

# EVALUACIÓN DE MARCADORES SSR LIGADOS A RESISTENCIA A *Colletotrichum kahawae* EN *Coffea arabica*

Félix Alberto Guzmán\*; María del Pilar Moncada-Botero\*.

---

## RESUMEN

**GUZMÁN, F.; MONCADA B, M del P.** Evaluación de marcadores SSR ligados a resistencia a *Colletotrichum kahawae* en *Coffea arabica*. *Revista Cenicafé* 63 (2): 7-22. 2012

El hongo *Colletotrichum kahawae* Bridge & Waller es el agente causal de la enfermedad de las cerezas del café (CBD, sus siglas en inglés: *Coffee Berry Disease*), y afecta desde flores hasta frutos maduros de *Coffea arabica* L. Sin embargo, las máximas pérdidas ocurren después de la infección de frutos verdes, debido a su momificación y caída. En los países caficultores africanos, esta enfermedad puede causar la pérdida hasta del 50% de la producción. El objetivo de este trabajo fue validar la asociación entre la resistencia a CBD y 15 microsatélites reportados previamente, para identificar marcadores útiles para la selección asistida en países como Colombia, donde el patógeno no ha sido reportado. Los microsatélites se evaluaron preliminarmente utilizando un genotipo susceptible (cv. Caturra) y un grupo diverso de 21 genotipos resistentes, posiblemente portadores de los genes *T*, *R* y *K*. Posteriormente, se usaron 64 genotipos para validar la asociación entre los microsatélites candidatos y la resistencia a CBD; algunos de estos genotipos tienen resistencia conocida a CBD, mientras que los otros están siendo evaluados en el Centro de Investigaciones de las Royas del Cafeto (CIFC, sus siglas en portugués) en Portugal. Los resultados mostraron que tres de los 15 microsatélites (FR34-6ctg, CMA276 y Sat227) estarían asociados a resistencia a CBD en genotipos portadores de los genes *T* y *R*; adicionalmente, los microsatélites CMA276 y Sat227 detectaron bandas que estarían asociadas a un alelo de resistencia presente en genotipos silvestres de *C. arabica*. Estos tres microsatélites serán útiles en la selección precoz de genotipos portadores de resistencia a CBD.

**Palabras clave:** Enfermedad de las cerezas del café, CBD, mejoramiento genético, Selección Asistida por Marcadores (SAM), Secuencias Simple Repetidas (RSS).

---

## ABSTRACT

The fungus *Colletotrichum kahawae* Bridge & Waller causes Coffee Berry Disease (CBD) on *Coffea arabica* L., and attacks from flowers up to ripen fruits. However, severe yield losses occur after green berries are affected, due to its premature dropping and mummification. In African coffee producer's countries, this disease may cause up to 50% of yield losses. The main goal of this study was to validate the association between CBD resistance and 15 microsatellites previously reported, in order to identify suitable markers for marker assisted selection in countries like Colombia, where the pathogen has not been reported so far. These microsatellites were preliminary tested using one susceptible genotype (cv. Caturra) and a diverse group of 21 resistant genotypes, potentially carrying genes *T*, *R*, and *K*. Subsequently, a total of 64 genotypes were used in order to validate the association between some candidate markers and CBD resistance. Some of these 64 genotypes were already tested on hypocotyls, while some others are being tested at the Coffee Rust Research Center (CIFC, its Portuguese acronym) in Portugal. The results unveiled that three out of the 15 microsatellites (FR34-6ctg, CMA276, and Sat227) would be associated to resistance in genotypes carrying genes *T* and *R*; additionally, CMA276 and Sat227 showed bands that would be associated to a resistance allele found in *C. arabica* wild genotypes. These three microsatellites are going to be suitable in the early selection of genotypes resistant to CBD.

**Keywords:** Coffee berry disease, CBD, plant breeding, Marker Assisted Selection (MAS), Simple Sequence Repeats (SSR).

---

\* Investigador Asociado (hasta septiembre de 2012) e Investigador Científico III, respectivamente, Disciplina de Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

La producción de café tiene factores limitantes como la enfermedad de las cerezas del café (CBD, sus siglas en inglés: *Coffee Berry Disease*), causada por el hongo *Colletotrichum kahawae* Bridge & Waller (27). Esta enfermedad solo ha sido encontrada en África (21) y fue reportada por primera vez en 1922, al Oeste de Kenia, en cafetales de *Coffea arabica* L. sembrados en altitudes superiores a 1.700 m, y después de 70 años se había dispersado por todas las zonas cafeteras de África, ocasionando un gran daño económico debido a la pérdida de cosecha y los altos costos derivados de su control químico (3).

El hongo parasítico *C. kahawae* infecta desde flores hasta frutos maduros e incluso hojas, pero las máximas pérdidas ocurren después de la infección de frutos verdes y la formación de lesiones oscuras hundidas con esporulación (*acervuli*), que causan su caída prematura y momificación (27). Por lo tanto, el CBD tiene el mayor potencial de daño económico para la caficultura mundial.

Actualmente, la caficultura colombiana comprende 926.388 hectáreas y cerca del 26% están sembradas por encima de 1.700 m de altitud (10); porcentaje que tiende a incrementarse debido a la presencia de broca en bajas altitudes. Por lo tanto, CBD es una amenaza real para la caficultura colombiana debido a que el país no cuenta con variedades resistentes, y porque se han sembrado cafetales en sitios cuyas condiciones climáticas favorecerían la proliferación de su agente causal.

Estudios de estructura poblacional mostraron que la variabilidad genética de *C. kahawae* es baja, y sugieren que la especie es una unidad clonal (5, 7, 19, 20, 29). Por otro lado, aunque no se han identificado razas del patógeno, la técnica de grupos de

compatibilidad vegetativa ha sugerido la existencia de dos grupos en aislamientos de *C. kahawae* obtenidos en varios países cafeteros africanos. Según Bella-Manga *et al.* (4), un grupo corresponde a aislamientos de la región de África del Este, y el otro a aislamientos de Camerún; estos autores registraron variaciones en la patogenicidad del hongo. Así mismo, Bridge *et al.* (5), utilizando los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) reportaron cierto nivel de variabilidad que permitió diferenciar los aislamientos de Camerún de los de otros países.

Silva *et al.* (28) evaluaron 55 aislamientos de *C. kahawae* de nueve países africanos, usando datos de secuencia multi-locus, y confirmaron su baja variabilidad genética. Adicionalmente, identificaron tres grupos clonales divergentes: 1) Angola, 2) Camerún y 3) uno que incluía los aislamientos de los otros siete países. Estos autores resaltaron que las poblaciones de Angola y Camerún serían ancestrales, mientras que las del Este de África (por ejemplo, las kenianas) serían derivadas.

La herencia de la resistencia a CBD está controlada por genes localizados en tres loci (32). Estos genes están presentes en: 1) el Híbrido de Timor (gen *T*), el cual surgió de la hibridación espontánea entre las especies *C. arabica* y *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, 2) la variedad comercial K7 (gen *K*) y 3) Rume Sudán (genes *R* y *K*), que también es resistente a la roya del café (2). Van der Vossen y Walyaro (33) reforzaron el planteamiento que la resistencia a CBD es oligénica (uno a tres genes), luego de evaluar el CBD en germoplasma de Etiopía, centro de diversidad genética de *C. arabica* propusieron la existencia de una resistencia oligogénica en la cual actuarían entre uno y tres genes.

La resistencia genética es una alternativa de control de CBD, porque las variedades mejoradas reducen significativamente los costos del control químico, y son seguras para los humanos y el ambiente (12). Ejemplos de esto son las variedades Ruiru 11 y Batian, que se cultivan en Kenia debido a que son resistentes a CBD y roya (11, 23).

En Cenicafé, el proyecto de mejoramiento por resistencia a CBD tiene como base materiales cultivados y silvestres etíopes de *C. arabica*, y al Híbrido de Timor. La estrategia de Cenicafé consiste en identificar resistencia en las entradas de su banco de germoplasma mediante pruebas de preselección en hipocótilos. Estas pruebas se realizan en el Centro de Investigaciones de las Royas del Cafeto (CIFC, sus siglas en portugués: *Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro*) en Portugal, utilizando cuatro aislamientos del hongo: Uno de Camerún, otro de Kenia y dos de Zimbabue. Al identificar resistencia en el material mejorado, Cenicafé hace su evaluación agronómica en Colombia y al identificar resistencia en el germoplasma exótico realiza cruzamientos entre genotipos resistentes para recombinar los genes de resistencia; posteriormente realiza la respectiva evaluación agronómica en el país. Los dos inconvenientes principales en el desarrollo de esta estrategia son la baja repetibilidad (60%) de las pruebas de preselección en hipocótilos y la obligatoriedad de hacer estas pruebas fuera de Colombia, porque el patógeno solamente ha sido reportado en África.

Una alternativa mucho más confiable para seleccionar los genotipos que servirían como progenitores es la Selección Asistida por Marcadores (SAM). Además, en el caso de la preselección de genotipos resistentes a CBD, la SAM permitiría hacer selección en ausencia del patógeno.

La SAM se fundamenta en la búsqueda de marcadores moleculares asociados a características de interés (por ejemplo, resistencia a enfermedades) para que asistan en la escogencia de fenotipos sobresalientes (30). Los marcadores moleculares asociados a resistencia permiten evaluar poblaciones grandes en cualquier estado de su desarrollo; además, cuando la resistencia es conferida por varios genes, estos marcadores tienen la ventaja sobre las evaluaciones morfológicas, porque las plantas portadoras de resistencia múltiple pueden diferenciarse fácilmente de aquellas que portan solamente un gen (15).

Entre las herramientas moleculares, los microsatélites o Repeticiones de Secuencia Simple (SSR, sus siglas en inglés: *Simple Sequence Repeats*) han probado su utilidad en el etiquetamiento de genes de resistencia en cultivos como trigo (25, 34), arroz (16), garbanzo (14), algodón (9) y cebada (1), entre otros. Los SSR han sido usados en café para evaluar la diversidad de *C. arabica* y otras especies del género (6, 18, 22, 26, 30), e identificar marcadores asociados a resistencia a roya (13, 19) y CBD (12, 17, 24).

Por ejemplo, Gichuru *et al.* (12) utilizaron 57 SSR para evaluar dos poblaciones F<sub>2</sub> de los cruces entre un progenitor femenino susceptible a CBD (cv. SL28) y otro resistente (cv. Catimor 88 ó cv. Catimor 127). Estos autores indicaron que la banda más liviana de las dos amplificadas por el microsatélite Sat235, podría usarse como marcador de resistencia a CBD. Además, basándose en un análisis de ligamiento, este grupo encontró que los microsatélites Sat207 y Sat235 (en adelante denominados FR34-6ctg y CMA276, respectivamente) están asociados a la región cromosómica donde se encuentra un gen de resistencia a CBD.

El objetivo de este estudio fue validar la presencia de 15 microsatélites, previamente reportados (12, 17, 24), usando un grupo diverso de genotipos del banco de germoplasma de Cenicafé, con características de resistencia a CBD contrastantes, para identificar SSR útiles en la selección precoz de genotipos portadores de resistencia genética a esta enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

**Evaluación preliminar.** Se usó un grupo de 22 genotipos pertenecientes al banco de germoplasma de Cenicafé para hacer una evaluación preliminar de los SSR (Tabla 1). Se seleccionaron 19 de estos genotipos con base en los resultados de resistencia a CBD obtenidos en pruebas de preselección en hipocótilos realizadas en el CIFC, utilizando aislamientos de Camerún, Kenia y Zimbabue<sup>1</sup>. Se incluyeron dos individuos Ruiru 11, porque representan una variedad mejorada resistente a CBD en Kenia. El objetivo de la evaluación preliminar fue identificar bandas cuyo tamaño fuera distinto al del fragmento observado en el control susceptible (Caturra).

**Fase de validación.** Los SSR candidatos que mostraron bandas diferenciales con respecto al testigo Caturra se validaron utilizando 64 genotipos (Tabla 2). Esta muestra incluyó nueve genotipos de la evaluación preliminar: Ocho resistentes y el control susceptible. Los 55 genotipos adicionales incluyeron individuos del Híbrido de Timor, Sudán Rume I.963, Rume Sudán, Costa Rica 95, Iapar 59, F<sub>2</sub>: DG1399 x Sudán Rume I.971 y de F<sub>2</sub>: DG1399 x CCC1147 (Tabla 2).

**Extracción de ADN.** Se recolectaron hojas jóvenes y frescas de cada genotipo para hacer la extracción de ADN usando el *kit* comercial *DNeasy Plant Mini Extraction* (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tejido foliar fue macerado en nitrógeno líquido para hacer la extracción a partir de 100 mg de tejido pulverizado. La calidad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en geles al 1% de agarosa, usando tampón TBE 0.5X (Tris borato EDTA) y tinción con *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). El gel fue expuesto a luz ultravioleta y fotografiado. Cada ADN fue diluido a una concentración final aproximada de 20,0 ng.μL<sup>-1</sup> y almacenado a -20°C hasta su uso.

**Microsatélites.** Se evaluaron 15 pares de cebadores de microsatélites para validar su utilidad en la detección de bandas asociadas a resistencia a CBD (Tabla 3). Cinco de estos microsatélites fueron evaluados previamente en estudios planteados para identificar marcadores asociados a resistencia a CBD (12, 24). Los otros 10 SSR se utilizaron en un estudio de introgresión en *C. arabica* (17).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 20,0 μL, que contenía 20,0 ng de ADN, 0,5 μM de cada cebador, 0,125 mM de cada dNTP, 2,0 μL de tampón 10X (0,1 M Tris pH 8,3 - 0,5 M KCl, 0,1% gelatina), 2,0 μL de magnesio (15 mM) y una unidad de *Taq* polimerasa obtenida en el laboratorio de marcadores de Cenicafé. Todas las amplificaciones se realizaron en termocicladores programables PTC-100 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA) utilizando el siguiente perfil: 94°C durante 5 min; 35 ciclos con fase de desnaturalización de 60 s a 94°C, fase de

<sup>1</sup> Informes anuales, Disciplina de Mejoramiento Genético, Cenicafé, 2000-2012.

**Tabla 1.** Genotipos seleccionados con base en los resultados de las pruebas de hipocótilo realizadas en el CIFC, utilizando tres aislamientos del patógeno.

	Genotipo <sup>a</sup>	Número de árbol	Aislamiento <sup>b</sup>		
			Camerún	Kenia	Zimbabue
1	DG1399	1.276	R	R	R
2	Maragogipe amarillo	790	R	R	R
3	Maragogipe amarillo	783	R	R	R
4	CCC1147	920	R	R	R
5	Java65	909	R	R	R
6	Cat x Can AJ389	1.574	R	R	R
7	Cat x Can FK105	937	R	R	R
8	Sudán Rume I.971	1.427		R	R
9	Cat x Can FK7	889		R	R
10	CCC1146	910		R	R
11	F2: Caturra36 x CCC1146	482		R	R
12	HdT 1343 I.574 CV1	553		R	R
13	HdT 1343 I.574 CV2	560		R	R
14	Jackson2	341		R	
15	Local Bronce TV	55		R	
16	Local Bronce 8	296		R	
17	HdT 1343 I.565	1.101		R	
18	K-7	700			R
19	F2: Caturra36 x CCC1146	223			R
20	Ruiru 11	1.340	Variedad mejorada resistente		
21	Ruiru 11	1.341	Variedad mejorada resistente		
22	Caturra	36	Control susceptible		

<sup>a</sup> CCC: Colección Colombiana de Café; Cat: Caturra; Can: Canephora; HdT: Híbrido de Timor.

<sup>b</sup> R: resistente.

hibridación de cebadores de 60 s a 55°C y fase de síntesis de 60 s a 72°C; y finalmente, 5 min a 72°C. Se utilizaron ciclos en cascada para disminuir la amplificación de productos no específicos (8). Las reacciones de amplificación con ciclos en cascada empezaban en una temperatura de hibridación alta (60°C) que iba disminuyendo en 1°C por cada ciclo hasta llegar a la temperatura de hibridación (55°C) de los cebadores.

La electroforesis de los productos amplificados se realizó en geles desnaturizantes con poliacrilamida al 4% con 6 M de urea y tampón TBE 1,0X. A

cada producto de la amplificación se le adicionaron 5,0 µL de tampón [95% (v/v) formamida, 20 mM EDTA pH 8,0 – 0,05% (p/v) azul de bromofenol y xilen cianol FF] y se desnaturizó el ADN durante 3 min a 95°C; luego se cargaron 5,0 µL de esta mezcla en los pozos del gel. Las muestras se dejaron migrar (2000V, 75W, 90mA) aproximadamente durante 80 min. e inmediatamente después se tiñeron con nitrato de plata.

Se escogieron seis genotipos al azar como control, para evaluar la reproducibilidad de los patrones y comparar bandas entre

**Tabla 2.** Listado de los 64 genotipos utilizados para la validación de los tres SSR candidatos.

<b>Genotipo<sup>a</sup></b>	<b>Árbol</b>	<b>Individuos</b>	<b>Experimento<sup>b</sup></b>	<b>Observación</b>
HdT 1343 I.565	1.101	1	MEG05.26	
HdT 1343 I.574 CV2	5.60	1	Colección de variedades	
Sudán Rume I.971	1.427	1	MEG05.27	
DG1399	1.276	1	MEG05.27	
CCC1146	910	1	MEG05.27	Silvestre etíope
CCC1147	920	1	MEG05.27	Silvestre etíope
Ruiru11	1.340, 1.341	2	MEG05.26	Variedad mejorada resistente
Caturra	36	1		Control susceptible
	Total =	9		
	416, 417, 426,			
HdT 832/1	1.654, 1.656, 1.658, 1.661	7	MEG05.27	
HdT 832/2	1.657	1	MEG05.27	
HdT 2252-2	332	1	MEG05.27	
HdT 2252-57	333	1	MEG05.27	
HdT 1343 I.574 CV2	561-566	6	Colección de variedades	
Sudán Rume I.963	1.222-1.230	9	MEG05.26	
Rume Sudán	91, 93-96, 98, 100	7	MEG05.26	
Costa Rica 95	1.885, 1.890	2	MEG05.26	Villa Sarchí CIFC 19/1 x HdT 832/1
Iapar 59	1.871, 1.874	2	MEG05.26	Villa Sarchí CIFC 971/10 x HdT 832/2
F2: DG1399 x Sudán Rume I.971	54-63, 65-67	13	MEG03.17	
F2: DG1399 x CCC1147	190-195	6	MEG03.17	
	Total =	55		

<sup>a</sup> HdT: Híbrido de Timor, CCC: Colección Colombiana de Café.

<sup>b</sup> MEG: Mejoramiento genético

geles. Estos genotipos se amplificaron separadamente y se corrieron varias veces en geles diferentes. Para cada SSR se determinó el tamaño (medido en número de nucleótidos) de las bandas amplificadas más intensamente, con base en su migración relativa a la de los marcadores de peso molecular [patrones de peso molecular de ADN de 25 pb y 10 pb (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)].

**Análisis de datos.** Las bandas se registraron manualmente en estado presente (1) o ausente (0) y se generó una matriz de datos binarios para analizar la correspondencia entre la resistencia a un aislamiento de CBD y las bandas de los 15 SSR evaluados. Los mejores marcadores se seleccionaron con base en el número de veces en que la presencia de una banda coincidía con la resistencia a CBD, que había sido establecida en las pruebas de

**Tabla 3.** Listado de los 15 microsatélites evaluados en este trabajo.

	<b>Locus</b>	<b>GenBank acc.</b>	<b>Fuente bibliográfica</b>
1	M25	AJ250255	Omondi y Pinard (24)
2	M27	AJ250256	Omondi y Pinard (24)
3	M47	AJ250260	Omondi y Pinard (24)
4	FR34-6ctg	AJ308753	Gichuru <i>et al.</i> (12); Lashermes <i>et al.</i> (17)
5	CMA276		Gichuru <i>et al.</i> (12); Lashermes <i>et al.</i> (17)
6	M32	AJ250258	Lashermes <i>et al.</i> (17)
7	Sat11	AJ250252	Lashermes <i>et al.</i> (17)
8	Sat172	AJ308753	Lashermes <i>et al.</i> (17)
9	Sat227		Lashermes <i>et al.</i> (17)
10	Sat229		Lashermes <i>et al.</i> (17)
11	Sat240		Lashermes <i>et al.</i> (17)
12	Sat254		Lashermes <i>et al.</i> (17)
13	Sat255		Lashermes <i>et al.</i> (17)
14	Sat262	AY705498	Lashermes <i>et al.</i> (17)
15	Sat283	AJ308772	Lashermes <i>et al.</i> (17)

hipocótilo en el CIFC. Este análisis permitió discriminar los genotipos que teóricamente portaban el mismo gen de resistencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

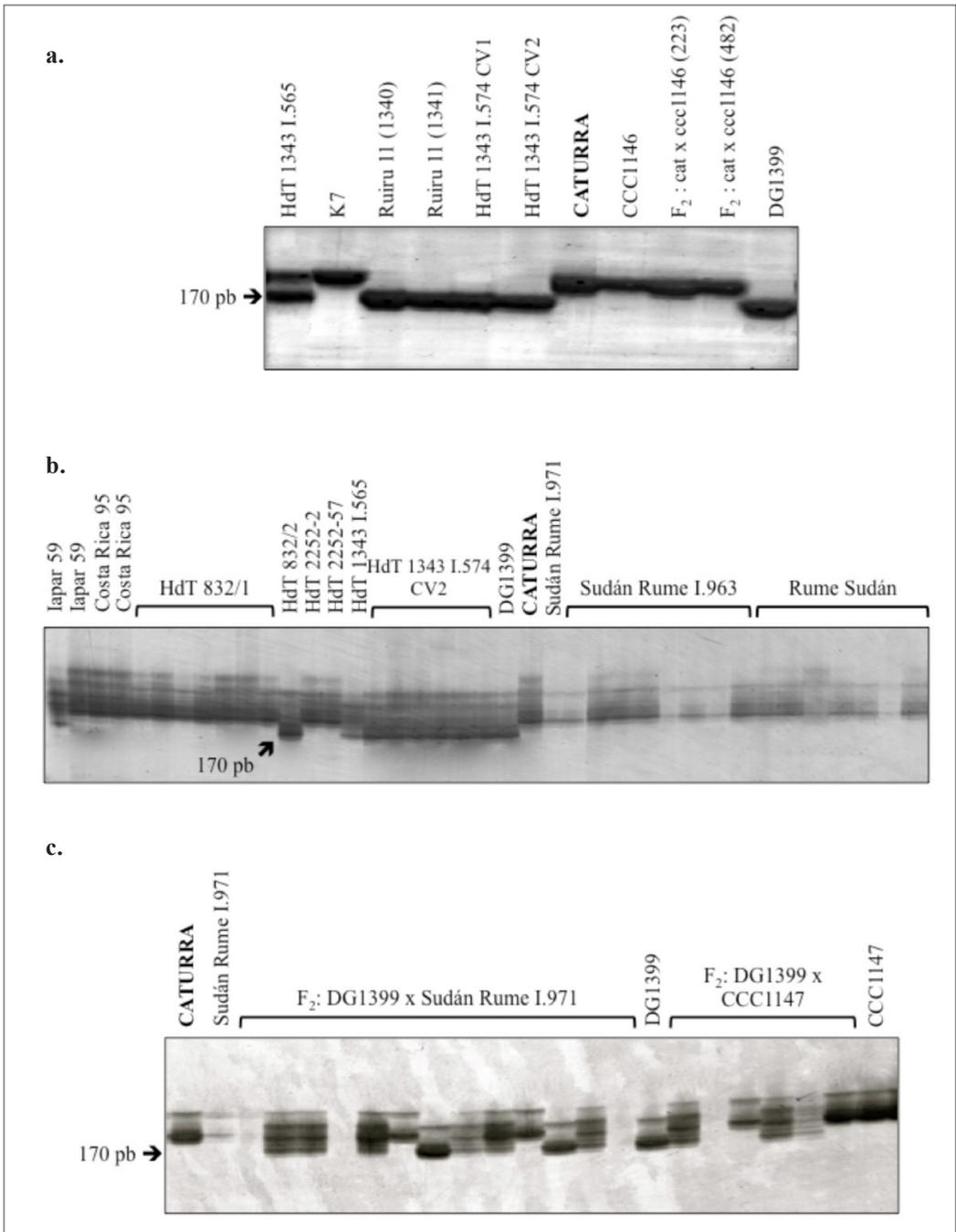
### Evaluación preliminar de los microsatélites.

De los 15 SSR en 12 no se detectaron bandas que discriminaran materiales resistentes y susceptibles, en los 22 genotipos incluidos en esta fase del estudio. Los microsatélites FR34-6ctg, CMA276 y Sat227 se consideraron candidatos para una potencial implementación de la selección asistida, ya que mostraron bandas cuyo tamaño era distinto al del fragmento observado en la variedad Caturra (Figuras 1, 2 y 3). Resalta el hecho que ningún SSR detectó fragmentos que pudieran asociarse a resistencia en el genotipo K7, portador del gen *K*; este individuo siempre mostró una banda del mismo tamaño que la amplificada en la variedad Caturra (Figuras 1, 2 y 3).

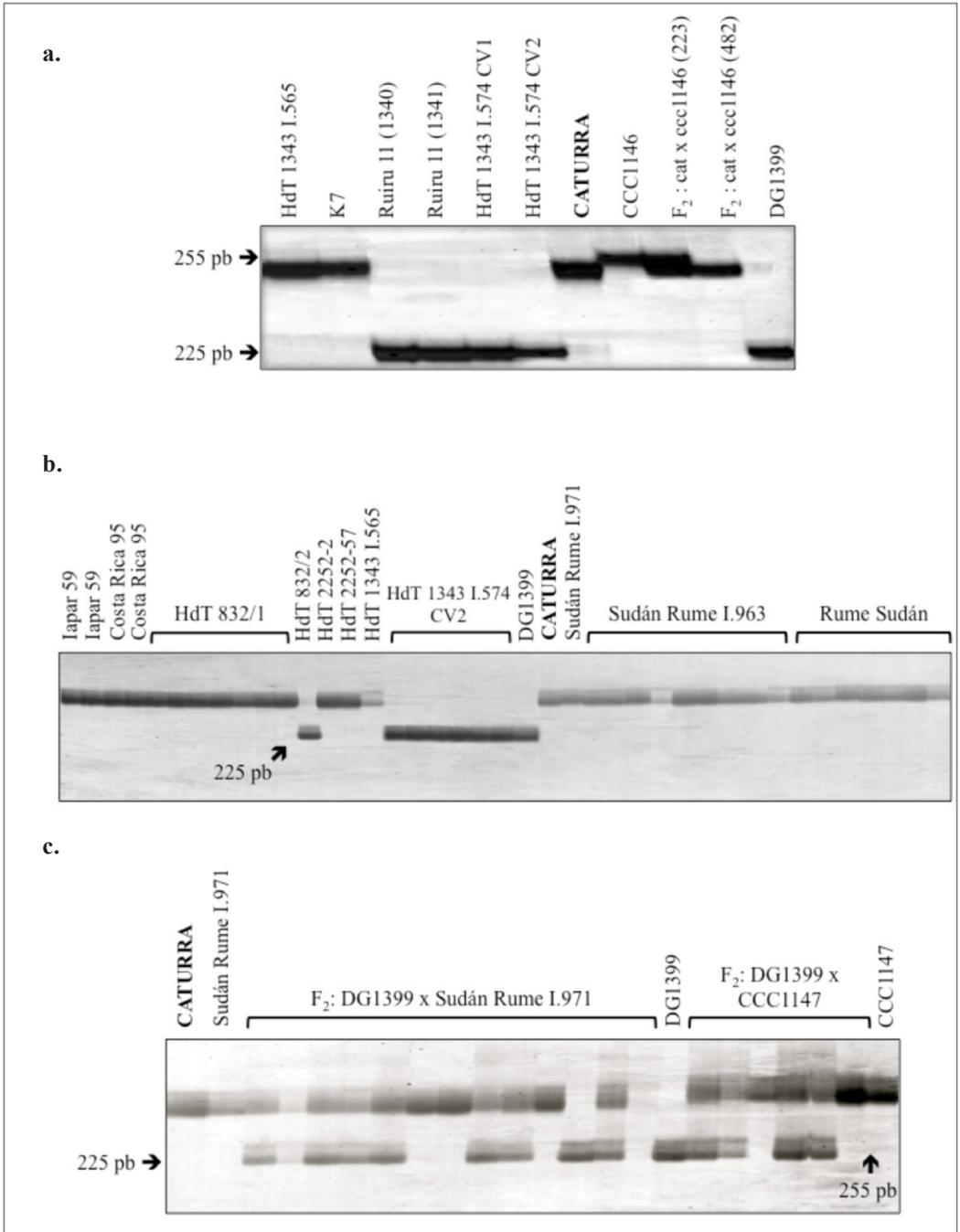
**Microsatélites candidatos para la selección asistida.** El microsatélite FR34-6ctg detectó

un fragmento de cerca de 170 pb que separó seis genotipos resistentes derivados del Híbrido de Timor (Figura 1a). En la fase de validación, este SSR detectó la banda asociada a resistencia (170 pb) en los individuos emparentados con el Híbrido de Timor y Sudán Rume, así: 1) un individuo Iapar 59; 2) el individuo HdT 832/2; 3) el individuo HdT 1343 I.565; 4) los siete individuos HdT 1343 I.574 CV2 (560 a 566) y 5) DG1399 (Figura 1b).

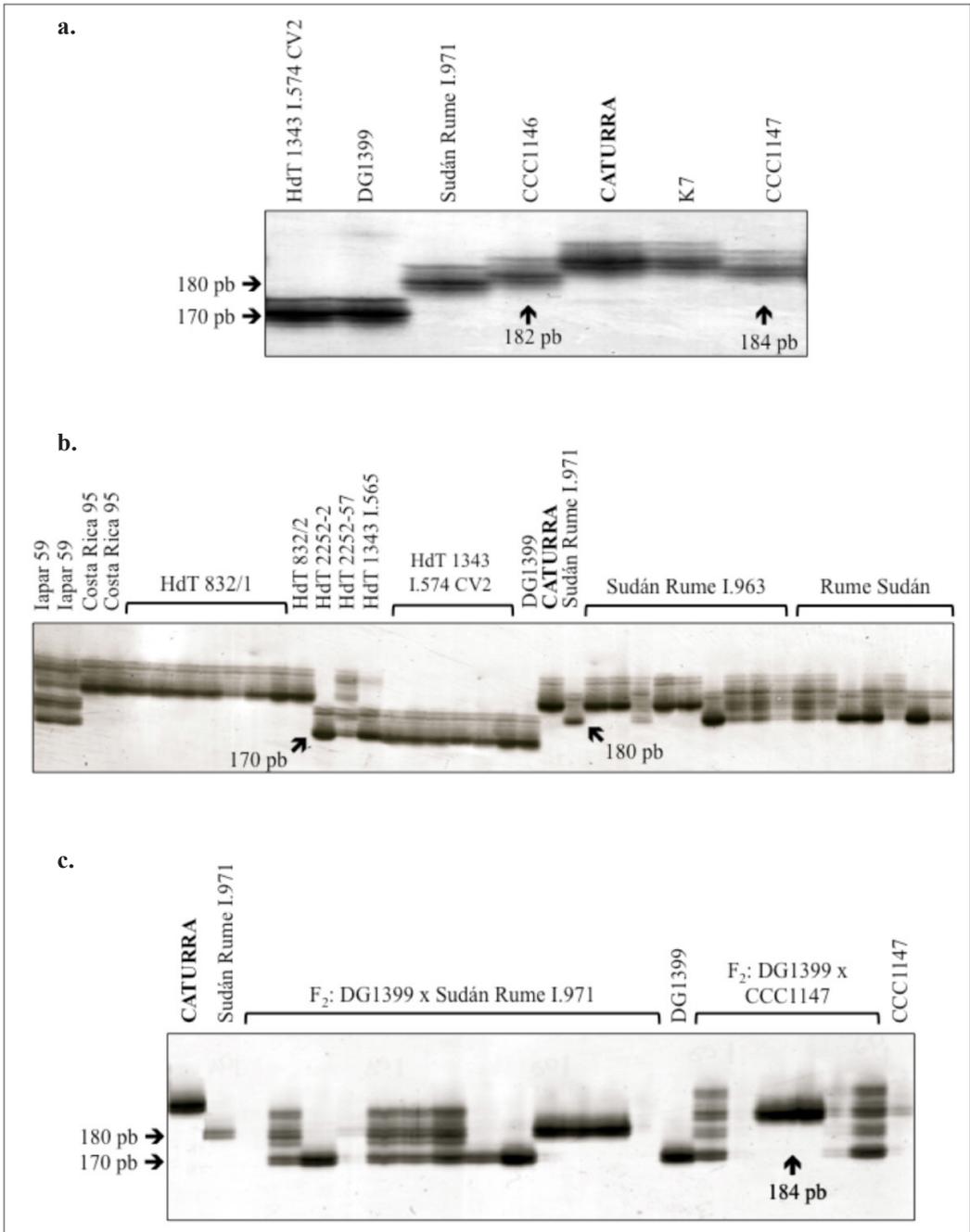
Por su parte, el microsatélite CMA276 en la evaluación preliminar, amplificó una banda de aproximadamente 225 pb que discriminó cinco genotipos resistentes relacionados con el Híbrido de Timor (Figura 2a); además, otro fragmento de cerca de 255 pb fue observado en los dos genotipos silvestres etíopes (por ejemplo, CCC1146 en la Figura 2a) y en uno de los individuos F<sub>2</sub> del cruce Caturra x CCC1146 (Figura 2a). En la validación, este SSR detectó el fragmento de resistencia (225 pb) en: 1) el individuo HdT 832/2; 2) los siete individuos HdT 1343 I.574 (560 a 566) y 3) DG1399 (Figura 2b).



**Figura 1. a.** Polimorfismo detectado en la evaluación preliminar; **b.** y **c.** Validación del microsatélite candidato FR34-6ctg. Las flechas señalan bandas distintas a las observadas en el control susceptible (Caturra). HdT: Híbrido de Timor, CCC: Colección Colombiana de Café, cat: Caturra.



**Figura 2. a.** Polimorfismo detectado en la evaluación preliminar; **b.** y **c.** Validación del microsatélite candidato CMA276. Las flechas señalan bandas distintas a las observadas en el control susceptible (Caturra). HdT: Híbrido de Timor, CCC: Colección Colombiana de Café, cat: Caturra.



**Figura 3. a.** Polimorfismo detectado en la evaluación preliminar; **b.** y **c.** Validación del microsatélite candidato Sat227. Las flechas señalan bandas distintas a las observadas en el control susceptible (Caturra). HdT: Híbrido de Timor, CCC: Colección Colombiana de Café.

La evaluación preliminar del microsatélite Sat227 detectó una banda de aproximadamente 170 pb que diferenció seis genotipos resistentes derivados del Híbrido de Timor (por ejemplo, HdT 1343 I.574 CV2 y DG1399 en la Figura 3a), y otra banda (aprox. 180 pb) distintiva de Sudán Rume (Figura 3a). Así mismo, Sat227 detectaron dos bandas en los genotipos silvestres CCC1146 y CCC1147 (aprox. 182 pb y 184 pb, respectivamente) que los diferenciaban del control susceptible (Figura 3a). Durante la fase de validación, este SSR detectó el fragmento de aproximadamente 170 pb que permitió diferenciar genotipos resistentes derivados del Híbrido de Timor (Figura 3b). Este fragmento fue observado en: 1) HdT 1343 I.565; 2) los siete individuos HdT I.574 CV2 (560 a 566) y 3) DG1399 (Figura 3b). Contrario a lo mostrado por FR34-6ctg y CMA276, este microsatélite no detectó en HdT 832/2 el fragmento (aprox. 170 pb) que estaría asociado a resistencia a CBD, sino que lo detectó en los individuos HdT 2252 (Figura 3b). Además, a diferencia de FR34-6ctg y CMA276, este microsatélite detectó en 12 individuos la banda (aprox. 180 pb) que estaría asociada a la resistencia de Sudán Rume (Figura 3b).

La validación de los resultados en las poblaciones segregantes  $F_2$  mostró que los tres microsatélites detectaron bandas posiblemente asociadas a genes de resistencia cuyos tamaños coinciden con los identificados en la evaluación preliminar: FR34-6ctg – 170 pb (Figura 1c), CMA276 – 225 pb y 255 pb (Figura 2c) y Sat227 – 170 pb, 180 pb, 182 pb y 184 pb (Figura 3c). Como se esperaba, por ser poblaciones segregantes, los tres microsatélites detectaron segregación en los 13 individuos del cruce DG1399 x Sudán Rume I.971 y en los seis del cruce DG1399 x CCC1147. Estos resultados serán validados con los resultados de resistencia a CBD que se obtendrán en las pruebas de

hipocótilos que actualmente están en desarrollo, y permitirán relacionar el genotipo de estos individuos y su resistencia a uno, dos o tres aislamientos del patógeno.

En general, los resultados de la fase de validación muestran que FR34-6ctg, CMA276 y sat227 no detectaron bandas de resistencia en la mayoría de los 16 individuos del Híbrido de Timor incluidos en esta fase del estudio (Tabla 2, Figuras 1, 2 y 3). Sin embargo, considerando que Iapar 59 es una variedad derivada de HdT 832/2 (Tabla 2), los microsatélites FR34-6ctg y CMA276 serían marcadores especialmente útiles en la selección por resistencia a CBD de materiales derivados del HdT 832/2 y HdT 1343 I.574 (Figuras 1b y 2b); no obstante, estos dos marcadores no detectaron bandas que diferenciaran a Caturra de Sudán Rume (Figuras 1c y 2c).

Por otro lado, resalta el hecho que CMA276 y Sat227 (Figuras 2c y 3c) detectaron en los  $F_2$ : DG1399 x CCC1147 las bandas (aprox. 255 pb y 184 pb, respectivamente) que estarían asociadas a la resistencia del progenitor silvestre (CCC1147). Por lo tanto, estos dos marcadores serían útiles para identificar genotipos silvestres etíopes portadores de un alelo de resistencia a CBD. Este hallazgo es particularmente llamativo porque hasta ahora no se han reportado alelos de resistencia en materiales silvestres. Consecuentemente, el marcador Sat227 será potencialmente útil para diferenciar individuos con resistencia procedente del Híbrido de Timor, Sudán Rume y CCC1147, y valdría la pena utilizarlo en diferentes poblaciones con resistencia de distintas fuentes.

**Utilidad de los tres SSR candidatos.** Gichuru *et al.* (12) reportaron que los microsatélites FR34-6ctg y CMA276 (Sat207 y Sat235, respectivamente) estuvieron fuertemente

asociados a los fenotipos resistentes a CBD incluidos en su estudio. Estos autores evaluaron dos poblaciones  $F_2$  del cruce entre un progenitor susceptible a CBD (cv. SL28) y otro resistente (cv. Catimor 88 o cv. Catimor 127), y concluyeron que estos dos marcadores estarían ligados a la región cromosómica que contiene un gen principal de resistencia a CBD, posiblemente el gen *T* descrito previamente por Van der Vossen y Walyaro (32). Además, según Gichuru *et al.* (12), la resistencia a CBD exhibida por las progenies del Híbrido de Timor que ellos evaluaron, se debe a un único fragmento introgresado. En el presente estudio, ambos marcadores (FR34-6ctg y CMA276) detectaron fragmentos que permitieron diferenciar algunos individuos emparentados con el Híbrido de Timor (por ejemplo, Iapar 59, DG1399 y Ruiru11) de otros individuos resistentes incluidos en el estudio; por lo tanto, estos resultados confirman que los dos SSR pueden ser usados para seleccionar materiales que presenten resistencia a CBD proveniente del Híbrido de Timor.

Los microsatélites FR34-6ctg y CMA276 serán útiles para establecer el genotipo de progenies  $F_2$  obtenidas al cruzar progenitores resistentes a CBD, y posiblemente para explicar por qué algunos individuos son resistentes a más de un aislamiento del patógeno al realizar las pruebas de inoculación de hipocótilos. Este aspecto se hace evidente observando la segregación detectada en los individuos  $F_2$  evaluados en la fase de validación, que son el producto de los cruces entre progenitores portadores del gen *T* y *R* (Figuras 1c, 2c y 3c). Actualmente, estos individuos están siendo evaluados en el CIFC; por lo tanto, el análisis complementario de la constitución genotípica y los datos de resistencia de cada material permitiría la comprensión de las diferencias de resistencia y la planeación de cruces que fomenten la piramidación de alelos

que confieran resistencia a CBD. De todos modos, la etapa posterior de comprobación de la resistencia de estos materiales inevitablemente implica la evaluación en el campo.

Lashermes *et al.* (17), obtuvieron evidencias de la introgresión del genoma de *C. arabica* utilizando marcadores SSR y AFLP en una población  $F_2$ , que fue obtenida cruzando un derivado del Híbrido de Timor y un silvestre etíope. Estos autores observaron que: 1) el polimorfismo detectado por el microsatélite Sat227 era consistente con una introgresión desde el genoma de *C. canephora* y 2) que este SSR estaría asociado a una región cromosómica portadora de un gen de resistencia a roya. Una explicación que permite conjugar todas estas observaciones reside en el hecho que los genes de resistencia a enfermedades de los genomas vegetales tienden a estar agrupados. Se puede asumir que el microsatélite Sat227 estaría cercano a una región cromosómica que contiene genes que confieren resistencia a roya y CBD.

Generalmente, los marcadores moleculares no son polimórficos en todas las poblaciones de mapeo; por lo tanto, es muy valioso identificar marcadores alternativos para otros materiales genéticos. En este contexto, los resultados de este trabajo indican que los microsatélites CMA276 y Sat227 pueden convertirse en una herramienta muy útil para identificar resistencia en materiales silvestres de origen etíope. Estos dos marcadores han sido evaluados exitosamente en la población  $F_2$  tetraploide (Caturra x CCC1146) que Cenicafé está usando para construir el mapa genético de *C. arabica*. Lo anterior permitirá la identificación de otros microsatélites que estén ligados a CMA276 y Sat227 para evaluarlos en los materiales cuya resistencia haya sido evaluada en el CIFC, y determinar si aquellos microsatélites también podrían usarse como herramienta en la selección de

materiales etíopes del banco de germoplasma de Cenicafé que portarían resistencia a CBD. Para cualquier programa de mejoramiento es de particular importancia identificar marcadores moleculares asociados a los tres genes de resistencia a CBD que han sido reportados (32), y a aquellos que potencialmente se encuentren en germoplasma exótico (por ejemplo, accesiones etíopes).

**Selección Asistida por Marcadores en Cenicafé.** La SAM es una estrategia que cambia el criterio de selección de fenotipos por la selección directa o indirecta de genes. El éxito de la aplicación de la SAM depende de factores como la base genética de la característica de interés, la distancia entre el marcador y el gen de interés, y el número de individuos que pueden evaluarse, entre otros. La SAM ha sido usada para seleccionar características de herencia simple, porque la asociación fenotipo-genotipo es más fácil de establecer con características monogénicas u oligénicas con heredabilidad alta que con características poligénicas (QTL, sus siglas en inglés: *Quantitative Trait Loci*). Sin embargo, la disponibilidad de marcadores moleculares y mapas genéticos han convertido a la SAM en una estrategia viable, tanto para rasgos controlados por genes mayores como para los QTLs (31).

La utilización de la SAM para preseleccionar materiales con resistencia a CBD se ve favorecida porque la resistencia a esta enfermedad está gobernada por tres genes (*R*, *T* y *K*), aunque el número de genes que controlan la resistencia a CBD es tema recurrente de debate entre los especialistas. Esta estrategia es particularmente aplicable para Cenicafé, debido a que la institución cuenta con un mapa genético de *C. arabica*, que facilitaría la identificación de regiones QTL asociadas a resistencia a CBD. Debido a la naturaleza de los microsatélites, la

implementación de la SAM aumentará la confiabilidad del proceso de preselección de materiales resistentes y reducirá sus costos; además, disminuirá el tiempo necesario para la ejecución de esta etapa y lo que es más importante, se podría hacer selección por resistencia a una enfermedad que no está en el país. Esto augura que la aplicación de esta estrategia optimizará el proceso de selección que actualmente realiza Cenicafé.

Finalmente, puede concluirse:

Este estudio validó la presencia de dos microsatélites previamente reportados como asociados a la resistencia a CBD y uno nuevo, Sat227. Estos microsatélites son potencialmente útiles para la selección precoz de genotipos resistentes a CBD, debido a que consistentemente detectaron bandas que estarían asociadas a resistencia, así: 1) FR34-6ctg y CMA276 presentaron bandas asociadas a resistencia derivada del Híbrido de Timor; 2) CMA276 y Sat227 detectaron bandas que presumiblemente estarían asociadas a un nuevo alelo de resistencia presente en las introducciones silvestres de Etiopía; y 3) Sat227 presentó bandas asociadas a resistencia proveniente de Sudán Rume y el Híbrido de Timor.

La utilidad de los tres microsatélites (FR34-6ctg, CMA276 y Sat227) que se seleccionaron en este estudio será confirmada utilizando un conjunto más grande de genotipos del banco de germoplasma de Cenicafé, tanto silvestres como derivados del Híbrido de Timor, cuya resistencia a CBD haya sido confirmada mediante pruebas de hipocótilos en el CIFIC.

Así mismo, se buscará asociar los marcadores a los diferentes aislamientos del patógeno, especialmente a aquellos que han sido reportados como los de mayor patogenicidad

(por ejemplo, aislamientos de Camerún), para seleccionar genotipos de la colección silvestre de Etiopía como progenitores en el desarrollo de variedades resistentes a CBD, y para tenerlos en cuenta durante la conformación de la colección núcleo del banco de germoplasma de Cenicafé.

Alternativamente, se plantea combinar la información de los mapas genético y físico de Cenicafé para identificar los clones de la librería genómica de Cenicafé (BAC, sus siglas en inglés: *Bacterial Artificial Chromosome*) que contengan las regiones cromosómicas a las cuales pertenecen estos microsatélites, y posteriormente secuenciar o caracterizar la región que potencialmente contenga gen(es) de resistencia asociado(s) a estos marcadores.

El presente estudio representa el primer intento realizado en Colombia para utilizar una metodología molecular que permita seleccionar precozmente materiales que sean portadores de resistencia a CBD. La identificación de microsatélites asociados a resistencia a CBD es de gran importancia en el programa de mejoramiento de Cenicafé porque permitirá hacer evaluaciones en ausencia del patógeno. Por lo tanto, el presente estudio debe ser considerado el punto de partida para: 1) la identificación de otras fuentes de resistencia a CBD; 2) la ampliación de la base genética usada por el programa de mejoramiento de Cenicafé, y 3) el fomento del uso de la Colección de Colombiana de Café de Cenicafé.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó en el marco de un convenio de Cooperación Técnica y Científica entre el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) de Colombia

y la Federación Nacional de Cafeteros (Federacafé). Los autores agradecen a Jairo Jaramillo y Carlos Augusto Vera, por su apoyo en la selección, identificación y recolección de los materiales evaluados.

## LITERATURA CITADA

1. AGRAMA, H.A.; DAHLEEN, L.; WENTZ, M.; JIN, Y.; STEFFENSON, B. Molecular mapping of the crown rust resistance gene *Rpc1* in barley. *Phytopathology* 94(8):858-861. 2004.
2. AGWANDA, C.O.; LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; COMBES, M.; CHARRIER, A. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in Arabica coffee. *Euphytica* 97(2):241-248. 1997.
3. BIEYSSE, D.; MANGA, B.; MOUEN B., J.A.; NDEUMENI, J.P.; ROUSSEL, V.; FABRE, J.V.; BERRY, D. Coffee berry disease: A potential threat to Arabica coffee growing worldwide. p. 153-156. En: BERRY, D. *Recherché et caféiculture*. Montpellier : CIRAD : CP, 2002. 156 p.
4. BELLA, M.; BIEYSSE, D.; MOUENB., J.A.; AKALAY, I.; BOMPARD, E.; BERRY, D. Observations sur la diversité de la population de *Colletotrichum kahawae* agent de l'antracnose des baies du caféier Arabica: Implications pour l'amélioration génétique. p. 604-612. En: *Colloque scientifique international sur le café* (17 : Juillet 20-25 1997 : Nairobi). Paris : ASIC, 1997. 828 p.
5. BRIDGE, P.D.; WALLER, J.M.; DAVIES, D.; BUDDIE, A.G. Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. *Journal of phytopathology* 156(5):274-280. 2008.
6. COMBES, M.C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAN, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular ecology* 9(8):1171-1193. 2000.
7. DERSO, E.; WALLER, J.M. Variation among *Colletotrichum* isolates from diseased coffee berries in Ethiopia. *Crop protection* 22(3):561-565. 2003.
8. DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to circumvent

- spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids research* 19(14):4008. 1991.
9. FANG, D.D.; STETINA, S.R. Improving cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plant resistance to reniform nematodes by pyramiding *Ren1* and *Ren2*. *Plant breeding* 130(6):673-678. 2011.
  10. FNC. Sistema de información cafetera: SICA. Bogotá: FEDERACAFÉ, 2012.
  11. GICHIMU, B.M.; OMONDI, C.O. Early performance of five newly developed lines of Arabica coffee under varying environment and spacing in Kenya. *Agriculture and biology journal of North America* 1(1):32-39. 2010.
  12. GICHURU, E.K.; AGWANDA, C.O.; COMBES, C.; MUTITU, E.W.; NGUGI, C.K.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P. Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant pathology* 57(6):1117-1124. 2008.
  13. GONZÁLEZ M., L.F.; CORTINAG., H.A.; HERRERA P., J.C. Validación de marcadores moleculares ligados al gen *SH3* de resistencia contra la roya en introducciones de la colección colombiana de café. *Cenicafé* 60(4):374-389. 2009.
  14. GOWDA, S.J.M.; RADHIKA, P.; KADDOO, L.B.; MHASE, L.B.; GUPTA, V.S. Molecular mapping of wilt resistance genes in chickpea. *Molecular breeding* 24(2):177-183. 2009.
  15. HINDORF, H.; OMONDI, C.O. A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of advanced research* 2(2):109-120. 2011.
  16. KAMESWARA R., K.; JENA, K.K.; LAKSHMI, M. Molecular tagging of a new bacterial blight resistance gene in rice using RAPD and SSR markers. *International rice research notes* 28(1):16-17. 2003.
  17. LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ANSALDI, C.; GICHURU, E.; NOIR, S. Analysis of alien introgression in coffee tree (*Coffea arabica* L.). *Molecular breeding* 27(2):223-232. 2011.
  18. LÓPEZ, G.; CORTINA G., H.A.; McCOUCH, S.; MONCADA B., M. DEL P. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. *Tree genetics and genomes* 5(3):435-446. 2009.
  19. MAHÉ, L.; COMBES, M.C.; VARZEA, V.M.; GUILHAUMON, C.; LASHERMES, P. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Molecular breeding* 21(1):105-113. 2008.
  20. MANUEL, L.; TALHINHAS, P.; VARZEA, V.M.; NEVES M., J. Characterization of *Colletotrichum kahawae* isolates causing coffee berry disease in Angola. *Journal of phytopathology* 158(4):310-313. 2010.
  21. MASABA, D.; WALLER, J.M. Coffee berry disease: The current status. p. 237-249. En: BALEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Wallingford : CAB International, 1992. 388 p.
  22. MONCADA B., M. DEL P.; McCOUCH, S. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome* 47(3):501-509. 2004.
  23. OMONDI, C.O.; AYIECHO, P.O.; MWANG'OMBE, A.W.; HINDORF, H. Resistance of *Coffea arabica* cv. Ruiru 11 tested with different isolates of *Colletotrichum kahawae*, the causal agent of coffee berry disease. *Euphytica* 121(1):19-24. 2001.
  24. OMONDI, C.O.; PINARD, F. Screening populations of Arabica coffee for molecular markers linked to coffee berry disease resistance. [cd rom]. p. 1377-1379. En: *Colloque scientifique international sur le café* (21 : September 11-15 2006 : Montpellier). Paris : ASIC, 2007.
  25. PENG, J.H.; FAHINA, T.; RODER, M.S.; LI, Y.C.; DAHAN, A.; GRAMA, A.; RONIN, Y.I.; KOROL, A.B.; NEVO, E. Microsatellite tagging of the stripe-rust resistance gene *YrH52* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, and suggestive negative crossover interference on chromosome 1B. *Theoretical and applied genetics* 98(6/7):862-872. 1999.
  26. PONCET, V.; HAMON, P.; MINIER, J.; CARASCO, C.; HAMON, S.; NOIROT, M. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome* 47(6):1071-1081. 2004.
  27. SILVA, M.C.; VÁRZEA, V.; GUERRA G., L.; AZINHEIRA, H.G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A.S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: Leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian journal of plant physiology* 18(1):119-147. 2006.

28. SILVA, D.N.; TALHINHAS, P.; VARZEA, V.; LOUREIRO, A.; SILVA, M.C.; PAULO, O.S.; BATISTA, D. Population structure of *Colletotrichum kahawae*, the causal agent of coffee berry disease (CBD): Insights from a multi-locus approach. [Cd rom]. p. 604-612. En: Colloque scientifique international sur le café (23 : October 3-8 2010 : Indonesia). Paris : ASIC, 2011.
29. SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.; MILLS, P.R. Coffee berry disease pathogen in Africa: Genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. Mycological research 97(8):995-1000. 1993.
30. TERESSA, A.; CROUZILLAT, D.; PETIARTD, V.; BROUHAN, P. Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica L.*) collections. Ethiopian journal of applied sciences and technology 1(1):63-79. 2010.
31. TORRES, A.M.; AVILA, C.M.; GUTIERREZ, N.; PALOMINO, C.; MORENO, M.T.; CUBERO, J.I. Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba L.*). Field crops research 115(3):243-252. 2010.
32. VAN DER V., H.A.M.; WALYARO, D.J. Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica L.*: Inheritance of the resistance. Euphytica 29(3):777-791. 1980.
33. VAN DER V., H.A.M.; WALYARO, D.J. Additional evidence for oligogenic inheritance of durable host resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in Arabica coffee (*Coffea arabica L.*). Euphytica 165(1):105-111. 2009.
34. WANG, L.M.; ZHANG, Z.Y.; LIU, H.J.; XU, S.C.; HE, M.Z.; LIU, H.X.; VEISZ, O.; XIN, Y. Identification, gene postulation and molecular tagging of a stripe rust resistance gene in synthetic wheat CI142. Cereal research communications 37(2):209-215. 2009.