

VALIDACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS AL GEN S_H3 DE RESISTENCIA CONTRA LA ROYA EN INTRODUCCIONES DE LA COLECCIÓN COLOMBIANA DE CAFÉ

Laura Fernanda González-Martínez*; Hernando Alfonso Cortina-Guerrero*; Juan Carlos Herrera-Pinilla*

RESUMEN

GONZÁLEZ M., L.F.; CORTINA G., H.A.; HERRERA P., J.C. Validación de marcadores moleculares ligados al gen S_H3 de resistencia contra la roya en introducciones de la colección colombiana de café. Cenicafé 60(4): 374-389. 2009

La roya es la enfermedad más importante para los países productores de café arábico (*Coffea arabica* L.). Para controlarla, en América se han desarrollado variedades resistentes derivadas del Híbrido de Timor. En Colombia, estas variedades están compuestas de líneas con diferentes combinaciones de genes de resistencia provenientes de este híbrido, gracias a esta diversidad, las variedades han permanecido resistentes por más de 25 años. Sin embargo, la evolución del patógeno obliga a mantener una estrategia basada en la diversidad de genes de resistencia. El gen S_H3 procedente de *Coffea liberica*, es un buen candidato para este propósito. El desarrollo reciente de marcadores moleculares ligados a este gen ha abierto la posibilidad de identificar de manera eficiente los genotipos que lo portan. El objetivo del presente estudio fue validar diez marcadores PCR específicos, en 52 accesiones de la Colección Colombiana de Café con diferentes grados de introgresión con la especie *C. liberica*. Los resultados revelaron que dos de los diez marcadores separaban de manera confiable y repetible los genotipos portadores del S_H3 . La presencia de tales marcadores coincidió significativamente con una elevada resistencia a la roya en el campo. En consecuencia, se propone utilizar estos marcadores para seleccionar tempranamente genotipos resistentes a la roya, en el marco de una estrategia de pirimidización orientada al desarrollo de líneas portadoras tanto de genes del Híbrido de Timor como del gen S_H3 . Esta acumulación de nuevos genes de resistencia constituye la estrategia más eficiente para lograr resistencia durable en las futuras variedades de café.

Palabras clave: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, *Coffea liberica*, selección asistida,

ABSTRACT

Leaf rust is the most important coffee (*Coffea arabica* L.) disease in producing countries. In order to face this disease, resistant varieties derived from Timor Hybrid have been developed in America. In Colombia, these varieties are made up of lines with different resistance genes combinations issued from this hybrid. Thanks to this diversity, such varieties have remained resistant to leaf rust for more than 25 years. However, the pathogen evolution obliges to keep a strategy based on the resistance genes diversity. The S_H3 gene from *Coffea liberica* is a good candidate for this purpose. Recent development of molecular markers linked to this gene has opened the possibility to efficiently identify the genotypes that carry it. The aim of this study was to validate ten PCR-specific markers over 52 accessions to the Colombian Coffee Collection characterized by having different introgression degrees from *C. liberica*. Our results revealed that two out of the ten markers allowed reliable discrimination of genotypes carrying the S_H3 gene. Furthermore, the presence of the selected markers significantly coincided with a high rust resistance recorded in the field. Therefore, we propose the use of these markers for early selection of rust resistant genotypes in the framework of gene pyramiding strategy involving not only the S_H3 but the resistance genes from the Timor hybrid. This accumulation of new resistance genes represents the most reliable approach towards development of future varieties with truly durable resistance.

Keywords: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, *Coffea liberica*, assisted selection.

* Investigadora Asociada e Investigador Científico II, respectivamente. Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

Dentro de las enfermedades limitantes del cultivo del café en el mundo, la roya del cafeto o roya anaranjada, causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Berk & Br), continúa siendo uno de los principales problemas. Aunque esta enfermedad infecta a prácticamente todas las especies de Rubiáceas conocidas (4), su efecto sobre la producción de *Coffea arabica*, la especie de mayor importancia comercial, es sin duda un problema mayor (21). Actualmente, la roya se encuentra distribuida en todas las áreas productoras de café del mundo, causando pérdidas de producción del 20% al 30% y costos de aplicación de entre el 10% y el 20% (24). En Colombia, donde la última epidemia severa de roya, ocurrió en los años 2008 y 2009, sobre la variedad Caturra, se ha estimado que en variedades susceptibles esta enfermedad puede causar la pérdida de hasta un 23% de la producción acumulada en cuatro cosechas (18). El uso de fungicidas ha sido un método de control ampliamente utilizado, sin embargo, además de contaminar, es una alternativa muy costosa, sobre todo si se tiene en cuenta que la gran mayoría de productores de café en Colombia (7) y en muchas partes del mundo, son pequeños campesinos que poseen menos de tres hectáreas de cultivo (11). Ante esta situación, el desarrollo de variedades mejoradas se convierte en la alternativa más limpia y eficiente para los productores.

De acuerdo con los estudios genéticos iniciados en los años 60's en el Centro de Investigación de las Royas del Café en Portugal (CIFC), la resistencia del café a la roya, está condicionada por al menos nueve factores o genes dominantes denominados S_H (S_H1 a S_H9), que pueden presentarse solos o en combinación (19). De estos factores de resistencia, S_H1 , S_H2 , S_H4 y S_H5 han sido encontrados en *C. arabica*; los otros (S_H6 , S_H7 , S_H8 y S_H9), han sido introgresados de la especie diploide *Coffea canephora*, a

través del híbrido de Timor, mientras que el factor S_H3 proviene de otra especie diploide, *Coffea liberica* (2, 29). Estos estudios han dejado igualmente en evidencia la continua aparición de nuevas razas de roya, es así como hasta 2004 se habían reportado 45 razas del hongo, 20 de las cuales presentaban alta virulencia sobre diferentes accesiones del Híbrido de Timor (27), hasta ahora la única fuente de genes de resistencia de las variedades cultivadas en América.

Aunque se ha hecho un gran esfuerzo para obtener variedades con resistencia durable contra la roya, la continua aparición de nuevas razas del hongo, ha hecho difícil esta tarea para los mejoradores. La experiencia muestra que los genes de resistencia presentes en *C. arabica*, usados solos o en combinación, no garantizan una resistencia durable contra la enfermedad; sin embargo, cuando estos genes son usados en combinación con aquellos derivados de las especies diploides, *C. canephora* y *C. liberica*, el resultado es una resistencia más durable y efectiva (6, 22). Por lo tanto, la acumulación de genes de resistencia en un solo genotipo (método conocido como piramidización) o el uso de líneas con diferentes combinaciones de estos genes, en variedades compuestas, parecen la mejor opción para lograr una resistencia verdaderamente durable contra la roya del cafeto (11, 14). En Colombia, por ejemplo, el uso de una variedad compuesta como la variedad Colombia, ha permitido mantener una elevada resistencia contra la roya por más de 25 años. Tanto esta variedad como las variedades liberadas posteriormente (Tabi y Variedad Castillo®), poseen un fondo genético derivado del híbrido de Timor. Si bien el monitoreo y ajuste constante de la resistencia exhibida por las líneas que componen estas variedades ha permitido mantener una resistencia elevada contra la enfermedad, la aparición cada vez más frecuente de razas compatibles con los derivados de este híbrido,

hace necesario pensar en incorporar otras fuentes de resistencia. En este contexto, la adición de un nuevo gen como el S_H3 , derivado de *C. liberica*, es sin duda una alternativa promisoría.

La introgresión progresiva de diferentes genes de resistencia en una sola variedad usando métodos convencionales de mejoramiento, puede ser una estrategia engorrosa debido a la presencia de genes ya existentes, que tienden a enmascarar los genes introducidos (fenómeno conocido como epistasia), haciendo más difícil la selección (10). Adicionalmente, estos métodos requieren de largos y costosos ensayos de campo a fin de seleccionar el fenotipo de resistencia buscado. Por lo tanto, recurrir a estrategias que hagan más efectiva la selección, se convierte en un objetivo prioritario. La selección asistida por marcadores (MAS, por sus siglas en inglés), es un método que facilita la selección precoz de los genotipos, acelerando el proceso de selección mientras asegura la presencia de los genes deseados (9, 10, 12). Esto es posible gracias a la identificación de marcadores moleculares íntimamente ligados a genes de interés. La utilidad de la MAS ha sido ampliamente probada en cultivos de importancia comercial tales como arroz, maíz y trigo, entre otros (8, 20, 25).

Recientemente, Mahé y colaboradores identificaron diez marcadores moleculares estrechamente ligados al gen S_H3 de resistencia a la roya (13). Estos marcadores, derivados de una caracterización molecular detallada de la región genómica portadora de dicho gen, han abierto por primera vez la posibilidad de utilizar la selección asistida en el mejoramiento del café arábico. En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue validar este grupo de diez marcadores, utilizando diferentes genotipos de la Colección Colombiana de Café (CCC), con el fin de determinar cuáles de ellos pueden ser de utilidad para asistir

la selección de genotipos portadores del gen s_H3 destinados a conformar las nuevas variedades de café en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. En este estudio se evaluaron 52 accesiones de la CCC, ubicada en la Estación Central Naranjal de Cenicafé (Chinchiná, Caldas). Los genotipos estudiados se dividieron en dos grupos: el primero correspondió a plantas no portadoras del gen S_H3 , en el que se incluyeron tres accesiones de la especie *C. arabica*, una de la especie *C. canephora* y una del híbrido de Timor. El segundo grupo estuvo conformado por 47 accesiones consideradas como portadoras del factor S_H3 . Este grupo incluyó ocho accesiones de la especie *C. liberica*, 23 accesiones derivadas de variedades originarias de India e Indonesia, respectivamente (i.e. S.288, S.795 y BA; Kawisari), y 16 accesiones de cruces entre la línea S.288 y variedades de *C. arabica*. Tanto Kawisari como el genotipo S.288 han sido utilizados como plantas diferenciales (26). La descripción completa de las accesiones incluyendo su genealogía, origen y grupo fisiológico al que pertenecen se presenta en la Tabla 1.

Los materiales cultivados originarios de India, en su mayoría son derivados de la accesión S.26. Esta accesión fue una de las primeras selecciones hechas a partir del cruzamiento espontáneo entre las especies *C. arabica* y *C. liberica*, que se convirtió en una de las principales fuentes de resistencia contra la roya utilizadas por el programa de mejoramiento de este país asiático (28). A partir de autofecundaciones sucesivas del S.26 se desarrollaron nuevas líneas con resistencia a la roya, entre las cuales se destacó la línea S.288, liberada en 1937. Igualmente, del cruzamiento entre la línea S.288 y la variedad Kent, se obtuvo la selección S.795, la cual fue liberada en 1947.

Tabla 1. Características de los 52 genotipos de la Colección Colombiana de Café analizados en este estudio.

	Genealogía	Código	Origen	Grupo fisiológico
No portadores del SH3	<i>Coffea arabica</i> var. Caturra	Cat	Brasil	E
	<i>Coffea arabica</i> var. Bourbon	Bor	Isla Reunión	E
	<i>Coffea arabica</i> var. Kent	Kent	India	D
	<i>Coffea canephora</i> conilon (Congolais)	Caneph	África Central?	No Identif.
	Híbrido de Timor (CV mix)	HDT	Isla de Timor	A/R 1,2 ,3 y E
Posibles portadores del SH3	<i>C. liberica liberica</i> (CCC.769)	Lib-769	África Occidental	No Identif.
	<i>C. liberica</i> Arawinensis (CCC1025)	Lib.araw-1025	África Central	No Identif.
	<i>C. liberica</i> Abeocutae (CCC1024)	Lib.abe-1024	Costa de marfil, Ghana	No Identif.
	<i>C. liberica</i> Excelsa (CCC1026)	Lib. Exc 1026	África Central	No Identif.
	<i>C. liberica</i> Excelsa (CC.1027)	Lib. Exc 1027	África Central	No Identif.
	<i>C. liberica</i> Excelsa (CCC.1028)	Lib. Exc 1028	África Central	No Identif.
	<i>C. liberica</i> Excelsa-26	Lib. Exc-26	África Central	No Identif.
	<i>C. liberica</i> Arawinensis-2	Lib. araw-2	África Central	No Identif.
	S.288-23	S288-1e-1	India	G
	S.288-23	S288-1e-2	India	G
	S.288-23	S288-1e-3	India	G
	S.288-23	S288-1e-4	India	G
	S.288-23	S288-1e-5	India	G
	S.288-23	S288-2e-1	India	G
	S.288-23	S288-2e-2	India	G
	S.288-23	S288-2e-3	India	G
	S.288-23	S288-2e-4	India	G
	S.288-23	S288-2e-5	India	G
	S.795	S795-1	India	H
	S.795	S795-2	India	H
S.795	S795-3	India	H	

Continúa...

	Genealogía	Código	Origen	Grupo fisiológico
	S.795	S795-4	India	H
	Kawisari	Kaw-1	Indonesia	M
	Kawisari	Kaw-2	Indonesia	M
	Kawisari	Kaw-3	Indonesia	M
	Kawisari	Kaw-4	Indonesia	M
	Kawisari	Kaw-5	Indonesia	M
	BA -2	BA-2	India	No Identif.
	BA -8	BA-8	India	No Identif.
	BA -10	BA-10	India	No Identif.
	BA -16	BA-16	India	No Identif.
	Bourbón salvadoreño x S.288-23	BxS-1	India	G
	Bourbón salvadoreño x S.288-23	BxS-2	India	G
Posibles portadores del SH3	Bourbón salvadoreño x S.288-23	BxS-3	India	G
	Bourbón salvadoreño x S.288-23	BxS-4	India	G
	Geisha x S288-23	GxS-1	India	Z
	Geisha x S288-23	GxS-2	India	Z
	Geisha x S288-23	GxS-3	India	Z
	Geisha x S288-23	GxS-4	India	Z
	S4 Agaro x S288-23	S4xS-1	India	X
	S4 Agaro x S288-23	S4xS-2	India	X
	S4 Agaro x S288-23	S4AxS-3	India	X
	S4 Agaro x S288-23	S4AxS-4	India	X
	S.288-23 x S4 Agaro	SxS4A-1	India	X
	S.288-23 x S4 Agaro	SxS4A-2	India	X
	S.288-23 x S4 Agaro	SxS4A-3	India	X
	S.288-23 x S4 Agaro	SxS4A-4	India	X

Estas selecciones, además de poseer el factor S_H3 , presentan características de calidad y comportamiento agronómico sobresalientes (16). Es importante anotar que todas estas selecciones de arábicas de India poseen diferentes grados de introgresión de la especie *C. liberica* y, por lo tanto, difieren del resto de líneas y variedades mejoradas producidas por los programas de mejoramiento de los países de América Latina (2, 16).

Otro grupo importante de selecciones fueron aquellas de la llamada serie BA (por Balehonur Arabica). Éstas son el resultado de selecciones hechas en plantaciones del sur de India desde 1929, también a partir de la accesión S.26. Fue a partir de una F1 derivada del S.288, que se seleccionó la planta que dio origen a la selección BA-2, entre otras. Del cruce S.26 x Kent se produjo la S.327, de la cual se obtuvieron las selecciones BA-8 y BA-10, entre otras. Por último, del cruce S.31 x S.22, se seleccionó la planta denominada S.333 que permitió obtener otras

plantas de la serie BA, dentro de las cuales se encuentra la accesión BA-16 (15).

Aislamiento de ADN y evaluación de marcadores para el gen S_H3 . Con el fin de evaluar la presencia de los marcadores estudiados, se extrajo ADN genómico a partir de hojas de cada uno de los individuos estudiados, siguiendo los procedimientos descritos por Bernatsky y Tanksley en 1986 (1), con algunas modificaciones para café. En total, se evaluaron diez marcadores moleculares (Tabla 2), previamente reportados como ligados a la región genómica portadora del gen S_H3 (13). Estos marcadores fueron desarrollados a partir de secuencias de microsátélites, AFLPs y secuencias derivadas de una librería de largos fragmentos contenidos en cromosomas bacterianos, también conocidas como librerías BAC (por *bacterial artificial chromosomes*). Las condiciones de amplificación fueron las reportadas por Mahé y colaboradores (13), mientras que la visualización de los marcadores a partir de separación por electroforesis en

Tabla 2. Descripción de los marcadores moleculares ligados al gen SH3, desarrollados por Mahé y colaboradores (13), evaluados en este trabajo.

Tipo de marcador	Nombre marcador	Polimorfismo
SCARs derivados AFLP	Sp-M5-SH3	Dominante
	Sp-M16-SH3	Co-Dominante
	Sp-M8-SH3	Co-Dominante
	Sp-M-18SH3	Dominante
Microsátélites	Sat281	Dominante
	Sat244	Dominante
	Sat160	Dominante
SCARs derivados de secuencias BAC	BA-42-21B-r	Dominante
	BA-48-21O-f	Co-Dominante
	BA-124-12K-f	Dominante

geles de poliacrilamida 6%, fue realizada según Combes y colaboradores (3). Antes de evaluar los marcadores sobre todas las accesiones seleccionadas, se hizo una evaluación preliminar de su calidad y reproducibilidad sobre un grupo reducido de genotipos. A partir de estos resultados se seleccionaron aquellos marcadores con amplificación consistente y que presentaron un polimorfismo relacionado con el gen S_H3 .

Caracterización de la resistencia genética a la roya en el campo. Bajo la hipótesis que la presencia del gen S_H3 conlleva resistencia genética contra la roya (dado que se trata de un gen de resistencia no explotado en Colombia), se evaluó la incidencia de roya en el campo de todas las accesiones estudiadas. Esta evaluación se llevó a cabo durante el mes de septiembre del año 2009, época en la cual se presentó una alta incidencia de la enfermedad, utilizando la escala propuesta por Eskes y Braghini (5) la cual va de 0 a 9, donde 0 indica una resistencia completa, mientras que 9 significa una elevada susceptibilidad a la enfermedad.

De manera complementaria, se recolectó la información histórica disponible sobre la incidencia de roya en las diferentes accesiones en la CCC, mucha de la cual se remontaba 13 años atrás. La calificación de roya que fue tenida en cuenta para las comparaciones entre genotipos, fue la más alta registrada para cada accesión. La reacción a la roya se determinó con base en la calificación otorgada a cada una de las accesiones, según las siguientes categorías:

1. Altamente resistente (calificación igual a 0 ó 1)
2. Medianamente resistente (calificación igual a 2, 3 ó 4)

3. Medianamente susceptible (calificación igual a 5, 6 ó 7)

4. Muy susceptible (calificación igual a 8 ó 9)

Análisis de datos. Con el fin de analizar la correspondencia entre la presencia del factor S_H3 y cada uno de los marcadores moleculares seleccionados, se construyó una matriz binaria con la información del polimorfismo observado en los diferentes geles, considerando la presencia de un marcador como “1” y su ausencia como “0”. Una vez construida la matriz, se relacionó esta información tanto con la pertenencia o no al grupo de accesiones portadoras del factor S_H3 , como con su fenotipo de resistencia (calificación de roya en el campo).

Los mejores marcadores se seleccionaron con base en un análisis de coincidencias, en el cual se consideró el número de veces en que la presencia del marcador coincidía con una elevada resistencia a la roya en el campo. De manera análoga, la ausencia del marcador en un genotipo resistente o la presencia de marcador en un genotipo susceptible, fueron calificadas como no-coincidencias. Por obvias razones, aquellas accesiones portadoras de genes de resistencia diferentes al gen S_H3 (por ejemplo, Híbrido de Timor, *C. canephora* y *C. arabica* var. Bourbón) fueron excluidas del análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la utilidad de diez marcadores moleculares reportados como ligados al gen S_H3 de resistencia a la roya del cafeto. Las evaluaciones de calidad de amplificación y reproducibilidad permitieron seleccionar ocho marcadores potencialmente útiles para nuestro estudio. Si bien, estos marcadores mostraron un buen perfil de

amplificación, sólo cinco de ellos (Sp-M18-SH3, Sat244, BA-48-210-f, BA-124-12K-f y Sat160) generaron un claro polimorfismo entre los diferentes grupos de accesiones estudiadas. De éstos, los cuatro primeros correspondieron a marcadores de presencia (banda presente en el genotipo portador del S_H3), mientras que el último fue catalogado como marcador de ausencia (banda ausente en el genotipo portador del S_H3).

Validación de marcadores en los genotipos control. Con el fin de verificar la correspondencia entre la presencia de un marcador y el gen S_H3 , cada marcador seleccionado fue evaluado sobre dos grupos controles: el primero estuvo constituido por individuos de la especie *C. arabica*, un representante de la especie *C. canephora* y uno del Híbrido de Timor, los cuales no poseen el gen S_H3 . El segundo grupo, estuvo

formado por ocho accesiones de la especie *C. liberica* presentes en la CCC. Esta especie se presume como la fuente del gen S_H3 .

Como era de esperarse, ninguna de las accesiones pertenecientes al primer grupo (sin el gen S_H3) mostró la banda correspondiente a los marcadores de presencia. Esto permitió confirmar la relación predicha entre los marcadores y el gen S_H3 . Como se observa en la Tabla 3, los individuos de las especies *C. arabica* (Caturra, Bourbon, Kent, Híbrido de Timor) y *C. canephora*, no mostraron la banda correspondiente a los marcadores de presencia, mientras que para el marcador Sat160 (marcador de ausencia) sí se observó la banda.

Cuando se evaluaron los mismos marcadores sobre las ocho accesiones de *C. liberica*, se observaron diferentes bandas (Tabla 3,

Tabla 3. Matriz presencia-ausencia de los marcadores moleculares ligados al gen S_H3 de resistencia a roya para el grupo de genotipos “no portadores del S_H3 ” y el grupo de individuos “portadores del S_H3 ”. La presencia de variaciones alélicas relacionadas con este gen se muestra con uno o varios asteriscos asociados al marcador respectivo.

		Marcador				
		Banda presente				Banda ausente
		Código	Sp-M18-SH3	Sat244	BA-48-210-f	BA-124-12K-f
No portadores del S_H3	Cat	0	0	0	0	1
	Bor	0	0	0	0	1*
	Caneph	0	0	0	0	1
	Kent	0	0	0	0	1*
	HDT	0	0	0	0	1**
Portadores del S_H3	Lib -769	1	1	1*	1	0
	Lib araw-1025	1*	1*	1*	1	1*
	Lib -abel1024	1*	0	1*	1	1**
	Lib -exc 1026	0	1**	0	1	1
	Lib -exc 1027	0	0	0	1	0
	Lib -exc 1028	0	1*	0	1	1*
	Lib -exc-26	1	0	0	1	1**
	Lib -araw -2	1	1*	1**	1	1**

Figura 1). La presencia de estas bandas fue interpretada como una posible variación alélica en la región portadora del gen S_{H3} en la especie *C. liberica*, hecho que no había sido reportado. Esta posible variación alélica se evidenció en el perfil de los marcadores Sat244 (Figura 1A), Sp-M18-SH3 y BA-48-210-f (Figura 1B). El marcador BA-124-12K-f por el contrario, mostró la misma banda entre las diferentes accesiones (Figura 1C), es decir, se comportó de manera monomórfica. Inesperadamente, el marcador Sat160 generó bandas asociadas al S_{H3} para seis de las ocho accesiones estudiadas, indicando una ausencia de relación entre este marcador y los alelos del gen. Debido a esto, el marcador Sat160 fue excluido de los análisis subsiguientes.

Validación de marcadores en las variedades de India. Al evaluar el comportamiento de los marcadores seleccionados sobre las variedades

S.288, S.795, Kawisari y BA, portadoras del gen S_{H3} , se observaron bandas polimórficas entre los individuos pertenecientes a los genotipos S.288 y S.795, con respecto a Kawisari (Tabla 4, Figura 2). Esta diferencia en las bandas asociadas al S_{H3} muestra que entre estos dos grupos existe variación en cuanto a este alelo de resistencia a la roya. De nuevo, mientras con los marcadores Sp-M18-SH3 y Sat244 se observó una variación alélica (Figura 2A), el marcador BA-124-12K-f mostró una banda monomórfica en todos los individuos (Figura 2B y Tabla 4). El marcador BA-48-210-f por su parte, no detectó el alelo S_{H3} , es decir, no mostró ninguna banda (Tabla 4).

En la Figura 2, se observa que dentro del grupo de individuos pertenecientes al genotipo S.288, cuatro carecen del marcador S_{H3} (S 288-1e-2, S 288-1e-3, S 288-1e-4 y S 288-1e-5). Al examinar su reacción de

Figura 1.
 Perfil molecular de diferentes marcadores candidatos amplificados a partir de ADN genómico de individuos del grupo control, sin presencia del marcador S_{H3} , y diferentes accesiones de *C. liberica*, fuente del gen SH3. (A), patrón de bandas del marcador Sat244; (B), marcador BA-48-210-f; (C), marcador BA124-12K. Las flechas señalan las bandas polimórficas.

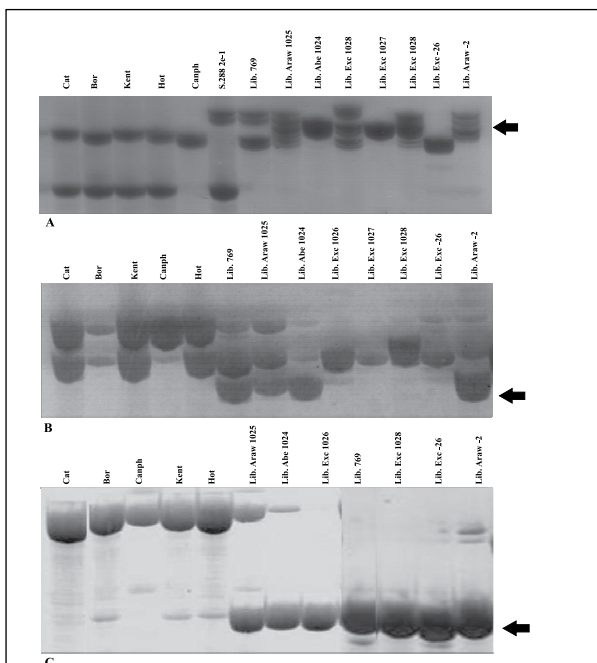


Tabla 4. Matriz presencia-ausencia de los marcadores moleculares ligados al gen S_H3 en variedades de India y su respectiva reacción de resistencia a la roya. Las variaciones alélicas relacionadas con el gen S_H3 se muestran con asteriscos asociados a la banda respectiva.

Código	Sp-M18- S_H3	Sat244	BA-48-210-f	BA- 124-12K-f	Calificación de roya	Tipo de reacción
S288-1e-1	1	1	1	1	1	Altamente resistente
S288-1e-2	0	0	0	0	8	Muy susceptible
S288-1e-3	0	0	0	0	6	Medianamente susceptible
S288-1e-4	0	0	0	0	6	Medianamente susceptible
S288-1e-5	0	0	0	0	7	Medianamente susceptible
S288-2e-1	1	1	1	1	0	Altamente resistente
S288-2e-2	1	1	1	1	0	Altamente resistente
S288-2e-3	1	1	1	1	0	Altamente resistente
S288-2e-4	1	1	1	1	0	Altamente resistente
S288-2e-5	1	1	1	1	0	Altamente resistente
S795-1	1	1	1	1	0	Altamente resistente
S795-2	1	1	1	1	0	Altamente resistente
S795-3	1	1	1	1	0	Altamente resistente
S795-4	1	1	1	1	0	Altamente resistente
Kaw-1	1*	1**	0	1	1	Altamente resistente
Kaw-2	1*	1**	0	1	0	Altamente resistente
Kaw-3	1*	1**	0	1	0	Altamente resistente
Kaw-4	1*	1**	0	1	4	Medianamente resistente
Kaw-5	1*	1**	0	1	1	Altamente resistente
BA-2	1	1	1	1	0	Altamente resistente
BA-8	0	0	0	0	6	Medianamente susceptible
BA-10	1	1	1	1	0	Altamente resistente
BA-16	0	0	0	0	7	Medianamente susceptible

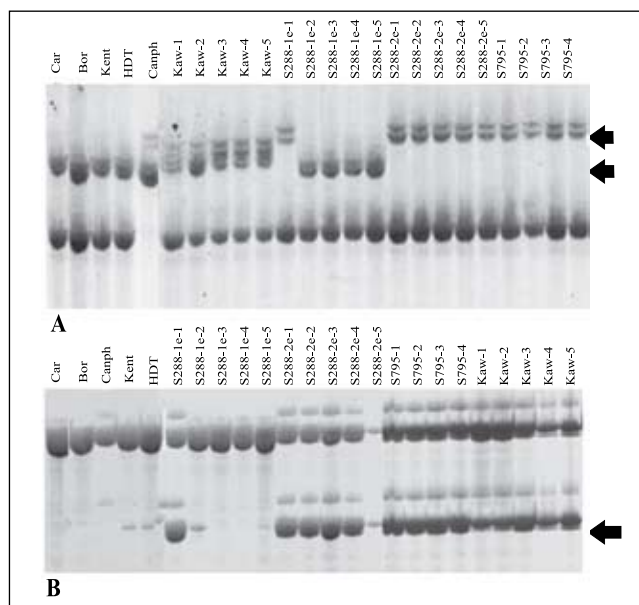


Figura 2. Perfil molecular de los marcadores Sat244 (A) y BA124-12K (B), para individuos del grupo control, sin presencia del marcador S_H3 , y para el grupo de individuos pertenecientes a las accesiones de la India (S288, S795 y Kawisari). Las flechas señalan las bandas diferenciales.

resistencia a la roya (Tabla 4) se observó que todos ellos eran susceptibles, sugiriendo un error en la clasificación de este material. Efectivamente, al examinar las fichas originales de registro elaboradas durante el proceso de introducción a la CCC, se encontraron inconsistencias relacionadas con su origen. De otro lado, al examinar el comportamiento de los marcadores sobre los individuos del grupo BA, se observó que sólo dos (BA-2 y BA-10), presentaban los cuatro marcadores ligados al S_H3 , mientras los dos restantes no (BA-8 y BA-16). Cuando se relacionó la presencia o ausencia de los marcadores con la reacción de cada planta frente a la roya, se encontró que los que presentan la banda exhibían una resistencia muy elevada, comparada con aquellos que, como el BA-8 y BA-16, no mostraron el marcador (Tabla 4). Las dos situaciones mencionadas constituyen ejemplos en los cuales los marcadores candidatos detectaron errores o inconsistencias en el genotipo de las plantas.

Adicionalmente, se determinó la presencia de los cuatro marcadores seleccionados sobre plantas de cruzamientos entre una línea de la variedad S.288 y las variedades S4-Agaro, Bourbón salvadoreño y Geisha. Como se observa en la Tabla 5, estos marcadores mostraron la presencia de una banda asociada al gen S_H3 en los cruzamientos entre Bourbón salvadoreño x S.288-23. La presencia de bandas coincidió nuevamente con la elevada resistencia a la roya de las plantas de este cruce. En los derivados del cruzamientos S4-Agaro x S.288-23, sus recíprocos (S.288-23 x S4-Agaro) y el cruce Geisha x S.288-23, el comportamiento de los marcadores fue similar, aunque el marcador BA-48-21O-f no detectó la presencia del S_H3 . Los marcadores Sp-M18-SH3, Sat244 y BA 124-12K, además permitieron revelar la presencia de dos plantas del cruce S.288-23 x S4-Agaro (SxS4A-2 y SxS4A-4) y cuatro del cruce Geisha x S.288-23, carentes del

marcador para el gen S_H3 . Como en los casos anteriores, la ausencia del marcador se reflejó en una susceptibilidad importante de tales plantas frente a la roya (Tabla 5).

Selección de marcadores consistentemente ligados al gen S_H3 . Con el fin de seleccionar aquel o aquellos marcadores que mostraran mayor asociación con el gen S_H3 , se estimó la frecuencia de coincidencias para cada uno de los cuatro marcadores retenidos en el estudio. Se encontró que tres de los marcadores seleccionados, Sp-M18-SH3, Sat244 y BA-124-12K-f, presentaron coincidencia completa. En otras palabras, cuando uno de estos marcadores estuvo presente en un genotipo, éste siempre mostró elevada resistencia a la roya. En el caso contrario, la reacción fue de susceptibilidad. Un hecho interesante fue que a diferencia del marcador BA-124-12K-f, los marcadores Sp-M18-SH3 y Sat244 fueron más informativos, ya que no solo discriminaron la presencia o ausencia del S_H3 , sino que además permitieron observar diferencias alélicas entre accesiones (S.288 y S.795 versus Kawisari). Por su parte, el marcador BA-48-21O-f presentó un 70,3% de coincidencias, ya que solo en 26 de los 37 genotipos, hubo correspondencia entre la presencia (o no) del marcador y la resistencia o susceptibilidad a la roya.

Curiosamente, el marcador Sp-M18-SH3 a pesar de estar genéticamente más distante del gen S_H3 que el marcador BA-48-21 (5,4 cM vs 0,6 cM, según Mahé *et al.* (13)), tuvo un mejor comportamiento como lo indican los valores de coincidencia estimados. La falta de coherencia entre la proximidad genética de estos dos marcadores, respecto al gen y su segregación en la población de estudio, parece tener su explicación en la ocurrencia de recombinaciones a nivel de la región del S_H3 . En efecto, la falta de consistencia entre la presencia del marcador BA-48-21 y la resistencia se observó particularmente al analizar los individuos derivados de diferentes cruzamientos recíprocos entre la accesión

Tabla 5. Matriz presencia-ausencia de los marcadores moleculares ligados al gen S_H3 y su respectiva reacción de resistencia a la roya, en diferentes cruzamientos entre la línea S.288 (S) y tres genotipos de *C. arabica*: S4-Agaro (S4A), Geisha (G) y Bourbón salvadoreño (B).

Código	Sp-M18- S_H3	Sat244	BA-48-210-f	BA-124-12K-f	Roya en el campo	Clasificación
BxS-1	1	1	1	1	1	Altamente resistente
BxS-2	1	1	1	1	3	Medianamente resistente
BxS-3	1	1	1	1	3	Medianamente resistente
BxS-4	1	1	1	1	4	Medianamente resistente
GxS-1	0	0	0	0	8	Muy susceptible
GxS-2	0	0	0	0	8	Muy susceptible
GxS-3	0	0	0	0	8	Muy susceptible
GxS-4	0	0	0	0	7	Medianamente susceptible
S4xS-1	1	1	0	1	0	Altamente resistente
S4xS-2	1	1	0	1	0	Altamente resistente
S4AxS-3	1	1	0	1	0	Altamente resistente
S4AxS-4	1	1	0	1	0	Altamente resistente
SxS4A-1	1	1	0	1	1	Altamente resistente
SxS4A-2	0	0	0	0	7	Medianamente susceptible
SxS4A-3	1	1	0	1	4	Medianamente resistente
SxS4A-4	0	0	0	0	8	Muy susceptible

S.288 y el genotipo S4 Agaró (Tabla 5). En consecuencia, dado que la presencia tanto de Sp-M18-SH3 como de BA-48-21 parece afectarse según el fondo genético donde se ubiquen, se prefirió descartarlos como posibles candidatos en una futura estrategia de selección asistida.

A diferencia de los demás marcadores evaluados, tanto Sat244 como BA-124-12K-f se comportaron de manera concordante respecto a su posición en el mapa genético de la región S_H3 , reportada por Mahé y colaboradores (13). Estos dos marcadores fueron desarrollados a partir de una población de 101 plantas F2 del cruce entre Matari, un genotipo altamente susceptible a la roya, y la línea S.288, portadora del gen S_H3 . De acuerdo con estos autores, los dos marcadores muestran una segregación en fase de acoplamiento, lo cual los hace más

interesantes desde el punto de vista de una futura selección asistida, ya que podrían ser mucho más informativos dada su condición de homocigocidad sobre el genotipo resistente. Adicionalmente, el hecho de encontrarse en acoplamiento, ratifica su ubicación justo en la región de introgresión portadora del gen S_H3 (13). Trabajos recientes realizados en India, indican que tanto Sat244 como BA-124-12K-f han empezado a ser utilizados con éxito en el programa de mejoramiento de ese país (17, 23). Los resultados de estos trabajos muestran que las selecciones realizadas en poblaciones derivadas del S.795 usando estos marcadores, han permitido identificar individuos con muy buenas características de resistencia a la roya y excelente vigor en el campo. Como consecuencia, actualmente se tienen plantas élite portadoras del gen S_H3 de buenas características agronómicas, las cuales se están siendo propagadas de manera clonal (17, 23).

Conclusiones y perspectivas. Con base en los resultados obtenidos se concluye que, de los diez marcadores evaluados, sólo dos (Sat244 y BA-124-12K-f) permitieron determinar en forma clara y repetible la presencia del gen S_H3 . Adicionalmente, el Sat244 distinguió posibles variaciones alélicas de este gen, tanto en la especie *C. liberica* como en materiales arábigos introgresados por ella. La presencia de estos marcadores correspondió muy bien con la reacción de resistencia a la roya, lo que sugiere que las razas compatibles con este gen de resistencia no existen o se encuentran en muy baja frecuencia, en nuestro

medio. Adicionalmente, la caracterización de diferentes accesiones de la CCC usando los marcadores seleccionados, mostró su bondad para identificar individuos “fuera de tipo” (no portadores del gen S_H3), que hacen parte de la colección y que eventualmente podrían eliminarse, contribuyendo así a su depuración.

Finalmente, dada la confiabilidad de los marcadores seleccionados en este estudio, es posible prever su utilización dentro de una estrategia de selección asistida que busque la piramidización del gen S_H3 sobre las líneas

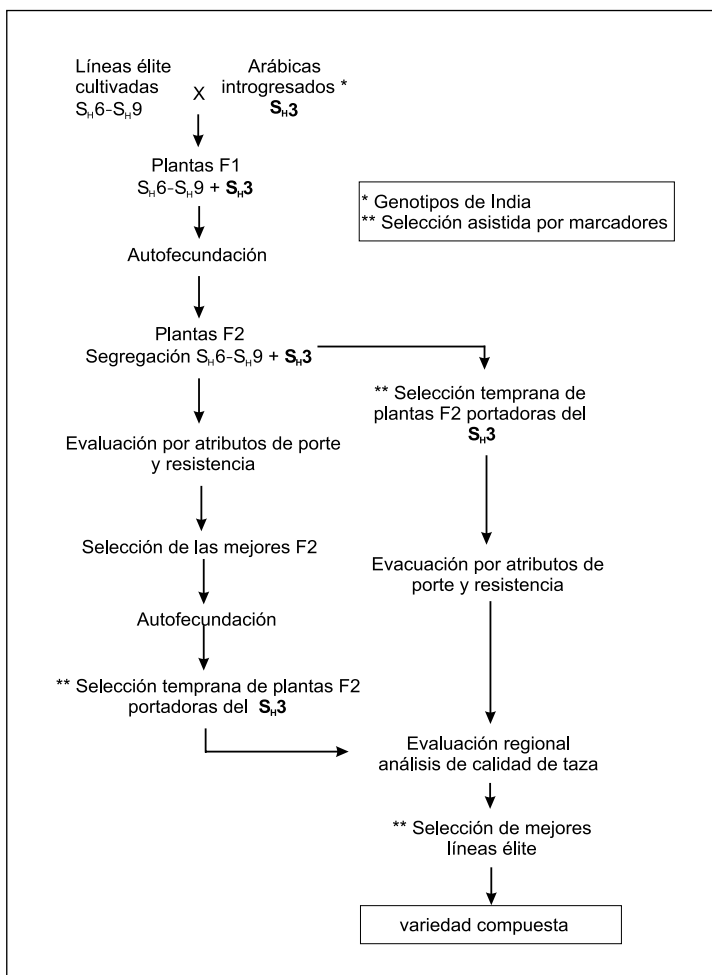


Figura 3. Posible esquema de selección asistida basada en la utilización de marcadores moleculares ligados al gen S_H3 .

actualmente cultivadas que conforman las variedades compuestas producidas por Cenicafé (Variedad Castillo® general, Variedades Castillo® Regionales y Tabi). En la Figura 3 se propone un esquema de selección basado en el cruzamiento de líneas élite con accesiones portadoras del gen S_H3 . Con esta estrategia se busca combinar los genes de resistencia derivados del híbrido de Timor (S_H6 a S_H9) con el gen de resistencia S_H3 , no explotado aun en Colombia. Así, la selección temprana de las plantas portadoras del S_H3 , con ayuda de los marcadores moleculares validados en este trabajo, permitirá identificar rápidamente plantas F2 o F3 portadoras tanto del gen S_H3 , como de otras combinaciones de genes de resistencia. Esta selección, complementada por evaluaciones de otras características agronómicas y de calidad de taza, deberá conducir a la obtención de líneas élite de elevado valor comercial.

La selección de individuos portadores de nuevos alelos S_H3 (distintos al estudiado en este trabajo) provenientes de las diferentes accesiones de *C. liberica*, es una alternativa interesante por explorar. Adicionalmente, el desarrollo progresivo de nuevos marcadores ligados a los genes derivados del Híbrido de Timor, facilitará la tarea de selección asistida. Actualmente, nuestro grupo trabaja en la identificación de tales marcadores, utilizando diferentes poblaciones desarrolladas para tal fin.

El presente trabajo constituye el primer paso hacia la incorporación de herramientas moleculares en la selección de genotipos mejorados de café en Colombia. La puesta en marcha de este tipo de estrategias, contribuirá progresivamente a agilizar los métodos de selección convencional, reduciendo costos y el tiempo de evaluación en el campo. De este modo, se busca contribuir a ampliar cada vez más la base genética de la resistencia

contra la roya, presente en las variedades cultivadas en el país, sin apartarse de la estrategia adoptada por Colombia para el desarrollo de variedades resistentes a esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al señor Luis Enrique Chanchí por su colaboración en las evaluaciones de roya en el campo, y al señor Jhon Esteban Quintero por su ayuda en la identificación y recolección de los materiales de la CCC. Este trabajo hace parte de una iniciativa financiada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, con el apoyo de la FNC.

LITERATURA CITADA

1. BERNATZKY, R.; TANKSLEY, S. Toward saturated linkage map in tomato based on isoenzymes and random cDNA sequences. *Genetics* (112): 887-898. 1986.
2. BETTENCOURT, A.J.; RODRIGUES, C.J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. 199–234 p. En: Clarke, R.J.; Macrae, R. *Coffee*. Vol. 4. London : Elsevier, 334 p. 1988.
3. COMBES, M.C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular ecology* (9):1171-1193. 2000
4. D'OLIVEIRA, B.; RODRIGUEZ, C., JR. O problema das ferrugens do cafeeiro. *Revista do café português* 8:5-50. 1961
5. ESKES, A.; TOMA, B. Assesment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk y Br). *Plant protection bulletin* 29:56-66. 1981.
6. ----- Resistance. 171-291 p. En: Kushallapa, A.C.; Eskes, A.B. *Coffee rust: Epidemiology, resistance and management*. Florida : CRC Press, 1989. 345p.

7. FEDERACAFÉ. Estadísticas cafeteras : Informe final. Bogotá : SICA, 1997. 178 p.
8. GUIMARÃES, P.; RUANE, J.; SCHERF, B.D.; SONNINO, A.; DARGIE, J.D. Marker assisted selection : Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Rome : FAO, 2007. 494 p.
9. HOSPITAL, F. Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica*. 136(2):303-310. 2009
10. KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology advances* 17(1999):143-182. 1999.
11. KUSHALAPPA, A.C.; ESKES, A.B. Advances in coffee rust research. *Annual review phytopathology* (27):503-531. 1989
12. LASHERMES, P.; AGWANDA, C.O.; ANTHONY, F.; COMBES, M.; TROUSLOT, P.; CHARRIER, A. Molecular marker-assisted selection: A powerful approach for coffee improvement. pp. 474-480. En: COLLOQUE Scientifique international sur le café (17 : fecha año : Nairobi). Paris : ASIC. 1997.
13. MAHÉ, L.; COMBES, M.C.; VÁRZEA, V.; 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):105-113. 2008
14. MORENO, G.; ALVARADO, G. La variedad Colombia: Veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del café. Chinchiná : Cenicafe, 2000. 32 p. (Boletín Técnico No. 22).
15. NARAYANAN, B.T. Sixth and seventh annual reports of the Research department of the Indian coffee board (1952-53, 1953-54). Karnataka : Coffee Board, 91 p. 1954.
16. PRAKASH, N.S.; GANESH, D.; BHAT, S.S. Population dynamics of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br) and recent advances in rust research in India. 411-442 p. En: Zambolim, E.M.; Varzea, V.M.P. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa : Universidad Federal de Viçosa. 2005. 450 p.
17. PRAKASH, N.S.; SUNDARESHA; ROOHE, K.; MUNISWAMY, B.; REDDY, K.B.; BHAT, S.S.; SREENATH, H.L.; SANTARAM, A.; SRINIVASAN, C.S.; RAMAMURTHY, N.; JAYARAMA. Recent leads in breeding and field strategies adopted for achieving durable rust resistance in coffee (*Coffea arabica*) in India. in: 22nd International Conference on Coffee Science. Campinas (Brazil). 2008.
18. RIVILLAS, C.A.; GIL, L.F.; DUQUE, H. Recomendaciones para el manejo de la roya del café en Colombia. Chinchiná : Cenicafe, 2005. 35 p. (Boletín Técnico No. 19).
19. RODRIGUES, C.J.; RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual review phytopathology* 13:49-70. 1975.
20. SERVIN, B.; MARTIN, O.; MEZARD, M.; HOSPITAL, F. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. *Genetics* 168:513-523. 2004.
21. 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. *Plant physiology* 18(1):119-147, 2006.
22. SRINIVASAN, K.; NARASIMHASWAMY, R. A review of coffee breeding work done at the government coffee experiment station, Balehonnur. *Indian coffee* 34:311-321. 1975.
23. SUNDARESHA, M.H.; MUNISWAMY, B.; HANUMANTHA, B.T.; PRAKASH, N.S.; SREENATH, H.L.; BHAT, S.S.; PRAKASAN, C.B.; JAYARAMA; LASHERMES, P. Marker assisted selection in coffee (*Coffea arabica* L.). En: SOLANACEAE Genome workshop. (6 : fecha de realización 2009 : New Delhi).
24. VAN DER VOSSSEN, H. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as Coffee Leaf Rust. 1-30 p. En: Zambolim, L.; Zambolim, E.; Várzea, V. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa : Universidade federal de Viosa , 2005. 450p.
25. VARSHNEY, A.; MOHAPATRA, T.; SHARMA, R.P. Molecular mapping and marker assisted selection of traits for crop improvement. En: Srivastava, P.S.; Narula, A.; Srivastava, S. *Plant biotechnology and molecular markers*. New Delhi, 2004.

26. VÁRZEA, V.; MARQUES, D. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance. in: Durable resistance to coffee leaf rust. vol. Z.E. Zambolim L, Várzea VMP Editor. Universidade Federal de Viçosa.: Viçosa, Brasil. p. 53-74. 2005.
27. -----. International survey of coffee leaf pathotypes. Evolution of virulence in *H. vastatrix* detected in resistant coffee varieties. vol. Proceedings of the 20th International Conference on Coffee Science (ASIC): Bangalore, India. 2004.
28. VISHVESHWARA, S. Periodicity of *Hemileia* in arabica selection - S.795. Indian coffee. 38:49-51. 1974.
29. WAGNER, M.; BETTENCOURT, A.J. Inheritance of reaction to *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in *Coffea arabica* L. En: Progress report. Oeiras : Coffee Rusts Research Center, 1965.