosa Espejo Joya
Submitter email	respejo@lamolina.edu.pe
Similarity	0%
Analysis address	respejo.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report



URL: [https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3532017/RMF\\_Vol\\_35\\_3\\_2017.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3532017/RMF_Vol_35_3_2017.pdf)  
Fetched: 10/21/2021 5:45:36 AM



8

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS "DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Hemileia vastatrix* EN DOS ZONAS PRODUCTORAS DE CAFÉ DEL PERÚ" Presentada por: CINTHIA SHEILA QUISPE APAZA TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS Lima – Perú 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO "Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional" Av. La Molina s/n La Molina, Lima – Perú 614 7800 anexos 209 – 200 / 614 7142 escuela@lamolina.edu.pe  
www.lamolina.edu.pe/posgrado ACTA DE SUSTENTACIÓN ASTD-EPG-UNALM: N° 20/2022 Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis presentada por la alumna CINTHIA SHEILA QUISPE APAZA, titulada: "

DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Hemileia vastatrix* EN DOS ZONAS PRODUCTORAS DE CAFÉ DEL PERÚ", para cumplir con uno de los requisitos para optar el grado académico de Doctor denominado Doctoris Philosophiae en CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo así como los conocimientos demostrados por la sustentante, el Jurado otorga el siguiente calificativo: JURADO CALIFICATIVO\* FIRMA Dra. Sandra Manrique Trujillo PRESIDENTE

..... Dr. Raúl Blas Sevillano MIEMBRO ..... Ph.D. Gretty Villena Chávez

MIEMBRO ..... Ph.D. Dina Lida Gutiérrez Reynoso MIEMBRO EXTERNO .....

..... Dra. Rosa Espejo Joya ASESOR ..... Siendo su calificativo final: ..... En consecuencia,

queda en condición de ser considerada APTA por el Consejo Universitario y recibir el grado académico de Doctoris Philosophiae (Ph.D.), de conformidad con lo estipulado en el Artículo 103º, inciso c) del Reglamento de la Escuela de Posgrado. La Molina, 14 de octubre del 2022 (\*) De acuerdo con el Artículo 102º de la Escuela de Posgrado, el calificativo de la sustentación será nominal: bueno, muy bueno o sobresaliente. El calificativo de sobresaliente deberá aplicarse solo si existe unanimidad. Sobresaliente Sobresaliente Sobresaliente Sobresaliente

La presente tesis se ha ejecutado en el marco del Proyecto N° 177 - 2015 - FONDECYT "Fortalecimiento de Programas de Doctorado en Universidades Peruanas"

DEDICATORIA Con mucho amor: A mis padres Ignacio Quispe Neyra y Yudy Elizabeth Apaza Olivera, a mi compañero de vida, mi hija y hermanos. En memoria de mi familia y amigos que se encuentran en el mundo espiritual.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**

**“DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL  
DE *Hemileia vastatrix* EN DOS ZONAS  
PRODUCTORAS DE CAFÉ DEL PERÚ”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR**

*Doctoris Philosophiae*

**Presentada por:**

**CINTHIA SHEILA QUISPE APAZA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dra. Sandra Manrique Trujillo  
**PRESIDENTE**

Dra. Rosa Espejo Joya  
**ASESOR**

Dr. Raúl Blas Sevillano  
**MIEMBRO**

Ph.D. Gretty Villena Chávez  
**MIEMBRO**

Ph.D. Dina Lida Gutiérrez Reynoso  
**MIEMBRO EXTERNO**

**La presente tesis se ha ejecutado en el marco del Proyecto  
N° 177 - 2015 - FONDECYT “Fortalecimiento de Programas de  
Doctorado en Universidades Peruanas”**

## **DEDICATORIA**

Con mucho amor:

A mis padres Ignacio Quispe Neyra y Yudy Elizabeth Apaza Olivera, a mi compañero de vida, mi hija y hermanos.

En memoria de mi familia y amigos que se encuentran en el mundo espiritual.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi eterna gratitud y reconocimiento:

A la Doctora Rosa Espejo asesora de la tesis por sus valiosos consejos y recomendaciones en el desarrollo y revisión de la presente tesis.

A los Doctores, Sandra Mabel Manrique Trujillo, Gretty Katherina Villena Chavez, Raul Humberto Blas Sevillano, Dina Lida Gutiérrez Reynoso, miembros del jurado, por la revisión de la tesis y sus sugerencias.

Al Doctor Giovanni Bernacchia de la Università degli Studi di Ferrara, por su valioso tiempo y sugerencias en la revisión del manuscrito.

A los profesores del Programa Doctoral de Ciencias e Ingeniería Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica - Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (CONCYTEC - FONDECYT) por el otorgamiento de la beca completa para realizar mis estudios de doctorado en el marco del proyecto N° 177 - 2015 - FONDECYT.

A los investigadores y estudiantes del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología, en especial al Dr. Roberto Mansilla por sus consejos.

A los agricultores de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica por permitirme con mucha amabilidad el muestreo, del material biológico, en sus fundos. A mi hermano Jhosep Quispe Apaza, por acompañarme en las actividades de campo.

# ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 LA ROYA AMARILLA DEL CAFÉ (<i>Hemileia vastatrix</i> BERK. &amp; BROOME) .</b>	<b>4</b>
2.1.1 Origen y distribución.....	6
2.1.2 Taxonomía de la roya amarilla del café .....	10
2.1.3 Ciclo de vida.....	12
2.1.4 Interacción entre <i>Hemileia vastatrix</i> y <i>Coffea arabica</i> .....	18
2.1.5 Sintomatología .....	19
2.1.6 Factores que influyen en la incidencia de la roya amarilla. ....	20
2.1.7 Variabilidad genética.....	25
<b>2.2 EVOLUCIÓN DE LOS PATÓGENOS DE PLANTAS .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 LA ROYA AMARILLA DEL CAFÉ (<i>Hemileia vastatrix</i>) EN EL PERÚ .....</b>	<b>31</b>
<b>2.4 ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS DEL ADN RIBOSOMAL (ITS - ADNr).....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE UNA POBLACIÓN .....</b>	<b>36</b>
2.5.1 Diversidad genética .....	36
2.5.2 Historia demográfica de una población.....	38
2.5.3 Estructura genética de una población.....	42
2.5.4 Flujo de genes.....	45
2.5.5 Inferencia filogenética intraespecífica.....	46
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2 UBICACIÓN DE LAS ZONAS DE MUESTREO .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 METODOLOGÍA .....</b>	<b>55</b>

3.3.1	Obtención de las secuencias de la región ITS - ADNr.....	55
3.3.1.1	Extracción, determinación de la calidad y cuantificación del ADN de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	55
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISIS DE DATOS.....</b>	<b>59</b>
3.4.1	Estudio de la diversidad genética y estructura poblacional de <i>Hemileia vastatrix</i> procedente de las zonas productoras de café de Quillabamba y Villa Rica muestreadas en los años 2014 y 2018.....	59
3.4.2	Análisis de la distribución de la variabilidad genética de <i>Hemileia vastatrix</i> en diferentes pisos altitudinales .....	64
3.4.3	Evaluación de las relaciones filogenéticas entre <i>Hemileia vastatrix</i> peruanas, colombianas, brasileras y del Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeiro .....	65
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LA REGIÓN ITS - ADNr.....</b>	<b>68</b>
4.1.1	Extracción, determinación de la calidad y cuantificación del ADN de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	68
4.1.2	Amplificación mediante PCR de la región ITS - ADNr y transformación de <i>E. coli</i> ....	69
<b>4.2</b>	<b>ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE <i>Hemileia vastatrix</i> PROCEDENTE DE LAS ZONAS PRODUCTORAS DE CAFÉ DE QUILLABAMBA Y VILLA RICA MUESTREADAS EN LOS AÑOS 2014 Y 2018.....</b>	<b>75</b>
4.2.1	Alineamiento y edición de secuencias.....	75
4.2.2	Diversidad genética .....	75
4.2.3	Historia demográfica .....	83
4.2.4	Estructura genética poblacional.....	89
4.2.5	Red haplotípica mediante el método de unión por la mediana.....	96
<b>4.3</b>	<b>DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>Hemileia vastatrix</i> EN DIFERENTES PISOS ALTITUDINALES .....</b>	<b>104</b>

<b>4.4 RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS POBLACIONES DE <i>Hemileia vastatrix</i> PERUANAS, COLOMBIANAS, BRASILERAS Y DEL CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DAS FERRUGENS DO CAFEEIRO.....</b>	<b>115</b>
4.4.1 Análisis filogenético mediante el método de la unión por la mediana (Median Joining).....	115
4.4.2 Análisis filogenético mediante Inferencia bayesiana .....	127
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>135</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>136</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>158</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Jerarquía del AMOVA para datos de un grupo de poblaciones.....	44
Cuadro 2: Información georreferenciada de los predios donde las hojas con uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> fueron muestreadas de plantas de café de las dos zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica .....	51
Cuadro 3: Lista de iniciadores.....	57
Cuadro 4: Información de los predios seleccionados por estar localizados entre los 1033-2076 m s. n. m., donde se muestrearon hojas infectadas con <i>Hemileia vastatrix</i> ..	64
Cuadro 5: Lista de poblaciones de <i>Hemileia vastatrix</i> que fueron utilizadas en el análisis de relaciones filogenéticas.....	66
Cuadro 6: Polimorfismo de secuencias de la región ITS-ADNr y diversidad genética de la población de <i>Hemileia vastatrix</i> agrupadas por áreas geográficas y años de colecta .	77
Cuadro 7: Valores hallados de los estimadores de neutralidad de la población de <i>Hemileia vastatrix</i> analizados por años de muestreo y origen geográfico .....	85
Cuadro 8: Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la población de <i>Hemileia vastatrix</i> estructurado en base al origen geográfico .....	91
Cuadro 9: Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la población de <i>Hemileia vastatrix</i> estructurado en base a los años de muestreo .....	92
Cuadro 10: Distribución regional y frecuencia de los haplotipos de <i>Hemileia vastatrix</i> generados a partir de las secuencias de la región ITS-ADNr.....	99
Cuadro 11: Lista de las principales variedades de café y área sembrada en porcentaje en los años 2014, 2016 y 2017 .....	102
Cuadro 12: Resultados del AMOVA mostrando los porcentajes de variación de los componentes de variancia, el índice de fijación (Fst) y su nivel de significancia .....	105

Cuadro 13: Distribución de haplotipos de <i>H. vastatrix</i> por altitudes de muestreo en las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica .....	113
Cuadro 14: Lista de las poblaciones de <i>Hemileia vastatrix</i> , con sus respectivas abreviaciones, utilizadas en el análisis de relaciones filogenéticas.....	116
Cuadro 15: Lista de haplotipos generados en base a 180 sitios polimórficos, distribución en los países productores de café y su frecuencia de ocurrencia.....	122

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> observadas en un microscopio electrónico de barrido.....	5
Figura 2. Distribución de <i>Hemileia vastatrix</i> a nivel mundial.....	8
Figura 3. Distribución de <i>Hemileia vastatrix</i> en Sudamérica.....	9
Figura 4. Árbol de máxima verosimilitud estimado de 378 conjuntos de datos genéticos de 32 taxones fúngicos usando RAxML .....	11
Figura 5. Teliosporas y uredinosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	13
Figura 6. Colonización de tejidos de la hoja por el hongo en interacciones compatibles (C) e incompatibles (I <sub>1</sub> y I <sub>2</sub> ) .....	16
Figura 7. Proceso de infección de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	17
Figura 8. Síntomas de la roya amarilla en plantas de café.....	20
Figura 9. Práctica de sombreado de cultivares de café de la zona cafetalera de Quillabamba .....	24
Figura 10. Principales variedades de café producidas a nivel nacional por área sembrada durante el año 2014 .....	32
Figura 11. Principales variedades de café producidas a nivel nacional por área sembrada durante el año 2016 .....	32
Figura 12. Principales variedades de café producidas a nivel nacional por área sembrada durante el año 2017 .....	33
Figura 13. Organización de los genes de ARN ribosomal (ARNr) en eucariotas .....	34
Figura 14. Localización en el mapa del Perú de los predios donde se recolectaron las hojas de café con roya amarilla .....	52

Figura 15. Delimitación de la zona productora de café de la Provincia de la Convención.....	53
Figura 16. Delimitación de la zona productora de café de Villa Rica.....	54
Figura 17. Estructuración en el espacio y tiempo de las poblaciones de <i>Hemileia vastatrix</i> para realizar el análisis de AMOVA .....	62
Figura 18. Gel de agarosa al uno por ciento mostrando fragmentos de ADN genómico de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	68
Figura 19. Gel de agarosa al dos por ciento mostrando los productos de PCR de 1100 pb amplificados con los iniciadores universales ITS en 16 bulks de ADN de <i>Hemileia vastatrix</i> ....	69
Figura 20. Gel de agarosa al 1.5 por ciento mostrando fragmentos de ADN del producto de amplificación de la región ITS - ADN <sub>r</sub> purificado a partir de gel .....	70
Figura 21. Placa con medio LB con ampicilina, IPTG y X-gal, mostrando la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) de color blanco y azul.....	71
Figura 22. Tubos conteniendo 5 mL de medio LB y ampicilina 100 µg/mL .....	72
Figura 23. Digestión in silico y geles de agarosa al 1.5 por ciento mostrando los fragmentos de ADN de aproximadamente 700 y 400 pb que corresponden a la región ITS cortada en un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Eco RI.....	74
Figura 24. Organización de la región ITS-ADN <sub>r</sub> de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	75
Figura 25. Porcentaje de incidencia de la roya amarilla del café durante los años 2013 al 2018.....	81
Figura 26. Porcentaje estimado de variedades de café en la Región Pasco y Cusco en los años 2014 y 2017.....	82
Figura 27. Distribución de diferencias pareadas (Mismatch Distribution) para todas las combinaciones por pares de 206 secuencias de la región ITS-ADN <sub>r</sub> de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	86

Figura 28. Bayesian skyline plot de los ITS - ADNr de <i>Hemileia vastatrix</i> del año 1980 al 2018.....	87
Figura 29. Bayesian skyline plot de los ITS-ADNr de <i>Hemileia vastatrix</i> del año 2007 al 2018.....	87
Figura 30. Número de grupos (clusters K) en relación al criterio de información bayesiano (BIC).....	93
Figura 31. Varianza acumulada explicada por el análisis de componentes principales (PCA).....	93
Figura 32. DAPC de 206 secuencias de la región ITS-ADNr de <i>H. vastatrix</i> .....	94
Figura 33. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 116 haplotipos detectados para la región ITS de <i>Hemileia vastatrix</i> de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica en los años 2014 y 2018. ....	98
Figura 34. Principales variedades de café y área sembrada en porcentaje a nivel nacional, en los años 2014, 2016 y 2017 .....	103
Figura 35. Datos climatológicos reportados por SENHAMI desde el año 1964 hasta el año 2014, para la zona cafetalera de Quillabamba.....	108
Figura 36. Datos climatológicos reportados por SENHAMI desde el año 1964 hasta el año 2014, para la zona cafetalera de Villa Rica. ....	109
Figura 37. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 66 haplotipos detectados para la región ITS de <i>H. vastatrix</i> de las zonas cafetaleras de Quillabamba Villa Rica, muestreadas a diferentes pisos altitudinales.....	112
Figura 38. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 174 haplotipos detectados para la región ITS de <i>Hemileia vastatrix</i> de las zonas cafetaleras de Perú, Brasil, Colombia y las del CIFC .....	121
Figura 39. Árbol filogenético no enraizado según el análisis de inferencia bayesiana de 116 haplotipos de la región ITS - ADNr de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	131

Figura 40. Árbol filogenético según el análisis de Inferencia bayesiana enraizado de 304 secuencias de la región ITS - ADNr de *Hemileia vastatrix* ..... 132

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de purificación de “QIAquick gel extracción Kit” de QIAGEN....	158
Anexo 2. Protocolo de transformación de <i>E. coli</i> .....	160
Anexo 3. Protocolo de purificación del Kit Wizard® SV Genomic DNA Purificación Kit de Promega.....	162
Anexo 4. Vista general del alineamiento de 206 secuencias de 918 pb de la región ITS - ADNr de <i>Hemileia vastatrix</i> procedente de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica .....	165
Anexo 5. Vista general del alineamiento de 303 secuencias (918 pb) de la región ITS - ADNr de <i>Hemileia vastatrix</i> procedentes de las zonas cafetaleras de Perú, Colombia, Brasil y del CIFC.....	166
Anexo 6. Vista general del alineamiento de 304 secuencias (918 pb) de la región ITS - ADNr de <i>Hemileia vastatrix</i> procedentes de las zonas cafetaleras de Perú, Colombia, Brasil y del CIFC.....	167
Anexo 7. Tamaño efectivo de muestreo (ESS) de cada parámetro .....	168
Anexo 8. Convergencia de las corridas 1 y 2 de las MCMC para el análisis de 206 secuencias de la región ITS - ADNr de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	169
Anexo 9. Quemado y mezcla de las cadenas de Montecarlo y Marcov para 206 secuencias de la región ITS - ADNr.....	169
ANEXO 10. Convergencia de las corridas 1 y 2 de las MCMC para el análisis de 116 haplotipos de la región ITS - ADNr de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	170
Anexo 11. Quemado y mezcla de las cadenas de Montecarlo y Marcov para 116 haplotipos de la región ITS - ADNr.....	170
Anexo 12. Valores de los índices de información de Akaike (AIC) y criterio de información bayesiano (BIC) para la selección del modelo de sustitución de nucleótidos.....	171

Anexo 13. Número óptimo de PCs utilizados para el DAPC basado en $\alpha$ -score function.....	172
Anexo 14. Distribución de los primeros 48 haplotipos en las zonas cafetaleras en los años 2014 y 2018.....	173
Anexo 15. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 65 haplotipos detectados para la región ITS de <i>Hemileia vastatrix</i> de la zona cafetalera de Quillabamba y Villa Rica muestreados en el año 2014.....	177
Anexo 16. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 56 haplotipos detectados para la región ITS de <i>Hemileia vastatrix</i> de la zona cafetalera de Quillabamba y Villa Rica muestreados el año 2018 .....	178
Anexo 17. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 67 haplotipos detectados para la región ITS de <i>Hemileia vastatrix</i> de la zona cafetalera de Quillabamba .....	179
Anexo 18. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 57 haplotipos detectados para la región ITS de <i>Hemileia vastatrix</i> de la zona cafetalera de Villa Rica.....	180

## RESUMEN

Estudios de genética poblacional se han realizado con la finalidad de analizar la diversidad genética y estructura poblacional de *Hemileia vastatrix* en dos zonas productoras de café en el Perú. Los análisis se efectuaron mediante secuenciación de los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal (ADNr – ITS) de *H. vastatrix* muestreadas en dos áreas cafetaleras en los años 2014 y 2018. La población de *H. vastatrix* mostró una alta diversidad de haplotipos ( $H_d = 0.9373 \pm 0.0115$ ) con una baja diversidad de nucleótidos ( $\pi = 0.00322 \pm 0.00018$ ). Asimismo, el AMOVA indicó que la población del hongo no se estructura por origen geográfico ni por años de muestreo ( $F_{ST} = 0.00180$ ;  $P = 0.20053$ ;  $F_{ST} = 0.00241$ ;  $P = 0.19693$ ). Adicionalmente, la red de haplotipos basada en el análisis filogenético intraespecífico de *H. vastatrix* utilizando secuencias peruanas y las del NCBI reveló que los haplotipos ancestrales peruanos, que se mantuvieron en el tiempo y espacio, corresponden a las secuencias reportadas de las razas II y XXII. Este resultado sugiere que no se han producido cambios sustanciales a lo largo del tiempo en la población peruana de *H. vastatrix*. El AMOVA de la distribución de la variabilidad genética del hongo a diferentes pisos altitudinales mostró que la población no está estructurada ( $F_{ST} = 0.00187$ ,  $P = 0.24340$ ). Esto sugiere que la población del patógeno no ha sufrido aún un proceso de adaptación con respecto a los factores climáticos. El análisis de la inferencia bayesiana mostró que el haplotipo Hap\_1 correspondería a la raza II de *H. vastatrix*, que arribó a Perú en 1979.

**Palabras claves:** Diversidad genética, *H. vastatrix*, historia demográfica, estructura poblacional.

## SUMMARY

Population genetic studies have been carried out in order to analyze the genetic diversity and population structure of *Hemileia vastatrix* in two coffee producing areas in Peru. These analyzes were performed by sequencing the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (rDNA -ITS) of *H. vastatrix* collected from two coffee growing areas in 2014 and 2018. *H. vastatrix* population showed high haplotype diversity ( $H_d = 0.9373 \pm 0.0115$ ) with a low nucleotide diversity ( $\pi = 0.00322 \pm 0.00018$ ). Likewise, AMOVA indicated that fungus population has behaved as a large population without structuring by geographical origin and sampling years ( $F_{ST} = 0.00180$ ;  $P = 0.20053$ ;  $F_{ST} = 0.00241$ ;  $P = 0.19693$ , respectively). Additionally, the haplotype network based on intraspecific phylogenetic analysis of *H. vastatrix* using Peruvian and NCBI sequences revealed that Peruvian ancestral haplotypes, which were maintained in time and space, correspond to the reported sequences of the races II and XXII. This result suggests that no substantial changes have occurred through time in Peruvian *H. vastatrix* population. The AMOVA of the distribution of the genetic variability of the fungus at different altitude levels showed that there is no structuring ( $F_{ST} = 0.00187$ ,  $P = 0.24340$ ). This would show that in the pathogen population there is not yet an adaptation process with respect to the climatic factors. The Bayesian inference analysis showed the Hap\_1 haplotype corresponds to the race II of *H. vastatrix*, which arrived to Peru in 1979.

**keywords:** Genetic diversity, *H. vastatrix*, demographic history, population structure.

## I. INTRODUCCIÓN

El hongo basidiomiceto *H. vastatrix*, es un patógeno obligado específico del género *Coffea* (*Coffea spp.*) (Bettencourt and Rodrigues 1988) y causa la enfermedad de la roya amarilla, la cual es considerada como una de las más devastadoras en este cultivo. Este patógeno afecta las hojas vivas y causa lesiones cloróticas en la superficie abaxial de las hojas, las cuales reducen el área fotosintética, produciendo defoliaciones prematuras y muerte de las ramas, resultando en pérdidas sustanciales en el rendimiento del cultivo. Aunque el género *Coffea* está conformado por más de 120 especies (Davis 2011), solo dos especies son cultivadas a nivel mundial; de estas, *Coffea arabica* está sujeta a los más severos ataques con pérdidas que están entre el 35-50 por ciento de producción del grano de café si la enfermedad no es adecuadamente controlada (Silva *et al.* 2006; Rozo *et al.* 2012). Uno de los efectos más devastadores de la enfermedad fue reportado en 1869, en Sri Lanka, donde la enfermedad fue responsable del reemplazo de plantaciones de variedades de *Coffea arabica* por el cultivo del té (*Camellia sinensis*), después de casi un ciclo de haber sido reportada en Sri Lanka, la temida enfermedad se encontró en Brasil en 1970 y 10 años después, el hongo ya se había esparcido al norte y sur, abarcando a todos los países productores de café en Latino América (Schieber y Zentmyer 1984). Actualmente la enfermedad se encuentra distribuida en todos los países productores de café en el mundo.

En el Perú, la roya amarilla fue reportada por primera vez en 1979 (Schieber y Zentmyer 1984), sin embargo, no se evidenciaron pérdidas sustanciales en la producción del grano de café debido a esta enfermedad hasta el año 2013, tiempo en el que, la enfermedad tuvo su mayor incidencia y ocasionó pérdidas que alcanzaron el 27 por ciento de la producción con respecto al año 2011 (INEI 2014). Este mismo panorama ya había sido reportado entre los años 2008 y 2013 en países de América Central, Colombia, México y Ecuador (Avelino *et al.* 2015). No se conoce con exactitud cuales fueron los factores que desencadenaron el surgimiento de la última epidemia en Latinoamérica, sin embargo, Avelino *et al.* (2015), sugieren que fue la combinación circunstancial de factores económicos, meteorológicos, agronómicos y de productividad. Asimismo, Rozo *et al.* (2012), plantearon que el origen de

la epidemia de la roya amarilla que inició en el año 2008 en Colombia, estuvo relacionado con condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad. No obstante, se ha planteado que la aparición de una nueva variante del hongo, pudo haber sido el principal factor causante de la epidemia.

Estudios previos en genética de poblaciones mostraron que *H. vastatrix* tiene características de una población grande, en la cual existe una alta probabilidad para que nuevas variantes del hongo surjan mediante una rápida multiplicación y eventos de mutación (McDonald y Linde 2002). Además, ellos mostraron que el hongo *H. vastatrix*, tiene una alta tasa de mutación y capacidad adaptativa (Varzea y Marques 2005; Cristancho *et al.* 2007; Cabral *et al.* 2009; Maia *et al.* 2013; Cabral *et al.* 2016). Estas características le permiten quebrar rápidamente la resistencia presente en los cultivares de café derivados del Híbrido de Timor (HDT) (Diniz *et al.* 2012), el cual es un híbrido natural originado del cruce entre *C. arabica* y *C. canephora* (Lashermes *et al.* 1993) y es la principal fuente de resistencia utilizada en los programas de mejoramiento genético del café arábico en el mundo (Gichuru *et al.* 2012; Zambolim 2016). La presión de selección ejercida sobre este patógeno por las variedades resistentes, ha llevado a la emergencia de más de 50 razas fisiológicas (Zambolim 2016; Thalinhas *et al.* 2017). A través del tiempo, estas razas, las cuales tienen una complejidad incrementada, han aparecido progresivamente. Por ejemplo, la raza XXXIII recientemente identificada en Brasil ha sobrepasado la resistencia de las principales variedades de café utilizadas como parentales donantes para la resistencia a la roya amarilla en programas de mejoramiento en este país (Porto *et al.* 2019).

En el Perú, actualmente, existe una alta probabilidad de que nuevas variantes del patógeno surjan, porque, la frecuencia y distribución espacial de cultivares resistentes y susceptibles a la enfermedad en las zonas de producción de café, ha cambiado drásticamente después de la epidemia de la roya amarilla del año 2013. Esto debido a que el gobierno peruano mediante el plan Nacional de renovación de plantaciones de café, impulsó el reemplazo de plantaciones de café susceptibles a la enfermedad con cultivares resistentes para luchar contra la epidemia de la roya amarilla (Diaz y Carmen 2017). (Thalinhas *et al.* 2017). Por lo tanto, la información generada de los estudios de diversidad y estructura genética de las poblaciones de fitopatógenos es muy importante para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad, monitoreo de la evolución del patógeno y el estudio epidemiológico de la enfermedad (Cabral *et al.* 2016). Por ello, en el presente estudio se ha planteado como

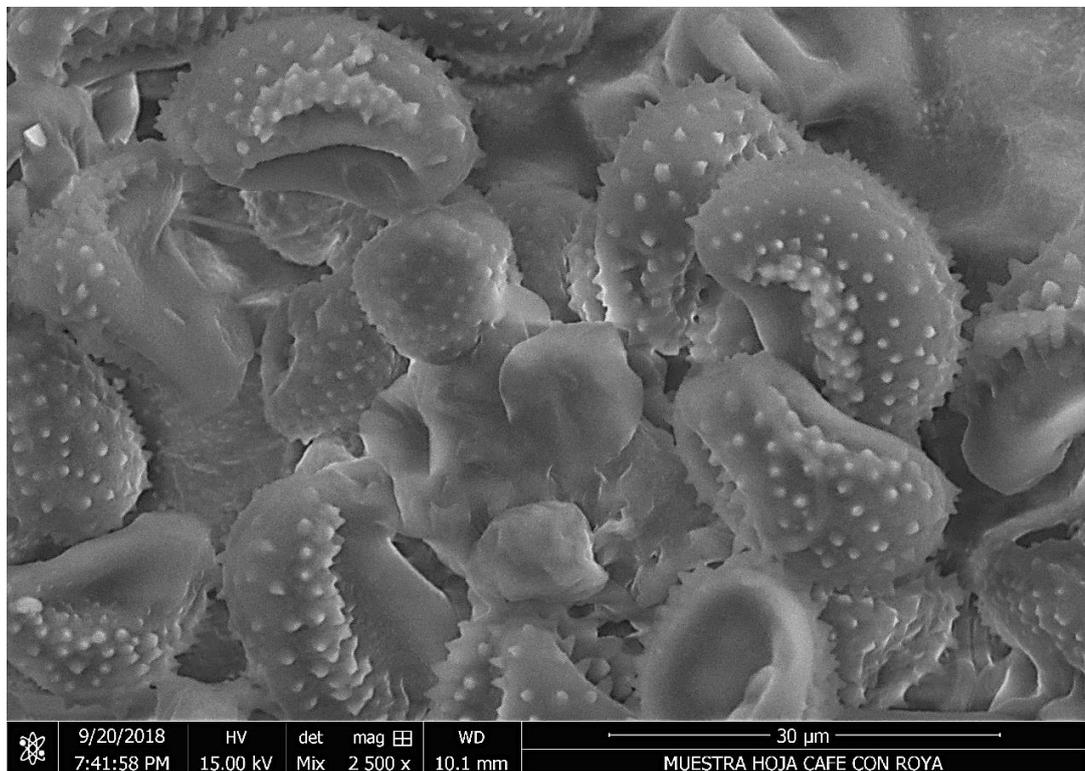
objetivo principal el análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *H. vastatrix* mediante secuenciación de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal y como objetivos específicos: (i) Estudiar la diversidad genética y estructura poblacional de *H. vastatrix* procedentes de las zonas productoras de café de Quillabamba y Villa Rica muestreadas en los años 2014 y 2018; (ii) Analizar la distribución de la variabilidad genética de *H. vastatrix* en diferentes pisos altitudinales; (iii) Evaluar las relaciones filogenéticas entre *H. vastatrix* peruanas, colombianas, brasileras y del Centro de InvestigaçãO Das Ferrugens Do Cafeeiro (CICF).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 LA ROYA AMARILLA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix* BERK. & BROOME)

La roya amarilla del café, causada por el hongo biotrófico *H. vastatrix*, es una de las principales enfermedades del cultivo de café. Está distribuido en todos los países productores en el mundo, y afecta a la planta causando severas defoliaciones y muerte de las ramas, resultando en pérdidas sustanciales en su rendimiento, llegando a disminuir la producción del grano de café entre 35 - 50 por ciento, si no es adecuadamente controlada (Silva *et al.* 2006; Zambolim *et al.* 2002). La enfermedad fue reportada por primera vez en 1861 cerca del lago Victoria (Este de África) infectando especies de *Coffea arabica* silvestres. Poco después de este primer reporte, los efectos de la enfermedad provocaron la completa erradicación del cultivo de café en Ceylon (Sri Lanka), donde fue descrito por primera vez en 1869 por Berkeley y Broome. *H. vastatrix*, recibió esta denominación debido a la morfología de las uredosporas, que se caracterizan por presentar una parte lisa y otra equinulada (Figura 1) (Rodrigues 1990). El género *Hemileia* presenta aproximadamente 50 especies, las cuales, se encuentran distribuidas en zonas tropicales e infectan predominantemente a plantas de la familia Rubiaceae (Rodrigues Jr., 1990). Sin embargo, dos son las especies que tienen importancia económica, *H. vastatrix* y *H. coffeicola* (Rodrigues Jr. y Bettencourt 1975), estando esta última restringida al Oeste de África (Waller 1985). Aunque, dos son las especies de café, que son principalmente afectadas por la enfermedad, *Coffea arabica*, es susceptible a todas las razas de *H. vastatrix*. Esto como consecuencia de su domesticación en Yemen y en áreas de cultivo seco en el mundo, las cuales no son condiciones apropiadas para el desarrollo del hongo, lo que ocasionó una ausencia de presión de selección sobre la

planta para la generación de resistencia a la roya amarilla (Rodrigues *et al.* 1975). En este sentido, se cree que el germoplasma de café de Yemen estuvo libre de roya amarilla. En consecuencia, las nuevas selecciones y adaptaciones a otras regiones y climas en diferentes áreas de Asia y América durante los siglos XVII y XVIII ocurrieron en ausencia del patógeno y sin condiciones favorables para la enfermedad. En el siglo XIX, la epidemia de la roya amarilla sobre vino bajo esas circunstancias biológicas y agronómicas, desde aquel momento, la enfermedad se ha esparcido a todos los países productores de café a nivel mundial (McCook 2006; McCook y Vandermeer 2015).



**Figura 1. Uredosporas de *Hemileia vastatrix* observadas en un microscopio electrónico de barrido**

Fuente: Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina - UNALM (2018)

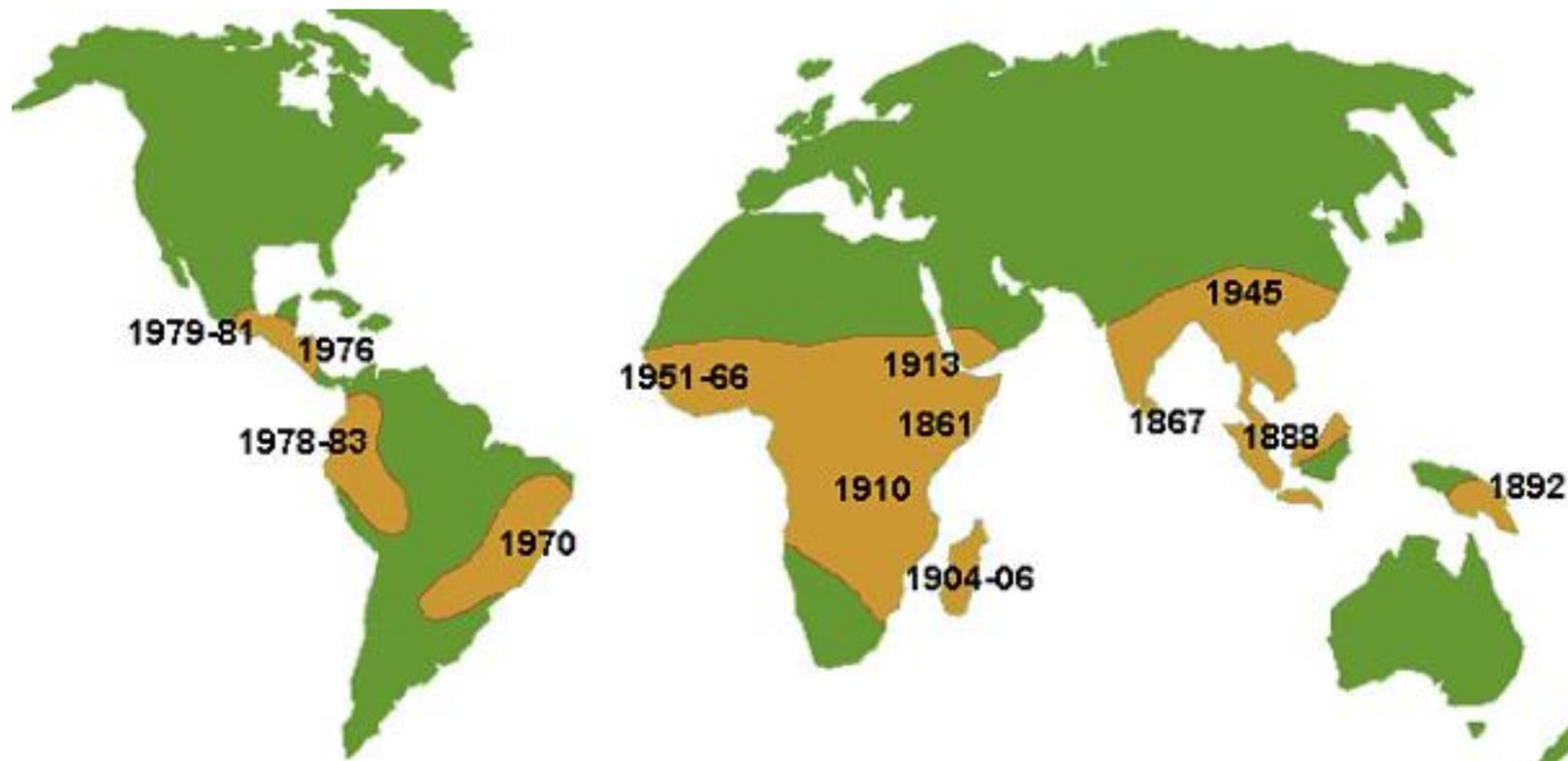
### 2.1.1 Origen y distribución

Las plantas de café y el hongo co-evolucionaron juntas muchos milenios en África ecuatorial. El género *coffea* está compuesto aproximadamente por 100 especies, las cuales crecieron de manera silvestre en África ecuatorial y Madagascar, ocupando un amplio rango de nichos ecológicos. La principal especie comercial de café es *Coffea arabica*, la cual creció de manera silvestre en ambientes montañosos fríos y secos del sureste de Ethiopia y el norte de Kenia. Otra especie, *Coffea canephora* var. robusta, está más ampliamente distribuidas a través de las tierras tropicales bajas calientes y frías de África central y occidental. *H. vastatrix* solo puede sobrevivir en plantas del género *Coffea* y especies cercanas relacionadas, todas las especies de café muestran alguna resistencia a la enfermedad, aunque el grado de resistencia varia grandemente (McCook 2006).

Las esporas de *H. vastatrix* contienen un gran potencial destructivo, sin embargo, este potencial fue raramente observado en plantas de café silvestres, en las cuales, las esporas pueden quedar viables por muchas semanas. También, éstas pueden ser dispersadas muy fácilmente por el viento, la lluvia, insectos, animales y personas que atraviesan por su ecosistema. En este sentido, en un ecosistema de plantas de café silvestres, las cuales presentaban esporas de *H. vastatrix*, estas no mostraban un potencial destructivo; sin embargo, el consumo de café en el África precolonial alteró poco la relación entre la planta y el patógeno, ya que la mayoría del café para consumo era cosechado de plantas silvestres. La relación entre ambos, empezó a cambiar desde que la bebida del café empezó a ganar popularidad en el mundo islámico y en Europa. En consecuencia, África no pudo producir suficiente café silvestre para cubrir su demanda, por esa razón, el cultivo de café empezó en la Península Arábiga, donde el cultivo prosperó, mientras que *H. vastatrix* no. Esto último debido a que esta región sufrió de escasez de lluvias, privando a la roya de agua libre en forma de gotas, las cuales son requeridas por el hongo para germinar y reproducirse, generando de esa manera un filtro para la enfermedad. Entonces, entre los años 1650 - 1850, las plantas de café libres de la enfermedad fueron difundidas globalmente a partir de la Península Arábiga, la cual fue fuente genética del cultivo de café para todas las zonas de crecimiento en el mundo (McCook 2006).

La roya amarilla del café fue descubierta en el año 1861 en los alrededores del lago Victoria al este de África (Schiber 1972) y poco después, en 1869, fue reportada en Ceylon (Sri Lanka), desde donde posiblemente se extendió a gran parte del sureste de Asia y gradualmente invadió todas las regiones de África (Figura 2). En 1966 fue encontrada en la costa occidental de Angola, de donde se cree llegó a Brasil en 1970 mediante las corrientes de aire (Bowden *et al.* 1971); luego en 1972 la enfermedad se extendió desde Brasil a Paraguay y Argentina, probablemente llevada por los vientos. En 1978 fue reportada por primera vez en Bolivia y en el año 1979 en el Perú la enfermedad fue encontrada en plantaciones de café en la provincia de Satipo Región Junín. En 1981 se halló en el Ecuador a donde pudo haber llegado desde Perú por medio del viento. En 1983 fue reportada en Colombia, y en 1984 en Venezuela. En América Central el hongo fue reportado por primera vez en Nicaragua en el año 1976 y se considera que su llegada se debió principalmente a inmigrantes. En 1979, los recolectores de café de Nicaragua fueron aparentemente los que introdujeron la roya amarilla a el Salvador, desde donde la roya se esparció a Honduras y Guatemala en 1980, y a México en 1981 (Figura 3) (Scheiber y Zentmyer 1984).

Actualmente la roya amarilla se encuentra distribuida a través de todos los países productores de café en el mundo y puede causar severas defoliaciones, con pérdidas sustanciales entre el 30 y 50 por ciento en la producción (Silva *et al.* 2006).



**Figura 2. Distribución de *Hemileia vastatrix* a nivel mundial**

Fuente: Schieber y Zentmyer (1984)

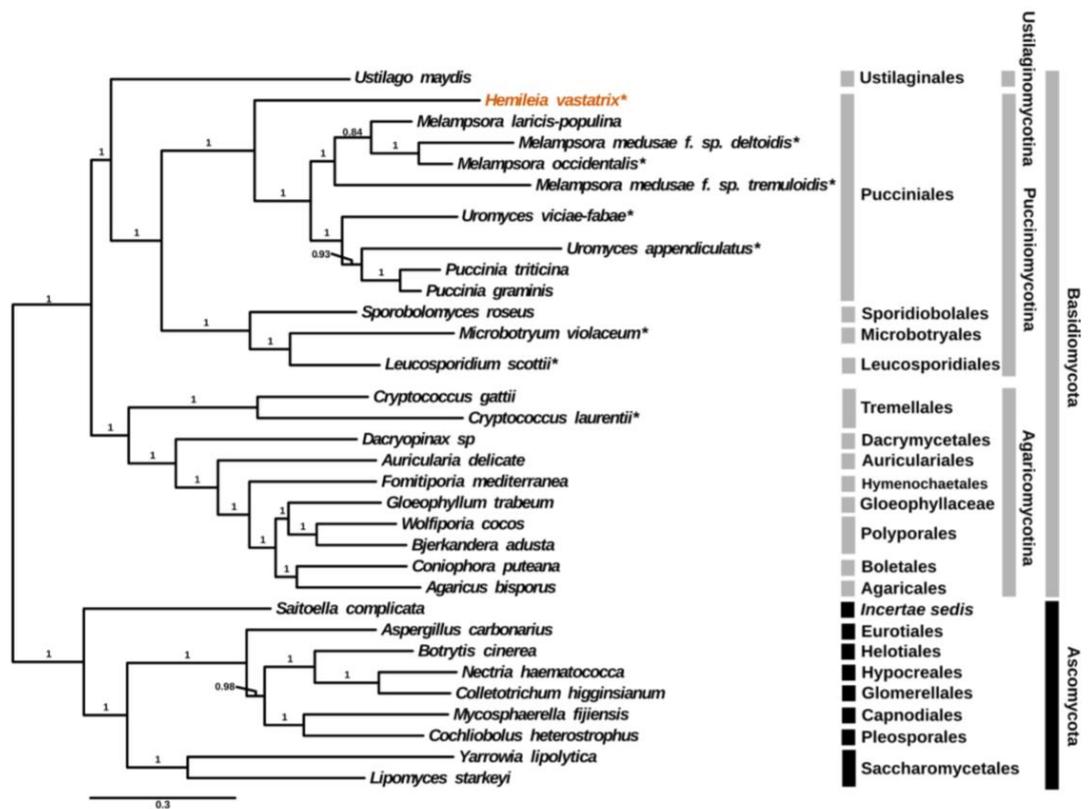


**Figura 3. Distribución de *Hemileia vastatrix* en Sudamérica**  
 Fuente: Schieber y Zentmeyer (1984)

### 2.1.2 Taxonomía de la roya amarilla del café

El género *Hemileia* es miembro del phylum Basidiomycota, clase Pucciniomycete, orden Pucciniales, la cual comprende 42 especies que están presentes en regiones tropicales y sub tropicales de África y Asia, principalmente en plantas no cultivadas de Rubiaceae y Apocynaceae (Ritschel 2005). *H. vastatrix* es una especie del género y se diferencia de las otras royas por presentar una combinación única de tres características morfológicas: soro suprastomatal en forma de bouquet; uredosporas ovoides a reniformes con un lado ventral liso y con un lado dorsal convexo equinulado y con teliosporas angulares-globosas a muy irregulares (Ritschel 2005).

Estudios filogenéticos realizados en base a las secuencias de 23 genomas completos y nueve bases de datos de EST (marcador de secuencia expresada), revelaron que *H. vastatrix* ocupa una posición basal dentro del orden Puccinales (Silva *et al.* 2012) (Figura 4). Por otro lado, en estudios filogenéticos realizados a nivel morfológico y molecular, *H. vastatrix* ha sido colocada en una posición indeterminada a nivel de familia pues la afinidad de este género con la familia Chaconiaceae es problemática. Aime (2006) sugiere, que el género *Hemileia* debería ser ubicado en la familia Mikronegeriaceae, sin embargo, aún es necesario realizar más estudios con un mayor número de royas tropicales.



**Figura 4.** Árbol de máxima verosimilitud estimado de 378 conjuntos de datos genéticos de 32 taxones fúngicos usando RAxML

Fuente: Silva *et al.* (2012)

La taxonomía de *Hemileia vastatrix*, es la siguiente:

Reyno: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycotina

Orden: Pucciniales

Familia: no determinada

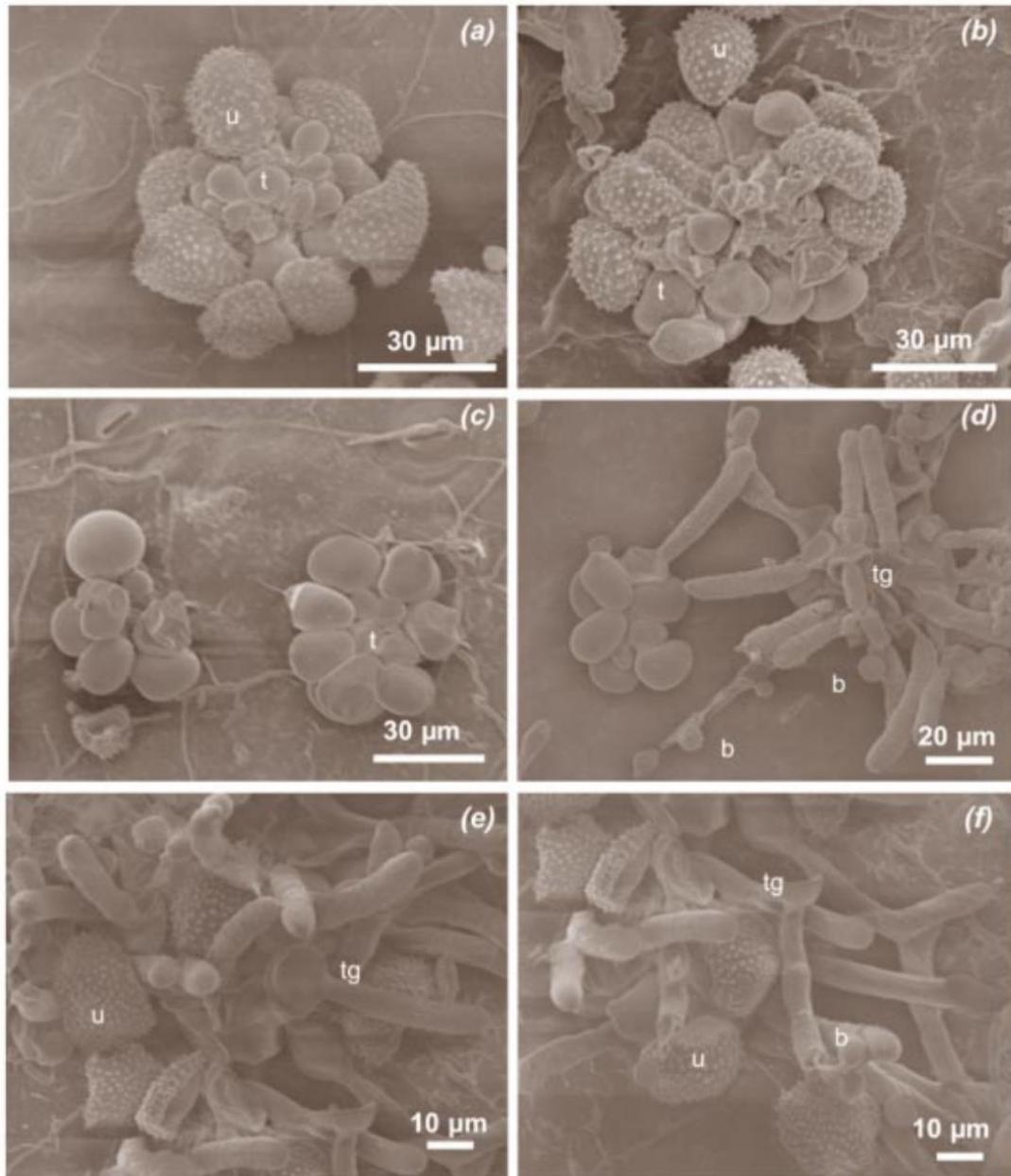
Género: *Hemileia*

Especie: *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome

### 2.1.3 Ciclo de vida

*Hemileia vastatrix* es un hongo biotrófico (Silva *et al.* 2006), que se caracteriza por su completa dependencia de células del huésped vivo para su crecimiento y reproducción (Heath 2000; Panstruga y Dodds 2009). Posee estructuras de infección altamente desarrolladas; actividad secretora limitada, especialmente de enzimas líticas; además, tiene capas interfaciales que separan las membranas plasmáticas de hongos y plantas, ricas en proteínas y carbohidratos; presenta una hifa especializada llamada haustorio, que está involucrada en la absorción y el metabolismo de nutrientes; secreta proteínas efectivas para suplantar la respuesta de defensa del huésped e inducir genes específicos en el huésped para el establecimiento de la interacción biotrófica (Mendgen y Hahn 2002).

En la naturaleza, el hongo *H. vastatrix* produce solo estados uredinial, telial y basidial, y no se ha observado bajo condiciones naturales, ni controladas los estados picnial y aecial. La perpetuación del hongo solo se da mediante las uredosporas, las cuales son cíclicas. Las teliosporas (esporas sexuales) (Figura 5) solo son producidas si las condiciones ambientales son favorables, sin embargo, no tienen una función conocida, ya que no infectan hojas de café ni tampoco se conoce un huésped alternativo (Ward 1882).



**Figura 5. Teliosporas y uredinosporas de *Hemileia vastatrix*: (a-b) teliosporas inmaduras (t) y uredosporas (u); (c) Sori conteniendo solo teliosporas jóvenes (t); (d) sori conteniendo teliosporas y basidiosporas maduras (b); (e-f) teliosporas germinando (tg) uredosporas (u) y basidiosporas (b)**

Fuente: Fernandes et al. (2009)

La infección de *H. vastatrix* a plantas de café, se inicia con la diseminación del patógeno en la cual la uredospora se despega del esporóforo y luego abandona la lesión (dispersión) hasta llegar a una nueva hoja (Silva *et al.* 1999), Una vez adherida en la cara abaxial de las hojas, lugar donde se encuentra el mayor número de estomas,

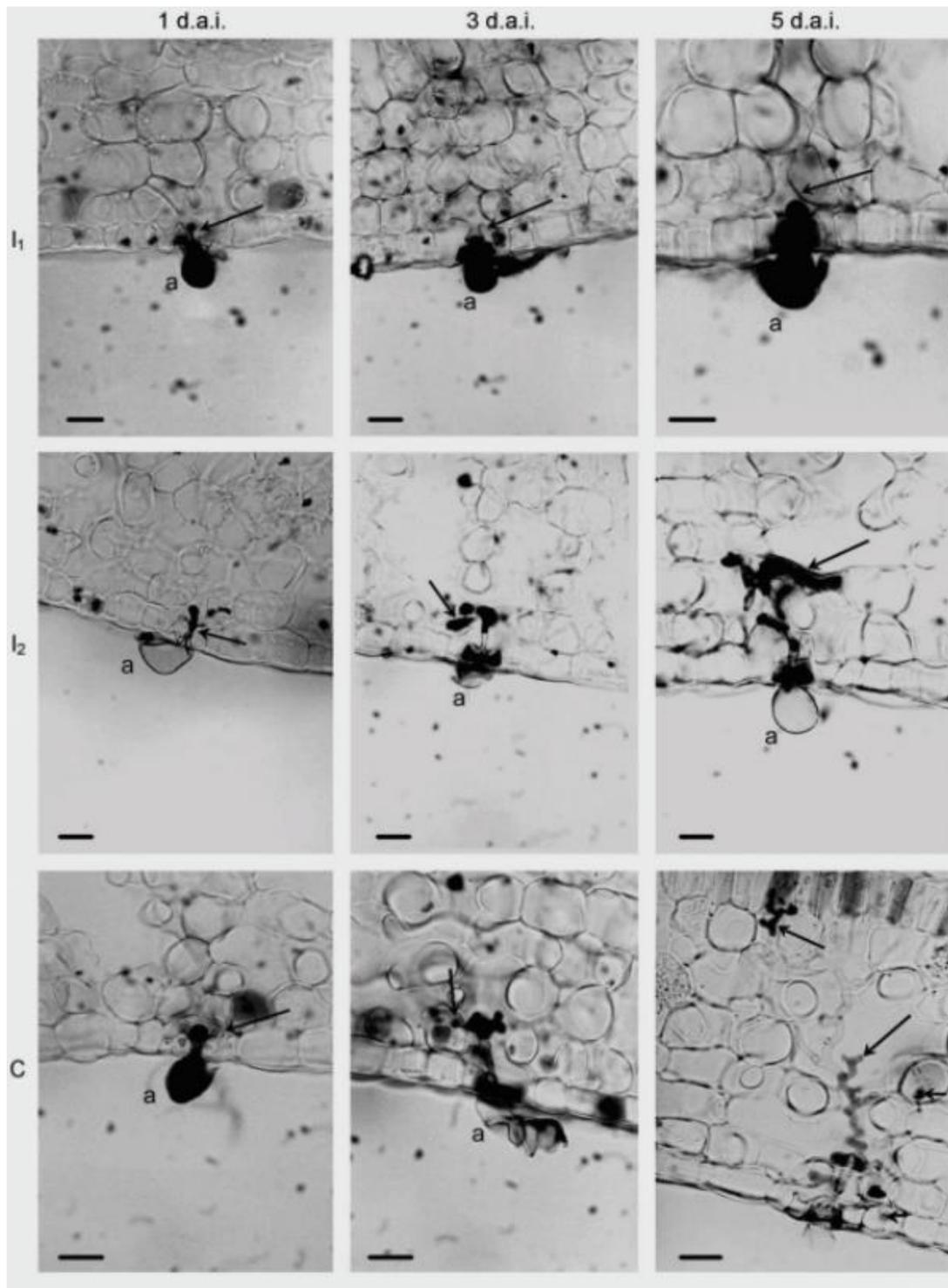
ocurre la germinación por medio de la elongación del tubo germinativo (Rayner 1961; Zambolim 2016), posteriormente se desarrolla el apresorio (AP), a través del cual el hongo va a penetrar e infectar (Rayner 1961; Nutman y Robert 1963; Hocking 1968). Después, el apresorio se diferencia en hifa, la cual penetra a través de los estomas al espacio intracelular; esta etapa inicial de la infección ocurre tanto en plantas de café resistentes como en susceptibles (Figura 6). Seguidamente las hifas forman dos ramas laterales (ancla) que se diferencian en células madres haustoriales (CMH) para dar lugar a los haustorios que penetrarán las células subsidiarias a los estomas (mesófilo); esto solo se ha observado en plantas susceptibles (Silva *et al.* 1999), lo cual involucra la colonización del tejido que culminará con el lanzamiento de las uredinosporas a través de los estomas (Figura 7). El número de esporas producidas es muy elevado, Ward (1882) contó en una sola instancia más de 150 000 esporas en una sola lesión.

Existe un período de latencia, entre el tiempo de invasión y el de esporulación, que fue reportado por varios investigadores, el cual varía de acuerdo con la estación (Bock 1962). Ward (1882), encontró que este período fue de 12 a 16 días; Mayne (1932), reportó para la India, que el período de latencia fue de 15 a 16 días, Rayner (1961), concluyó que se puede tomar hasta 5 semanas, mientras que Nutman *et al.* (1963), informaron que el tiempo fue de 21 días, esto se observó utilizando discos de hojas de café, mantenidas en cámaras húmedas. Sin embargo, en estudios recientes Herrera *et al.* (2009), reportaron que individuos con resistencia parcial exhiben un progreso lento (un retraso de hasta 5 meses en comparación con las variedades susceptibles) con menor defoliación. Entonces se podría considerar que este tiempo de latencia varía de acuerdo con el tipo de resistencia que exhiben las plantas de café, la ecología (pisos altitudinales) y las condiciones ambientales (temperatura, luz y humedad) de las zonas productoras de café.

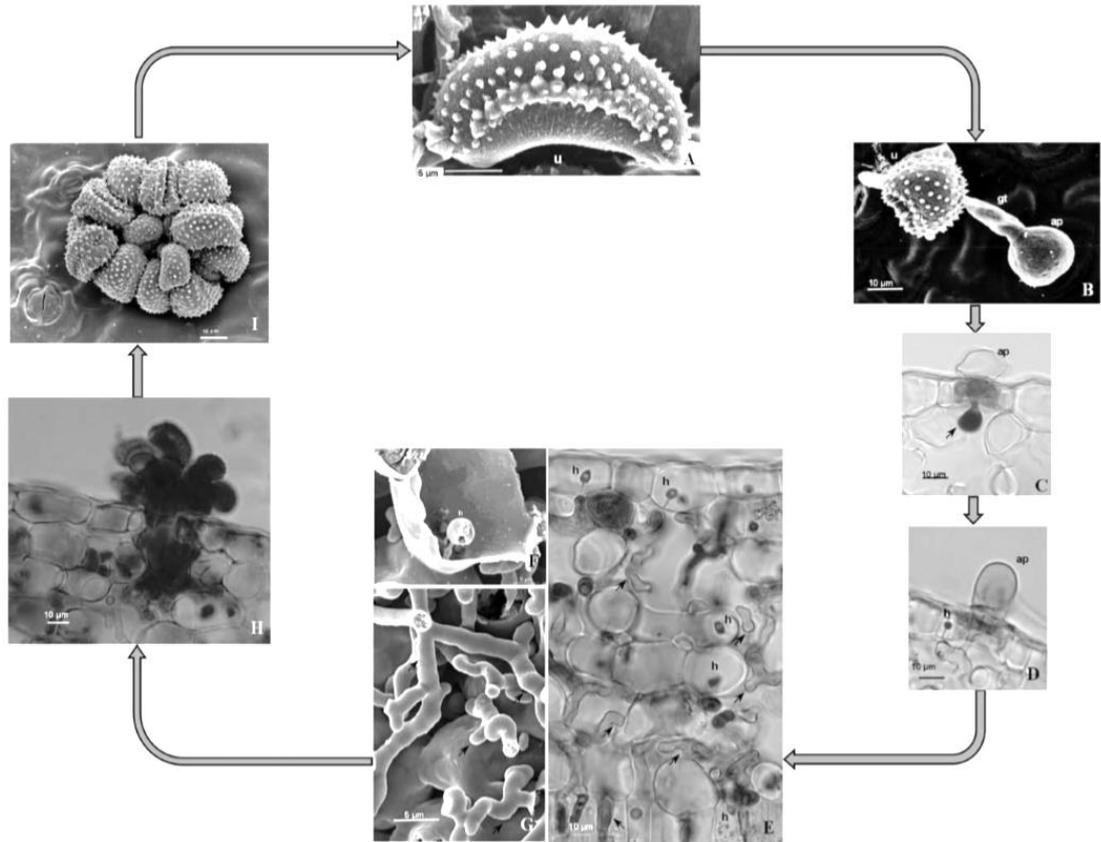
La dispersión de las uredosporas ocurre en ambientes húmedos y secos (Avelino y Rivas 2013). En ambientes húmedos, las esporas se dispersan a través de las salpicaduras por la lluvia, sin embargo, excesivas cantidades de agua pueden causar el desprendimiento de las uredosporas de la superficie de la hoja (Nutman *et al.* 1963; Kushalappa 1989). La dispersión en seco ocurre por fuertes vientos (Rayner 1961; Becker y Kranz 1977). También varios autores han sugerido la diseminación de la

roya por el hombre (Nutman y Robert 1970; Schiber 1970) e insectos (Nutman y Robert 1970; Amante 1971).

Las estructuras reproductivas del hongo son las uredosporas (reproducción asexual), que constituyen el medio de reproducción y dispersión; estas esporas son de forma arriñonada, rugosas en su mitad superior y lisas ventralmente (Coutinho *et al.* 1995; Fernández *et al.* 2009). Sin embargo, Rajendren (1967) observó que la uredospora podía albergar un proceso de meiosis, lo cual fue comprobado recientemente por Carvalho *et al.* (2011), quienes denominaron a este fenómeno como criptosexualidad.



**Figura 6.** Colonización de tejidos de la hoja por el hongo en interacciones compatibles (C) e incompatibles (I<sub>1</sub> y I<sub>2</sub>), a los 1, 3 y 5 (d.a.i) “*days after inoculation*”. I<sub>1</sub>-apresorio (a) sobre el estoma y penetración de la hifa (flecha)  
Fuente: Guerra-Guimarães *et al.* (2009)



**Figura 7. Proceso de infección de *Hemileia vastatrix*. (A) Uredosporas (u). (B) uredospora germinada (u) con tubo germinativo (gt) apresorio (ap) sobre la estoma en la cara abaxial de la hoja de café. (C) apresorio (ap) sobre el estoma y penetración de la hifa (fecha). (D) apresorio (ap) sobre el estoma e hifa intercelular con un haustorio (h) dentro de una célula subsidiaria. (E) hifa intracelular (flecha) y haustorio (h) dentro de células epidérmicas y mesofílicas. (F) haustorio (h) dentro de una célula del parénquima esponjoso. (G) hifa intercelular (flecha) en el parénquima esponjoso. (H) soro sobresale a través de las estomas en forma de ramo. (I) Soro**

Fuente: Talhinhos *et al.* (2017)

#### 2.1.4 Interacción entre *Hemileia vastatrix* y *Coffea arabica*

La interacción entre *Coffea spp* y *H. vastatrix* puede ser explicada por la teoría gen por gen de Flor (1954), la cual postula que por cada gen que condiciona la resistencia en el huésped, existe un gen específico que condiciona la patogenicidad en el patógeno. Basados en esta teoría los estudios de herencia de la resistencia a la roya amarilla llevados a cabo por el CIFC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro) permitieron evidenciar la existencia de al menos nueve factores de resistencia (SH1 a SH9) presentes en las especies de café (Bettencourt y Rodrigues, 1988). Los factores SH1, SH2, SH4 y SH5 han sido identificados en el germoplasma de *C. arabica*, mientras que el SH3 fue encontrado solo en selecciones de la india derivadas de cruzamientos con *C. liberica*. Los factores SH6 a SH9 se encuentran en la especie *C. canephora* y han sido introducidos a las variedades comerciales a través del Híbrido de Timor (HDT), un híbrido natural entre *C. arabica* y *C. canephora*, que es considerado el recurso genético más ampliamente utilizado en los programas de mejoramiento en América (Bettencourt y Lopes 1982). Sin embargo, la resistencia de los cultivos de café mejorados viene siendo muy rápidamente quebrada por el patógeno, dificultando el control de la enfermedad por medio del uso de cultivares resistentes (Zambolim *et al.* 2005).

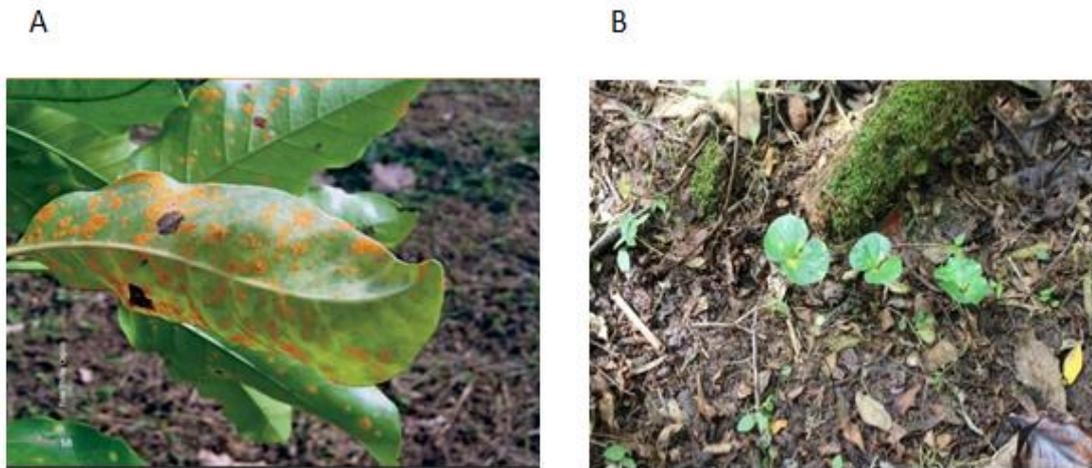
Existen reportes de estudios, donde indican que, durante la interacción con el café, *H. vastatrix* secreta diversas proteínas efectivas para eludir las respuestas de defensa del huésped y promover el parasitismo (Fernández 2012; Maia 2013). *H. vastatrix*, presenta  $\beta$ -1,3-glucanos y quitinas, que son las principales componentes de la pared celular de las uredosporas y estructuras previas y posteriores a la penetración (Silva *et al.* 1999), ambos polímeros son distribuidos regularmente sobre las paredes de las estructuras de pre-penetración del hongo (Silva *et al.* 2006). Sobre las paredes celulares de las hifas intercelulares, Silva *et al.* (1999) observaron un marcador regular de  $\beta$ -1,3-glucanos, mientras que, la quitina se acumulaba preferentemente sobre la parte interna, probablemente menos expuesta a la acción eventual de las quitinasas del huésped. Deising *et al.* (1996), sugirieron que la restricción de la exposición de la quitina a estructuras fúngicas que no están en contacto directo con las enzimas de defensa del huésped, podría ser una regla general para las royas.

Los haustorios, estructura posterior a la penetración, son especializados en la absorción de nutrientes y secreción de proteínas efectoras en la matriz extra haustorial; esos efectores son translocados dentro de la célula del hospedero, por mecanismos que aún son desconocidos, induciendo alteraciones estructurales, celulares y bioquímicas (Catanzariti *et al.* 2007; Petre y Kamoun 2014). En general, la resistencia del café a la roya ocurre después de la formación de los haustorios secundarios en el mesófilo, cuyo fenotipo característico es la inducción de la respuesta de hipersensibilidad (HR), la cual ocasiona la muerte localizada de una o pocas células de la planta, en respuesta a la invasión de un aislado avirulento de un patógeno. La HR es la respuesta más común de la interacción gen por gen (Silva *et al.* 2002; Silva *et al.* 2006; Silva *et al.* 2008; Ramiro *et al.* 2009).

### **2.1.5 Sintomatología**

El primer síntoma de la roya amarilla del cafeto es la aparición de pequeñas manchas cloróticas en las hojas de 1 a 3 mm de diámetro, las que a los pocos días se incrementan en tamaño y aparece luego la masa de uredosporas en el envés de las hojas (pústula). Posteriormente, el centro de la pústula muchas veces se torna necrótico mientras que la producción de esporas continúa en sus bordes (Nutman y Roberts 1970). Las uredosporas producidas en estas lesiones constituyen su forma infecciosa y aparecen tanto en hojas jóvenes como en hojas viejas y eventualmente en las primeras hojas de los semilleros jóvenes (Figura 8).

La enfermedad ocasiona en la planta una fotosíntesis deteriorada, provocando defoliación prematura y reducción de la iniciación floral que resulta en la pérdida del rendimiento (Bettencourt y Noronha-Wagner 1971). En etapas avanzadas, las lesiones se vuelven necróticas y las ramas pueden morir (Avelino *et al.* 2015; Zambolim 2016). La enfermedad es responsable de las pérdidas de rendimiento que van del 10 al 40 por ciento cuando no se implementan las medidas de control apropiadas (Silva *et al.* 2006).



**Figura 8. Síntomas de la roya amarilla en plantas de café (A: hojas de café viejas; B: cotiledones)**

#### **2.1.6 Factores que influyen en la incidencia de la roya amarilla.**

El impacto de los patógenos residentes sobre las plantas varía dramáticamente en el tiempo y en el espacio, dependiendo de los factores tales como la susceptibilidad del cultivo hospedero, la evolución de la virulencia del patógeno, las estrategias de manejo de la enfermedad y las condiciones ambientales predominantes (Anderson *et al.* 2004). El ciclo de vida de muchos patógenos está determinado fuertemente por la presencia de agua, el rol del agua para determinar la probabilidad del comienzo de la enfermedad es bien conocido por los agricultores, y numerosos modelos de prevención han sido desarrollados para una intervención a tiempo, del manejo de los cultivares, como la aplicación de fungicidas (Bebber *et al.* 2017).

Para el caso de *H. vastatrix*, la lluvia y el rocío constituyen dos factores muy importantes para el desarrollo de la enfermedad. La lluvia contribuye al transporte de las uredosporas a distancias cortas, esto mediante las salpicaduras, mientras que el agua es determinante para la germinación y penetración en la hoja (Rayner 1961; Nutman *et al.* 1963; Silva *et al.* 1999). Por ello las epidemias se desarrollan durante épocas de lluvia y se estancan en épocas secas (Avelino *et al.* 1991). Sin embargo, existen otras fuentes de agua como el rocío, el cual podría facilitar la germinación de

las uredosporas en ausencia de lluvia, en tanto, el viento y las personas, permiten la dispersión en seco de uredosporas (Muller 1975). Por otra parte, la temperatura es fundamental en la germinación de las uredosporas, formación del apresorio y progreso de la infección (Nutman *et al.* 1963; De Jong *et al.* 1987). En amplitudes térmicas cortas donde no hay temperaturas muy altas, ni muy bajas el período de latencia (tiempo entre la germinación de las uredosporas y la esporulación nueva) se acorta (Avelino y Rivas 2013) y se dan las condiciones adecuadas para que el ciclo del patógeno se repita, esto determinará la intensidad de una epidemia (Kushalappa *et al.* 1984; Avelino *et al.* 2006). Otro factor importante para el desarrollo de la enfermedad es la carga fructífera (Costa *et al.* 2006; López-Bravo *et al.* 2012), y es que la receptividad de la hoja a la roya es mayor con altas cargas fructíferas, esto podría relacionarse con el contenido de compuestos fenólicos que protegen a las hojas, los cuales se translocan a los frutos dejando las hojas desprotegidas (Carvalho *et al.* 2011).

La sombra es una de las variables epidemiológicas de la roya más controversiales ya que tiene dos efectos (López-Bravo *et al.* 2012). La sombra evita temperaturas extremas lo que favorece la penetración, pero reduce la carga fructífera lo cual se asocia a un menor ataque del patógeno debido a su efecto sobre la colonización (Avelino y Rivas 2013). Asimismo, la sombra conserva agua libre de lluvias con ello favorece la germinación y penetración; sin embargo, bajo sombra no hay rocío, única fuente de agua libre en días sin lluvia (Avelino y Rivas 2013). López-Bravo *et al.* (2012) determinaron que la sombra reduce los ataques de la roya debido a la reducción de carga fructífera; no obstante, las condiciones de microclima (agua libre y temperatura en las hojas) son mejores para el patógeno bajo sombra. Adicionalmente, mencionaron que es posible encontrar más altas incidencias de roya a pleno sol que bajo sombra si la carga fructífera es más elevada a pleno sol; pero si las cargas fructíferas bajo sombra y sol son similares, habrá mayor incidencia bajo sombra.

La temperatura media anual óptima de *Coffea arabica* está en un rango de 18 a 21 °C, crece bajo condiciones de sombra (DaMatta y Cochicho Ramalho 2006). Sin embargo, *C. arábica* tiene suficiente plasticidad para ser cultivada tanto bajo

exposición solar como en sombra, pero necesita una gran cantidad de aportes externos bajo exposición solar (Matos *et al.* 2009).

La epidemia de la roya amarilla producida en Colombia durante el período del 2008 al 2013, despertó el interés de determinar las causas que la desencadenaron. Avelino *et al.* (2015), sugieren la combinación circunstancial de factores económicos, meteorológicos, agronómicos y de productividad. Sin embargo, incidió particularmente en los factores meteorológicos como la elevación de las temperaturas mínimas y descenso de las temperaturas máximas, así como, el inicio anticipado de las lluvias. Sin embargo, en un estudio enfocado solo en la respuesta del patógeno, Bebber *et al.* (2016) encontraron que el cambio climático no había afectado la germinación y la formación del apresorio, consecuentemente, no favoreció significativamente la infección.

Toniutti (2017) evaluó, el nivel de infección del hongo en tres genotipos, bajo diferentes condiciones agronómicas cercanas a condiciones reales de campo (fertilización de nitrógeno y exposición a la intensidad de luz), asimismo, evaluó dos regímenes de temperatura, el primero corresponde al régimen de temperatura más adecuado para *C. arabica* (18 °C - 23 °C) y el segundo bajo un probable futuro régimen térmico en áreas de cultivo para Arábica bajo una continua alarma de cambio global (22 °C a 27 °C) (Bunn *et al.* 2015). Los resultados obtenidos en condiciones controladas demostraron que altas temperaturas favorecen el desarrollo del hongo, sin embargo, el uso de variedades híbridas bajo sombra y fertilización con alto contenido de nitrógeno, limita la incidencia de la enfermedad; asimismo, determinaron que no existe un estado fisiológico de la planta (los metabolitos en Caturra o de los híbridos) que determine la incidencia de la enfermedad.

Por otro lado, Maia *et al.* (2017), en Brasil, evaluaron tres componentes de la agresividad del patógeno (período de incubación, período de latencia, producción de esporas), para determinar su relación con el surgimiento de la última epidemia de la roya amarilla. En su estudio utilizando 183 pústulas de aislados de *H. vastatrix*, sus resultados mostraron que el período de incubación es significativamente más largo en Minas Gerais que en Espírito Santo. Ellos, sugieren que existe una relación con la agresividad del patógeno y el área geográfica de producción de los cultivos de café,

lo cual estaría asociado a las diferencias en altitudes sobre el nivel del mar entre las diferentes áreas geográficas donde fueron muestreados los aislados de *H. vastatrix*. Avelino *et al.* (2005), también reportaron el efecto negativo de la altura sobre la roya amarilla del café, pero, la agresividad del patógeno, igualmente podría estar asociado a las diferentes condiciones climáticas que prevalecen en las diferentes áreas geográficas. Maia *et al.* (2017) también, evaluaron el efecto de los tres componentes de agresividad de los aislados de roya en *C. canephora* y *C. arabica*, para observar el efecto del hospedero sobre la agresividad del patógeno. Sus resultados no muestran diferencias significativas y los aislados de *H. vastatrix* se agrupan y comportan como una sola población.

Se ha mencionado en varios trabajos de investigación que entre los diferentes factores microclimáticos que afectan el ciclo de vida de *H. vastatrix* están la temperatura, la humedad y en menor grado la radiación solar. Siendo el factor más importante en el período de incubación y de latencia, la temperatura (Becker *et al.* 1991; Kushalappa y Eskes 1989). Sin embargo, existen otros factores adicionales que podrían estar relacionados con la agresividad del patógeno (Maia *et al.* 2017).

También se sugirió que la dispersión de las uredosporas desempeña un papel clave en el desarrollo de la epidemia (Avelino *et al.* 2015; Vandermeer y Rohani 2014). Basándose en las relaciones positivas encontradas entre la apertura del paisaje y la incidencia de la roya del café, se ha sugerido que la deforestación y la remoción de árboles de sombra en las plantaciones de café pueden favorecer la dispersión de esporas a distancias medias y grandes (Avelino *et al.* 2012; McCook y Vandermeer 2015; Vandermeer *et al.* 2014). Las lluvias parecieron ser el mejor predictor de la dispersión de las esporas en el aire bajo la sombra. Este efecto puede ser explicado por la intercepción de la lluvia por el follaje de árboles de sombra, que induce una acumulación de agua en las hojas, lo que resulta en un aumento en el tamaño de la gota de la lluvia, que caerá con una gran energía cinética. Según lo propuesto por Avelino *et al.* (2004), el aumento del movimiento del aire debido a la caída de las gotas de lluvia y la mayor fuerza con las que estas impactan sobre la superficie superior de las hojas de café probablemente facilita la liberación seca de las uredosporas de las lesiones y su dispersión en el aire. Este mecanismo de liberación y dispersión seca de propágulos por lluvia ya se ha demostrado para la roya del café

y otros patógenos (Hirst y Stedman 1963; Rayner 1961b; Savary y Janeau 1986). Las primeras gotas que golpean la superficie seca de las hojas son responsables de esta dispersión seca (Hirst y Stedman 1963; Savary y Janeau 1986). La lluvia también puede involucrarse en la dispersión de propágulos a través de las salpicaduras, goteo y escurrimiento (Hirst y Stedman 1963; Savary y Janeau 1986). Esto implica que las prácticas de sombreado pueden ayudar a suprimir o, al contrario, mejorar la dispersión aérea de este patógeno (Figura 9), según el régimen de lluvia; ya que una mayor sombra puede suprimir la dispersión de esporas en estación seca, mientras que una sombra reducida (poda) puede proporcionar cierto control contra la dispersión de las esporas inducidas por la lluvia. La altura de las plantas de sombra (a mayor altura, mayor fuerza cinética), su forma y el tamaño, así como, la forma y el área específica de las hojas también son importantes (Beer *et al.* 1998).



**Figura 9. Práctica de sombreado de cultivares de café de la zona cafetalera de Quillabamba**

### 2.1.7 Variabilidad genética

Los estudios de variabilidad genética de *H. vastatrix* generalmente fueron realizados a través de evaluaciones de inoculaciones en una serie de plantas diferenciales. Mayne (1932), realizó el primer estudio sobre la diversidad fisiológica de *H. vastatrix* en la India, donde fueron identificadas cuatro razas fisiológicas del hongo.

En 1955, en el Centro de Investigaçã das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) en Oeiras, Portugal, desarrollaron investigaciones sobre la especificidad fisiológica de *H. vastatrix* (D'Oliveira 1965) y se han identificado hasta la fecha más de 50 razas del patógeno en función de la interacción diferencial con las plantas portadoras de estos nueve genes resistentes (Cabral *et al.* 2009; Capucho *et al.* 2012; Gichuru *et al.* 2012; Zambolim 2016).

La raza II, que afecta solo a las plantas de café que tienen el gen de resistencia SH5, es la más extendida en todo el mundo (Van der Vossen 2005; Zambolim *et al.* 2005). Sin embargo, han surgido razas más complejas que superan las combinaciones de varios genes de resistencia en varios países donde las plantas resistentes a la raza II se cultivan de manera experimental o comercial (Alvarado-Alvarado y Moreno-Ruiz 2005; Cabral *et al.* 2009; Capucho *et al.* 2012; Gichuru *et al.* 2012; Kilambo *et al.* 2013).

En Brasil, 15 razas fisiológicas de la roya amarilla del café han sido identificadas (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ó XXXI, XXXVII) (Zambolim *et al.* 2005; Cabral *et al.* 2009). En Tanzania se han utilizado 18 clones diferenciales de café para caracterizar la prevalencia de *H. vastatrix*, y los resultados mostraron la presencia de siete nuevas razas que son agentes causantes de la enfermedad (Kilambo *et al.* 2013). En el 2007, Capucho *et al.* (2012) recolectaron 64 muestras de la roya del café en las diferentes regiones productoras de café en Brasil, detectando la presencia de las razas I, II, III, XV, XXII y XXXIII; estando la raza II presente en el 68,7 por ciento de las muestras, en tanto que las razas I, III, XV y XXII estuvieron presentes en seis, cuatro, una y dos muestras respectivamente. En Colombia, los estudios realizados en el año 1983 reportaron a la raza II como responsable de la infección en la variedad Caturra. Cristancho *et al.* (2007),

estimaron que deben existir más de 10 razas aún no identificadas atacando variedades derivadas del Híbrido de Timor, las cuales no pudieron ser determinadas por la falta de plantas diferenciales; además, mencionan la existencia de las razas XXII, XXV, XXIII, XVII y XXX. Estudios posteriores realizados después de la severa epidemia entre 2008 y 2011, que causó pérdidas superiores al 30 por ciento de la producción, revelaron que la raza II y sus derivados ya reportados anteriormente prevalecen en dicho país (Cristancho *et al.* 2007; Castro *et al.* 2013). En Venezuela parece encontrarse muy baja variabilidad del patógeno, dado que solo se han hallado las razas I y II (Silva *et al.* 1997).

La identificación y caracterización morfológica del patógeno mediante el uso de cafetos diferenciales se va tornando insuficiente para determinar la presencia de nuevas razas de *H. vastatrix*. Cristancho (2008), menciona la importancia del desarrollo de técnicas moleculares para la identificación del hongo, debido al continuo desarrollo de nuevas razas. Así, la transferibilidad de SSR (secuencias simples repetidas) de especies relacionadas de uredinales *Puccinia coronata* f. sp. loli y *Melampsora linii* a *H. vastatrix* resultó en un bajo nivel de transferibilidad y solo 4 de 25 marcadores pudieron ser usados en la identificación genética. Los estudios realizados por Gouveia *et al.* (2005), en 45 muestras *H. vastatrix* con diferentes espectros de virulencia, aislados de diferentes hospederos y regiones geográficas, utilizando marcadores moleculares RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar), evidenciaron una diversidad genética moderadamente baja, asimismo, la diferenciación genética fue alta entre aislados del hongo para las poblaciones procedentes de África ( $G_{st} = 0.865$ ) y Asia ( $G_{st} = 0.768$ ), pero no para Sud América ( $G_{st} = 0.266$ ). El análisis de agrupamiento exhibió la falta de estructuración del patógeno con respecto a su origen geográfico, razas fisiológicas y hospederos.

En un trabajo preliminar Batista *et al.* (2010), estudiaron la diversidad genética, los patrones de dispersión y flujo génico de los aislados de *Hemilia vastatrix*, con ayuda de marcadores moleculares AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) y secuencias de los genes  $\beta$  tubulina 1, factor de elongación de traducción (TEF1), transportador de hexosa (HXTp1) y los espaciadores transcritos internos (ITS 1 e ITS2) del ADN ribosomal. Del análisis de las secuencias de estos

genes, solo los genes  $\beta$  tubulina 1 y la región ITS revelaron variación entre los aislados de *H. vastatrix*, sin embargo, no se obtuvo un patrón de agrupamiento de los aislados en cuanto al origen geográfico y de virulencia. En contraste, los marcadores AFLPs permitieron la estructuración de los aislados de *H. vastatrix* en tres grupos, los cuales estuvieron correlacionados con el origen geográfico.

En Colombia, Rozo *et al.* (2012), evaluaron la diversidad molecular del patógeno de diferentes regiones del país, antes y durante la epidemia de la roya amarilla (ocasionada desde 2008). Asimismo, evaluaron la agresividad de aislados colectados de diferentes áreas productoras y de diferentes genotipos, reportando que los aislados de *H. vastatrix* recolectados antes y después del año 2008 fueron bastante parecidos y concluyeron que la epidemia fue causada por una excesiva precipitación pluvial que ocurrió en Colombia desde el año 2006 y que se extendió hasta el 2011 y no por el arribo de un nuevo aislado del patógeno o cambio en la virulencia de la especie presente en el país.

En Brasil, Cabral *et al.* (2016), evaluaron la influencia del hospedero y el origen geográfico en la diversidad y diferenciación de la población de *H. vastatrix*, la cual mostró una diversidad genotípica media y una baja diversidad génica ( $h = 0.027$ ), asimismo, el análisis de variancia molecular reveló que el 90 por ciento de la distribución genética de la población ocurre entre aislados dentro de las subpoblaciones (hospedero, origen geográfico). Asimismo, reportaron 68 haplotipos de los 112 aislados de los cuales 59 fueron únicos.

En la India, Kosaraju *et al.* (2017), evaluaron la capacidad de los marcadores moleculares SRAP (polimorfismos amplificados de secuencias relacionadas) en la evaluación de la variabilidad genética entre 14 razas de *H. vastatrix* conocidas y dos desconocidas. El uso de este marcador molecular permitió la generación de 25 fragmentos de ADN únicos en ocho de las 14 razas evaluadas permitiendo diferenciar la diversidad genética entre las diferentes razas de roya.

Santana *et al.* (2018), evaluaron la diversidad genética y estructura poblacional de quince poblaciones de *H. vastatrix* mediante secuenciación de la región ITS del ADNr (ADN ribosomal). Diez de las quince poblaciones fueron colectadas en las

principales áreas de producción de Minas Gerais y Espírito Santo en Brasil, dos poblaciones (Raza II) procedieron del CIFC, y tres poblaciones (razas I, II, III) que fueron caracterizadas en 1986 (Cardoso 1986). Del análisis de las secuencias, reportaron una alta diversidad genotípica, con valores que presentaron un rango de 0.7 a 1 y una diversidad nucleotídica con valores en un rango de 0.002 a 0.007. Asimismo, se reportó un índice de fijación de  $F_{st}$  de 0.13, lo cual indica una baja diferenciación genética entre las poblaciones y la mayor diversidad estuvo distribuida dentro de las poblaciones con un 86.5 por ciento.

En Brasil, Silva *et al.* (2018), evaluaron la historia y el potencial evolutivo de la población del patógeno utilizando secuenciación de ADN asociado a sitios de restricción (RADseq) en una colección mundial de 37 muestras de *H. vastatrix*. Los resultados revelaron que los aislados de *H. vastatrix* están estructurados de acuerdo a la afinidad con su hospedero. Los grupos C1 y C2 mostraron afinidad por las especies de café diploides, mientras que el grupo C3 mostro afinidad por *C. arabica* y los híbridos tetraploides. Asimismo, ellos sugirieron que el grupo C3 puede ser un linaje recientemente domesticado que emergió a través del cambio de un hospedero diploide. También, encontraron evidencia de recombinación dentro de este grupo y hallaron introgresión entre los grupos C2 y C3.

Se conoce que el inóculo inicial de *H. vastatrix* es la raza II, que está ampliamente distribuida en todos los países productores de café en el mundo, y a partir de la cual se generaron otras razas genéticamente diferentes (Zambolin *et al.* 2005). La presión de selección provocada por el ambiente sobre el patógeno ha acelerado su evolución y la formación de nuevas razas (Varzea *et al.* 2005), este proceso se acentúa más en los lugares de uso continuo de fungicidas con principios activos similares o iguales en las plantaciones a gran escala de genotipos de baja divergencia genética (Silva 2000).

## 2.2 EVOLUCIÓN DE LOS PATÓGENOS DE PLANTAS

Los agro-ecosistemas han jugado un rol crítico en el reciente surgimiento y esparcimiento de los patógenos de plantas. Desde el inicio de la agricultura, aproximadamente 10 000 años atrás, los patógenos de plantas han sido un desafío para los agricultores. Los primeros cultivos de Mesopotamia probablemente fueron mezclas de especies recolectadas directamente de poblaciones silvestres. Estas mezclas mantuvieron un alto grado de heterogeneidad genética y ambiental en comparación con los cultivos modernos. Con el transcurso del tiempo los agricultores neolíticos empezaron a sembrar cultivos como monocultivos de especies, los cuales se extendieron a otras regiones de Europa y Asia. El desarrollo de nuevas especies de cultivos y las prácticas agrícolas dirigieron simultáneamente la emergencia de nuevos patógenos y cambios significativos en las poblaciones de patógenos que ya existieron en los ancestros silvestres de los cultivos sembrados. El nuevo agroecosistema proporcionó una población del hospedador más densa y genéticamente más uniforme, la cual permitió una transmisión de patógenos más fácil entre plantas infectadas y no infectadas y creó un entorno más propicio para la especialización más favorable en comparación con el ecosistema natural. El campo agrícola proporcionó entonces un ambiente más homogéneo y menos propenso a fluctuaciones ambientales, las cuales podían conducir a la reducción del tamaño poblacional del patógeno o a su extinción completa (Stukenbrock y McDonald 2008).

Las poblaciones de patógenos en los agroecosistemas modernos son desafiadas constantemente por una variedad de prácticas culturales destinadas a reducir las infecciones de las plantas. Los genotipos de patógenos seleccionados que se adaptan a estos cambios generados por el manejo de los cultivos (las rotaciones de cultivo, aplicación de fungicidas, uso de cultivos con genes de resistencia) pueden aumentar rápidamente en frecuencia y dispersarse a campos de cultivos vecinos. Los estudios de genética poblacional han aumentado el conocimiento sobre el potencial evolutivo de diferentes patógenos en los agroecosistemas y han permitido caracterizar los procesos importantes que gobiernan la evolución de los patógenos (McDonald 2004).

Los cambios en la estructura poblacional de los patógenos, después de la dispersión de nuevos cultivares con nuevas combinaciones de genes de resistencia son el mejor

ejemplo de evolución. Esto ocurre prácticamente en todas las interacciones en las que se han desplegado genes principales únicos para la resistencia en cultivos que crecen bajo una alta densidad y sobre grandes áreas continuas (Thrall y Burdon 1999). Además, en las interacciones hospedero-patógeno, la variación de la distribución espacial de las poblaciones del hospedero probablemente tenga un gran impacto en los patrones de persistencia e incidencia de la enfermedad (presencia y ausencia) (Hassell y Wilson 1997).

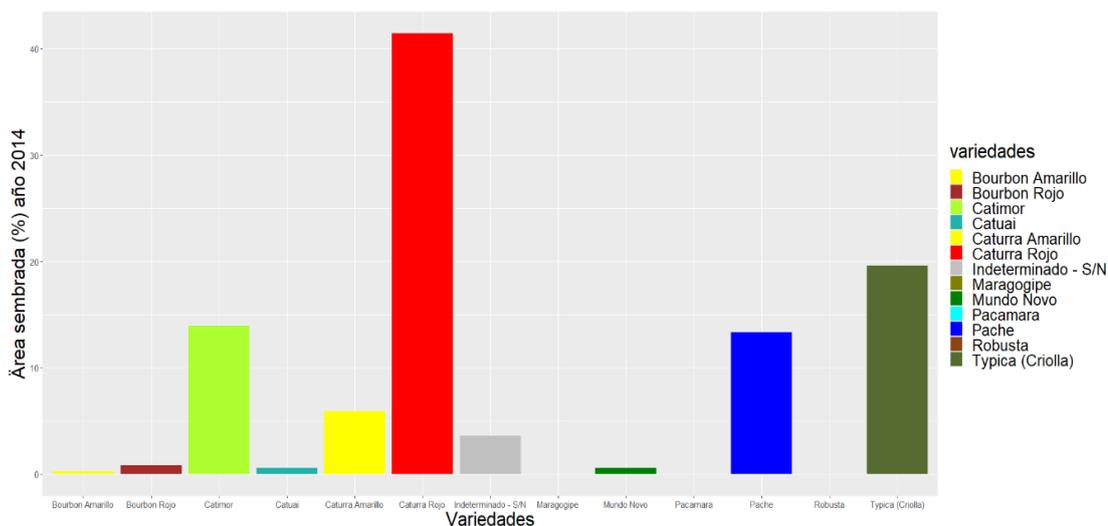
La extinción de un patógeno local será más probable si se incrementa la subdivisión de las poblaciones de hospederos en áreas más pequeñas y aisladas, de manera opuesta, cuando la parcela del hospedero se encuentra más conectada, el patógeno puede dispersarse frecuentemente entre poblaciones, conduciendo a una persistencia a largo plazo de las poblaciones de patógenos (Thrall y Burdon 1999). Cuando las poblaciones de huéspedes están altamente conectadas y son relativamente continuas, la propagación global del patógeno en todo el sistema puede eventualmente aumentar el riesgo de extinción tanto del huésped como del patógeno, dependiendo de la gravedad de los efectos del patógeno en las tasas de crecimiento de la población del huésped y del grado de sincronía de las poblaciones locales (Thrall y Burdon 1999). La comprensión del papel que juega el espacio en la persistencia y la dinámica de la enfermedad requiere el conocimiento acerca de cómo los procesos entre poblaciones afectan la dinámica co-evolutiva del hospedero y el patógeno. Esto en parte debido al potencial de la estructura espacial para impactar significativamente en los patrones de la variación genética dentro y entre las poblaciones (Harrison y Hasting 1996).

Los estudios de genética de poblaciones proporcionan información sobre la estructura poblacional y la naturaleza de la variación genética que existe en poblaciones naturales y su principal enfoque es entender los procesos evolutivos que forman y mantienen la diversidad genética dentro y entre las poblaciones. Un parámetro fundamental es la cantidad de variación genética de una población, porque determina su potencial evolutivo.

### 2.3 LA ROYA AMARILLA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) EN EL PERÚ

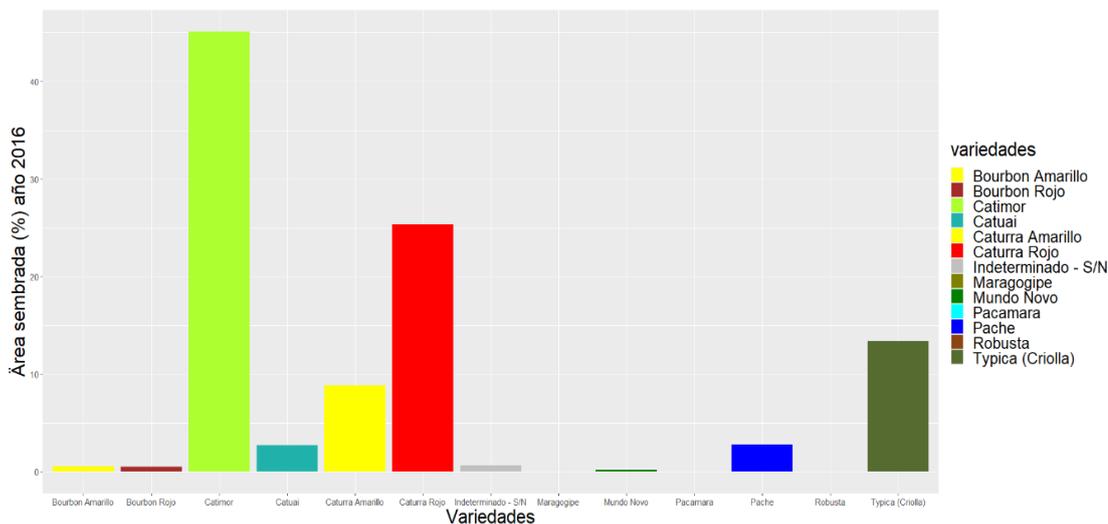
El café, es el principal producto agrícola de exportación en el Perú, un aproximado de 223 mil familias conducen 425 400.00 hectáreas (ha) localizadas en 15 regiones, 95 provincias y 450 distritos. Pero, solo siete regiones (Junín, San Martín, Cajamarca, Cusco, Amazonas, Huánuco y Pasco) concentran al 91 por ciento del total de los productores y del área cultivable. Los pequeños productores, quienes conducen entre 1 – 5 has, representan el 85 por ciento del total de caficultores. El uso de tecnología en el manejo del cultivo de café en este grupo es bastante precario y, en consecuencia, la producción de café es baja en comparación con otros países productores, la media nacional es aproximadamente 13 qq/ha (quintales por hectárea). El 2011 fue un año extraordinario para el café peruano. Se produjeron cerca de 332 100 Tm (tonelada métrica), y el valor de las exportaciones superó los US\$ 1650 millones. Un año después, la roya amarilla mostró las grandes deficiencias del sector y generó una crisis productiva, social, económica e institucional. El Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) reportó el daño de 290 000 ha, de las cuales 80 mil fueron totalmente afectadas. En respuesta a la roya, el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) desarrolló el Plan Nacional de Renovación de Cafetales (PNRC) e invirtió más de US\$ 122 millones durante el período 2013-2016, con lo cual se logró la instalación de más de 37 200 ha de plantaciones de café. Principalmente, se sembró la variedad Catimor, resistente a la enfermedad pero que carece de buena calidad en taza (Díaz y Carmen 2017).

Las variedades más difundidas según reporte del SENASA, antes de la epidemia de la roya amarilla, fueron las variedades Caturra y Typica (Figuras 10 y 11), las cuales se caracterizan por presentar: un alto perfil de taza, calidad de grano, rendimiento y adaptabilidad a las condiciones climáticas del país (SENASA, comunicación personal; Díaz y Carmen 2017). Sin embargo, después de la alta incidencia de la enfermedad, el año 2017, solo el 29.05 por ciento del área sembrada de café estuvo representada por estas variedades, como se muestra en la Figura 12 (SENASA 2018).



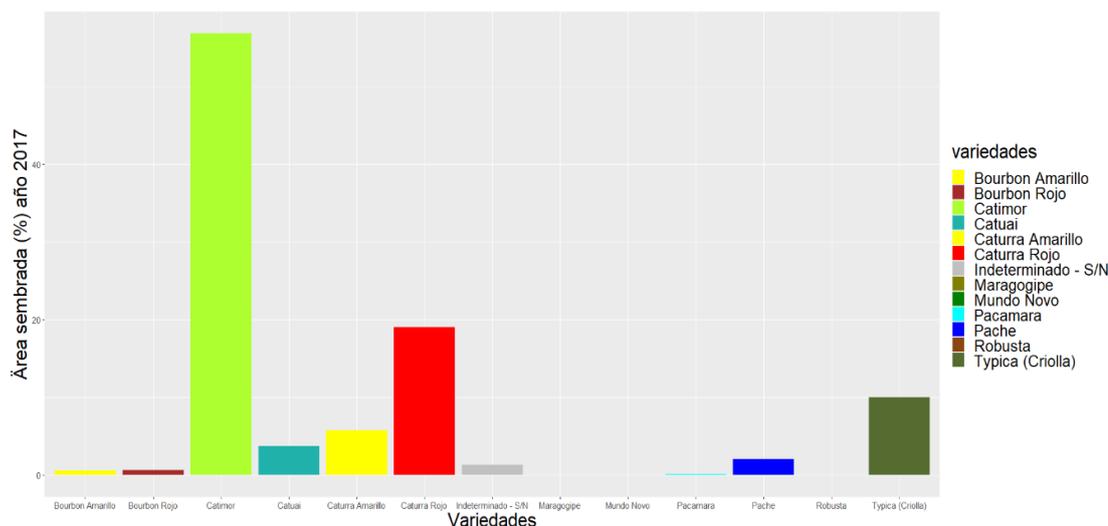
**Figura 10. Principales variedades de café producidas a nivel nacional por área sembrada durante el año 2014**

Fuente: SENASA (2018)



**Figura 11. Principales variedades de café producidas a nivel nacional por área sembrada durante el año 2016**

Fuente: SENASA (2018)



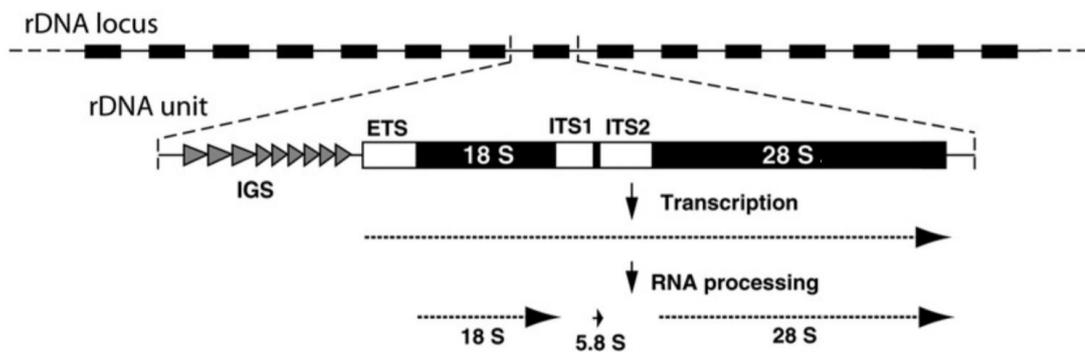
**Figura 12. Principales variedades de café producidas a nivel nacional por área sembrada durante el año 2017**

Fuente: SENASA (2018)

## 2.4 ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS DEL ADN RIBOSOMAL (ITS - ADN<sub>r</sub>)

El ADN ribosomal (ADN<sub>r</sub>) juega un rol importante en la biogénesis del ribosoma, codificando genes, para los componentes estructurales (ARN), de esta importante estructura celular interna. Estos genes son vitales para el funcionamiento eficiente de la maquinaria de síntesis de proteínas celulares y como tales, están presentes en un elevado número de copias. En los eucariotas, los genes más conservados y utilizados son los que codifican el ARN ribosómico (ARN<sub>r</sub>). Todos los linajes organizan el único ARN<sub>r</sub> de la pequeña subunidad ribosomal (18S) y los dos ARN<sub>r</sub> de la subunidad ribosómica grande (5.8S y 28S) dentro de una unidad de transcripción (Figura 13). Los eucariotas codifican cientos de copias de esta unidad de transcripción debido al masivo número de ribosomas necesarios durante períodos de rápido crecimiento. Una de las características más sobresalientes de las unidades del ADN<sub>r</sub> repetidas en tándem es la uniformidad en su secuencia, sin embargo, estas secuencias podrían cambiar en el tiempo (Eickbush y Eickbush 2007). La habilidad de todas las unidades de ADN<sub>r</sub> para cambiar sus secuencias de una manera altamente organizada es descrita como una

evolución concertada, que es el mecanismo mediante el cual las secuencias son homogeneizadas, esto quiere decir que un miembro de una familia de genes evoluciona de la misma manera como los otros miembros de la familia (De Luca *et al.* 2021).



**Figura 13. Organización de los genes de ARN ribosomal (ARNr) en eucariotas, los cuales están organizados en unidades repetidas en tándem (ADNr locus)**

Fuente: Eickbush y Eickbush 2007

La región ITS es el código de barras fúngico establecido y es el marcador genético secuenciado comúnmente en micología (Schoch *et al.* 2012). La longitud promedio de la región ITS es de 550 pares de bases (pb) en el reino fungí, pero varía notablemente entre linajes (Alanagreh *et al.* 2017). Está compuesto por dos espaciadores variables ITS 1 e ITS 2, y el gen ribosomal 5.8S intercalar, altamente conservado (Yang *et al.* 2018).

El ADNr está presente en un alto número de copias, con un alto grado de homogeneidad, mientras que en las regiones de codificación los ARNr maduros del gen son bastante conservados a través de la evolución; los dos espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) evolucionan más rápidamente siendo idóneos para la comparación entre taxones cercanamente relacionados. La región ITS evoluciona cohesivamente dentro de una sola especie y exhibe solo una limitada secuencia divergente entre copias dentro de un solo individuo (Arnheim *et al.* 1980). Igualmente, comparaciones entre especies muestran un buen nivel de divergencia de secuencias.

En muchas especies la variación de la región ITS ha demostrado ser útil para estudios a nivel de poblaciones y especies, debido a su alto grado de variación de secuencias (Yuan y Küpfer 1995; Desfeux y Lejeune 1996; Bellemain *et al.* 2010; Aïnouche y Bayer 1999; Aggarwal *et al.* 2018) y tiene una alta probabilidad y éxito de identificación para un amplio rango de hongos.

Nilson *et al.* (2008) reportaron una variabilidad intraespecífica de secuencia de los ITS de 3.33 por ciento (+/- desviación estándar de 5.62) para basidiomycota. En hongos varía desde algunos casos extremos que se acercan al 8 por ciento de divergencia de secuencia en los ITS (Kausarud y Schumacher 2002) hasta algunas especies que muestran haplotipos idénticos en áreas amplias (Kausarud *et al.* 2007). Estensmo *et al.* (2021) sugieren que, estos niveles de variación reflejan las historias naturales de las especies, donde las especies evolutivas antiguas con tamaños de población grandes pueden presentar una mayor variabilidad de secuencias en las regiones ITS en comparación con las especies más recientes con poblaciones más pequeñas, que podrían haber experimentado cuellos de botellas genéticos recientes.

Estudios previos utilizando los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal en poblaciones de *H. vastatrix*, han permitido inferir las relaciones entre y dentro de las poblaciones, así como la determinación de la estructura y evolución de las poblaciones del hongo (Batista *et al.* 2010; Quispe *et al.* 2017; Santana *et al.* 2018). Asimismo, estudios moleculares de patotipos de *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, mostraron que los ITS - ADNr pueden ser utilizados para inferir la filogenia de especies cercanamente relacionadas, así como para examinar las relaciones entre y dentro de las poblaciones de la misma especie; también pueden ser muy útiles para la identificación de especies que no pueden ser distinguidas utilizando caracteres morfológicos o para evaluar el potencial de cruzamiento (Aggarwal *et al.* 2018).

## **2.5 MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE UNA POBLACIÓN**

Los estudios de genética de poblaciones proporcionan información sobre la estructura poblacional y la naturaleza de la variación genética que existe en poblaciones naturales y su principal objetivo es entender los procesos evolutivos que generan y mantienen la diversidad genética dentro y entre las poblaciones. La variación genética es un parámetro fundamental de una población, porque determina su potencial evolutivo.

En las poblaciones de microorganismos, para estimar la diversidad genética son necesarios el cálculo de los índices de diversidad genética y genotípica (Grunwald *et al.* 2003), los cuales están en función del número y la frecuencia de los alelos en cada locus.

### **2.5.1 Diversidad genética**

La cantidad y los patrones de la diversidad genética en una población puede proveer de información importante para deducir su historia evolutiva, incluyendo los cambios pasados en el tamaño de la población, patrones de migración y eventos de selección pasada. En tal sentido, es habitual en genética de poblaciones medir la variación genética en términos de heterocigosidad o diversidad genética. Entre los estimadores de la diversidad genética se tiene el índice de diversidad nucleotídica (índice de polimorfismo en una población a nivel de nucleótidos) y la diversidad de haplotipos.

– **Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )**

El índice de diversidad de nucleótidos o simplemente diversidad nucleotídica está dado por el número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias de ADN elegidas al azar (Nei y Li 1979).

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij}$$

Dónde:  $d_{ij}$  es una estimación del número de mutaciones que se han producido desde la divergencia de los haplotipos  $i$  y  $j$ ;  $k$  es el número de haplotipos;  $p_i$  es la frecuencia del haplotipo  $i$ ,  $p_j$  es la frecuencia del haplotipo  $j$  y  $n$  es el tamaño de la muestra.

La diversidad nucleotídica varía de 0 a 1 ( $0 \leq \pi \leq 1$ ). Si las secuencias de una muestra presentan los mismos nucleótidos será 0 y si las secuencias de una muestra presentan todos los nucleótidos diferentes será 1.

– **Diversidad haplotípica**

El índice de diversidad haplotípica desarrollado por Nei (1987), mide la particularidad de un haplotipo en una población dada en relación con el tamaño muestral y se estima como:

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^h X_i^2\right)$$

Dónde:  $n$  es el número de secuencias;  $h$  = número de haplotipos diferentes;  $X_i$  es la frecuencia del haplotipo  $i$ .

El valor de  $H_d$  varía entre 0 y 1. Si todos los haplotipos de una muestra son iguales el valor de  $H_d$  será 0 y si todos los haplotipos de la muestra fuesen diferentes el valor será 1.

## 2.5.2 Historia demográfica de una población

En años recientes, una gran cantidad de datos de secuenciación de ADN se han generado en varios proyectos y sus principales logros fueron: la observación de una mayor variación genética dentro de las poblaciones que entre poblaciones y cada individuo alberga un gran número de variantes con frecuencias alélicas bajas. Asimismo, se ha evidenciado que muchos cambios moleculares (a nivel de ADN) no tienen ningún efecto sobre los fenotipos (Okasaki *et al.* 2021). Esto le dio un fuerte soporte a la Teoría Neutral postulada por Kimura (1964), quien postuló que la gran mayoría de cambios evolutivos a nivel molecular son causados por fijación aleatoria de mutantes selectivamente neutrales o casi neutrales y no por selección Darwiniana (las mutaciones y los cambios aleatorios en una población finita pueden mantener una considerable variación a través de la fijación aleatoria de mutantes selectivamente neutrales o casi neutrales). En otras palabras, la mayor parte de la variación molecular dentro y entre las especies, para la Teoría Neutral de la Evolución Molecular, es selectivamente neutral, es decir, no afecta la aptitud de los organismos (Kimura 1991). La Teoría también reafirma que la mayoría de los polimorfismos de proteínas y ADN son selectivamente neutrales y estos son mantenidos en las especies por aportes mutacionales equilibrados por extinciones aleatorias (Kimura 1991). Un método estadístico destinado a rechazar un modelo de evolución neutral es denominado prueba de neutralidad.

Hasta el presente, un número creciente de pruebas de neutralidad han sido desarrolladas y se ha demostrado que los desvíos de la hipótesis nula no sólo pueden ser consecuencia de selección sino también de eventos demográficos, dado que los

cambios de tamaño poblacional pueden dejar huellas particulares que podrían, eventualmente, ser detectadas (Ramírez-Soriano *et al.* 2008). Existen varios estimadores para detectar huellas de posibles eventos demográficos, entre ellos las pruebas de neutralidad de D de Tajima (Tajima 1989),  $F_s$  de Fu (Fu 1997),  $D^*$  y  $F^*$  de Fu y Li' (Fu y Li 1993) y Mismatch distribution (diferencias apareadas).

#### – Índice de Tajima (D)

La prueba de Tajima (1989) es ampliamente utilizada para evaluar la neutralidad en genética de poblaciones. Esta estadística mide la distribución de las frecuencias alélicas de datos de secuencias de nucleótidos y está basada en la diferencia entre dos estimadores de diversidad genética. El primero, la diversidad nucleotídica ( $\theta_\pi$ ), que es el promedio del número de diferencias por pares entre las secuencias, y el segundo, es el estimador de Watterson ( $\theta_S$ ), que es el número de sitios segregativos (un sitio segregativo es un sitio en donde las secuencias difieren, en otras palabras, son los sitios variables a lo largo de las secuencias de ADN) en la muestra.

La estadística de la prueba de D se define como:

$$D = \frac{\theta_\pi - \theta_S}{\sqrt{\text{Var}(\theta_\pi - \theta_S)}}$$

Donde:

$$\theta_\pi = \pi$$

$$\theta_S = \frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{1}{i}\right)}$$

S es el número de sitios segregantes en la muestra.

$\sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{1}{i}\right)$  es una corrección por el error de muestreo, que está en base al número total de muestras analizadas (n).

Si D es igual a cero, no existe diferencia alguna entre ambos estimadores indicando evolución neutral (Tajima 1989). Un valor positivo indica un exceso de frecuencias alélicas intermedias, mientras que un valor negativo indica un exceso de alelos raros. La hipótesis nula de la prueba de D de Tajima es la evolución neutral en una población en equilibrio. Esto implica que la selección no está actuando y que la población no ha experimentado ningún crecimiento o contracción reciente (Tajima 1989).

#### – **Fs de Fu**

El estadístico Fs (Fu 1997) se evalúa para detectar crecimiento poblacional y autostop genético (hitchhiking). Es la probabilidad de tener K alelos en una muestra de n secuencias, dado el valor de  $\Theta$ .

$$F_S = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

Para una muestra con  $K_o$  alelos y un  $\theta_\pi$ ,  $S'$  fue definida como la probabilidad de tener no menos de  $K_o$  alelos (observados) en una muestra aleatoria dado que  $\Theta = \pi$  (Fu 1997). El número de alelos observados no debe ser mayor que el número de alelos esperados. Valores negativos de Fs son evidencia de un número excesivo de alelos, producto de una expansión poblacional reciente o de un autostop genético, un valor positivo de Fs evidencia una deficiencia de alelos, resultado de un cuello de botella reciente en la población.

– **D\* y F\* de Fu y Li**

El estadístico de D\* y F\* de Fu y Li (Fu y Li 1993) considera la distribución de las mutaciones en una genealogía de muestras tomadas al azar a partir de una población dada. Las mutaciones antiguas tienden a encontrarse en las ramas internas de la genealogía, mientras que mutaciones recientes son más probables de encontrarlas en las ramas externas. Si existe selección negativa purificadora se observará un exceso de las mutaciones en las ramas más externas, al contrario, si existe una selección positiva se observará una reducción de mutaciones en las ramas externas. Al comparar el número de mutaciones en las ramas externas e internas en la genealogía con los valores esperados de acuerdo al modelo neutral debería proveer una prueba estadística para determinar si existe selección, no obstante, Fu (1997) mostró que la prueba de Fu y Li es más efectiva para detectar la presencia de selección de fondo (background selection) y crecimiento poblacional.

– **Análisis de distribución de diferencias pareadas (*Mismatch distribution*)**

El análisis de distribución de diferencias por pares o “the mismatch distribution” (MMD) (Slatkin y Hudson 1991; Rogers y Harpending 1992); puede ser utilizado para evaluar eventos demográficos. El análisis MMD es una forma de mostrar un evento demográfico a través de una distribución de frecuencias del número observado de diferencias entre pares de haplotipos. Esta distribución suele ser multimodal en muestras extraídas de poblaciones en equilibrio demográfico, ya que refleja la forma altamente estocástica de los árboles de genes, pero es usualmente unimodal en poblaciones que han pasado por una reciente expansión demográfica (Hudson y Slatkin 1991 y Rogers y Harpending 1992) o una gama expansión con altos niveles de migración entre subpoblaciones vecinas (Ray *et al.* 2003, Excoffier 2004). Este análisis se puede usar para prueba de hipótesis sobre la historia del tamaño de una población y la subdivisión (si se asume neutralidad selectiva), o sobre selección (si se supone un tamaño de población constante).

La estadística de raggedness ( $rg$ ) mide el ajuste del análisis entre la distribución pareada observada y la esperada. Valores bajos de  $rg$  se esperan bajo un modelo de crecimiento poblacional (Harpending *et al.* 1993; Harpending 1994).

Tajima (1989), Slatkin y Hudson (1991), y Rogers y Harpending (1992) fueron precursores en el estudio del efecto de algunos eventos demográficos en los datos de secuencias de ADN. Ellos demostraron que un evento demográfico relativamente reciente, como un crecimiento de la población, hacen que la mayoría de los eventos coalescentes ocurran antes de la expansión y, en consecuencia, las muestras de estas poblaciones tienen genealogías de genes extendidas cerca de los nodos externos y comprimidas cerca de la raíz (es decir, genealogías de tipo estrellas). Por lo tanto, los cambios en el tamaño de la población pueden dejar una huella particular que eventualmente puede detectarse en los datos de secuencia de ADN. Este marco teórico impulsó el desarrollo de pruebas estadísticas para detectar la expansión de la población. El análisis de la distribución de diferencias por pares, o distribución de desajustes (Slatkin y Hudson 1991; Rogers y Harpending 1992), proporciona un método para inferir tales eventos demográficos. Estos autores han demostrado que, para las regiones de ADN que no se recombinan, las poblaciones de tamaño constante presentaban distribuciones de desajuste con formas con muy poca semejanza con las esperadas en poblaciones en crecimiento. Esto motivó el desarrollo de algunas pruebas estadísticas para detectar procesos de expansión (Harpending *et al.* 1993).

### **2.5.3 Estructura genética de una población**

Es definida como la cantidad y distribución de la variación existente entre y dentro de las poblaciones de un organismo, siendo consecuencia de la interacción entre las cinco fuerzas evolutivas (migración, mutación, selección, deriva génica y recombinación) (McDonald y Linde 2002). Por lo tanto, la comprensión de los procesos evolutivos de una población a menudo depende del conocimiento detallado de la estructura genética de la población de una especie (Meirmans 2012).

La estructura genética de la población de una especie está usualmente descrita en términos de la estadística de F, y un método de cálculo popular de esta es el análisis de variancia molecular (AMOVA) (Meirmans 2012).

El análisis de la variancia molecular (AMOVA) es un método para estimar la diferenciación de la población directamente a partir de datos moleculares y probar la hipótesis sobre dicha diferenciación. Un modelo lineal en los patrones primero descritos por Cockerham (1969, 1973) y refinado por Weir y Cockerham (1984) y Long (1986), fue empleado por Excoffier *et al.* (1992), de la siguiente manera:

$$X_{ijk} = X + a_k + b_{jk} + c_{ijk}$$

Donde, el vector  $x$  es la expectativa desconocida de  $x_{ijk}$ , promediada en todo el estudio. Los efectos son: **a** para grupo, **b** para población y **c** para haplotipos dentro de una población dentro de un grupo, que se supone que es aditivo, aleatorio, independiente y que tiene asociados los componentes de covarianza  $\sigma_a^2$ ,  $\sigma_b^2$ ,  $\sigma_c^2$  respectivamente. La variancia molecular total ( $\sigma^2$ ), es la suma de los componentes de la covarianza debido a: las diferencias entre los haplotipos dentro de una población ( $\sigma_c^2$ ), el componente de covarianza debido a las diferencias entre los haplotipos en diferentes poblaciones dentro de un grupo ( $\sigma_b^2$ ), y el componente de covarianza entre G (número de grupos en la estructura) poblaciones ( $\sigma_a^2$ ).

Para los datos haplotípicos para un grupo de poblaciones, el AMOVA jerárquico estará representado por:

**Cuadro 1: Jerarquía del AMOVA para datos de un grupo de poblaciones**

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SSD)	Cuadrados medios esperados (CME)
Entre grupos	G-1	SSD (AG)	$n''\sigma_a^2 + n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre poblaciones dentro de los grupos	P-G	SSD (AP/WG)	$n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Dentro de las poblaciones	N-P	SSD (WP)	$\sigma_c^2$
Total	N-1	SSD (T)	$\sigma_T^2$

Donde  $n$  y el  $F_{st}$  son definidos por:

$$S_G = \sum_{g \in G} \sum_{p \in g} \frac{N_p^2}{N_g}, \quad n = \frac{N - S_G}{P - G}$$

$$n' = \frac{S_G - \sum_{p \in P} \frac{N_p^2}{N}}{G - 1}, \quad n'' = \frac{N - \sum_{g \in G} \frac{N_g^2}{N}}{G - 1}$$

$$F_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}, \quad F_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2} \quad y \quad F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

Donde, G es el número de grupos en la estructura, P es el número total de poblaciones, N es número total de secuencias;  $N_p$  es el número de individuos en la población,  $N_g$  es el número de individuos en el grupo.

$\sigma_c^2$  y  $F_{ST}$  se evalúan permutando los haplotipos entre poblaciones entre grupos.

$\sigma_b^2$  y  $F_{SC}$  se evalúan permutando los haplotipos entre poblaciones dentro de los grupos.

$\sigma_a^2$  y  $F_{CT}$  se evalúan permutando poblaciones entre grupos.

El rango de  $F_{ST}$  varía de 0 a 1. Cuando no existe diferenciación será 0 y si existe diferenciación completa será 1.

Cuando  $F_{ST}$  es:

De 0 a 0.05 = La diferenciación genética es pequeña.

De 0.05 a 0.15 = La diferenciación genética es moderada.

De 0.15 a 0.25 = La diferenciación genética es grande.

> 0.25 = La diferenciación genética es muy grande.

#### **2.5.4 Flujo de genes**

El flujo de genes es el intercambio o movimiento de gametos, individuos, y poblaciones en una escala geográfica. El flujo genético en combinación con otras fuerzas evolutivas puede resultar en la propagación de un solo gen, genotipos e incluso el establecimiento de poblaciones enteras en diferentes regiones (McDermott 1993). Los procesos de extinción y recolonización son probablemente una importante fuente de flujo genético en poblaciones de patógenos. Existen dos consecuencias que derivan del proceso de extinción y recolonización: un “Efecto Fundador” resulta de la supervivencia de solo una pequeña fracción de los individuos de la población fuente; en segundo lugar, un componente del flujo de genes debido a la mezcla aleatoria y a la supervivencia de individuos de varias poblaciones (Slatkin 1985). Lo que parece ser más importante para determinar el resultado de la extinción y la recolonización es la fuente de los propágulos que establecen la nueva población (McDermott 1993).

Dos modelos extremos fueron considerados por Slatkin (1985), el grupo de propágulos y el grupo de migrantes. En el primer modelo, el grupo de propágulos se

forma muestreando individuos de una sola población fuente. En este caso, la deriva genética supera el efecto del flujo de genes, lo que resulta en una mayor diferenciación local entre poblaciones.

En el modelo de grupo de migrantes, la población local se compone de una muestra aleatoria de genotipos de varias poblaciones, conjuntamente denominada “metapoblación”. En este caso, la mutación tiende a aumentar la diferenciación de la población local, mientras que el flujo de genes tiende a disminuirla. La consecuencia de la recolonización en este caso es disminuir las diferencias entre poblaciones debido al muestreo de la variación de muchas poblaciones (McDermott 1993).

Los patógenos de plantas exhiben una amplia gama de posibles mecanismos de dispersión, que van desde el inóculo transmitido por semillas y la dispersión local de salpicaduras hasta la dispersión por el viento a larga distancia, los cuales podrían fomentar la mezcla de individuos de diversas fuentes (McDermott 1993).

### **2.5.5 Inferencia filogenética intraespecífica**

Un árbol filogenético es también conocido como filogenia, la cual es un diagrama que describe las líneas de ascendencia evolutiva de diferentes especies, organismos o genes de un ancestro común (Baum 2008). En estudios que exploran la variación de la secuencia de ADN a nivel intraespecífico dos tipos de gráficos (árboles filogenéticos y/o redes de haplotipos) normalmente se utilizan para resumir los datos genéticos (Mardulyn 2012). El enfoque filogenético, el cual asume que las secuencias ancestrales no se observan y están asociadas con nodos internos del árbol, mientras que las secuencias observadas están asociadas con sus nodos terminales. Por otro lado, si algunas secuencias observadas pueden ser ancestrales de otras, un enfoque de red es más apropiado, en cuyo caso estas secuencias se asociarán con los nodos internos de la red (Paradise 2018).

### 2.5.5.1 Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median Joining)

Las redes de haplotipos son árboles multibifurcados, en los cuales muchos haplotipos pueden ser originados por un único haplotipo y están dispuestos a manera de redes. Dichas redes son conocidas como redes mínimas de haplotipos, en otras palabras, las conexiones entre haplotipos son dadas por el mínimo número posible de mutaciones entre ellos. Esto debido a que se trabaja con filogenias de haplotipos a nivel intraespecífico, que pueden presentar muy poca variación e implican un tiempo evolutivo mucho menor (Dominguez - Dominguez *et al.* 2009).

Las conexiones entre los haplotipos representan eventos coalescentes, y se pueden realizar a partir de la red de parsimonia deducciones, tales como:

- Los haplotipos de mayor frecuencia tienen alta probabilidad de ser los alelos ancestrales.
- Los haplotipos que tienen múltiples conexiones muy probablemente son ancestrales.
- Dentro de la red, los haplotipos ancestrales están ubicados en el interior y los haplotipos nuevos tienen mayor probabilidad de estar ubicados en las ramas externas.
- Además, se espera que los haplotipos ancestrales muestren una amplia distribución geográfica, porque estos tuvieron mayor tiempo para dispersarse.
- Los haplotipos con una única conexión posiblemente estén unidos a haplotipos de la misma subpoblación, (debido a su surgimiento reciente y por lo tanto no tuvieron tiempo para dispersarse) (Vázquez *et al.* 2009).

Una de las redes más populares es la red producida a través de unión de mediana o “Median Joining Networks” (MJN) (Bandelt *et al.* 1999). El algoritmo MJN está diseñado para producir una red que contiene múltiples árboles plausibles en

una sola figura reticulada, utilizando datos intraespecíficos de un gran número de muestras, pero con pequeñas diferencias genéticas (Bandelt *et al.* 1995).

El algoritmo MJN requiere una alineación múltiple de secuencias que presenten estados ambiguos poco frecuentes y con ausencia de recombinación. Esto debido a que las secuencias recombinantes producen redes de alta dimensión, las cuales son virtualmente imposibles de interpretar. La técnica de "distancia de Hamming" calcula la distancia entre secuencias basada en el número de diferencias. Los estados ambiguos son especificados y asignados arbitrariamente a través de la comparación con sitios no ambiguos de otras secuencias de distancias mínimas (Bandelt *et al.* 1999).

El método de unión por la mediana (MJN) fue frecuentemente utilizado como una herramienta para visualizar las relaciones entre los taxones (Langford *et al.* 2013, citado por Kong, 2015), la estructura de la población (Campos *et al.* 2013, citado por Kong, 2015), y para proveer una información complementaria para las filogenias reconstruidas (Yamakawa y Imai 2013, citado por Kong 2015). ya que estas serían inapropiadas para la inferencia de relaciones filogenéticas intraespecíficas debido a la representación de haplotipos ancestrales ocupando ramas de longitud cero en el nodo basal de un grupo. Por lo tanto, sería un modelo inapropiado (Posada y Crandall 2001).

#### **2.5.5.2 Árbol filogenético**

Antes del advenimiento de las tecnologías de secuenciación de ADN, los árboles filogenéticos se usaban casi exclusivamente para describir las relaciones entre especies en sistemática y taxonomía. En la actualidad, la filogenia se usa en casi todas las ramas de la biología. Además de representar relaciones entre las especies en el árbol de la vida, las filogenias también pueden utilizarse para describir las relaciones entre una familia de genes parálogos, historia de poblaciones, dinámica evolutiva y epidemiológica de los patógenos (Yang y Rannala 2012).

Una filogenia o árbol filogenético es una representación de las relaciones genealógicas entre especies, entre genes, entre poblaciones o incluso entre individuos, la cual, contiene nodos que están conectados por ramas. Cada rama representa la persistencia de un linaje genético a través del tiempo, y cada nodo representa el nacimiento de un nuevo linaje. Por ejemplo, en un árbol genético de secuencias muestreadas de una población, los nodos representan eventos de nacimiento de individuos que son ancestrales de la muestra, mientras que en un árbol de familias de genes parálogos, los nodos pueden representar eventos de duplicación de genes (Yang y Rannala 2012).

Los métodos de reconstrucción de filogenias están basados en distancias o caracteres. En los métodos de matriz de distancias, se calcula la distancia entre cada par de secuencias, y la matriz de distancia resultante se usa para la reconstrucción del árbol. Por ejemplo, el método de "Unión de vecinos" parte de una matriz de distancias, que indica la distancia entre cada par de taxones. El algoritmo comienza con un árbol completamente sin resolver, cuya topología corresponde a la de una red en estrella, y aplica los siguientes pasos hasta que el árbol está completamente resuelto y las longitudes de sus ramas se conocen (Yang y Rannala 2012).

Los métodos basados en caracteres incluyen: máxima parsimonia, máxima verosimilitud (MV) y el método de inferencia bayesiana (IB). Estos enfoques comparan simultáneamente todas las secuencias en el alineamiento, considerando un carácter (un sitio de alineamiento) a la vez para calcular una puntuación del árbol, la cual, es el número mínimo de cambios para la máxima parsimonia. El método de MV estima la probabilidad de qué tan bien la matriz de caracteres es explicada por los árboles filogenéticos (Felsenstein 2004), mientras que inferencia bayesiana (IB) estima la probabilidad de qué tan bien los árboles filogenéticos son explicados por los datos (la matriz de caracteres) (Huelsenbeck *et al.* 2001, Brooks *et al.* 2007).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA

Hojas de café infectadas por *H. vastatrix*, de plantas de café de las variedades “Typica” y “Caturra”, fueron muestreadas al azar en las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica.

Para el muestreo de hojas de café infectadas por *H. vastatrix* se consideraron aquellas que mostraron un alto grado de severidad y se tuvo cuidado de seleccionar hojas que solo tuvieran pústulas con esporas de color amarillo sin presencia de otros contaminantes visibles. Las hojas infectadas, que fueron seleccionadas, se colocaron en bolsas de papel para su transporte hasta laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM); donde, las esporas del hongo fueron inmediatamente aisladas en tubos de 1.5 mL y almacenadas a 4°C.

El muestreo fue repetido dos veces, el primero en el 2014 (después de la epidemia de la roya del café del 2013) y la segunda en el 2018 (cuatro años después del primer muestreo).

En Quillabamba el muestreo de hojas infectadas fue llevado a cabo para ambos años en cinco plantaciones. En Villa Rica, los muestreos fueron realizados en siete plantaciones en el 2014, mientras que, en el 2018 fue realizado solo en una plantación; esto debido a la escasa presencia de plantas infectadas como consecuencia de la renovación de plantas de café realizada con cultivares resistentes a la enfermedad.

En base a los sitios de colecta, las uredosporas fueron agrupadas en subpoblaciones según Santana *et al.* (2018) (Cuadro 2).

**Cuadro 2: Información georreferenciada de los predios donde las hojas con uredosporas de *Hemileia vastatrix* fueron muestreadas de plantas de café de las dos zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica**

Zona cafetalera	Año de muestreo	Latitud (S)*	Latitud (W)*	Plantaciones	Código de las muestras compuestas	Altitud (m s. n. m.)	N° de hojas muestreadas por año	N° de secuencias por subpoblación
Quillabamba	2014	-12.86021	-72.7005	Cocla	HVQ01	1033	125	10
		-12.95125	-72.66411	Maranura	HVQ02	1152		9
		-12.94241	-72.64352	Sector Beatriz	HVQ03	1766		10
		-13.18405	-72.6043	Santa Teresa	HVQ04	1865		10
		-13.21229	-72.61512	Centro Bayona	HVQ05	2076		10
	2018	-13.00492	-72.51137	Huayopata	HVQ12	1879	125	11
		-13.0015556	-72.526597	Huayopata	HVQ13	1688		12
		-13.2123	-72.61596	Santa Teresa	HVQ14	2060		11
		-12.89009	-72.72633	Potrero	HVQ15	1319		11
		-12.88732	-72.64793	Yanay	HVQ16	1528		11
Villa Rica	2014	-10.78518	-75.2665	Brack	HVV06	1537	175	10
		-10.7396	-75.19847	Cruzeiro	HVV07	1478		9
		-10.71801	-75.2713	Aroma de Montaña	HVV08	1633		9
		-10.79966	-75.30816	Rosalía	HVV09	1391		8
		-10.71675	-75.2686	Clemencia	HVV10	1549		10
		-10.75821	-75.29628	Aicahuaman	HVV11	1750		11
	-10.75919	-75.295	Marcelo	1776				
	2018	-10.77822	-75.26767	Brack	HVV17	1542	50	22
-10.77195		-75.26601	Brack	HVV18	1731	22		

(S)\*: South

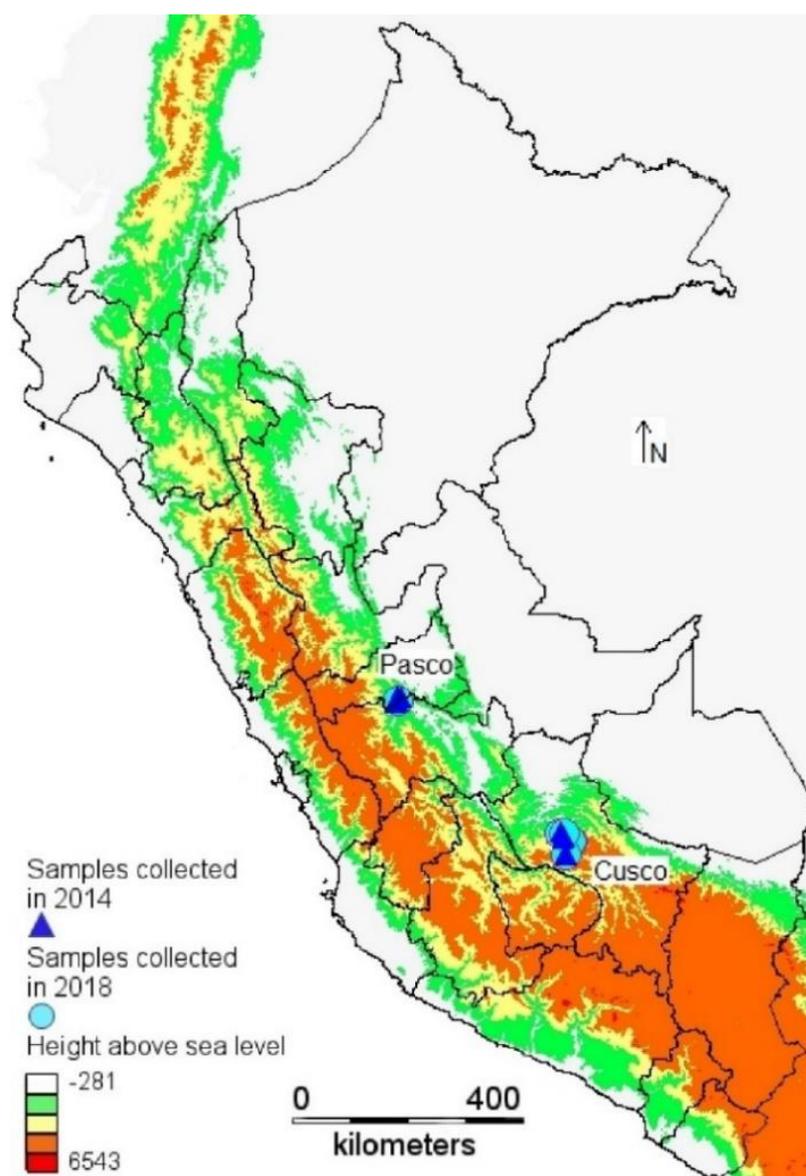
(W)\*: West

HVV: *H. vastatrix* muestreada en Villa Rica

HVQ: *H. vastatrix* muestreada en Quillabamba

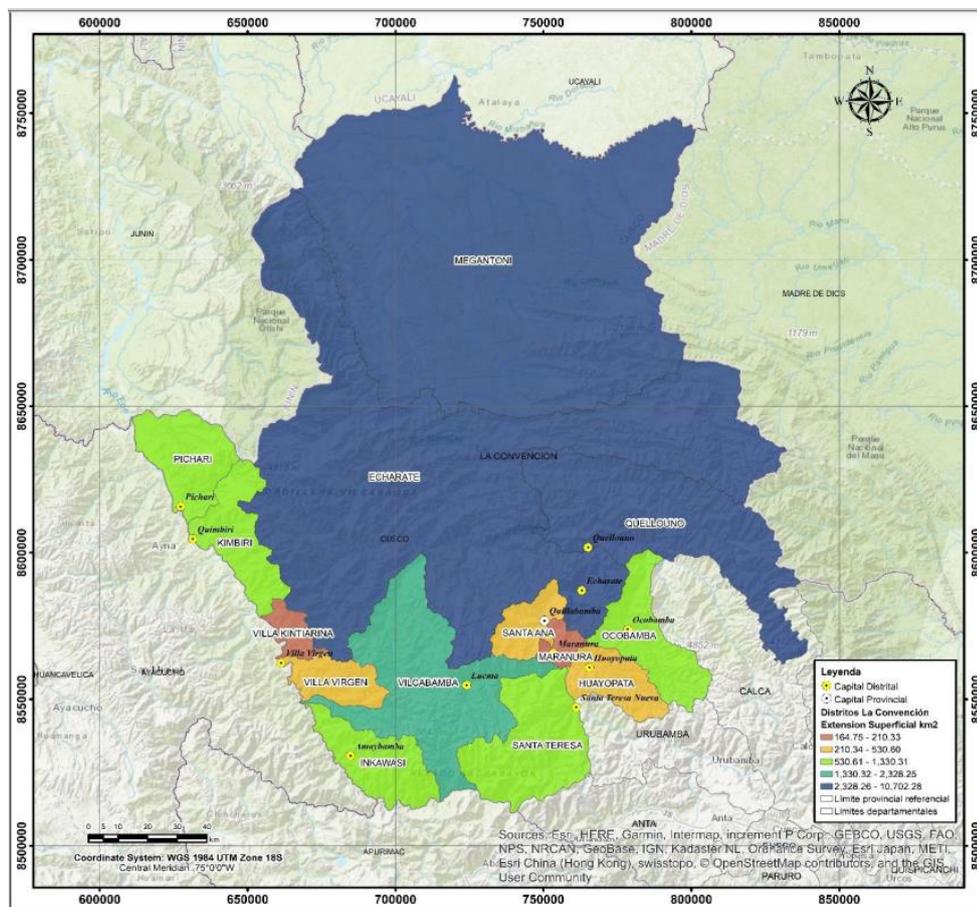
### 3.2 UBICACIÓN DE LAS ZONAS DE MUESTREO

La recolección de esporas de *H. vastatrix*, se realizó en las zonas cafetaleras de Quillabamba (Región Cusco) y Villa Rica (Región Pasco), las cuales se encuentran distanciadas geográficamente y están consideradas dentro del grupo de las regiones cafetaleras con mayor producción de café en el Perú (Figura 14).



**Figura 14. Localización en el mapa del Perú de los predios donde se recolectaron las hojas de café con roya amarilla**

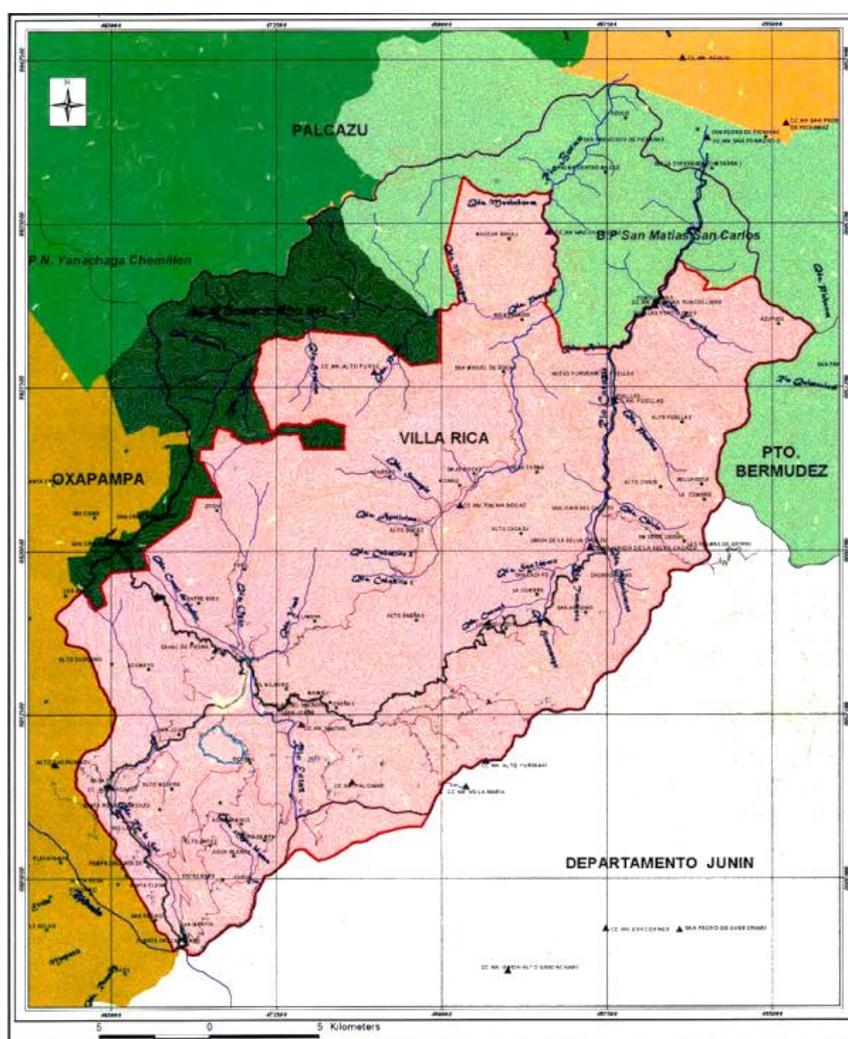
- Quillabamba es la capital de la Provincia de la Convención (Figura 15), la cual limita por el Norte con el departamento de Junín y el departamento de Ucayali; por el Este con el departamento de Madre de Dios; por el Sur con las provincias de Calca, Urubamba y Anta; y, por el Oeste con el departamento de Ayacucho y el departamento de Apurímac. El clima de la convención es tropical, con régimen térmico semi cálido y con abundante precipitación distribuida en dos estaciones (lluviosa y seca), la temperatura media anual es 15.4°C, sin embargo, esta es muy variable debido a las grandes diferencias topográficas. Es así que en las zonas más frías (Cordillera Vilcabamba) tienen temperaturas medias de 2°C, mientras que en las zonas más bajas (bajo Urubamba) registran temperaturas de 23.3°C. La zona de la Convención tiene una precipitación total anual de aproximadamente 1275 mm (ZEE 2005).



**Figura 15. Delimitación de la zona productora de café de la Provincia de la Convención**

Fuente: Municipalidad Provincial de la Convención

- Villa Rica, limita por el Norte y Noreste, con el bosque de protección San Matías San Carlos; por el Este con el bosque San Matías San Carlos, Región Junín y Distrito de Puerto Bermúdez; por el Sur con la Región Junín - río Paucartambo, río Entaz; por el Oeste con la provincia de Oxapampa y área de conservación Municipal Bosque Sho'llet, y por el Noroeste con el área de conservación Municipal Bosque Sho'llet (Figura 16). Villa Rica se encuentra entre las formaciones ecológicas bosque muy húmedo subtropical y bosque húmedo sub tropical. Su clima es de tipo semi cálido húmedo, con estación invernal eventualmente seca y temperaturas mínimas algo frías, con una media anual de precipitación pluvial alrededor de los 1500 mm (INDECOPI 2011).



**Figura 16. Delimitación de la zona productora de café de Villa Rica**

Fuente: Denominación de origen del café (INDECOPI 2011)

### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1 Obtención de las secuencias de la región ITS - ADNr

##### 3.3.1.1 Extracción, determinación de la calidad y cuantificación del ADN de *Hemileia vastatrix*

La extracción de ADN genómico de *H. vastatrix* se realizó a partir de 30 - 50 mg de uredosporas, de acuerdo al protocolo descrito por Cristancho *et al.* (2007) con modificaciones.

Las uredosporas fueron aisladas de pústulas de hojas de café infectadas, las cuales fueron llevadas a tubos de 1.5 ml, posteriormente, se adicionó a cada tubo 300 µL de buffer de lisis (50 mM de tris HCL; 50 mM de EDTA a pH 8; 3 por ciento de SDS; 1 por ciento de betamercaptoetanol), después, las uredosporas en el buffer de lisis fueron maceradas hasta fraccionarlas con ayuda de un pistilo de polipropileno durante 45 minutos. Luego, la solución macerada fue llevada al horno microondas durante 45 segundos, cuidando de que no muestre ebullición. Se volvió a adicionar a cada tubo 300 µL de buffer de lisis. Seguidamente, los tubos fueron agitados en un vortex e incubados en baño maría a 80°C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar las muestras hasta llegar a 50°C, posteriormente, se les agregó 10 µL de proteinasa K (0.5 mg/mL) a cada tubo; luego, se agitaron en un vortex, e incubaron a 50°C durante 30 minutos. A continuación, se le agregó a cada tubo 700 µL de una solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1), las muestras fueron mezcladas suavemente hasta obtener una emulsión y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionó el mismo volumen de solución de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1); se mezcló suavemente y se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 10 minutos, este procedimiento se repitió dos veces. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el ADN, adicionando dos volúmenes de isopropanol frío, y se almacenó a -20°C durante 16 horas. El pellet de ADN se obtuvo

centrifugando las muestras a 10000 rpm a 4°C durante 5 minutos; luego, se eliminó el sobrenadante y los pellets fueron lavados con 480 µL de etanol al 70 por ciento y 120 µL de NaCl 5M; adicionalmente, se realizaron dos lavados del pellet resultante, el primero con etanol al 70 por ciento y el segundo con etanol al 96 por ciento. Los pellets de ADN se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendieron en 40 µL de buffer TE.

Para eliminar el ARN se realizó la digestión con ARNasa (Novagen) para lo cual se agregó a cada muestra 0.5 µL ( $5 \times 10^{-3}$  mg/mL) de enzima y se incubó a 37°C por 30 minutos; luego para desactivar la enzima se incubó a 65°C por 10 minutos.

La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento. Como tampón de corrida electroforética se utilizó TBE 1X. En cada pozo del gel se colocó 1 µL de ADN con 8.9 µL de tampón de carga 1X y 0.1 µL de *Gel Red Nucleic Acid Stain* (Biotium®) 1:10. Su visualización se realizó bajo luz UV (UV SOLO TS imagen system®).

Para determinar la concentración y calidad del ADN se utilizó el espectrofotómetro Epoch (Biotek®).

### **3.3.1.2 Amplificación mediante PCR de la región ITS - ADNr y transformación de *E. coli***

Las regiones ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S del ADNr fueron amplificadas mediante PCR empleando los iniciadores universales ITS1-L e ITS4-R (White *et al.* 1990) (Cuadro 3), como referencia se utilizó el protocolo descrito por Cristancho *et al.* (2007).

### Cuadro 3: Lista de iniciadores

N°	Referencia	Iniciador	Secuencia
1	White <i>et al.</i> 1990	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
2	White <i>et al.</i> 1990	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

La amplificación se realizó en un volumen de 10 µL conteniendo: 1X de buffer de PCR (Qiagen®), 2 mM de dNTPs (Thermo Fisher Scientific®), 0.4 µM de cada iniciador, 1.5 Unidades de Taq polimerasa (*Hifidelity polimerase kit* Qiagen®) y 40 ng de ADN. El programa de amplificación consistió de una etapa inicial a 95 °C por 5 minutos; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1.5 minutos, alineamiento a 60 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 2 minutos; y un paso final de extensión a 72 °C por 5 minutos.

Cada muestra fue amplificada con seis repeticiones para obtener un volumen final de 60 µL. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento. Los fragmentos de ADN correspondientes a la región ITS de aproximadamente 1000 pb (Santana *et al.* 2018) fueron cortados del gel de agarosa y purificados utilizando el *QIAquick gel extracción Kit* (Qiagen®) según las instrucciones del fabricante (Anexo 1). Una alícuota del producto de PCR purificado fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa con la finalidad de verificar la presencia de solo la región de ADN deseada.

La reacción de ligación entre el producto de PCR purificado (región ITS) y el *pGEM®-T easy Vector*, se realizó en un volumen final de 10 µL, conteniendo 5 µL de *2X Rapid Ligation Buffer*, *T4 DNA Ligase*; 1 µL de *pGEM®-T Easy Vector* (50 ng), 1 µL de *T4 DNA Ligase* (3 Weiss units/µl) y 50 ng de producto de PCR purificado. La mezcla de reacción se incubó a 4 °C durante toda la noche.

Para calcular la cantidad de producto de PCR a utilizar se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{50 \text{ ng del vector} \times 1.0 \text{ kb del inserto}}{3.0 \text{ kb del vector}} \times \frac{3}{1} = 50 \text{ ng del inserto}$$

La transformación se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo del Kit *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega®), con modificaciones (Anexo 2). Se utilizó la cepa DH5α de *E. coli*. Se preparó placas conteniendo medio LB, Miller (Luria Bertani) con Ampicilina (100 µg/µL), IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside), seguidamente se centrifugaron los tubos conteniendo las reacciones de ligación. Se extrajeron las células ultra competentes (100 µL) del congelador de -80 °C a un recipiente con hielo, se dejó descongelar las células durante cinco minutos, seguidamente se adicionó 2 µL de la reacción de ligación al vial de las células, se mezcló suavemente, y se dejó en hielo durante 20 minutos, luego, se dio un shock térmico a 42 °C durante 1 minuto y 30 segundos, inmediatamente se retornó los tubos sobre hielo y se incubó por dos minutos. Seguidamente, se añadió 900 µL de medio SOC (2 por ciento de triptona, 0,5 por ciento de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa) a temperatura ambiente. Finalmente, los tubos se incubaron a 37 °C por 1.5 horas a 150 rpm.

Luego de la incubación se vertieron los 1000 µL del cultivo transformado sobre las placas conteniendo medio LB, ampicilina (100 µg/µL), IPTG (800 mM) y X-Gal (50 mg/ml). Las placas fueron incubadas aproximadamente 16 horas a 37 °C.

Para la secuenciación de la región ITS, se seleccionaron al azar de 8 a 22 colonias de color blanco por cada placa, que correspondieron a una población de *H. vastatrix*. La extracción del plásmido de las colonias de las bacterias seleccionadas se realizó a partir de 5 mL del medio de cultivo LB con ampicilina (100 µg/ µL), utilizando el kit *Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System* de PROMEGA según las instrucciones del fabricante (Anexo 3).

La verificación de la transformación se realizó mediante digestión empleando la enzima de restricción EcoRI. La reacción de digestión se efectuó en un volumen final de 10 µL, conteniendo 1X del EcoRI NEB Buffer, 10 U de la enzima EcoRI y 1 µg del ADN del plásmido. La presencia del inserto fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 por ciento. Finalmente, los plásmidos que contenían los fragmentos de ADN de interés fueron enviados a GenBiotech (Argentina) y Macrogen (Seoul - Korea) para su secuenciación.

### **3.4 ANÁLISIS DE DATOS**

#### **3.4.1 Estudio de la diversidad genética y estructura poblacional de *Hemileia vastatrix* procedente de las zonas productoras de café de Quillabamba y Villa Rica muestreadas en los años 2014 y 2018**

##### **a. Alineamiento y edición de las secuencias de la región ITS-ADNr**

Las secuencias fueron editadas utilizando el programa CodonCode Aligner v. 2.0.6 y alineadas mediante el programa MAFFT implementado en la plataforma UGENE (Golosova *et al.* 2014). Posterior al alineamiento, se editaron manualmente algunas regiones con gaps utilizando el programa Aliview V1.22, (Larsson 2014) (Anexos 4, 5 y 6).

## **b. Diversidad genética**

Los índices de diversidad estándar, tales como el polimorfismo ( $S$ ), diversidad haplotípica ( $H_d$ ), número de haplotipos y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei y Li 1979) fueron calculados con el programa DNAsp v 6 (Rozas *et al.* 2017).

## **c. Historia demográfica poblacional**

Para detectar desviaciones del modelo neutral de Wright-Fisher, los valores de  $D$  de Tajima (Tajima 1989),  $D^*$  y  $F^*$  de Fu y Li (Fu y Li 1993) y  $F_s$  de Fu (Fu 1997) fueron calculados utilizando el software DNAsp V6 (Rozas *et al.* 2017). En ausencia de selección natural y migración, una población estable bajo el modelo neutral de Wright-Fisher, se espera que muestre un equilibrio entre la pérdida de variación genética a través de la deriva genética y la acumulación de diversidad a través de la mutación. Esto implica que la selección no está actuando y que la población no ha experimentado ningún crecimiento o contracción reciente (Tajima 1989).

Asimismo, se realizó el análisis de “*mismatch distribution*” (MMD), en base al modelo de crecimiento y disminución poblacional, utilizando el software DNAsp v6 (Rozas *et al.* 2017). Esto con la finalidad de inferir procesos demográficos. Una distribución unimodal indica que las poblaciones han pasado por una expansión demográfica reciente (Excoffier 2004), mientras que las distribuciones multimodales son consistentes con la estabilidad de la población (Slatkin 1991).

El estadístico de Raggedness y las estadísticas de Ramos-Onsins y Rosas  $R^2$  (Ramos-Onsins y Rosas 2002), se utilizaron para evaluar las desviaciones entre los valores observados y los esperados en la distribución de las diferencias pareadas (*mismatch distribution*).

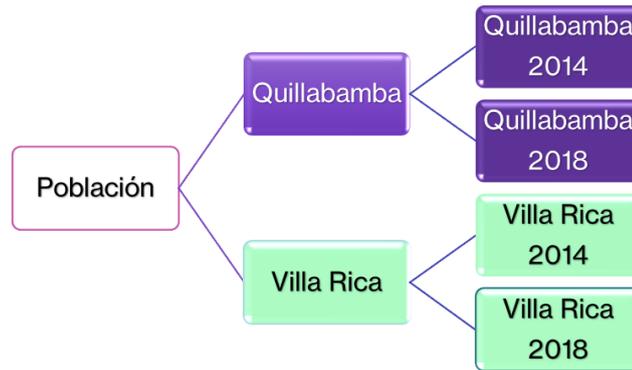
Para reconstruir la historia del tamaño de la población con la información contenida en la genealogía, se realizó un análisis bayesiano (Bayesian skyline plot) (Drummond *et al.* 2005) empleando un reloj estricto con datos de colecta (heterochromus data). El software BEAUti (Bayesian Evolutionary Analysis Utility) v1.6.1 fue utilizado para generar un archivo xml inicial para el software BEAST 2 (Bouckaert *et al.* 2014), empleando un modelo de horizonte bayesiano (bayesian skyline), para lo cual se utilizó un modelo de sustitución nucleotídica de GTR con parámetro gamma. La corrida consistió de una cadena de longitud de  $35 \times 10^7$  con un muestreo cada 2000 y un 10 por ciento de descarte (burning). La incertidumbre del análisis fue indicada por un 95 por ciento de densidad posterior alta (95 por ciento HPD). Una adecuada mezcla de las cadenas de Markov Monte Carlo (Markov chain Monte Carlo – MCMC) fue evaluada mediante el tamaño efectivo de muestreo (effective sample size - ESS) de cada parámetro. Solo parámetros estimados con ESS > 200 fueron aceptados (Anexo 7). El gráfico del análisis bayesiano fue construido utilizando el software Tracer v. 1.7 (Rambaut *et al.* 2018).

#### **d. Estructura genética poblacional de *Hemileia vastatrix***

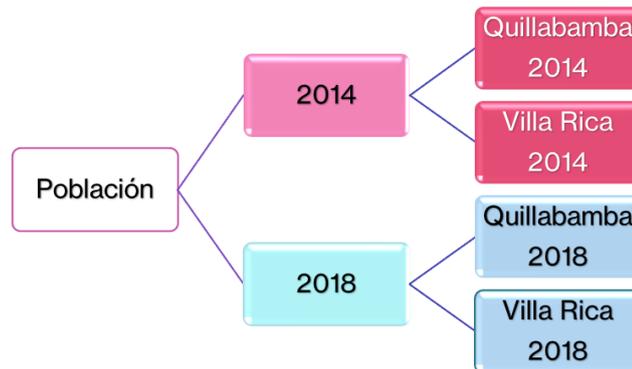
La inferencia de los grupos genéticos del patógeno y el conocimiento de su divergencia y distribución fueron evaluados utilizando diferentes métodos, los cuales están divididos conceptualmente entre los que evalúan las poblaciones a priori (Análisis de la varianza molecular - AMOVA) y las que encuentran agrupaciones de novo (el Análisis discriminante de componentes principales - DAPC) (Miller *et al.* 2020). Asimismo, se utilizó un análisis de aislamiento por distancia el cual fue evaluado mediante el test de Mantel (Mantel 1967).

El análisis de distribución de la variabilidad genética y los índices de fijación fueron determinados mediante el análisis de variancia molecular (AMOVA), utilizando el programa Arlequin Versión 3.5 (Excoffier y Lischer 2010). En este estudio, se realizaron dos análisis, el primero agrupado por origen geográfico (A) y el segundo agrupado por años (B) (Figura 17).

A



B



**Figura 17. Estructuración en el espacio y tiempo de las poblaciones de *Hemileia vastatrix* para realizar el análisis de AMOVA**

En el análisis de la estructura poblacional con DAPC (Jombart *et al.* 2010), las secuencias alineadas fueron importadas a R (R development Core Team 2014), utilizando el software *ape* (Paradis *et al.* 2004), y los polimorfismos de nucleótidos únicos (single nucleotide polymorphism - SNPs) fueron extraídos de las secuencias mediante el paquete *adegenet* (Jombart y Ahmed 2011). El análisis se realizó de novo, utilizando el paquete *adegenet* implementado en R, el número óptimo de grupos genéticos (K) se determinó mediante la selección del valor más bajo de la estadística del criterio de información

bayesiano (BIC) de *find.clusters*. El número óptimo de componentes principales (PCs) a utilizar en el DAPC fue determinado utilizando el comando *optim.alpha.score*.

La correlación entre la similitud genética y la distancia geográfica entre muestras de *H. vastatrix* (El aislamiento por distancia) fue determinada utilizando el test de Mantel (Mantel 1967) con 9999 réplicas, mediante el paquete estadístico *ade4* (Chessel *et al.* 2004) implementado en R (R development Core Team 2014). La matriz de distancia geográfica fue generada, calculando la distancia entre las zonas de muestreo de *H. vastatrix* utilizando los sistemas de coordenadas geográficas, luego, fue comparada con la matriz de las distancias genéticas obtenida mediante el modelo de sustitución de NT93 (Tamura y Nei 1993) utilizando el paquete estadístico *ape* (Paradis *et al.* 2004) implementado en R (Core Team 2014).

#### **e. Construcción de la red haplotípica**

Para la observación de las relaciones entre los 116 haplotipos (relaciones filogenéticas intraespecíficas), se construyó una red utilizando el algoritmo Median Joining (MJ) (Bandelt *et al.* 1999) implementado en el programa PopArt (Leigh y Bryant 2015).

### 3.4.2 Análisis de la distribución de la variabilidad genética de *Hemileia vastatrix* en diferentes pisos altitudinales

#### a. Estructura poblacional de *Hemileia vastatrix* a diferentes pisos altitudinales

Considerando la población de *H. vastatrix* como una población grande y no estructurada por origen geográfico (Quispe-Apaza *et al.* 2017), se realizó el AMOVA por pisos altitudinales, con la finalidad de analizar la distribución de la variabilidad genética de la población del patógeno entre y dentro de los diferentes pisos altitudinales, la cual fue definida por rangos de altura de 1033 -1478 m s. n. m. (bajo) y 1776 - 2060 m s. n. m. (alto) (Liebig *et al.* 2019) (Cuadro 4).

**Cuadro 4: Información de los predios seleccionados por estar localizados entre los 1033-2076 m s. n. m., donde se muestrearon hojas infectadas con *Hemileia vastatrix***

<b>Pedio</b>	<b>Clave de las muestras compuestas</b>	<b>Número de secuencias</b>	<b>Altitud (m s. n. m.)</b>
Cocla	HVQ_1	10	1033
Maranura	HVQ_2	9	1152
Potrero	HVQ_15	11	1319
Rosalia	HVV_9	8	1391
Cruzeiro	HVV_7	9	1478
Aicahuaman/Marcelo	HVV_11	11	1750/1776
Santa Teresa	HVQ_4	10	1865
Huayopata	HVQ_12	12	1879
Santa teresa	HVQ_14	11	2060
Centro Bayona	HVQ_5	10	2076

**HVQ:** *Hemileia vastatrix* colectadas en la zona cafetalera de Quillabamba

**HVV:** *Hemileia vastatrix* colectadas en la zona cafetalera de Villa Rica

### **3.4.3 Evaluación de las relaciones filogenéticas entre *Hemileia vastatrix* peruanas, colombianas, brasileñas y del Centro de Investigaçã das Ferrugens do Cafeiro**

La red haplotípica y el árbol filogenético fueron utilizadas para construir las relaciones filogenéticas de *H. vastatrix*, procedentes de Quillabamba y Villa Rica muestreadas en los años 2014 y 2018, utilizando las secuencias de la región ITS - ADNr. Adicionalmente, se utilizaron las secuencias de la región ITS de *H. vastatrix* almacenadas en el GenBank, que corresponden a *H. vastatrix* de Brasil, Colombia, y del CIFC (Cristancho *et al.* 2007; Santana *et al.* 2018) (Cuadro 5). Para el análisis filogenético, como secuencia fuera de grupo se utilizó la secuencia de *Puccinia porri* (KY492364.1).

**Cuadro 5: Lista de poblaciones de *Hemileia vastatrix* que fueron utilizadas en el análisis de relaciones filogenéticas**

<b>ID</b>	<b>Abreviación</b>	<b>Población</b>	<b>Origen geográfico</b>	<b>Referencia</b>
MF627747.1- MF627751.1	B1	Raza II	*CIFC, Oeiras- Portugal	Santana <i>et al.</i> 2018
MF627752.1- MF627755.1	B2	Raza II	Viçosa-Brasil	Santana <i>et al.</i> 2018
MF627756.1- MF627760.1	B3	Raza II	*CIFC, Oeiras- Portugal	Santana <i>et al.</i> 2018
MF627761.1- F627767.1; MF627771.1	B4	Raza I	Caratinga-Brasil	Santana <i>et al.</i> 2018
MF627768.1- MF627770.1	B5	Raza III	Campinas-Brasil	Santana <i>et al.</i> 2018
EF394119.1	EF394119.1	Raza XXII- 637	*CIFC, Oeiras- Portugal	Cristancho <i>et al.</i> 2007
EF394120.1	EF394120.1	Raza II-1126	*CIFC, Oeiras- Portugal	Cristancho <i>et al.</i> 2007
EF394122.1	EF394122.1	Raza XXII- 535	*CIFC, Oeiras- Portugal	Cristancho <i>et al.</i> 2007
MF627772.1- MF627828.1	MF	Población de campo	Brasil	Santana <i>et al.</i> 2018
EF394118.1- EF394132.1	EF	Población de campo	Colombia	Cristancho <i>et al.</i> 2007
MW477031- MW477135	HVQ	Población de campo	Quillabamba- Perú 2014-2018	Quispe- Apaza C <i>et al.</i> 2021
MW477136- MW477236	HVV	Población de campo	Villa Rica-Perú 2014-2018	Quispe- Apaza C <i>et al.</i> 2021

**a. Análisis filogenético mediante el método de la unión por la mediana (Median Joining)**

Para la observación de las relaciones entre los haplotipos (relaciones filogenéticas intraespecíficas), se construyó una red utilizando el algoritmo Median Joining (MJ) (Bandelt *et al.* 1999) implementado en el programa PopArt (Leigh y Bryant 2015).

**b. Análisis filogenético mediante Inferencia Bayesiana**

La inferencia bayesiana de la filogenia de las secuencias ITS - ADNr se realizó con el software MrBayes v 3.2.7 (Huelsenbeck y Ronquist 2001), cuatro cadenas independientes fueron corridas para 10 000 000 de generaciones con una longitud de *burning* del 25 por ciento (descarte del 25 por ciento de árboles inicialmente muestreados) (Anexos 8, 9, 10, 11) y una frecuencia de muestreo de 1 000 generaciones. Tres cadenas calientes y una fría fueron utilizadas y el análisis fue corrido dos veces. El modelo de evolución para las secuencias de ADN más apropiado fue el GTR + I +  $\Gamma$  (Anexo 12), el cual fue estimado utilizando phangorn v2.5.5 (Schliep 2011), un paquete para el análisis y reconstrucción filogenética en lenguaje R (R development Core Team 2014). El alcance de la fase estacionaria y la mezcla para todos los parámetros fue visualizado utilizando Tracer v1.7 (Rambaut *et al.* 2018) y finalmente la anotación del árbol filogenético generado por MrBayes fue realizado por el software FigTree v1.4.2 (Rambaut 2014).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LA REGIÓN ITS - ADN<sub>r</sub>

#### 4.1.1 Extracción, determinación de la calidad y cuantificación del ADN de *Hemileia vastatrix*

La extracción del ADN utilizando el protocolo descrito por Cristancho *et al.* (2007) con modificaciones, permitió obtener ADN de buena concentración, calidad y pureza (Figura 18). La concentración del ADN extraído varió entre 267.5 ng/ $\mu$ L y 1342.5 ng/ $\mu$ L y presentó una relación de absorbancia 260/280 entre 2.13 - 2.22.

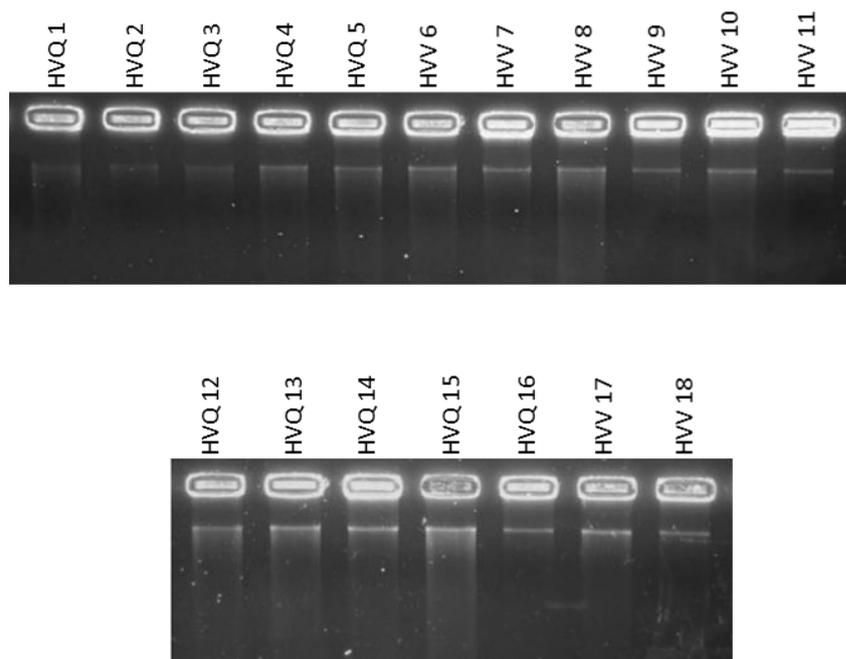
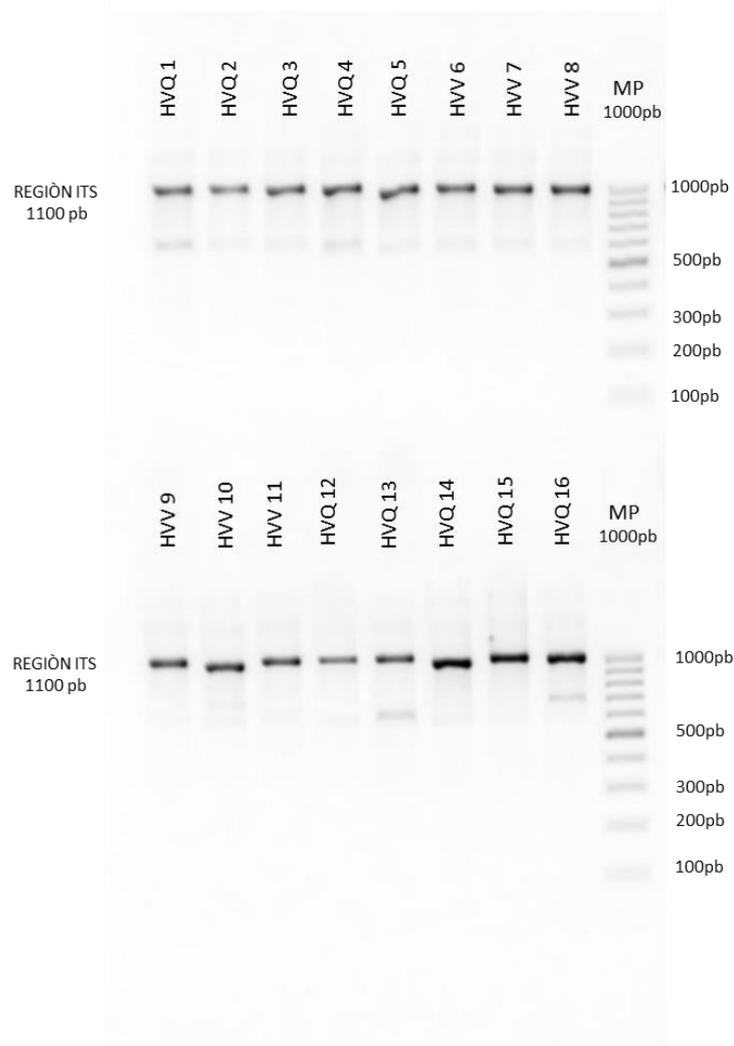


Figura 18. Gel de agarosa al uno por ciento mostrando fragmentos de ADN genómico de *Hemileia vastatrix*

#### 4.1.2 Amplificación mediante PCR de la región ITS - ADNr y transformación de *E. coli*

##### a. Amplificación mediante PCR

La amplificación de los ITS - ADNr mediante PCR del ADN genómico de *H. vastatrix* empleando los iniciadores universales ITS 1 e ITS 4 (White *et al.* 1990) y utilizando como referencia el protocolo descrito por Cristancho *et al.* (2007), ha generado un fragmento de ADN de aproximadamente 1100 pb (Figura 19).

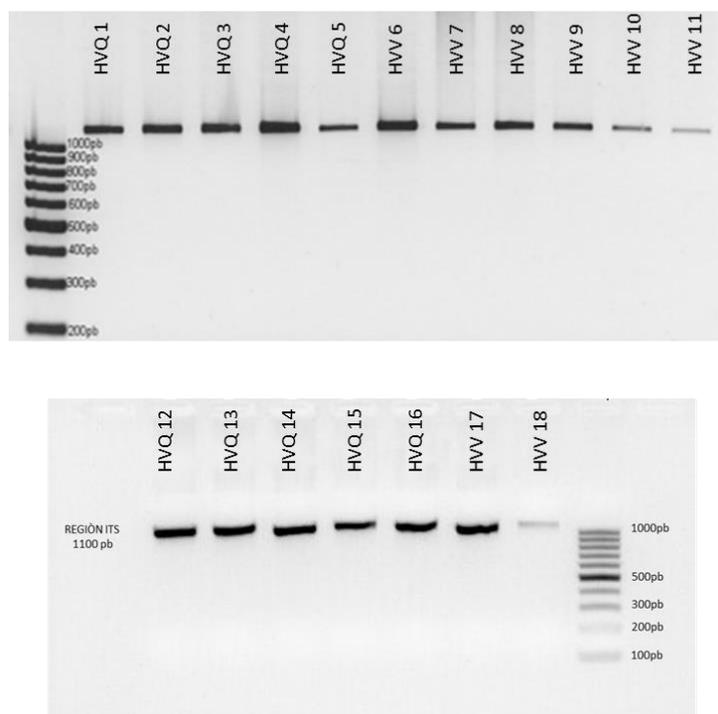


**Figura 19.** Gel de agarosa al dos por ciento mostrando los productos de PCR de 1100 pb amplificados con los iniciadores universales ITS en 16 bulks de ADN de *Hemileia vastatrix*

## b. Purificación del producto de PCR

El kit de purificación QIAquick® de QIAGEN permitió purificar el fragmento ITS - ADNr con buena calidad y concentración. Los valores de concentración estuvieron entre los 25 ng/μL y 60 ng/μL. La relación de absorbancia 260/280 nm varió entre 1.8 y 2.

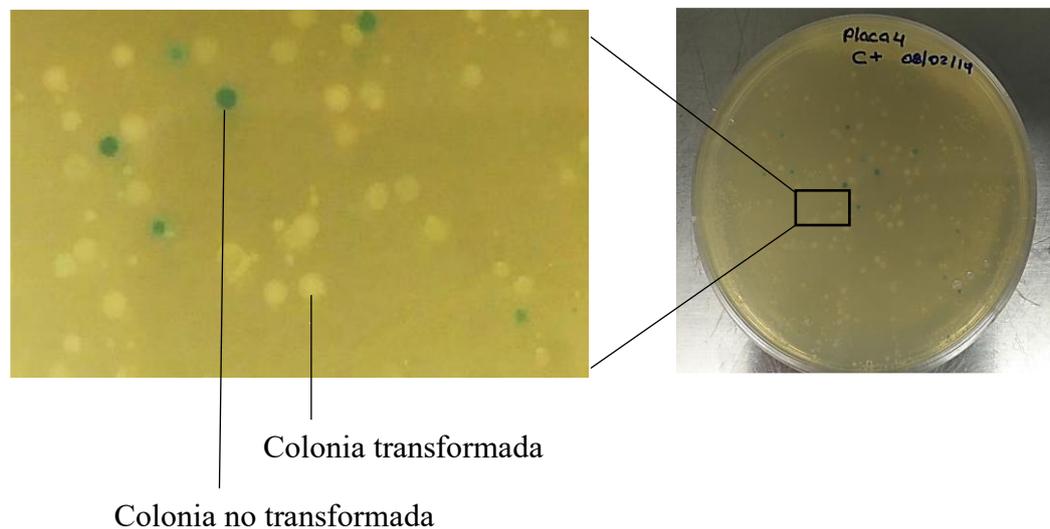
La electroforesis en gel de agarosa al 1.5 por ciento permitió determinar y confirmar la presencia de una sola banda de ADN de aproximadamente 1100 pb, que corresponde a la región ITS - ADNr de *H. vastatrix* (Figura 20).



**Figura 20. Gel de agarosa al 1.5 por ciento mostrando fragmentos de ADN del producto de amplificación de la región ITS - ADNr purificado a partir de gel**

### c. Transformación de *E. coli*

Después de la ligación del producto de PCR purificado (región de interés) con el *pGEM®-T Easy Vector*, las células ultra competentes DH5 $\alpha$ , fueron transformadas exitosamente utilizando el método de choque térmico (Sambrook *et al.* 2001). Los clones recombinantes pudieron ser identificados por su coloración blanca, esto debido a la interrupción de la secuencia que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa. En la Figura 21, se puede observar el crecimiento de las bacterias bajo un medio selectivo, el cual contiene ampicilina, IPTG y X-gal.

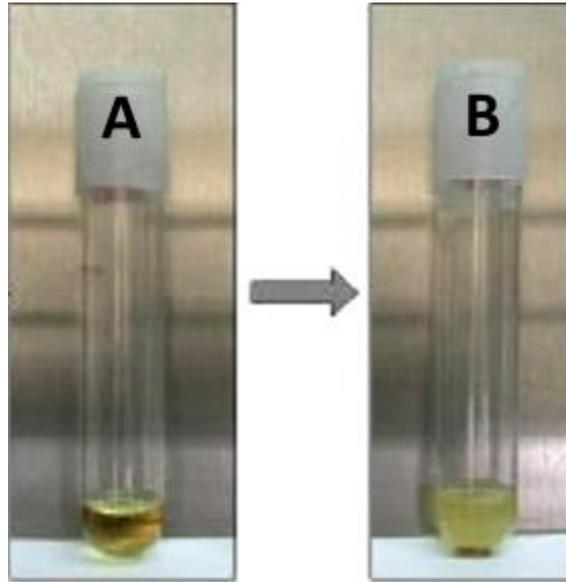


**Figura 21. Placa con medio LB con ampicilina, IPTG y X-gal, mostrando la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) de color blanco y azul**

### d. Selección de colonias transformantes y aislamiento del ADN plasmídico

Por cada placa se eligieron al azar de 8 a 22 colonias de color blanco, con bordes lisos y apariencia cremosa, las cuales fueron sembradas en 5 ml de medio LB (Luria Bertani) con ampicilina. A partir de este medio de cultivo con crecimiento

bacteriano (Figura 22), se realizó la extracción del ADN plasmídico y se cuantificó por espectrofotometría. Los valores de concentración estuvieron entre los 96 ng/ $\mu$ L y 285 ng/ $\mu$ L. La relación de absorbancia 260/280 nm varió entre 1.8 y 2.



**Figura 22. Tubos conteniendo 5 mL de medio LB y ampicilina 100  $\mu$ g/mL. A: momento de siembra; B: después de catorce horas en incubación a 37 °C y 150 RPM, mostrando la turbidez característica del crecimiento de bacterias recombinantes resistentes al antibiótico ampicilina**

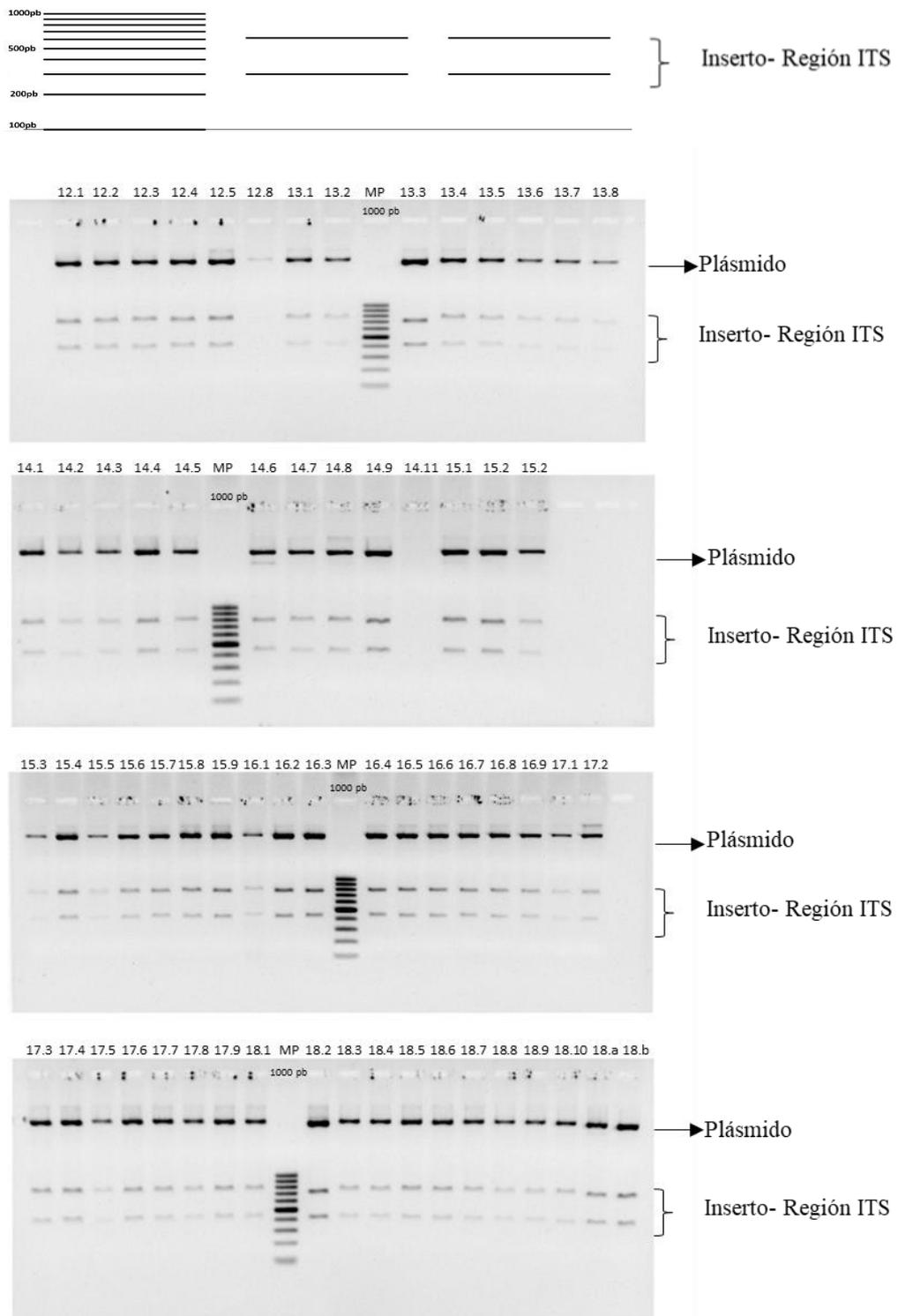
**e. Verificación del vector transformado en *E. coli***

La verificación de la transformación se realizó utilizando la enzima de restricción EcoRI. La presencia del inserto fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 por ciento. De los 221 plásmidos extraídos, 206 presentaron las bandas de interés. Los plásmidos, correspondientes a las primeras 11 subpoblaciones que mostraron las secuencias de ADN de interés fueron enviados para su secuenciación a Gen Biotech (Argentina) y los siete restantes (Figura 23)

fueron enviados a Macrogen (Seoul-Korea), ambos grupos fueron secuenciados mediante el método de Sanger.

Se realizó un mapa de restricción utilizando la enzima EcoRI en una secuencia de *H. vastatrix* de 949 pb utilizando el programa CodonCode Aligner v. 2.0.6, esto con la finalidad de verificar si la secuencia de la región ITS presentaba un único sitio de reconocimiento para la enzima y si los tamaños correspondían a los obtenidos en laboratorio.

In silico los valores que se obtuvieron fueron de 338 pb y 611 pb aproximadamente. En la Figura 23, se reportan tamaños de fragmentos más grandes, esto debido al uso del gel red, el cual reporta tamaños de fragmentos más grandes de los esperados.



**Figura 23. Digestión *in silico* y geles de agarosa al 1.5 por ciento mostrando los fragmentos de ADN de aproximadamente 700 y 400 pb que corresponden a la región ITS cortada en un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Eco RI**

## 4.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Hemileia vastatrix* PROCEDENTE DE LAS ZONAS PRODUCTORAS DE CAFÉ DE QUILLABAMBA Y VILLA RICA MUESTREADAS EN LOS AÑOS 2014 Y 2018

### 4.2.1 Alineamiento y edición de secuencias

A partir de los plásmidos recombinantes que fueron enviados a secuenciar en los dos sentidos con los cebadores ITS1 e ITS4, se obtuvieron en total 206 secuencias. La comparación de estas secuencias con las registradas para la misma especie en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) permitió identificar cuatro regiones (Figura 24): de la posición 1 a la 223, corresponde a la Región **ITS1** (Secuencia Completa); de la 224 a la 376 a la subunidad **5.8S** del ARN ribosomal (Secuencia completa); de la 377 a la 863 a la Región **ITS2** (secuencia completa) y de la 864 a la 918 a la subunidad **28S** del ARN ribosomal (secuencia parcial).

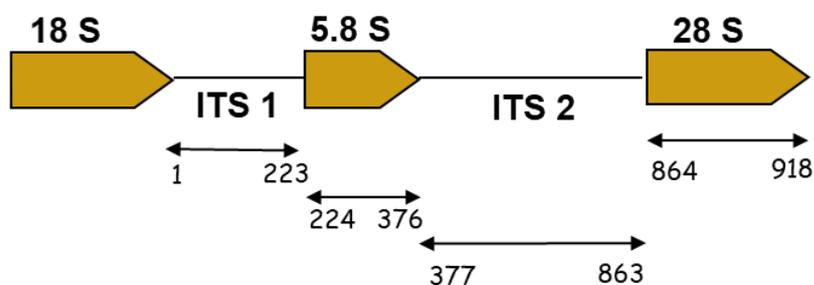


Figura 24. Organización de la región ITS-ADNr de *Hemileia vastatrix*

### 4.2.2 Diversidad genética

El alineamiento de 206 secuencias, resultó en 918 sitios alineados, de los cuales 35 fueron informativos y 145 fueron singletons (Cuadro 6). En base a estos polimorfismos, 116 haplotipos fueron generados, seis de los cuales (5.17 por ciento)

fueron compartidos entre Quillabamba y Villa Rica, mientras que solo dos (1.72 por ciento) fueron encontrados en el 2014 y 2018 (haplotipos Hap\_4 y Hap\_8). Asimismo, 87.07 por ciento de los haplotipos fueron únicos y exclusivos a una sola población, mientras que los nueve haplotipos restantes (7.76 por ciento) estuvieron conformados por dos secuencias cada uno.

La diversidad nucleotídica fue baja, tanto para población total ( $\pi_{\text{Total}} = 0.00322 \pm 0.00018$ ) como cuando fueron analizadas por origen geográfico y años muestreo ( $\pi_{\text{Quillabamba}} = 0.00406 \pm 0.00026$ ;  $\pi_{\text{Villa Rica}} = 0.00292 \pm 0.00023$ ;  $\pi_{2014} = 0.00301 \pm 0.00024$ ;  $\pi_{2018} = 0.00397 \pm 0.00026$ ). Sin embargo, la diversidad haplotípica fue alta, tanto en la población total ( $Hd_{\text{Total}} = 0.9373 \pm 0.0115$ ) como cuando fueron analizados por origen geográfico y años de muestreo ( $Hd_{\text{Quillabamba}} = 0.954 \pm 0.013$  and  $Hd_{\text{Villa Rica}} = 0.933 \pm 0.017$ ;  $Hd_{2014} = 0.934 \pm 0.017$  and  $Hd_{2018} = 0.948 \pm 0.014$ ) (Cuadro 6).

En el agrupamiento de las secuencias por localidades se observó la presencia de 101 sitios polimórficos en la población de la zona cafetalera de Quillabamba, los cuales no se encontraron en la zona cafetalera de Villa Rica. Asimismo, en la población de Villa Rica fueron encontrados 69 sitios polimórficos no encontrados en Quillabamba, y solamente 14 sitios polimórficos fueron compartidos entre ambas poblaciones. Mientras que, cuando se realizó el agrupamiento de las secuencias por años de muestreo se observó en la población del año 2014 la presencia 85 sitios polimórficos los cuales no se hallaron en el 2018. Asimismo, en la población del año 2018 se encontraron 86 sitios polimórficos no encontrados en el año 2014, y solamente 13 sitios polimórficos fueron compartidas entre ambas poblaciones.

**Cuadro 6: Polimorfismo de secuencias de la región ITS-ADNr y diversidad genética de la población de *Hemileia vastatrix* agrupadas por áreas geográficas y años de colecta**

	Por años		Por origen geográfico		Población total
	2014	2018	Quillabamba	Villa Rica	
Número de secuencias	106	100	105	101	206
Gaps	20	19	20	19	24
Sitios invariables	801	799	782	815	714
Sitios polimórficos (S)	97	100	116	84	180
Sitios singletons	89	76	100	66	145
Sitios informativos	8	24	16	18	35
Número de haplotipos (H)	65	56	67	57	116
Diversidad haplotípica (Hd)	0.934 +/- 0.017	0.948 +/-0.014	0.954 +/- 0.013	0.933 +/- 0.017	0.9373 +/- 0.0115
Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )	0.00301 +/- 0.00024	0.00397 +/-0.00026	0.00406 +/- 0.00026	0.00292 +/- 0.00023	0.00322 +/- 0.00018

Estos resultados sugieren que las poblaciones de *H. vastatrix* tienen bajos valores en diversidad nucleotídica pero altos valores de diversidad haplotípica. Althoff y Pellmyr (2002) indicaron que estos valores caracterizan a poblaciones que han pasado por un cuello de botella y un rápido crecimiento poblacional. La alta proporción de singletons podría explicar la alta diversidad haplotípica. Estos resultados también fueron observados por Santana *et al.* (2018) en una población de *H. vastatrix* de Brasil utilizando secuencias de la región ITS-ADNr. Similarmente, Silva *et al.* (2018) reportó una alta proporción de singletons en una colección de 37 muestras de *H. vastatrix* utilizando secuenciación de ADN asociado a sitios de restricción (RADseq). De igual manera, utilizando marcadores AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados), Cabral *et al.* (2016), reportaron una baja diversidad genética (diversidad de Nei) para todos los loci ( $h = 0.027$ ) y una mediana diversidad genotípica ( $G = 18.447$  y  $N_1 = 40.394$ ). La baja diversidad genética de este patógeno también fue reportada por Gouveia *et al.* (2005), quienes, encontraron en los aislados de *H. vastatrix* americanos muy baja diversidad genética ( $G_{st} = 0.266$ ) comparada con los aislados africanos ( $G_{st} = 0.865$ ) y aislados asiáticos ( $G_{st} = 0.768$ ). Estos reportes confirman que *H. vastatrix*, tiene una muy baja diversidad genética, debido probablemente al efecto fundador de una población que arribó al continente americano sobre un hospedero con estrecha base genética, sobre la cual se ha estado ejerciendo una baja presión por selección (Gouveia *et al.* 2005).

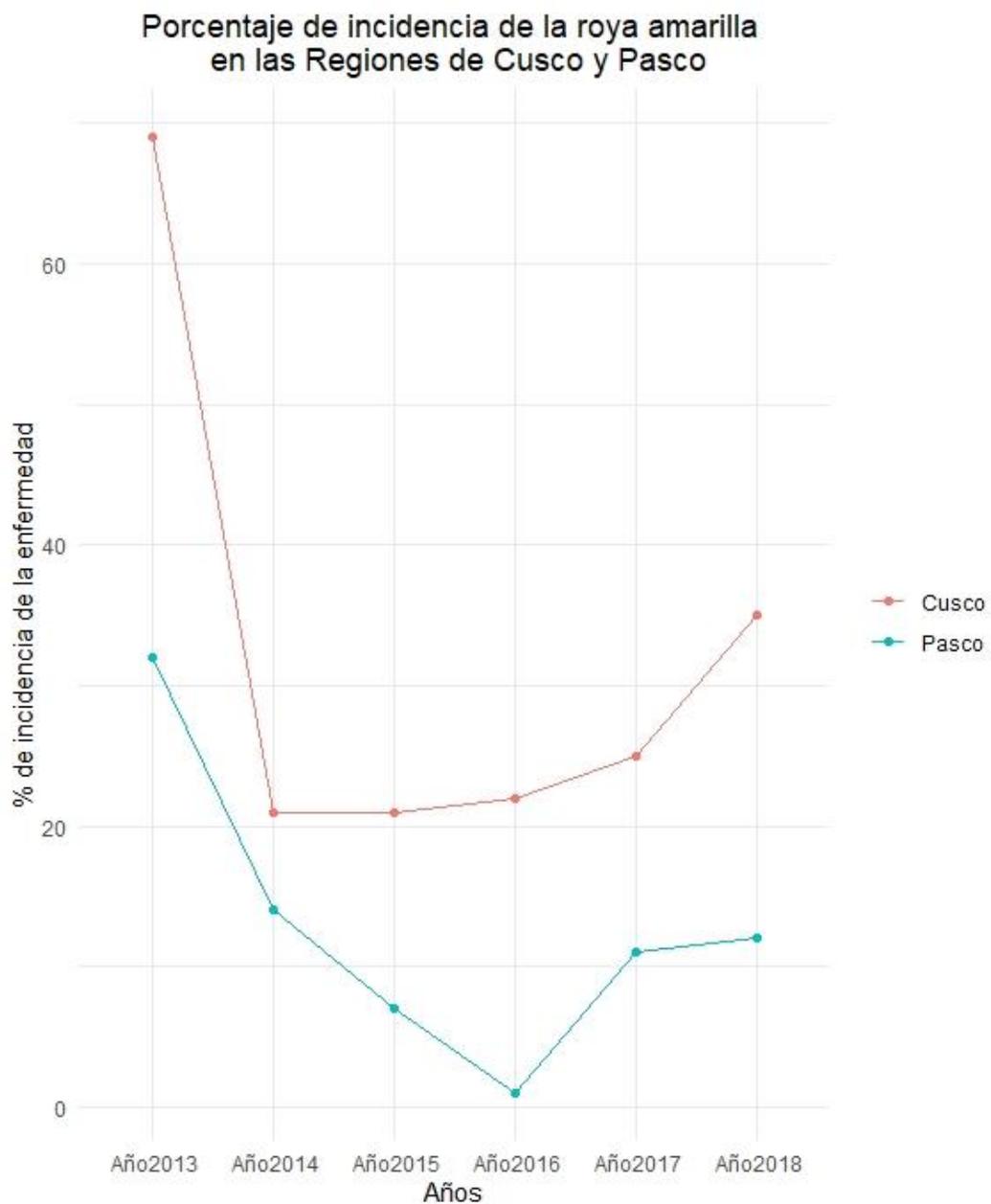
*H. vastatrix* se caracteriza por una alta producción de esporas por pústula (300 000 a 2 millones en 5 meses) (McCain y Hennen 1984), por eso existe una alta probabilidad que surjan nuevas mutaciones en etapas de alta incidencia de la enfermedad, la cual podría generar nuevos alelos, incrementando la variabilidad genética observada en el patógeno. A pesar de la disminución del uso de cultivares susceptibles ocurrida entre el 2014 y 2017 en Quillabamba (de 89.4 por ciento a 42.2 por ciento) y Villa Rica (de 88.6 por ciento a 21.1 por ciento) y el uso de fungicidas para controlar la enfermedad, implementado por el Ministerio de Agricultura y riego (SENASA 2018, dato no publicado), no se observó una reducción severa en la población del patógeno a través de los años. Esto podría estar explicado por la persistencia de variedades de *C. arabica* susceptibles, las cuales representan una constante fuente de inóculo para el desarrollo de la enfermedad (Maia *et al.* 2013).

También, en el Cuadro 6, se observan valores mayores de los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica en la población de la zona cafetalera de Quillabamba ( $Hd = 0.954 \pm 0.013$  y  $\pi = 0.00406 \pm 0.00026$ ). Este resultado guarda relación con la mayor incidencia de la enfermedad en la zona cafetalera de la Región Cusco en comparación con la de Villa Rica en los dos años de evaluación de la incidencia de la enfermedad (Información personal SENASA 2018) (Figura 25). Además, se suma la persistencia de cultivares susceptibles (Figura 26), el tipo de manejo de la enfermedad (Zona principalmente de producción de café orgánico) y del efecto del factor climático sobre el cultivo, ya que presenta características más favorables para la ocurrencia de brotes de la enfermedad e incremento del tamaño de la población del patógeno.

Por otro lado, en las sub poblaciones de roya del año 2014 existe un mayor número de sitios singletons comparado a lo observado en el 2018, esto podría estar evidenciando la fijación de ciertos alelos en las poblaciones de *H. vastatrix*. Se sugiere que la disminución en la proporción de cultivares susceptibles a la enfermedad y el incremento en el porcentaje de área cultivada con variedades resistentes después de la epidemia de la roya amarilla (2013) (Figura 26), podría ocasionar la aparición y fijación de nuevas variantes del hongo, las cuales probablemente estarían adaptándose a un escenario de cambio en el medio ambiente, a nuevos agroquímicos, y la mayor presencia de cultivares con resistencia a la enfermedad. Várzea y Marques (2005), afirman que tanto el uso de agroquímicos como la presencia de cultivares resistentes, conllevan a la fijación de nuevas variantes del hongo a través de selección natural. El primero facilitando la emergencia de resistencia a los productos químicos en el patógeno, y el segundo rompiendo la barrera presente en las variedades resistentes. Se conoce, que la liberación de nuevas variedades resistentes implica la generación de nuevas razas virulentas del hongo, debido a la presión por selección que ejercen estos nuevos cultivares (Várzea y Marques 2005; Cristancho *et al.* 2007; Diniz *et al.* 2012; Kosaraju *et al.* 2017).

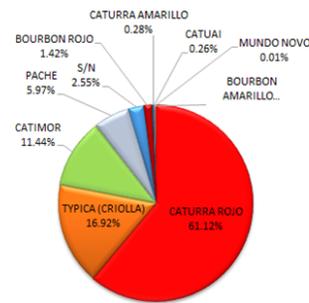
La generación de variabilidad genética en el hongo aún se desconoce, sin embargo, existen reportes contradictorios de estudios realizados a nivel citológico y molecular. Rajendren (1967), reportó la existencia de un fenómeno natural denominado

“fenômeno-Kamat”, donde la cariogamia y la meiosis suceden dentro de la uredospora de *H. vastatrix*. También, Carvalho *et al.* (2011), mediante citometría de flujo encontraron la ocurrencia de reproducción sexual escondida dentro de las esporas asexuales denominándola como criptosexualidad. Sin embargo, Chinnapa y Sreenivasan (1965) rechazaron la hipótesis de recombinación genética. Por otro lado, algunos estudios moleculares fueron incapaces de detectar recombinación y respaldan el estado asexual de *H. vastatrix* (Gouvea *et al.* 2005; Rozo *et al.* 2012), mientras que otros han encontrado evidencia de recombinación en regiones específicas (Cabral *et al.* 2016; Maia *et al.* 2013). No obstante, la alta diversidad genotípica podría estar atribuida a la presencia de criptosexualidad, lo cual aún es un tema debatible. Otros factores que podrían explicar el surgimiento frecuente y rápido de nuevas variantes y la alta diversidad genotípica, hallada en las poblaciones de *H. vastatrix*, en ausencia de reproducción sexual podrían ser: la hibridación entre aislados divergentes (Silva *et al.* 2018); la parasexualidad (Carvalho *et al.* 2011; Wang *et al.* 2009) y la actividad de elementos transponibles (Cristancho *et al.* 2014).

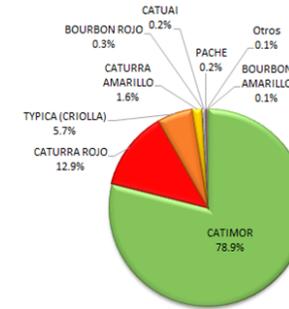


**Figura 25. Porcentaje de incidencia de la roya amarilla del café durante los años 2013 al 2018**

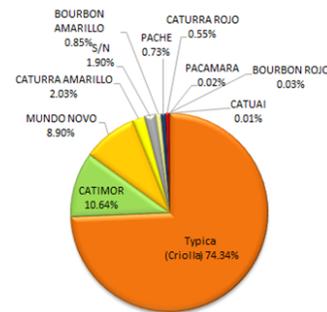
Fuente: SENASA (2018)



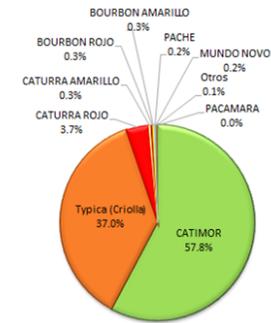
Pasco 2014



Pasco 2017



Cusco 2014



Cusco 2017

**Figura 26. Porcentaje estimado de variedades de café en la Región Pasco y Cusco en los años 2014 y 2017. Caturra: Color rojo, “Typica criolla”: Color anaranjado, “Catimor”: Color verde**

Fuente: SENASA (2018)

### 4.2.3 Historia demográfica

Las desviaciones de un modelo neutral de Wright-Fisher fueron estimadas por pruebas que evalúan la neutralidad. La hipótesis de la evolución neutral, en poblaciones estables muestra un equilibrio entre la generación de variación genética mediante mutaciones y pérdida de la misma por deriva genética en ausencia de selección natural y migración (Kimura 1991). Esta prueba de condiciones de equilibrio provee de una base para la evaluación de la neutralidad, la cual es influenciada por la selección natural y demografía poblacional (Stewart 2015). Por consiguiente, como hipótesis nula se asume que no está actuando la selección natural sobre las secuencias de los ITS - ADN<sub>r</sub> y que las poblaciones no han experimentado ningún crecimiento o contracción reciente que pueda generar un proceso demográfico en la población de *H. vastatrix*.

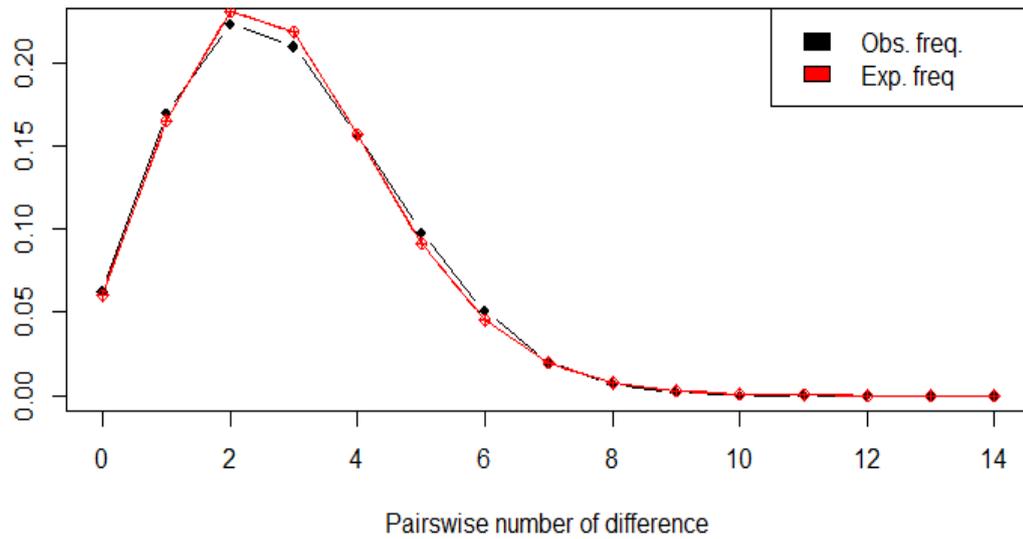
Las estadísticas que evalúan la neutralidad mostraron valores negativos tanto para la población total, así como para los evaluados por años de colecta y por origen geográfico, mostrando una significativa desviación de la neutralidad (Cuadro 7). El valor negativo del estadístico de D de Tajima ( $D = -2.85942$ ,  $P < 0.001$ ) (Tajima 1989) sugiere una expansión poblacional o selección purificadora. De manera similar, el estadístico de  $D^*$  y  $F^*$  mostraron valores negativos ( $D^* = -11.09888$ ,  $P < 0.02$ ;  $F^* = -8.48704$ ,  $P < 0.02$ ), revelando un exceso de haplotipos que podrían haber surgido recientemente, debido a un acontecimiento de expansión poblacional o selección de fondo (background selection) (Fu y Li 1993). Igualmente, el estadístico de  $F_s$  de Fu ( $F_s = -33,181$ ) fue negativo (Cuadro 7) sugiriendo una expansión poblacional o un *autostop* genético (genetic hitchhiking) (Fu 1997). Además, el análisis de distribución de diferencias pareadas (mismatch distribution) mostró una distribución unimodal y un ajuste perfecto a la distribución esperada bajo el modelo de crecimiento y contracción poblacional (Growth-Divide population model) (Figura 27). Asimismo, los estadísticos de Raggedness ( $r$ ), Ramos - Onsins y Rozas  $R^2$ , fueron 0.0242, 0.0068, respectivamente.

El análisis del gráfico del horizonte bayesiano (bayesian skyline plot - BSP), que es un nuevo método para estimar el pasado de la dinámica poblacional a través del tiempo sin depender de un modelo paramétrico preespecifico de la historia

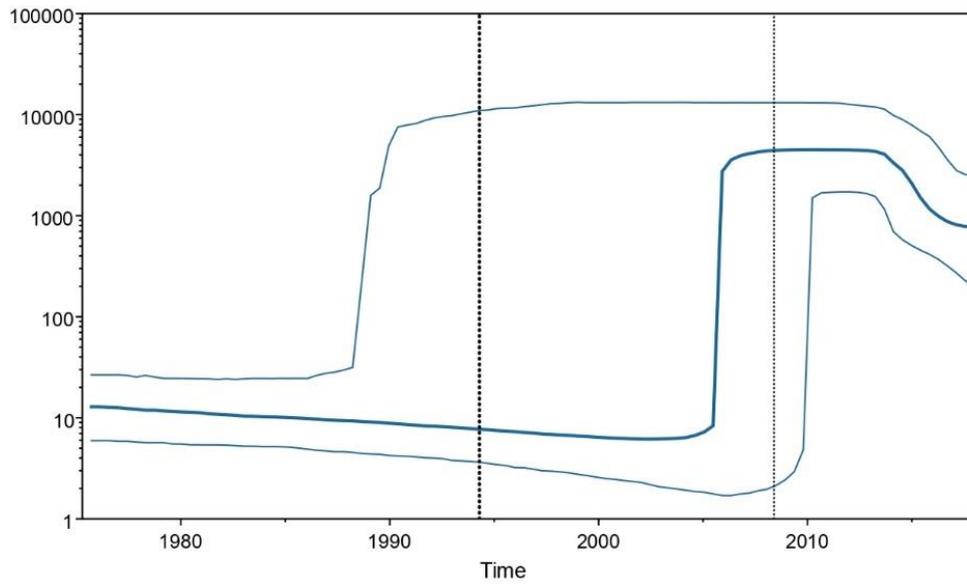
demográfica, reveló una curva en forma de “L” con un 95 por ciento de alta densidad posterior entre los años 1980 - 1989 (Figura 28) y entre los años 2009 - 2018 (Figura 29). El BSP también mostró valores bajos de densidad posterior, la cual está representada por una línea plana y constante desde el año 1989 hasta antes del 2010. Esta región carece de información debido a la dinámica poblacional del patógeno, la cual atraviesa por ciclos de extinción y recolonización (Figura 29).

**Cuadro 7: Valores hallados de los estimadores de neutralidad de la población de *Hemileia vastatrix* analizados por años de muestreo y origen geográfico**

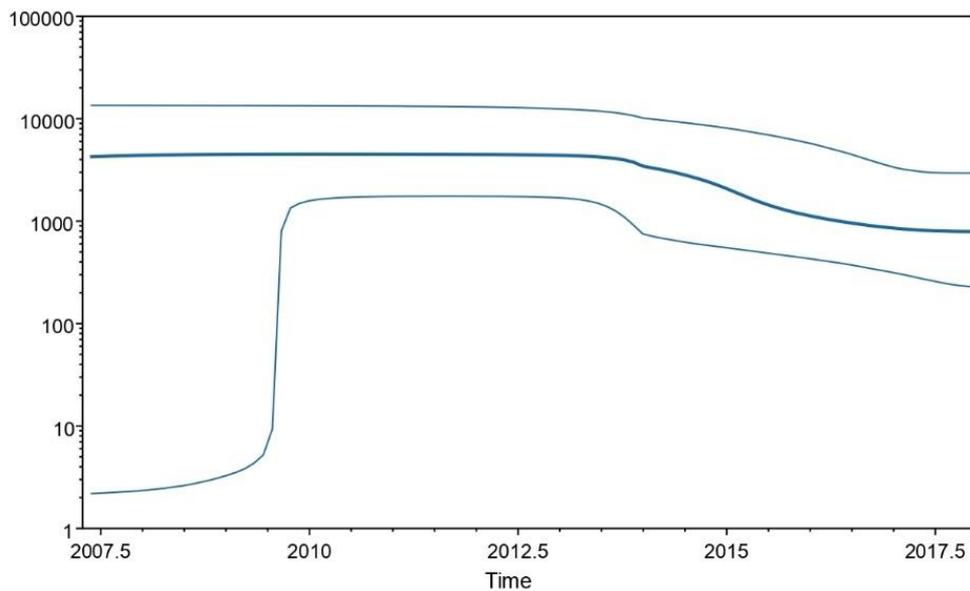
	Por años		Por origen geográfico		Población total
	2014	2018	Quillabamba	Villa Rica	
D de Tajima	-2.80387; P<0.001	-2.683, P<0.001	-2.75712; P<0.001	-2.73547; P<0.001	-2.85942; P<0.001
Fs de Fu	-106.916	-33.792	-97.482	-33.24	-33.181
D* de Fu y Li	-9.18177; P<0.02	-6.99256; P<0.02	-8.60143; P<0.02	-7.18501; P<0.02	-11.09888; P<0.02
F* de Fu y Li	-7.75296; P<0.02	-6.20419; P<0.02	-7.31101; P<0.02	-6.37989; P<0.02	-8.48704; P<0.02



**Figura 27. Distribución de diferencias pareadas (Mismatch Distribution) para todas las combinaciones por pares de 206 secuencias de la región ITS-ADNr de *Hemileia vastatrix*. La línea discontinua (color negro) muestra las frecuencias observadas y la línea continua (color rojo) muestra las frecuencias esperadas bajo el modelo de crecimiento y disminución poblacional**



**Figura 28. Bayesian skyline plot de los ITS - ADNr de *Hemileia vastatrix* del año 1980 al 2018. El eje y muestra el número efectivo de individuos, la línea sólida gruesa es la mediana estimada y las líneas claras delgadas muestran los límites de densidad posterior altos y bajos, y el eje x está en escala de años**



**Figura 29. Bayesian skyline plot de los ITS-ADNr de *Hemileia vastatrix* del año 2007 al 2018**

Los valores negativos de los tres estadísticos que evalúan la neutralidad ( $D$  de Tajima,  $F_s$  de Fu y  $D^*$  y  $F^*$  de Fu y Li), revelan que un elevado número de haplotipos pudo haberse originado recientemente y sugieren que ha ocurrido una expansión poblacional repentina. Esto está relacionado con la característica expansiva y estacional de la reproducción de un hongo patógeno, donde el tamaño de la población se incrementa rápidamente cuando las condiciones ambientales son óptimas para dar inicio a los brotes infecciosos, resultando en un incremento de variantes alélicas/haplotipos, posiblemente ocasionado por mutaciones espontáneas. Esto es luego seguido por un proceso de selección de variantes del hongo que mejor se adapten a su nuevo entorno. Asimismo, estos valores sugieren que las poblaciones del hongo podrían haberse originado de pocos genotipos que fueron recientemente introducidos (efecto fundador), o que ellos podrían ser descendientes de la raza II, la cual según Schieber y Zentmyer (1984) ha existido en el Perú desde 1979. También, estos valores negativos de la neutralidad podrían explicar la presencia de un alto número de haplotipos únicos, los cuales incrementan la variabilidad de *H. vastatrix* y probablemente sea el resultado de un crecimiento poblacional. Por eso, se sugiere que cada brote infeccioso de la roya amarilla del café en las dos zonas cafetaleras del Perú ha estado surgiendo a partir de pocos genotipos de *H. vastatrix*.

Por otro lado, si se asume que la reproducción asexual es el principal método de propagación del patógeno (ocurren eventos de recombinación baja o nula), las secuencias de la región ITS podrían estar asociadas a una región de ADN bajo selección positiva. Maynard-Smith y Haigh (1974), denominaron a este proceso como barrido selectivo (selective sweep), el cual reduce la diversidad neutral en un solo locus de manera análoga al de la deriva genética, por eso muestra características similares a un cuello de botella (Barton 2000; Maynard-Smith y Haigh 1974). Considerando, que la región ITS-ADNr está bajo efectos de barrido selectivos, se sugiere que esta región pudo haber presentado una mutación preexistente en la población ancestral que se volvió ventajosa fuera de su centro de origen (África) y se elevó a una alta frecuencia, la cual podría haber persistido a lo largo del tiempo debido al origen recurrente del mismo alelo. (Hermisson y Pennings 2017).

El análisis de frecuencias pareadas refuerza el crecimiento expansivo de la población de *H. vastatrix* durante las etapas de alta incidencia de la enfermedad. Además, mostró un ajuste exacto bajo el modelo de crecimiento-disminución (Figura 27) debido a la presencia de un alto número de variantes de hongos con baja frecuencia, lo que sugiere que hubo una expansión poblacional repentina por efectos de un cuello de botella y/o barrido selectivo. Este resultado está relacionado con los valores negativos de las pruebas de neutralidad, las cuales indican una significativa desviación de la neutralidad de Wright-Fisher. Sin embargo, no se tiene claro si esta desviación de la neutralidad es causada por *autostop* genético o demografía poblacional, ya que ambos producen potencialmente una alta frecuencia de haplotipos con mutaciones recientes y ligeramente deletéreas que derivan de ellos, produciendo una genealogía en forma de estrella.

Asimismo, BSP también mostró que, de acuerdo a los ITS-ADNr, *H. vastatrix* pudo haber sufrido un evento de cuello de botella (efecto fundador) o un barrido selectivo, seguido de una explosión demográfica (Figura 29). Sin embargo, la Figura 28 muestra una curva casi constante entre los años 2009 y 2018 con un 95 por ciento HPD, la cual evidencia, que a pesar de que la población del patógeno ha sufrido eventos recurrentes de cuello de botella (efecto fundador) o barrido selectivo, el tamaño poblacional de *H. vastatrix* se mantiene grande a través del tiempo, esto debido a los frecuentes ciclos de extinción y recolonización por las que atravesó la población de *H. vastatrix*.

#### **4.2.4 Estructura genética poblacional**

El AMOVA reveló que la población de *H. vastatrix* no está estructurada ni por origen geográfico ni por años de colecta. En el Cuadro 8 se observa un nivel no significativo de estructuración genética entre las poblaciones de *H. vastatrix* de Quillabamba y Villa Rica (FCT = - 0.00124, P = 1+/- 0.0). De forma similar, la variación hallada entre las poblaciones del hongo muestreadas en los años 2014 y 2018 dentro de cada zona (Zona cafetalera) fue baja y no significativa (0.30 por ciento, P = 0.17526 +/-

0.00264). La mayor parte de la variabilidad fue explicada por la variación presente dentro de las poblaciones en los diferentes años (99.82 por ciento;  $P = 0.20053 \pm 0.00271$ ). De igual forma, en el Cuadro 9 se observa la ausencia de estructuración de las poblaciones por años ( $FCT = 0.00059$ ,  $P = 0.33119 \pm 0.00298$ ) con la mayor variación explicada dentro de las zonas productoras sin considerar los años (99.76 231 por ciento,  $P = 0.19693 \pm 0.00316$ ).

En el análisis mediante DAPC, el K óptimo fue 130 (Figura 30) para el gráfico del BIC - criterio de información bayesiano y el número óptimo de PCs retenidos utilizados en el DAPC fue 73 (Figura 31, Anexo 13). Asimismo, la separación en grupos de la población de *H. vastatrix* tanto por origen geográfico como por años de colecta en el diagrama de dispersión del DAPC no fue visualizada (Figura 32), mostrando al igual que el AMOVA una población no estructurada. Asimismo, la prueba de Mantel no fue significativa ( $r = 0.002470158$ ;  $P = 0.2031$ ), indicando la falta de aislamiento genético por distancia geográfica.

**Cuadro 8: Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la población de *Hemileia vastatrix* estructurado en base al origen geográfico**

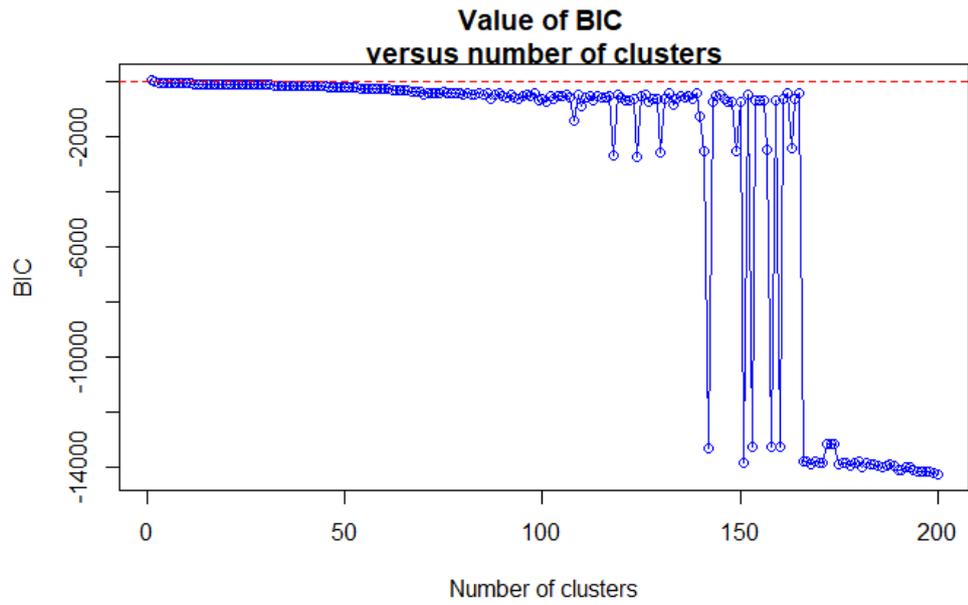
Fuente de variación	*g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación	P-value
Entre zonas cafetaleras	1	1.482	-0.00179	-0.12	F <sub>CT</sub> : -0.00124	1.00000 +/- 0.00000
Entre años dentro de las zonas cafetaleras	2	3.323	0.00439	0.30	F <sub>SC</sub> :0.00304	0.17526 +/- 0.00264
Dentro los años	202	290.448	1.43786	99.82	F <sub>ST</sub> :0.00180	0.20053 +/- 0.00271
Total	205	295.252	1.44046	100	-	-

\*g.l.: Grados de libertad

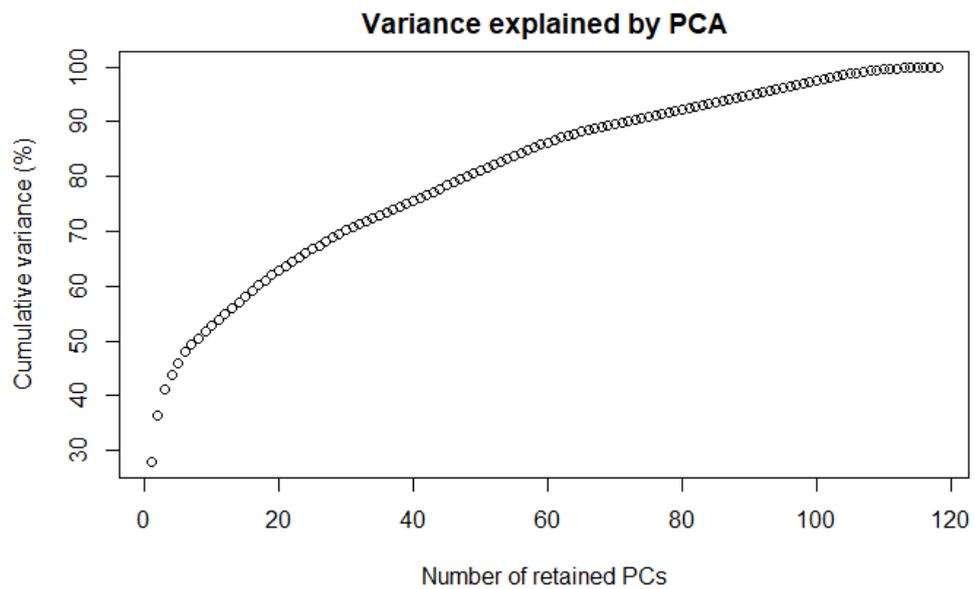
**Cuadro 9: Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la población de *Hemileia vastatrix* estructurado en base a los años de muestreo**

Fuente de variación	*g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación	P- value
Entre años (2014-2018)	1	1.662	0.00085	0.06	F <sub>CT</sub> :0.00059	0.33119 +/-0.00298
Entre zonas cafetaleras dentro de los años	2	3.143	0.00262	0.18	F <sub>SC</sub> :0.00182	0.25532 +/-0.00323
Dentro de las zonas cafetaleras	202	290.448	1.43786	99.76	F <sub>ST</sub> :0.00241	0.19693 +/- 0.00316
Total	205	295.252	1.44133	100	-	-

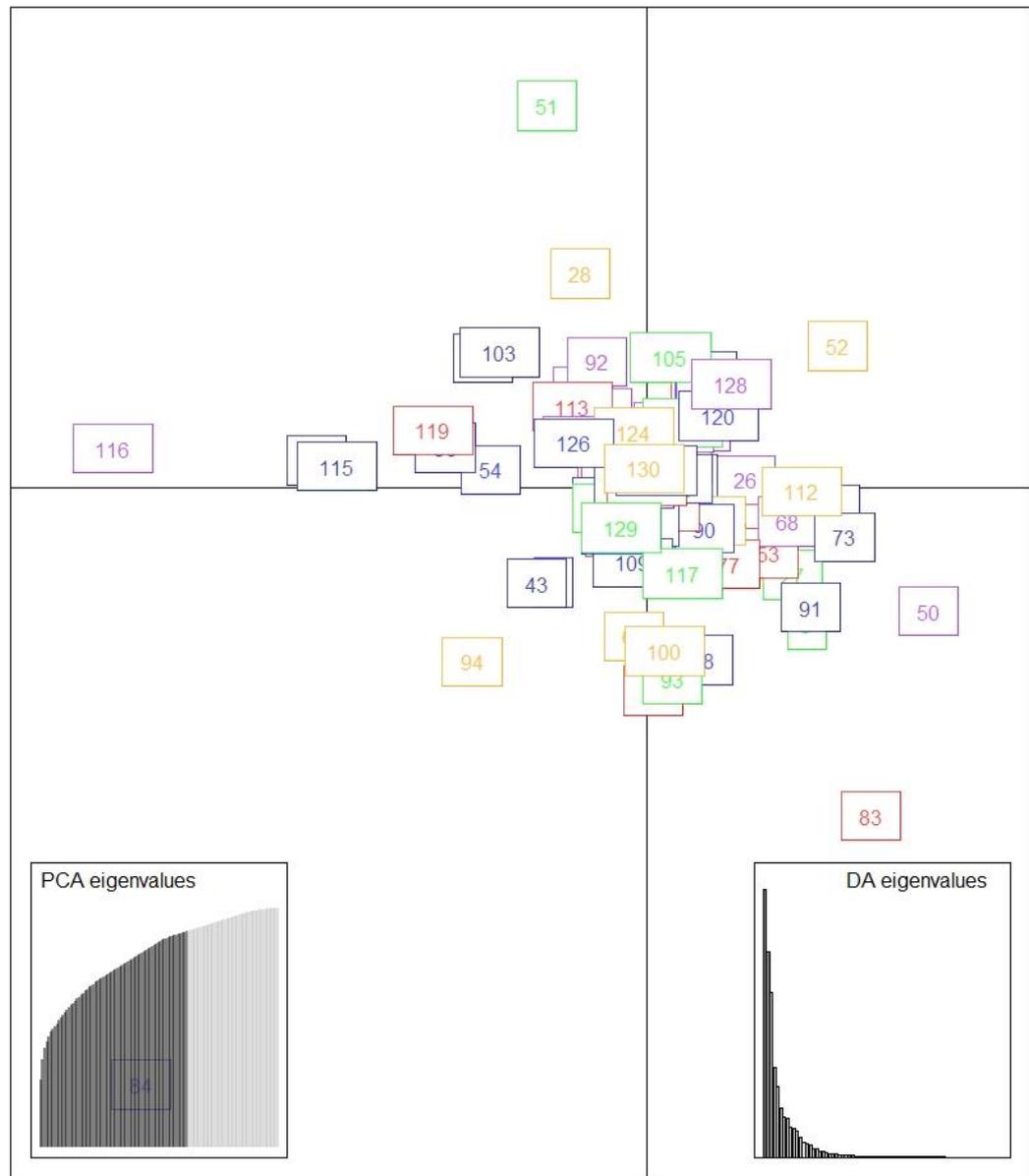
\*g.l.: grados de libertad



**Figura 30. Número de grupos (clusters K) en relación al criterio de información bayesiano (BIC)**



**Figura 31. Varianza acumulada explicada por el análisis de componentes principales (PCA)**



**Figura 32. DAPC de 206 secuencias de la región ITS-ADNr de *H. vastatrix***

Los resultados del AMOVA, DAPC y la prueba de Mantel sugieren que las poblaciones de *H. vastatrix* no están estructuradas, mostrando una población grande y no diferenciada. Estos resultados son congruentes con estudios previos basados en secuencias de la región ITS-ADNr y RADseq en poblaciones de *H. vastatrix* procedentes de áreas de cultivo de café de Brasil y de una colección mundial (Santana *et al.* 2018; Silva *et al.* 2018, respectivamente). Asimismo, Gouvea *et al.* (2005), en 45 aislados de *H. vastatrix* de una colección del CIFC y Cristancho *et al.* (2007), en

aislados de *H. vastatrix* de Colombia; concluyeron que las poblaciones *H. vastatrix* no están estructuradas, de acuerdo a origen geográfico. En Brasil, Cabral *et al.* (2016) no observaron una estructuración de la población de *H. vastatrix* respecto a su origen, hospedero ni razas fisiológicas; Maia *et al.* (2013) también en Brasil, obtuvieron resultados similares, a través del estudio de 91 aislados del hongo, proponiendo que *H. vastatrix* se comporta como una gran población indiferenciada con una alta diversidad genotípica, y de igual forma, sin estructuración con respecto a su origen geográfico y hospedero.

La no estructuración de las poblaciones de *H. vastatrix* en base a origen geográfico podría ser explicado por el alto flujo genético, resultado del movimiento de material vegetal infectado. Además, Villa Rica es considerada como un área proveedora de semillas de café para muchas otras zonas productoras en Perú, favoreciendo así la propagación a través del movimiento de personas, semillas y/o plantas infectadas. Al respecto, se ha destacado la participación del hombre como vector de patógenos y uno de los ejemplos más claros del impacto de la dispersión a largas distancias ocasionadas por el hombre son las epidemias de las enfermedades de las plantas causadas por otros hongos como *Cryphonectria parasítica* (tizón de la castaña) y *Cronartium ribicola* (Roya del pino blanco) (Golan y Pringle 2017). Por lo tanto, también se ha planteado que la introducción de la roya amarilla al continente americano, pudo haber sido a través del transporte de semillas de café y otros materiales de plantas contaminadas (Schieber y Zentmyer 1984). Asimismo, se ha reportado que la roya fue introducida a Beni (Bolivia) a través de semillas provenientes de Acre (Brasil). Igualmente, la dispersión de *H. vastatrix* de Guatemala a México se considera que fue debido al movimiento de los trabajadores de campo (Kushalappa 1989). Por otro lado, el viento también juega un rol muy importante en la dispersión del patógeno a largas distancias y fue sugerido como la principal causa del arribo de la enfermedad en Sudamérica (Bowden *et al.* 1971) y su rápida propagación en Brasil después de su primera detección en 1970 (Schieber y Zentmyer 1984).

Los procesos de extinción y recolonización de patógenos biotróficos podrían también explicar la baja diferenciación observada. Este fenómeno es caracterizado por ciclos de disminución en la población hasta llegar a lo que se llama población fuente

“Efecto Fundador”, esto es luego seguido por procesos de rápido crecimiento, donde los eventos de mutaciones tienden a diferenciar las poblaciones y el flujo de genes a disminuirlos. Por lo tanto, la falta de estructuración de la población de *H. vastatrix* podría deberse a la existencia de diferentes mecanismos de flujo de genes para el patógeno, cuya población podría ser considerada como una metapoblación, de acuerdo a los modelos propuestos por Slatkin (1977).

#### **4.2.5 Red haplotípica mediante el método de unión por la mediana**

El método de unión por la mediana reveló una red de haplotipos en forma de estrella (Figura 33), la cual representa una rápida expansión de la población (Slatkin y Hudson 1991).

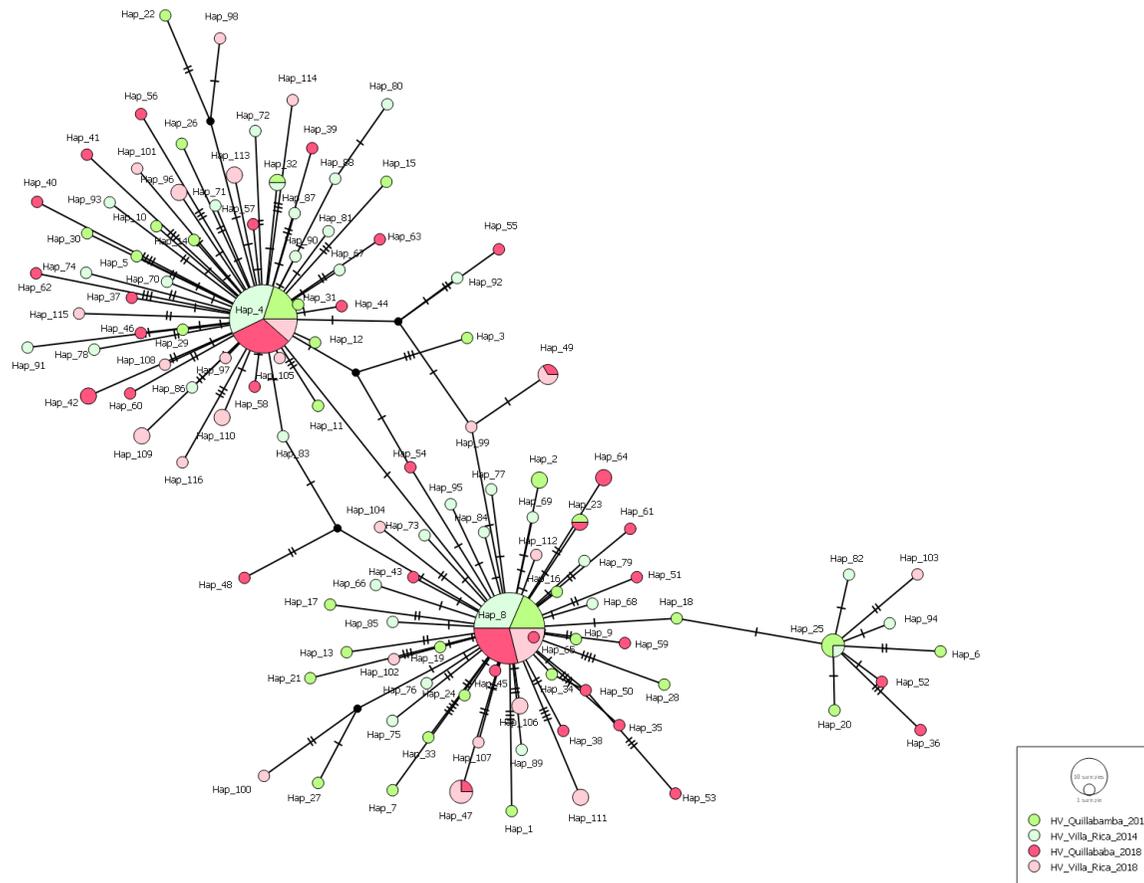
Entre las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica en los años 2014 y 2018 se hallaron un total de 116 haplotipos mostrando una diversidad haplotípica ( $0.9373 \pm 0.0115$ ) y nucleotídica ( $P_i = 0.00322 \pm 0.00018$ ); con 100 haplotipos con secuencias únicas y 16 haplotipos (Hap\_2; Hap\_4; Hap\_8; Hap\_23; Hap\_25; Hap\_32; Hap\_42; Hap\_47; Hap\_49; Hap\_64; Hap\_96; Hap\_106; Hap\_109; Hap\_110; Hap\_111; Hap\_113) conformados por más de dos secuencias (Cuadro 10, Anexo 14). de los cuales, los haplotipos Hap\_4 y Hap\_8 se encuentran en mayor frecuencia en ambas zonas cafetaleras.

Los haplotipos centrales Hap\_4 y Hap\_8, son los más comunes y los más ampliamente distribuidos geográficamente, el haplotipo Hap\_25 está vinculado al Hap\_8, con una longitud de rama divergente máximo de 2 mutaciones, este haplotipo también es interno y está distribuido en ambas zonas cafetaleras (Figura 33). Asimismo, se puede observar la persistencia de los haplotipos Hap\_4 y Hap\_8 a través de los años. No obstante, el año 2014, ambos haplotipos se encontraron en mayor frecuencia en la zona cafetalera de Villa Rica. Por el contrario, el año 2018 ambos haplotipos se encontraron en mayor frecuencia en la zona cafetalera de Quillabamba. Esto probablemente debido a la presencia de un menor proporción de

cultivares de café resistentes a la enfermedad en la zona cafetalera de Quillabamba en comparación con Villa Rica.

En la red haplotípica también se puede observar al haplotipo Hap 25 de origen reciente, esto debido a que se encuentra en la población en menor proporción a los haplotipos Hap\_4 y Hap\_8. El surgimiento de nuevas variantes del patógeno respondería al gran potencial de adaptación y evolución que tiene *H. vastatrix*, como resultado principalmente de la exposición del patógeno a nuevas presiones de selección (Varzea y Marques 2005). Además, se conoce que poblaciones grandes, se caracterizan por presentar tasas de mutaciones altas, que le permiten adaptarse muy rápidamente a la introducción de nuevos genes de resistencia en el hospedero y a los agroquímicos, estos genes de resistencia podrían llevar a la rápida fijación de ciertos mutantes, volviéndolos resistentes a los genes de resistencia del hospedero y a los agroquímicos (McDonal y Linde 2002). Según el modelo de gen por gen (Flor 1954), el aumento de la frecuencia de las cepas de los patógenos que albergan una mutación de un gen de avirulencia a virulencia es el resultado del quiebre de la resistencia en el hospedero (McDonald y Linde 2002). En la actualidad, la distribución de cultivares resistentes y susceptibles en las zonas de producción de café ha cambiado drásticamente después de la epidemia de la roya amarilla del 2013, en el Perú actualmente la producción de café está en base a cultivares de *Coffea arabica* resistentes “Catimores” (Cuadro 11, Figura 34). Entonces, se podría esperar que nuevas variantes del patógeno surjan cuanto más uniformes y contiguas se vuelvan las áreas de cultivo.

La construcción de la red haplotípica de las poblaciones de roya agrupadas por años y localidades mostró, diferencias en la topología de las redes, esto indica que cada zona tiene una historia demográfica diferente, la cual podría depender del manejo del cultivo, las condiciones del medio ambiente y a la exposición del patógeno a plantas de café con diferentes genes de resistencia (Anexos 15, 16, 17, 18).



**Figura 33. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joining) de 116 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica en los años 2014 y 2018. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos perdidos o no muestreados están representados por nodos de color negro**

**Cuadro 10: Distribución regional y frecuencia de los haplotipos de *Hemileia vastatrix* generados a partir de las secuencias de la región ITS-ADNr**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencias
		Quillabamba 2014	Villa Rica 2014	Quillabamba 2018	Villa Rica 2018	
Hap_1	1	1	0	0	0	HVQ_1.1_2014
Hap_2	2	2	0	0	0	HVQ_1.2_2014; HVQ_1.5_2014
Hap_3	1	1	0	0	0	HVQ_1.3_2014
Hap_4	35	7	13	11	4	HVQ_1.4_2014; HVQ_2.4_2014; HVQ_2.10_2014; HVQ_3.3_2014; HVQ_3.5_2014; HVQ_3.10_2014; HVQ_5.9_2014; HVQ_12.5_2018; HVQ_12.7_2018; HVQ_12.10_2018; HVQ_13.1_2018; HVQ_13.6_2018; HVQ_13.8_2018; HVQ_14.8_2018; HVQ_15.3_2018; HVQ_15.4_2018; HVQ_15_2018; HVQ_16.10_2018; HVV_10.2_2014; HVV_10.4_2014; HVV_10.8_2014; HVV_10.9_2014; HVV_11.5_2014; HVV_11.6_2014; HVV_11.9_2014; HVV_11.11_2014; HVV_6.3_2014; HVV_6.9_2014; HVV_8.5_2014; HVV_9.2_2014; HVV_9.4_2014; HVV_17.4_2018; HVV_17.5_2018; HVV_17.14_2018; HVV_18.6_2018
Hap_5	1	1	0	0	0	HVQ_1.6_2014
Hap_6	1	1	0	0	0	HVQ_1.7_2014
Hap_7	1	1	0	0	0	HVQ_1.8_2014
Hap_8	38	7	12	11	8	HVQ_1.9_2014; HVQ_1.10_2014; HVQ_2.2_2014; HVQ_2.7_2014; HVQ_3.1_2014; HVQ_4.7_2014; HVQ_5.8_2014; HVQ_12.3_2018; HVQ_13.2_2018; HVQ_13.4_2018; HVQ_13.11_2018; HVQ_14.1_2018; HVQ_14.9_2018; HVQ_15.1_2018; HVQ_15.6_2018; HVQ_15.11_2018; HVQ_16.2_2018; HVQ_16.4_2018; HVV_11.8_2014; HVV_6.2_2014; HVV_6.6_2014; HVV_7.7_2014; HVV_8.1_2014; HVV_8.2_2014; HVV_8.3_2014; HVV_8.4_2014; HVV_8.6_2014; HVV_8.7_2014; HVV_8.8_2014; HVV_8.10_2014; HVV_17.1_2018; HVV_17.15_2018; HVV_18.1_2018; HVV_18.9_2018; HVV_18.17_2018; HVV_18.23_2018; HVV_18.25_2018; HVV_18.26_2018
Hap_9	1	1	0	0	0	HVQ_2.1_2014
Hap_10	1	1	0	0	0	HVQ_2.5_2014
Hap_11	1	1	0	0	0	HVQ_2.6_2014
Hap_12	1	1	0	0	0	HVQ_2.8_2014
Hap_13	1	1	0	0	0	HVQ_2.9_2014
Hap_14	1	1	0	0	0	HVQ_3.2_2014
Hap_15	1	1	0	0	0	HVQ_3.4_2014
Hap_16	1	1	0	0	0	HVQ_3.6_2014
Hap_17	1	1	0	0	0	HVQ_3.7_2014

**“Continuación”**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencias
		Quillabamba 2014	Villa Rica- 2014	Quillabamba- 2018	Villa Rica 2018	
Hap_18	1	1	0	0	0	HVQ_3.8_2014
Hap_19	1	1	0	0	0	HVQ_3.9_2014
Hap_20	1	1	0	0	0	HVQ_4.1_2014
Hap_21	1	1	0	0	0	HVQ_4.2_2014
Hap_22	1	1	0	0	0	HVQ_4.3_2014
Hap_23	2	1	0	1	0	HVQ_4.4_2014; HVQ_12.6_2018
Hap_24	1	1	0	0	0	HVQ_4.5_2014
Hap_25	4	3	1	0	0	HVQ_4.6_2014; HVQ_4.10_2014; HVQ_5.6_2014 HVV_9.1_2014
Hap_26	1	1	0	0	0	HVQ_4.8_2014
Hap_27	1	1	0	0	0	HVQ_4.9_2014
Hap_28	1	1	0	0	0	HVQ_5.1_2014
Hap_29	1	1	0	0	0	HVQ_5.2_2014
Hap_30	1	1	0	0	0	HVQ_5.3_2014
Hap_31	1	1	0	0	0	HVQ_5.4_2014
Hap_32	2	1	1	0	0	HVQ_5.5_2014; HVV_11.3_2014
Hap_33	1	1	0	0	0	HVQ_5.7_2014
Hap_34	1	1	0	0	0	HVQ_5.10_2014
Hap_35	1	0	0	1	0	HVQ_12.1_2018
Hap_36	1	0	0	1	0	HVQ_12.2_2018
Hap_37	1	0	0	1	0	HVQ_12.4_2018
Hap_38	1	0	0	1	0	HVQ_12.9_2018
Hap_39	1	0	0	1	0	HVQ_12.11_2018
Hap_40	1	0	0	1	0	HVQ_12.12_2018
Hap_41	1	0	0	1	0	HVQ_13.3_2018
Hap_42	2	0	0	2	0	HVQ_13.5_2018; HVQ_13.12_2018
Hap_43	1	0	0	1	0	HVQ_13.7_2018
Hap_44	1	0	0	1	0	HVQ_13.9_2018
Hap_45	1	0	0	1	0	HVQ_13.10_2018
Hap_46	1	0	0	1	0	HVQ_14.2_2018
Hap_47	4	0	0	1	3	HVQ_14.3_2018; HVV_17.3_2018 HVV_17.17_2018; HVV_18.24_2018
Hap_48	1	0	0	1	0	HVQ_14.4_2018
Hap_49	3	0	0	1	2	HVQ_14.5_2018; HVV_17.11_2018 HVV_18.2_2018
Hap_50	1	0	0	1	0	HVQ_14.6_2018
Hap_51	1	0	0	1	0	HVQ_14.7_2018
Hap_52	1	0	0	1	0	HVQ_14.10_2018
Hap_53	1	0	0	1	0	HVQ_14.12_2018
Hap_54	1	0	0	1	0	HVQ_15.5_2018
Hap_55	1	0	0	1	0	HVQ_15.7_2018
Hap_56	1	0	0	1	0	HVQ_15.8_2018
Hap_57	1	0	0	1	0	HVQ_15.9_2018
Hap_58	1	0	0	1	0	HVQ_15.12_2018
Hap_59	1	0	0	1	0	HVQ_16.1_2018
Hap_60	1	0	0	1	0	HVQ_16.3_2018
Hap_61	1	0	0	1	0	HVQ_16.5_2018
Hap_62	1	0	0	1	0	HVQ_16.6_2018
Hap_63	1	0	0	1	0	HVQ_16.7_2018
Hap_64	2	0	0	2	0	HVQ_16.8_2018; HVQ_16.9_2018
Hap_65	1	0	0	1	0	HVQ_16.12_2018
Hap_66	1	0	1	0	0	HVV_10.1_2014
Hap_67	1	0	1	0	0	HVV_10.3_2014
Hap_68	1	0	1	0	0	HVV_10.5_2014
Hap_69	1	0	1	0	0	HVV_10.6_2014
Hap_70	1	0	1	0	0	HVV_10.7_2014
Hap_71	1	0	1	0	0	HVV_10.10_2014

**“Continuación”**

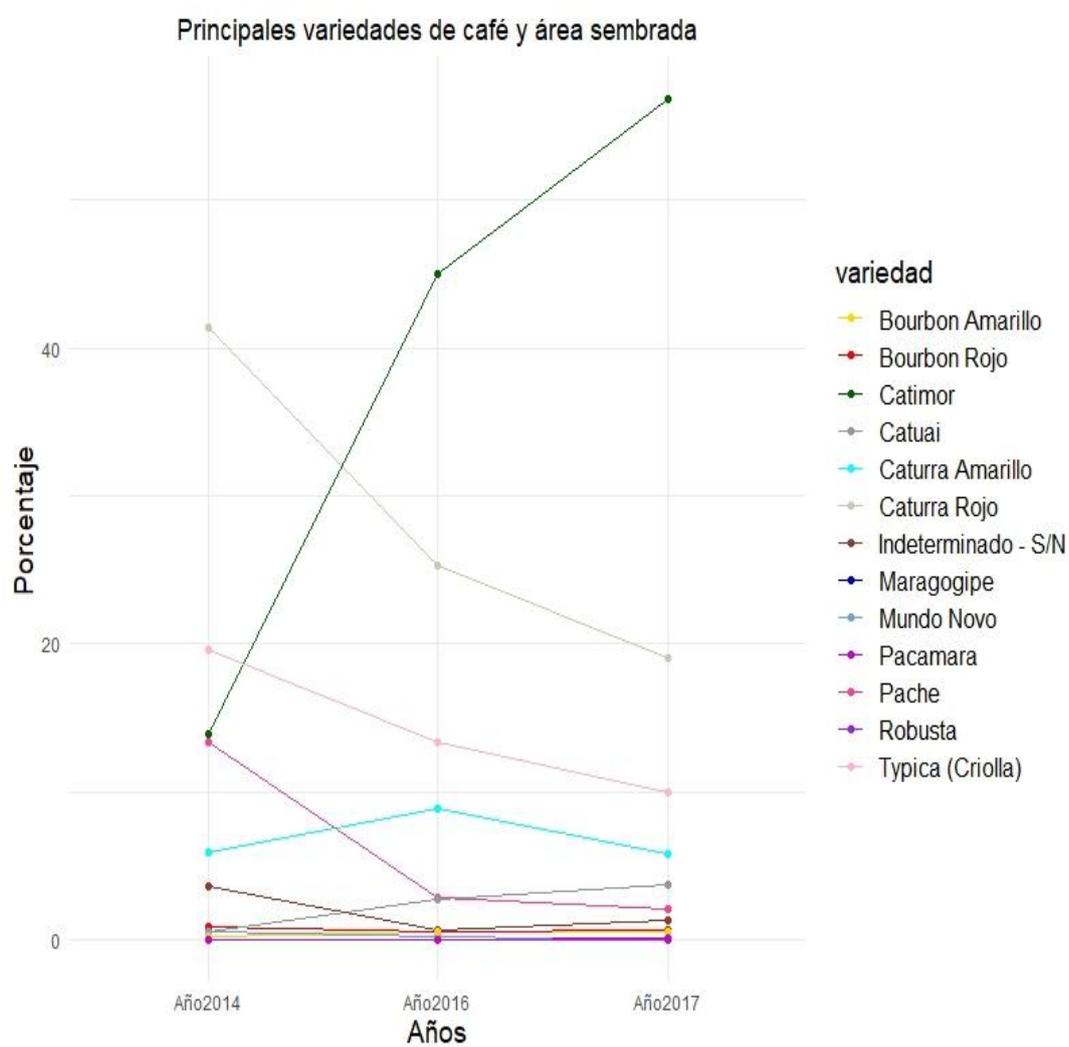
Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencias
		Quillabamba 2014	Villa Rica- 2014	Quillabamba -2018	Villa Rica 2018	
Hap_72	1	0	1	0	0	HVV_11.1_2014
Hap_73	1	0	1	0	0	HVV_11.2_2014
Hap_74	1	0	1	0	0	HVV_11.4_2014
Hap_75	1	0	1	0	0	HVV_11.7_2014
Hap_76	1	0	1	0	0	HVV_11.10_2014
Hap_77	1	0	1	0	0	HVV_6.1_2014
Hap_78	1	0	1	0	0	HVV_6.4_2014
Hap_79	1	0	1	0	0	HVV_6.5_2014
Hap_80	1	0	1	0	0	HVV_6.7_2014
Hap_81	1	0	1	0	0	HVV_6.8_2014
Hap_82	1	0	1	0	0	HVV_6.10_2014
Hap_83	1	0	1	0	0	HVV_7.1_2014
Hap_84	1	0	1	0	0	HVV_7.2_2014
Hap_85	1	0	1	0	0	HVV_7.3_2014
Hap_86	1	0	1	0	0	HVV_7.4_2014
Hap_87	1	0	1	0	0	HVV_7.5_2014
Hap_88	1	0	1	0	0	HVV_7.6_2014
Hap_89	1	0	1	0	0	HVV_7.9_2014
Hap_90	1	0	1	0	0	HVV_7.10_2014
Hap_91	1	0	1	0	0	HVV_9.5_2014
Hap_92	1	0	1	0	0	HVV_9.6_2014
Hap_93	1	0	1	0	0	HVV_9.7_2014
Hap_94	1	0	1	0	0	HVV_9.9_2014
Hap_95	1	0	1	0	0	HVV_9.10_2014
Hap_96	2	0	0	0	2	HVV_17.2_2018; HVV_17.20_2018
Hap_97	1	0	0	0	1	HVV_17.7_2018
Hap_98	1	0	0	0	1	HVV_17.8_2018
Hap_99	1	0	0	0	1	HVV_17.9_2018
Hap_100	1	0	0	0	1	HVV_17.10_2018
Hap_101	1	0	0	0	1	HVV_17.16_2018
Hap_102	1	0	0	0	1	HVV_17.18_2018
Hap_103	1	0	0	0	1	HVV_17.19_2018
Hap_104	1	0	0	0	1	HVV_17.21_2018
Hap_105	1	0	0	0	1	HVV_17.22_2018
Hap_106	2	0	0	0	2	HVV_17.23_2018; HVV_18.15_2018
Hap_107	1	0	0	0	1	HVV_17.24_2018
Hap_108	1	0	0	0	1	HVV_17.25_2018
Hap_109	2	0	0	0	2	HVV_18.3_2018; HVV_18.21_2018
Hap_110	2	0	0	0	2	HVV_18.4_2018; HVV_18.18_2018
Hap_111	2	0	0	0	2	HVV_18.5_2018; HVV_18.16_2018
Hap_112	1	0	0	0	1	HVV_18.11_2018
Hap_113	2	0	0	0	2	HVV_18.12_2018; HVV_18.19_2018
Hap_114	1	0	0	0	1	HVV_18.14_2018
Hap_115	1	0	0	0	1	HVV_18.20_2018
Hap_116	1	0	0	0	1	HVV_18.22_2018

Hap: Haplotipo; HVQ: *Hemileia vastatrix* de Quillabamba; HVV: *Hemileia vastatrix* de Villa Rica

**Cuadro 11: Lista de las principales variedades de café y área sembrada en porcentaje en los años 2014, 2016 y 2017**

<b>Variedad</b>	<b>Porcentaje de área Sembrada 2014</b>	<b>Porcentaje de área Sembrada 2016</b>	<b>Porcentaje de área Sembrada 2017</b>
Caturra Rojo	41.40	25.35	19.07
Typica (Criolla)	19.59	13.36	9.98
Catimor	13.94	45.06	56.83
Pache	13.33	2.80	2.07
Caturra Amarillo	5.92	8.84	5.78
Indeterminado - S/N	3.57	0.61	1.29
Bourbon Rojo	0.84	0.52	0.61
Catuai	0.58	2.72	3.71
Mundo Novo	0.57	0.18	0.05
Bourbon Amarillo	0.23	0.53	0.52
Maragogipe	0.02	0.01	0.00
Robusta	0.02	0.00	0.00
Pacamara	0.01	0.02	0.11
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Fuente: SENASA (2018)



**Figura 34. Principales variedades de café y área sembrada en porcentaje a nivel nacional, en los años 2014, 2016 y 2017**

Fuente: SENASA (2018)

### **4.3 DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix* EN DIFERENTES PISOS ALTITUDINALES**

Se realizó el análisis de la distribución de la variabilidad genética del hongo en dos rangos de altitud a través de un AMOVA en el que se agruparon las fincas que mostraban mayores diferencias en rangos de pisos altitudinales de acuerdo a Liebig *et al.* (2019) y se encontró que el 99.81 por ciento de la variación genética de *H. vastatrix* fue atribuida a las diferencias dentro de los pisos altitudinales y solo 0.19 por ciento de la variación resultó entre los diferentes pisos altitudinales. Por lo que, las poblaciones de *H. vastatrix* en ambas zonas cafetaleras no estarían siendo estructuradas genéticamente en las épocas de evaluación (2014 - 2018) por pisos altitudinales (Cuadro 12). Además, el índice de fijación  $F_{st}$  fue de 0.00187, con un  $P$ -value = 0.24340 +/- 0.01707. Este valor estaría indicando que no existe diferenciación genética entre las sub poblaciones de *H. vastatrix* muestreadas en diferentes pisos altitudinales.

**Cuadro 12: Resultados del AMOVA mostrando los porcentajes de variación de los componentes de variancia, el índice de fijación (Fst) y su nivel de significancia**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la variación	Índice de fijación	P - value
Entre pisos altitudinales (1033-1528) -(1766-2060)	1	1.927	0.00331	0.19	0.00187	0.24340 +/-0.01707
Dentro de los pisos altitudinales	98	172.658	1.76182	99.81		
Total	99	174.585	1.76513	100		

Avelino *et al.* (2015) y Roza *et al.* (2012) reportaron, que en el pasado la roya amarilla del café no fue un problema a altitudes sobre los 1000 - 1100 metros sobre el nivel del mar (m s. n. m.) en América Central y a los 1600 m s. n. m. en Colombia. Sin embargo, en la actualidad, tanto en Nicaragua como en Colombia se reportan incidencias similares de la enfermedad en los diferentes pisos altitudinales. Por lo tanto, Avelino *et al.* (2015), sugieren que el incremento de las temperaturas mínimas ocurridas en los últimos años sería uno de los factores que pudo haber afectado la barrera de distribución de la enfermedad sobre los diferentes pisos altitudinales.

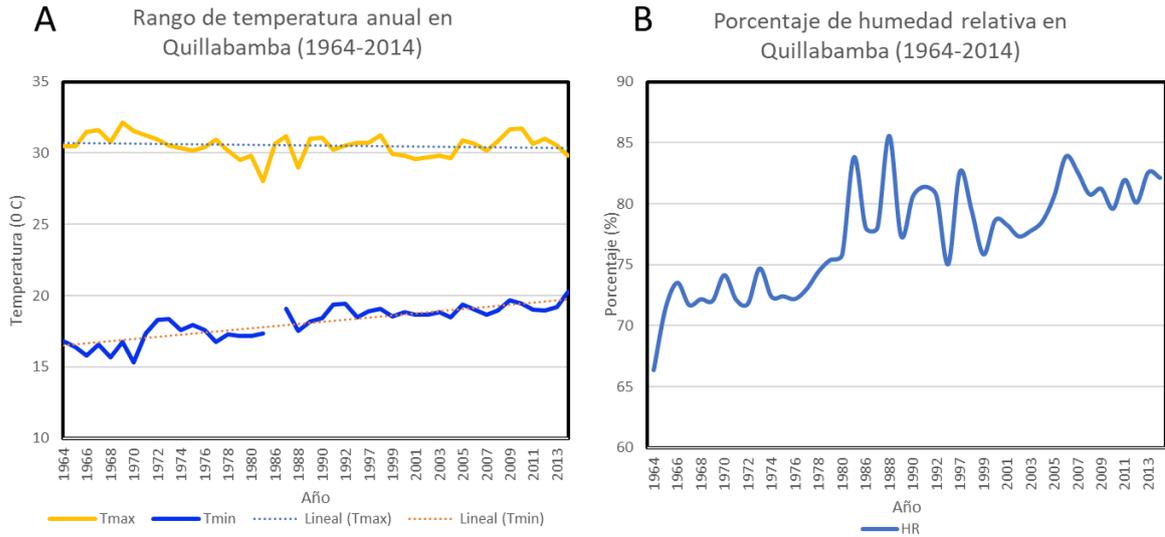
Tanto la temperatura, como la presencia de agua en forma de gotas, juegan un rol muy importante en la germinación y formación del apresorio (Nutman y Roberts 1961; Rayner 1961; Kushalappa y Eskes 1989; De Jong *et al.* 1987; Avelino *et al.* 2004; López-Bravo *et al.* 2012). Asimismo, la humedad es un factor muy importante para el mantenimiento de las gotas de agua sobre las hojas de café por un período prolongado, favoreciendo de esta manera, el éxito de la infección. De Jong *et al.* (1987), observaron rangos amplios en las temperaturas óptimas de germinación y formación del apresorio (22°C - 28°C y 13°C - 16°C, respectivamente), los cuales, podrían ser muy importantes para la supervivencia del patógeno bajo condiciones naturales.

En las Figuras 35 y 36, se puede observar, para las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica, las variaciones de las temperaturas máximas y mínimas; así como, de la humedad relativa a través de los años. Cuando la roya amarilla fue reportada por primera vez en el Perú, las condiciones ambientales, ya eran propicias para el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, el incremento de las temperaturas mínimas y del porcentaje de la humedad relativa, producidos en los últimos tiempos en las zonas cafetaleras bajo estudio, podrían estar acelerando la velocidad de la infección, acortando los tiempos de infección y período de latencia de la enfermedad. Al respecto, Toniutti *et al.* 2017 en su estudio del efecto de la temperatura en la incidencia de la enfermedad reportó que regímenes térmicos de 22 - 27 °C tuvieron un mayor impacto en la incidencia de la enfermedad en plantas de café de la variedad caturra en comparación con regímenes térmicos de 18 - 23°C. Asimismo, reportaron que la temperatura no solo afecta la germinación, sino también las etapas tardías del desarrollo del hongo (colonización del hospedero).

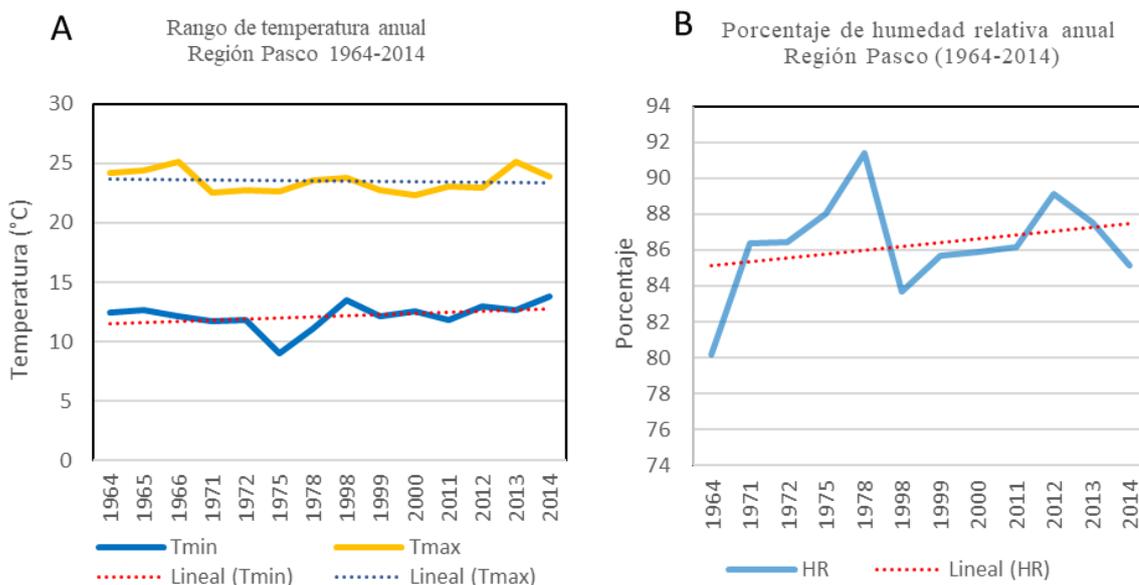
Los brotes epidémicos están determinados por el número de repeticiones del ciclo del patógeno, y son favorecidos por las amplitudes térmicas cortas, donde las temperaturas no son muy altas, ni muy bajas y en consecuencia el período de latencia de la enfermedad se acorta (Avelino y Rivas 2013) y se dan las condiciones adecuadas para que el ciclo del patógeno se repita (Kushalappa *et al.* 1984; Avelino *et al.* 2006).

Desde el año 1964 hasta el 2014, en la zona cafetalera de Quillabamba se registraron temperaturas mínimas, máximas y humedad relativa a una altitud de 990 m s. n. m., entre los rangos 15.4°C - 20.3 °C; 28 °C - 32.2 °C y 66.4 por ciento - 85.6 por ciento respectivamente. Asimismo, para la zona cafetalera de Villa Rica, a una altitud de 1850 m s. n. m. se reportaron datos de temperaturas mínimas y máximas y valores de humedad relativa entre 9 °C - 13.8 °C; 22°C - 25.2 °C y 80.2 por ciento - 91.4 por ciento respectivamente. Estos datos muestran diferencias contrastantes de las condiciones climatológicas bajo diferentes pisos altitudinales. Sin embargo, a pesar de estas diferencias *H. vastatrix*, muestra una gran capacidad de adaptarse a las condiciones de su entorno (Toniutti *et al.* 2017). En consecuencia, se puede observar que los haplotipos Hap\_7, Hap\_17 y Hap\_6, se encuentran ampliamente distribuidos en ambos pisos altitudinales (Figura 37).

Desde el 2008 al 2013, se ha reportado la más intensa epidemia de la roya del café desde Colombia a México, incluyendo Perú, Ecuador y algunos países caribeños (Avelino *et al.* 2015). Varias hipótesis han sido propuestas para explicar el brote, incluyendo la emergencia de una nueva raza virulenta del patógeno, cambios en el manejo del cultivo y factores económicos. Sin embargo, las anomalías meteorológicas causadas por el continuo cambio climatológico (Rozo *et al.* 2012; Avelino *et al.* 2015) han sido consideradas como los principales factores que propiciaron la epidemia de la roya. No obstante, Bebber *et al.* (2016), encontraron que el cambio en las condiciones climáticas no afecta la germinación y la formación del apresorio, por consiguiente, no favorece significativamente la infección.



**Figura 35. Datos climatológicos reportados por SENHAMI desde el año 1964 hasta el año 2014, para la zona cafetalera de Quillabamba. A: Temperaturas máximas y mínimas mostrando línea de tendencia. B: Humedad relativa (por ciento). Los datos fueron registrados a una Latitud: -12.85611111, Longitud: -72.69194444 y Altitud: 990**



**Figura 36. Datos climatológicos reportados por SENHAMI desde el año 1964 hasta el año 2014, para la zona cafetalera de Villa Rica. A: Temperaturas máximas y mínimas. B: Humedad relativa (por ciento). Datos registrados a una Latitud: -10.59277778, Longitud: -75.38972222 y Altitud: 1850**

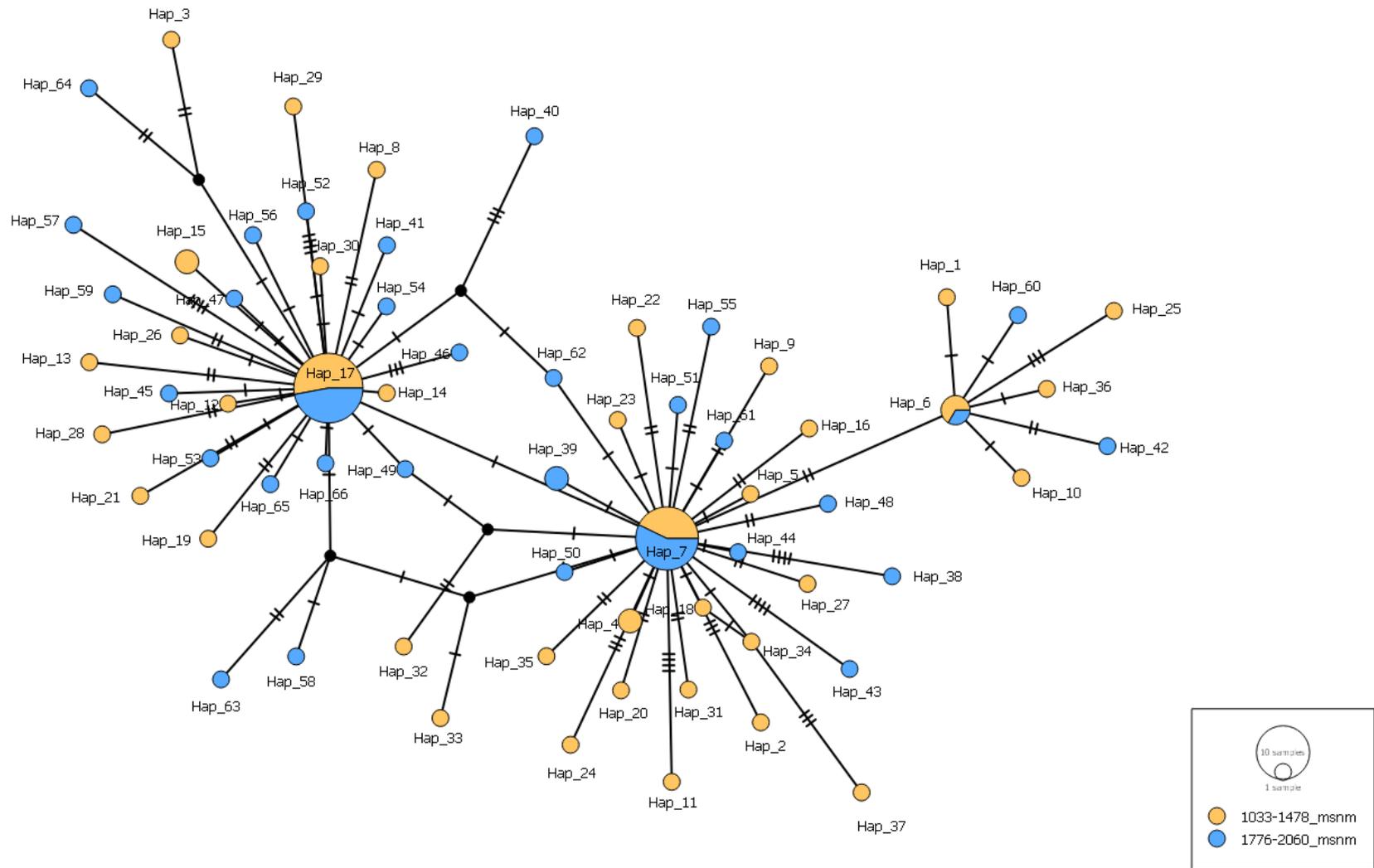
El manejo de los cultivos también estaría jugando un rol muy importante en la variación del microclima de los ecosistemas del cultivo de café, lo cual podría estar favoreciendo la distribución de las poblaciones de *H. vastatrix* en los diferentes pisos altitudinales (1033-1528 m s. n. m. y 1766-2060 m s. n. m.). La sombra es una de las variables epidemiológicas de la roya más controversiales ya que tiene dos efectos (López-Bravo *et al.* 2012). El primero, evita temperaturas extremas lo que favorece la infección, pero reduce la carga fructífera, la cual se asocia a un menor ataque del patógeno debido a su efecto sobre la colonización (Avelino y Rivas 2013). Y el segundo, conserva agua libre de lluvias con ello favorece la germinación y penetración; sin embargo, bajo sombra no hay rocío, única fuente de agua libre en días sin lluvia (Avelino y Rivas 2013). López-Bravo *et al.* (2012) determinaron que la sombra reduce los ataques de la roya debido a la reducción de carga fructífera; no obstante, las condiciones de microclima (agua libre y temperatura en las hojas) son mejores para el patógeno bajo sombra. Adicionalmente, mencionaron que es posible

encontrar más altas incidencias de roya a pleno sol que bajo sombra si la carga fructífera es más elevada a pleno sol; pero si las cargas fructíferas bajo sombra y sol son similares, habrá mayor incidencia bajo sombra.

Por otro lado, Maia *et al.* (2017) evaluaron tres componentes de la agresividad del patógeno (período de incubación, período de latencia, producción de esporas), para determinar su relación con el surgimiento de la última epidemia de la roya amarilla. En su estudio utilizando 183 pústulas de aislados de *H. vastatrix*, sus resultados muestran que el período de incubación es significativamente más largo en Minas Gerais que en Espírito Santo. Ellos, sugieren que existe una relación con la agresividad del patógeno y el área geográfica de producción de los cultivos de café, lo cual estaría asociado a las diferencias altitudinales entre las diferentes áreas geográficas donde fueron muestreados los aislados de *H. vastatrix*. Avelino *et al.* (2005), también reportó el efecto negativo de la altura sobre la roya amarilla del café. Pero, la agresividad del patógeno, igualmente podría estar asociado a las diferentes condiciones climáticas que prevalecen en las diferentes áreas geográficas. Del mismo modo Maia *et al.* (2017), evaluaron el efecto de los tres componentes de agresividad de los aislados de roya en *C. canephora* y *C. arabica*, para observar el efecto del hospedero sobre la agresividad del patógeno. Sus resultados no muestran diferencias significativas y más bien evidencian que las poblaciones se agrupan y comportan como una sola población. Se ha mencionado en varios trabajos de investigación que entre los diferentes factores microclimáticos que afectan el ciclo de la vida de *H. vastatrix* están la temperatura, la humedad y en menor grado la radiación solar. Siendo el factor más importante, en el período de incubación y de latencia, la temperatura (Becker *et al.* 1991; Kushalappa y Eskes 1989). Sin embargo, podrían existir otros factores adicionales que estarían relacionados con la agresividad del patógeno (Maia *et al.* 2017).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, la epidemia de la roya amarilla del 2013 en el Perú, fue ocasionada por pocos individuos los cuales se encuentran distribuidos en los diferentes pisos altitudinales desde 1033 - 2060 m s. n. m. Uno de los factores para su distribución podría ser el incremento de la temperatura mínima y la disminución de la temperatura máxima, las cuales se encuentran dentro del rango de temperaturas óptimas para el desarrollo del hongo

(Nutman y Roberts 1961; De Jong *et al.* 1987), asimismo, el manejo del cultivo del café podría estar jugando un rol muy importante en la incidencia de la enfermedad. También, las áreas continuas con cafetales permiten un movimiento "paso a paso" de las epidemias de la roya y la distribución de los genotipos (Nunes *et al.* 2009).



**Figura 37. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 66 haplotipos detectados para la región ITS de *H. vastatrix* de las zonas cafetaleras de Quillabamba Villa Rica, muestreadas a diferentes pisos altitudinales**

**Cuadro 13: Distribución de haplotipos de *H. vastatrix* por altitudes de muestreo en las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución (m s. n. m.)		Secuencias
		1776- 2060	1033- 1478	
Hap_1	1	1	0	HVQ_4.1_2014
Hap_2	1	1	0	HVQ_4.2_2014
Hap_3	1	1	0	HVQ_4.3_2014
Hap_4	2	2	0	HVQ_4.4_2014; HVQ_12.6_2018
Hap_5	1	1	0	HVQ_4.5_2014
Hap_6	3	2	1	HVQ_4.6_2014; HVQ_5.6_2014 HVV_9.1_2014
Hap_7	14	6	8	HVQ_4.7_2014; HVQ_5.8_2014; HVV_11.8_2014; HVQ_12.3_2018; HVQ_14.1_2018; HVQ_14.9_2018; HVQ_1.9_2014; HVQ_1.10_2014; HVQ_2.2_2014; HVQ_2.7_2014; HVV_7.7_2014; HVQ_15.1_2018; HVQ_15.6_2018; HVQ_15.11_2018
Hap_8	1	1	0	HVQ_4.8_2014
Hap_9	1	1	0	HVQ_4.9_2014
Hap_10	1	1	0	HVQ_4.10_2014
Hap_11	1	1	0	HVQ_5.1_2014
Hap_12	1	1	0	HVQ_5.2_2014
Hap_13	1	1	0	HVQ_5.3_2014
Hap_14	1	1	0	HVQ_5.4_2014
Hap_15	2	2	0	HVQ_5.5_2014; HVV_11.3_2014
Hap_16	1	1	0	HVQ_5.7_2014
Hap_17	17	9	8	HVQ_5.9_2014; HVV_11.5_2014; HVV_11.6_2014; HVV_11.9_2014; HVV_11.11_2014; HVQ_12.5_2018; HVQ_12.7_2018; HVQ_12.10_2018; HVQ_14.8_2018; HVQ_1.4_2014; HVQ_2.4_2014; HVQ_2.10_2014; HVV_9.2_2014; HVV_9.4_2014; HVQ_15.3_2018; HVQ_15.4_2018; HVQ_15_2018
Hap_18	1	1	0	HVQ_5.10_2014
Hap_19	1	1	0	HVV_11.1_2014
Hap_20	1	1	0	HVV_11.2_2014
Hap_21	1	1	0	HVV_11.4_2014
Hap_22	1	1	0	HVV_11.7_2014
Hap_23	1	1	0	HVV_11.10_2014
Hap_24	1	1	0	HVQ_12.1_2018
Hap_25	1	1	0	HVQ_12.2_2018
Hap_26	1	1	0	HVQ_12.4_2018
Hap_27	1	1	0	HVQ_12.9_2018
Hap_28	1	1	0	HVQ_12.11_2018
Hap_29	1	1	0	HVQ_12.12_2018
Hap_30	1	1	0	HVQ_14.2_2018
Hap_31	1	1	0	HVQ_14.3_2018
Hap_32	1	1	0	HVQ_14.4_2018
Hap_33	1	1	0	HVQ_14.5_2018

**“Continuación”**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución (m s. n. m.)		Secuencias
		1776- 2060	1033- 1478	
Hap_34	1	1	0	HVQ_14.6_2018
Hap_35	1	1	0	HVQ_14.7_2018
Hap_36	1	1	0	HVQ_14.10_2018
Hap_37	1	1	0	HVQ_14.12_2018
Hap_38	1	0	1	HVQ_1.1_2014
Hap_39	2	0	2	HVQ_1.2_2014; HVQ_1.5_2014
Hap_40	1	0	1	HVQ_1.3_2014
Hap_41	1	0	1	HVQ_1.6_2014
Hap_42	1	0	1	HVQ_1.7_2014
Hap_43	1	0	1	HVQ_1.8_2014
Hap_44	1	0	1	HVQ_2.1_2014
Hap_45	1	0	1	HVQ_2.5_2014
Hap_46	1	0	1	HVQ_2.6_2014
Hap_47	1	0	1	HVQ_2.8_2014
Hap_48	1	0	1	HVQ_2.9_2014
Hap_49	1	0	1	HVV_7.1_2014
Hap_50	1	0	1	HVV_7.2_2014
Hap_51	1	0	1	HVV_7.3_2014
Hap_52	1	0	1	HVV_7.4_2014
Hap_53	1	0	1	HVV_7.5_2014
Hap_54	1	0	1	HVV_7.6_2014
Hap_55	1	0	1	HVV_7.9_2014
Hap_56	1	0	1	HVV_7.10_2014
Hap_57	1	0	1	HVV_9.5_2014
Hap_58	1	0	1	HVV_9.6_2014
Hap_59	1	0	1	HVV_9.7_2014
Hap_60	1	0	1	HVV_9.9_2014
Hap_61	1	0	1	HVV_9.10_2014
Hap_62	1	0	1	HVQ_15.5_2018
Hap_63	1	0	1	HVQ_15.7_2018
Hap_64	1	0	1	HVQ_15.8_2018
Hap_65	1	0	1	HVQ_15.9_2018
Hap_66	1	0	1	HVQ_15.12_2018

Hap: Haplotipo

HVQ: *Hemileia vastatrix* de Quillabamba

HVV: *Hemileia vastatrix* de Villa Rica

#### **4.4 RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS POBLACIONES DE *Hemileia vastatrix* PERUANAS, COLOMBIANAS, BRASILERAS Y DEL CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DAS FERRUGENS DO CAFEEIRO**

Para el análisis de las relaciones filogenéticas se construyó una red haplotípica mediante el método de la unión por la mediana y árboles filogenéticos utilizando el método de inferencia bayesiana.

##### **4.4.1 Análisis filogenético mediante el método de la unión por la mediana (Median Joining)**

En el análisis de relaciones filogenéticas se incluyeron las secuencias ITS - ADNr de *H. vastatrix* que se encuentran almacenadas en el GenBank (Cristancho *et al.* 2007 y Santana *et al.* 2018), entre estas se encuentran las secuencias reportadas de las razas I, II, III y XXII de *H. vastatrix* (Cuadro 14).

**Cuadro 14:** Lista de las poblaciones de *Hemileia vastatrix*, con sus respectivas abreviaciones, utilizadas en el análisis de relaciones filogenéticas.

ID	Abreviación	Población	Origen geográfico	Referencia
MF627747.1- MF627751.1	B1	Raza II	*CIFC, Oeiras-Portugal	Santana et al., 2018
MF627752.1- MF627755.1	B2	Raza II	Viçosa-Brasil	Santana et al., 2018
MF627756.1- MF627760.1	B3	Raza II	*CIFC, Oeiras-Portugal	Santana et al., 2018
MF627761.1-F627767.1; MF627771.1	B4	Raza I	Caratinga-Brasil	Santana et al., 2018
MF627768.1- MF627770.1	B5	Raza III	Campinas-Brasil	Santana et al., 2018
EF394119.1	EF394119.1	Raza XXII-637	*CIFC, Oeiras-Portugal	Cristancho et al., 2007
EF394120.1	EF394120.1	Raza II-1126	*CIFC, Oeiras-Portugal	Cristancho et al., 2007
EF394122.1	EF394122.1	Raza XXII-535	*CIFC, Oeiras-Portugal	Cristancho et al., 2007
MF627772.1- MF627828.1	MF	Población de campo	Brasil	Santana et al., 2018
EF394118.1- EF394132.1	EF	Población de campo	Colombia	Cristancho et al., 2007
MW477031-MW477135	HVV	Población de campo	Villa Rica-Perú 2014-2018	Quispe et al., 2017 y 2021
MW477136-MW477236	HVQ	Población de campo	Quillabamba-Perú 2014-2018	Quispe et al., 2017 y 2021
KY492364.1		Puccinia porri	Serbia 2016	Ristic et al., 2017

Del análisis de las 303 secuencias de ADN se encontró un total de 174 haplotipos, de los cuales 153 haplotipos son únicos. En la red haplotípica (Figura 38), se puede observar 3 nodos principales, que corresponden a los haplotipos Hap\_1, Hap\_10 y Hap\_13, los cuales se encuentran distribuidos en los tres países productores de café (Perú, Colombia y Brasil) , asimismo, se puede observar que los Haplotipos Hap\_1 y Hap\_10, se encuentran en mayor frecuencia y podrían ser considerados como ancestrales, porque, de acuerdo a la Teoría de Coalescencia, los haplotipos más recientes deben estar ubicados en los extremos de la red, mientras que, los haplotipos ancestrales en el interior. En relación a la distribución geográfica, también se espera que los haplotipos ancestrales se encuentren mejor distribuidos, en contraste, con los haplotipos recientes, que se encuentran restringidos a una zona, porque no tuvieron tiempo suficiente para su dispersión. Por consiguiente, la distribución de los haplotipos ancestrales en los diferentes países productores de café, obedece a la Teoría de Coalescencia, la cual, también fue propuesta por Santana *et al.* (2015) en poblaciones de *H. vastatrix* en Brasil. Asimismo, según el análisis del alineamiento

de las secuencias, los haplotipos ancestrales (Hap\_1, Hap\_10 y Hap\_13), corresponderían a los haplotipos de las razas I (V<sub>2,5</sub>), raza II (V<sub>5</sub>) y raza XXII (V<sub>5,6</sub>) reportados en el GenBank por Cristancho *et al.* (2007) y Santana *et al.* (2018). De estos, solo los haplotipos Hap\_1 y Hap\_10 se mantuvieron en el tiempo y en el espacio. En base a estos resultados, se podría plantear la existencia de dos variantes de *H. vastatrix* para las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica.

El haplotipo Hap\_1 podría ser la raza II que se reportó por primera vez en el Perú en el año 1979. Este haplotipo contiene las secuencias de las razas II (B1\_1\_raceII - CIFC; B1\_2\_raceII - CIFC; B2\_1\_raceII\_Vicosa; B3\_3\_raceII\_CIFC) y se encuentra en mayor frecuencia en la población y está distribuida en Perú, Brasil y Colombia. Por lo tanto, a partir de este haplotipo ancestral se ha estado generando nuevas variantes del patógeno. Estos resultados estarían corroborando lo planteado por Zambolin *et al.* (2005) en Brasil, quien sugiere que a partir de la raza II surgieron las demás razas; y es predominante en América Latina (Cristancho *et al.* 2007).

Del mismo modo, el haplotipo Hap\_10, correspondería a la Raza XXII y II, porque estaría conteniendo a las razas B3\_4\_raceII\_CIFC; EF394119.1\_RaceXXII - 637; EF394122.1\_raceXXII - 535. Este haplotipo pudo haber evolucionado en el país a partir del Hap\_1 (población fundadora) o pudo haber ingresado de Colombia adaptándose a las condiciones agroecológicas de las zonas cafetaleras del Perú (Figura 38). Por esta razón, podemos observar en la red de haplotipos una mayor frecuencia del haplotipo Hap\_10 en Perú. Además, se puede observar que este haplotipo es ancestro común de los haplotipos singletons exclusivamente peruanos, en contraste con el haplotipo Hap\_1, que presenta tanto haplotipos singletons peruanos como brasileños. La raza XXII, ha sido reportada en plantas de café derivadas del Híbrido de Timor (HdT 1343/269) y presenta los genes de virulencia V<sub>5,6</sub> (Cristancho *et al.* 2007).

Igualmente, en la red haplotípica se puede observar que el haplotipo Hap\_13 contiene a la raza I (B4\_1\_raceI\_Caratinga; B4\_2\_raceI\_Caratinga), la cual, solo fue muestreada el año 2014. Además, este haplotipo se encuentra distribuido en los tres países productores de café. Sin embargo, en Perú se encuentra en menor frecuencia, debido probablemente a su reciente permanencia en los campos de cultivo de café en

las zonas de estudio. Capucho *et al.* (2012), señalan que la raza I fue descrita por primera vez en *C. canephora* en Brasil, sin embargo, Castro-Cabral (2013) reportó como hospederos de la raza I a *C. arabica* y *C. canephora*.

Se conoce que la raza II, es considerada como la raza más común y de amplia distribución a nivel mundial, esto posiblemente como resultado de un origen genético uniforme de muchos de los cultivares de *Coffea arabica* (Bettencourt 1981).

La distribución, así como la prevalencia de ciertas razas, parecen ser completamente dependientes de los genotipos sembrados localmente (Bettencourt, 1981). La India posee el programa de mejoramiento más antiguo para la resistencia a la roya del café en el mundo y se han identificado 39 razas del hongo (Bhat *et al.* 2013), las cuales presentan un amplio espectro de virulencia (Kosaraju *et al.* 2017). Esto se ha reflejado en la aparición de nuevos aislados que han sido capaces de infectar plantas que fueron originalmente resistentes (Alvarado and Moreno, 2005). De igual manera, existe la prevalencia de ciertas razas que fueron solo descritas para Brasil, donde se han reportado 15 razas fisiológicas (*I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV o XXXI y XXXVII*) (Zambolim *et al.* 2005; Cabral *et al.* 2009), de las cuales las razas II y XV fueron descritas en *Coffea canephora* (Silva 2000). Posteriormente, Silva (2017), reportó quince razas adicionales a las 15 previamente descritas. En Kenia se reportaron 12 razas fisiológicas (*I, II, VII, XV, XX, XXIV, III, XVII, XXIII, XXXVI, XLI, XLII*) (Thitai y Okioga 1977; Gichuru *et al.* 2012), siendo las razas más comunes la *I* y *II*. En Venezuela, solo las razas *I* y *II* fueron reportadas (Silva *et al.* 1997). Mientras que, en Colombia, las razas *II, XXII, XXV, XXIII, XVII, XXX* fueron reportadas, aunque Cristancho *et al.* (2007), estima que existen más de 10 razas de roya sin identificar atacando plantas de café derivadas del Híbrido de Timor. El surgimiento de estas nuevas razas con un amplio espectro de virulencia es el resultado de la exposición de los patógenos a hospederos con un amplio rango de genes de resistencia, a esto se suma la alta diversidad genética y al gran potencial evolutivo del hongo para romper la resistencia a la cual es sometido (Cabral *et al.* 2009).

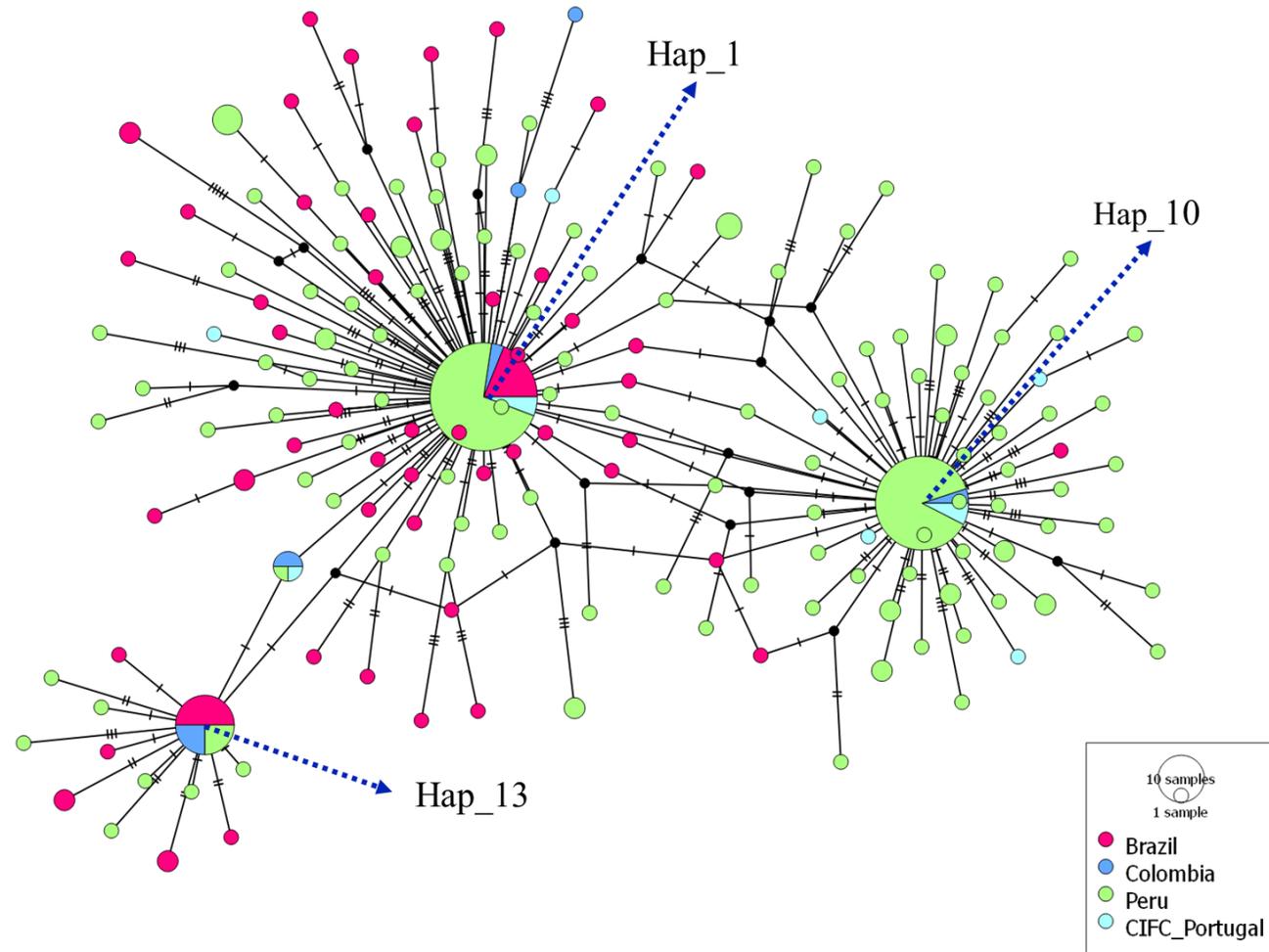
En el Perú, la prevalencia de solo dos variantes del hongo, podría ser el resultado de la uniformidad de las variedades comerciales cultivadas en las diferentes zonas

cafetaleras del país y de la baja introducción de variedades que presentan diferentes factores de resistencia, la cual estuvo principalmente en base a cultivares de *Coffea arabica* no mejorados, destacando las variedades Caturra y Typica. Sin embargo, se puede encontrar plantas de café denominadas como Catimores, las cuales constituyeron hasta antes del año 2014 solo el 10.6 por ciento y 11.4 por ciento del área cultivada en las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica, respectivamente (SENASA, comunicación personal), sin embargo, este panorama ha ido cambiando para el año 2017, donde se observó un 57.8 por ciento y 78.9 por ciento, respectivamente de las variedades que muestran resistencia a la enfermedad. El uso en el mejoramiento de los genotipos derivados del Híbrido de Timor (HDT), los cuales tienen genes de resistencia (SH6, SH7, SH8 y SH9) introgresados de *C. canephora* (Rodrigues *et al.* 1975; Bettencourt y Rodrigues 1988), es considerado como el principal factor que ha ocasionado el surgimiento de nuevas razas del patógeno por presión de selección, y no se descarta, el surgimiento de nuevas razas de roya, que serán capaces de romper la resistencia presente en los nuevos cultivares resistentes.

Estudios realizados en otros tipos de royas, mostraron una correlación entre las razas fisiológicas y los marcadores moleculares SSR (Kolmer y Ordoñez, 2007); asimismo, Aggarwal *et al.* (2018), destacaron el funcionamiento de los marcadores ITS - ADNr, para diferenciar patotipos Indios de *P.striiformis* f. sp. tritici. Santana *et al.* (2018), destacaron el funcionamiento de las secuencias de la región ITS - ADNr para explicar la estructura poblacional de *H. vastatrix*. En este sentido, los marcadores neutrales podrían revelar de mejor manera la relación genética entre los aislados, debido a que la variación genética del fenotipo virulento representa una pequeña parte de la variación genética (Liu *et al.* 2018).

La región del espaciador transcrito interno del ADNr ha sido propuesta por Schoch *et al.* (2012) como un marcador principal de código de barras para hongos al *Consortium for the Barcode of Life*, además, el uso de la región ITS-ADNr como un marcador efectivo ha sido destacado por diferenciar no solo a nivel de especies sino también nivel de población (Nilson *et al.* 2008; Bradshaw *et al.* 2020; Estensmo *et al.* 2021). Sin embargo, su uso ha sido cuestionado debido a que se han reportado diferentes niveles de variación intragenómica en un amplio rango de taxones. Pero,

Lindner *et al.* (2013) estudiando la región ITS1 de 99 cultivos de hongos de una sola espora axènica (filogenéticamente diversos) mediante la técnica de pirosecuenciación 454, reportaron que la variación intragenómica de la región ITS1 es relativamente rara en hongos (lo presentan solo entre 3 y 5 por ciento de especies investigadas en su estudio). Además, ellos reportaron que la falta de la evolución concertada en la homogenización de los parálogos de ITS produce árboles filogenéticos complejos y altos niveles de variación que dificultan incluso la identificación de las especies y en consecuencia inflan los estimados de la diversidad genética. Lo cual no se ha observado en nuestro estudio. Sin embargo, no descartamos la existencia de variación intragenómica en *H. vastatrix*.



**Figura 38.** Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 174 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de las zonas cafetaleras de Perú, Brasil, Colombia y las del CIFIC

**Cuadro 15: Lista de haplotipos generados en base a 180 sitios polimórficos, distribución en los países productores de café y su frecuencia de ocurrencia**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				CIF	Secuencia
		Brasil	Colombia	Perú			
Hap_1	53	10	2	38	3	B1_1_raceII-CIFC; B1_2_raceII-CIFC; B2_1_raceII_Vicosa; B3_3_raceII_CIFC; EF394129.1_CTInNa2; EF394130.1_CT_13_v; MF627774.1; MF627779.1; MF627785.1; MF627794.1; MF627809.1; MF627822.1; MF627823.1; MF627826.1;MF627828.1; HVQ_1.9_2014; HVQ_1.10_2014; HVQ_2.2_2014; HVQ_2.7_2014; HVQ_3.1_2014; HVQ_4.7_2014; HVQ_5.8_2014; HVQ_12.3_2018; HVQ_13.2_2018; HVQ_13.4_2018; HVQ_13.11_2018; HVQ_14.1_2018; HVQ_14.9_2018; HVQ_15.1_2018; HVQ_15.6_2018; HVQ_15.11_2018; HVQ_16.2_2018; HVQ_16.4_2018; HVV_11.8_2014; HVV_6.2_2014; HVV_6.6_2014; HVV_7.7_2014; HVV_8.1_2014; HVV_8.2_2014; HVV_8.3_2014; HVV_8.4_2014; HVV_8.6_2014; HVV_8.7_2014; HVV_8.8_2014; HVV_8.10_2014; HVV_17.1_2018; HVV_17.15_2018; HVV_18.1_2018; HVV_18.9_2018; HVV_18.17_2018; HVV_18.23_2018; HVV_18.25_2018; HVV_18.26_2018	
Hap_2	1	0	0	0	1	B1_3_raceII_CIFC	
Hap_3	1	0	0	0	1	B1_4_raceII-CIFC	
Hap_4	4	0	2	1	1	B1_5_raceII-CIFC; EF394127.1_VColPa1_2; EF394128.1_CTSol_1; HVQ_3.8_2014	
Hap_5	1	1	0	0	0	B2_2_raceII_Vicosa	
Hap_6	1	1	0	0	0	B2_3_raceII_Vicosa	
Hap_7	1	1	0	0	0	B2_4_raceII_Vicosa	
Hap_8	1	0	0	0	1	B3_1_raceII_CIFC	
Hap_9	1	0	0	0	1	B3_2_raceII_CIFC	
Hap_10	40	0	2	35	3	B3_4_raceII_CIFC; EF394118.1_CTInNa3; EF394119.1_RaceXXII-637_CIF; EF394121.1_CT_2_N; EF394122.1_raceXXII-535_CIF; HVQ_1.4_2014; HVQ_2.4_2014; HVQ_2.10_2014; HVQ_3.3_2014; HVQ_3.5_2014; HVQ_3.10_2014; HVQ_5.9_2014; HVQ_12.5_2018; HVQ_12.7_2018; HVQ_12.10_2018; HVQ_13.1_2018; HVQ_13.6_2018; HVQ_13.8_2018; HVQ_14.8_2018; HVQ_15.3_2018; HVQ_15.4_2018; HVQ_15_2018; HVQ_16.10_2018; HVV_10.2_2014; HVV_10.4_2014; HVV_10.8_2014; HVV_10.9_2014; HVV_11.5_2014; HVV_11.6_2014; HVV_11.9_2014; HVV_11.11_2014; HVV_6.3_2014; HVV_6.9_2014; HVV_8.5_2014; HVV_9.2_2014; HVV_9.4_2014; HVV_17.4_2018; HVV_17.5_2018; HVV_17.14_2018; HVV_18.6_2018	
Hap_11	1	0	0	0	1	B3_5_raceII_CIFC	
Hap_12	1	1	0	0	0	B_4_raceI_Caratinga	

**“Continuación”**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencia
		Brasil	Colombia	Perú	CIF	
Hap_13	16	8	4	4	0	B4_1_raceI_Caratinga; EF394123.1_CT_7_N; EF394125.1_CTInNa1; MF627772.1; MF627773.1; MF627789.1; MF627790.1; MF627791.1; MF627825.1; HVQ_4.6_2014; HVQ_4.10_2014; HVQ_5.6_2014; HVV_9.1_2014
Hap_14	1	1	0	0	0	B4_3_raceI_Caratinga
Hap_15	1	1	0	0	0	B4_4_raceI_Caratinga
Hap_16	1	1	0	0	0	B4_5_raceI_Caratinga
Hap_17	1	1	0	0	0	B4_6_raceI_Caratinga
Hap_18	1	1	0	0	0	B4_7_raceI_Caratinga
Hap_19	1	1	0	0	0	B5_1_raceIII_Campinas
Hap_20	1	1	0	0	0	B5_2_raceIII_Campinas
Hap_21	1	1	0	0	0	B5_3_raceIII_Campinas
Hap_22	1	0	0	0	1	EF394120.1_RaceII-1126_CIF
Hap_23	1	0	1	0	0	EF394131.1_CT_28_v
Hap_24	1	0	1	0	0	EF394132.1_CT-9-8
Hap_25	1	1	0	0	0	MF627775.1
Hap_26	2	2	0	0	0	MF627776.1; MF627778.1
Hap_27	1	1	0	0	0	MF627777.1
Hap_28	1	1	0	0	0	MF627780.1
Hap_29	1	1	0	0	0	MF627781.1
Hap_30	1	1	0	0	0	MF627782.1
Hap_31	1	1	0	0	0	MF627783.1
Hap_32	1	1	0	0	0	MF627784.1
Hap_33	1	1	0	0	0	MF627786.1
Hap_34	1	1	0	0	0	MF627787.1
Hap_35	1	1	0	0	0	MF627788.1
Hap_36	1	1	0	0	0	MF627792.1
Hap_37	1	1	0	0	0	MF627793.1
Hap_38	1	1	0	0	0	MF627795.1
Hap_39	2	2	0	0	0	MF627796.1; MF627797.1
Hap_40	1	1	0	0	0	MF627798.1
Hap_41	1	1	0	0	0	MF627799.1
Hap_42	1	1	0	0	0	MF627800.1
Hap_43	1	1	0	0	0	MF627801.1
Hap_44	1	1	0	0	0	MF627802.1
Hap_45	1	1	0	0	0	MF627803.1
Hap_46	2	2	0	0	0	MF627804.1; MF627805.1
Hap_47	1	1	0	0	0	MF627806.1
Hap_48	1	1	0	0	0	MF627807.1
Hap_49	1	1	0	0	0	MF627808.1
Hap_50	1	1	0	0	0	MF627810.1

**“Continuación”**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencia
		Brasil	Colombia	Perú	CIF	
Hap_51	1	1	0	0	0	MF627811.1
Hap_52	1	1	0	0	0	MF627812.1
Hap_53	1	1	0	0	0	MF627813.1
Hap_54	1	1	0	0	0	MF627814.1
Hap_55	1	1	0	0	0	MF627815.1
Hap_56	2	2	0	0	0	MF627816.1; MF627817.1
Hap_57	1	1	0	0	0	MF627818.1
Hap_58	1	1	0	0	0	MF627819.1
Hap_59	1	1	0	0	0	MF627820.1
Hap_60	1	1	0	0	0	MF627821.1
Hap_61	1	1	0	0	0	MF627824.1
Hap_62	1	1	0	0	0	MF627827.1
Hap_63	1	0	0	1	0	HVQ_1.1_2014
Hap_64	2	0	0	2	0	HVQ_1.2_2014; HVQ_1.5_2014
Hap_65	1	0	0	1	0	HVQ_1.3_2014
Hap_66	1	0	0	1	0	HVQ_1.6_2014
Hap_67	1	0	0	1	0	HVQ_1.7_2014
Hap_68	1	0	0	1	0	HVQ_1.8_2014
Hap_69	1	0	0	1	0	HVQ_2.1_2014
Hap_70	1	0	0	1	0	HVQ_2.5_2014
Hap_71	1	0	0	1	0	HVQ_2.6_2014
Hap_72	1	0	0	1	0	HVQ_2.8_2014
Hap_73	1	0	0	1	0	HVQ_2.9_2014
Hap_74	1	0	0	1	0	HVQ_3.2_2014
Hap_75	1	0	0	1	0	HVQ_3.4_2014
Hap_76	1	0	0	1	0	HVQ_3.6_2014
Hap_77	1	0	0	1	0	HVQ_3.7_2014
Hap_78	1	0	0	1	0	HVQ_3.9_2014
Hap_79	1	0	0	1	0	HVQ_4.1_2014
Hap_80	1	0	0	1	0	HVQ_4.2_2014
Hap_81	1	0	0	1	0	HVQ_4.3_2014
Hap_82	2	0	0	2	0	HVQ_4.4_2014; HVQ_12.6_2018
Hap_83	1	0	0	1	0	HVQ_4.5_2014
Hap_84	1	0	0	1	0	HVQ_4.8_2014
Hap_85	1	0	0	1	0	HVQ_4.9_2014

**“Continuación”**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencia
		Brasil	Colombia	Perù	CIF	
Hap_86	1	0	0	1	0	HVQ_5.1_2014
Hap_87	1	0	0	1	0	HVQ_5.2_2014
Hap_88	1	0	0	1	0	HVQ_5.3_2014
Hap_89	1	0	0	1	0	HVQ_5.4_2014
Hap_90	2	0	0	2	0	HVQ_5.5_2014; HVV_11.3_2014
Hap_91	1	0	0	1	0	HVQ_5.7_2014
Hap_92	1	0	0	1	0	HVQ_5.10_2014
Hap_93	1	0	0	1	0	HVQ_12.1_2018
Hap_94	1	0	0	1	0	HVQ_12.2_2018
Hap_95	1	0	0	1	0	HVQ_12.4_2018
Hap_96	1	0	0	1	0	HVQ_12.9_2018
Hap_97	1	0	0	1	0	HVQ_12.11_2018
Hap_98	1	0	0	1	0	HVQ_12.12_2018
Hap_99	1	0	0	1	0	HVQ_13.3_2018
Hap_100	2	0	0	2	0	HVQ_13.5_2018; HVQ_13.12_2018
Hap_101	1	0	0	1	0	HVQ_13.7_2018
Hap_102	1	0	0	1	0	HVQ_13.9_2018
Hap_103	1	0	0	1	0	HVQ_13.10_2018
Hap_104	1	0	0	1	0	HVQ_14.2_2018
Hap_105	4	0	0	4	0	HVQ_14.3_2018; HVV_17.3_2018; HVV_17.17_2018; HVV_18.24_2018
Hap_106	1	0	0	1	0	HVQ_14.4_2018
Hap_107	3	0	0	3	0	HVQ_14.5_2018; HVV_17.11_2018; HVV_18.2_2018
Hap_108	1	0	0	1	0	HVQ_14.6_2018
Hap_109	1	0	0	1	0	HVQ_14.7_2018
Hap_110	1	0	0	1	0	HVQ_14.10_2018
Hap_111	1	0	0	1	0	HVQ_14.12_2018
Hap_112	1	0	0	1	0	HVQ_15.5_2018
Hap_113	1	0	0	1	0	HVQ_15.7_2018
Hap_114	1	0	0	1	0	HVQ_15.8_2018
Hap_115	1	0	0	1	0	HVQ_15.9_2018
Hap_116	1	0	0	1	0	HVQ_15.12_2018
Hap_117	1	0	0	1	0	HVQ_16.1_2018
Hap_118	1	0	0	1	0	HVQ_16.3_2018
Hap_119	1	0	0	1	0	HVQ_16.5_2018
Hap_120	1	0	0	1	0	HVQ_16.6_2018
Hap_121	1	0	0	1	0	HVQ_16.7_2018
Hap_122	2	0	0	2	0	HVQ_16.8_2018; HVQ_16.9_2018

**“Continuación”**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencia
		Brasil	Colombia	Perù	CIF	
Hap_123	1	0	0	1	0	HVQ_16.12_2018
Hap_124	1	0	0	1	0	HVV_10.1_2014
Hap_125	1	0	0	1	0	HVV_10.3_2014
Hap_126	1	0	0	1	0	HVV_10.5_2014
Hap_127	1	0	0	1	0	HVV_10.6_2014
Hap_128	1	0	0	1	0	HVV_10.7_2014
Hap_129	1	0	0	1	0	HVV_10.10_2014
Hap_130	1	0	0	1	0	HVV_11.1_2014
Hap_131	1	0	0	1	0	HVV_11.2_2014
Hap_132	1	0	0	1	0	HVV_11.4_2014
Hap_133	1	0	0	1	0	HVV_11.7_2014
Hap_134	1	0	0	1	0	HVV_11.10_2014
Hap_135	1	0	0	1	0	HVV_6.1_2014
Hap_136	1	0	0	1	0	HVV_6.4_2014
Hap_137	1	0	0	1	0	HVV_6.5_2014
Hap_138	1	0	0	1	0	HVV_6.7_2014
Hap_139	1	0	0	1	0	HVV_6.8_2014
Hap_140	1	0	0	1	0	HVV_6.10_2014
Hap_141	1	0	0	1	0	HVV_7.1_2014
Hap_142	1	0	0	1	0	HVV_7.2_2014
Hap_143	1	0	0	1	0	HVV_7.3_2014
Hap_144	1	0	0	1	0	HVV_7.4_2014
Hap_145	1	0	0	1	0	HVV_7.5_2014
Hap_146	1	0	0	1	0	HVV_7.6_2014
Hap_147	1	0	0	1	0	HVV_7.9_2014
Hap_148	1	0	0	1	0	HVV_7.10_2014
Hap_149	1	0	0	1	0	HVV_9.5_2014
Hap_150	1	0	0	1	0	HVV_9.6_2014
Hap_151	1	0	0	1	0	HVV_9.7_2014
Hap_152	1	0	0	1	0	HVV_9.9_2014
Hap_153	1	0	0	1	0	HVV_9.10_2014
Hap_154	2	0	0	2	0	HVV_17.2_2018; HVV_17.20_2018
Hap_155	1	0	0	1	0	HVV_17.7_2018
Hap_156	1	0	0	1	0	HVV_17.8_2018
Hap_157	1	0	0	1	0	HVV_17.9_2018

**“Continuación”**

Haplotipos	Frecuencia	Distribución				Secuencia
		Brasil	Colombia	Perú	CIF	
Hap_158	1	0	0	1	0	HVV_17.10_2018
Hap_159	1	0	0	1	0	HVV_17.16_2018
Hap_160	1	0	0	1	0	HVV_17.18_2018
Hap_161	1	0	0	1	0	HVV_17.19_2018
Hap_162	1	0	0	1	0	HVV_17.21_2018
Hap_163	1	0	0	1	0	HVV_17.22_2018
Hap_164	2	0	0	2	0	HVV_17.23_2018; HVV_18.15_2018
Hap_165	1	0	0	1	0	HVV_17.24_2018
Hap_166	1	0	0	1	0	HVV_17.25_2018
Hap_167	2	0	0	2	0	HVV_18.3_2018; HVV_18.21_2018
Hap_168	2	0	0	2	0	HVV_18.4_2018; HVV_18.18_2018
Hap_169	2	0	0	2	0	HVV_18.5_2018; HVV_18.16_2018
Hap_170	1	0	0	1	0	HVV_18.11_2018
Hap_171	2	0	0	2	0	HVV_18.12_2018; HVV_18.19_2018
Hap_172	1	0	0	1	0	HVV_18.14_2018
Hap_173	1	0	0	1	0	HVV_18.20_2018
Hap_174	1	0	0	1	0	HVV_18.22_2018
	303	72	12	206	13	

Hap: Haplotipo

HVQ: *Hemileia vastatrix* de Quillabamba

HVV: *Hemileia vastatrix* de Villa Rica

#### 4.4.2 Análisis filogenético mediante Inferencia bayesiana

Para la reconstrucción del árbol filogenético se utilizaron las secuencias de la región ITS - ADNr de *H. vastatrix* muestreadas en los años 2014 y 2018 de plantaciones de café arábico (“typica y caturra”) de Quillabamba (105 secuencias) y Villa Rica (101 secuencias), adicionalmente, se incluyeron secuencias depositadas en el Gen Bank identificadas con los números de accesión del MF627747 al MF627828 (82 secuencias) (Santana *et al.* 2018); del EF394118 al EF394132 (15 secuencias)

(Cristancho *et al.* 2007) y como secuencia fuera de grupo (outgroup) se utilizó la secuencia de *Puccinia porri* (KY492364.1).

El análisis filogenético realizado en base a las secuencias de la región ITS - ADNr para los 116 haplotipos (peruanos) y para las 304 secuencias (peruanas y del NCBI) incluyendo el *outgroup* evidenció la presencia de tres clados, los cuales no estuvieron estructurados con respecto a su origen geográfico ni a los años de muestreo (Figuras 39 y 40). Estos resultados son similares a los mostrados por la red haplotípica. Sin embargo, el uso del análisis filogenético utilizando como outgroup a *P. porri* permitió identificar al haplotipo Hap\_1 como ancestro común para las poblaciones peruanas, brasileras y las colombianas, el cual se encuentra en la base del árbol (clado de color anaranjado) (Figura 40).

El filograma de la Figura 40, muestra en su base (clado color anaranjado) tanto a las secuencias de la raza II (CIFC) como a las secuencias de roya procedentes de Brasil, Colombia y Perú. Estas secuencias, podrían corresponder a la raza II, las cuales fueron reportadas en Brasil (Medeiros 1970), Perú (Schiber y Zentmyer 1984) y Colombia (Leguizamón *et al.* 1984) en 1970, 1979 y 1983, respectivamente. Asimismo, en la base del segundo clado (color lila) se observa la presencia de secuencias de la raza I; las cuales fueron muy similares a las secuencias brasileras, colombianas y peruanas y se encuentran como descendientes recientes. El clado 3 (color verde), el más reciente, alberga en su base a las secuencias de las razas II (CIFC), XXII - 535 y secuencias de royas peruanas en mayor proporción; asimismo, esto se encuentra alejado de la raíz del filograma (Figura 40). Estos resultados son coherentes con los de la red haplotípica donde, también se puede observar secuencias de roya, que al parecer se adaptaron mejor a las condiciones ambientales del Perú. Asimismo, estos resultados podrían guardar relación con la presencia de cultivares de *Coffea arabica* no mejorados los cuales difieren de los cultivares brasileros. Esta distribución, así como la prevalencia de ciertas razas, parecen ser completamente dependientes de los genotipos sembrados localmente (Bettencourt 1981). En el Perú, la alta proporción de variedades susceptibles (85 por ciento), ha ejercido una baja presión de selección en las poblaciones de royas peruanas, sin embargo, este panorama podría cambiar si estas son sometidas a presión por selección de hospederos con combinaciones de genes de resistencia complejos.

Aunque la red de haplotipos (Bandelt *et al.* 1999), es la más apropiada para inferir la variación de secuencias intraespecíficas, los árboles filogenéticos permiten la inferencia de la historia evolutiva. En tal sentido, en el filograma se puede observar que las secuencias de roya brasileñas se encuentran en mayor proporción cerca a la raíz, estos resultados guardan relación con los de la red haplotípica. Por lo tanto, se sugiere que a partir de la raza II, surgieron las demás razas, estos resultados corroboran lo planteado por Zambolin *et al.* (2005) en Brasil, quienes propusieron que a partir de la raza II surgieron las demás razas; y es predominante en América Latina (Cristancho *et al.* 2007).

Schiber y Zentmyer (1984), reportaron que la roya amarilla poco después de su descubrimiento, fue encontrada en Ceilán (actualmente Sri Lanka - ubicado en Asia del Sur), lo cual causó el reemplazo de los cultivares de café por té, luego la enfermedad se extendió a gran parte del sur de Asia y la enfermedad gradualmente fue invadiendo todas las regiones de cultivo de café de África y finalmente fue encontrada en la costa occidental de Angola en 1966, de donde se cree que llegó a Brasil mediante corrientes de viento en 1970; y solo 14 años después, la roya amarilla ya se encontraba en todas las zonas cafetaleras de latino américa, reportándose a la raza II en todos los casos.

En Tanzania, siete razas de roya (razas **I**, **II**, **III**, XVII, XXIV, XI y XX) fueron reportadas inicialmente por Rodrigues Jr. *et al.* (1975). Estudios posteriores, llevados a cabo desde el 2006 al 2007 reportaron a las razas **XXII** y **XXXIV** y solo dos años después fueron reportadas las razas **XXIII**, **XXIV**, **XXV**, **XXVIII** and **XXXI** (Kilambo 2013). En Brasil, fueron reportadas 14 razas de roya (Cabral *et al.* 2009), dentro de las cuales estuvieron las razas I, II, III y XXII. En relación a estos reportes, se podría sugerir que las razas I y XXII pudieron haber sido introducidas al Perú.

*H. vastatrix* presenta una baja diversidad genética resultado probablemente de la adaptación a su nuevo hospedero tetraploide y/o producto de un efecto fundador reciente (Silva *et al.* 2018). Esto podría estar relacionado con el reciente surgimiento de *C. arabica*, producto de la hibridación entre *C. canephora* y *C. eugenioides* (Bawin *et al.* 2020). Estudios recientes de la diversidad genética dentro de esta especie utilizando GBS (*genotyping by sequencing*) mostraron una baja diversidad genética

consecuencia de un severo cuello de botella, resultado de un solo evento de poliploidización (Scalabrin *et al.* 2020). Estos resultados sugieren que tanto *H. vastatrix* como *C. arabica* han co-evolucionado juntas.



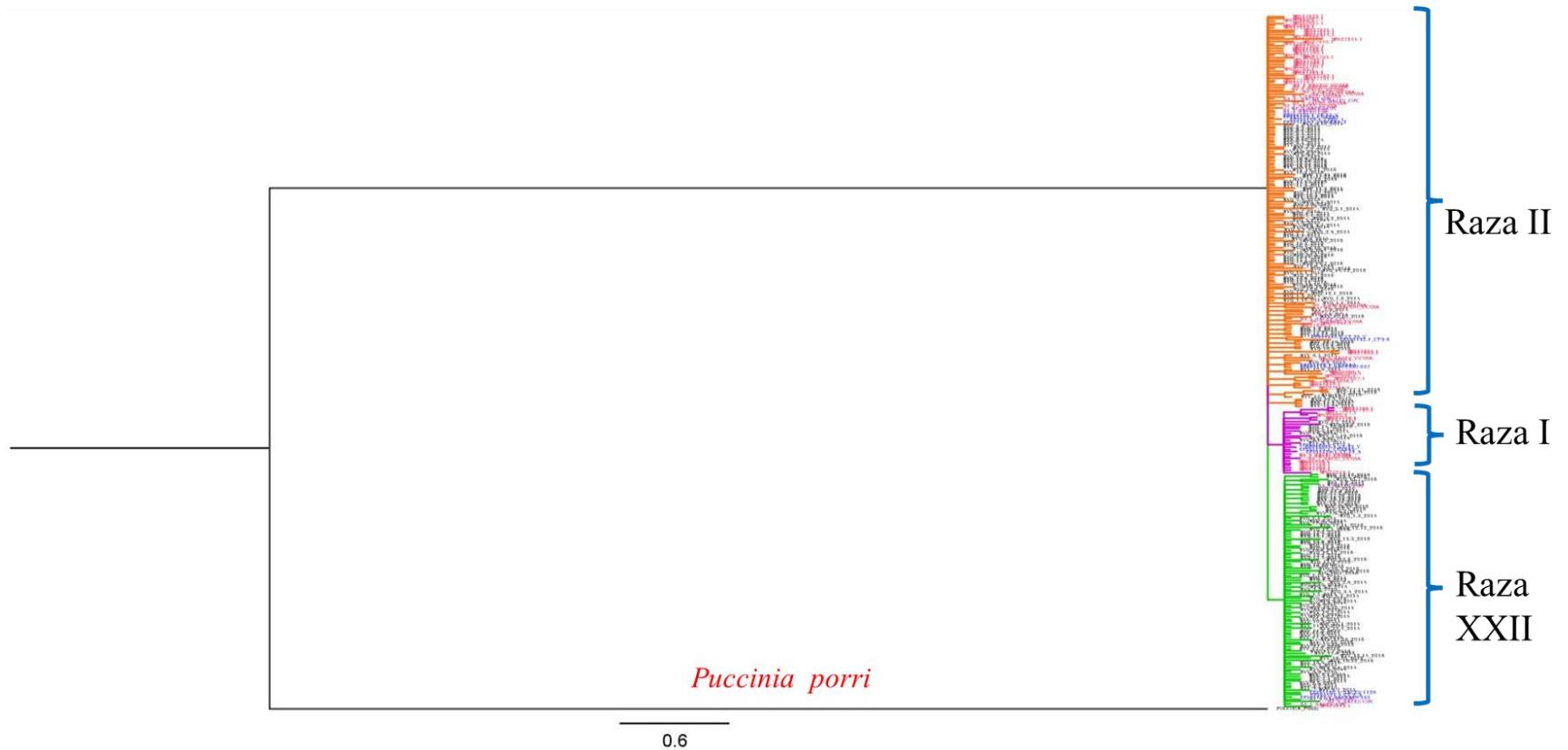


Figura 40. Árbol filogenético según el análisis de Inferencia bayesiana enraizado de 304 secuencias de la región ITS - ADNr de *Hemileia vastatrix*, como fuera de grupo *Puccinia porri*: Clado I (Color naranja); Clado II (Color lila); Clado III (Color verde)

## V. CONCLUSIONES

- Mediante el análisis de la diversidad genética y demografía poblacional de *H. vastatrix*, se determinó que la baja diversidad nucleotídica y la alta diversidad haplotípica presente en el patógeno a través del espacio y el tiempo, se deben a los ciclos de aumento y disminución en el tamaño de la población que ha experimentado *H. vastatrix* desde su arribo al Perú. Además, proponemos que cada brote de la enfermedad en las dos áreas cafetaleras comenzó de unos pocos genotipos, los cuales, de acuerdo con el análisis filogenético intraespecífico, corresponden a las razas II y XXII de este patógeno.
- En la población de *H. vastatrix*, según el análisis filogenético intraespecífico, no se observaron cambios evolutivos en respuesta a la interacción con los nuevos genes de resistencia del hospedero. Asimismo, la prevalencia de las razas II y XXII a través del tiempo sigue siendo el resultado de la persistencia de variedades susceptibles en los campos de café.
- *H. vastatrix* mostró una población grande y no estructurada en el espacio ni en el tiempo; esto debido a los diferentes mecanismos de flujo de genes utilizados por el patógeno. Por lo cual, planteamos que *H. vastatrix*, por los ciclos de aumento y disminución en el tamaño de su población, se comporta como una metapoblación.
- La no estructuración de la variabilidad genética de *H. vastatrix*, por pisos altitudinales, no evidencia un proceso de adaptación. Pero, si revela la plasticidad fenotípica del patógeno a las diferentes condiciones meteorológicas a las que fue sometido en los diferentes pisos altitudinales.

- Mediante el análisis filogenético se determinó que el haplotipo Hap\_1, que corresponde a la raza II, es el que dio origen a las demás variantes del patógeno; y está ampliamente distribuido en los países de Brasil, Colombia y Perú. Además, el haplotipo Hap\_10, de reciente emergencia, corresponde a la raza XXII; y está distribuida en los países de Colombia y Perú.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar muestreos periódicos en las zonas cafetaleras y estudios de diversidad y estructura poblacional del patógeno para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad, monitoreo de la evolución y el estudio de la epidemiología del patógeno.
2. Realizar la identificación fisiológica de aislados de *H. vastatrix* muestreados de diferentes genotipos de café.
3. Secuenciar la región ITS - ADNr mediante secuenciación de alto rendimiento de cultivos de esporas axénicas de *H. vastatrix*, para determinar la eficacia de este marcador para evaluación y monitoreo de la evolución de este patógeno.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, R; Kulshreshtha, D; Sharma, S; Singh, VK; Manjunatha, C; Bhardwaj, SC; Saharan, MS. 2018. Molecular characterization of Indian pathotypes of inter and intraspecific f. sp tritici and multigene phylogenetic analysis to establish inter and intraspecific relationships. *Genet. Mol. Biol.* 41(4): 83 - 842.
- Aime, MC. 2006. Toward Resolving Family-level Relationships in Rust Fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112 - 122.
- Ainouche, AK; Bayer, R. 1999. Phylogenetic relationships in *Lupinus* (*Fabaceae: Papilionideae*) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 86: 590 - 607.
- Alanagreh, L; Pegg, C; Harikumar, A; Buchheim, M. 2017. Assessing intragenomic variation of the internal transcribed spacer two: Adapting the Illumina metagenomics protocol. *Plos One*. 12: e0181491.
- Althoff, DM; Pellmyr, O. 2002. Examining genetic structure in a bogus yucca moth: a sequential approach to phylogeography. *Evolution* 56: 1632 - 1643.
- Alvarado-Alvarado, G; Moreno-Ruiz, L. 2005. Cambio en la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de Caturra x Híbrido de Timor. *Cenicafé* 56(2): 110 - 126.
- Amante, E; Vulcano, MA; Abraho, J. 1971. Observacoes preliminares sobre a influencia da entomofauna na dispersao dos uredospores da ferrugen do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). *O Biologico*. 37: 102 - 105.
- Anderson, PK; Cunningham, AA; Patel, NG; Morales, FJ; Epstein, PR; Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19: 535 - 544.

- Arnheim, N; Krystal, M; Schmickel, R; Wilson, G; Ryder, O; Zimmer, E. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 77(12): 7323 -7327.
- Avelino, J; Muller, R; Cilas, C; Velasco, H. 1991. Development and behaviour of coffee orange rust (*Hemileia vastatrix* Berk. And Br.) in plantations undergoing modernization, planted with dwarf varieties in South-East Mexico. *Café, Cacao, Thé*. 35(1): 21 - 42.
- Avelino, J; Willocquet, L; Savary, S. 2004. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. *Plant Pathology*. 53: 541 - 547.
- Avelino, J; Barboza, B; Araya, J; Fonseca, C; Davrieux, F; Guyot, B; Cila, C. 2005. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *J Sci Food Agri*. 85: 1869 - 1876.
- Avelino, J; Zelaya, H; Merlo, A; Pineda, A; Ordoñez, M; Savary, S. 2006. The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecological Modelling*. 197(3-4): 431- 447.
- Avelino, J; Romero-Gurdián, A; Cruz-Cuellar, HF; Declerck, FA J. 2012. Landscape context and scale differentially impact coffee leaf rust, coffee berry borer, and coffee root-knot nematodes. *Ecological Applications*. 22(2): 584 - 596.
- Avelino, J; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. pp 47.
- Avelino, J; Cristancho, M; Georgiou, S; Imbach, P; Aguilar, L; Bornemann, G; Laderach, P; Anzueto, F; Hruska, A; Morales, C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impact, plausible causes and proposed solutions. *Food Sec*. 7:303 - 321.
- Avise, J. 1989. Gene Trees and Organismal Histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*. 43(6): 1192 - 1208.
- Avise, JC. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, United Kingdom. pp 447.

- Avise, J. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 36:3 - 15.
- Bandelt, HJ; Forster, P; Sykes, BC; Richards, MB. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics*. 141(2): 743 - 747.
- Bandelt, H; Forster, P; Röhl, A. 1999. Median - joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16(1):37 - 48.
- Barton, NH. 2000. Genetic hitchhiking. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 1553 - 1562.
- Batista, D; Guerra - Guimarães, L; Talhinhos, P; Loureiro, A; Silva, DN; Gonzalez, L; Pereira, AP; Vieira, A; Azinheira, HG; Struck, C; Silva, MC; Paulo, OS; Várzea, V. 2010. Analysis of population genetic diversity and differentiation in *Hemileia vastatrix* by molecular markers. Resumo Congresso. 23 International Scientific Conference on Coffee Science. pp. 738 – 742. Bali; Indonesia.
- Baum, D. 2008. Reading a phylogenetic tree: the meaning of monophyletic groups, *Nat Educ*, 2008, vol.1.<http://www.nature.com/scitable/topicpage/reading-a-phylogenetic-tree-the-meaning-of-41956>.
- Bawin, Y; Ruttink, T; Staelens, A; Haegeman, A; Stoffelen, P; Mwanga, JCIM; Roldán-Ruiz, I; Honnay, O; Janssens, SB. 2020. Phylogenomic analysis clarifies the evolutionary origin of *Coffea arabica*. *Journal of Systematics and Evolution*. 59(5): 953 – 963.
- Bhat, SS; Hanumantha, BT; Sounnderrajan, S; Barman, B; Varzea, VMP; Jayarama, BM. 2013. Characterization of virulent rust races of *Hemileia vastatrix* from traditional coffee regions of south India. *J. Coffee Res*. 41: 61 - 74.
- Bebbber, D; Delgado, A; Gurr, S. 2016. Modelling coffee leaf rust risk in Colombia with climate reanalysis data. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 371: 1 - 9.
- Becker, R. 1991. Coffee-stirrer structures. *Journal of Chemical Education*. 68(6): 459.

- Becker, S; Kranz, J. 1977. Comparative studies on the dispersal of *Hemileia vastatrix* in Kenya. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 84(9): 526 - 539.
- Beer, J; Muschler, R; Kass, D; Somarriba, E. 1998. Shade management in coffee and cacao plantations. *Agroforestry Systems*. 38: 139 - 164.
- Bellemain, E; Carlsen, T; Brochmann, C; Coissac, E; Taberlet, P; Kausrud, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in - silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 10: 189.
- Bettencourt, AJ; Noronha - Wagner, M. 1971. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Agronomia Lusitana*. 31: 285 - 292.
- Bettencourt, AJ. 1981. Melhoramento genético do cafeeiro: transferência de fatores de resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica*. Tese (Doutorado). Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.
- Bettencourt, AJ; Rodrigues, JrCJ. 1988. Principles and practice of coffee breeding to rust and other diseases. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R., eds. *Coffee*. London, *Elsevier Applied Science*. 4: 199 - 234.
- Bock, KR. 1962. Dispersal of uredospores of *Hemileia vastatrix* under field conditions. *Transactions of the British mycological Society*. 45(1): 63 - 74.
- Bouckaert, R; Heled, J; Kuhnert, D; Vaughan, T; Wu, CH; Xie, D; Suchard, MA; Rambaut, A; Drummond, AJ. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol*. 10(4): e1003537.
- Bowden, J; Gregory, PH; Johnson, CG. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature*. 229: 500 - 501.
- Bradshaw, M; Grewe, F; Thomas, A; Harrison, CH; Lindgren, H; Muggia, L; Clair, LLSt; Lumbsch, HT; Leavitt, SD. 2020. Characterizing the ribosomal tandem repeat and its utility as a DNA barcode in lichen-forming fungi. *BMC Evol. Biol*. 20: 2.

- Brooks, DR; Bilewitch, J; Condy, C. 2007. Quantitative Phylogenetic Analysis in the 21st Century. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78: 225 - 252.
- Bunn, C; Läderach, P; Pérez-Jimenez, JG; Montagnon, C; Schilling, T. 2015. Multiclass classification of agro-ecological zones for Arabica coffee: an improved understanding of the impacts of climate change. *PLOS ONE* 10: e0140490.
- Cabral, PGC; Zambolin, E; Zambolin, L; Lelis, T; Capucho, A; Caixeta, E. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Disease notes*. 4: 129 - 130.
- Cabral, PGC; Maciel-Zambolim, E; Oliveira, SAS; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2016. Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea spp.* *Plant Pathology*. 65(2): 196 - 204.
- Campos, R; Torres-Pérez, F; Botto-Mahan, C; Coronado, X; Solari, A. 2013. High phylogeographic structure in sylvatic vectors of Chagas disease of the genus *Mepraia* (*Hemiptera: Reduviidae*). *Infect Genet Evol* 19: 280–286. In Kong, S; Sánchez-Pacheco, SJ; Murphy, RW. 2016. On the use of median-joining networks in evolutionary biology. *Cladistics*. 32: 691 - 699.
- Capucho, AS; Caixeta, ET; Zambolim, EM; Zambolim, E; Caixeta, ET. 2012. Climate favourability to leaf rust in conilon coffee. *Australasian Plant Pathology*. 1-4.
- Cardoso, RML. 1986. Novas raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Brasil, Métodos de identificação, e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do híbrido de Timor. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1986. In Santana, MF; Zambolim, EM; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2018. Population genetic structure of the coffee pathogen *Hemileia vastatrix* in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43(5): 473 - 476.
- Carvalho, CR; Fernandes, RC; Carvalho, GMA; Barreto, RW; Evans, HC. 2011. Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE*, 6(11): e26387.

- Castro-Cabral, P. 2013. Diversidade, estrutura populacional e caracterização fisiológica de raças de *Hemileia vastatrix*. Tesis para la obtención grado de Magister Scientiae. Universidade Federal de Viçosa.
- Castro, CBL; Cortina, GHA; Rouxl, J; Wingfield, MJ. 2013. New coffee (*Coffea arabica*) genotypes derived from *Coffea canephora* exhibiting high levels of resistance to leaf rust and Ceratocystis canker. *Tropical Plant Pathology*. 38(6): 485 - 494.
- Catanzariti, A; Dodds, P; Ellis, J. 2007. Avirulence proteins from haustoria - forming pathogens. *FEMS Microbiol Lett*. 269: 181 - 188.
- Chessel, D; Dufour, AB; Thioulouse, J. 2004. The ade4 package-I: one-table methods. *R News*. 4: 5 - 10.
- Chinnappa, C; Sreenivasan, S. 1965. Cytological Studies on Germinating Teliospores of *Hemileia Vastatrix*. *Caryología*. 18(4): 625 - 631.
- Cockerham, CC. 1969 Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72 - 83.
- Cockerham, CC. 1973 Analysis of gene frequencies. *Genetics* 74: 679 - 700.
- Coutinho, TA; Rijkenberg, FHJ; Van Asch, MAJ. 1995. Teliospores of *Hemileia vastatrix*. *Mycol. Res*. 99: 932 - 934.
- Costa, MJ; Zambolim, L; Rodrigues, F. A. 2006. Efeito de níveis de desbaste de frutos do cafeeiro na incidência da ferrugem, no teor de nutrientes, carboidratos e açúcares redutores. *Fitopatologia Brasileira*. 31(6): 564 - 571.
- Cristancho, AMA; Escobar, OC; Ocampo, MJD. 2007. Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. *Cenicafé*. 58(4): 340 - 359.
- Cristancho, M; Escobar, C. 2008. Transferability of SSR markers from related Uredinales species to the coffee rust *Hemileia vastatrix*. *Genet Mol Res*. 7 (4):1186 - 1192.
- Cristancho, MA; Botero-Rozo, DO; Giraldo, W; Tabima, J; Riaño-Pachón, DM; Escobar, C; Rozo, Y; Rivera, LF; Durán, A; Restrepo, S; Eilam, T; Anikster, Y;

- Gaitán, AL. 2014. Annotation of a hybrid genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. *Front. Plant Sci.* 5: 594.
- Davis, AP; Tosh, J; Ruch, N; Fay, MF. 2011. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 167: 357 - 377.
  - DaMatta, F; Cochicho-Ramalho, J. 2006. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Braz. J. Plant. Physiol.* 18(1): 55 - 81.
  - De Jong, EJ; Eskes, AB; Hoogstraten, JGJ; Zadoks, JC. 1987. Temperature requirements for germination, germ tube growth and appressorium formation of urediospores of *Hemileia vastatrix*. *Netherlands Journal of Plant Pathology.* 93(2): 61 - 71.
  - De Luca, D; Kooistra, WHF; Sarno, D; Biffali, E; Piredda, R. 2021. Empirical evidence for concerted evolution in the 18S rDNA region of the planktonic diatom genus *Chaetoceros*. *Scientific Reports.* 11: 807.
  - Deising, H; Heiler, S; Rauscher, M; Xu, H; Mendgen, K. 1996. Cellular Aspects of Rust Infection Structure Differentiation. *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions.* pp. 135 – 156.
  - Desfeux, C; Lejeune, B. 1996. Systematics of Euromediterranean *Silene* (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequences. *Sciences de la vie/Life sciences.* 319: 351 – 358.
  - Díaz, C; Carmen, M. 2017. Línea base del sector café en el Perú (en línea). Lima, Perú, PNUD. 55 p. Consultado 27 noviembre.2018. Disponible en [http://www.pe.undp.org/content/peru/es/home/library/environment\\_energy/linea-debase-del-sector-cafe-en-el-peru/](http://www.pe.undp.org/content/peru/es/home/library/environment_energy/linea-debase-del-sector-cafe-en-el-peru/).

- Diniz, I; Talhinas, P; Azinheira, HG; Várzea, V; Medeira, C; Maia, I; *et al.* 2012. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. *Eur. J. Plant Pathol.* 133: 141 - 157.
- Domínguez-Domínguez, O; Vázquez-Domínguez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1): 59 - 70.
- D'Oliveira, B. 1965. Introduction. Progress Report 1960-65. Coffee Rusts Research Center, Oeiras, Portugal. pp. 1-20.
- Drummond, AJ; Rambaut, A; Shapiro, B; Pybus, OG. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences, *Molecular Biology and Evolution*. 22(5): 1185 - 11.
- Eickbush, TH; Eickbush, DG. 2007. Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175(2): 477 - 485.
- Estensmo, EL; Maurice, S; Morgado, L; Martin-Sanchez, PM; Skrede, I; Kauserud, H. 2021. The influence of intraspecific sequence variation during DNA metabarcoding: A case study of eleven fungal species. *Mol Ecol Resour.* 00: 1 - 8.
- 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.
- Excoffier L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol. Ecol.* 13(4): 853 - 864.
- Excoffier, L; Heckel, G. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics*. 7(10): 745 - 758.
- Felsenstein J. 2004. Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Fluxus Engineering Web site, <http://www.fluxus-engineering.com> (for Network software).

- Fernandes, RC; Evans, HC; Barreto, RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode germination. *Tropic Plant Pathol.* 34: 108 - 113.
- Fernandez, D; Tisserant, E; Talhinhos, P; Azinheira, H; Vieira, A; Petitot A; Loureiro, A; Poulain, J; Da Silva, C. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant–rust interaction. *Molecular Plant Pathology*, 13(1): 17 - 37.
- Flor, HH. 1954. Identification of races of flax rust by lines with single rust-conditioning genes. US Dept. of Agriculture. Technical Bulletin No. 1087. <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT86201076/pdf>.
- Fu, YX; Li, WH. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 133: 693 - 709.
- Gichuru, E.K., Ithiru, J.M., Silva, M.C., Pereira, A.P. and Varzea, V.M.P. 2012. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. *Trop. plant pathol.* 37(6): 424 - 427.
- Fu, YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics*. 147: 915 - 925.
- Gichuru, EK; Ithiru, JM; Silva, MC; Pereira, AP; Varzea VMP. 2012. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. *Tropical plant pathology*. 37(6): 424 - 427.
- Golan, JJ; Pringle, A. 2017. Long-distance dispersal of fungi. *Microbiology spectrum*. 5(4): FUNK-0047-2016.
- Golosova, O; Henderson, R; Vaskin, Y; Gabrielian, A; Grekhov, G; Nagarajan, V; Oler, AJ; Quiñones, M; Hurt, D; Fursov, M; Huyen, Y. 2014. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. *PeerJ*. 2: 1 - 15.

- Gouveia, MM; Ribeiro, A; Várzea, VMP; Rodrigues, JRC. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia* 97: 396 - 404.
- Grünwald, NJ; Goodwin, SB; Milgroom, MG; Fry, WE. 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology*. 93: 738 - 46.
- Harpending, HC; Sherry, ST; Rogers, AR; Stoneking, M. 1993. Genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthropol.* 34: 483 - 496.
- Harpending, HC. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591 - 600.
- Harrison, S; Hastings, A. 1996. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends Ecol. Evol.*, 11: 180 – 183.
- Heath, MC. 2000. Nonhost resistance and non-specific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 315 - 319.
- Hermisson, J; Pennings, PS. 2017. Soft sweeps and beyond: understanding the patterns and probabilities of selection footprints under rapid adaptation. *Methods in Ecology and Evolution*. 8: 700 - 716.
- Herrera, JC; Alvarado, G; Cortina, H; Combes, MC; Romero, G; Lashermes, P. 2009. Genetic analysis of partial resistance of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica* 167: 57 - 67.
- Hirst, JM; Stedman, OJ. 1963. Dry liberation of fungus spores by raindrops. *Microbiology*, 33(2): 335 - 344.
- Hocking, D. 1968. Effects of light on germination and infection of coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *British Mycological Society Transactions*. 51(1): 89 - 93.
- Huelsenbeck, JP; Ronquist, F; Nielsen, R; Bollback, JP. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*. 294(5550): 2310 - 2314.
- INEI, Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2014. Compendio estadístico del Perú. Consultado en setiembre 2016. Disponible en

[https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1055/COMPENDIO2012.html](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1055/COMPENDIO2012.html).

- Jombart, T; Devillard, S; Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*. 11(1): 94.
- Jombart, T; Ahmed, I. 2011. adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*. 27(21): 3070 - 3071.
- Kauserud, H; Schumacher, T. 2002. Population structure of the endangered wood decay fungus *Phellinus nigrolimitatus* (Basidiomycota). *Canadian journal of botany. Journal Canadien De Botanique*. 80: 59 - 606.
- Kauserud, H; Svegård, IB; Saetre, GP; Knudsen, H; Stensrud, Ø; Schmidt, O; Doi, S; Sugiyama, T; Högborg, N. 2007. Asian origin and rapid global spread of the destructive dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Molecular Ecology*. 16: 3350 - 3360.
- Kimura, M. 1964. Diffusion models in population genetics. *J Appl Probab*. 1: 177 - 232.
- Kimura, M. 1991. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn J Genet*. 66(4) :367 - 386.
- Kilambo, DL; Reuben, SOWM; Mamiro, DP. 2013. Races of *Hemileia vastatrix* and variation in pathogenicity of *Colletotrichum kahawae* isolates to compact coffee genotypes in Tanzania. *Journal of Plant Studies*. 2: 95 - 104.
- Kolmer, JA; Ordoñez, M. E. 2007. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. *Phytopathology*. 97: 1141 - 1149.
- Kosaraju, B; Sannasi, S; Mishra, MK; 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.
- Kushalappa, AC; Akutsu, M; Oseguera, SH; Chaves, GM; Melles, CA; Miranda, JM; Bartolo, GF. 1984. Equations for predicting the rate of coffee rust development based

- on net survival ratio for monocyclic process of *Hemileia vastatrix* [*Coffea arabica*]. *Fitopatologia Brasileira*. 9(2): 555 - 271.
- Kushalappa, AC. 1989. Biology and epidemiology, in: Coffee rust: epidemiology, resistance and management. *CRC Press*: Florida: 16 - 80.
  - Kushalappa, AC; Eskes, AB. 1989. Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1): 503 - 531.
  - Langford, SM; Kraitsek, S; Baskerville, B; Ho, SYW; Gongora, J. 2013. Australian and Pacific contributions to the genetic diversity of Norfolk Island feral chickens. *BMC Genet* 14: 9. In Kong, S. 2016. On the use of Median Joining Networks: A philosophical and empirical evaluation of its suitability in evolutionary biology. Thesis for the degree of Master of Science, Department of Ecology and Evolutionary Biology. University of Toronto.
  - Lashermes, P; Cros, J; Marmey, P; Charrier, A. 1993. Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genet Resour Crop Evol*. 40: 91 - 99.
  - Larsson, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30(22): 3276 - 3278.
  - Leguizamón, JE; Baeza, CA; Fernández, O; Moreno, G; Castillo, ZJ; Orozco, FJ. 1984. Identification of race II of *Hemileia vastatrix* Berk y Br. In Colombia. *Cenicafé*. 35:26-28. In Cristancho MA; Botero-Rozo, DO; Giraldo, W; Tabina, J; Riaño-Pachón, DM; Escobar, C; Rozo, Y; Rivera, LF; Durán, A; Restrepo, S; Eilam, T; Anikster, Y; Gaitán, AL. 2014. Annotation of a hybrid partial genoma of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. *Frontiers In Plant Science*. 5: 594.
  - Leigh, JW; Bryant, D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9): 1110 - 1116.
  - Liebig, T; Ribeyre, F; Läderach, P; Poehling, HM; Asten, P; Avelino, J. 2019. Interactive effects of altitude, microclimate and shading system on coffee leaf rust.

- Interactive effects of altitude, microclimate and shading system on coffee leaf rust. *Journal Of Plant Interactions*. 14(1): 407 - 415.
- Lindner, DL; Carlsen, T; Henrik-Nilsson, R; Davey, M; Schumacher, T; Kauserud, H. 2013. Employing 454 amplicon pyrosequencing to reveal intragenomic divergence in the internal transcribed spacer rDNA region in fungi. *Ecology and Evolution*. 3: 1751 - 1764.
  - Liu, TG; Ge, RJ; Ma, YT.; Liu, B; Gao, L; Chen, WQ. 2018. Population genetic structure of Chinese *Puccinia triticina* races based on multi-locus sequences. *J. Integr. Agric.* 17: 1779 - 1789.
  - Long, JC. 1986. The allelic correlation structure of Gainj and Kalam speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics*. 112: 629 - 647.
  - Lopez-Bravo, DF; Virginio-Filho, EDM; Avelino, J. 2012. Shade is conducive to coffee rust as compared to full sun exposure under standardized fruit load conditions. *Crop Protection*. 38: 21 - 29.
  - Maia, T; Badel, JL; Fernandes, MB; Bragança, CAD; Mizubuti, ESG; Brommonschenkel, SH. 2017. Variation in Aggressiveness Components in the *Hemileia vastatrix* Population in Brazil. *Journal of Phytopathology*. 165(3): 174 - 188.
  - Maia, TA; Maciel-Zambolim, E; Caixeta, ET; Mizubuti, ESG; Zambolim, L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology*. 42(5): 533 - 542.
  - Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res*. 27: 209 - 220.
  - Mardulyn, P. 2012. Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation?. *Molecular Ecology*. 21: 3385 - 3390.

- Matos, FS; Wolfgramm, R; Gonçalves, FV; Cavatte, PC; Ventrella, MC; DaMatta, FM. 2009. Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree. *Environmental and Experimental Botany*. 67: 421 - 427.
- Maynard-Smith, J; Haigh, J. 1974. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research*. 23: 23 - 35.
- Mayne, WW. 1932. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* B. et Br. *Nature* 129:510.
- McCain, JW; Hennen, JF. 1984. Development of the uredinial thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. *DEP*. 8: 5592.
- 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.
- McCook, S; Vandermeer, J. 2015. The big rust and the red queen: long-term perspectives on coffee rust research. *Phytopathology*. 105(9): 1164 - 1173.
- McDermott, JM; McDonald, BA. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Phytopathol*. 31: 353 - 73.
- McDonald, BA; Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. 40: 349 - 79.
- McDonald, BA. 2004. Population genetics of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-A-2004-0524-01.
- Meirmans, PG. 2012. AMOVA-Based Clustering of Population Genetic Data. *Journal of Heredity*. 103: 744 - 750.
- Mendgen, K; Hahn, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in plant science*. 7(8): 352 - 356.
- Miller, JM; Cullingham, CI; Peery, RM. 2020. The influence of a priori grouping on inference of genetic clusters: simulation study and literature review of the DAPC method. *Heredity*. 125:269 - 280.

- Nei, M; Li, WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76(10): 5269 - 5273.
- Nei, M; 1987. Molecular Evolutionary Genetics. *Columbia University Press*, New York, NY, USA.
- Nilsson, RH; Kristiansson, E; Ryberg, M; Hallenberg, N; Larsson, KH. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol. Bioinform*. 4: 193 - 201.
- Nunes, CC; Maffia, LA; Mizubuti, ESG; Brommonschenkel, SH; Silva, JC. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. *Australas. Plant Pathol*. 38: 445 - 452.
- Nutman, FJ; Roberts, F. M. 1961. Investigations on a disease of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* Noack: III. The relation between infection of bearing wood and disease incidence. *Transactions of the British Mycological Society*. 44(4): 511 - 521.
- Nutman, FJ; Roberts, FM; Clarke, RT. 1963. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. *Transactions of the British Mycological Society*. 46(1): 27 - 44.
- Nutman, FJ; Roberts, FM. 1970. Coffee leaf rust. *PANS*. 16(4): 607 - 624.
- Okazaki, A; Yamazaki, S; Inoue, I; Ott, J. 2021. Population genetics: past, present, and future. *Human Genetics*. 140: 231 - 240.
- Paradis, E; Claude, J; Strimmer, K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 20(2): 289 - 290.
- Paradise, E. 2018. Analysis of haplotype networks: The randomized minimum spanning tree method. *Methods in Ecology and evolution*. 9: 1308 - 1317.
- Petre, B; Kamoun, S. 2014. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells. *PLoS biology*. 12(2): e1001801.

- Porto, BN; Caixeta, ET; Mathioni, SM; Vidigal, PMP; Zambolim, L; Zambolim, EM; Donofrio, N; Polson, SW; Maia, TA; Chen, C; Adetunji, M; Kingham, B; Dalio, DRJ; De Resende, VML. 2019. Genome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* expression dynamics of candidate effectors dependent on host compatibility. *PloS ONE* 14(4): e0215598.
  - Posada, D; Crandall, KA. 2001. Intraspecific gene genealogies: tress grafting into networks. *Trend in ecology and evolution*. 16: 1.
  - Quispe-Apaza, CS; Mansilla-Samaniego, RC; López-Bonilla, CF; Espejo-Joya, R; Villanueva-Caceda, J; Monzón, C. 2017. Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru. *Fitopatología*. 35(3): 418 - 436.
  - Rajendren, RB. 1967. Atypical and typical germination of uredinoid teliospores of *H. vastatrix*. *Mycologia*. 59: 918 - 921.
  - Rambaut, A; Drummond, AJ; Xie, D; Baele, G; Suchard, MA. 2018. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. **syy032**.
  - Rambaut, A. 2014. FigTree v1.4.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
  - Ramiro, DA; Escoute, J; Petitot, AS; Nicole, M; Maluf, MP; Fernandez, D. 2009. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*. 58(5): 944 - 955.
- Ramos-Onsins, SE; Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol*. 23(8): 1642.
- Ray, N; Currat, M; Excoffier, L. 2003. Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Mol Biol Evol*. 20(1): 76 - 86.
  - Rayner, RW. 1961. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br). *Annals of Applied Biology*. 49: 497 - 505.

- Rayner, RW. 1961b. Spore liberation and dispersal of coffee rust *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Nature* 191(4789): 725.
- Ritschel, A. 2005. Monograph of the genus *Hemileia* (Uredinales). In: *Bibliotheca Mycologica*, (A. Bresinsky, H. Butin and P. Tudzinski, eds). 200: 3 - 132 p. Stuttgart: J. Cramer.
- Talhinhos, P; Batista, D; Diniz, I; Vieira, A; Silva, DN; Loureiro, A; Várzea, V. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular plant pathology*. 18(8): 1039 - 1051.
- Rodrigues, JR; Bettencourt, CJ; Rijo, AJ. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual Review Phytopathology*. 14: 49 - 70.
- Rodrigues, JrCJ. 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. *Fitopatol Brasileira*, 15: 5 - 9.
- Rogers, AR; Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552 - 569.
- Rozas, J; Ferrer-Mata, A; Sánchez-DelBarrio, JC; Guirao-Rico, S; Librado, P; Ramos-Onsins, SE; Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299 - 3302.
- Rozo, Y; Escobar, C; Gaitán, Á; Cristancho, M. 2012. Aggressiveness and Genetic Diversity of *Hemileia vastatrix* During an Epidemic in Colombia. *Journal of Phytopathology*. 160(11-12): 732 - 740.
- Sambrook, J; Russell, D. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Edition 3a, New York, *Cold spring harbor laboratory press*. 1.35-1.37.
- Santana, MF; Zambolim, EM; Oliveira, LO; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2007. Análise molecular do rDNA de *Hemileia vastatrix*. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5, Águas de Lindóia, SP. Anais. Brasília, DF: Embrapa Café. Disponível em linha: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/46691/1/Analise-molecular>.

- Santana, MF; Zambolim, EM; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2018. Population genetic structure of the coffee pathogen *Hemileia vastatrix* in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43(5): 473 - 476.
- Savary, S; Janeau, JL. 1986. Rain-induced dispersal in *Puccinia arachidis*, studied by means of a rainfall simulator. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 92(4): 163 - 174.
- Scalabrin, S; Toniutti, L; Di Gaspero, G. *et al.* 2020. A single polyploidization event at the origin of the tetraploid genome of *Coffea arabica* is responsible for the extremely low genetic variation in wild and cultivated germplasm. *Sci Rep.* 10: 4642.
- Schiber, E. 1970. Viaje al Brasil y el África para estudiar y observar el problema de la herradumbre del café. Abril- mayo. *Report to OIRSA*. pp.109.
- Schiber, E. 1972. Economic impacto coffe rustin Latin America. *Annu, RAv. Phytopatol.* 10: 491 - 510.
- Schieber, E; Zentmyer, GA. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 68(2): 89 - 93.
- Schliep, KP. 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*. 27(4): 592 - 593.
- Schoch, CL; Seifert, KA; Huhndorf, S; Robert, V; Spouge, JL; Levesque, CA; Chen, W; Bolchacova, E; Voigt, K; Crous, PW; Miller, AN; Wingfield, MJ; Aime, MC; An, KD; Bai, FY; Barreto, RW; Begerow, D; Bergeron, MJ; Blackwell, M; Schindel, D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*. 109: 6241 - 6246.
- Silva, AR; Zambolim, L; Pérez, E. 1997. Identificación de razas fisiológicas de la roya del cafeto en el estado Táchira, Venezuela. *BioAgro*. 9: 95 - 98.
- Silva, MC; Nicole, M; Rijo, L; Geiger, JP; Rodrigues, JrCJ. 1999. Cytochemical aspects of the plant–rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)–*Hemileia vastatrix* (race III). *International Journal of Plant Sciences*. 160(1): 79 - 91.

- Silva, DG. 2000. Levantamento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e resistência de clones de *Coffea canephora* var. Conilon à ferrugem. Dissertation, Federal University of Viçosa, Brazil.
- Silva, MC; Nicole, M; Guerra-Guimarães, L; Rodrigues, JrCJ. 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60(4): 169 - 183.
- Silva, MC; Várzea, V; Guimarães, LG; Azinheira, HG; Fernandez, D; Petitot, A. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 119 - 147.
- Silva, MC; Guerra-Guimarães, L; Loureiro, A; Nicole, MR. 2008. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 72(1-3): 29 - 38.
- Silva, DN; Vieira, A., Talhinhos, P., Azinheira, H. G., Silva, M. C., Fernandez, D., *et al.* (2012). “Phylogenetic analysis of *Hemileia vastatrix* and related taxa using a genome-scale approach,” in *Proceedings of the 24th International Conference on Coffee Science, 11–16 November 2012, San José*, ed Association for Science and Information on Coffee (Paris). 1404 - 1408.
- Silva, RA. 2017. Caracterização de raças fisiológicas e análise de proteínas candidatas a efetoras em população de *Hemileia vastatrix* no Brasil. D.S. thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Silva, DN; Várzea, V; Paulo, OS; Batista, D. 2018. Population genomic footprints of host 443 adaptation, introgression and recombination in coffee leaf rust. *Mol Plant Pathol.* 19(7): 444 1742 - 1753.
- Slatkin, M. 1977. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theor. Popul. Biol.* 12: 253 - 262.
- Slatkin, M. 1985. Gene Flow in natural populations. *Ecol. Syst.* 16: 393 - 430.

- Slatkin, M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetics Research*. 58(2): 167 - 175.
- Slatkin, M; Hudson, RR. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. 129: 555 - 562.
- Stewart, GW. 2015. Problems and Cautions with Sequence Mismatch Analysis and Bayesian Skyline Plots to Infer Historical Demography. *Journal of Heredity*. 333 - 346.
- Stukenbrock, EH; McDonald, BA. 2008. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 75 - 100.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585 - 595.
- Tajima, F. 1990. Relationship Between Migration and DNA Polymorphism in a local Population. *Genetic* 126: 231 - 234.
- Tamura, K; Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512 - 526.
- Thrall, PH; Burdon, JJ. 1999. The spatial scale of pathogen dispersal: Consequences for disease dynamics and persistence. *Evolutionary Ecology Research*. 1: 681 - 701.
- Talhinhas, P; Batista, D; Diniz, I; Vieira, A; Silva, DN; Loureiro, A; Várzea, V. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular plant pathology*. 18(8): 1039 - 1051.
- Thitai, GNW; Okioga, DM. 1977. A new physiologic race of *Hemileia vastatrix* in Kenya. *Kenya Coffee*. 42(496): 241 - 243.
- Toniutti, L; Breitler, JC; Etienne, H; Campa, C; Doubeau, S; Urban, L; Bertrand, B. 2017. Influence of environmental conditions and genetic background of arabica coffee (*C. arabica* L) on leaf rust (*Hemileia vastatrix*) pathogenesis. *Frontiers in plant science*. 8: 2025.

- Van der Vossen, HAM. 2005. A critical analysis of the agronomic and economic sustainability of organic coffee production. *Expl Agric.* 41: 449 - 473.
- Vandermeer, J; Rohani, P. 2014. The interaction of regional and local in the dynamics of the coffee rust disease. *arXiv preprint*.1407.8247.
- Varzea, VM; Marques, DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolin L, Zambolim EM, Várzea VM (Eds.) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa MG, Brazil. *Editora UFV*. pp. 53-74.
- Waller, JM. 1985. Control of coffee diseases. In: Coffee: Clifford MN, Willson RC (eds), Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. pp. 219-229.
- Wang, X; McCallum, B. 2009. Fusion body formation, germ tube anastomosis, and nuclear migration during the germination of urediniospores of the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*. *Phytopathology*. 99: 1355–1364.
- Ward, HM. 1882. Researches on the life history of *Hemileia vastatrix*, the fungus of the coffee leaf disease. *Jlinn. Sic. London Bot.* 19: 229.
- Weir, BS; Cockerham, CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38:1358-1370.
- White, TJ; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Inoculum*. 64(1):1-9.
- Yamakawa, AY; Imai, H. 2013. PCR-RFLP typing reveals a new invasion of Taiwanese Meretrix (*Bivalvia: Veneridae*) to Japan. *Aquatic Invasions*, 8(4):407-415. In Kong, S. 2015. On the use of Median Joining Networks: A philosophical and empirical evaluation of its suitability in evolutionary biology. Thesis for the degree of Master of Science, Department of Ecology and Evolutionary Biology. University of Toronto.
- Yang, Z; Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature reviews genetics*. 13(5): 303.
- Yang, RH; Su, JH; Shang, JJ; Wu, YY; Li, Y; Bao, DP; *et al.* 2018. Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for

- the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE* 13 (10): e0206428. <https://doi.org/10.1371>.
- Yuan, YM; Küpfer, P. 1995. Molecular phylogenetics of the subtribe Gentianinae (Gentianaceae) inferred from the sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution*. 196: 207 - 226.
  - Zambolim, L; Vale, FD; Costa, H; Pereira, AA; Chaves, GM. 2002. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. O Estado da Arte de Tecnologias de Produção de Café. UFV-Viçosa, MG, Brasil, 369 - 450.
  - Zambolim, L; Maciel-Zambolim, E; Vale, FXR; Pereira, AA; Sakiyama, NS; Caixeta, ET. 2005. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil – Physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim, L; Maciel-Zambolim, E; Várzea, VMP. Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 75 - 98.
  - Zambolim, L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 41(1): 1 - 8.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo de purificación de “QIAquick gel extracción Kit” de QIAGEN

1. Cortar el fragmento de ADN con un bisturí estéril, cuidando de no exponer mucho tiempo las muestras a la luz ultravioleta para evitar que se degraden.
2. Colocarlo en un tubo para microcentrífuga de 2 mL y determinar el peso de la agarosa para lo cual previamente se debe determinar el peso del tubo. Añadir 3 volúmenes del buffer QG por cada volumen del gel de agarosa al 1 por ciento (100 mg ~ 100  $\mu$ L). La cantidad máxima de agarosa que puede ser procesada en cada columna QIAquick es de 400 mg. Para mayores cantidades de agarosa emplear más de una columna.
3. Incubar a 50 ° C por 10 minutos (o hasta que se disuelva la agarosa). Mezclar con un vortex cada 2 minutos y medio.
4. Cuando se haya disuelto la agarosa, verificar que el color de la mezcla sea amarillo. Si estuviese de color anaranjado o violeta, añadir 10  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.0 y mezclar.
5. Añadir 1 volumen de isopropanol y mezclar.
6. Colocar la columna QIAquick en el tubo de 2 mL que viene en el kit.
7. Añadir la muestra a la columna y centrifugar por 1 minuto a más de 10000 g (14000 rpm en un centrífuga Eppendorf 5415C). El volumen máximo del recipiente es de 800  $\mu$ L por lo que para volúmenes de muestras mayores hay que centrifugar varias veces.

8. Descartar lo eluído y colocar la columna en el mismo tubo de 2 mL.
9. Añadir 0.5 mL del Buffer QG a la columna y centrifugar por 1 minuto a más de 10000 g.
10. Lavar con 0.75 del Buffer PE (al cual previamente se le añadido etanol absoluto) a la columna. Dejar que la columna repose por 3 minutos. Centrifugar por 1 minuto a más de 10000 g.
11. Descartar lo eluído y centrifugar la columna por 1 minuto a más de 10000 g.
12. Colocar la columna en un tubo estéril para microcentrífuga de 1.5 mL.
13. Para eluir añadir 30  $\mu$ L del buffer EB al centro de la membrana, dejar reposar la columna por 1 minuto y centrifugar por un minuto a más de 10000 g. Se recupera un 80 por ciento de la cantidad de ADN que había originalmente.

## **Anexo 2. Protocolo de transformación de *E. coli***

### **a. Materiales**

- Placas de LB con ampicilina y X-Gal e IPTG
- Medio SOC

### **b. Procedimiento**

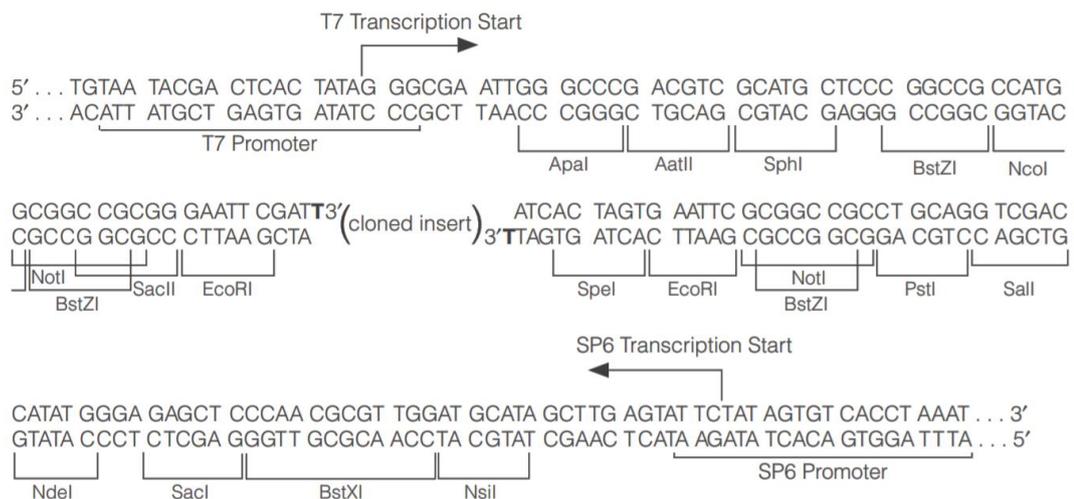
- Centrifugar los tubos conteniendo la reacción de ligación para colectar el contenido en el fondo del tubo.
- Descongelar 100  $\mu$ L de células ultra competentes.
- Agregar al vial de las células 2 $\mu$ L de la reacción de ligamiento y mezclar con movimientos suaves, sin utilizar pipetor.
- Incubar la mezcla en hielo por 30 minutos.
- Posteriormente realizar un choque térmico de 50 segundos a 42 °C.
- Inmediatamente después colocar el vial con células ultra competentes transformadas en hielo durante 2 minutos y adicionar 250  $\mu$ L de medio SOC.
- Incubar el vial conteniendo las células ultra competentes transformadas y el medio SOC a una temperatura de 37° C a 225 rpm durante 1 hora.
- Una vez transcurrido este tiempo, verter y esparcir el contenido del vial en placas Petri conteniendo medio LB, X-Gal, IPTG y ampicilina.
- Incubar las placas Petri toda la noche (14 horas aproximadamente) a 37°C.

- Seleccionar solo colonias blancas, que son las colonias que presentan el inserto.
- Sembrar cada colonia blanca en 5ml de medio LB conteniendo 5µg/ml de ampicilina.
- Incubar a 37 °C por 24 horas.

### c. Selección de los insertos transformantes

Una transformación exitosa de un inserto en pGEM®-T o pGEM®-T Easy Vector interrumpe la secuencia de codificación de β-galactosidasa; Los clones recombinantes pueden identificarse mediante selección por color en placas indicadoras. Sin embargo, las características de los productos de PCR clonados en los vectores pueden afectar significativamente la proporción de colonias azules: blancas obtenidas.

### d. Secuencia de los sitios de multi clonación de PGem-T Vector



**Anexo 3. Protocolo de purificación del Kit Wizard® SV Genomic DNA Purificación Kit de Promega.**

**a. Componentes del producto**

- 20 ml Cell Resuspension Solution (CRA)
- 20 ml Cell Lysis Solution (CLA)
- 30 ml Neutralization Solution (NSB)
- 20 ml Column Wash Solution (CWA)
- 50 Wizard® SV Minicolumns
- 50 Collection Tubes (2ml)
- 550 µl Alkaline Protease Solution
- ml Nuclease-Free Water

**b. Materiales de laboratorio**

- Medio LB que contiene antibióticos
- Etanol (95 por ciento)
- Microcentrífuga capaz de  $14.000 \times g$
- Tubos de microcentrífuga estériles de 1,5 ml
- Centrífuga capaz de  $10.000 \times g$

### c. Protocolo

1. Cosechar 1-5ml (plásmido de alto número de copias) o 10ml (plásmido de bajo número de copias) del cultivo bacteriano por centrifugación durante 5 minutos a 10.000 x g en una centrífuga de mesa. Eliminar el sobrenadante e invertir el tubo sobre papel toalla para eliminar el exceso de medios.
2. Añadir 250 µl de Solución de Resuspensión Celular y resuspender completamente el sedimento celular agitando con vórtex o pipeteando. Es esencial resuspender completamente las células.
3. Añadir 250 µl de solución de lisis celular y mezclar mediante la inversión 4 veces (no vórtice). Incubar hasta que la célula en suspensión desaparezca (aproximadamente 1-5 minutos).

**Nota:** Es importante observar la limpieza parcial del lisado antes de proceder a la adición de la solución alcalina Solución de proteasa (etapa 4); no incubar más de 5 minutos.

4. Añadir 10 µl de Solución de Proteasa Alcalina y mezclar invirtiendo el tubo 4 veces.
5. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 350 µl de Solución de Neutralización y mezcle inmediatamente invirtiendo el tubo 4 veces.
7. Centrifugar el lisado bacteriano a velocidad máxima (alrededor de 14.000 x g) en una microcentrífuga durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 minutos.

**d. Unión del ADN plasmídico**

1. Insertar la columna dentro del tubo colector.
2. Decantar el lisado claro dentro de la columna.
3. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante y reinsertar la columna dentro del tubo colector.

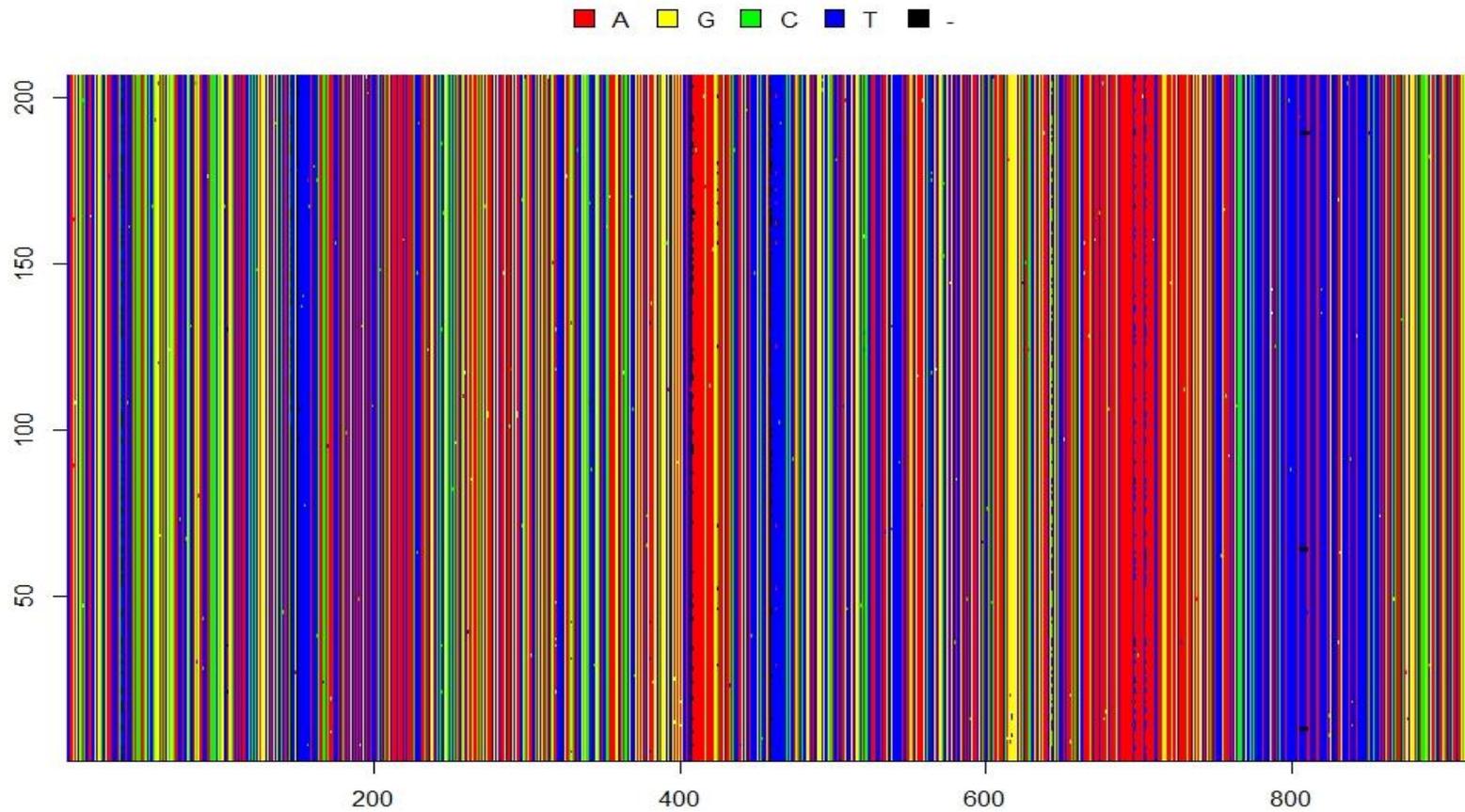
**e. Lavado**

4. Añadir 750  $\mu\text{L}$  de Wash solution (previamente se haya añadido etanol), centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto, descartar el sobrenadante y reinsertar la columna en el tubo.
5. Repetir el paso 11. Con 250  $\mu\text{L}$  de wash solution.
6. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.

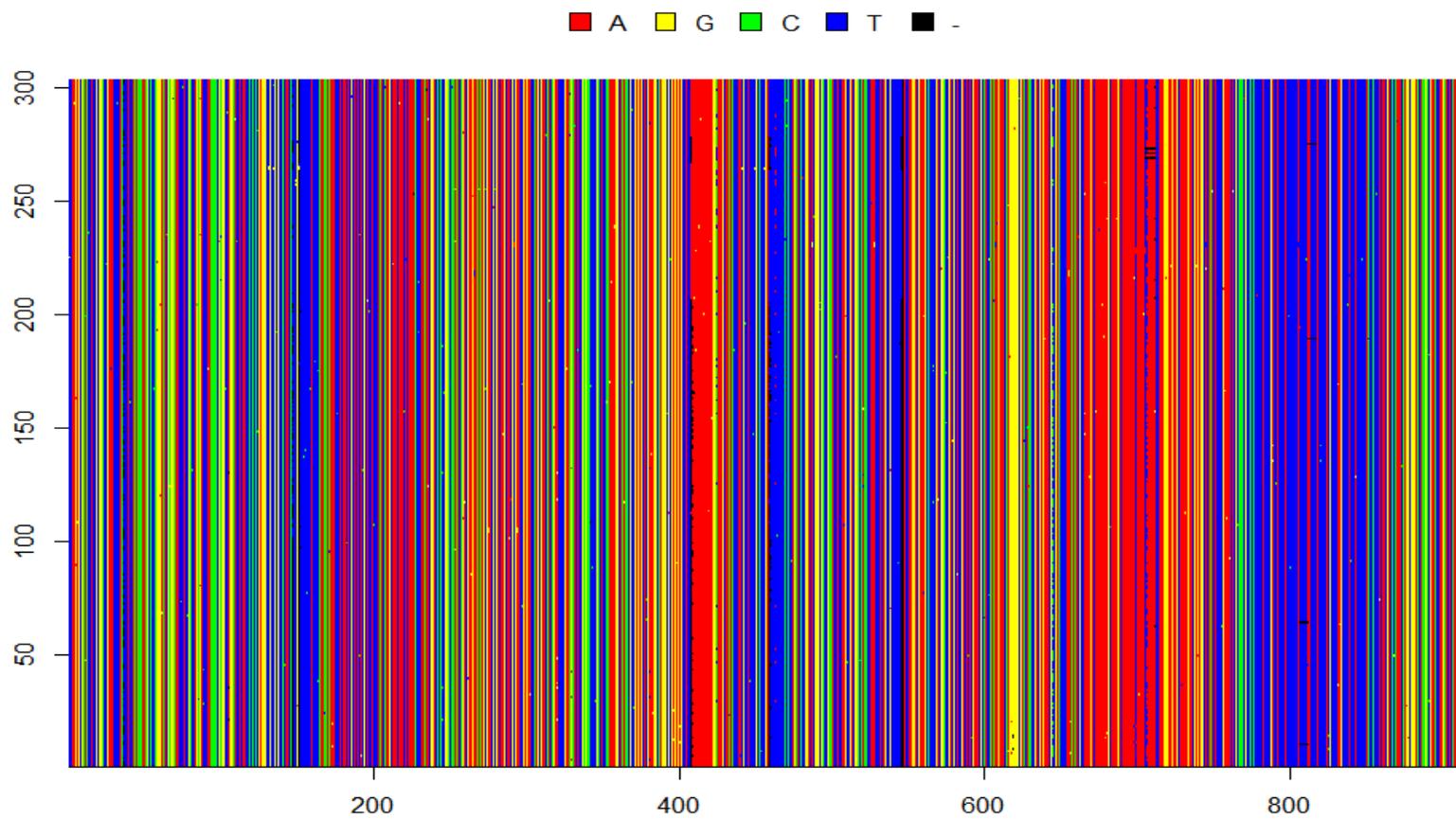
**f. Elución**

7. Transferir la columna a un tubo estéril de 1.5 ml, teniendo cuidado de no transferir cualquier solución de lavado en la columna.
8. Añadir 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas a la columna. Centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto a temperatura ambiente.
9. Descartar la columna y almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o menos.

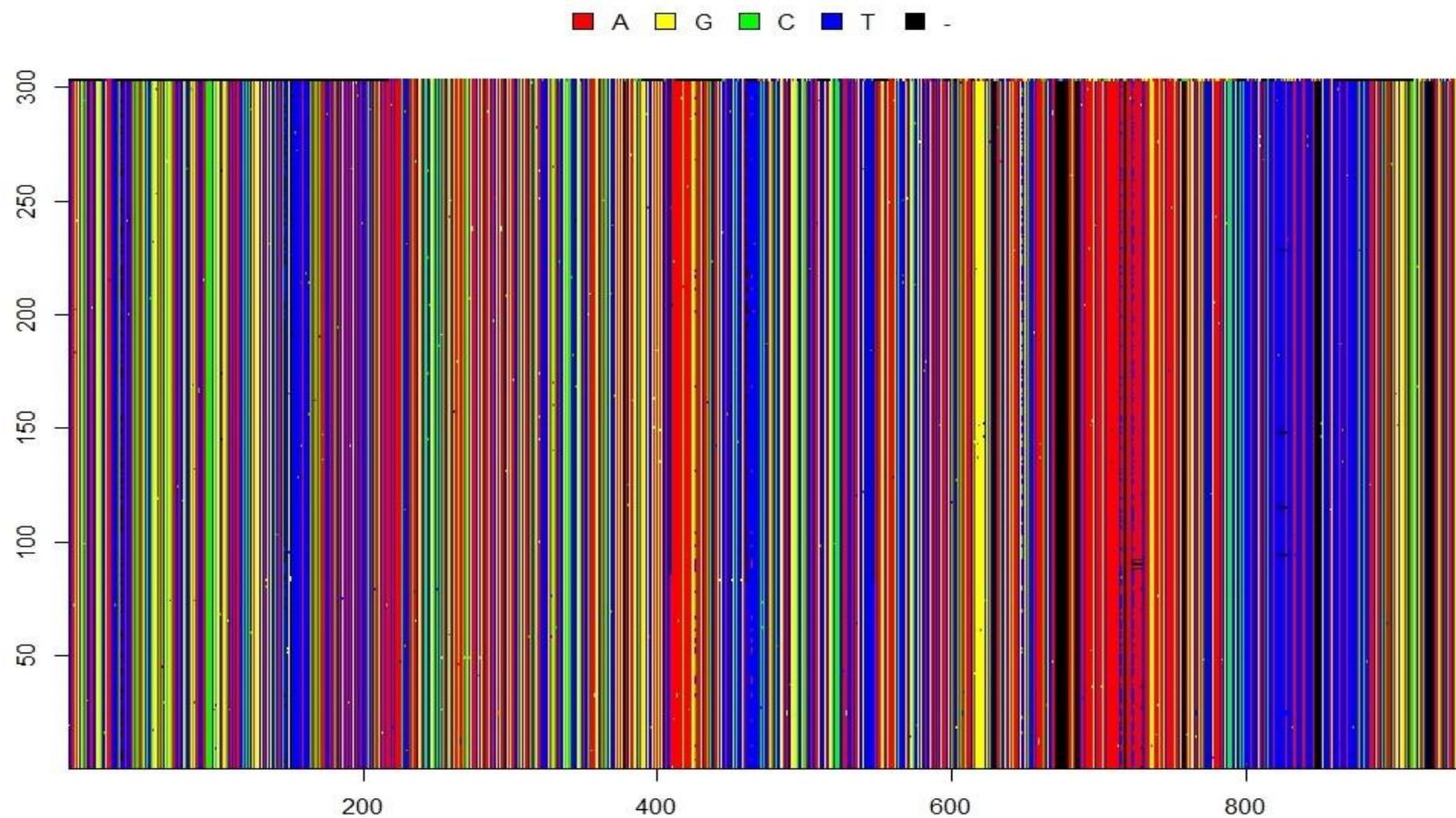
**Anexo 4. Vista general del alineamiento de 206 secuencias de 918 pb de la región ITS - ADNr de *Hemileia vastatrix* procedente de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica**



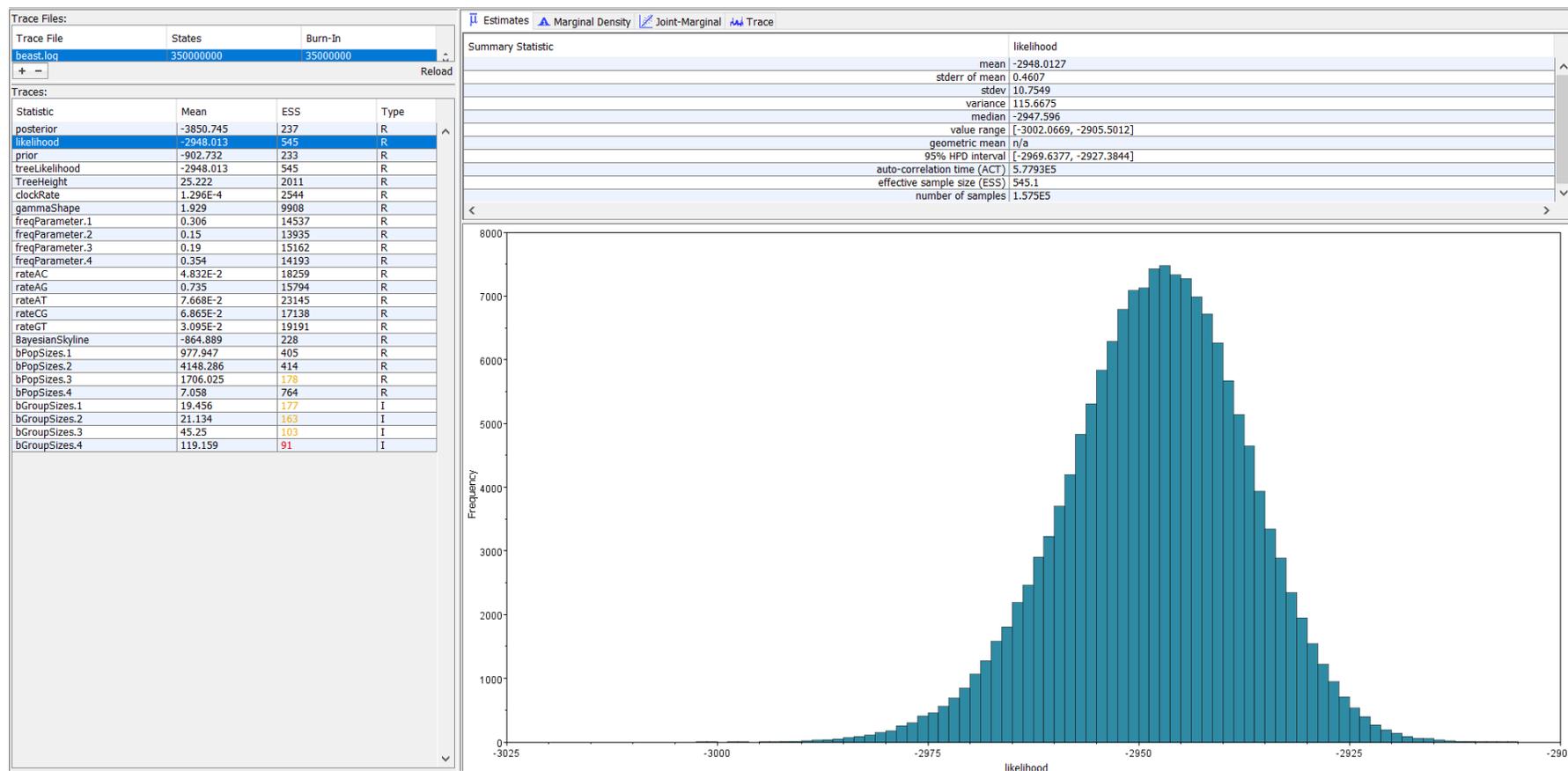
**Anexo 5. Vista general del alineamiento de 303 secuencias (918 pb) de la región ITS - ADNr de *Hemileia vastatrix* procedentes de las zonas cafetaleras de Perú, Colombia, Brasil y del CIFC (Portugal)**



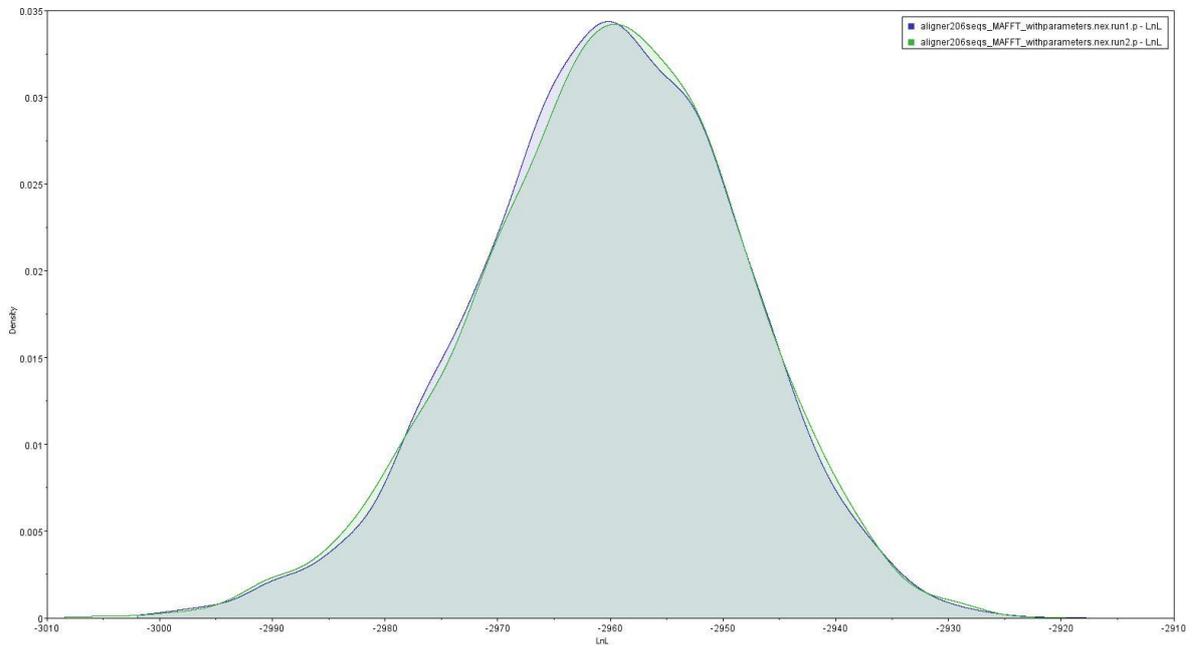
**Anexo 6. Vista general del alineamiento de 304 secuencias (918 pb) de la región ITS - ADNr de *Hemileia vastatrix* procedentes de las zonas cafetaleras de Perú, Colombia, Brasil y del CIFC (Portugal)**



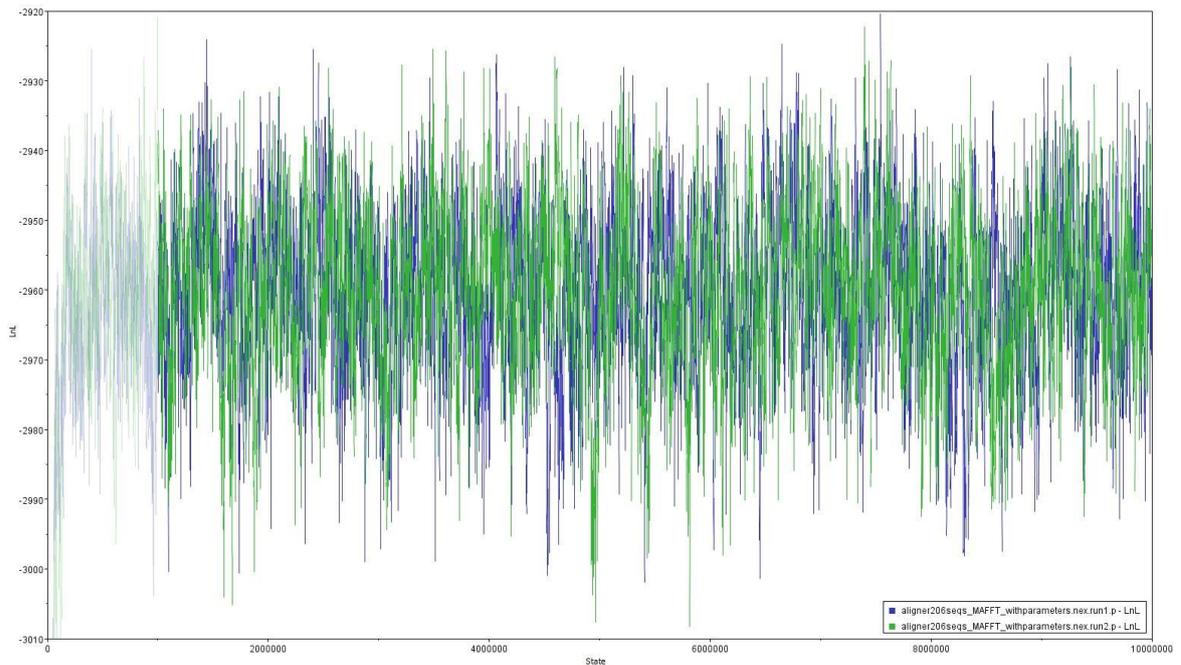
## Anexo 7. Tamaño efectivo de muestreo (ESS) de cada parámetro



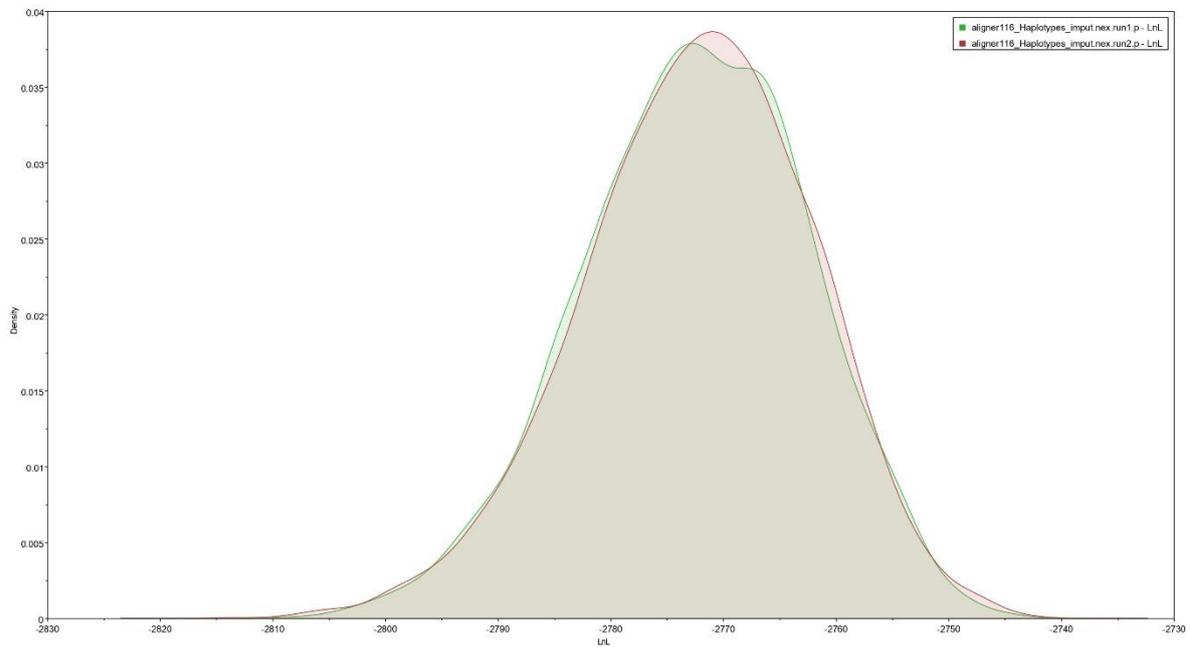
**Anexo 8. Convergencia de las corridas 1 y 2 de las MCMC para el análisis de 206 secuencias de la región ITS - ADNr de *Hemileia vastatrix* (eficiencia de la cadena)**



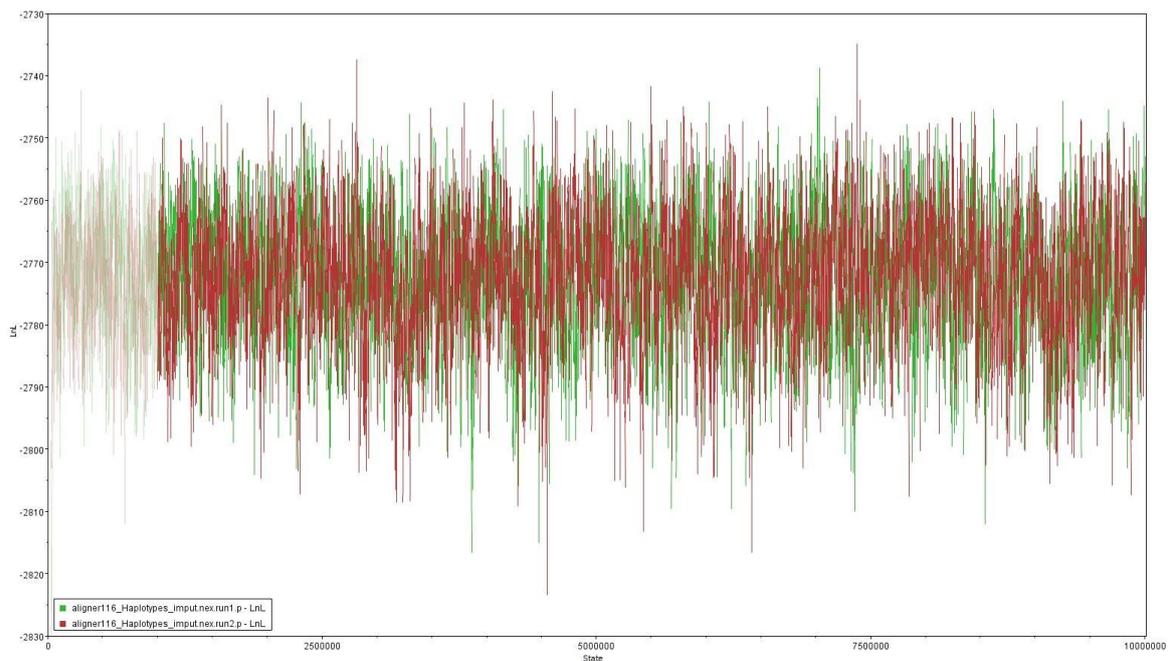
**Anexo 9. Quemado y mezcla de las cadenas de Montecarlo y Marcov para 206 secuencias de la región ITS - ADNr (burn-in and mixing of the MCMC)**



**ANEXO 10. Convergencia de las corridas 1 y 2 de las MCMC para el análisis de 116 haplotipos de la región ITS - ADNr de *Hemileia vastatrix***



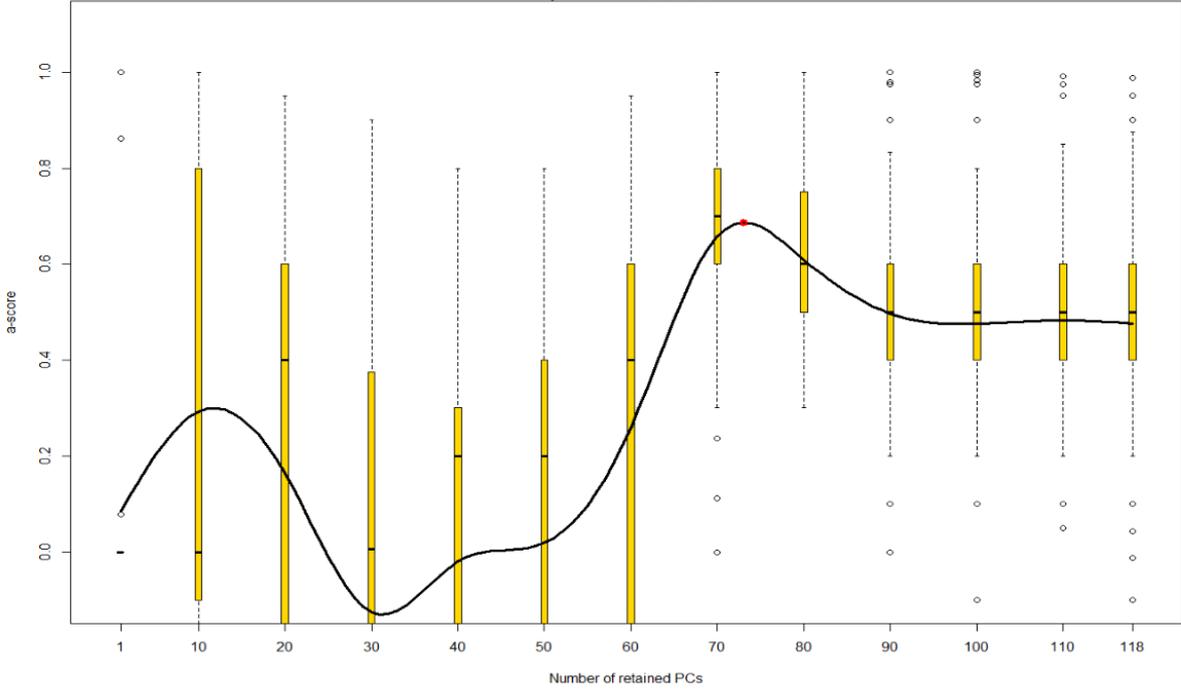
**Anexo 11. Quemado y mezcla de las cadenas de Montecarlo y Marcov (burn-in and mixing of the MCMC) para 116 haplotipos de la región ITS - ADNr**



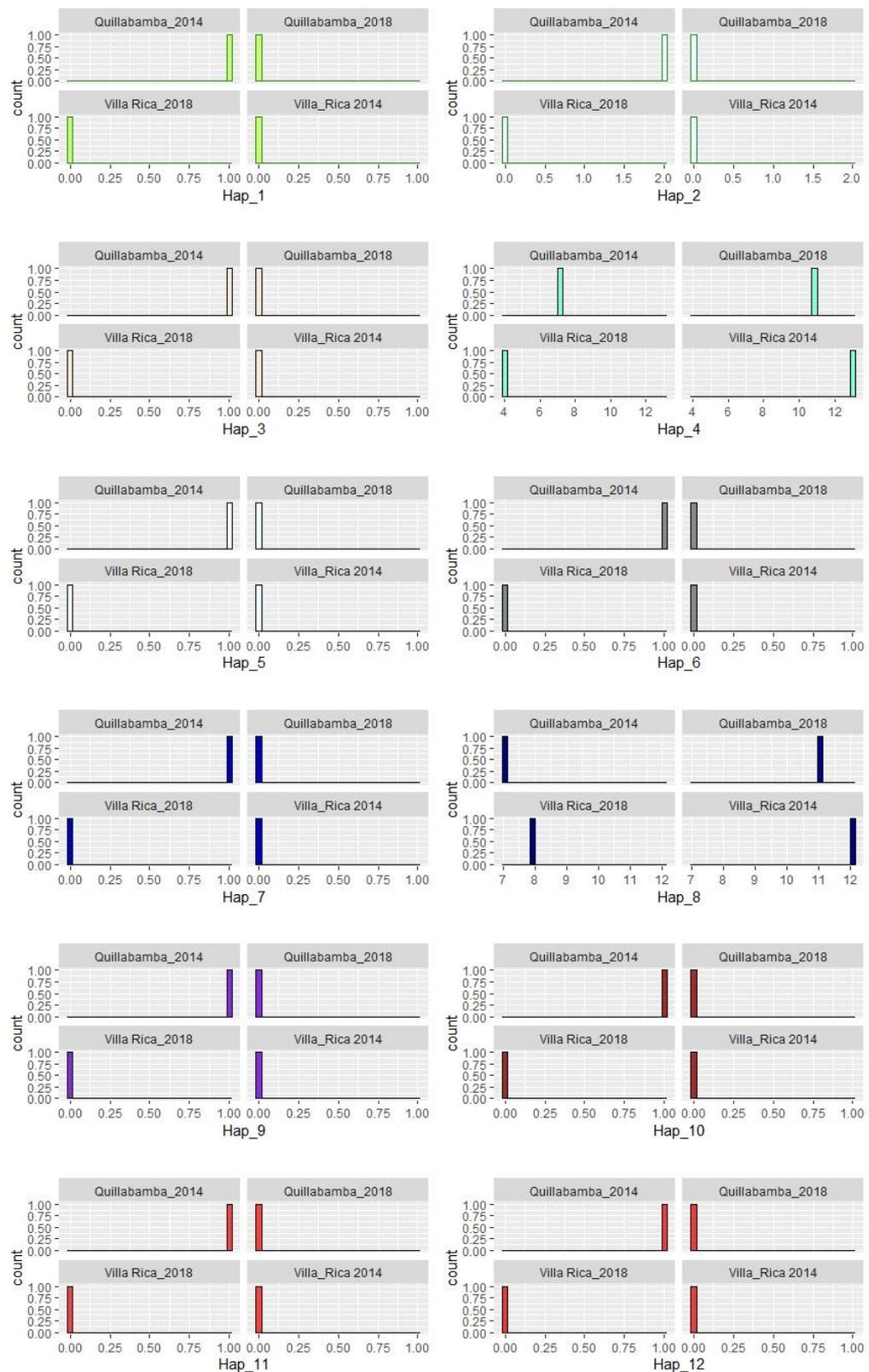
**Anexo 12. Valores de los índices de información de Akaike (AIC) y criterio de información bayesiano (BIC) para la selección del modelo de sustitución de nucleótidos**

Item	Modelo	df	logLik	AIC	BIC
1	JC	603	-4968.973	11143.946	14072.393
2	JC+I	604	-4956.3616	11120.723	14054.026
3	JC+G	604	-4915.7287	11039.457	13972.761
4	JC+G+I	605	-4915.6472	11041.294	13979.454
5	F81	606	-4912.1404	11036.281	13979.297
6	F81+I	607	-4896.8999	11007.8	13955.672
7	F81+G	607	-4857.2745	10928.549	13876.421
8	F81+G+I	608	-4857.0071	10930.014	13882.743
9	K80	604	-4864.1721	10936.344	13869.647
10	K80+I	605	-4849.3421	10908.684	13846.844
11	K80+G	605	-4807.3048	10824.61	13762.769
12	K80+G+I	606	-4808.5268	10829.054	13772.069
13	HKY	607	-4784.4725	10782.945	13730.817
14	HKY+I	608	-4758.7841	10733.568	13686.297
15	HKY+G	608	-4715.1689	10646.338	13599.067
16	HKY+G+I	609	-4713.6577	10645.315	13602.901
17	SYM	608	-4824.7052	10865.41	13818.139
18	SYM+I	609	-4808.4394	10834.879	13792.464
19	SYM+G	609	-4765.5133	10749.027	13706.612
20	SYM+G+I	610	-4765.1321	10750.264	13712.706
21	GTR	611	-4763.1402	10748.28	13715.579
22	GTR+I	612	-4737.7897	10699.579	13671.734
23	GTR+G	612	-4696.0808	10616.162	13588.316
24	GTR+G+I	613	-4694.4396	10614.879	13591.89

**Anexo 13. Número óptimo de PCs utilizados para el DAPC basado en  $\alpha$ -score function**

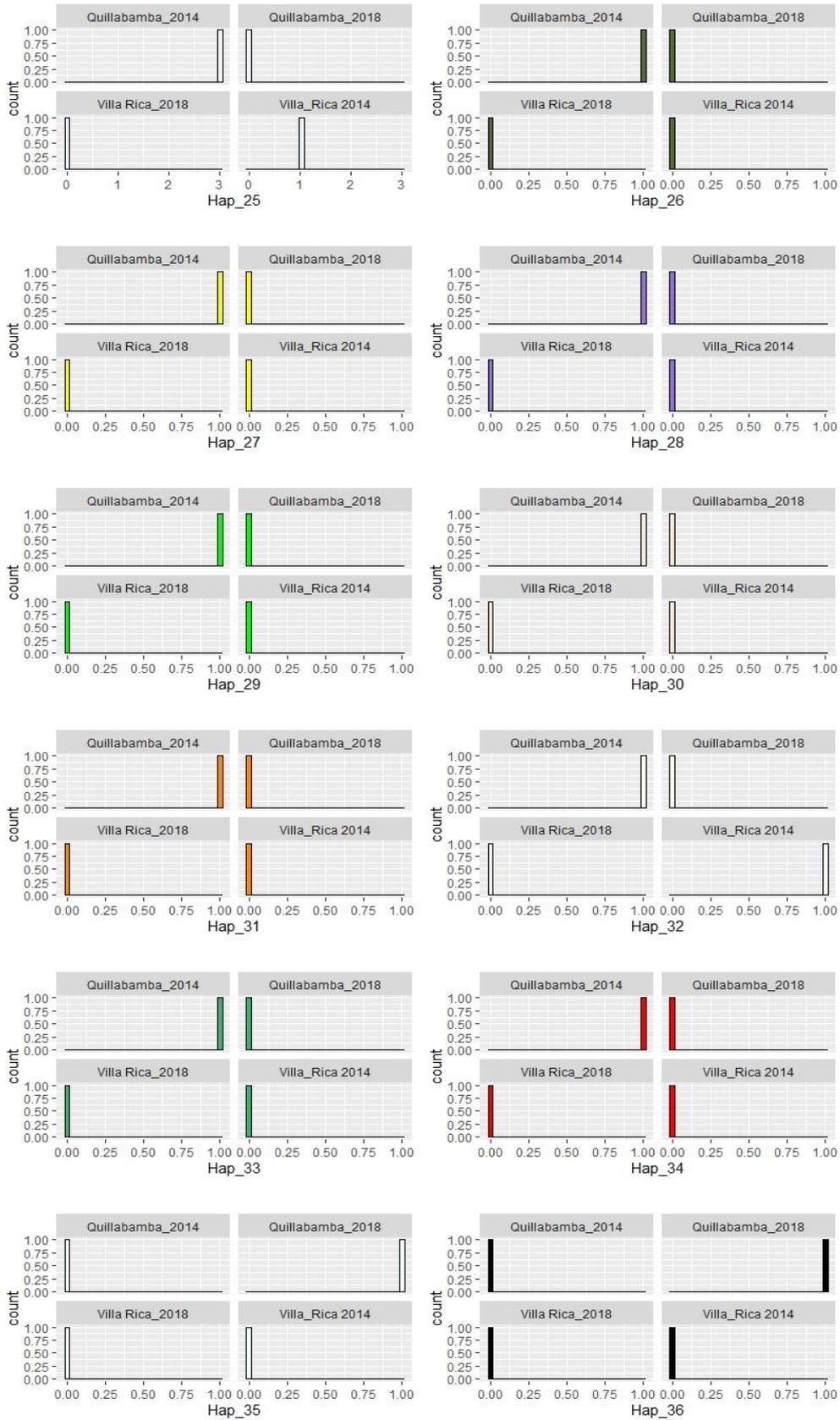


## Anexo 14. Distribución de los primeros 48 haplotipos en las zonas cafetaleras en los años 2014 y 2018

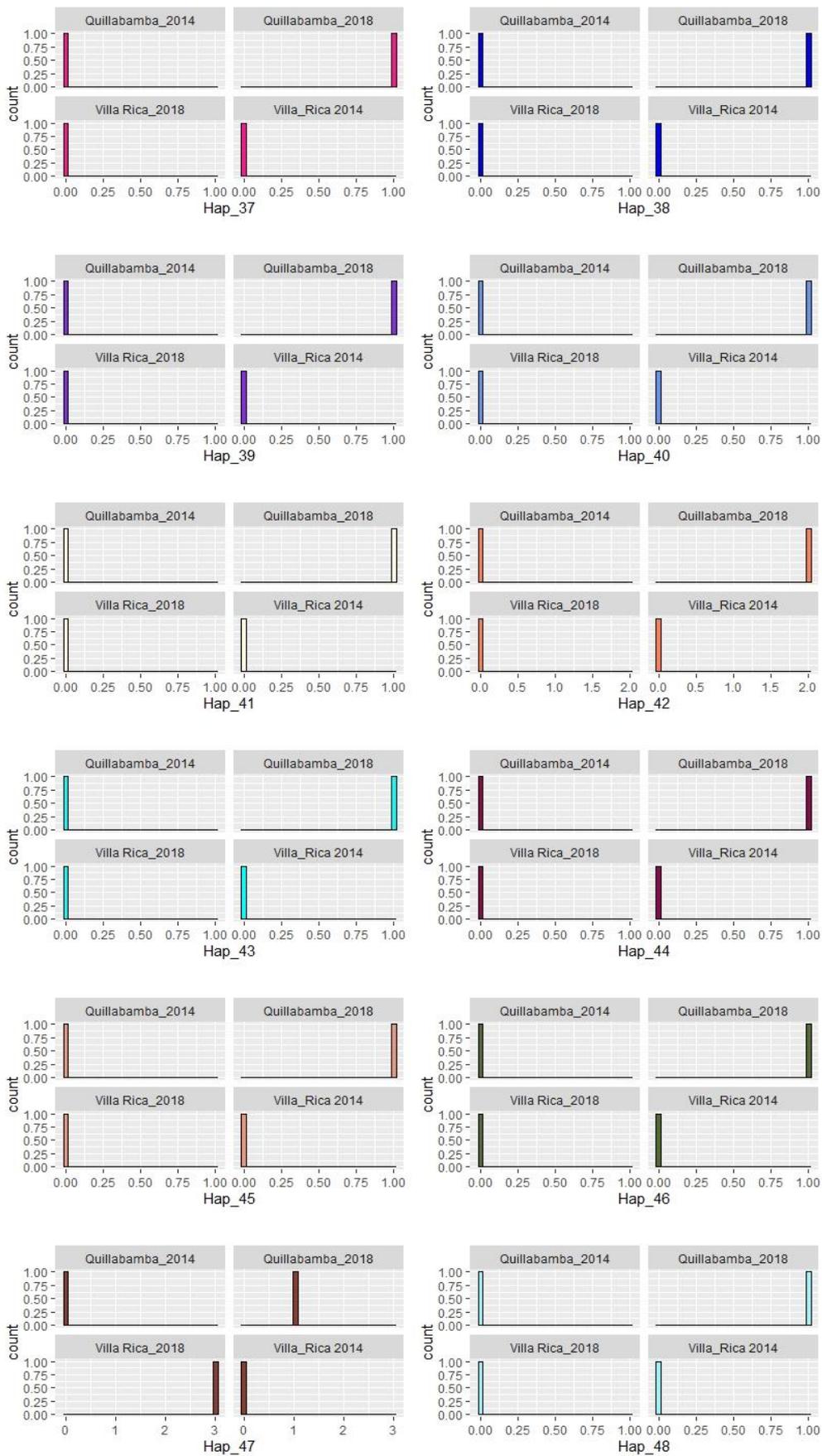




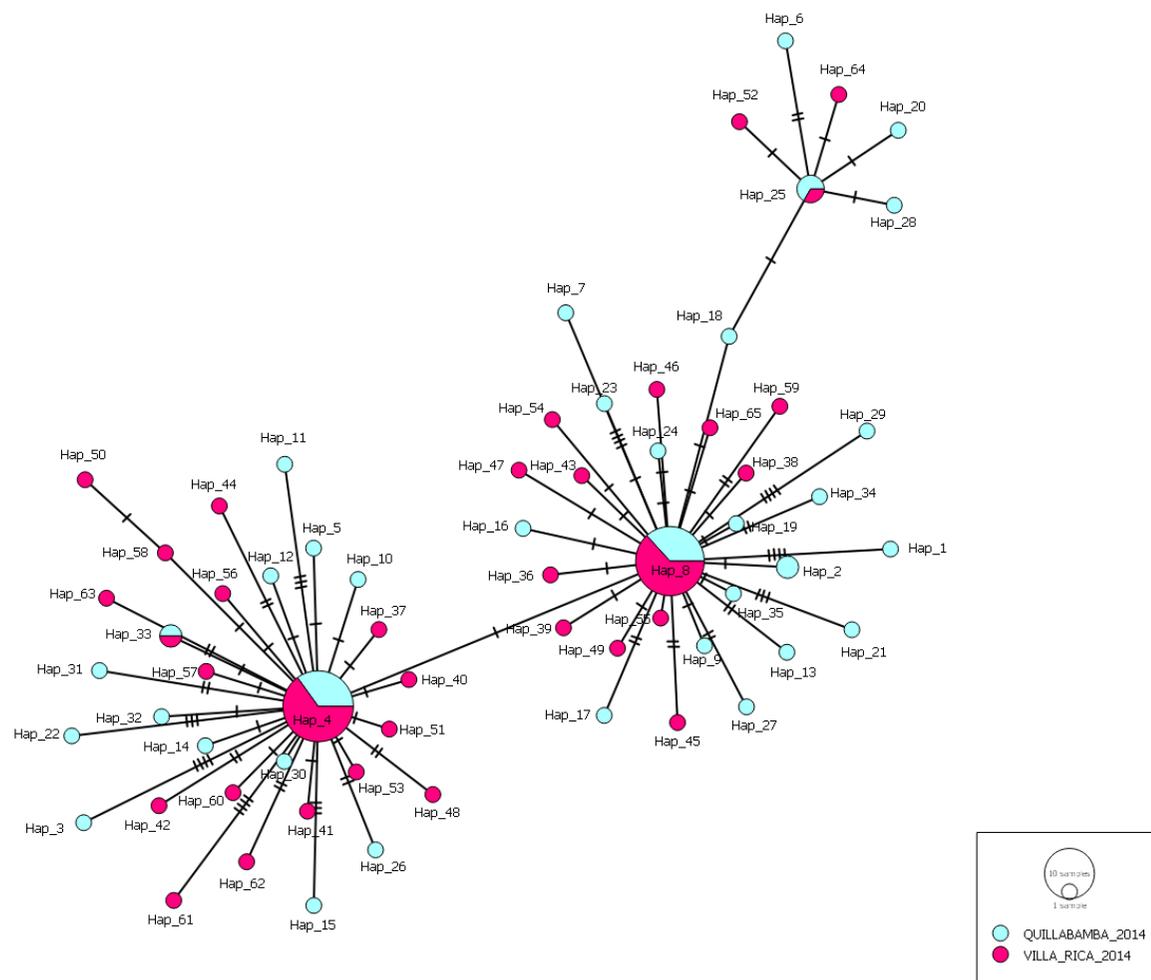
# “Continuación”



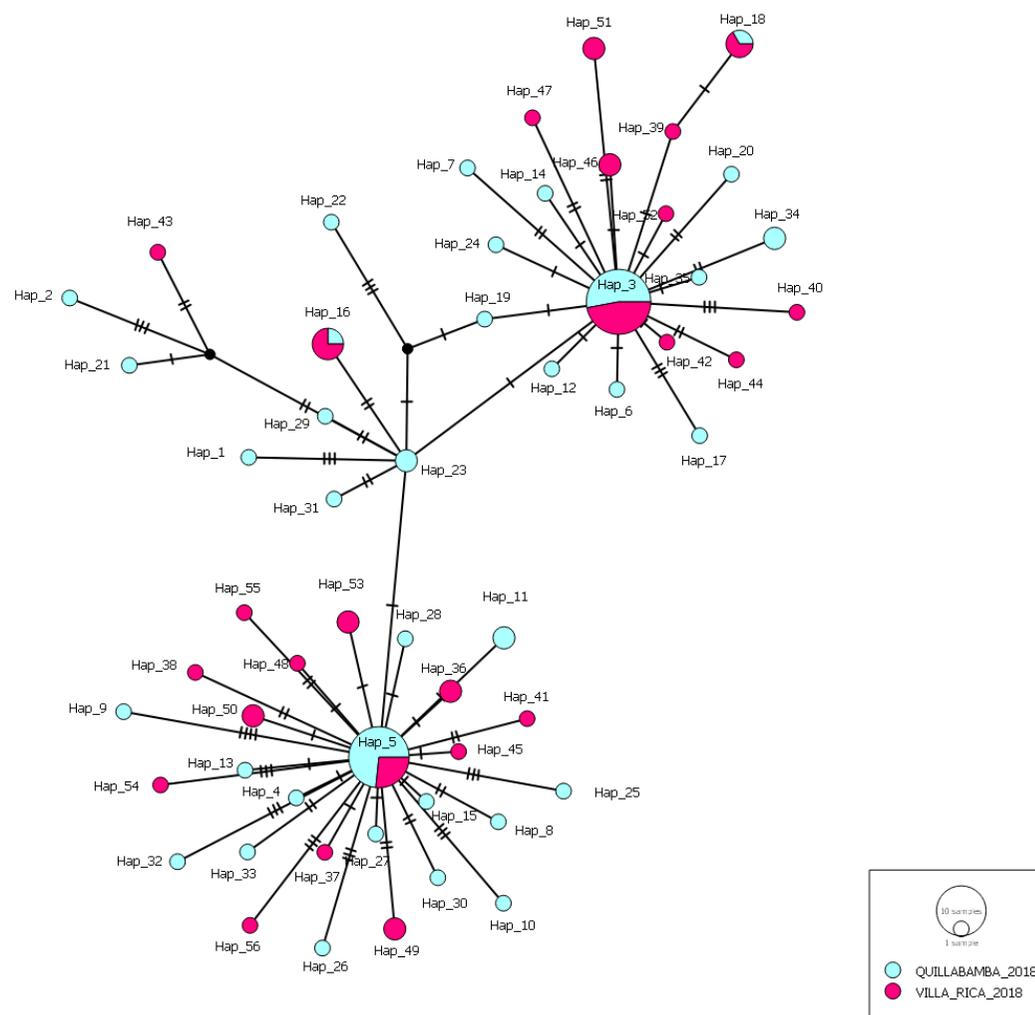
“Continuación”



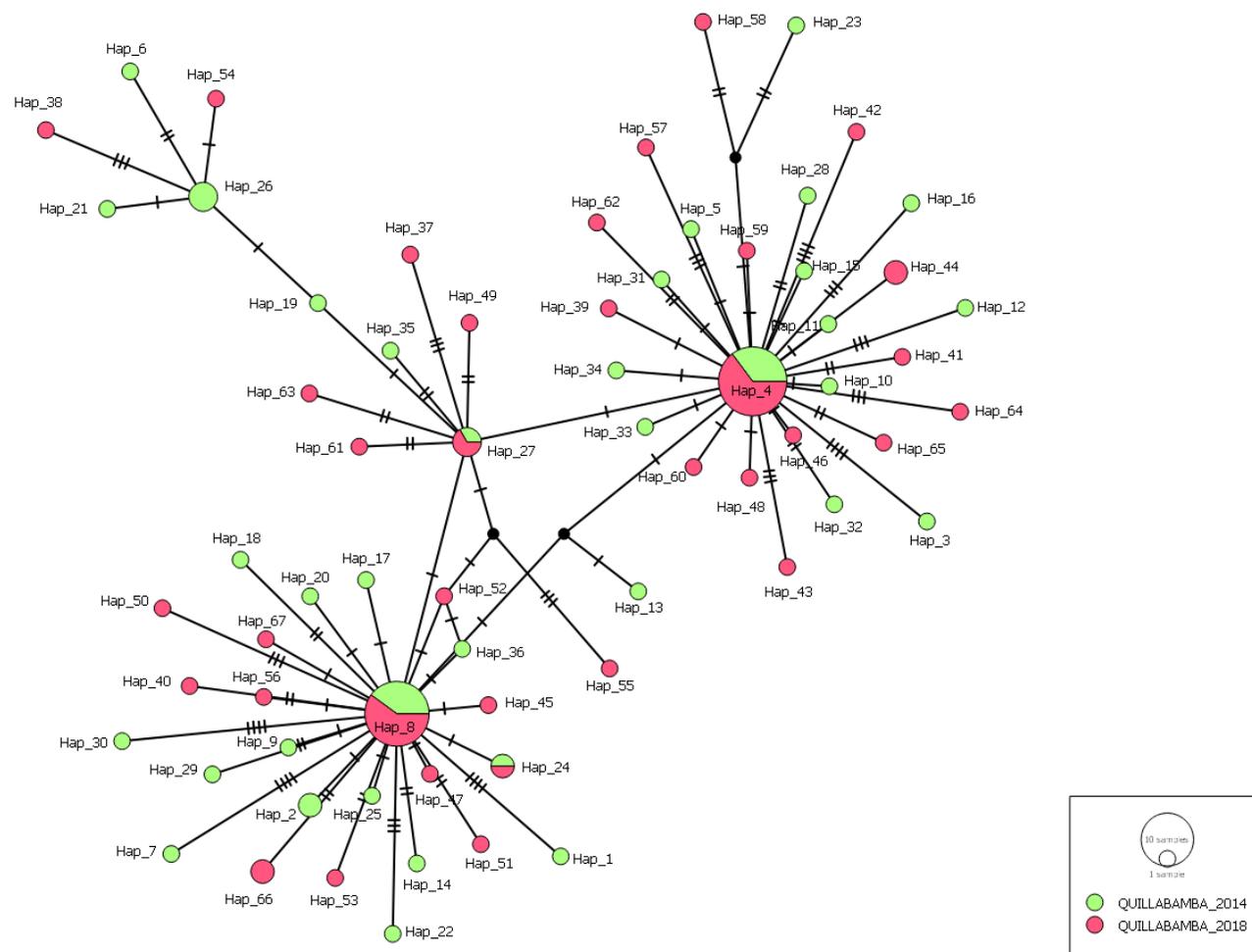
**Anexo 15. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 65 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de la zona cafetalera de Quillabamba y Villa Rica muestreados en el año 2014**



**Anexo 16. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 56 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de la zona cafetalera de Quillabamba y Villa Rica muestreados el año 2018**



**Anexo 17. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 67 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de la zona cafetalera de Quillabamba**



**Anexo 18. Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 57 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de la zona cafetalera de Villa Rica**

