UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de fin de carrera titulado:

"CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE VARIEDADES DE CAFÉ PRESENTES EN EL SUR DE ECUADOR MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES"

Realizado por:

SARA PAULINA TELENCHANA RAMÓN

Director del proyecto:

PhD. José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 30 de septiembre de 2022.

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, SARA PAULINA TELENCHANA RAMÓN, con cédula de identidad N° 180544875, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

FIRMA

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE VARIEDADES DE CAFÉ PRESENTES EN EL SUR DE ECUADOR MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES”

Realizado por:

SARA PAULINA TELENCHANA RAMÓN

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor.

FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

JOHANNA MEDRANO BARBOZA

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral

ante el tribunal examinador

FIRMA

FIRMA

Quito, 30 de septiembre de 2022.

DEDICATORIA

A Dios, por bendecirme con salud y fortaleza, y nunca abandonarme en el trayecto de mi vida.

A mis padres, por ofrecerme su amor, paciencia, sacrificio y apoyo incondicional, por todos sus consejos y palabras de aliento que me han ayudado a ser la persona que soy ahora, a ellos, mi amor infinito, respeto y gratitud por siempre.

A mis hermanas Ali, Dani y Viki, que por medio de su alegría y apoyo me motivan a seguir adelante.

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

Identificación genética de variedades de café presentes en Rapa Nui y su comparación con variedades descritas mundialmente

Y con el financiamiento de

Universidad Internacional SEK Ecuador

Proyecto N° P102020

Artículo de tesis

Caracterización genotípica de variedades de café presentes en el sur de Ecuador mediante marcadores microsatélites.

Sara Telenchana Ramón[1], José Rubén Ramírez Iglesias[2].

[1] Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas; stelenchana.amb@uisek.edu.ec
[2] Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud; jose.ramirez@uisek.edu.ec

Resumen

El café es uno de los productos agrícolas de gran importancia comercial, el cual es cultivado en más de 70 países de Asia, África y América. Existen más de 130 especies del género *Coffea* pero tres son cultivadas comercialmente, *Coffea arabica*, *Coffea Canephora* y *Coffea liberica.* Con los años, se han desarrollado variedades que portan características agronómicas variadas, pero en la mayoría de los casos se desconoce su identificación y/o caracterización genotípica. En Ecuador, el conocimiento de la organización genética y la relación existente entre las variedades de *C. arabica* es muy escaso. Peor aún se han encontrado investigaciones que involucran técnicas de genotipificación con microsatélites. Por lo mismo, en este estudio se caracterizó genotípicamente variedades de café del sur de Ecuador, utilizando marcadores moleculares de tipo microsatélite para el estudio de la variación genética. Se realizó extracción y purificación de ADN genómico de hojas de las variedades Catucaí rojo, Catucaí amarillo, Obatá y Colombia 6. Se determinó el tamaño de alelos amplificados con los cuales se realizó un dendograma, un análisis ANOSIM de una vía y se se calcularon parámetros básicos de diversidad genética. Se observó que los marcadores microsatélites amplificaron en la mayoría de las variedades, pero presentan un bajo nivel de polimorfismo (PIC=1,8) debido a que amplificaron un máximo de dos alelos. Se obtuvo como resultado que las cuatro variedades analizadas son variedades pertenecientes a la especie *Coffea arábica.* Sin embargo, no fue posible identificar variación genética entre ellas debido a la presencia de alelos homogéneos en todos los casos.

***Palabras clave*:** SSR, PIC, alelos, polimorfismo, variación genética, diversidad.

Abstract:

Coffee is one of the agricultural products of great commercial importance, which is cultivated in more than 70 countries in Asia, Africa and America. There are more than 130 species of the Coffea genus but three are commercially cultivated, *Coffea arabica, Coffea canephora and Coffea liberica*. Over the years, varieties have been developed that have varied agronomic characteristics, but in most cases their identification and/or genotypic characterization is unknown. In Ecuador, knowledge of the genetic organization and relationship between *C. arabica* varieties is very scarce. Even worse, research involving microsatellite genotyping techniques has been found. Therefore, in this study, coffee varieties from southern Ecuador were genotypically characterized using microsatellite-type molecular markers for the study of genetic variation. Genomic DNA was extracted and purified from leaves of the varieties Red Catucai, Yellow Catucai, Obata and Colombia 6. The size of amplified alleles was determined and used to perform a dendogram, a one-way ANOSIM analysis and basic parameters of genetic diversity were calculated. The microsatellite markers amplified in most of the varieties but showed a low level of polymorphism (PIC=1.8) because they amplified a maximum of two alleles. The four varieties analyzed are varieties belonging to the *Coffea arabica* species. However, it wasn't possible to identify genetic variation among them due to the presence of homogeneous alleles in all cases.

***Keywords*:** SSR, PIC, alleles, polymorphism, genetic variation, diversity.

1. Introducción

El café es uno de los productos agrícolas con mayor importancia en el comercio internacional global, por lo cual es muy común su producción en distintas regiones del mundo. En América Latina, se considera al café como el producto de exportación más valioso (Robles, 2015) ya que la industria cafetera latinoamericana abarca el 61% de la producción global (Statista Research Department, 2022). Hasta el pasado año, 2021, según el reporte de la Organización Internacional del Café, Brasil se posicionó como el líder del mundo en la producción de café, seguido por Vietnam, Indonesia y Colombia. Ecuador está dentro de los veinte principales productores de café a nivel mundial y es el décimo en América Latina (International Coffee Organization, 2022).

Actualmente, el café se cultiva en más de 70 países de Asia, África y América. Los cafetos pertenecen a la familia *Rubiaceae* y al género *Coffea*. Si bien es cierto, existen más de 130 especies del género *Coffea* (Davis et al., 2006; Davis, 201; Missio et al., 2010), solo tres son cultivadas comercialmente como son *Coffea arabica, Coffea Canephora* y *Coffea liberica Bull*. Casi todas las especies de café, incluido *C. canephora* son diploide (2n = 2x = 22) y principalmente autoincompatible (alógamo) (Mishra & Slater, 2012) en comparación de *C. arabica* que es una especie alotetraploide natural (2n = 4x = 44) autofértil (Charrier et al., 1985); Akpertey et al., 2021). De las especies mencionadas, *C. arabica* es la especie con mayor importancia dentro del comercio en la actualidad (Figueroa Hernandéz et al., 2009), ya que

representa alrededor del 65% de la producción de café a nivel mundial (Lécolier et al., 2009). Esto es debido a que se trata de un café de alta calidad (Anthony et al., 2002; Tornincasa et al., 2010) posee características aromáticas y bajo contenido de cafeína (Mishra & Slater, 2012; DaMatta et al., 2007).

Las variedades tradicionales de arábica que se encuentran presentes en Ecuador provienen de semillas originarias de Etiopía (COVECA, 2010), estas son Típica y Bourbon. Tras el paso de los años, debido a las mutaciones naturales y, en la mayoría de los casos, a los cruzamientos espontáneos e inducidos con el fin de un mejoramiento varietal, se han originado nuevas variedades tales como Caturra, Catucaí, Mundo Novo, Villa Sarchí, Maragogipe, y muchas otras (Velásquez, 2019) que portan características agronómicas variadas en cuanto al tamaño de planta, producción, sabor del café, mayor rendimiento y resistencia a plagas, enfermedades o estrés abiótico (Mishra & Slater, 2012). Es así, que la variedad del cafeto se vuelve importante en cualquier sistema de producción, pues dependiendo del genotipo y su adaptación al ambiente depende la cantidad y la calidad de frutos a cosechar (Hein & Gatzweiler, 2006; Kathurima et al., 2009).

Hasta ahora, la denominación varietal se la ha hecho basándose en las características fenotípicas de las plantas, por lo que muchas veces se tiene una idea equívoca de la identificación y/o caracterización de estas. Como consecuencia, no es posible discriminar entre los genotipos de café presentes en el mercado actual ya que se desconoce su procedencia,

generando problemas en el cultivo de semilla a campo abierto y su correcta clasificación en bancos de germoplasma. Por lo mismo es necesario realizar estudios enfocados en la recolección de información que esté relacionada con la organización y distribución de la diversidad genética del café para obtener una adecuada caracterización varietal. Esta identificación genotípica proporcionará bases que facilitarán a futuro el proceso de mejoramiento de la calidad de variedades de plantas productoras para satisfacer las necesidades específicas de los agricultores y consumidores. Asimismo, personas dedicadas al mejoramiento pueden beneficiarse ya que podrán proteger sus derechos al generar nuevas variedades. En este sentido, los marcadores moleculares basados en el ADN han mostrado ser una herramienta exitosa y precisa para estudiar la diversidad genética, no solo en *Coffea*, sino también, en muchas especies de plantas (Sánchez, 2017). Sin embargo, los estudios y análisis que están relacionados a la diversidad genética con marcadores moleculares representan un muestreo relativamente pequeño centrados principalmente en *C. arabica* y *C. canephora* y sus parientes cercanos propuestos (Kochko et al. ,2010; Plechakova et al., 2009). Las técnicas generalmente utilizadas se basan en aloenzimas, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) y SSR (Simple Sequence Repeats).

Los SSRs o también denominados microsatélites (Azofeita, 2006) son secuencias de ADN caracterizadas por repeticiones cortas de nucleótidos (generalmente de 1 a 4 pares de

bases) dispuestas en tándem. Se han encontrado dispersos en el genoma de todas las especies eucariotas analizadas hasta la fecha y generalmente se presentan en el ADN no codificante (NIH, 2022). Asimismo, los microsatélites son marcadores que incluyen la herencia codominante (Ben-Ari & Lavi, 2012) y, en comparación con otros marcadores moleculares, presentan un alto nivel de polimorfismo (Litt & Luty, 1989), lo que resulta muy conveniente para medir las variaciones entre especies estrechamente relacionadas (Zietkiewicz et al. 1994) de tal manera que ayuda a la generación de huellas genéticas (Gebhardt, 2007) estableciendo así patrones específicos del individuo o planta (Henry, 1997).

Litt y Luty (1989) y Edwards et al., (1991) desarrollaron técnicas basadas en SSR aplicadas a humanos y un año después, estos fueron aplicados por primera vez a las plantas por Akkaya et al., (1992) con el fin de determinar la presencia y el grado de polimorfismo de longitud de ADN de SSR en la soja (*Glycine max (L.) Merr*). Desde entonces, muchos estudios han aplicado los microsatélites con distintas finalidades y con esto, cada vez se han ido desarrollando nuevas tecnologías adecuadas para aplicaciones de alto rendimiento. Los SSRs se amplifican por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gebhardt, 2007), por lo que desde el desarrollo de esta técnica se ha mejorado considerablemente la obtención de huellas genéticas e información sobre la diversidad genética dentro de las poblaciones (Adato et al., 1995; Nevo, 2001). Para lograr la amplificación de los microsatélites, es necesario conocer las secuencias de las regiones únicas de ADN que los flanquean, de modo que se pueda

diseñar los cebadores específicos. Luego, mediante electroforesis se separan por tamaño los productos de amplificación y se visualizan por tinción de plata o tintes fluorescentes (Picó & Esteras, 2012). Actualmente, dado que la secuenciación de ADN se convirtió en una herramienta universal para la genética molecular (Gebhardt, 2007), se emplean secuenciadores automáticos que permiten separar los productos de acuerdo a su tamaño por medio de electroforesis capilar y, a la vez, detectar fluorescencia. Así, se puede determinar los polimorfismos de longitud basándose en la variación alélica del número de motivos repetidos (Lowe et al., 2004) en el microsatélite, lo cual permite identificar genotipos y conocer la similitud entre los individuos y las poblaciones (Becerra V. & Paredes C., 2000). Dicho esto, como hipótesis de investigación se plantea que la aplicación de procesos de genotipificación basados en marcadores moleculares como los SSRs permiten la identificación de cafetos.

Hasta ahora, en Ecuador el conocimiento de la organización genética y la relación existente entre el material disponible de *C. arabica* es muy escaso. Peor aún se han encontrado investigaciones que involucran técnicas de genotipificación con microsatélites. Por lo mismo, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar genotípicamente variedades de café del sur de Ecuador, utilizando marcadores moleculares de tipo microsatélite para el estudio de la variación genética.

2. Materiales y Métodos

Sitio de Estudio

Las muestras utilizadas para el presente estudio fueron facilitadas por dos productores de café de la zona sur de Ecuador. Se obtuvieron muestras de cuatro variedades diferentes (según la información suministrada por los caficultores), tres de ellas (variedad Catucaí rojo, Catucaí amarillo y Obatá) pertenecen a la Parroquia San Isidro del cantón Macas (provincia Morona Santiago) y una (híbrido Colombia 6) de la Parroquia San Pedro de Vilcabamba del cantón Loja (provincia Loja). De las cuatro variedades, los caficultores proporcionaron entre 5 a 6 hojas jóvenes de buen aspecto y estado fitosanitario (Anexo A). Las muestras fueron transportadas hasta el Laboratorio de Investigación de la Universidad Internacional SEK, en donde fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

Método

Extracción y cuantificación de ADN

El tejido vegetal de las cuatro variedades fue molido por separado bajo nitrógeno líquido, utilizando un mortero esterilizado y una maja, hasta obtener 20 gramos de un polvo fino de cada una. Posteriormente, la extracción y purificación del material genético del polvo fino se realizó empleando el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (50) de QIAGEN siguiendo

el protocolo “Purification of Total DNA from Plant Tissue (Mini Protocol)” establecido por el fabricante, hasta obtener ADN purificado en un volumen total de 100 uL y 50 uL.

Para cuantificar el ADN de las cuatro muestras se utilizó el Kit de ensayo Qubit ™ 1X dsDNA HS (Invitrogen) y se midió fluorescencia en el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen) (Anexo B). Luego, el ADN de cada muestra se diluyó a 10 ng/ul en un volumen de 30 µL para su uso posterior.

Selección de marcadores microsatélites para genotipificación

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de cebadores específicos para regiones microsatélites dentro de la especie *Coffea arabica* previamente identificados por otros autores. Dentro de la búsqueda se destacó la investigación hecha por Combes et al., (2000) debido a que presentaba loci de microsatélites con un alto grado de polimorfismo que resultan útiles para investigar los niveles de variación genética, además de contar con información referente a los mismos que sirven de guía para el presente estudio. Por lo tanto, se seleccionaron cinco SSR de *C. arabica* para genotipificar las cuatro variedades de café. Las características de cada uno de ellos están descritas en la Tabla 1.

Todos los cebadores fueron sintetizados por Macrogen y las temperaturas de hibridación de cada set de cebadores se calculó en el servidor web New England Biolabs

(https://tmcalculator.neb.com/#!/main) fijando condiciones para una DNA Polimerasa de alta fidelidad.

Tabla 1. Resumen de marcadores microsatélites SSR del género *Coffea arabica* descrito por Combes et al., (2000).

Locus	**EMBL No. acceso**	**Motivo de microsatélite**	**Secuencia de cebador de PCR (5′ → 3′)**	**Temperatura de Hibridación**	**Tamaño del producto (bp)**
M20	AJ250253	$(GA)_5(GT)_8TT(GT)_4TT(GT)_7$ $(GA)_{11}(TC)_2(CT)_3GT$	F: CTTGTTTGAGTCTGTCGCTG R: TTTCCCTCCCAATGTCTGTA	51 °C	240–270
M24	AJ250254	$(CA)_{15}$ $(CG)_4CA$	F: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC	48 °C	132–166
M25	AJ250255	$(GT)_5CT(GT)_2/(GT)_{12}$	F: CCCTCCCTGCCAGAAGAAGC R: AACCACCGTCCTTTTCCTCG	56 °C	160–170
M29	AJ250257	$(CTCACA)_4/(CA)_9$	F: GACCATTACATTTCACACAC R: GCATTTTGTTGCACACTGTA	47 °C	103–122
M32	AJ250258	$(CA)_3/(CA)_3/(CA)_{18}$	F: AACTCTCCATTCCCGCATTC R: CTGGGTTTTCTGTGTTCTCG	52 °C	89–135

F: *Forward*. R: *Reverse.*

Análisis de microsatélites

Las regiones microsatélites se amplificaron por PCR en un volumen de reacción de 25 uL que contenían 0,2X de 5X MegaFi ™ Buffer, 0,5 U de MegaFi ™ DNA Polimerasa (5 U/ul), 0,04 mM de dNTPs MIX-10mM, 0,3 pmol de cada cebador y 10 nm de ADN genómico. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MiniAmp Plus Thermal Cyclers (Thermo Fisher Scientific), el cual estaba programado para un paso a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 90 °C por 45 s, 1 min a la temperatura de hibridación determinada para cada par de cebadores (Tabla 1) y 72 °C por 30 s) y una extensión final a 72 °C durante 4 min.

Dado el avance en tecnologías que permiten la secuenciación de ADN y la determinación del tamaño exacto de fragmentos, se decidió llevar a cabo un marcaje fluorescente a los productos amplificados. A diferencia de las metodologías tradicionales, las nuevas tecnologías requieren que los fragmentos sean marcados con fluoróforos (FAM, HEX, ROX, TAMRA) (Blacket et al., 2012) antes del análisis. Luego, un equipo sofisticado se encarga de separar las regiones microsatélites amplificadas por tamaño mediante electroforesis capilar (Magaña et al., 2009) y poco antes de llegar al electrodo positivo, los fragmentos unidos a los fluoróforos se mueven a través de un rayo láser con lo que se emite una señal de fluorescencia (Applied Biosystems®, 2014; Kostal et al., 2008) que es captada, transformada en datos digitales y almacenada en un formato de archivo el cual es compatible con software o

programas de análisis como GeneMapper o PeakScanner. En este sentido, para el marcaje fluorescente de los productos amplificados (Figura 1) del presente estudio, se llevó a cabo una PCR adicional utilizando el cebador M13 (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3') el cual es complementario al extremo 5' del cebador *forward* específico de cada locus (Schuelke, 2000). Las etiquetas de fluorescencia utilizadas son FAM (azul) y HEX (verde). El volumen total de reacción de PCR fue de 25 uL y el contenido de la mezcla de reacción es la misma que se menciona anteriormente, pero, se usó el cebador M13 en lugar del cebador *forward* específico de locus. Las condiciones de temperatura son muy similares (descritas en la Tabla 2) por lo que se utilizó el mismo programa de ciclado con la diferencia que la etapa de desnaturalización se redujo a 10 ciclos.

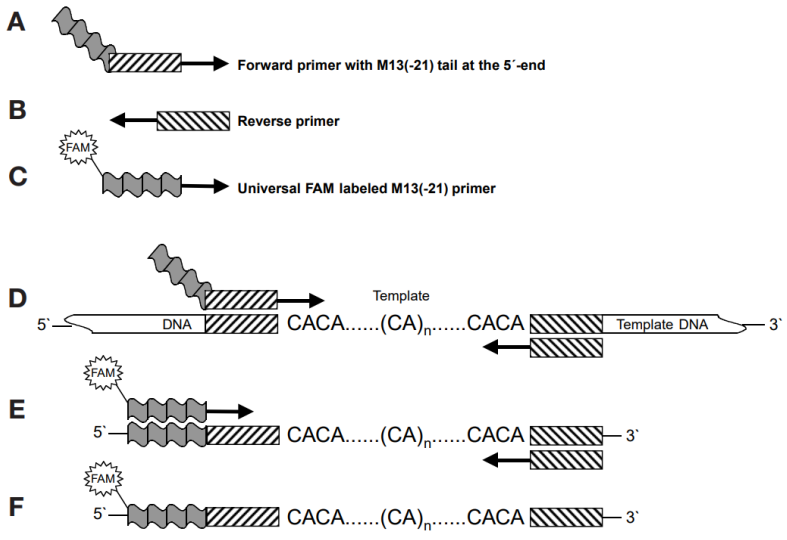


Figura 1. Esquema del proceso de unión del marcador universal M13 a los productos de PCR. (A) cebador *forward* específico de locus modificado con una cola de secuencia de cebador universal en el extremo 5'. (B) cebador *reverse* específico de locus. (C) cebador universal M13 con etiqueta fluorescente FAM. (D) Incorporación de cebador *forward* a los productos de PCR. (E) Unión del marcador M13. (F) Fragmentos con etiqueta fluorescente listos para análisis mediante un sistema de detección láser. Figura tomada de Nature Biotechnology 18: 233-234 (2000).

Tabla 2. Temperatura de hibridación y etiqueta fluorescente utilizada para la amplificación y marcaje de las regiones microsatélites

Locus	Tm* para cebadores específicos de locus	Tm* para cebador M13	Etiqueta fluorescente
M20	55 °C	56 °C	FAM
M24	55 °C	56 °C	HEX
M25	65 °C	65 °C	FAM
M29	58 °C	58 °C	HEX
M32	64 °C	64 °C	HEX

*Temperatura de hibridación

Para confirmar la amplificación y marcaje fluorescente, los productos de PCR se separaron por tamaño en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con Safe View ™ Classic (Applied Biological Materials) en una cámara de electroforesis horizontal a 100 V durante 1 hora en tampón 1X TAE. La escalera de peso molecular utilizada fue Tracklt ™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Luego, los productos se visualizaron en un transiluminador UV (Anexo C).

Análisis Bioinformático

Los amplicones marcados con fluorescencia se enviaron a Macrogen para su análisis mediante el servicio de GeneScan. Luego, los datos de salida (archivos .fsa) fueron revisados en el programa Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). Así, se visualizaron los electroferogramas con los datos crudos y/o analizados y las respectivas leyendas de tinte

utilizados para las diferentes muestras de café (Anexo D). Se determinó el tamaño del alelo generado en la amplificación por PCR teniendo en cuenta el valor del pico más alto de Unidades relativas de fluorescencia (RFU). Tras analizar los alelos en cada microsatélite, se procedió a tabular los datos y, luego, se generó una matriz de presencia/ausencia de los microsatélites en las cuatro variedades de café, considerando 1 cuando el alelo estaba presente en la variedad estudiada y 0 cuando el alelo estaba ausente. Posteriormente, esta matriz fue introducida en el software analizador de datos PAST 4.03 en donde se representó mediante un dendograma la relación genética entre las cuatro variedades estudiadas. Se tomó en cuenta un índice de similitud Euclidiano y un algoritmo de grupo emparejado (UPGMA). También, se realizó un análisis de similaridad (ANOSIM) de una vía para determinar las diferencias estadísticas entre las variedades, en donde se ha fijado como hipótesis nula (Ho_1) que no existe diferencias significativas entre las variedades estudiadas.

Finalmente, se calcularon parámetros básicos de diversidad genética como el índice de contenido polimórfico (PIC), número de alelos, heterocigocidad esperada, entre otros, para estimar el grado de polimorfismo de cada loci, a través del programa informático CERVUS 3.0® (Marshall et al., 1998; Slate et al., 2000; Kalinowski et al., 2007) que permite ejecutar análisis de marcadores genéticos como microsatélites.

3. Resultados

Tras determinar los alelos presentes en las variedades Catucaí rojo, Catucaí amarillo, Obatá y Colombia 6 en los distintos loci (Anexo E), según lo observado en los perfiles de electroferogramas en el programa Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems), se determina que los SSRs para *Coffea arabica* utilizados en el estudio (M20, M24, M25, M29 y M32) amplificaron en la mayoría de las variedades de café. Sin embargo, la variedad Obatá no presentó amplificación en tres casos, con los marcadores M20, M24 y M32.

La mayoría de los marcadores empleados generaron dos alelos, a excepción del marcador M24 que presentó únicamente un alelo en 181 pb en todas las variedades. Los marcadores M20, M25, M29 y M32 produjeron dos únicos productos amplificados homogéneos en todas las variedades analizadas, es decir, no mostraron variabilidad, por lo que se consideraron a los marcadores como monomórficos para las variedades biológicas ecuatorianas aquí usadas.

La Figura 2 muestra un ejemplo de los electroferogramas obtenidos para el marcador M32 en las cuatro variedades estudiadas. El marcador utilizado no permite diferenciar las variedades debido a que no existe polimorfismo entre ellas. Por tanto, en la mayoría de los casos, se observa un alelo en 118 pb y otro en 143 pb. Sin embargo, se distingue el electroferograma C de los demás porque denota que no hubo amplificación del locus M32 en la variedad Obatá.

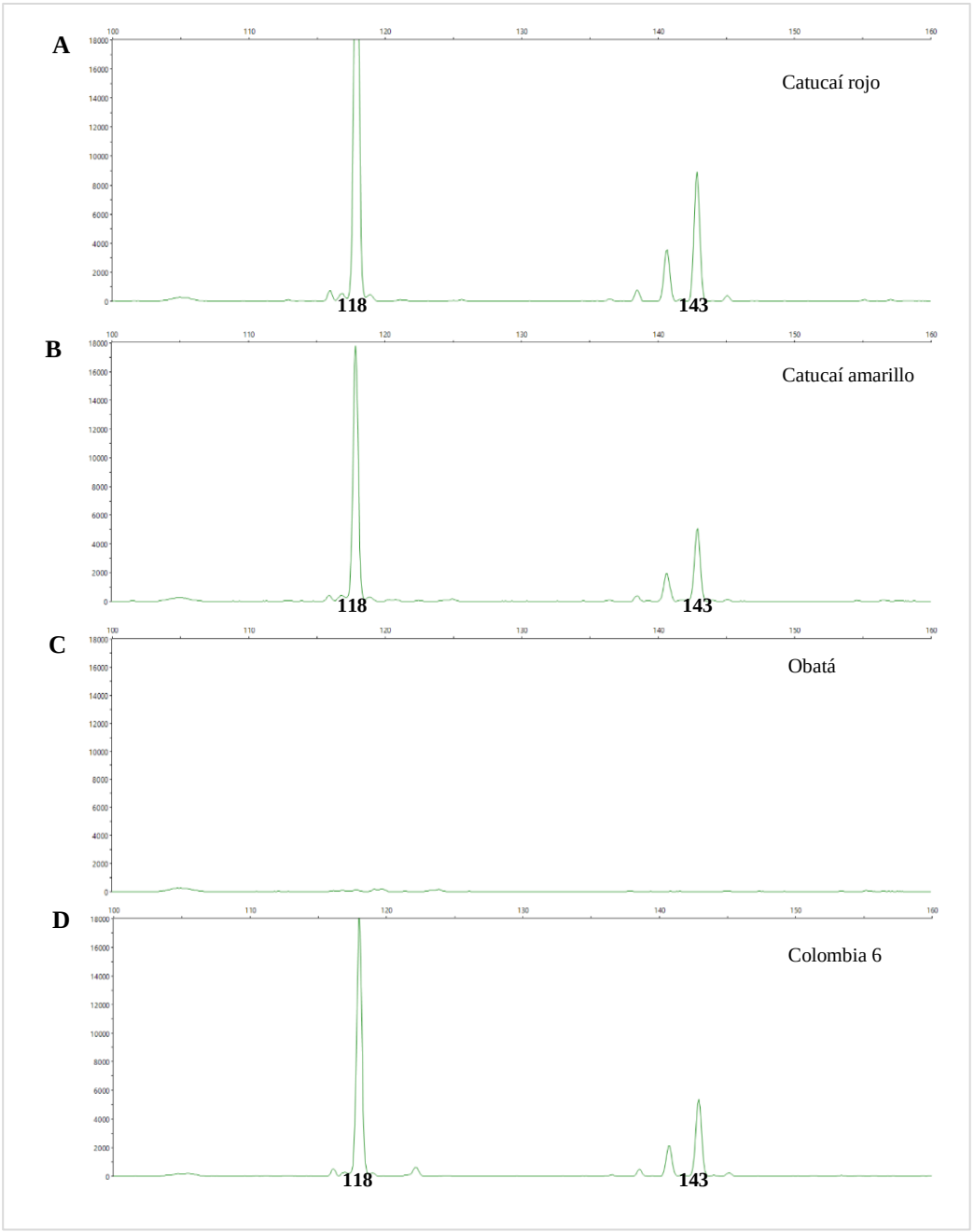


Figura 2. Electroferogramas con perfiles de amplificación del SRR locus M32 en distintas variedades de *Coffea*. SSR M32 posee etiqueta fluorescente HEX. Se distinguen variedades heterocigotas ya que muestra dos alelos, en 118 pb y 143 pb. En Obatá (C) no existe un perfil de amplificación. Muestras A, B y C proceden de Macas; D procede de Loja. El electroferograma presenta en el eje *x* el tamaño de los alelos y en el eje *y* las unidades relativas de fluorescencia (RFU).

La matriz de presencia/ausencia de los microsatélites en las cuatro variedades de café estudiadas (Tabla 3) se basa en los resultados de los perfiles de amplificación en los electroferogramas, por lo tanto, se vuelve a coincidir en que no hubo amplificación de los SSR´s M20, M24 y M32 en la variedad Obatá. Para informar la presencia o ausencia de amplificación, se sustituyó 1 por + y 0 por -.

Tabla 3. Amplificación de regiones microsatélites utilizando cebadores diseñados para *Coffea arabica*.

Variedad	**M20**	**M24**	**M25**	**M29**	**M32**
Catucaí rojo	+	+	+	+	+
Catucaí amarillo	+	+	+	+	+
Obatá	-	-	+	+	-
Colombia 6	+	+	+	+	+

(+): existe amplificación de región microsatélite.
(-): ausencia de amplificación de región microsatélite

La matriz generada facilitó la construcción de un dendograma, representado en la Figura 3, en donde se observa la relación genética existente entre las cuatro variedades estudiadas. Se constata que se forman dos clústers. Uno de ellos abarca la mayoría de las variedades, encontrándose muy relacionadas Catucaí rojo, Catucaí amarillo y Colombia 6. En un clúster separado se posiciona Obatá. Se observa además una distancia entre los clústers de 525, demostrando una disimilaridad de Obatá con respecto a las demás variedades.

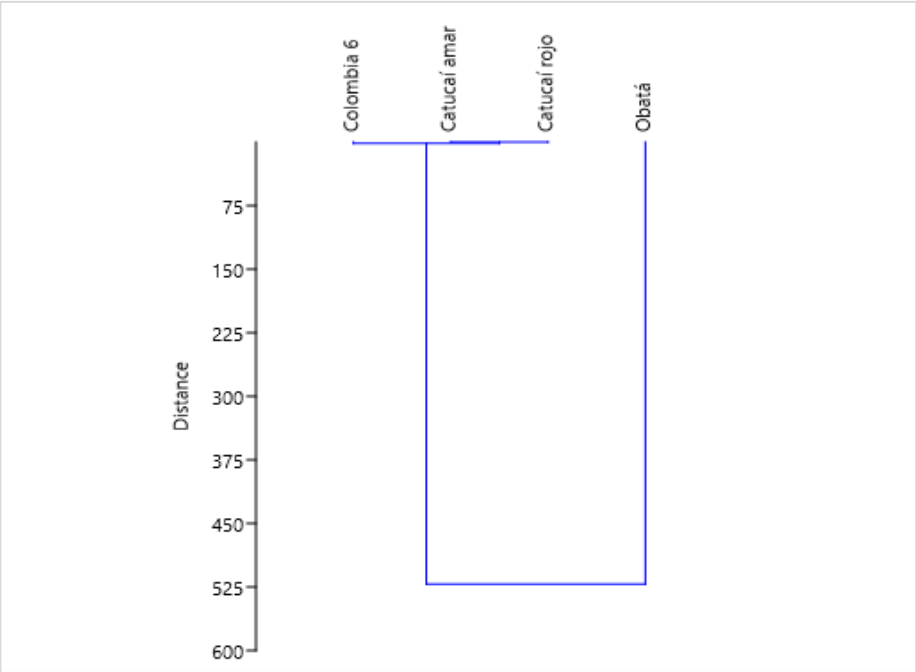


Figura 3. Dendograma basado en la presencia de cinco SSR's en cuatro variedades de *Coffea*. Dendograma clásico generado en el software PAST 4.03 teniendo como criterio el índice de similitud Euclidiano y el algoritmo de grupo emparejado (UPGMA).

El análisis de similaridad (ANOSIM) de una vía señala que la hipótesis nula se rechaza debido a que se reflejan diferencias significativas entre las variedades estudiadas ya que el análisis calcula un nivel de significancia (*p)* de 0,0287 ($p<0,05$; 9999 permutaciones).

Por otra parte, los parámetros estadísticos de diversidad genética para los cinco SSRs calculados en el programa CERVUS 3.0® se muestran en la Tabla 4. Según los resultados obtenidos, los marcadores SSRs empleados en el presente estudio no muestran una variabilidad considerable ya que la mayoría de ellos generan dos alelos. Por tanto, el número medio es de 1,800 alelos por locus. La estimación de heterocigosis muestra que existe alta heterocigocidad observada (H_{obs}), alcanzando un promedio de 0,8. Asimismo, se observa que la heterocigocidad esperada (H_{exp}) tiene un valor promedio de 0,4686. En cuanto al índice de contenido

polimórfico (PIC), el análisis indica que se encuentra en un rango entre 0 en el marcador M24 a 0,375 en los marcadores M20, M25, M29 y M32, lo cual da como promedio global 0,300. Dicho valor, demuestra que los loci analizados no son altamente informativos.

Tabla 4. Resultados obtenidos en el programa Cervus ®.

Locus	k	N	H_{obs}	H_{exp}	PIC
M20	2	3	1,000	0,600	0,375
M24	1	4	0,000	0,000	0,000
M25	2	4	1,000	0,571	0,375
M29	2	4	1,000	0,571	0,375
M32	2	3	1,000	0,600	0,375
Promedio	1,8	3,6	0,800	0,4684	0,3000

k: número de alelos. N: número de individuos. H_{obs}: heterocigosidad observada. H_{exp}: heterocigosidad esperada. PIC: contenido de información polimórfica.

4. Discusión

Los SSRs desarrollados hasta la fecha para el género *Coffea arábica* abarcan un número muy reducido (Ferrao et al., 2015; Missio et al., 2011) debido a la poca abundancia de regiones microsatélites dentro de su genoma a comparación de otras especies también de interés comercial (Sánchez, 2017). Sin embargo, gracias a estudios e investigaciones realizadas por Combes et al., (2000), Aggarwal et al., (2007), Hendre et al., (2008), Razafinarivo et al., (2013) y otros, se tiene bases suficientes para llevar a cabo la genotipificación de variedades de café empleando marcadores moleculares de tipo microsatélite, ya que estos permiten establecer

diferencias (polimorfismos) entre dos individuos diferentes (genotipos) pertenecientes a la misma especie (o a especies emparentadas) (Martínez, 2010).

Para uso de este estudio, se utilizaron cinco SSRs descritos en el trabajo realizado por Combes et al., (2000) ya que son marcadores que permiten la discriminación de genotipos de *Coffea arabica* y especies de café relacionadas. Todos los marcadores amplificaron en la mayoría de las variedades estudiadas en este caso, lo que sugiere que todas ellas pertenecen a la especie *Coffea arabica*.

En general, se observó la presencia de alelos homogéneos en las cuatro variedades, demostrando que los cinco loci no son polimórficos. Según lo descrito por Londoño et al., (2011), se considera a un marcador como polimórfico cuando identifica más de dos alelos por locus. Al encontrar únicamente uno o dos alelos iguales en las cuatro variedades analizadas, es imposible discriminar un individuo del otro. Esto puede ser debido a que las variedades de *Coffea arabica* poseen una base genética similar (López et al., 2016) a causa de la forma de reproducción (Hendre et al., 2008) y cruzamientos inducidos por el humano para el mejoramiento varietal (Velásquez, 2019; Mishra & Slater, 2012). Asimismo, se puede pensar que se trata de la misma variedad pero que equívocamente han sido consideradas como diferentes. Sin embargo, esta idea se debe probar empleando un mayor número de marcadores SSR o a través de otras técnicas que estén basadas en marcadores moleculares (Picca et al,. 2004; Rallo et al,. 2002) distintos a los SSRs.

Si se considera el tamaño de los alelos obtenido, se evidencia que estos difieren del tamaño registrado por Combes et al., (2000), Missio et al., (2010), Poncet et al., (2004) y Anthony et al., (2002). La razón puede estar relacionada a que todos ellos determinaron los

alelos mediante la visualización en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. La técnica es muy útil para separar fragmentos por su tamaño, pero posee un bajo poder de resolución y reproducibilidad (Fierro, 2014; Sánchez, 2017), lo cual significa que no se obtiene con precisión el tamaño del producto amplificado y por ende, confiere baja confiabilidad al análisis. Debido a este problema, Aggarwal et al., (2007), Hendre et al., (2008) y en el presente estudio implementan metodologías que involucran a analizadores automatizados de ADN con el fin de obtener una alta sensibilidad y mayor validez de resultados. Es importante recalcar que, además de determinar los alelos, es posible detectar polimorfismos (Wang et al., 2010) presentes en ellos.

Por otra parte, tras evaluar la relación genética existente entre Catucaí rojo, Catucaí amarillo, Obatá y Colombia 6 mediante un dendograma, se observó que Obatá estaba menos relacionado con las demás variedades. Basándose en información proporcionada por Velásquez (2019) se generó un árbol genealógico de las variedades de café analizadas en este estudio (Figura 4). Tanto Catucaí rojo como Catucaí amarillo son variedades descendientes del cruzamiento natural entre Icatú y Catuaí. Catuaí, a su vez, es descendiente de Caturra, lo cual explica que Colombia 6 (descendiente de Caturra amarillo e Híbrido de Timor CIFC 1343) se encuentre en el mismo cluster ya que existe mayor relación genética entre estas tres variedades. Obatá no se encuentra muy alejada del resto ya que se deriva del cruce de Villa Sarchí con el Híbrido de Timor (CIFC 832/2). Sin embargo, se agrupa en un cluster diferente debido a que los loci M20, M24 y M32 no muestran amplificación de alelos. Por lo mismo, el dendograma calcula una distancia grande que indica cierto grado de disimilaridad (Anthony et al., 2002) entre Obatá y resto de variedades estudiadas.

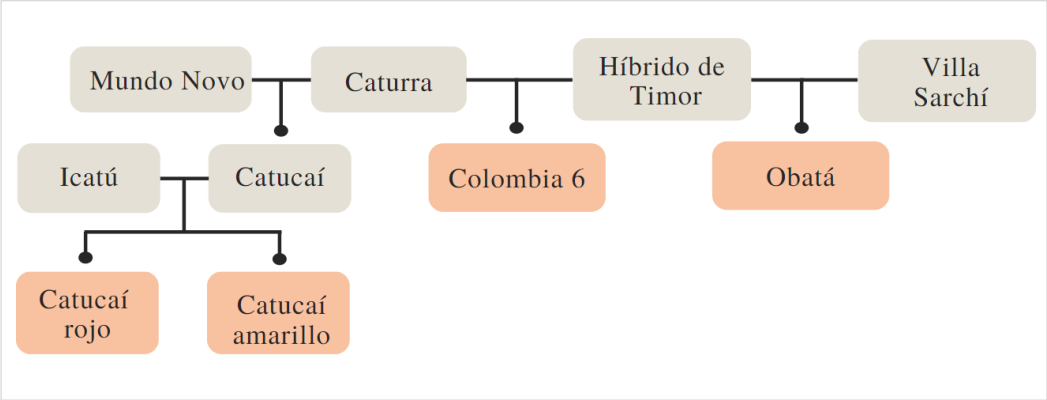


Figura 4. Árbol genealógico de las variedades de café analizadas.

El análisis estadístico reveló que el número promedio de alelos encontrados por cada marcador es de 1,8 en este estudio. Dicho valor concuerda con lo reportado por Missio et al., (2010) ya que obtuvieron el mismo promedio pero trabajaron con 26 SSRs en 19 muestras. Otros estudios obtuvieron un promedio de alelos por marcador superior a lo mencionado, tal es el caso de Poncet et al., (2004) que informa un número medio de más de 3 alelos por locus tras analizar 110 SSRs en seis especies africanas de *Coffea*. Asimismo, Combes et al., (2000) registra 3,6 alelos por marcador utilizando 11 SSRs en 32 muestras y Aggarwal et al., (2007) con un promedio de 3,4 alelos por marcador tras emplear 16 SSRs en 15 muestras.

En cuanto al índice de contenido polimórfico (PIC) para los cinco loci analizados, el valor obtenido (0,3) es muy bajo a comparación de PIC registrados por Sánchez, 2017 (PIC= 0,5183). El PIC indica cuán informativo es un marcador dentro de una población, basándose en las frecuencias de los alelos (Aranguren-Méndez et al., 2005). Así, se considera a los loci altamente informativos si presenta un PIC mayor a 0,5 (Botstein et al., 1980). Ferrao et al., (2015) y Hendre et al., (2008) mencionan en que variedades de la especie *C. arabica* mostrarán un bajo nivel de polimorfismo con respecto a otras especies de *Coffea*, esto debido a factores como evolución del genoma y su proceso de domesticación.

Finalmente, los avances dentro de la biología molecular han permitido desarrollar y validar nuevos métodos de identificación y caracterización de individuos mediante el análisis de la variación presente en el propio ADN (Vieira et al., 2010). La mayoría de ellos, se basan en utilizar marcadores moleculares (Azofeita, 2006) que ayudan a obtener mayor reproducibilidad a diferencia de los métodos tradicionales, y todos se enfocan en determinar la organización de la estructura genética en las poblaciones naturales y cultivadas (Becerra V. & Paredes C., 2000). Sin duda, la caracterización molecular mediante SSR representa una poderosa herramienta que complementa la caracterización morfológica ya que facilita la evaluación y determinación de caracteres únicos para cada individuo (Aguilar Tlatelpa et al., 2019).

5. Conclusiones

Se evidenció que existe amplificación de regiones microsatélites en Catucaí rojo, Catucaí amarillo, Obatá y Colombia 6, lo que quiere decir, según lo descrito por Combes et al., (2000) y otros autores, que todas ellas son variedades pertenecientes a la especie *Coffea arábica.* Por otra parte, los marcadores moleculares empleados, SSRs, no muestran polimorfismo ya que se observa la presencia de alelos homogéneos en todos los casos, lo que no permite identificar variación genética entre las variedades de *Coffea arabica* usadas en el estudio. Por tanto, la hipótesis planteada para la investigación es rechazada debido a que la genotipificación basada en marcadores moleculares como los SSR no permite la identificación de variedades de café.

Recomendaciones

Optimizar la metodología para la PCR y utilizar un mayor número de etiquetas fluorescentes, con el fin de reducir el costo y el tiempo de la genotipificación de las especies y/o variedades de café.

Se recomienda aumentar la cantidad de pares de cebadores con la finalidad de cubrir más áreas del genoma de café y así, lograr identificar más polimorfismos que muestren variedad genética y permita discriminar un individuo de otro.

Incluir genotipos del género *Coffea* de bancos de germoplasma que han sido caracterizados y validados por instituciones reconocidas, los cuales sirvan como punto de referencia para próximas identificaciones varietales.

Continuar desarrollando estudios basados en la diferenciación genotípica de variedades de café utilizando marcadores codominantes distintos a los utilizados en este estudio y que han sido reportados como técnicas altamente confiables, reproducibles, rápidas y de bajo costo.

Implementar la secuenciación del ADN mediante técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) ya que se puede obtener una enorme cantidad de información lo cual permite detectar diferencias entre secuencias genómicas de plantas y conseguir de esta forma listados de mutaciones que discriminan de forma inequívoca variedades e incluso individuos extremadamente próximos. Con esto, se puede elaborar mapas genómicos con una precisión considerablemente mayor que la que permiten otras técnicas.

Financiamiento/Fondos

Esta investigación fue financiada por la Universidad Internacional SEK Ecuador.

Agradecimientos

A la Finca Perla Negra, por proporcionar muestras de plantas de café. A mi tutor, José Rubén Ramírez, y mi profesor Alberto Aguirre, por la guía y acompañamiento brindado para elaborar el trabajo de fin de carrera. A la Dra. Carolina Andrea Klagges Ormeño, por compartir sus conocimientos y experiencia en las técnicas de laboratorio. A Gabriela Naranjo, por su amistad y colaboración en el laborioso proceso experimental.

Conflictos de Interés:

Los autores declaran no tener conflicto de interés. Los financiadores no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio; en la recopilación, análisis o interpretación de datos; en la redacción del manuscrito, o en la decisión de publicar los resultados.

Referencias citadas

ANEXOS

Anexo A. Muestras de variedades de café proporcionadas por caficultores. A) Variedad Catucaí rojo. B) Obatá. C) Catucaí amarillo. D) Híbrido Colombia 6.

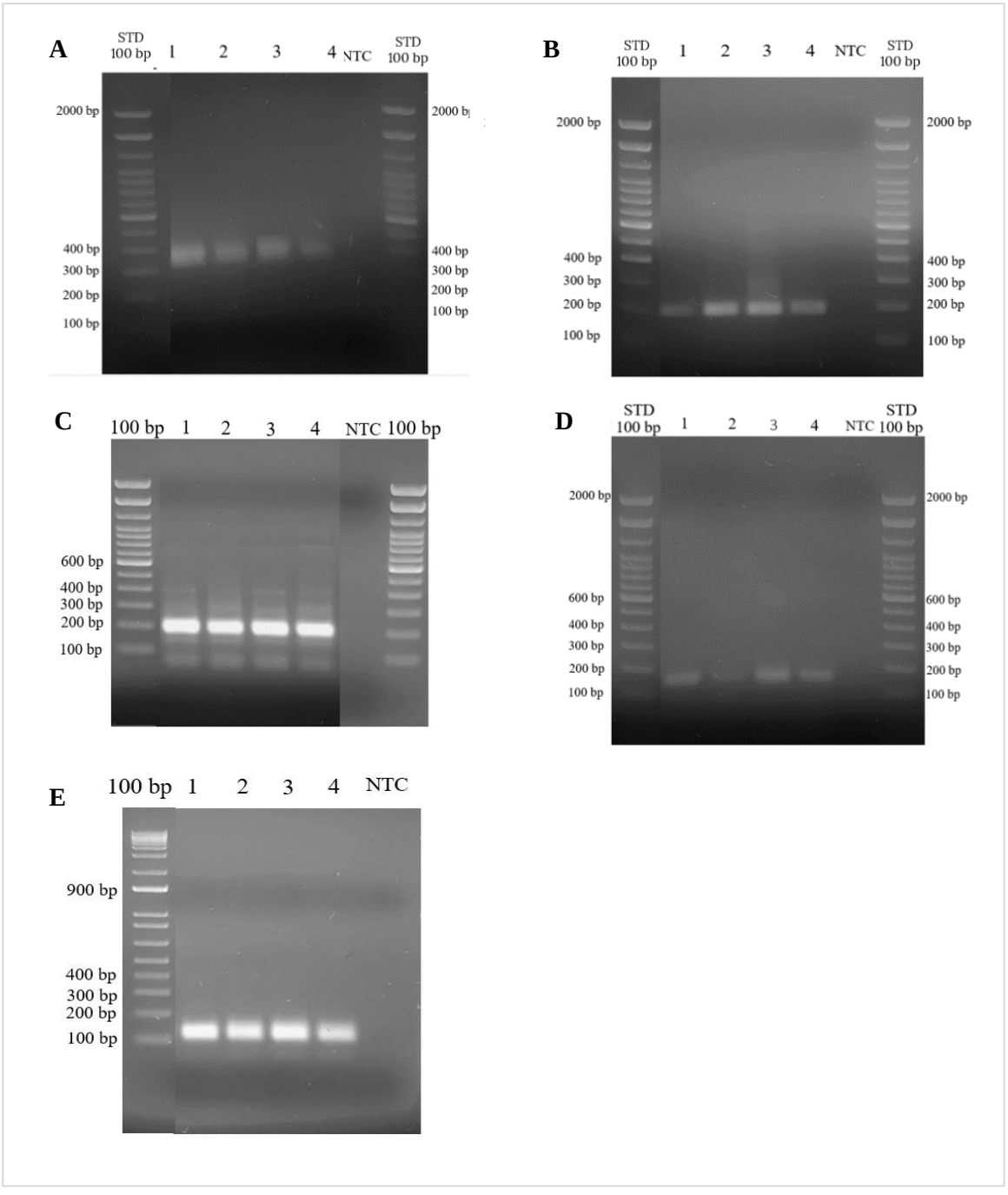
Anexo B. Concentración de ADN genómico de las variedades de *Coffea* utilizadas en el estudio.

Variedad	Concentración de ADN*	Concentración de ADN**
Catucaí rojo	27,4 ng/ul	5,56 ng/ul
Catucaí amarillo	15,9 ng/ul	13, 2 ng/ul
Obatá	54,0 ng/ul	8,4 ng/ul
Colombia 6	23,3 ng/ul	23,3 ng/ul

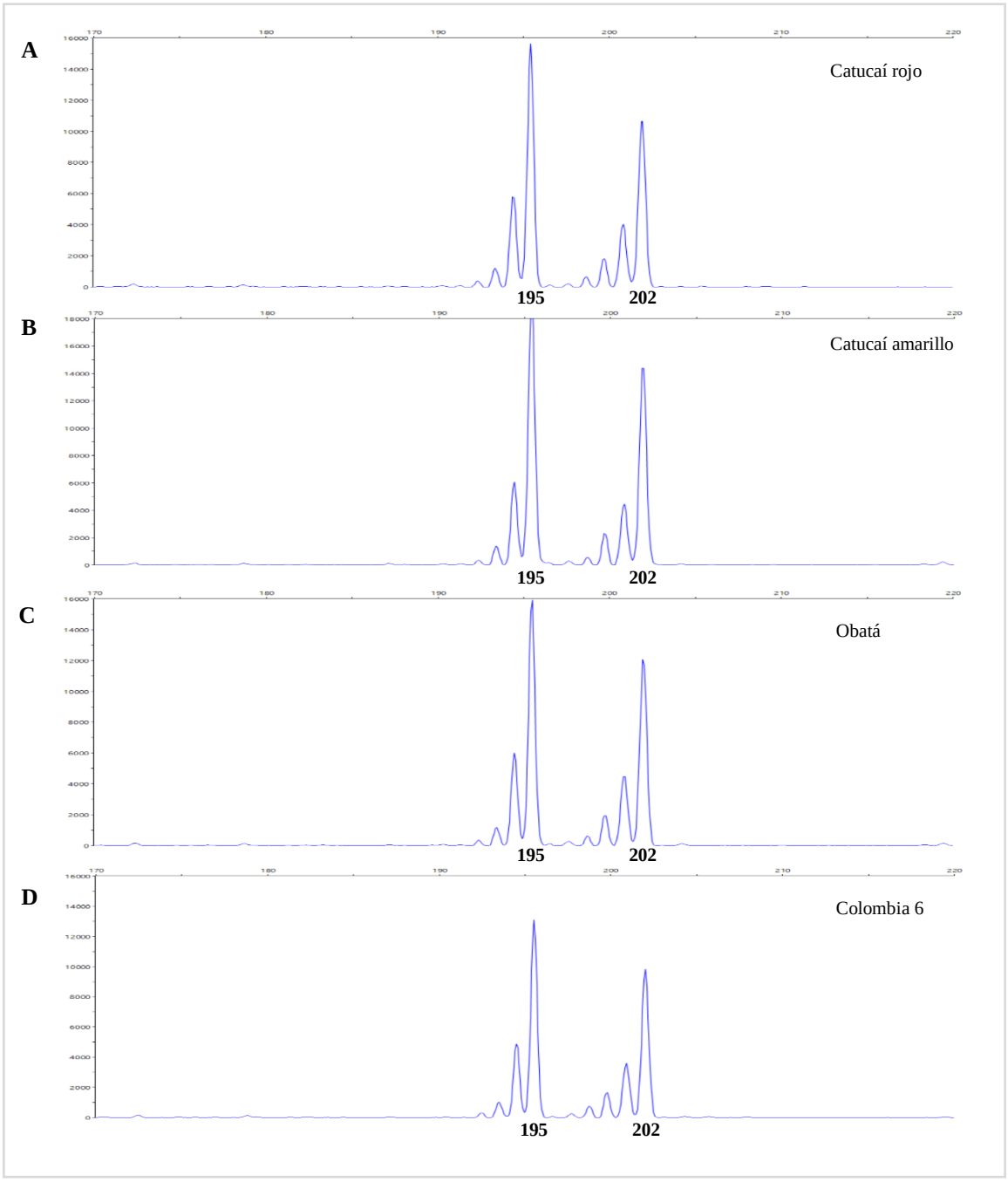
* Concentración obtenida en la 1ra extracción de ADN genómico.

** Concentración obtenida en la 2da extracción de ADN genómico.

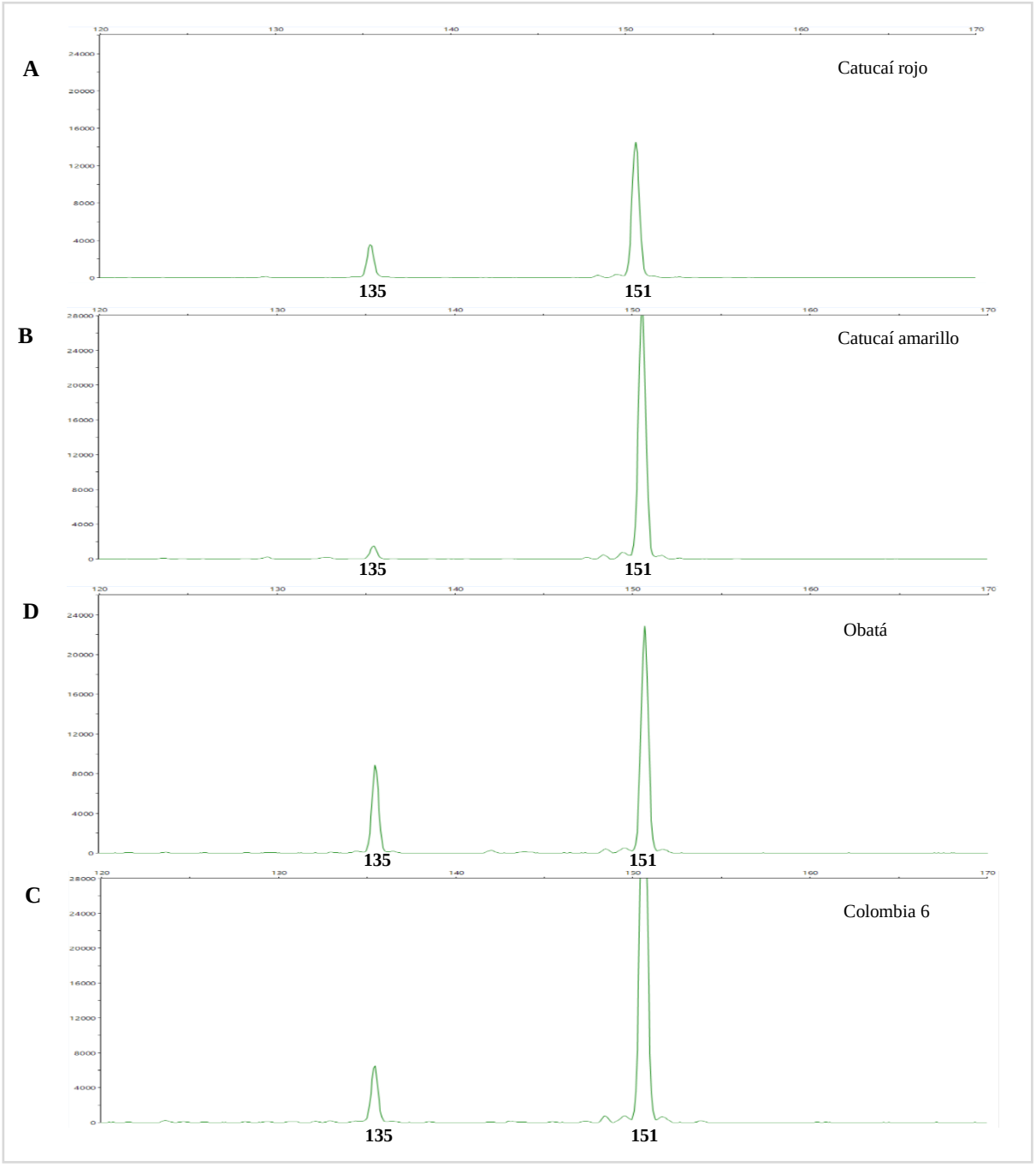
Anexo C. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con Safe View Classic. A) Amplificación de marcador SRR M20. B) Amplificación de marcador SRR M24. C) Amplificación de marcador SRR M25. D) Amplificación de marcador SRR M29. E) Amplificación de marcador SRR M32. **Leyenda:** 1: Catucaí rojo. 2: Catucaí amarillo. 3: Obatá. 4: Colombia 6. NTC: no template control.



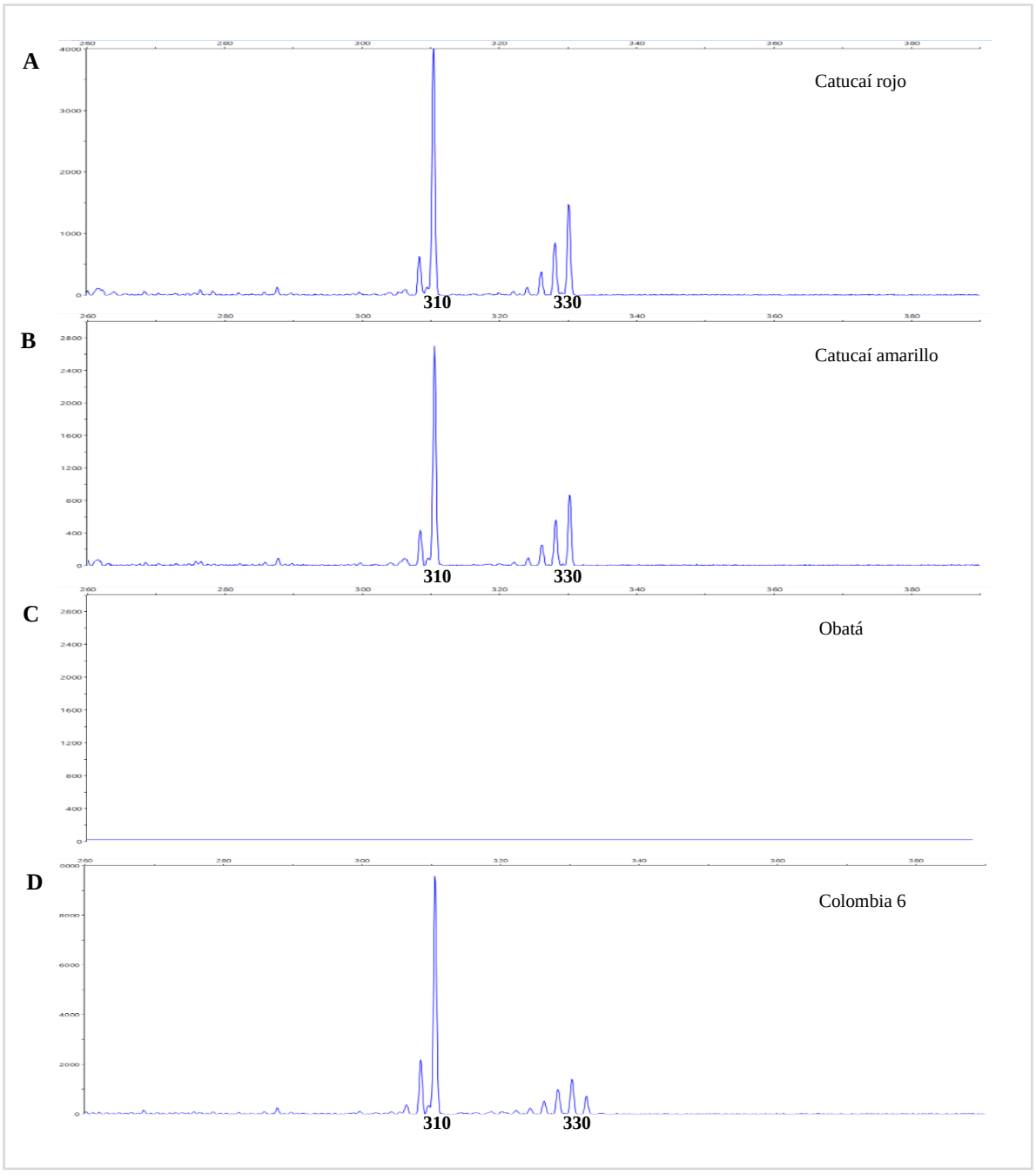
Anexo D-1. Electroferogramas con perfil de amplificación de los SRR locus M25. Se observa amplificación de dos alelos, en 195 pb y 202 pb, en todos los casos. El electroferograma presenta en el eje x el tamaño de los alelos y en el eje y las unidades relativas de fluorescencia (RFU). Etiqueta fluorescente FAM.



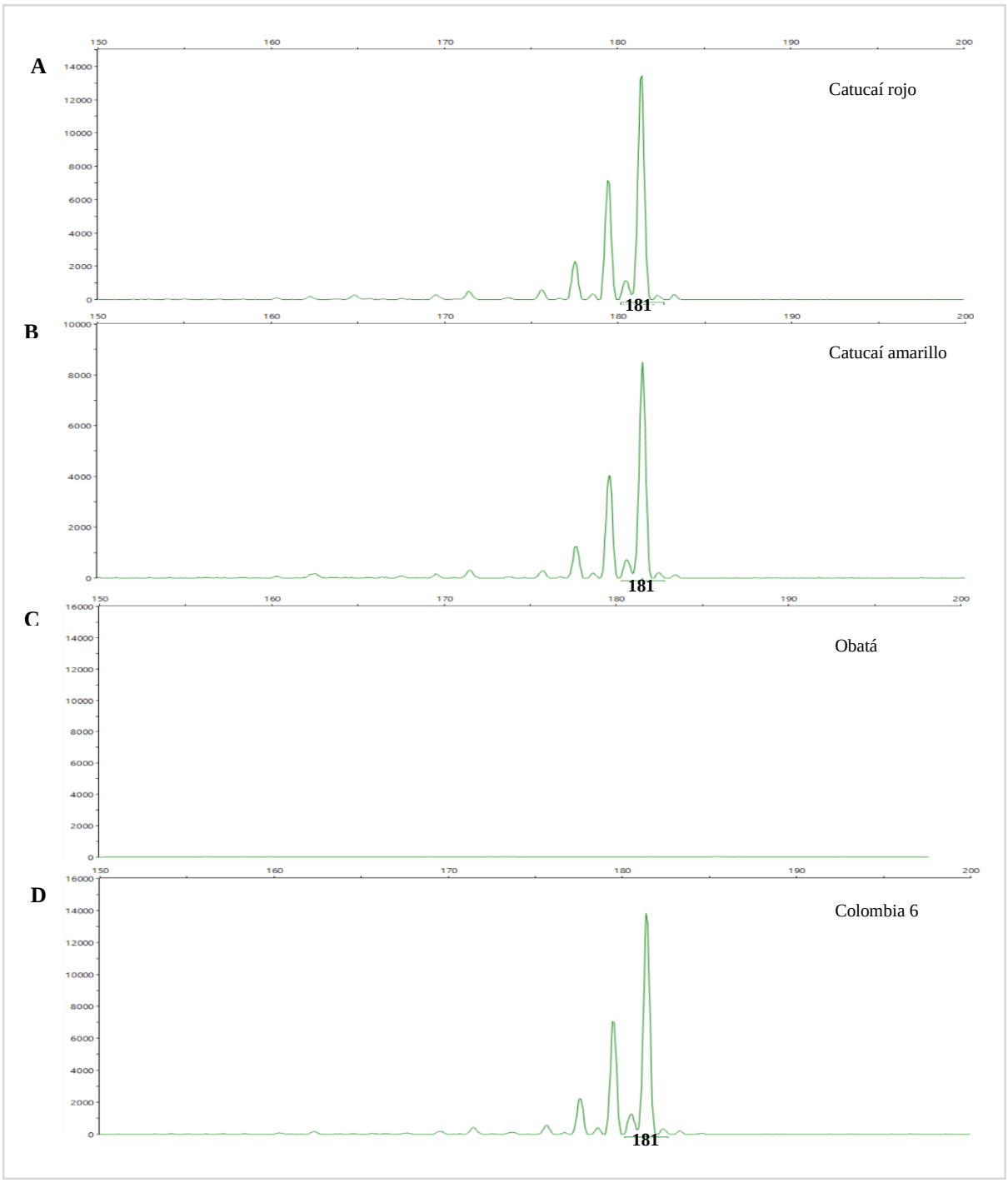
Anexo D-1. Electroferogramas con perfil de amplificación de los SRR locus M29. Se observa amplificación de dos alelos, en 135 pb y 151 pb, en todos los casos. El electroferograma presenta en el eje x el tamaño de los alelos y en el eje y las unidades relativas de fluorescencia (RFU). Etiqueta fluorescente HEX.



Anexo D-3. Electroferogramas con perfil de amplificación de los SRR locus M20. Se observa amplificación de dos alelos, en 310 pb y 330 pb, en A, B y D. C no muestra amplificación de alelo. El electroferograma presenta en el eje x el tamaño de los alelos y en el eje y las unidades relativas de fluorescencia (RFU). Etiqueta fluorescente FAM.



Anexo D-4. Electroferogramas con perfil de amplificación de los SRR locus M24. Se observa amplificación de un alelo en 181 pb, en A, B y D. C no muestra amplificación de alelo. El electroferograma presenta en el eje x el tamaño de los alelos y en el eje y las unidades relativas de fluorescencia (RFU). Etiqueta fluorescente HEX.



Anexo E. Alelos presentes en las variedades Catucaí rojo, Catucaí amarillo, Obatá y Colombia 6 en los distintos loci empleados.

Variedad	M20		M24	M25		M29		M32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Catucaí rojo	310	330	181	195	202	135	151	118	143
Catucaí amarillo	310	330	181	195	202	135	151	118	143
Obatá	-	-	-	195	202	135	151	-	-
Colombia	310	330	181	195	202	135	151	118	143

DII-Marzo 20227