

1  
2 **FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS**  
3  
4

5 **Trabajo de Fin de Carrera Titulado:**

6 **“GENOTIPIFICACIÓN DE HOJAS DE CAFÉ (*COFFEA ARÁBICA*) PRESENTES EN NANEGAL ME-**  
7 **DIANTE MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS”**  
8

9  
10 **Realizado por:**

11 **GABRIELA NOEMÍ NARANJO RODRÍGUEZ**  
12

13 **Director del proyecto:**

14 **Ing. Alberto Aguirre, PhD.**  
15

16 **Como requisito para la obtención del título de:**

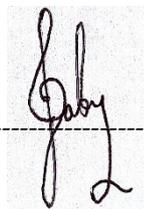
17 **INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**  
18  
19  
20

21 **Quito, 16 de marzo del 2023**  
22  
23  
24  
25  
26

27  
28  
29  
30 **DECLARACIÓN JURAMENTADA**  
31

32 Yo, GABRIELA NOEMÍ NARANJO RODRÍGUEZ, con cédula de identidad N°  
33 175547585-0, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no  
34 ha sido previamente presentado en ningún grado a calificación profesional; y, que he consul-  
35 tado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

36 A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspon-  
37 dientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido  
38 por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vi-  
39 gente.  
40  
41  
42  
43  
44

45  
46 

47 Gabriela Noemí Naranjo Rodríguez

48 C.I: 1755475850  
49  
50  
51

52

53

54

### DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

55

56

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus co-

57

nocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas

58

las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

59

60

61



62

63

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

64

Ing. Alberto Alejandro Aguirre PhD

65

66

67

68

69

70

71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94

**LOS PROFESORES INFORMANTES:**

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

JOHANA MEDRANO

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como  
apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.



\_\_\_\_\_  
Ing. JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

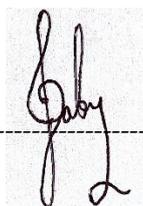


\_\_\_\_\_  
Ing. JOHANA MEDRANO

Quito, 16 de marzo del 2023

95  
96 **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**  
97

98 Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en  
99 su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.  
100

101  
102  
103 

104 -----  
105 GABRIELA NOEMÍ NARANJO RODRÍGUEZ

106 C.I.: 1755475950  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117

118

119 *Artículo de tesis*

# 120 **Genotipificación De Hojas De Café (*Coffea Arábica*) Presen-** 121 **tes En Nanegal Mediante Microsatélites Polimórficos, Tra-** 122 **bajo final de Grado.**

123 **Gabriela Naranjo <sup>1</sup>, Ing. Alberto Aguirre, PhD.**124 <sup>1</sup> Afiliación 1 gnnaranjo.bio@uisek.edu.ec125 <sup>2</sup> Afiliación 2; alberto.aguirre@uisek.edu.ec

126 \* Autor de Correspondencia: gnnaranjo.bio@uisek.edu.ec.

127 **Resumen:** El Café es uno de los productos más importantes a nivel mundial y en Ecuador se encuentra dentro de los  
128 elementos más exportados para la rentabilidad del país, por ello conocer más acerca de sus características tanto morfo-  
129 lógicas como moleculares debe ser importante. En Nanegal y en general en Ecuador la diferenciación entre variedades  
130 de café no está muy presente, por lo que al presentar ciertos cafetos al mercado mundial se pierde el valor porque no se  
131 puede asegurar que lo que se está produciendo son variedades únicas o corrientes, igualmente se necesita más informa-  
132 ción del café molecularmente para sí crear tipos de cafetos mejorados genéticamente que pueden llegar a tener caracte-  
133 rísticas óptimas. En busca de desarrollar mejoramientos en el café se debe tomar en cuenta que existen diferentes especies  
134 como son por ejemplo Arábica o Liberica y saber que dentro de estas se encuentran sus respectivas variedades, es decir  
135 tenemos un submundo de posibilidades.

136 En este trabajo se busca genotipificar, identificar y caracterizar variedades de café tipo arábica utilizando cinco marca-  
137 dores moleculares tipo SSR, electroforesis capilar y análisis estadísticos y con ello lograr obtener información y comparar  
138 características físicas, sensoriales y genéticas de los cafetos. Sin embargo, se pudo observar que utilizar solo cinco mar-  
139 cadores SSR para identificar variedades no proporciona suficiente información, por lo que se recomienda hacer uso de  
140 un mayor número de marcadores moleculares en futuras investigaciones del tema.

141 **Palabras clave:** Cafetos 1; Marcadores Moleculares 2; Electroforesis Capilar 3; Variedades 4; Especies de café 5; Sensorial  
142 6

143 **Abstract:** Coffee is one of the most important products worldwide and in Ecuador it is one of the most exported elements  
144 for the profitability of the country, therefore it is important to know more about its morphological and molecular cha-  
145 racteristics. In Nanegal and in general in Ecuador the differentiation between varieties of coffee is not very present,  
146 therefore when presenting certain coffee plants to the world market the value is lost because it is not possible to assure  
147 that what is being produced are unique or common varieties. In the search to develop improvements in coffee it should  
148 be taken into account that there are different species such as Arabica or Liberica and to know that within these there are  
149 their respective varieties, that is to say that we have an underworld of possibilities.

150 In this work we seek to genotype, identify and characterize Arabica coffee varieties using five molecular markers of the  
151 SSR type, capillary electrophoresis and statistical analysis to obtain information and compare the physical, sensory and  
152 genetic characteristics of the coffee plants. However, it was observed that using only five SSR markers to identify varieties  
153 does not provide sufficient information, so it is recommended that a greater number of molecular markers be used in  
154 future research on this topic.

155 **Keywords:** Coffee plants 1; Molecular Markers 2; Capillary Electrophoresis 3; Varieties 4; Coffee Species 5; Sensory 6  
156

157

## 1. Introducción

El café es uno de los elementos agrícolas que está presente en la economía de varios países (Tran H T, 2016). Por lo tanto, su producción es un factor muy importante a nivel global, ya que ocupa el segundo puesto en la industria del comercio después del petróleo (Labouisse, Bellachew, Kotecha, & Bertrand, 2008).

El género *Coffea* L ( $2n=2x=44$ ), posee aproximadamente 130 especies o más, entre ellas las que se cultivan en mayor cantidad son *Coffea arábica* L, *Coffea liberica* bull y *Coffea canephora* P (Fernández, De-Guglielmo, & Menéndez, 2010). Sin embargo, la especie principal comercialmente, poseyendo el mayor porcentaje en el mercado es *Coffea arabica* L, esta corresponde al género *Coffea* y pertenece a la familia *Rubiceae* (Berthaud & Carrier, 1988). La misma se cultiva en 80 países, principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, abarcando así 10,2 millones de hectáreas repartidas entre África, América latina y Asia (Labouisse, Bellachew, Kotecha, & Bertrand, 2008).

### Origen

El origen del café tipo arábica se remonta a Etiopía, principalmente en el este del Gran Valle del Rift y al oeste de la selva tropical afromontana (Kitila, Alamerew, Kufa, & Garedew, 2011). Una de las primeras veces que se escribió algo sobre el café fue en el siglo X, por un médico de procedencia árabe, cuyo nombre era Razes (Clifford & Willson, 1985), pero el inicio del comercio y de la explotación del café data de hace 1500 años en los bosques del suroeste de Etiopía (Leugeune, 1958), para luego ser llevado a Yemen, donde comenzó el cultivo de esta planta y de allí surge el café arábico que cultivamos en todo el mundo (Krug, Mendes, & Calvalho, 1939).

La primera introducción del café en Europa fue en 1706, con el traslado de plantas desde Java hasta Amsterdam y su jardín botánico (Meyer, 1965). En América el café llegó aproximadamente en el siglo XVII (Anthony, Astorga, & Berthaud, 1999), utilizaron las plantas de Amsterdam para llevarlas a la Guayana Holandesa, concida en la actualidad por el nombre de Surinam, y posteriormente se trasladó de París a una isla llamada Martinica que se encontraba en las Antillas. En 1719 se extendió esta planta por la Guayana Francesa y en 1727 apareció en Brasil. En el año de 1730 llegó el café a Jamaica mediante ingleses, seguidamente se extendió por México, el Caribe y Colombia. Posteriormente algunos cafetos que venían de la Isla Borbón se expandieron en Brasil (Anthony, Astorga, & Berthaud, 1999).

Las variedades cultivadas en América y Asia derivan de dos tipos de café obtenidos en Yemen, los cuales son *C. arábica* var. *arabica*, las cuales son conocidas por el nombre de Típica y Arábica (Anthony, Astorga, & Berthaud, 1999).

### Identificación molecular

Debido a que el café es un producto de gran importancia a nivel mundial, y tiene un gran número de especies y variedades, para beneficiarnos más con este producto es necesario desarrollar estudios, mediante varias técnicas, para conocerlo más a fondo, la identificación y caracterización genética de diferentes especies y variedades de café nos puede abrir puertas a estudios sobre mejoras genéticas en los años venideros.

Conocer acerca de la parte genética del café no es una tarea sencilla, pero para ello se han desarrollado varias técnicas que nos ayudan con este objetivo en cuestión. Se puede estudiar el café de una manera agromorfológica, por código de barras o por otro lado mediante el uso de marcadores moleculares (Carvalho et al. 1969).

Los marcadores moleculares han reemplazado y complementado las maneras tradicionales con las que se estudiaba y caracterizaba las plantas; estos segmentos de ADN pueden llegar a cubrir todo el genoma y no son influenciados al ambiente lo que les hace candidatos a utilizarlos en investigaciones de poblaciones, además que el tiempo en el que obtenemos la información deseada es muy corto. Cada marcador que existe tiene sus ventajas y desventajas, por ello hay que saber escoger con cual se desea trabajar.

(Karp, Kresovich, Bhat, Ayad, & Hodgkin, 1997). Los marcadores moleculares en general a nivel de plantas se utilizan para realizar evaluaciones genéticas, diferenciaciones varietales, así como la evaluación de introgresiones entre especies y estudiar los modos en que la herencia de alguna enfermedad evolucione o sobre avances en la resistencia de plagas, entre otras cosas (Melese, 2016).

En este caso se escogió identificar y caracterizar las variedades de café mediante los marcadores moleculares, de estos existen varios tipos, el primer tipo son los "RAPDs" (Random Amplified Polymorphic DNA o marcadores de ADN polimórfico amplificado), los cuales ayudan a localizar polimorfismos presentes y son una herramienta útil para evaluar la diversidad del café (Palomino, López, Espejo, Mansilla, & Quispe, 2014)

Otro tipo de marcadores moleculares son los "AFLP" (Amplified Fragment Length Polymorphism o polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados), se basan en la PCR (reacción de cadena de la polimerasa), y nos facilita una mayor tasa de polimorfismos a estudiar en comparación del antes mencionado "RAPD" (Arnao, y otros, 2008).

Los "SSR" (Simple Repeated Sequences o Secuencias Simples Repetidas o microsatélites) son otro tipo de marcadores moleculares que tienen secuencias repetidas en tándem conteniendo de 1 a 5 nucleótidos, observando estas repeticiones se puede diferenciar genéticamente individuos. Además, estos microsatélites los encontramos en el genoma de todos los organismos eucariotas (Kruglyak, Durrett, Schug, & Aquadro, 1998).

Todos estos marcadores moleculares constituyen regiones ADN que demuestran alguna variación entre diferentes individuos de una especie y este ADN se puede visualizar mejor mediante una PCR, utilizando partidores que van a flanquear un motivo repetitivo y pueden ser visualizados mediante electroforesis (Liu, 1998).

En este documento la especie utilizada es *Coffea Arábica* con las variedades Bourbon LM16, Geisha, Típica Bourbon Fragancia, Bourbon Sidra y Bourbon Rosado, para realizar la genotipificación mediante microsatélites polimórficos. Se describen cinco pares de cebadores que nos ayudan a detectar los alelos en cada una de las variedades, lo cual nos ayuda a identificar diferencias genéticas entre las variedades de café y con el conocimiento acerca de lo que se tiene en el país se pueden desarrollar mejoras de variedades o así mismo conseguir la creación de otras variedades de café con característica beneficiosas.

En Ecuador es muy importante conocer acerca de métodos para realizar diferenciación varietal a nivel molecular, ya que se cultiva este producto en 20 provincias del país. Nanegal es uno de los lugares de Ecuador en donde podemos encontrar diversas fincas y cafetales, en los cuales, debido a su clima se encuentran en mayor cantidad los cultivos de ciertas variedades de café arábico, de los cuales se pueden mencionar Geisha, Típica y Bourbon (Delgado, y otros, 2002). Un problema que se presenta en este lugar como en muchos otros, es que no existen muchas investigaciones para diferenciar todos los cafetos, por lo que al presentarse al mercado los caficultores no pueden asegurar que sus variedades sean de una buena calidad y no sean corrientes, por lo que pierden competitividad a nivel global (fórumcafé, 2020). Por ello en este trabajo se provee bases para utilizar la diferenciación molecular como una herramienta que le sirva a los caficultores para obtener información de lo que están produciendo, con esto tendrían una visión más acertada de sus variedades y además podrían realizar denominaciones de origen de variedades de Nanegal y del país

La hipótesis planteada en este documento es si los marcadores polimórficos SSR que se emplean en este trabajo ayudan a realizar una diferenciación molecular varietal en variedades de café arábica de la zona de Nanegal y el objetivo general fue determinar las diferencias genéticas de variedades de plantas de café (*Coffea Arábica*) de Nanegal utilizando marcadores moleculares del tipo SSR M20, M24, M25, M29, M32. Los objetivos específicos del trabajo fueron: genotipificar las variedades obtenidas de café mediante microsatélites moleculares tipo M20, M24, M25, M29, M32 y analizar la información conseguida en la genotipificación de las variedades de café.

## 2. Materiales and Métodos

### Material vegetal

Se recolectaron 6 variedades de hojas jóvenes de café (*Coffea Arábica*), pertenecientes al noroccidente de Quito, específicamente de la finca “Perla Negra” ubicada en la parroquia de Nanegal (Tabla 1) (Figura A.1), posteriormente se trasladaron a la Universidad Internacional SEK, se seleccionaron las que estaban en mejores condiciones y se sometieron a un proceso de conservación, el cual consistió en el congelamiento de las muestras a -20 °C con ayuda de nitrógeno líquido.

**Tabla 1.** Variedades de café provenientes de la finca “Perla Negra”, Nanegal.

Variedad	Padres	Origen
Bourbon LM16	-	Nanegal
Geisha	Eugenioides	Gesha-Panamá
Típica	Bourbon*Típica	Malabar-Java
Bourbon Fragancia	-	Nanegal
Bourbon Sidra	-	Nanegal
Bourbon Rosado	Bourbon rojo*Bourbon Amarillo	Colombia

### Extracción y purificación del material genético.

Para el proceso de extracción de material genético, se realizó un macerado de las hojas de café con una maza, un mortero y nitrógeno líquido. En este proceso se fueron aplastando de una en una las hojas seleccionadas y se recolectó 20 g del material triturado. Este polvo resultante se sometió a un proceso de extracción y purificación de ADN siguiendo el protocolo “Purification of Total DNA from Plant Tissue (Mini Protocol)” del Kit comercial Dneasy Plant Mini Kit (50) de QIAGEN (DNeasy®, 2020) para obtener como resultado 50 ul y 100 ul del ADN purificado.

### Cuantificación del material genético.

El proceso de cuantificación del ADN extraído y purificado anteriormente se realizó por medio de Qubit™ 1X ds DNA HS Assay Kit de Invitrogen. En este procedimiento se utilizaron 90 ul de Qubit™ 1X ds DNA HS Working Solution y 10 ul del volumen total del ADN. Luego mediante el fluorómetro Qubit 2.0 también de Invitrogen se observó y midió la fluorescencia (Tabla A.1 y Tabla A.2).

### Amplificación de las regiones microsatélites polimórficas mediante PCR utilizando sets de primers descritos por (Combes, y otros, 2000).

Para el proceso de amplificación de las regiones microsatélites polimórficas se utilizó cinco sets de primers descritos por Combes y et al 2000. Los primers utilizados, las secuencias, las temperaturas de hibridación, el número de alelos y los tamaños aproximados del producto de PCR se encuentran en (Tabla 2). Los cálculos de las temperaturas de hibridación de cada primer se realizaron con el servidor New England Biolabs (<https://tmcaculator.neb.com/#!/main>).

**Tabla 2.** Locus de marcadores, número de acceso, secuencias de cebadores de oligonucleótidos, temperatura de hibridación y tamaños aproximados de productos de PCR.

Locus	EMBL No. acceso	Secuencia repeti- tiva	PCR primer sequence (5' → 3')	Tempera- tura de Hi- bridación	Tamaño del producto (bp)	Número Alelos
M20	AJ250253	(GA)5(GT)8TT(G T)4TT(GT)7(GA)1 1 (TC)2(CT)3GT	<b>F:</b> CTTGTTTGAGTCTGTCGCTG <b>R:</b> TTCCTCCCAATGTCTGTA	51 °C	240–270	5
M24	AJ250254	(CA)15 (CG)4CA	<b>F:</b> GGCTCGAGATATCTGTTTAG <b>R:</b> TTTAATGGGCATAGGGTCC	48 °C	132–166	6
M25	AJ250255	(GT)5CT(GT)2/ (GT)12	<b>F:</b> CCCTCCCTGCCAGAAGAAGC <b>R:</b> AACCACCGTCCTTTTCTCG	56 °C	160–170	3
M29	AJ250257	(CTCACA)4/(CA) 9	<b>F:</b> GACCATTACATTTACACAC <b>R:</b> GCATTTTGTGCACACTGTA	47 °C	103–122	3
M32	AJ250258	(CA)3/(CA)3/ (CA)18	<b>F:</b> AACTCTCCATTCGCCATTC <b>R:</b> CTGGGTTTTCTGTGTTCTCG	52 °C	89–135	7

Referencia: (Combes, y otros, 2000).

La amplificación de los SSR o microsatélites polimórficos se desarrolló por medio de la PCR (Reacción en la cadena de la polimerasa), en donde la composición de la mezcla maestra tuvo un volumen total de 25 ul, se utilizó 24 ul de la mezcla de la reacción (Tabla 3) y 1 ul del ADN genómico diluido 1/20 (1 ul de ADN en 19 ul de agua miliQ).

Se realizaron dos rondas de PCR y para ello se necesitó 3 tipos de *primers*, el primero consta del *primer* forward específico de los diferentes locus que contenga una cola M13 en el extremo 5', el segundo *primer* debe ser el reverso, el cual va a formar el complemento del anterior y por último el *primer* M13 universal, este va a estar marcado con un fluoróforo (Schuelke, 2000).

En los primeros ciclos del ADN el *primer* delantero que posee la cola M13 se va a incorporar con el producto de PCR. Este producto va a ser el molde o la diana para el *primer* universal M13 marcado con el fluoróforo correspondiente (Tabla 5), el cual se va a unir durante los siguientes ciclos (Schuelke, 2000). Es decir, en la primera ronda se utilizan los *primers* "normales" (Tabla 2) y en la segunda ronda se agregan las colas M13 utilizando otro *primer* forward que contenga un fluoróforo, el cual va a reconocer un segmento del forward "normal-sin fluoróforo" para así marcar el producto con fluorescencia.

**Tabla 3.** Contenido de la mezcla de reacción de PCR.

PCR. Ronda 1		PCR. Ronda 2	
Reactivos PCR	Volumen	Reactivos PCR	Volumen
-MegaFi™ Buffer (5X)	5 ul	MegaFi™ Buffer (5X)	5 ul
-dNTPs MIX (10mM)	0.5 ul	dNTPs MIX (10mM)	0.5 ul
-MegaFi™ DNA Taq Polimerasa (5	0.5 ul	MegaFi™ DNA Taq Polimerasa (5	0.5 ul

U/ul)	1,25 ul	U/ul)	1,25 ul
-Primer Forward	1,25 ul	Primer Forward M13	1,25 ul
-Primer Reverse		Primer Reverse M13	

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MiniAmp Plus Thermal Cycles (Thermo Fisher Scientific) y se realizaron dos programas de amplificación, los cuales se detallan a continuación:

A. 1 ciclo de desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de hibridación a 90 °C durante 45 s, 1 minuto a la temperatura específica para cada par de cebadores (Tabla 4) y 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 72°C durante 4 minutos (Combes, y otros, 2000).

B. 1 ciclo de desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 10 ciclos de hibridación a 90 °C durante 45 s, 1 minuto a la temperatura específica para cada par de cebadores (Tabla 4) y 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 72°C durante 4 minutos (Combes, y otros, 2000).

**Tabla 4.** Temperatura de hibridación utilizadas para la PCR

Locus	Temperatura de Hibridación	Temperatura de Hibridación con M13
	(30 ciclos)	(10 ciclos)
M20	55 °C	56 °C
M24	55 °C	56 °C
M25	65 °C	65 °C
M29	58 °C	58 °C
M32	64 °C	64 °C

### Visualización de ADN mediante Electroforesis

Los productos que se amplificaron mediante la PCR se visualizaron a través de electroforesis, para ello se utilizaron geles de agarosa al 1.5%, los cuales estuvieron teñidos con Safeview™ Classic de BIOGENA. Estos geles fueron sometidos durante 1 hora a 100 v y más adelante se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Anexo 3).

### Electroforesis capilar

El ADN que se obtuvo de todos los procedimientos anteriores y fueron comprobados por electroforesis que se encuentren en el rango adecuado, se mandaron a GeneScan MacroGen para un proceso de electroforesis capilar, en busca de medir el tamaño de los amplicones. Se enviaron las reacciones de la segunda ronda de PCR con los respectivos fluoróforos para cada marcador (Tabla 5), el volumen total fue de 15 ul por cada muestra.

Los resultados de la electroforesis capilar se recibieron vía gmail y los electroferogramas fueron analizados mediante el programa Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems), el cual hizo posible la etiquetación de los alelos para cada una de las variedades, determinando los tamaños de cada alelo. Estos datos se trasladaron a Microsoft Excel para desarrollar análisis estadísticos.

**Tabla 5.** Fluoróforo utilizado con cada marcador.

Muestras	Variedad	M20	M24	M25	M29	M32
1	Bourbon LM16	FAM	HEX	FAM	HEX	FAM
2	Geisha	FAM	HEX	FAM	HEX	FAM
3	Típica	FAM	HEX	FAM	HEX	FAM
4	Bourbon Fragancia	FAM	HEX	FAM	HEX	FAM
5	Bourbon Sidra	FAM	HEX	FAM	HEX	FAM
6	Bourbon Rosado	FAM	HEX	FAM	HEX	FAM

Los resultados enviados por Macrogen fueron Electroferogramas, los cuales fueron analizados en el programa Peak Scanner Software v1.0.

### Análisis de datos

La matriz de datos de los alelos analizados para cada marcador (SSR) (Tabla A.3), se utilizaron para hacer una diferenciación varietal. Primero se realizó un análisis de los electroferogramas a partir del programa Peak Scanner Software v1.0., el cual ayuda a visualizar claramente cuáles son los alelos obtenidos a partir de la electroforesis capilar, luego con estos valores resultantes se desarrolló una estimación del índice de contenido polimórfico (PIC), el cual proporciona una estimación del poder discriminatorio de un locus, en donde toma en cuenta no sólo el número de alelos, sino también la frecuencia relativa de esos alelos. Asimismo, se realizaron cálculos de heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada por medio del programa Cervus 3.0.7 (Smith, y otros, 1997).

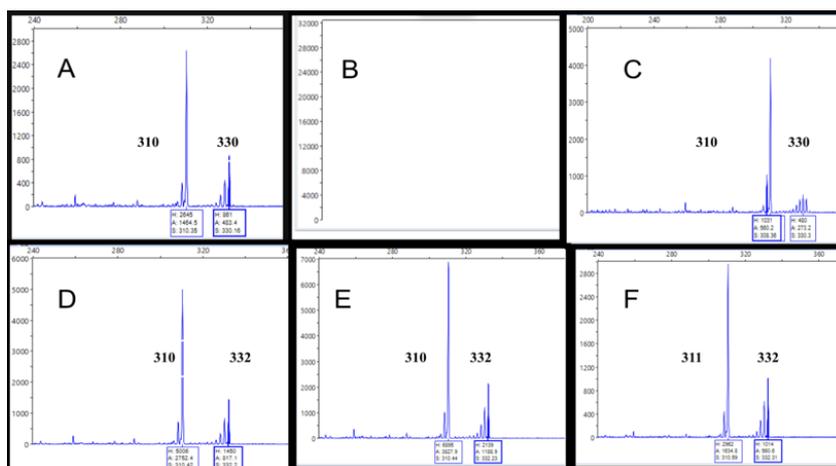
Seguidamente se realizó una diferenciación varietal de los cafetos mediante un análisis cluster, el cual pertenece a la estadística multivariante, se utiliza para la formación de grupos a partir de características similares y por medio de este se formó un dendograma (Dallas & Pérez, 2000). Posteriormente se desarrolló un ANOSIM (ONE-WAY ANOSIM), el cual es una prueba de tipo no paramétrica que sirve para la determinación de diferencias estadísticamente significativas entre pares. Este programa calculó el estadístico R, lo cual nos provee disimilitud entre los grupos correspondientes (Legendre & Gallager, 2001). Estos dos análisis se llevaron a cabo mediante el programa PAST 4.03.

## 3. Resultados

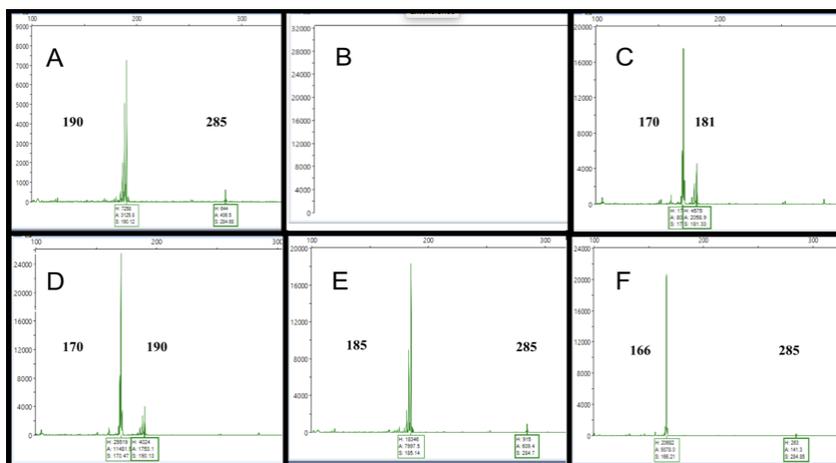
### 3.1. Análisis de los marcadores SSR

#### 3.1.1. Electroferogramas

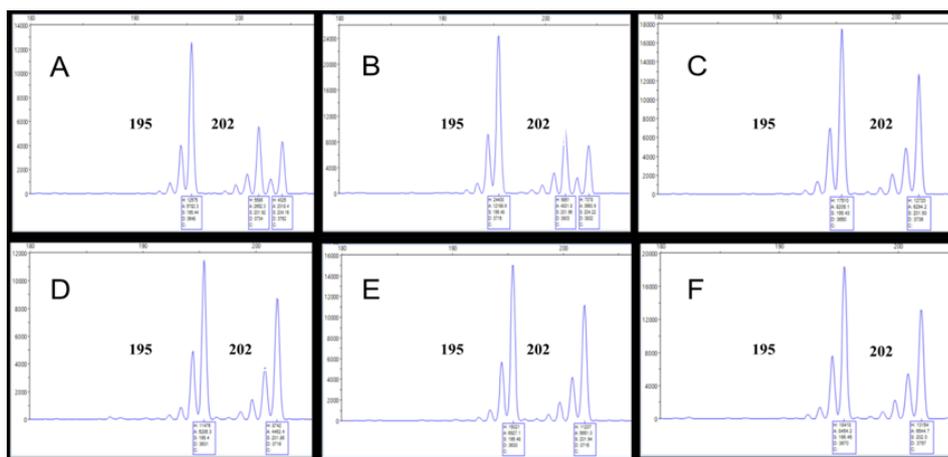
Los cinco marcadores moleculares SSR utilizados se amplificaron en casi todas las variedades de café, pero hubo cuatro casos en los que no se observó ninguna amplificación (Geisha con los marcadores M20, M24 y M29 y Bourbon rosado con el marcador M32) (Tabla A.3).



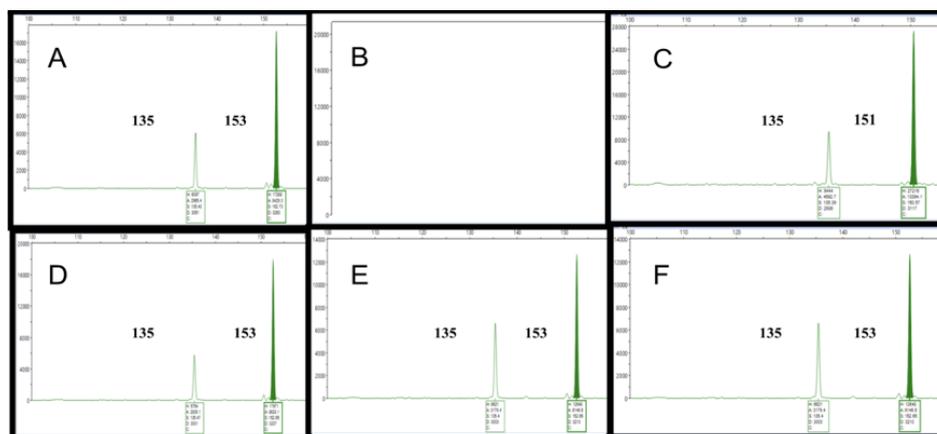
**Figura 1.** Electroferogramas que presentan el perfil de amplificación del SSR M20 obtenido en seis variedades de café (*coffea arábica*). (A) Se puede observar el perfil obtenido para Bourbon LM16, la cual es una variedad heterocigota, con dos alelos (310 bp y 330 bp), (B) Geisha no presentó ninguna amplificación del marcador, (C) Típica es una variedad heterocigota con dos alelos (310 bp y 330 bp), (D) Bourbon Fragancia es una variedad heterocigota con dos alelos (310 bp y 332 bp), (E) Bourbon Sidra es una variedad heterocigota con dos alelos (310 bp y 332 bp), (F) Bourbon rosado es una variedad heterocigota con dos alelos (310 bp y 332 bp). El SSR M20 se marcó con FAM. El eje X nos indica el tamaño que tienen los alelos y el eje Y nos provee el grado de intensidad de fluorescencia que se obtuvo de la amplificación (Klagges, 2014).



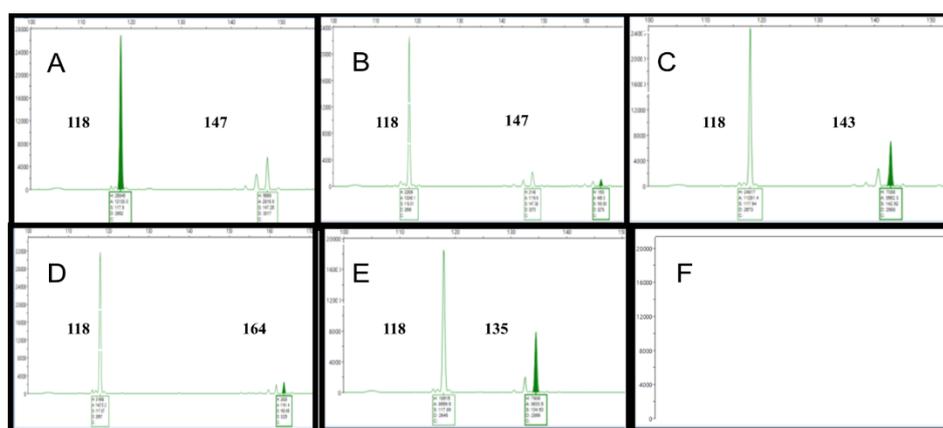
**Figura 2.** Electroferogramas que presentan el perfil de amplificación del SSR M24 obtenido en seis variedades de café (*coffea arábica*). (A) Se puede observar el perfil obtenido para Bourbon LM16, la cual es una variedad heterocigota, con dos alelos (190 bp y 185 bp), (B) Geisha no presentó ninguna amplificación del marcador, (C) Típica es una variedad heterocigota con dos alelos (170 bp y 181 bp), (D) Bourbon Fragancia es una variedad heterocigota con dos alelos (170 bp y 190 bp), (E) Bourbon Sidra es una variedad heterocigota con dos alelos (185 bp y 285 bp), (F) Bourbon rosado es una variedad heterocigota con dos alelos (166 bp y 285 bp). El SSR M24 se marcó con HEX. El eje X nos indica el tamaño que tienen los alelos y el eje Y nos provee el grado de intensidad de fluorescencia que se obtuvo de la amplificación (Klagges, 2014).



**Figura 3.** Electroferogramas que presentan el perfil de amplificación del SSR M25 obtenido en seis variedades de café (*coffea arábica*). (A) Se puede observar el perfil obtenido para Bourbon LM16, la cual es una variedad heterocigota, con dos alelos (195 bp y 202 bp), (B) Geisha es una variedad heterocigota con dos alelos (195 bp y 202 bp), (C) Típica es una variedad heterocigota con dos alelos (195 bp y 202 bp), (D) Bourbon Fragancia es una variedad heterocigota con dos alelos (195 bp y 202 bp), (E) Bourbon Sidra es una variedad heterocigota con dos alelos (195 bp y 202 bp), (F) Bourbon rosado es una variedad heterocigota con dos alelos (195 bp y 202 bp). El SSR M25 se marcó con FAM. El eje X nos indica el tamaño que tienen los alelos y el eje Y nos provee el grado de intensidad de fluorescencia que se obtuvo de la amplificación (Klagges, 2014).



**Figura 4.** Electroferogramas que presentan el perfil de amplificación del SSR M29 obtenido en seis variedades de café (*coffea arábica*). (A) Se puede observar el perfil obtenido para Bourbon LM16, la cual es una variedad heterocigota, con dos alelos (135 bp y 153 bp), (B) Geisha no presentó ninguna amplificación del marcador, (C) Típica es una variedad heterocigota con dos alelos (135 bp y 153 bp), (D) Bourbon Fragancia es una variedad heterocigota con dos alelos (135 bp y 153 bp), (E) Bourbon Sidra es una variedad heterocigota con dos alelos (135 bp y 153 bp), (F) Bourbon rosado es una variedad heterocigota con dos alelos (135 bp y 153 bp). El SSR M29 se marcó con HEX. El eje X nos indica el tamaño que tienen los alelos y el eje Y nos provee el grado de intensidad de fluorescencia que se obtuvo de la amplificación (Klagges, 2014).



**Figura 5.** Electroferogramas que presentan el perfil de amplificación del SSR M32 obtenido en seis variedades de café (*coffea arábica*). (A) Se puede observar el perfil obtenido para Bourbon LM16, la cual es una variedad heterocigota, con dos alelos (118 bp y 147 bp), (B) Geisha es una variedad heterocigota con dos alelos (118 bp y 147 bp), (C) Típica es una variedad heterocigota con dos alelos (118 bp y 143 bp), (D) Bourbon Fragancia es una variedad heterocigota con dos alelos (118 bp y 164 bp), (E) Bourbon Sidra es una variedad heterocigota con dos alelos (118 bp y 135 bp), (F) Bourbon rosado no presentó ninguna amplificación del marcador. El SSR M20 se marcó con HEX. El eje X nos indica el tamaño que tienen los alelos y el eje Y nos provee el grado de intensidad de fluorescencia que se obtuvo de la amplificación (Klagges, 2014).

### 3.1.2. Análisis de Frecuencia Alélica de los marcadores

**Tabla 6.-** Frecuencia Alélica

Locus	k	HObs	HExp	PIC
M20	4	1	0.778	0.645
M24	6	1	0.889	0.772
M25	2	1	0.545	0.375
M29	3	1	0.644	0.492
M32	5	1	0.756	0.642
Promedio:	4	1	0.7224	0.5852

En la Tabla 6 en la primera columna podemos observar todos los marcadores SSR utilizados, en la segunda columna encontramos el número de alelos que se detectaron en cada marcador, la tercera columna indica heterocigosidad observada (HObs), la cual se puede definir como “la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci” (Hernández & Trejo, 2014):

$$H(obs) = 1 - \sum \text{frecuencias}$$

La cuarta columna nos proporciona la heterocigosidad esperada (HE), la que se la define como “la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes” (Hernández & Trejo, 2014):

$$H(esp) = 1 - \sum frecuencias^2$$

La última columna nos da el valor PIC o índice de contenido polimórfico, este puede oscilar entre 0-1. “Es un índice que evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo con las frecuencias de los alelos, lo obtenemos al multiplicar la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado en función de las frecuencias alélicas) por la probabilidad de que sean informativos, lo que significa que se podría identificar el progenitor del alelo” (Hernández & Trejo, 2014):

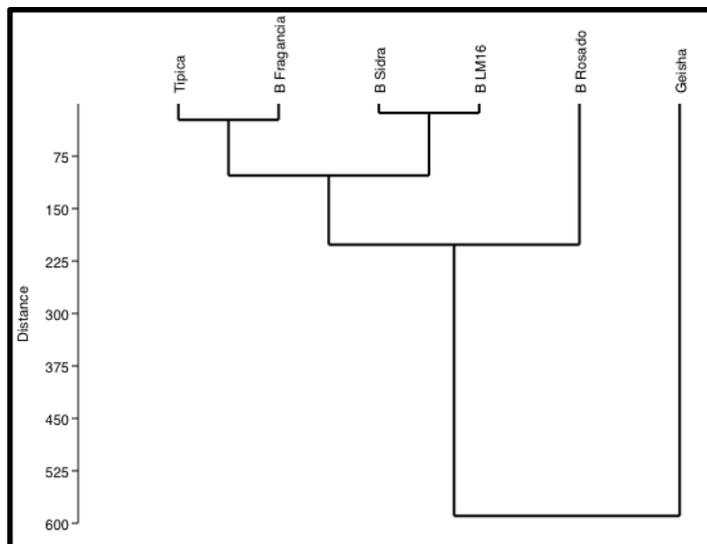
$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n (p_i^2) - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1}^{n-i} p_i p_j^2$$

Se dice que pi y pn vas a ser las frecuencias de los n alelos (Hernández & Trejo, 2014).

### 3.2. Identificación de las diferentes variedades de plantas de café (*Coffea Arábica*) en base a los marcadores utilizados en la investigación.

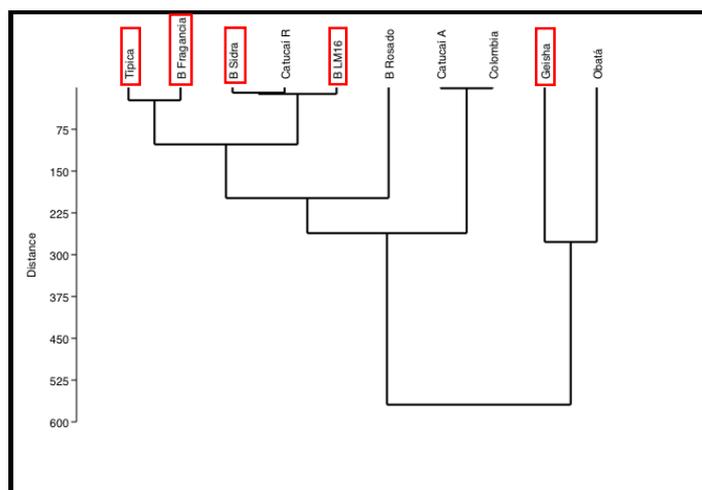
#### 3.2.1. Diferenciación varietal de cafetos mediante análisis Cluster.

Para realizar un análisis entre todas las variedades presentes en este documento se utilizaron los valores de alelos obtenidos anteriormente.



**Figura 6.** Dendrograma clustering clásico con distancia euclidiana por pares de grupos (UPGM), utilizando seis variedades de café (*coffea arábica*).

Se observaron 4 grupos o conglomerados (Figura 6) empleando un clustering clásico con una distancia euclidiana. Se puede ver que el grupo 1 corresponde a Típica y Bourbon Fragancia, en el grupo 2 encontramos a Bourbon Sidra y Bourbon LM16, en el grupo 3 se encuentra Bourbon rosado y en el grupo 4 Geisha. Todos estos grupos se formaron tomando en cuenta los valores de los alelos al ser amplificados con los 5 marcadores SSR.



**Figura 7.** Dendrograma clustering clásico con distancia euclidiana por pares de grupos (UPGM), utilizando 10 variedades de café (*coffea arábica*).

Se realizó una comparación entre las variedades utilizadas en este trabajo, que provienen de Nanegal (Típica, Bourbon Fragancia, Bourbon Sidra, Bourbon LM16 y Bourbon Rosado) con variedades de otras partes del país como son Loja (Colombia 6) y Macas (Obatá, Catucaí rojo y Catucaí amarillo) para realizar una diferenciación varietal más completa.

Se presentaron 5 grupos (Figura 7), el grupo 1 consta de Típica y Bourbon Fragancia, el grupo 2 de Bourbon Sidra, Catucaí rojo y Bourbon LM16, el grupo 3 de Bourbon Rosado, el grupo 4 de Catucaí amarillo y Colombia 6 y el grupo 5 con Geisha y Obatá. Todos estos grupos se formaron tomando en cuenta los valores de los alelos al ser amplificados con los 5 marcadores SSR.

### 3.2.2. ANOSIM

Para tener una idea más completa acerca de las diferencias que presentan las variedades de café estudiadas, se realizó un análisis multivariado de similitud ANOSIM.

**Tabla 7.** Diferenciación varietal mediante ANOSIM.

Estadístico Global (R)						
R:1						
Nivel de Significancia por Pares						
Variedades	Bourbon LM16	Geisha	Típica	Bourbon Fragancia	Bourbon Sidra	Bourbon Rosado
<b>Bourbon LM16</b>	/	0.3391	0.3367	0.3308	0.3328	0.3398
<b>Geisha</b>	0.3349	/	0.3277	0.3323	0.3381	0.3386
<b>Típica</b>	0.3274	0.3282	/	0.336	0.3308	0.3443

<b>Bourbon</b>	0.3354	0.3383	0.3409	/	0.335	0.3299
<b>Fragancia</b>						
<b>Bourbon</b>	0.3317	0.3387	0.3331	0.3346	/	0.3336
<b>Sidra</b>						
<b>Bourbon</b>	0.3344	0.3322	0.339	0.3333	0.3292	/
<b>Rosado</b>						

En la (Tabla 7) observamos en la primera fila el valor estadístico global R y en la segunda y tercera parte podemos ver el nivel de significancia por pares P (%). El estadístico R proviene de una fórmula que consiste “en la medida de la diferencia de los datos entre los grupos rB (promedio de las distancias entre grupos) y en el mismo grupo rW (promedio de distancias dentro de grupos) y N va a ser el número de muestras totales” (Illera, 2016), en nuestro caso este valor es de 1, lo cual nos indica que existen diferencias entre los grupos estudiados, en este caso las variedades (Legendre & Gallagher, 2001).

$$R = (r_B - r_W) / \left( \frac{N(N-1)}{4} \right)$$

El valor P nos ayuda a cuantificar las diferencias que existen entre dos grupos o más (Wilcox, 2012), en la (Tabla 7) se indica que el valor p por pares oscila entre 0.32-0.33, es un valor mayor  $p < 0.05$ , lo que nos indica que no existe mucha diferencia entre las variedades (Gómez, Cruz, & Duque, 2010), (Schiller, 2003).

#### 4. Discusión

##### 4.1.- Análisis de los marcadores SSR

##### 4.1.1. Electroferogramas

Se puede observar en los electroferogramas que los marcadores utilizados (Tabla 2) se pudieron amplificar en la gran mayoría de las variedades exceptuando el caso de Bourbon rosado que solo no se presentó en M32 y Geisha que fue una variedad que no se amplificó con tres tipos de marcadores M20, M24 y M29, esto pudo ocurrir ya que la mayoría de las variedades con las que estamos trabajando pertenecen a Bourbon, y Geisha se encuentra alejada en cuanto a su origen. Las variedades Bourbon provienen de la isla Borbón de Etiopía (Fischersworing & Roßkamp, 2001) y Geisha fue colectada en Etiopía luego se trasladó a Kenia, posteriormente estuvo en Tanzania, llegó a un banco de germoplasma y por último llegó a Panamá (Ebert, 2008). Otra razón por la cual no se amplificaron Bourbon rosado y Geisha puede ser que los marcadores respectivos no se encuentren en estas variedades y por ello no emite ningún tipo de señal (Klagges, 2014).

##### 4.1.2. Análisis de Frecuencia Alélica de los marcadores

Los valores estadísticos que se obtuvieron en los cinco marcadores se presentan en (Tabla 6). Se pudo observar que el número de alelos que se encontraron en el trabajo es menor al que se presentan en otras investigaciones. Para hacer una comparación de los alelos encontrados se utilizó (Combes, y otros, 2000) (Tabla 2), el cual es el trabajo en el que se basó el uso de nuestros marcadores, ellos nos señalan que en M20 deberíamos encontrar 5 alelos y en este caso nosotros obtuvimos 4, también nos indican que el M24 debería tener 6 alelos, lo cual concuerda con nuestros resultados, ya que en nuestro trabajo también se obtuvieron 6, posteriormente nos señalan que M25 debería poseer 3 y nosotros tuvimos 2, luego nos dicen que el M29 debería tener 3 alelos y en este caso también obtuvimos la misma cantidad, y por último nos señalan que el M32 inicialmente tiene 7 alelos y nosotros obtuvimos 5.

Por consiguiente, se podría decir que M20, M25 y M32 obtuvieron números menores que la bibliografía con la que estamos comparándolos, sin embargo, M24 y M29 sí consiguieron presentar los alelos requeridos (Klagges, 2014).

Se indicaron 4 alelos en promedio por los cinco marcadores, estuvieron en un rango desde 2 alelos con M25 hasta 6 con M24. También se presentaron valores de heterocigosidad observada la cual en todos los casos nos arrojó el mismo valor, el cual es 1. La heterocigosidad esperada nos dio un promedio de 0.7224, con el rango de 0.545 para M25 a 0.889 para M24. El PIC o contenido de información polimórfica presentó un promedio de 0.5852, y estuvo en el rango de 0.375 para M25 a 0.772 para M24.

Todos estos datos nos indican que el marcador menos informativo es M25 ya que presenta una cantidad baja de número de alelos, sabiendo que la heterocigosidad como tal y el PIC dependen de este valor, se entiende que sea el marcador con menos características polimórficas (Klagges, 2014).

Así mismo se podría decir que los marcadores que tengan un PIC por encima de 0,5 son informativos, por lo tanto, M29 tampoco se consideraría un marcador informativo, pero en el caso de los demás M20, M24, M32 sí presentarían esta característica (Klagges, 2014).

## 4.2. Identificación de las diferentes variedades de plantas de café (*Coffea Arábica*) en base a los marcadores utilizados en la investigación.

### 4.2.1. Diferenciación varietal entre cafetos mediante análisis Cluster.

El análisis cluster (Figura 6) demostró 4 agrupamientos utilizando los valores de los alelos en las diferentes variedades. Como grupo 1 tenemos a Típica y Bourbon Fragancia. Típica o también llamada arábica es un arbusto que presenta porte alto, es considerado un café de muy buena calidad, produce granos grandes y además puede tener hojas nuevas con un color que parece bronceado (Wintgens, 2004). Bourbon Fragancia por otro lado es una mezcla como su nombre lo indica entre Bourbon puro y alguna alteración no específica, posee un porte de mediano a alto, es mucho más productivo que típica y las hojas nuevas normalmente se tiñen de color verde claro (Fischersworing & Roßkamp, 2001). Ambos cafetos pueden crecer en climas subtropicales con temperatura entre 25°-30° C, aunque pueden sobrevivir a 9° C. Hablando de características sensoriales estas dos variedades son totalmente contrarias, Típica presenta sabores cítricos como la mandarina y tiene un toque amielado, mientras que Bourbon fragancia es mucho más floral como el arándano rojo o azul y es muy complejo en sabores. Por lo cual podríamos decir que son variedades que son similares en cuanto a características físicas y genómicas en base a marcadores moleculares, pero sensorial y gustativamente son totalmente contrarias.

El grupo 2 consta de Bourbon Sidra y Bourbon LM16, estas variedades son nuevas y se originaron en una finca llamada "Perla Negra" (Tabla 1) la cual se encuentra en Nanegal-Ecuador. Bourbon LM16 y Bourbon Sidra poseen una altura de cultivo de 1350 msnm y tienen un porte alto (2.50m-3m), puede crecer en climas subtropicales de 25°-30°. Las hojas de B LM16 son alargadas, onduladas, con pico y poseen un ombligo, mientras que B Sidra tiene hojas anchas y no tiene ni picos, ni ombligo. Las características sensoriales de estas dos variedades son diferentes, B LM16 es ácida-dulce con toques florales sutiles y B Sidra es cítrica con notas a lima, albaricoque, frambuesa y posee muy pocos gustos florales. Este grupo de cafetos presentaron características físicas similares sin contar sus hojas, sin embargo, en sabor y sensorialmente al igual que el grupo anterior son muy distintas.

En el grupo 3 solo se encuentra Bourbon Rosado, es una mezcla entre el Bourbon rojo y el amarillo, nació en Colombia y se distingue de las demás clases de Bourbon por su color de grano rosado, su producción es muy compleja y presenta características sensoriales como sabores de frutos rojos, extremadamente dulces y nectarinas (Roasters, 2021). Este grupo puede encontrarse alejado de los otros bourbon, ya que molecularmente se observó su falta de amplificación con un marcador, además estructural, física y sensorialmente posee características atípicas en comparación a las demás variedades.

El grupo 4 pertenece a Geisha, esta variedad posee un porte alto (3m o más), las hojas son lanceoladas, los brotes nuevos presentan un color verde, la producción es muy baja, pero de buena calidad. En cuanto a las características sensoriales denota sabores florales y se puede percibir acidez a frutas amarillas (Velásquez, 2016). Según expertos en el tema Geisha es muy similar a Bourbon LM16, por lo que al igual que el caso anterior se cree que esta variedad se encuentra muy alejada de las demás gracias a su falta de amplificación en varios marcadores.

Podemos ver que en la (Figura 7) tenemos un panorama más amplio de variedades que podemos encontrar en Ecuador. Se puede ver que al igual que se nos presenta en la (Figura 6), en el grupo 1 encontramos a Típica y Bourbon Fragancia, variedades anteriormente comparadas.

En el grupo 2 tenemos a Bourbon Sidra, Catucaí rojo y Bourbon LM16, analizando el anterior dendograma vemos que solo se sumó Catucaí rojo a este conglomerado; sin embargo, expertos del café nos señalaron que en calidad y sensorialmente, esta variedad introducida no pertenecería a este grupo y debería estar en el grupo 4, ya que es el primo hermano de Catucaí rojo y es muy similar a Obatá. Catucaí rojo presenta toques amargos y características simples, mientras que como se señaló anteriormente las otras dos variedades son mucho más complejas y de mejor calidad.

En el grupo 3 tenemos a Bourbon rosado que como ya se había mencionado es muy distinta a las demás y por ello se encuentra apartada.

El grupo 4 consta de Colombia 6 y Catucaí amarillo, las cuales son variedades provenientes de Loja y Macas respectivamente. Ambos tienen características físicas similares como que son de porte alto, aunque Colombia 6 crece a 1500 msnm y Catucaí Amarillo a 900msnm. También sensorialmente presentan sabores amargos, frutales y toques chocolatosos. Cabe señalar que en este grupo debería estar Catucaí Rojo.

En el grupo 5 se encuentran Geisha y Obatá, variedades totalmente diferentes en cuanto a sus características físicas y sensoriales, pero molecularmente pareadas. Geisha tiene características sensoriales similares a Bourbon LM16, mientras que Obatá se parece a Catucaí Amarillo. También Geisha tiene mucha mejor calidad y producción que Obatá que se encuentra entre los peores tipos de café.

Se puede decir que realizando una comparación con más variedades que encontramos dentro del país, los análisis resultantes mediante los marcadores SSR ocupados y sus alelos nos entregan una evaluación en cuanto a las diferencias entre cafetos. En algunos casos las características físicas, genómicas y sensoriales coinciden con el emparejamiento, sin embargo, en otros no es así, esto puede presentarse debido a que los genes son distintos entre las variedades y los marcadores tal vez no son una buena herramienta para medir las diferencias sensoriales, que es el rasgo en el que más difieren los agrupamientos.

#### 4.2.2.- ANOSIM

Para analizar las variedades en un ámbito estadístico y determinar las diferencias se realizó ANOSIM (Tabla 7), los resultados nos indican que comparando entre pares encontramos que los valores son de entre 0.32 a 0.33, lo cual también estaría por encima de  $p < 0.05$  (Schiller, 2003) (Gómez, Cruz, & Duque, 2010). Por lo tanto, decimos que no se encontraron diferencias entre las variedades que sean significativas, sin embargo, tanto física como sensorialmente sí podemos observar claramente características discriminantes entre los cafetos estudiados (Illera, 2016).

### 5. Conclusiones

Siguiendo los parámetros de la bibliografía utilizada como base para la obtención de ADN genómico, se logró obtener una concentración del material adecuada para trabajar en este estudio, además se desarrolló un protocolo más específico para alcanzar el rango de tamaño en el que debían estar los marcadores comprobados en la electroforesis.

Al trabajar con un número limitado tanto de variedades como de marcadores, estadísticamente no se pudo completar la información necesaria para realizar una diferenciación varietal específica, por lo tanto la hipótesis no se cumplió; sin embargo se logró diferenciar a las variedades por grupos con los datos obtenidos en la investigación.

Los resultados de este documento pueden constituir una base para realizar más investigaciones en donde se caractericen molecularmente un mayor número de variedades de café de diferentes partes del país y del mundo, y además con ello desarrollar nuevos cafetos con características que sirvan en un futuro.

## 6.- Recomendaciones

Para siguientes trabajos enfocados en este tipo de análisis se debería trabajar con un mayor grupo de variedades de café y marcadores moleculares, ya que de esta manera podemos tener una mayor cantidad de datos para que las comparaciones sean mucho más reales.

Tenemos que considerar que los marcadores moleculares SSR no son los únicos que se utilizan en este tipo de investigaciones, por lo que se podrían ocupar otro tipo de marcadores moleculares como los que se mencionaron en la introducción o en otro caso se puede hacer uso del análisis mediante código de barras para así identificar variedades de café mediante la comparación de genes compartidos y así mapear el genoma completo de los cafetos.

**Agradecimientos:** A Dios, mi familia, amigos, tutor de tesis, profesores, Finca Perla Negra y a la Universidad Internacional SEK.

**Conflictos de Interés:** Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias

1. Anthony, F., Astorga, C., & Berthaud, J. (1999). Los recursos genéticos: Las bases de una solución genética a los problemas del la caficultura latinoamericana. (B. Bertrand, & B. Rapidel, Edits.) Desafíos de la caficultura en Centroamérica, 369-406. Obtenido de [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/divers14-12/010018384.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers14-12/010018384.pdf)
2. Arnao, E., Jayaro, Y., Hinrichsen, P., Ramis, C., Marín, C., & Pérez, I. (2008). Marcadores aifp en la evaluación de la diversidad genética de variedades y líneas élites de arroz en venezuela. *Interciencia*, 33(5), 359-364. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442008000500009&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008000500009&lng=es&tlng=es)
3. Berthaud, J., & Carrier, A. (1988). Recursos genéticos de Coffea. En *Coffee: Agronomy* (Vols. Coffee: Agronomy, vol. IV, págs. págs. 1-42). Londres.
4. Clifford, M., & Willson, K. (1985). *Café. Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage*. Londres, Sydney: Croom Helm. doi:<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6657-1>
5. Combes, M., Andrzejewski, S., Anthony, F., Bertrand, B., Rovelli, P., Graziosi, G., & Lashermes, P. (2000). Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*, 1171-1193. Obtenido de [file:///Users/mac/Downloads/combes%202000%20\(2\).pdf](file:///Users/mac/Downloads/combes%202000%20(2).pdf)
6. Dallas, J., & Pérez, H. (2000). *Métodos multivariados aplicados al análisis de datos*. México, D.F: International Thomson Editores.
7. Delgado, P., Larco, A., García, C., Alcívar, R., Chilán, W., & Patiño, M. (2002). Informe de Terminación de Proyecto. Manta: FERIVA S.A. Obtenido de [http://www.ico.org/projects/cabi\\_cdrom/PDFFiles/ECUADOR.pdf](http://www.ico.org/projects/cabi_cdrom/PDFFiles/ECUADOR.pdf)
8. DNeasy®. (2020). Plant Handbook. DNeasy Plant Mini Kit. DNeasy Plant Maxi Kit For purification of total cellular DNA from plant cells and tissues or fungi. DNeasy 96 Plant Kit For high-throughput purification of DNA from tissue. Obtenido de [file:///Users/mac/Downloads/HB-1166-008\\_HB\\_DNY\\_Plant\\_0720\\_WW%20\(1\).pdf](file:///Users/mac/Downloads/HB-1166-008_HB_DNY_Plant_0720_WW%20(1).pdf)
9. Ebert, A. W. (2008). Flujos de germoplasma facilitado por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza dentro y fuera de Latinoamérica. *CATIE. CONSERVACION DEL GERMOPLASMA*(53), 54-61. Obtenido de <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/9176>
10. Fernández, R., De-Guglielmo, Z., & Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación*, 34(71), 57-84.

- 693 11. Fischersworing, B., & Roßkamp, R. (2001). Guía para la caficultura ecológica. Popayán: Editorial López. Obtenido de  
694 file:///D:/Downloads/pdfcoffee.com\_caficultura-ecologica-pdf-pdf-free.pdf
- 695 12. fórumcafé. (2020). EL CAFÉ EN ECUADOR. doi: ISSN 2696-3043
- 696 13. Gómez, L., Cruz, N., & Duque, G. (2010). COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL ENSAMBLAJE DE CRUSTÁCEOS  
697 BRACHYURA DE LA PLATAFORMA CONTINENTAL DE LA GUAJIRA COLOMBIANA Y SU RELACIÓN CON LA  
698 PROFUNDIDAD Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL SEDIMENTO. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVE-  
699 MAR. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612010000200006&lng=en&tlng=es)  
700 97612010000200006&lng=en&tlng=es.
- 701 14. Hernández, A. W., & Trejo, F. (2014). Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR  
702 presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. IMedPub Journals, Vol. 10 (1:1).  
703 doi:10.3823/1209
- 704 15. Illera, E. D. (2016). Análisis bioestadístico de señales EEG registradas durante la realización de una tarea auditiva para el  
705 estudio de su viabilidad en la ayuda al diagnóstico de la esquizofrenia. TRABAJO FIN DE MÁSTER. Obtenido de  
706 [https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/21014/TFM-G656.pdf;jses-](https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/21014/TFM-G656.pdf;jsessionid=5C0A80A5DFE481C5F7DD49DF43F54473?sequence=1)  
707 [sionid=5C0A80A5DFE481C5F7DD49DF43F54473?sequence=1](https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/21014/TFM-G656.pdf;jsessionid=5C0A80A5DFE481C5F7DD49DF43F54473?sequence=1)
- 708 16. Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K., Ayad, W., & Hodgkin, T. (1997). Molecular tools in plant genetic conservation: a guide to  
709 the techniques. International Plant Genetic Resources Institute(2), 5-47.
- 710 17. Kitila, O., Alamerew, S., Kufa, T., & Garedew, W. (2011). Variabilidad de los rasgos cuantitativos en Limmu Coffee (*Coffea*  
711 *arabica* L.) en Etiopía. Revista Internacional de Investigación Agrícola, 6: 482-493.
- 712 18. Klagges, C. (2014). ESTUDIO GENÉTICO MOLECULAR DEL CEREZO PARA BÚSQUEDA DE POTENCIALES QTLs DE  
713 INTERÉS COMERCIAL, APLICABLES EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESTA ESPECIE. Santiago  
714 de Chile. Obtenido de file:///Users/mac/Downloads/TESIS\_2014\_KLAGGES\_final%20(1).pdf
- 715 19. Krug, C., Mendes, J., & Calvalho, A. (1939). Taxonomia de *Coffea arabica* L. Campinas, Brasil.
- 716 20. Kruglyak, S., Durrett, R., Schug, M., & Aquadro, C. (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting  
717 from a balance between slippage events and point mutations.
- 718 21. Labouisse, J. P., Bellachew, B., Kotecha, S., & Bertrand, B. (2008). Current status of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources  
719 in Ethiopia: implications for conservation. Genetic Resources and Crop Evolution, 55(7), 1079–1093. doi:10.1007/s10722-008-  
720 9361-7
- 721 22. Legendre, P., & Gallagher, E. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. Oecologia.  
722 doi:10.1007/s004420100716
- 723 23. Leugeune, J. (1958). Rapport au Gouvernement Impérial d'Ethi opie sur la production caféière. Roma: FAO.
- 724 24. Liu, B. H. (1998). Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. Florida.  
725 doi:<https://doi.org/10.1201/9780203738658>
- 726 25. Medina, P. M., Mendes, A., & Monaco, L. (1969). Coffee. Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Veenman &  
727 Zonen, Wageningen.
- 728 26. Melese, K. (2016). The role of biotechnology on coffee plant propagation. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 6,  
729 13-19. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/234661918.pdf>
- 730 27. Meyer, F. G. (1965). Notes on wild *coffea arabica* from southwestern ethiopia, with some historical considerations. Economic  
731 Botany 19, 136–151. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02862825>
- 732 28. Palomino, C., López, C., Espejo, R., Mansilla, R., & Quispe, J. (2014). EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA  
733 DEL CAFÉ (*Coffea arabica* L.) EN VILLA RICA (PERÚ). Ecología Aplicada, 13(2). doi:ISSN 1726-2216.

- 734 29. Roasters, I. C. (12 de Febrero de 2021). Pink Bourbon de la finca Las Delicias en Colombia. Recuperado el 8 de Septiembre  
735 de 2022, de <https://ineffablecoffee.com/pink-bourbon-finca-las-delicias-colombia/>
- 736 30. Schiller, C. (2003). Monitoring river health initiative technical report number 36. National River Health Program.
- 737 31. Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature American Inc, 18. Obtenido  
738 de file:///D:/Downloads/schuelke2000.pdf
- 739 32. Smith, J., Chin, E., Shu, H., Smith, O., Wall, S., Senior, M., . . . Ziegler, J. (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as  
740 molecular markers in maize ( *Zea mays* L. ): comparisons with data from RFLPS and pedigree. TAG Theoretical and Applied  
741 Genetics. doi:10.1007/s001220050544
- 742 33. Tran H T, L. L. (2016). Advances in genomics for the improvement of quality in coffee. Journal of the Science of Food and  
743 Agriculture. doi:10.1002/jsfa.7692
- 744 34. Velásquez, R. (2016). Guía de variedades de café (Primera edición ed.). Guatemala: Asociación Nacional del Café, Anacafé.  
745 Obtenido de <https://www.anacafe.org/uploads/file/9a4f9434577a433aad6c123d321e25f9/Gu%C3%ADa-de-variedades-Ana->  
746 [caf%C3%A9.pdf](https://www.anacafe.org/uploads/file/9a4f9434577a433aad6c123d321e25f9/Gu%C3%ADa-de-variedades-Ana-)
- 747 35. Wilcox, R. (2012). Introduction to robust estimation and hypothesis testing. Academic Press.  
748 doi:<https://doi.org/10.1016/C2010-0-67044-1>
- 749 36. Wintgens, J. N. (2004). Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production: A Guidebook for Growers, Processors, Traders,  
750 and Researchers. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi:10.1002/9783527619627
- 751 37.

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

## Anexo 1

Figura A1. Hojas de café (*Coffea Arábica*).

## Anexo 2

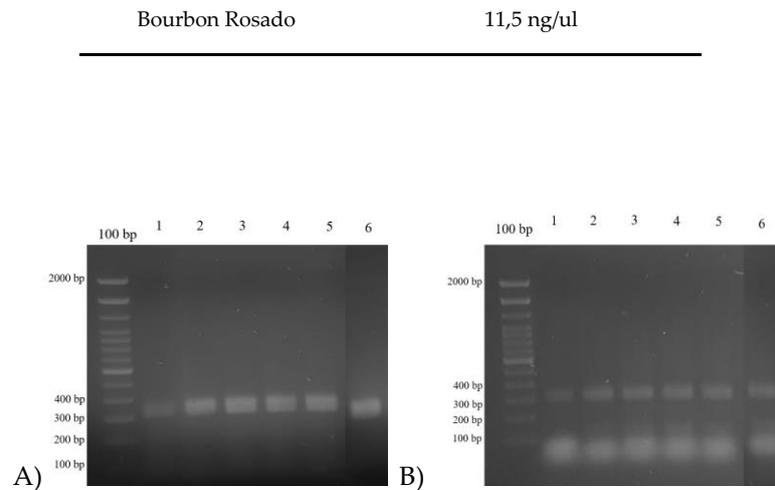
Tabla A.1 Concentración de ADN (1ra extracción)

Variedad	Concentración de ADN
Bourbon LM16	33,3 ng/ul
Geisha	108 ng/ul
Típica	43,2 ng/ul
Bourbon Fragancia	47,2 ng/ul
Bourbon Sidra	59,6 ng/ul
Bourbon Rosado	34,2 ng/ul

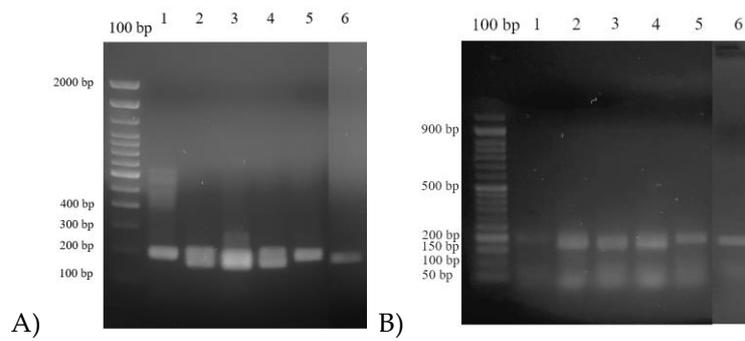
Tabla A.2. Concentración de ADN (2da extracción)

Variedad	Concentración de ADN
Bourbon LM16	13,9 ng/ul
Geisha	5,64 ng/ul
Típica	7,2 ng/ul
Bourbon Fragancia	7,32 ng/ul
Bourbon Sidra	12,5 ng/ul

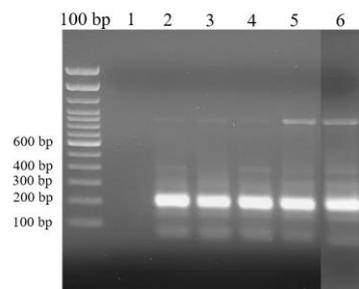
Anexo 3



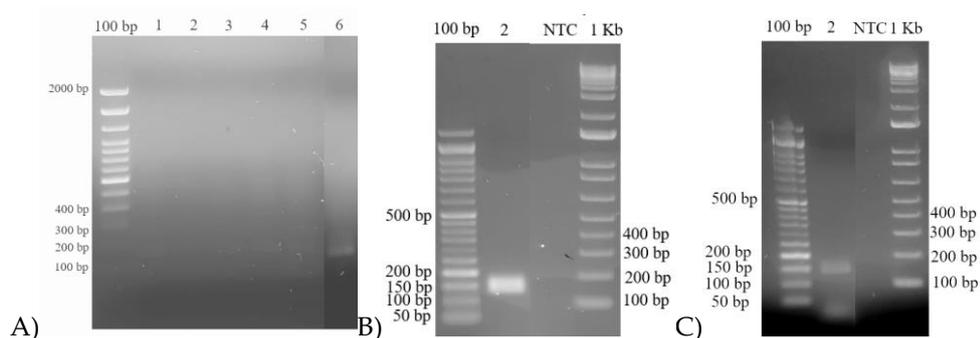
**Figura A2:** A) Primer M20 (Forward y reverse) a  $T_m$  55 °C. Tamaño entre 300-400. B). Primer M20 (Forward con M13 y reverse) a  $T_m$  56 °C. Tamaño entre 300-400. Tamaño descrito por Combes y et al 240–270 bp.



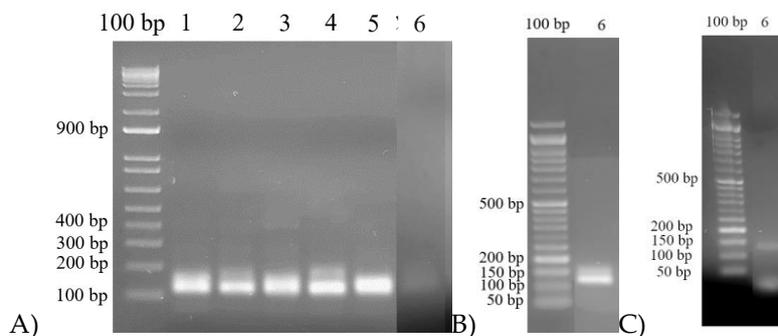
**Figura A3:** A) Primer M24 (Forward y reverse) a  $T_m$  55 °C. Tamaño entre 100-200. B) Primer M24 (Forward con M13 y reverse) a  $T_m$  56 °C. Tamaño entre 100-200. Tamaño descrito por Combes y et al 132–166 bp.



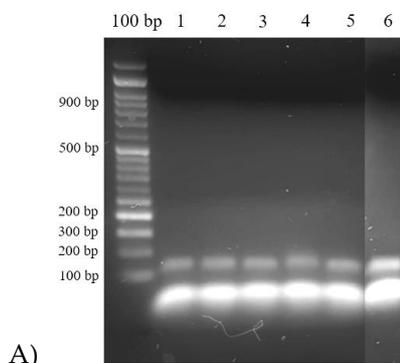
**Figura A4:** Primer M25 (Forward y reverse) a  $T_m$  65 °C. Tamaño entre 100-200. Tamaño descrito por Combes y et al 160–170 bp.



**Figura A5:** A) Primer M29 (Forward y reverse) a Tm 58 °C. Tamaño entre 100-200. B) Primer M29 (Muestra 2) (Tabla A.1) (Forward y reverse) a Tm 58 °C. Tamaño entre 100-200. C) Primer M29 (Muestra 2) (Tabla A.1) (Forward con M13 y reverse) a Tm 58 °C. Tamaño entre 100-200. Tamaño descrito por Combes y et al 103–122 bp.



**Figura A6:** A) Primer M32 (Forward y reverse) a Tm 64 °C. Tamaño entre 100-200. B) Primer M32 (Muestra 6) (Tabla A.1) (Forward y reverse) a Tm 64 °C. Tamaño entre 100-200. C) Primer M32 (Muestra 6) (Tabla A.1) (Forward con M13 y reverse) a Tm 64 °C. Tamaño entre 100-200. Tamaño descrito por Combes y et al 89–135 bp.



**Figura A7:** A) Primer M32 (Forward con M13 y reverse) a Tm 59 °C. Tamaño 100-200. Tamaño descrito por Combes y et al 100–132 bp.

**Anexo 4**

**Tabla A.3** Valores de tamaño de alelos

Variedad	M20	M24	M25	M29	M32					
Bourbon LM16	310	330	190	285	195	202	135	153	118	147
Geisha	0	0	0	0	195	202	0	0	118	147
Típica	310	330	170	181	195	202	135	151	118	143
Bourbon Fragancia	310	332	170	190	195	202	135	153	118	164
Bourbon Sidra	310	332	185	285	195	202	135	153	118	135
Bourbon Rosado	311	332	166	285	195	202	135	153	0	0

En la Tabla A.3 podemos encontrar a las seis variedades de *coffea arábica* y los valores de los dos alelos resultantes en la amplificación con los marcadores, estos valores se tomaron del programa Peak Scanner Software v1.0.