

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE *COFFEA ARABICA* L. DE TRUJILLO, VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA USANDO MARCADORES SSR

DANIEL GUTIÉRREZ

Universidad del Valle, Calle 13 #100-00, Cali, Valle del Cauca, Colombia.

MARY BELCY BONILLA-GRANJA

Universidad del Valle, Calle 13 #100-00, Cali, Valle del Cauca, Colombia.

RONALD VIÁFARA-VEGA

Universidad del Valle, Calle 13 #100-00, Cali, Valle del Cauca, Colombia.
ronald.viafara@correounivalle.edu.co

HEIBER CÁRDENAS

Universidad del Valle, Calle 13 #100-00, Cali, Valle del Cauca, Colombia.

Resumen: *Coffea arabica* es una de las especies más importantes a nivel económico, al producir una de las bebidas más consumidas en el mundo. Este estudio evaluó molecularmente algunas de las variedades de café cultivadas en el departamento del Valle del Cauca con el fin de que los resultados contribuyan a direccionar los planes de mejoramiento y fomentar la producción de café regional. Se muestrearon 140 individuos correspondientes a cinco variedades de café. Se usaron ocho microsatélites para hacer la caracterización molecular a partir de los estimadores de diversidad genética, un dendrograma basados en las distancias de Nei y un AMOVA. Se encontró una heterocigosidad promedio observada de 0.004, sin embargo, la heterocigosidad promedio esperada junto con el número de genotipos mostraron que a pesar de haber sido sometidas a programas de mejoramiento aún existe diversidad genética en todas las variedades. Esto junto con el resultado del AMOVA, revelaron que esta diversidad se encuentra alojada en diferentes tipos de homocigotos que provocan una gran variación cuando se comparan los individuos dentro de cada variedad. Finalmente, las distancias de Nei mostraron una diferenciación de las variedades siendo más parecidas aquellas con una mayor intensidad de selección artificial.

Palabras Clave: microsatélites, diversidad genética, estructura genética, selección artificial

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE *COFFEA ARABICA* L. DE TRUJILLO, VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA USANDO MARCADORES SSR

Abstract: *Coffea arabica* is one of the most economically important species, producing one of the most consumed beverages in the world. In this study, with the purpose of using the results to guide improvement plans and promote regional coffee production, some of the coffee varieties grown in the department of Valle del Cauca were molecularly evaluated. 140 individuals corresponding to five coffee varieties were sampled. Eight microsatellites were used to carry out the molecular characterization based on genetic diversity estimators, a dendrogram based on Nei distances and an AMOVA. The observed average heterozygosity was 0.004, however, the expected average heterozygosity together with the number of genotypes showed that despite having been subjected to breeding programs, there is still genetic diversity in all varieties. This, together with the result of the AMOVA, revealed that this diversity is housed in different types of homozygotes, which cause a great variation in the comparison of individuals within each variety. Finally, the Nei distances showed a differentiation of the varieties. Those with a greater intensity of artificial selection are more similar.

Keywords: microsatellites, genetic diversity, genetic structure artificial selection,

INTRODUCCIÓN

El café pertenece a la familia de las rubiáceas, compuesta por 600 géneros y cerca de 1600 especies (Wikström et al., 2020). Aunque tiene distribución cosmopolita, la mayoría de las especies se encuentran ubicadas en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, siendo las especies del género *Coffea* las más importantes a nivel económico, ya que de ellas se obtiene una de las bebidas más consumidas en el planeta (Preedy, 2015; ICO, 2018). Este género está compuesto por 124 especies descritas hasta la fecha de las cuales dos son domesticadas, *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (Wikström et al., 2020). Las especies del género *Coffea* son principalmente diploides ($2n=2x=22$) genéticamente autoincompatibles (Clarindo y Carvalho, 2008) y se caracterizan por ser plantas leñosas, comprendiendo desde arbustos hasta árboles de 10 metros de altura. A diferencia de las demás especies de su género, *C. arabica* es un alotetraploide natural ($2n=4x=44$) originado del cruce entre las especies diploides *C. canephora* y *Coffea eugenoides* S. Moore, caracterizado por ser principalmente autógamo al tener un porcentaje de autopolinización del 90% (Carvalho & Krug, 1949; Lashermes et al., 1993; Clarindo & Carvalho, 2008; Spinoso-Castillo et al., 2020). En cuanto al comportamiento meiótico, algunos informes de citogenética indican que esta especie presenta una meiosis similar a la de un diploide y, en consecuencia, algunos marcadores de su genoma presentan una herencia de tipo disómica (Lashermes et al., 1998; Lashermes et al., 2000; Pinto-Maglio, 2006).

De las dos especies comerciales más importantes de café, *C. arabica* es considerada la de mayor calidad en el grano y en la bebida, sin embargo, a diferencia de *C. canephora* su cultivo es más demandante por su amplia susceptibilidad a las enfermedades y al cambio climático (Spinoso-Castillo et al., 2020). No obstante, sigue representando alrededor del 70% de la producción de café en el mundo (Acosta-Alba et al., 2020), siendo Colombia el primero en producción y exportación de esta especie, conocido como café suave de Colombia y el tercer país en producción de café por volumen en el mundo, después de Brasil y Vietnam (Ballesteros & Escudero, 2019).

Sin embargo, con el paso de los años, el consumo de café ha ido en aumento en el mundo y de esa misma forma cada vez son más los países que exportan café, aumentando la competencia tanto en el mercado internacional como en el mercado nacional (Salazar, 2021). Adicionalmente, aunque en la actualidad *C. arabica* sigue siendo la especie de café que más se

cultiva y se exporta, la tendencia mundial en los últimos años ha ido por el aumento en la producción y exportación de la especie *C. canephora* (robusta) debido a que presentan mayor facilidad para su cosecha y mayor resistencia a las plagas que generalmente afectan a *C. arabica* (Campuzano-Duque, 2021). Aunque, mundialmente las exportaciones de *C. arabica* siguen manteniendo una calidad y precio superior a las de otras especies de *Coffea* (ICO, 2023), la producción de café en Colombia se basa exclusivamente en las variedades de la especie *C. arabica*. Entre las más comunes se encuentran: Castillo, Tabí, Supremo, Colombia, Bourbon y Maragogipe (Maldonado et al., 2020). Sin embargo, el área de producción de café y de paso la exportación ha ido en descenso en el territorio nacional, siendo el Valle del Cauca uno de los principales departamentos donde el área utilizada para la cosecha de café ha disminuido drásticamente debido a factores ambientales relacionados con el cambio climático, impidiendo de esta forma que se den las condiciones adecuadas para su producción (Campuzano-Duque, 2021).

En este estudio, se llevó a cabo una caracterización molecular de las variedades de café *C. arabica* cultivadas en el departamento del Valle del Cauca, Colombia con el objetivo de estimar la variación presente en este recurso genético, lo que puede ser crucial para su conservación, manejo y utilización sostenible en programas de mejoramiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCALIDADES Y VARIEDADES MUESTREADAS

Las muestras se tomaron de cuatro fincas ubicadas en el municipio de Trujillo del departamento del Valle del Cauca y por cada finca se colectaron al azar entre 10-20 individuos de cada variedad de café cultivada. Estas muestras representan 5 variedades de *C. arabica*: Castillo, Supremo, Bourbon amarillo, Tabi y Maragogipe. En total, fueron muestreadas 140 plantas de café siendo Castillo la variedad más abundante con 60 individuos seguida de Supremo con 50 (Tab. 1). Se colectó por cada individuo tejido foliar joven guardado en sílica a gel para secarlo y evitar su degradación (Chase & Hill, 1991).

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se hizo a partir del tejido foliar utilizando el método de Doyle & Doyle (1987) modificado por Healy et al. (2014) para especies recalcitrantes. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% usando el buffer TBE al 0.5X y teñido con bromuro de etidio para evaluar la calidad del

ADN. Se expuso el gel a luz ultravioleta para ver las bandas formadas y finalmente, se usó el espectrofotómetro Nanodrop 2000 para valorar la pureza del ADN extraído.

AMPLIFICACIÓN DE SISTEMAS MICROSATÉLITES

A pesar de que el café es una especie aloploiploide, se ha demostrado que algunos microsátélites solo se ubican en uno de los dos genomas parentales y por lo tanto se comportan como un sistema diploide, permitiendo identificar los individuos heterocigotos a pesar de la naturaleza poliploide de *C. arabica* (Rovelli et al. 2000). Con base en esto, los marcadores fueron elegidos teniendo en cuenta que solo se ubicarán en solo uno de los dos genomas parentales que posee *C. arabica* (genoma caphora o eugenoides). Esta elección se hizo con base en dos estrategias, la primera, revisando marcadores SSR en la literatura donde se confirmará que estos se comportarán como un sistema diploide, como es el caso del sistema 4-1CTG (Rovelli et al. 2000); y segundo, a través de un análisis de primer-BLAST de cada pareja de cebadores donde se confirmaba que el cebador solo se alineaba con uno de los dos genomas parentales que componen el genoma de *C. arabica*. Luego de esta búsqueda, se utilizaron en este trabajo ocho microsátélites (Tab. 2).

Las condiciones de PCR y los programas del termociclador usados corresponden a los sugeridos por la literatura correspondiente de ca-

da marcador (Tab. 2). Los amplificadores fueron corridos en geles de poliacrilamida a 8% junto un marcador de peso de 25 pb para poder identificar el tamaño de los alelos. Finalmente, los geles fueron teñidos con nitrato de plata para observar las bandas de los amplificadores.

ANÁLISIS DE DATOS MOLECULARES

Inicialmente, para estimar la diversidad y la variación genética se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas por locus, la cantidad de alelos promedio por locus y por variedad y el número efectivo de alelos. Además, se estimaron, las heterocigosidades observada y esperada según Crow y Kimura (Fraser 1972). Y se realizó un análisis de varianza molecular (AMO-VA) con los siguientes niveles de variación: entre variedades, entre individuos dentro de variedades y dentro de individuos. Finalmente, se calcularon los estadísticos F de Wright. Estas estimaciones se realizaron usando los programas GenAlex (Peakall & Smouse 2012) y Arlequín (Excoffier & Lischer 2010).

La similitud por par de variedades estudiadas se llevó a cabo utilizando la distancia genética de Nei (1978) y con base en estas distancias se elaboró un dendrograma con el método de ligamiento promedio, además se calculó la correlación fenética entre la matriz de distancia y la matriz cofenética. Estos análisis fueron realizados usando el paquete stats del programa R (R Core Team 2021).

Tab. 1. Datos geográficos de las localidades muestreadas y números de plantas por localidad y variedad de café.

Tab. 1. Geographical data of the sampled localities and number of plants per locality and coffee variety.

Localidad	Coordenadas geográficas	Altura (msnm)	Variedad de café	Número de plantas
La Espartana	4°11,915'N	1549	Castillo	10
	76°23,515' W			
Finca Buenos Aires	4°13,828' N	1412	Castillo	10
	76°18,663' W		Supremo	10
Las Margaritas	4°14.097'N 76°19.152' W	1683	Castillo	20
			Supremo	20
			Bourbon amarillo	10
			Tabi	10
La Luisa	4°14.699'N 76°17.703' W	1503	Castillo	20
			Supremo	20
			Maragogipe	10

Tab. 2. Listado de microsatélites de *Coffea arabica* usados en este estudio.**Tab. 2.** List of microsatellites of *Coffea arabica* used in this study.

Microsatélite	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Referencia
gE8-3CTG	F: CACTGGCATTAGAAAGCACC R: GGCAAAGTCAATGATGACTC	181	56	Hussein <i>et al.</i> 2017
gSSR Ca018	F: GTCTCGTTTCACGCTCTCTC R: ATTTTGGCACGGTATGTTC	113	54	Hussein <i>et al.</i> 2017
Sat235	F: TCGTTCTGTCATTAATCGTCAA R: GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG	226	55	Pruvot-Woehl <i>et al.</i> 2020
Sat24	F: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC	166	55	Pruvot-Woehl <i>et al.</i> 2020
CM35	F: TAAAGTGGATGCGTCTCCCA R: GGATAAGCAAGGAGCTGCAA	265	55	López-Gartner <i>et al.</i> 2009
gSSR Ca085	F: ATGTGAAAATGGGAAGGATG R: CACAGGAAAGTGACACGAAG	107	54	Hussein <i>et al.</i> 2017
CFCA500	F: AGCGTCCACGTGTTAAGTCT R: TGAAGACTTCAAGTGGCAGA	166	55	López-Gartner <i>et al.</i> 2009
4-1CTG	F: AAAAAGCTGGTCCATGTCAA R: GGGGCGTTCAGTTATAAACA	99	55	Rovelli <i>et al.</i> 2000

RESULTADOS

DIVERSIDAD GENÉTICA

La Tab. 3 muestra los estimadores genéticos calculados a partir de 8 *loci* microsatélites para las 5 variedades de *C. arabica* evaluadas. Se destaca la gran homocigosidad encontrada en las accesiones de café, solo se registró un individuo heterocigoto, correspondiente a una muestra de Tabi para el marcador Sat24. Sin embargo, a pesar de que la heterocigosidad observada fue casi cero (0.004), la heterocigosidad esperada promedio fue superior a 0.34 indicando que, si bien hay un déficit de individuos heterocigotos, las variedades sí mantienen una diversidad genética en diferentes tipos de homocigotos, lo cual es confirmado por los valores FIS calculados para cada variedad que muestran una endogamia intrapoblacional alta (FIS=1). El número de genotipos muestra que casi cada individuo evaluado representa un genotipo diferente, esto muestra que las variedades estudiadas aún mantienen una diversidad genética a pesar de haber sido sometidas a selección. De igual manera, no hubo ningún marcador monomórfico cuando se evaluaron todas las muestras. De modo general, la diversidad alélica es parecida entre variedades (de 1.8 a 2.7 alelos), a excepción de Castillo que fue la variedad con mayor número de alelos (4,5). En

cuanto al número de alelos efectivo, las variedades Maragogipe, Supremo y Tabí tienen un intervalo de 1.83-2.16, similar a valor de riqueza alélica lo que indica que en estas variedades todos los alelos poseen frecuencias alélicas similares. Mientras que para Castillo el número efectivo es de 2,65, indicando que hay una proporción significativa de alelos en baja frecuencia. Hubo al menos dos alelos privados por variedad, mostrando cierta diferenciación entre las variedades evaluadas, siendo Castillo la variedad con mayor número de alelos privados (14).

El análisis de varianza molécula (AMOVA), mostrado en la Tab. 4, revela que 98% de la varianza se aloja al comparar a los individuos dentro de cada variedad, solo un 2% de la variación es debido al comparar entre las variedades de café estudiadas. Además, no se atribuye ninguna variación al nivel dentro de individuos. La Fig. 1 muestra el dendrograma construido con el método ligamiento promedio usando las distancias de Nei (1978), se puede observar que las variedades más relacionadas genéticamente corresponden a Supremo y Castillo. Tabi y Borbón amarillo se encuentran medianamente relacionadas con este grupo, mientras que Maragogipe es la variedad más alejada de todas las evaluadas. La correlación cofenética dio 0,97 indicando poca distorsión entre la matriz de distancia y el dendrograma.

DISCUSIÓN

De los ocho microsatélites utilizados ninguno resultó ser monomórfico, esta información coincide con Alemayehu et al. en el 2010 quienes reportaron un polimorfismo del 92.6% en su estudio de la diversidad genética de 133 genotipos de *C. arabica* donde se incluyeron accesiones de Etiopía y variedades cultivadas utilizando 32 *loci* microsatélites (SSR). Benti et al. (2021) reportaron un polimorfismo del 98,25 a partir de 14 SSR. Por otro lado, en estudios de diversidad genética de *C. arabica* con otras metodologías, Jingade y colegas (2019) evaluaron la diversidad genotípica de accesiones de *C. arabica* de la India utilizando marcadores SRAP encontrando un polimorfismo del 64%, cifra cercana a la que reportaron Mansilla-Samaniego et al. en el 2021 (47.35%) a partir de una colección de *C. arabica* en el Perú, en el cual el porcentaje de polimorfismo fue menor comparado con el reportado para marcadores SSR (62%) en el mismo estudio.

En el estudio de Omingo et al. (2017), se encontró un promedio de 3,8 variantes genéticas a partir de 13 *loci* SSR. Este valor está cerca del rango reportado en nuestro propio estudio (que oscila entre 2 y 4,5 variantes genéticas), con la excepción de Castillo, que presentó un máximo de 7 variantes genéticas. De igual forma, Alemayehu et al. (2010) reportaron en promedio 3,5 alelos en accesiones domesticadas de *C. arabica* utilizando 50 marcadores SSR, mientras que en las accesiones silvestres el promedio fue de 6,5 alelos. En contraste, en el 2005, Maluf et al. hallaron un promedio de 2.8 alelos en accesiones domesticadas utilizando 23 marcadores SSR, similar a lo reportado por Moncada & McCouch en el 2004, 2.5 alelos para accesiones domesticadas de *C. arabica* a partir de 34 microsatélites. Una razón por la cual pueden presentarse estas diferencias podría ser por la naturaleza de las muestras utilizadas, ya que en algunos estudios solo se utilizan variedades domesticadas como es el caso de este trabajo, mientras que en otros utilizan tanto variedades domesticadas como silvestres originarias de Etiopía. Otra razón se debe a la variación en el número de microsatélites utilizados y el tamaño de la muestra, factores limitantes para el estudio de la diversidad genética.

Por otro lado, en este trabajo se encontró una alta homocigosidad (139 de 140 individuos son homocigotos) en las distintas variedades de café, el bajo número de individuos heterocigotos hallados puede ser explicado por el sistema de apareamiento mayoritariamente autógeno de la especie *C. arabica* (Clarindo & Carvalho, 2008). Falconer y Mackay (2001) mencionan que la autopolinización en plantas lleva a una reducción de la heterocigosidad observada a lo largo de las generaciones independientemente

de las frecuencias alélicas iniciales de la población. Incluso una alogamia restringida (polinización cruzada solo con los individuos más cercanos) también actúa de igual manera que la autopolinización reduciendo el número de heterocigotos y provocando un aumento rápido de la endogamia de la población (Turner et al. 1982). Jones (1924) reportó que hacen falta pocas generaciones (6-7) para que la autopolinización del maíz produzca un alto grado de homocigosidad en líneas mejoradas. Además, las variedades estudiadas provienen de distintos programas de mejoramiento vegetal ejecutados por Cenicafe, este efecto de selección artificial añadido al de la autopolinización aumenta la reducción de la heterocigosidad en las variedades, de ahí que solo se encontrara un individuo heterocigoto entre 140 muestras.

La falta de heterocigosidad también se ha observado en varios estudios (Scalabrin et al., 2020), tanto en variedades de centros de investigación y mejoramiento en América (como CATTIE & CENICAFE), como en accesiones de Yemen (Moncada & McCouch, 2004; Maluf et al., 2005; Negawo et al., 2010; Al-Murish et al., 2013). No obstante, esta alta homocigosidad parece estar fuertemente relacionada con las variedades de *C. arabica* derivadas a partir del cuello de botella generado en Yemen (Anthony et al., 2002); pues en otros estudios donde se incluyen variedades locales o accesiones de Etiopía, se ha encontrado que la heterocigosidad es mayor que en accesiones de otras partes del mundo ($He > 0.3$) (Benti et al., 2021; Moncada & McCouch, 2004).

Sin embargo, esta reducción de la heterocigosidad observada no implica una reducción de la diversidad genética de las variedades. La heterocigosidad esperada, el número de alelos y el número de genotipos obtenidos muestran que las variedades estudiadas albergan una diversidad genética media pese a ser variedades sometidas a mejoramiento vegetal. Machado et al. (2016) muestran resultados similares para líneas mejoradas de *Ricinus communis* usando *loci* microsatélites, reportando una gran homocigosidad producto de la autopolinización controlada y una alta variabilidad genética entre los cultivos. De igual manera, Bomblies y colaboradores (2010) trabajando con poblaciones silvestres de *Arabidopsis thaliana*, una especie mayoritariamente autógena (alogamia entre 2-15%), registraron una baja heterocigosidad observada (8%) con una gran variación genética entre individuos y entre poblaciones estudiadas. Finalmente, López-Candelo et al. (2022) trabajando con cultivares de *Capsicum chinense* y *loci* microsatélites también registraron el mismo comportamiento mencionado anteriormente, una baja heterocigosidad observada pero una diversidad genética media de homocigotos lo que lleva a una variación entre individuos alta y

Tab. 3. Estimadores genéticos para 5 variedades de *Coffea arabica* L usando 8 microsatélites. N: Tamaño de muestra, Na: número de alelos, Ne: Número de alelos efectivos, Ap: número de alelos privados, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, DE: Desviación Estándar.

Tab. 3. Genetic estimators for 5 varieties of *Coffea arabica* L using 8 microsatellites. N: sample size, Na: number of alleles, Ne: number of effective alleles, Ap: number of private alleles, Ho: observed heterozygosity, He: expected heterozygosity, DE: standard deviation.

Variedad	Marcador	N	Na	Ne	Ap	Ho	He	Número de genotipos
Su	CM35	17	4	2.806	1	0.00	0.644	17
	CFCA500	16	2	1.882		0.00	0.469	
	41CTG	18	4	3.176		0.00	0.685	
	Sat24	15	4	2.586	1	0.00	0.613	
	Sat235	13	1	1.000		0.00	0.000	
	Ca018	18	2	1.117	1	0.00	0.105	
	Ca085	18	2	1.976		0.00	0.494	
	gE083CGT	17	3	2.752		0.00	0.637	
	Promedio		2.75	2.16	0.38		0.46	
	DE		0.41	0.28	0.18		0.09	
Ca	CM35	16	3	2.462		0.00	0.594	19
	CFCA500	19	6	3.574	2	0.00	0.720	
	41CTG	19	5	2.597	2	0.00	0.615	
	Sat24	15	7	4.245	4	0.00	0.764	
	Sat235	13	3	1.610	1	0.00	0.379	
	Ca018	19	3	1.241	2	0.00	0.194	
	Ca085	18	5	2.531	2	0.00	0.605	
	gE083CGT	18	4	2.945	1	0.00	0.660	
	Promedio		4.50	2.65	1.75		0.57	
	DE		0.54	0.34	0.41		0.07	
Ma	CM35	1	1	1.000		0.00	0.000	3
	CFCA500	3	3	3.000	1	0.00	0.667	
	41CTG	3	2	1.800		0.00	0.444	
	Sat24	2	2	2.000		0.00	0.500	
	Sat235	1	1	1.000	1	0.00	0.000	
	Ca018	3	1	1.000		0.00	0.000	
	Ca085	3	2	1.800		0.00	0.444	
	gE083CGT	3	3	3.000		0.00	0.667	
	Promedio		1.88	1.83	0.25		0.34	
	DE		0.30	0.29	0.16		0.10	
Ba	CM35	7	3	2.333		0.00	0.571	7
	CFCA500	4	2	2.000	1	0.00	0.500	
	41CTG	7	3	2.579		0.00	0.612	
	Sat24	3	2	1.800	1	0.00	0.444	
	Sat235	4	2	1.600		0.00	0.375	
	Ca018	6	1	1.000		0.00	0.000	
	Ca085	4	1	1.000		0.00	0.000	
	gE083CGT	5	3	2.778	1	0.00	0.640	
	Promedio		2	1.886	0.38		0.39	
	DE		0	0.237	0.18		0.09	

.continuación ...

Variedad	Marcador	N	Na	Ne	Ap	Ho	He	Número de genotipos
Ta	CM35	6	2	1.800		0.00	0.444	9
	CFCA500	5	3	2.273	1	0.00	0.560	
	41CTG	8	3	2.133		0.00	0.531	
	Sat24	7	3	2.279	1	0.14	0.561	
	Sat235	7	3	1.815	1	0.00	0.449	
	Ca018	6	1	1.000		0.00	0.000	
	Ca085	8	3	2.462		0.00	0.594	
	gE083CGT	8	2	1.600		0.00	0.375	
Promedio			2.50	1.92	0.38		0.44	
DE			0.27	0.17	0.18		0.07	

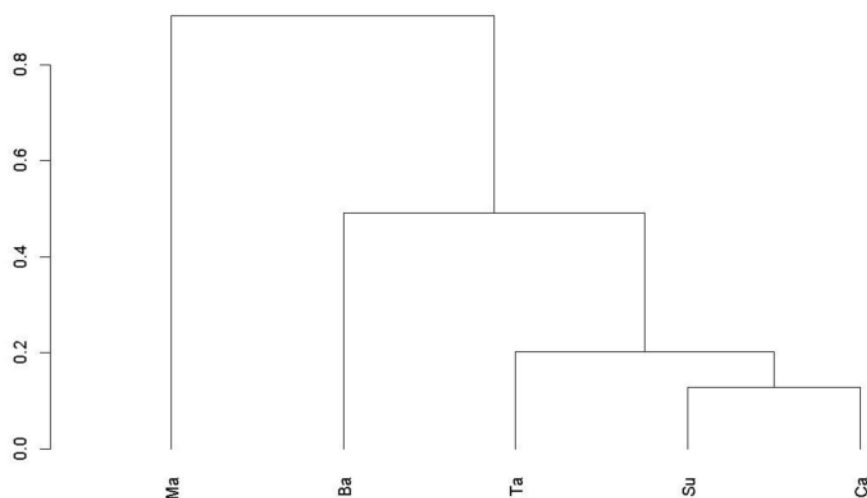


Fig. 1. Dendrograma de las distancias genéticas de Nei para 5 variedades de café colombiano usando 8 marcadores SSR.

Fig. 1. Dendrogram of Nei's genetic distances for 5 Colombian coffee varieties using 8 SSR markers.

una diferenciación entre líneas vegetales, similar a lo ocurrido en este estudio donde el AMOVA refleja que casi toda la variación se encuentra presente al comparar los individuos dentro de las variedades. En este sentido, una población con una alta homocigosis producto de la autogamia no necesariamente refleja una baja diversidad genética y por lo tanto deben analizarse otros estimadores como el número

de alelos, el número de genotipos y la heterocigosidad esperada para determinar el nivel de variación genética presente en una población.

Por otro lado, la diversidad y relación genética resultantes de este estudio encuentran su explicación en los procesos históricos y de mejoramiento asociados a cada variedad. Se seleccionaron cinco variedades para este estudio, dos de las cuales se reconocen como variedades ba-

Tab. 4 Análisis de varianza molecular de las variedades de café estudiadas. *p-valor<0.05.**Tab. 4.** Analysis of molecular variance of the coffee varieties studied. *p-value<0.05

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componente de variación	Porcentaje de variación (%)
Entre variedades	23,192	0,040	2*
Entre individuos dentro de variedades	249,426	2,490	98*
Dentro de individuos	0,500	0,009	0*
Total	273,118	2,539	100

se o derivadas directas de las mismas. La variedad Bourbon, una de las dos variedades base, se distribuyó originalmente desde Yemen (Flores et al., 2017). En contraste, la variedad Maragogipe surge de una mutación en cultivos de la variedad base Typica (Flores et al., 2017). Ambas, Bourbon y Typica, exhiben una marcada uniformidad genética, atribuible a diversos factores, entre los cuales destaca la cantidad limitada de individuos empleados en el cultivo pionero del café en Sudamérica y la tendencia de la especie a la autogamia (Romero et al., 2010). Por lo tanto, es plausible esperar que tanto Bourbon como Maragogipe, siendo este último un derivado de Typica con pocas diferencias respecto a su progenitor, presenten dos de las heterocigosidades más bajas en este estudio.

En contraste, las restantes variedades son el resultado de procesos de mejoramiento que involucran la diversidad genética como base de su desarrollo, denominándose comúnmente como variedades "compuestas" o "multilíneas" (Castillo & Moreno, 1988; Bustamente et al., 2001; Alvarado et al., 2005; Flores et al., 2017; Maldonado et al., 2020). Esta estrategia surge como respuesta a la amenaza de la roya, una enfermedad que afecta el cultivo de café y puede reducir su productividad (Castillo & Moreno, 1988). Dicha enfermedad era frecuente en cultivos densos y monogénicos. Con el objetivo de lograr una resistencia sostenible en el tiempo y basada en un sistema poligénico, se desarrollaron variedades mediante la combinación de varios linajes que presentaban diferentes combinaciones de genes de resistencia (Castillo

& Moreno, 1988; Flores et al., 2017; Reynolds & Braun, 2022).

No obstante, esta estrategia no habría tenido éxito sin la introducción de nuevos genes para ampliar el acervo genético de las variedades desarrolladas. El Híbrido de Timor (HdT) fue el individuo utilizado para introducir nuevos genes de resistencia de *C. canephora* a *C. arabica* (Flores et al. 2017). De hecho, las variedades Castillo y Supremo resultan del cruce entre Caturra y HdT, y la variedad Tabi tiene como parentales a Typica, Bourbon y HdT (Flores et al., 2017; Alvarado et al., 2005). En resumen, estas variedades son el fruto de una estrategia de mejoramiento novedosa basada en la hibridación de diversas líneas con distintas combinaciones genotípicas. Además, albergan parte del genoma de una especie diferente. Por lo tanto, es esperable que la diversidad genética de estos cultivares sea una de las más elevadas en este estudio.

Por último, las relaciones expuestas por el dendograma concuerdan con lo estipulado en la historia de la obtención de las variedades. En principio, las variedades Supremo y Castillo vienen de los mismos parentales y forman un grupo en el dendograma (Alvarado et al., 2005; Flores et al., 2017); en segundo lugar, Tabi también forma un grupo con las dos anteriores variedades debido a que comparten al HdT como parental (Flores et al., 2017). Y, en tercer lugar, Bourbon está más cerca de este clado debido a que es uno de los parentales de Tabi (Flores et al. 2017). Dejando a Maragogipe como el grupo más externo, pues no expresa una relación genética tan estrecha como si lo hacen las demás.

CONCLUSIONES

A pesar de que las variedades de *C. arabica* evaluadas fueron originadas por selección artificial, aún presenta suficiente diversidad genética que pueda ser usadas en futuros programas de fitomejoramiento. De igual manera, la diversidad genética presente en estas variedades se encuentra representada en diferentes combinaciones de homocigotos en vez de en genotipos heterocigotos debido a su sistema de polinización principalmente autógamo.

AGRADECIMENTOS

Esta investigación fue financiada por el sistema general de regalías a través del proyecto "Fortalecimiento de la competitividad de los cafés especiales del centro del Valle del Cauca" (BPIN: 201900010006).

Agradecemos profundamente a Leidy Laura Arias y Daniel Jiménez por su ayuda durante las fases de campo y muestreo. A León Denis por su ayuda con el transporte a los diferentes sitios de muestreo. A Héctor Fabio Flórez, Marta Lucia Giraldo, Miguel Antonio Villegas y Juan Carlos Ramírez por permitirnos el acceso a sus cafetales y facilitarnos la estadía en sus fincas.

REFERENCIAS

- Acosta-Alba, I., J. Boissy, E. Chia & N. Andrieu.** 2020. Integrating diversity of smallholder coffee cropping systems in environmental analysis. *The Intl J. of Life Cycle Assessment.* 25: 252-266.
- Alemayehu, T., D. Crouzillat, V. Petiard & P. Brouhan.** 2010. Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. *EJAST.* 1: 63-79.
- Al-Murish, T., Elshafei, A., Al-Doss, A., Doss, A. & Barakat, M.** 2013. Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) in Yemen via SRAP, TRAP and SSR markers. *Food Agric Environ.* 1111(2): 411-416.
- Alvarado, G., H. E. Posada, & H. A. Cortina.** 2005. Castillo: Nueva variedad de café con resistencia a la roya. *Avances Técnicos Cenicafé,* 337, 1-8.
- Anthony, F., Combes, M., Astorga, C., Graziosi, G., & Lashermes, P.** 2002. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor Appl Genet.* 104: 894-900.
- Ballesteros-Angulo, M. M. & D. Escudero-Valderrama.** 2019. Eje Cafetero: de centro productor de café a principal punto turístico de grano en el país. Bachelor Dissertation. Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
- Benti, T., E. Gebre, K. Tesfaye, G. Berecha, P. Lashermes, M. Kyallo & K. Nasser Yao.** 2021. Genetic diversity among commercial arabica coffee (*Coffea arabica* L.) varieties in Ethiopia using simple sequence repeat markers. *J. of Crop Improvement.* 35(2): 147-168, DOI: <https://doi.org/10.1080/15427528.2020.1803169>
- Bustamante, J., A. Sarmiento, A. Casanova, E. Contreras, C. Yáñez, C. Romero, I. Peña, A. Verenzuela, N. Morales, J. Garnica & N. de Colmenares.** 2001. Caracterización de resistencia incompleta a *Hemileia vastatrix* en genotipos de café (*Coffea arabica* L.) variedad Bramón I. *Bioagro.* 13(2): 65-70.
- Cano-Duque, L.F., J. C. Herrera, C. Ged, M. Wohlgenuth.** 2021. Bases for the Establishment of Robusta Coffee (*Coffea canephora*) as a New Crop for Colombia. *Agronomy.* 11: 2550. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11122550>
- Castillo, J. & L. G. Moreno.** 1988. La Variedad Colombia: Selección de un cultivar compuesto resistente a la roya del cafeto. *Cenicafé.*
- Carvalho, A. & C. A. Krug.** 1949. Agentes de polinização da flor do cafeeiro (*Coffea arabica* L. *Bragantia.* 9: 11-24.
- Chase, M. W. & H. H. Hills.** 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon.* 40(2): 215-220.
- Clarindo, W. R. & C. R. Carvalho.** 2008. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Systematics and Evol.* 274: 237-241.
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19: 11-15.
- Excoffier, L. & H. E. L. Lischer.** 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* 10: 564-567.
- Flóres, C. P., J. C. Arias & H. Duque.** 2017. Guía para la caracterización de las variedades de café: Claves para su identificación. *Avances Técnicos Cenicafé.* 476: 1-12.

- Fraser, A. S.** 1972. An introduction to population genetic theory. By J. F. Crow and M. Kimura. Harper and Row, New York. 656 pp. 1970. Teratology. 5: 386-387. DOI: <https://doi.org/10.1002/tera.1420050318>
- Healey, A., A. Furtado, T. Cooper & R. J. Henry.** 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant methods*. 10(1): 1-8.
- Hussein, M. A. A., A. A. A. Al-Azab, S. S. Habib, F. M. El Sherif & H. A. El-Garhy.** 2017. Genetic diversity, structure and DNA fingerprint for developing molecular IDs of Yemeni coffee (*Coffea arabica* L.) Germplasm assessed by SSR Markers. *Egypt J. Plant Breed.* 203: 1-25.
- ICO.** 2018. Aspectos Botánicos. International Coffee Organization.
- ICO.** 2023. Informe de mercado de café: enero 2023. http://www.ico.org/es/botanical_c.asp?%20section=Acerca_del_caf%E9. Acceso 21 julio 2023.
- Jingade, P., A. K. Huded, B. Kosaraju & M. K. Mishra.** 2019. Diversity genotyping of Indian coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm accessions by using SRAP markers. *J. of Crop Improvement*. 33(3): 327-345. DOI: <https://doi.org/10.1080/15427528.2019.1592050>
- Lashermes, P., J. Cros, P. Marmey & A. Charrier.** 1993. Use of random amplified DNA markers to analyses genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genet. Resour. Crop Evol.* 40: 91-99.
- Lashermes, P., Combes, M.-C., Robert, J., Trouslot, P., D'Hont, A., Anthony, F. & Charrier, A.** 1999. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics*. 261(2): 259-266. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004380050965>
- Lashermes, P., Paczek, V., Trouslot, P., Combes, M., Couturon, E. & Charrier, A.** 2000. Brief communication. Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific Hybrid *C. arabica* X *C. canephora*. *Journal of Heredity*. 91(1): 81-85. doi:10.1093/jhered/91.1.81
- López-Candelo, J. E., Viáfara-Vega, R. A., & Cárdenas-Henao, H.** 2022. SSR-HRM molecular characterization of the Colombian cultivated germplasm of *Capsicum chinense* Jacq.(Solanaceae). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 16(2).
- López-Gartner, G., H. Cortina, S. R. McCouch & M. D. P. Moncada.** 2009. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. *Tree genetics & genomes*. 5(3): 435-446.
- Maldonado Londoño, C., L. Giraldo & C. Flórez-Ramos.** 2020. Resistencia genética a la Enfermedad de la Cereza del Café en variedades cultivadas en Colombia. *Rev. Cenicafe*. 71: 68-90.
- Maluf, M. P., M. Silvestrini, L. M. de C. Ruggero, O. Guerreiro Filho & C. A. Colombo.** 2005. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. *Scientia Agricola*. 62(4): 366-373. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162005000400010>
- Mansilla-Samaniego, R., R. Espejo-Joya, G. Bernacchia, J. Wither-Villavicencio, C. Quispe-Apaza & C. López-Bonilla.** 2021. Genetic diversity and population structure of a Peruvian *Coffea arabica* L. collection. *Chilean J. of agricultural R.* 81(2): 138-150. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392021000200138>
- Moncada, P. & S. McCouch.** 2004. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome*. 47(3): 501-509. DOI: <https://doi.org/10.1139/g03-129>
- Nei, M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Negawo, A. T., Cruzillat, D., Pétiard, V. & Brouhan, P.** 2010. Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. *EJAST*. 1(1): 63-79.
- Omingo, D. O., C. O. Omondi, J. Cheserek, S. Runo & D. Okun.** 2017. Diversity analysis of selected coffee genotypes using microsatellites and random amplified polymorphic DNA in Kenya. *Intl. J. Biot. Food. Sci.* 5: 1-9.

- Peakall, R. & P. E. Smouse.** 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*. 28: 2537e2539.
- Pinto-Maglio C. A. F.** 2006. Cytogenetics of coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18: 37-44. doi: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100004>
- Preedy, V. R.** 2015. *Coffee in Health and Disease Prevention*. Cambridge, Academic Press.
- Pruvot-Woehl, S., S. Krishnan, W. Solano, T. Schilling, L. Toniutti, B. Bertrand & C. Montagnon.** 2020. Authentication of *Coffea arabica* varieties through DNA Fingerprinting and its Significance for the Coffee Sector. *J. of AOAC Intl.* 103(2): 325-334.
- R Core Team.** 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Reynolds, M. & J. H. Braun.** 2022. A Breeding Methods: Line Development. pp. 69-82. In: Rutkoski, C., M. Krause & M. Sorrells (Eds.), *Wheat Improvement Food Security in a Changing Climate*. Springer International Publishing.
- Romero, J. V., G. C. Camayo, L. F. González, H. A. Cortina & J. C. Herrera.** 2010. Caracterización citogenética y morfológica de híbridos interespecíficos entre *C. arabica* y las especies diploides *C. liberica* y *C. eugenioides*. *Cenicafé*. 61(3): 206-221.
- Rovelli, P., R. Mettullo, F. Anthony, F. Anzueto, P. Lashermes & G. Graziosi.** 2000. Microsatellites in *Coffea arabica* L. pp. 123-133. In: *Coffee biotechnology and quality: Proceedings of the 3rd international seminar on biotechnology in the Coffee Agro-Industry*, Londrina, Brazil. Springer Netherlands.
- Salazar, F. A.** 2021. *Café de Colombia, análisis de los principales productores de café del mundo*. Bachelor dissertation. Universidad Pontificia Bolivariana, Palmira, Colombia.
- Spinoso-Castillo, J. L., E. Escamilla-Prado, V. H. Aguilar-Rincón, V. Morales Ramos, G. G. de los Santos, P. Pérez-Rodríguez & T. Corona-Torres.** 2020. Genetic diversity of coffee (*Coffea spp.*) in Mexico evaluated by using DArTseq and SNP markers. *Genet. Resour. and Crop Evol.* 67: 1795-1806.
- Wikström, N., B. Bremer & C. Rydin.** 2020. Conflicting phylogenetic signals in genomic data of the coffee family (Rubiaceae). *J. System. Evol.* 58: 440-460. DOI: <https://doi.org/10.1111/jse.12566>

Editor Asociado / Associated Editor: Walter Alvarenga Rodrigues, UFG, Brazil
Recebido / Recibido / Received: 21.12.2023
Revisado / Revised: 17.04.2024
Aceito / Aceptado / Accepted: 09.05.2024
Publicado / Published: 06.04.2023
DOI: <https://doi.org/10.5216/rbn.v21i1.78154>
Dados disponíveis / Datos disponibles / Available data: Not informed