

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN**

ESCUELA DE POSTGRADO

CARACTERIZACIÓN DE VARIETADES CULTIVADAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CONSERVADAS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CATIE.

POR

CARLOS GERARDO ASTORGA DOMÍAN

CATIE

**TURRIALBA, COSTA RICA
1999**

**CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACION PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADO**

CARACTERIZACION DE VARIEDADES CULTIVADAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CONSERVADAS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CATIE

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito parcial para optar por el grado de:

Magister Scientiae

Por

Carlos Gerardo Astorga Domian

Turrialba, Costa Rica
1999

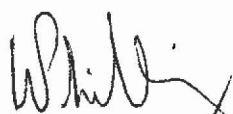
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección del Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

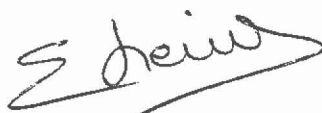
FIRMANTES:



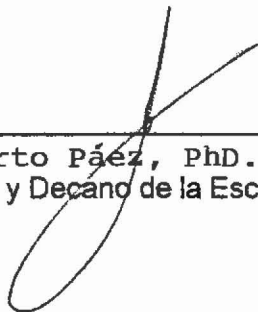
François Anthony, PhD.
Consejero Principal



Wilberth Phillips, MSc.
Miembro Comité Consejero



Hervé Etienne, PhD.
Miembro Comité Consejero



Gilberto Páez, PhD.
Director y Decano de la Escuela de Posgrado



Carlos Astorga Domián
Candidato

DEDICATORIA

Ami esposa Ana Paulina y mis hijos

Paula Margarita

Carlos Eduardo

Con amor y gratitud por su apoyo y comprensión

A la memoria de mi padre y hermano

Con mucho amor y ejemplos de superación

A mi madre

Con cariño por sus esfuerzos y buenos consejos

A mi hermano y esposa

Con mucho cariño

A mis suegros

Con mucho cariño

A mi sobrino propio y políticos

Con mucho cariño

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

A Francois Anthony por su amistad, valiosa ayuda, enseñanzas y consejos a lo largo de mis estudios, desarrollo de la investigación, y por la revisión y edición de la tesis.

A los miembros del Comité Asesor Wilberth Phillips y Hervé Etienne por su amistad y apoyo en las diferentes áreas Técnicas y Científicas de la investigación.

Al personal de la Unidad de Biotecnología y Recursos Genéticos del CATIE, por su desinteresada colaboración en la realización de la investigación; especialmente a Olman Quiros por la ayuda brindada en el laboratorio de biología molecular y Joaquín Abendaño en la toma de datos de campo.

A las autoridades del CATIE por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de postgrado, especialmente a los Drs. Rubén Guevara, Markku Kanninen, Juan Antonio Aguirre, Elkin Bustamante y Gilberto Paéz.

Al personal de la Unidad de Informática, Biblioteca y Escuela de Postgrado del CATIE por su colaboración. Especial reconocimiento a Johnny Pérez por los consejos y ayuda en el procesamiento de datos.

Por último, un especial agradecimiento a los compañeros y amigos del CATIE y en Costa Rica quienes directa o indirectamente me apoyaron para compartir mis alegrías y angustias hasta culminar con el objetivo propuesto.

| | Pag. |
|--|-------------|
| 2. 2. 3. Características de selección del grano de café | 19 |
| 2. 3. Caracterización de germoplasma | 20 |
| 2. 3. 1. Caracterización agro-morfológica | 23 |
| 2. 3. 2. Marcadores moleculares | 24 |
| 2. 3. 3. Análisis PCR/RAPD | 25 |
| 2. 4. Análisis Estadístico | 29 |
| 2. 4. 1. Métodos estadísticos multivariados aplicados en biología molecular | 29 |
| III. MATERIALES Y METODOS | 32 |
| 3.1 Estudio de campo | 32 |
| 3.1.1. Material experimental | 32 |
| 3.1.2. Métodos | 35 |
| 3.1.3. Diseño experimental | 38 |
| 3. 2. Caracterización molecular | 38 |
| 3. 2. 1. Ubicación | 38 |
| 3. 2. 2. Material experimental | 39 |
| 3. 2. 3. Métodos | 39 |
| 3.2.3.1. Aislamiento de ADN | 40 |
| 3.2.3.2. Cuantificación del ADN | 41 |
| 3.2.3.3. Amplificación del ADN | 41 |
| 3.3. Análisis de los datos | 43 |
| 3. 3. 1. Análisis de datos de granulometría y características morfológica | 43 |
| 3.3.2. Análisis de datos moleculares | 47 |
| 3. 3. 2. 1. Matriz de similitud y distancias genéticas | 47 |
| IV. RESULTADOS | 50 |
| 4. 1. Caracterización morfo-agronómica | 50 |
| 4. 1. 1. Caracterización morfológica | 50 |

| | Pag. |
|---|-------------|
| 4. 1. 2. Color del brote y ángulo de inserción | 51 |
| 4. 1. 3. Características de frutos y granos | 52 |
| 4. 1. 3. 1. Porcentaje de frutos flotantes | 52 |
| 4. 1. 3.2 Peso de 100 granos de café oro | 53 |
| 4. 1. 3. 3. Porcentaje de Rendimiento de café oro | 54 |
| 4. 1. 3.4. Relleno del fruto | 55 |
| 4. 1. 3. 5. Porcentaje de grano caracol | 56 |
| 4. 1. 3. 6 Comportamiento de las variables de fertilidad | 57 |
| 4. 1 .4. Componentes de varianza | 59 |
| 4 .1 .5. Índice de Heredabilidad | 60 |
| 4. 1. 6. Correlaciones entre características derivadas de producción y fertilidad | 61 |
| 4. 1. 7. Discriminación entre Typica y Bourbon | 62 |
| 4. 1. 8. Similitud de las accesiones T.04387 y T.05286 | 64 |
| 4. 2 Caracterización. Molecular | 67 |
| 4. 2. 1 Aislamiento y determinación de la concentración de ADN | 67 |
| 4. 2. 2 Amplificación de ADN | 71 |
| 4. 2. 3 Selección de “primers” polimórficos | 72 |
| 4. 2. 4 Caracterización Molecular | 76 |
| 4. 2. 5 Matriz de distancias y dendrogramas | 77 |
| 4. 2. 6 Análisis de componentes principales para los grupos Typica y Bourbon | 80 |
| V. DISCUSIÓN | 84 |
| 5.1. Eficiencia de los marcadores moleculares para la caracterización de germoplasma | 84 |
| 5. 1. 1. Eficiencia de los protocolos de laboratorio | 84 |
| 5.1.2. Análisis del número de RAPDs por grupo de materiales | 85 |
| 5.2. Estructura de la variabilidad agro-morfológica | 87 |
| 5. 2. 1. Análisis de las variables | 87 |
| 5. 2.2. Variabilidad morfológica | 90 |

| | |
|---|------------|
| 5. 2. 3. Variabilidad de la fertilidad | Pag. 91 |
| 5.3. Caracterización de las variedades tradicionales Typica-Bourbon | 95 |
| 5.4. Detección de introgresiones del <i>C. canephora</i> | 98 |
| VI. CONCLUSIONES | 100 |
| VII. RECOMENDACIONES | 104 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA | 105 |
| IX. ANEXOS | 113 |

ASTORGA, C. 1999. Caracterización de variedades cultivadas de café (*Coffea arabica* L) conservadas en el banco de germoplasma del CATIE. Tesis Mag. Sci. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 130 p.

Palabras claves: caracterización, diversidad genética, *Coffea arabica*, RAPDs, marcadores moleculares, recursos genéticos, cultivares

RESUMEN

El cultivo del café ha sido tradicional en Centro América y ligado al desarrollo socio-económico, generó el 3,8% del Producto Interno Bruto en 1996 y ocupa el tercer lugar en la producción en el mundo. La producción se concentra mayormente en manos de pequeños agricultores, además es una fuente importante de generación de empleo.

La especie más cultivada en el mundo es *C. arabica* originaria de las regiones altas de Etiopía y Kenia y cultivada en las tierras altas de América Tropical. El material genético actualmente cultivado tiene como origen una base genética muy estrecha, derivada básicamente de dos poblaciones de porte alto Typica y Bourbon a partir de muy pocas semillas introducidas en el siglo, XVIII y XIX de Holanda y la Isla Bourbon. Con el descubrimiento y selección de una planta de porte bajo en Brasil, se desarrollo la variedad Caturra, la cual permite cosechas más fáciles y densidades de siembra más altas, pero susceptibles a la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y los nemátodos. Otro esquema de mejoramiento genético se generó a partir de los Híbridos de Timor, las variedades que derivan del Híbrido de Timor son resistentes a la roya, a algunas especies de nemátodos y a algunas cepas de la antracnosis del fruto (*Colletotrichum kahawae*).

Los objetivos de esta investigación fueron evaluar en el CATIE, Turrialba, Costa Rica, el poder de los marcadores moleculares para la caracterización varietal de café y evaluar la diversidad genética del material cultivado (Typica, Bourbon, Silvestres, e Introgresados) de café por marcadores moleculares y observaciones agro-morfológicas.

Para la caracterización ago-morfológica se utilizaron características de la planta, fruto y grano. Se determinó para las características morfológicas una alta variabilidad genética entre variedades y entre árboles. La variación entre variedades es producto de la variación genética, en tanto que la variación entre árboles es producto de la influencia del medio ambiente, factores fisiológicos y de manejo del germoplasma, por ser materiales homocigotos.

El color del brote de café es una característica importante para clasificar las dos poblaciones básicas de Typica y Bourbon. Los componentes de varianza indican que el factor variedad es el que más contribuye a la variabilidad observada, y los índices de heredabilidad demuestran que es factible obtener progresos genéticos en programas de selección en las variedades estudiadas.

Las características de fruto, grano y fertilidad permitieron determinar la variabilidad genética presente entre grupos de café. La característica de relleno del fruto se presentó como la más importante para clasificar variedades entre el grupo Typica y Bourbon.

Para la caracterización molecular se utilizó RAPD. El polimorfismo detectado fue alto debido a la presencia de genotipos de *C. canephora* y al grupo de introgresados, sin embargo, el número de marcadores polimórficos fue bajo. Por medio del cálculo de las similitudes entre individuos, dendrogramas y análisis de componentes principales se estimó las distancias genéticas entre grupos, y se generó la clasificación de los grupos genéticos. Se identificó los marcadores diferentes entre cada grupo y los marcadores comunes que se comparten entre grupos.

Se determinó que la distancia genética entre el grupo Typica y Bourbon fue no significativa, demostrando la estrecha base genética que caracteriza estos grupos; sin embargo la distancia genética de estos grupos respecto al grupo Silvestres fue significativamente mayor, presentando una mayor variabilidad genética entre estos grupos.

ASTORGA, C. 1999. Characterization of cultivated varieties of coffee (*Coffea arabica* L) preserved in the germplasm bank of CATIE. Thesis Mag. Sci. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 130 p.

Key words: characterization, genetic diversity, *Coffea arabica*, RAPDs, molecular markers, genetic resources, cultivars.

SUMMARY

The production of the coffee has been traditional in Central America and bound to the socio-economic development, generated 3.8% of the gross internal product in 1996, and occupies the third place in the production in the world. The production is concentrated mostly in small farmer hands, furthermore it is an important source of employment generation.

The specie most cultivated in the world is *C. arabica* originating in the high regions of Ethiopia and Kenya and cultivated in the high lands of Tropical America. The currently cultivated genetic material has as origin a very close genetic base, derived basically from two populations from high freightage Typica and Bourbon as of very few seeds introduced in the century, XVIII and XIX from Holland and the Island of Bourbon. With the discovery and selection of a freightage low growth plant in Brazil, was development the variety Caturra, these one which permits crops easier and highest sowing densities, but susceptible to the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) and the nematodes. Other genetic improvement program was generated as of the Hybrids of Timor, the varieties that derive from the Timor Hybrid are resistant to the coffee rust, to some kinds of nematodes and to some vine-stocks of the antracnosis of the fruit (*Colletotrichum kahawae*).

The objectives of this research were evaluated in the CATIE, Turrialba, Costa Rica, the performance of the molecular markers for the characterization variety of coffee and to evaluate the genetic diversity of the material cultivated (Typica, Bourbon, Wild, and "Introgresados") of coffee by molecular markers and agro-morphological observations.

For the agro-morphological characterization were used characteristic of the plant, fruit and grain. It was determined for the morphological characteristics a high genetic variability between varieties and between trees. The variation between varieties is product of the genetic variation, while the variation between trees is product of the influence of the environment, physiological factors and germplasm managing, because the natural homocigosity of the material.

The color of the coffee outbreak is a key feature to classify the two basic populations of Typica and Bourbon. The variance components indicate that the factor variety is the one which more contributes to the observed variability, and the heredability index demonstrate that it is feasible to obtain genetic progress in selection programs in the studied varieties. The fruit characteristics, grain and fertility permitted to determine the genetic variability present between groups of coffee. The landfill characteristic of the fruit was presented as the most important to classify varieties between the group Typica and Bourbon. For the molecular characterization was used RAPD. The polymorphism detected was high due to

the presence of genotypes of *C. canephora* and to the group of "introgresados", however, the number of polymorphism markers was under.

For middle of the calculation of the similarities between individuals, dendrograms and principal components analysis was estimated the genetic distances between groups, and was generated the classification of the genetic groups. It was identified the different markers between each group and the common markers that are shared between groups.

It was determined that the genetic distance between the group Typica and Bourbon it was very small, demonstrating the close genetic base that characterizes these groups, however the genetic distance of these groups respect to the Wild group was significantly high, representing a greater genetic variability between these groups.

LISTA DE CUADROS

| | Pag. |
|---|------|
| Cuadro 1. Variedades de los grupos Typica (T) y Bourbon (B) utilizadas para el estudio de características de producción y fertilidad del grano de café. | 33 |
| Cuadro 2. Descendencias del Híbrido de Timor (HDT) utilizados para el estudio de características de producción y fertilidad del grano de café. | 34 |
| Cuadro 3. Variedades de los grupos Typica (T) y Bourbon (B) utilizadas para la caracterización morfológica de la hoja de café. | 36 |
| Cuadro 4. Características evaluadas de las muestras de frutos de café cosechados de las variedades de café Typica, Bourbon e Híbrido de Timor. | 37 |
| Cuadro 5. Descripción de los genotipos utilizados para realizar el estudio molecular por grupo: T: Typica, B: Bourbon, HDT: Híbrido de Timor, INT: Introgresado, SIL: Silvestre, CAN: <i>Coffea canephora</i> | 40 |
| Cuadro 6. Promedio, coeficiente de variación, desviación estándar, nivel de significancia para longitud y ancho de la hoja de café. | 50 |
| Cuadro 7. Componente de varianza e índices de heredabilidad (H^2) para longitud y ancho de hoja para los grupos Typica y Bourbon e Introgresados de café. | 51 |
| Cuadro 8. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de porcentaje de frutos flotantes para variedades cultivadas e introgresadas de café. | 53 |
| Cuadro 9. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de peso de 100 granos de café oro (11% de Humedad) para variedades cultivadas e introgresadas de café. | 54 |
| Cuadro 10. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de porcentaje de rendimiento de café oro para las variedades Typica y Bourbon e introgresadas de café. | 55 |
| Cuadro 11. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de | 56 |

| | Pag. |
|--|-------------|
| significancia para la característica relleno del fruto de café para las variedades Typica y Bourbon e introgresadas de café. | |
| Cuadro 12. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de porcentaje de granos caracoles para variedades cultivadas e introgresadas de café. | 57 |
| Cuadro 13. Componentes de varianza en porcentaje para las variables derivadas de producción y fertilidad de café para los grupos Typica y Bourbon, y variedades introgresadas. | 59 |
| Cuadro 14. Índice de heredabilidad para los grupos Typica y Bourbon e Introgresados determinados para las variables derivadas de granulometría del grano de café. | 60 |
| Cuadro 15. Correlaciones de las características de producción y variables de fertilidad del grano de café para los grupos Typica y Bourbon, e Introgresados. | 61 |
| Cuadro 16. Coeficientes de clasificación del análisis discriminante para las variedades Amphilo, Rume Sudan. ET-6 y ET-59 de café. | 63 |
| Cuadro 17. Clasificación de las variedades Amphilo, Rume Sudan, ET-6 y ET59 de café por el análisis discriminante. | 63 |
| Cuadro 18. Resultados del análisis de varianza para las características de producción y fertilidad de café de las accesiones T.04387 y T.05286. | 65 |
| Cuadro 19. Promedio, coeficiente de variación, desviación estándar y nivel de significancia para las características de longitud y ancho de la hoja de café de las accesiones T.04387 y T.05286. | 65 |
| Cuadro 20. Componentes de varianza e índices de heredabilidad (H^2) para las características de longitud y ancho de la hoja de café para las accesiones T.04387 y T.05286. | 66 |
| Cuadro 21. Concentración de ADN extraído de los genotipos de café Arabica y <i>C. canephora</i> seleccionados para el estudio de caracterización molecular. | 68 |
| Cuadro 22. Promedio, Desviación estándar y coeficiente de variación de rendimiento de ADN en $\mu\text{g/ml}$ por grupo genético de café. | 69 |

| | Pag. |
|---|-------------|
| Cuadro 23. Primers polimórficos utilizados para el estudio de la diversidad genética de Café. | 74 |
| Cuadro 24. Número de loci polimórficos y frecuencia en porcentaje por grupo genético de café. | 76 |
| Cuadro 25. Loci polimórficos comunes (debajo de la diagonal) y loci diferentes (sobre la diagonal) entre los grupos Typica, Bourbon, Silvestre, Introgresados y <i>C. canephora</i> . | 77 |
| Cuadro 26. Medidas de distancia genética (debajo de la diagonal) e identidad genética (sobre la diagonal) para los grupos Typica, Bourbon y Silvestres de café. | 77 |
| Cuadro 27. Medidas de distancia genética (debajo de la diagonal) e identidad genética (sobre la diagonal) para los grupos Introgresados, Híbridos de Timor y <i>C. canephora</i> . | 79 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pag. |
|---|------|
| Figura 1. Esquema de producción de los RAPDs por el proceso de amplificación del ADN, mediante la técnica de PCR. | 29 |
| Figura 2. Flujograma de análisis estadísticos de los datos de granulometría y morfológicos de café. | 46 |
| Figura 3. Flujograma de análisis estadísticos de los datos moleculares generados con la metodología RAPDs en los grupos de café. | 49 |
| Figura 4. Frecuencias y desviación estándar para las características de porcentaje de frutos flotantes, relleno de fruto y porcentajes de grano caracol de café por mes de cosecha. | 58 |
| Figura 5. Ejemplo de cuantificación de ADN en gel de agarosa de 14 genotipos de café para el estudio de caracterización molecular. | 70 |
| Figura 6. Ejemplo de amplificación de ADN de café con la técnica RAPD's con el "primer" OPM-4 en 19 muestras. | 75 |
| Figura 7. UPGMA, dendograma (1000 repeticiones) de los grupos Typica, Bourbon y Silvestres de café basado en las distancias genéticas de Nei (1978). | 78 |
| Figura 8. UPGMA, dendograma (1000) repeticiones de los grupos Introgresados, Híbridos de Timor y <i>C. canephora</i> , basado en las distancias genéticas de Nei (1978). | 79 |
| Figura 9. UPGMA, dendograma de los grupos Typica, Bourbon y Silvestres de café, basado en el índice de similitud Dice. | 81 |
| Figura 10. UPGMA, dendograma del grupo de Introgresados de café y Robustas (<i>C. canephora</i>), basado en el índice de similitud Dice. | 82 |
| Figura 11. Distribución de genotipos de los grupos Typica y Bourbon de café, en función de los componentes principales (Factor 1 y Factor 2) basado en las diferencias genéticas de Nei (1978). | 83 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pag |
|--|-----|
| Anexo 1. Método CTAB-Minipreparaciones (Murray y Thompsom,1980) | 114 |
| Anexo 2. Metodología para la cuantificación de ADN con electroforesis en gel de agarosa. | 116 |
| Anexo 3. Composición del buffer TBE 0,5X (Tris Borato EDTA). | 117 |
| Anexo 4. Preparación de “Master Mix”. | 118 |
| Anexo 5. Prueba de medias “LSMean” por variedad del grupo Typica y Bourbon para las características longitud y ancho de hoja de café | 119 |
| Anexo 6. Prueba de medias “LSMean” por variedad para los grupos Typica y Bourbon para la variable porcentaje de granos flotantes de café. | 121 |
| Anexo 7. Prueba de medias “LSMean” por variedad para los grupos Typica y Bourbon para la variable peso de 100 granos oro de café. | 122 |
| Anexo 8. Prueba de medias “LSMean” por variedad para los grupos Typica y Bourbon para la variable porcentaje de rendimiento de café oro. | 123 |
| Anexo 9. Prueba de medias “LSMean” por variedad para los grupos Typica y Bourbon para la variable relleno del fruto de café. | 124 |
| Anexo 10. Prueba de medias “LSMean” por variedad para los grupos Typica y Bourbon para la variable porcentaje de granos caracoles de café. | 125 |
| Anexo 11. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable porcentaje de granos flotantes de café. | 126 |
| Anexo 12. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable peso de 100 granos de café oro. | 126 |
| Anexo 13. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable porcentaje de rendimiento oro de café. | 127 |
| Anexo 14. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable relleno del fruto de café. | 127 |
| Anexo 15. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable porcentaje de granos caracoles de café. | 128 |
| Anexo 16. Prueba de Tukey por accesión para el Híbrido de Timor T.04387 y T.05286, para las características longitud y ancho de la hoja de café. | 128 |

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del café ha sido tradicional en Centro América y ligado fuertemente a su historia y desarrollo económico-social. La producción en esta región durante el periodo 1997-1998 fue de 11,9 millones de sacos de 60 kg; ocupando la tercera posición en cuanto a producción en el mundo. La contribución del café en la economía global centroamericana en términos del Producto Interno Bruto para 1995 y 1996 fue de 4,7% y 3,98% respectivamente (IICA, 1999).

La producción de este grano se caracteriza por estar mayormente en manos de pequeños agricultores (227 mil pequeños productores), distribuidos en diversas condiciones ecológicas. Es una de las mayores fuentes de generación de empleo en el sector agrícola; para 1996-1997 generó 236 mil empleos directos (sin incluir la fuerza laboral familiar por la complejidad para cuantificarla) y 1,2 millones de empleos indirectos. Se estima que el café contribuye al sostenimiento de 1,67 millones de centroamericanos que obtienen ingresos en todos los eslabones de la cadena de producción y procesamiento del café (IICA, 1998).

Dentro del género *Coffea* L, la especie *C. arabica* L. es la más cultivada en el mundo. Es originaria de las tierras altas de Etiopía y Kenia y cultivada en las regiones de altura de América Tropical, Africa del Este y Asia. Se caracteriza por ser la única especie alotetraploide ($2n=4x=44$ cromosomas) dentro del género *Coffea*; y por presentar una autocompatibilidad entre el 85-90% (ver síntesis de Anthony *et al.*, 1999).

El desarrollo de la caficultura en América tropical tiene su origen en una base genética muy reducida derivada básicamente de dos poblaciones de porte alto Typica y Bourbon a partir de muy pocas semillas, que se introdujeron en el siglo XVIII. Con el descubrimiento en 1939 de una planta de porte bajo en Brasil en una población de Bourbon, se creó la variedad denominada Caturra. El porte pequeño permite cosechas más fáciles y densidades de siembra más altas. Los programas de mejoramiento genético en América Latina, se han concentrado en la selección de

genotipos de porte bajo, la calidad del fruto reduciendo los defectos del grano, la calidad de la bebida y la selección de nuevos materiales más productivos que presenten una amplia adaptación a diferentes ambientes (Moreno y Castillo, 1984).

El uso generalizado de las variedades de porte bajo por su buen comportamiento agronómico bajo condiciones de plena exposición solar, produjo un cambio sustancial en las prácticas culturales tornándose el café en un cultivo de altos insumos. A pesar de las buenas características de productividad y rendimiento, estas variedades mostraron una alta susceptibilidad a plagas como la roya (*Hemileia vastarix* Berk. et Br.) que llegó al continente americano en los años de 1970 (Bertrand *et al.*, 1999).

Las variedades que derivan de cruces entre las variedades de porte bajo y el híbrido interespecífico natural (*C arabica* x *C canephora*) seleccionado en la Isla de Timor en 1927, denominado Híbrido de Timor, son resistentes a la roya, a algunas poblaciones de nemátodos (Bertrand *et al.*, 1995) y a algunas cepas de “Coffee berry disease (CBD)”, (enfermedad muy grave que existe en Africa que es causada por el hongo *Colletotrichum kahawae*) (Aguilar *et al.*, 1997a y 1997b). Sin embargo, los segmentos cromosómicos introgresados, heredados del ancestro *C. canephora* por el Híbrido de Timor, podrían alterar la calidad de la bebida debido a la transferencia no controlada de genes indeseables.

En años posteriores la caficultura fue amenazada por el surgimiento de nuevas plagas como la broca (*Hypothenemus hampei*) u otras que han tenido una incidencia limitada en el cultivo (ojo de gallo, antracnosis, cochinillas de la raíz y nemátodos) y por la amenaza del CBD. El origen reducido de las variedades de café Arabica cultivado en el continente Americano representa una estrecha proporción de la variabilidad genética potencial disponible en el acervo genético de la especie; ya que se caracteriza por una base genética fundamentada en un número reducido de plantas.

Los materiales silvestres recolectados por el IRD¹ (ex ORSTOM) en Etiopía fueron objeto de una evaluación fenotípica multilocal (Charrier, 1978); las características observadas de naturaleza morfológica y agronómica revelaron la presencia de una heterocigosis residual relativamente importante en algunos orígenes. Existe también bastante polimorfismo para varios caracteres con variaciones por ejemplo en estos individuos, en el contenido de cafeína de los granos que varía entre 1 y 2% de materia seca aproximadamente (Berthaud, 1978a; Bouharmont, 1995).

Estudios realizados en América Latina y Camerún ponen en evidencia la existencia de una resistencia incompleta a la roya en algunas plantas de origen etíope que podrían actuar en complemento a la resistencia específica (Eskes, 1983; Gil *et al.*, 1990; Bourharmont, 1995). Plantas de origen etíope, resistentes a los nemátodos fueron seleccionadas para la raza endémica *Meloidogyne incognita* de Guatemala (Anzueto *et al.*, 1991).

Los cafés etíopes de la colección de CATIE² han revelado una gran variabilidad para los caracteres de interés para los fitomejoradores, como la fertilidad, granulometría y la conversión a café oro. La resistencia a plagas y enfermedades ha sido recientemente estudiada en las introducciones de café silvestre recolectadas en Etiopía y los resultados de las observaciones repetidas en la colección y las pruebas de laboratorio muestran que es posible seleccionar procedencias resistentes a la raza II de la roya anaranjada (Anthony, 1996; Anthony, 1997).

El inicio de los estudios de los recursos genéticos de café empezó en CATIE alrededor de los años 50. Más tarde y con base en la evaluación fenotípica y de productividad del material genético, el convenio CATIE-PROMECAFE³ inició programas de selección y mejoramiento de las variedades cultivadas. Hasta ahora la diversidad conservada por la Unidad de Recursos Genéticos del CATIE ha sido poco utilizada en los programas de mejoramiento, debido a una reducida caracterización de los genotipos (Anthony *et al.*, 1993a).

¹ Institut de Recherche pour le Développement, ex ORSTOM, Paris, Francia

² Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica

³ Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y Modernización de la Caficultura en México, Centroamérica, República Dominicana y Jamaica.

A partir de 1995 se establece el programa regional para el mejoramiento genético de *C. arabica* y el establecimiento de una nueva base genética, con la participación de PROMECAFE, el CATIE y la Cooperación Francesa (CIRAD⁴, IRD y MAE⁵). El programa pretende aumentar la base genética del material cultivado utilizando la variabilidad del material silvestre recolectado en el área de origen de la especie *C. arabica* para el análisis de la estructura de la diversidad genética disponible en los materiales silvestres (Bertrand *et al.*, 1997).

En este estudio se caracterizaron 84 genotipos morfológicamente, y 38 molecularmente, representados por variedades cultivadas de Typica y Bourbon, el Híbrido de Timor, variedades introgresadas del Híbrido de Timor, genotipos de origen Silvestres y genotipos de *C. canephora* de la colección del CATIE. Se seleccionaron las características más importantes y discriminantes entre entradas basadas en la lista de descriptores para café elaborada por IPGRI (1996).

⁴ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Paris, Francia.

⁵ Ministerio de Asuntos Extranjeros de la República Francesa.

1. 1. Objetivos

1. 1. 1. Generales

- Precisar la eficiencia de los marcadores moleculares RAPD para la caracterización varietal de café.
- Evaluar la diversidad genética del material cultivado (Typica, Bourbon, Catimores y Sarchimores) en café por marcadores moleculares y observaciones de campo en la colección del CATIE.

1. 1. 2. Específicos

- Estimar las diferencias entre las variedades cultivadas que derivan del Typica y del Bourbon.
- Analizar las relaciones entre los materiales silvestres y las variedades cultivadas.
- Detectar segmentos cromosómicos introgresados de *C. canephora* en las líneas de Catimor y Sarchimor.
- Racionalizar la conservación de los Recursos Genéticos identificando plantas no conformes a su identificación en el germoplasma de café del CATIE.

1.2. Hipótesis

- Existen diferencias entre las variedades que derivan del Typica y Bourbon.
- Existen segmentos cromosómicos introgresados de *C. canephora* en las líneas de Catimor y Sarchimor.
- Es posible racionalizar el manejo de los Recursos Genéticos basados en la conformidad de las plantas del germoplasma del CATIE.

II. REVISION DE LITERATURA

2. 1. Origen del cultivo del café Arábica

El cultivo del café Arábica se inició en Etiopía, lugar de origen, donde se encuentra en estado silvestre. La fecha del inicio del cultivo se estima a comienzos del siglo VIII (Anthony *et al.*, 1999). El cultivo se mantuvo como un monopolio de los Arabes en las cercanías del Mar Rojo, hasta el siglo XV, con una fuerte expansión en Arabia del Sur (lo que hoy es Yemen) en el siglo XIV, y en Oriente Medio durante el siglo XV. Los intereses comerciales ligados al auge de la bebida fueron luego el origen del robo de plantas o de semillas.

2. 1. 1. Introducción del café en Europa.

La introducción del café en Europa fue objeto de varias versiones que difieren sobre las condiciones de la salida de las plantas de Arabia por parte de Holandeses, a finales del siglo XVII, y sobre las etapas de su viaje hasta Holanda (ver síntesis de Anthony *et al.*, 1999). Sin embargo, todas coinciden que el primer traslado se efectuó de Java al Jardín Botánico de Amsterdam, hacia 1706, y fue de una sola planta. Este individuo jugó un papel excepcional en la historia de la creación varietal puesto que fue el origen de la mayoría de las variedades cultivadas en el mundo (Chevalier y Dagron, 1928; Carvalho, 1946).

En 1714, después de la firma del tratado de paz de Utrecht entre Holanda y Francia, el burgomaestre de Amsterdam decidió ofrecer una planta pequeña de café al rey Luis XIV. La planta prosperó en el invernadero del Jardín de plantas de París, y produjo rápidamente semillas (Chevalier y Dagron, 1928). En 1715, Francia recibió algunas plantas de parte del sultán de Yemen, que fueron enviadas a la Isla de Bourbon (actualmente Isla de la Reunión) (Perrard, 1993).

2. 1. 2. Introducción del café Arábica en el continente americano

Las primeras introducciones de café en el continente americano se registran a comienzos del siglo XVIII. Unas plantas fueron enviadas desde Amsterdam a la Guyana Holandesa, y de París a la isla de Martinica en las Antillas. El cultivo se extendió rápidamente en la Guyana Francesa en 1719, a partir de la Guyana Holandesa, luego a Brasil en 1727. Aparentemente las semillas producidas en gran cantidad en la Guyana Francesa dieron origen al desarrollo del cultivo en Martinica (Chevalier y Dagron, 1928). Los ingleses introdujeron plantas de café a Jamaica en 1730. A finales del siglo XVIII, el cultivo se extendió al Caribe (Cuba, Puerto Rico, Santo Domingo), México y Colombia.

Semillas de café de la isla Bourbon fueron introducidas en Brasil entre 1860 y 1870. Semillas de otros cafés, cercanos a los de la isla Bourbon e identificados como “café de Sumatra”, llegaron a Brasil en 1896, a través de Londres (Krug *et al.*, 1939).

Los cafés de Yemen dieron origen a dos tipos de café Arábica: *C. arabica* var. *arabica*, conocido como Arábigo, Typica o Típica, que constituyó la base genética de las primeras variedades cultivadas en América y en Asia, y *C. arabica* var. *bourbon* que se difundió a partir de la isla Bourbon (Krug *et al.*, 1939; Carvalho *et al.*, 1969).

2. 2. Recursos genéticos conservados en colecciones de germoplasma

Los cafés del género *Coffea* se encuentran en estado silvestre en los bosques de la zona intertropical de África y de la región malgache. Se presentan en forma de árboles o arbustos, a veces como matorral, y forman poblaciones silvestres más o menos densas dependiendo de las especies. Más de un centenar de especies de café han sido descritas por los botánicos (Lebrun, 1941; Chevalier, 1947; Bridson y Verdcourt, 1988; Stoffelen, 1998).

La especie *C. arabica* ha sido recolectada en Etiopía, Sur de Sudán y en Kenia, centro de origen, y en Yemen considerado como centro secundario de origen. Para todas las recolecciones de plantas cultivadas, conviene distinguir los individuos silvestres extraídos del bosque, los

individuos semi-silvestres que han sido extraídos de su medio natural para ser cultivados y los individuos seleccionados en las plantaciones. La mayoría del material recolectado en Etiopía por la FAO en 1964 y 1965 (FAO, 1968), luego por el IRD en 1966 (Guillaumet y Hallé, 1978) fue extraído de plantaciones de tipo familiar o industrial. Algunos orígenes etíopes corresponden a cosechas realizadas en el bosque. En Kenia, se recolectaron aproximadamente 80 genotipos de café en una población natural del Monte Marsabit (Berthaud *et al.*, 1980; Anthony *et al.*, 1987). Finalmente en Yemen, donde el café fue introducido por el hombre aparentemente en el siglo XIV, las recolecciones se efectuaron en plantaciones comerciales donde los investigadores describieron seis morfotipos (Eskes, 1989).

Además de estas tres prospecciones principales, otras misiones de recolección tuvieron lugar en el centro de origen de *C. arabica*, para encontrar nuevos candidatos para la selección (van der Vossen, 1985). Dos prospecciones se distinguen por el gran impacto que tuvo el material recolectado en la caficultura: la de Jones (1956) en Etiopía, que dio origen a las variedades Dalle, Dilla y Gimma, y la de Thomas (1942) en el sudeste de Sudán, que permitió el descubrimiento de variedades tales como Rume Sudán y Barbuk Sudán.

La recolección de otras especies de café estuvo motivada por la destrucción rápida de los ecosistemas forestales africanos y malgaches. El producto de estas prospecciones por el IRD es impresionante, cuantitativamente y cualitativamente: aproximadamente 20,000 cafés silvestres, que representan más de 70 especies, fueron recolectados y 300 poblaciones silvestres fueron localizadas (Anthony, 1992). El descubrimiento reciente de unas diez nuevas especies en Africa Central muestra que el inventario de los recursos genéticos del café no ha concluido (Anthony *et al.*, en prensa 1).

2. 2. 1. Colecciones de germoplasma

El material recolectado en Etiopía ha sido ampliamente propagado en todo el mundo. Existen diez colecciones importantes para la especie *C. arabica* : cinco en Africa (Etiopía, Kenia, Tanzania, Camerún y Costa de Marfil), una en Madagascar, una en Asia (India) y tres en el

continente americano (Costa Rica, Colombia y Brasil). Con excepción de la especie *C. canephora*, representada en cuatro colecciones importantes (Costa de Marfil, Camerún, Madagascar e India), los recursos genéticos de otras especies diploides han tenido una difusión muy restringida, limitada a algunos individuos. Estos otros recursos se conservan en dos colecciones únicas en Madagascar para las especies endémicas de la región malgache (aproximadamente 50 especies) y en Costa de Marfil para las otras especies africanas (aproximadamente 30 especies).

La colección del CATIE, está constituida por más de 1.700 introducciones, en ella se conservan:

- Individuos silvestres y semi-silvestres de las recolecciones de *C. arabica* efectuados en Etiopía (Recolección de FAO e IRD),
- Numerosas variedades y mutantes, provenientes de las bases genéticas introducidas en los siglos XVIII y XIX, de Typica y Bourbon.
- Líneas bastante homocigotas introgresadas por *C. canephora*, seleccionadas por su resistencia a la roya,
- Algunos representantes de otras especies (*C. canephora* y *C. liberica* principalmente).

Esta colección contiene casi la totalidad de la diversidad genética de la especie *C. arabica*; sin embargo, como la mayoría de las colecciones existentes en el mundo, posee una representación muy reducida de otras especies. El sistema de conservación en el campo no permite garantizar la preservación de estos recursos a largo plazo. En efecto, el material sufre una erosión genética debido a las presiones de selección ejercidas por el medio ambiente (clima, suelo, parásitos, enfermedades, etc.) y por la edad de las plantas. Otros medios de conservación, basados en métodos biotecnológicos, deberían ser utilizados como complemento para la preservación en colecciones de campo (Dussert *et al.*, 1997).

2. 2. 2. Diversidad genética disponible para el mejoramiento genético

La diversidad genética disponible para el mejoramiento se evalúa a dos niveles: el genotipo, por los marcadores moleculares, y el fenotipo, a través de observaciones agro-

morfológicas. En contraste con los marcadores morfológicos, los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros y presentan un importante polimorfismo (Tanksley, 1993). Además, su expresión no depende del medio ambiente y no varía con la edad de los individuos.

Las observaciones en el campo han sido, por mucho tiempo, el único método de estudio de la diversidad genética. El IPGRI (1996) desarrolló una lista de descriptores para café con el objetivo de homogeneizar los datos, facilitar su utilización y promover el uso de los recursos genéticos.

La evaluación genotípica comenzó en los años 70 con la revelación de los marcadores enzimáticos por electroforesis (Berthou y Trouslot, 1977). Recientemente se ha orientado a la utilización de marcadores moleculares del ADN. El límite que presentan las isoenzimas para la planta de café se debe a que es una planta alotetraploide, lo cual produce un acumulo de alelos de los padres y su modo de reproducción, una autógamia preferencial, entre 85 y 95%, dependiendo de los autores. Este modo de reproducción tiende a homogeneizar las estructuras genéticas, particularmente en las líneas reproducidas por autofecundación.

A continuación se describen las diferentes agrupaciones presentes en el germoplasma de café:

2. 2. 2. 1. Materiales Silvestres

El material, recolectado durante la misión IRD en Etiopía, fue objeto de una evaluación fenotípica en varios lugares de Costa de Marfil, Camerún y Madagascar (Charrier, 1978). Los caracteres observados, de naturaleza morfológica y agronómica, pusieron en evidencia la presencia de una heterocigosis residual relativamente importante en sus orígenes, la cual puede representar un 40% de la variabilidad intervietal (Louarn, 1978). En estos individuos, el contenido de cafeína de los granos varía entre 1 y 2% de materia seca aproximadamente (Berthaud, 1978a; Bouharmont y Montagnon, 1995).

Los cafés etíopes en la colección del CATIE han revelado una gran variabilidad para los caracteres que interesan a los seleccionadores, como la fertilidad, la granulometría o la

conversión a café oro. Por ejemplo, algunos individuos poseen una granulometría equivalente a la de la variedad Maragogipe (frutos muy grandes). Otras poseen una fertilidad muy elevada, con pocos frutos flotantes y granos caracoles (Anthony, 1996).

La resistencia a parásitos y enfermedades ha sido recientemente estudiada en América Central en los individuos de las recolecciones de la FAO y ORSTOM en Etiopía (Anthony, 1996; Anthony, 1997). Los resultados de las observaciones repetidas en colección y los de las pruebas efectuadas en laboratorio han mostrado que es posible seleccionar orígenes resistentes a la raza II de la roya anaranjada. Además, los estudios efectuados en América Latina y en Camerún pusieron en evidencia la existencia de una resistencia incompleta en algunas plantas de origen etíope, que podría actuar en complemento a la resistencia específica (Eskes, 1983; Gil *et al.*, 1990; Bouharmont, 1995). Plantas de origen etíope, resistentes a los nemátodos, fueron seleccionadas para una especie endémica de Guatemala, *Meloidogyne incognita* (Anzueto *et al.*, 1991). Finalmente, la resistencia al CBD (*Colletotrichum kahawae*) se está evaluando en varios centros de investigación (Kenia, Camerún, Francia y Portugal), pero los resultados de las pruebas practicadas en plántulas son actualmente objeto de una controversia (Anthony, 1996; Anthony, 1997).

2. 2. 2. 2. Variedades cultivadas, derivadas del Typica

Las variedades que derivan de la estrecha base genética introducida en los siglos XVIII y XIX son muy productivas (sobre todo las variedades de porte bajo, plantadas a alta densidad) y producen un café de buena calidad, pero son susceptibles a la mayoría de los parásitos y enfermedades que atacan el café (roya, CBD, nemátodos, broca, etc.). Las variedades que derivan del Híbrido de Timor (Costa Rica 95, variedad Colombia, Riuru 11) son resistentes a la roya, a algunas poblaciones de nemátodos (Bertrand *et al.*, 1995) y a algunas cepas de CBD (Aguilar *et al.*, 1997a y 1997b). Sin embargo, se sospecha que los segmentos cromosómicos introgrados en el Híbrido de Timor, heredados del ancestro *C. canephora*, podrían alterar la calidad de la bebida debido a la transferencia no controlada de genes indeseables.

Las características de las principales variedades cultivadas que han dado origen a la caficultura actual y que fueron estudiadas en el presente proyecto se describen con base a la descripción realizada por Krug *et al.* (1939).

Variedad "Typica": Arbusto hasta de 4m de altura, tronco único con troncos verticales secundario provenientes de los nudos, ramas laterales o plagiotrópicas abundantes, en ángulo muy variable con el eje central, generalmente entre 50-70°, hojas oblongo-elípticas, agudas u obtusas al ápice, generalmente acuminadas; haz superior glabro, verde oscuro, brillante, ondulado en los bordes, con nervios impresos; haz inferior verde claro, nervaduras prominentes; domancias con apertura irregular en la cara inferior, prominentes en la superior; tamaño y forma de la lámina muy variable según la edad, posición en la planta, etc., 8-18 cm de largo, 2-7 cm de ancho. Flores en cimas axilares, simples por reducción de partes; cada cima con 2 a 6 flores. Cáliz verdoso, muy corto, con cinco dientes de 0,5 mm de largo. Corola con cinco pétalos blancos, unidos en la base en un tubo de 4-8 mm de largo, los lobos de 9-18 mm de largo. Estambres adheridos a la corola. Gineceo con ovario bilocular; estilo filiforme; terminado en estigma bifido. Fruto una drupa elipsoidal, de 8-16 mm de largo, rojo oscuro uniforme en la madurez. Semillas plano convexas, con endosperma verdoso, cubiertas por una "película plateada", 6-9 mm de largo y 5-7 mm de ancho.

Variedad "Blue Mountain": progenie del Typica procedente de la región de Blue Mountain, Jamaica, localidad famosa por la alta calidad de su café. Esta línea es de bajo rendimiento y pobre crecimiento vegetativo en las condiciones de Turrialba; observaciones similares han sido hechas en Kenia, Java y otras regiones. En Kenia se observó que era de marcada resistencia al frío, lo que ha sido comprobado recientemente en Florida y a ataques de *Colletotrichum* en el fruto. Por otra parte su resistencia a *Hemileia* es muy baja, como las otras variedades derivadas del Typica.

Variedad "Padang". Línea derivada del Typica, seleccionada en Sumatra, indistinguible desde el punto de vista morfológico, de las altas poblaciones comunes de esa variedad, pero de alto rendimiento (en Turrialba). En Puerto Rico esta variedad produce los frutos más grandes de Typica, pero su rendimiento efectivo (relación peso del fruto a café de exportación) es bajo.

Híbrido de "Ceilán": Progenies del Typica introducidas a Mayagüez, Puerto Rico, desde Ceilán a comienzos de este siglo. No difiere de las poblaciones comunes de Typica en Centro América en producción y crecimiento vegetativo.

Variedad "Bronze": Selecciones hechas en Congo en poblaciones de Typica. Estas líneas son vigorosas y de buen rendimiento, especialmente la "local Bronze 9".

Variedad "Pluma Hidalgo": Línea derivada del Typica, seleccionada en México por su alta productividad.

Variedad "H 1": "H" es la sigla correspondiente a líneas escogidas por el programa de selección de progenies hechas en Tanganyika, Tanzania; procedentes de la región Malgache. Es una línea del Typica.

Variedad "Guadeloupe": Poblaciones de Typica, posiblemente originarias de Guadalupe, Antillas Francesas.

2. 2. 2. 3. Variedades cultivadas, derivadas del Bourbon

Variedad "Bourbon": Se distingue del cultivar "Typica" fácilmente por el color de las hojas nuevas, que es verde. Choussy (1935) estableció el tipo "Bourbon" considerando además del color de las hojas nuevas, cerca de 17 características adicionales que lo diferencian de "Typica". Entre ellas se puede citar que "Bourbon" presenta mayor ondulación de la hoja; ramas laterales que forman con el eje central ángulos más cerrados; mayor crecimiento vegetativo; mayor número de axilas florales y por consiguiente rendimientos más altos y precocidad más marcada, etc.

Variedad "Caturra": Está variedad fue seleccionada en Brasil, es producto de la mutación de un gen de dominancia casi completa y se llama "CtCr" (Carvalho *et al.*, 1991). Se caracteriza por entrenudos cortos, lo que resulta en porte bajo, tronco grueso y poco ramificado, y ramas

laterales abundantes, cortas, con ramificación secundaria, lo que le da a la planta un aspecto vigoroso y compacto. Las hojas son más grandes, anchas y oscuras que en “Bourbon” y los frutos son también mayores. El sistema radical está bien desarrollado y es de mayor extensión y densidad que en ese cultivar.

Variedad “Mundo Novo”: Variedad creada en Brasil, por el cruce entre “Bourbon” y “Typica”. Las plantas se asemejan en su mayoría a la primera variedad, pero hay algunas de brotes bronceados. Desde un principio se observó que “Mundo Novo” es una variedad sumamente vigorosa y productiva y que un alto número de plantas producían frutos que aunque aparentemente normales, sólo contenían una semilla bien formada (grano caracol). Selecciones posteriores obtenidas en Campinas han probado que la característica de tener granos vanos es hereditaria, y que es posible obtener líneas de alta producción en que se ha reducido considerablemente el porcentaje de semillas vacías, producto de la selección a través de las generaciones (León, 1962).

Variedad “Catuai”: Fue seleccionada de Brasil. Se obtuvo mediante el cruce de “Caturra” y “Mundo Novo”. Es de porte pequeño y de entrenudos cortos. Sus bandolas erectas forman ángulos de unos 45° con el eje principal. Las hojas nuevas son color verde tierno. Las maduras redondeadas y brillantes. El fruto es similar al de “Caturra” y de maduración tardía.

Variedad “Mibirizi”: Línea derivada de Bourbon, uniforme, de buena productividad. Es una de las introducciones más prometedoras. Seleccionada en el Congo.

Variedad “N-100”: Línea derivada del Bourbon. Buen crecimiento y productividad. Seleccionada en la región Kilema, Tanganyika, Tanzania.

Variedad “F-840”: Línea derivada del Typica. Las líneas “F” no presentan ningún carácter distinto de las poblaciones de Typica corrientes en América Tropical.

Variedad “I 60”: Línea derivada del Bourbon, seleccionada en Tanganyika, Tanzania. Es de buen crecimiento en vegetativo en Turrialba, y de alta producción (León, 1962).

Variedad "N 313": "N" sigla utilizada para las líneas seleccionadas en la región de Kilema, Tanganyika, Tanzania; en el programa de selección individual, Estación Experimental de Café, Lyamungu, Tanganyika, Tanzania. Línea derivada del Bourbon de productividad media.

2. 2. 2. 4. Diferencias genéticas entre cafés Silvestres y Cultivados

La diferenciación genética entre los individuos silvestres de Etiopía y las variedades cultivadas de *C. arabica* se han estudiado con la ayuda de los marcadores moleculares RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). De acuerdo con Lashermes *et al.*, (1996) y Anthony *et al.*, (en prensa 2), los individuos silvestres se distinguen claramente de las variedades y generan la mayor parte de la diversidad observada. El número reducido de marcadores moleculares utilizados no ha permitido caracterizar las variedades al interior de los grupos Typica y Bourbon. Esta estructuración de la diversidad genética en tres grupos había sido observada en un estudio preliminar con otros orígenes de *C. arabica* (Orozco-Castillo *et al.*, 1994). Es corroborada por el vigor de los híbridos entre estos grupos, por un lado en las líneas de Mundo Novo que provienen de cruces entre Typica y Bourbon (Carvalho, 1988), y por otro lado en los híbridos F1 entre los individuos etíopes y las variedades cultivadas (Bertrand *et al.*, 1997).

Los cafés del sudoeste de Etiopía no han participado efectivamente en la selección de variedades de *C. arabica*, como lo indican Bouharmont y Montagnon (1995), el vigor de los híbridos F1 se debería al cruce de los dos grupos genéticos, separados por el valle del "Rift". En efecto, las formas silvestres se sitúan al oeste de esta fosa tectónica (provincias de Kaffa y Illubador), mientras que las formas cultivadas habrían sido seleccionadas en el este (provincia de Sidamo y región cercana a Yemen). La diferenciación genética que permite obtener el vigor híbrido en los híbridos F1 no estaría entonces ligada a la selección efectuada por el hombre en las variedades cultivadas, sino a un aislamiento natural por un largo período (aproximadamente 20 millones de años). La confirmación de esta hipótesis reforzará la estrategia de los cruces entre estos dos grupos de cafés.

2. 2. 2. 5. Variedades introgresadas del Híbrido de Timor

Con la aparición de la roya y su importancia económica en Centroamérica se inicia una

búsqueda de fuentes de resistencia genética en el género *Coffea* a esta enfermedad; los principales logros se obtuvieron utilizando el Híbrido de Timor (Híbrido interespecífico natural de *C. arabica* x *C. canephora*) como progenitor.

Coffea canephora: Conocido con el nombre de café Robusta, es una especie diploide cuyo número básico de cromosomas es $2n = 22$. Su variación puede apreciarse mejor si se considera que el área de distribución incluye la selva altamente húmeda de Guinea a Congo, y llega hasta la región del lago Victoria, desde el nivel del mar hasta los 800m. Se caracteriza por su gran variación en formas y ecotipos, muchos de los cuales fueron originalmente descritos bajo diferentes nombres botánicos. África Central y especialmente el Congo son ricos centros de diversidad genética para esta especie (Van der Vossen, 1985).

Los cafés Robusta fueron inicialmente estudiados en Java, en introducciones procedentes de localidades africanas muy diferentes. Los primeros trabajos de selección de la estación experimental de Bangelan y otras instituciones en Java fue de gran impacto y mejoró las semillas de Java donde fue utilizada para establecer plantaciones de café robusta en países como India, Uganda, Costa de Marfil, y también en Zaire (Van der Vossen, 1985).

Arbusto de tallo central hasta de 10m de altura. Después de algunos años aparecen brotes basales que forman de 2-6 tallos verticales secundarios. Ramas plagiotrópicas largas, sin ramificaciones en las primera etapas. Hojas elípticas y oblongas agudas, redondas y a veces acorazonadas en la base; ápice agudo, acuminado, rara vez obtuso; bordes ondulados; haz superior verde oscuro, brillante, nervaduras hundidas, haz inferior verde claro, con nervaduras prominentes; domancias generalmente axilares. Fruto subgloboso a elipsoidal de 9-18mm de largo, 6-14mm de ancho, 6-12mm de grueso: rojo vivo a la madurez; disco muy pequeño, prominente o liso; mesocarpo delgado, que se separa del endocarpo o pergamino. Semillas plano convexas, 7-15mm de largo (Chevalier, 1947; Bridson y Verdcourt, 1988).

Estudios recientes en el germoplasma de *C. canephora* en las poblaciones existentes del IRCC en Costa de Marfil y las accesiones colectadas por las misiones del ORSTON en África

Central y del Oeste han confirmado la existencia de diversas subpoblaciones. Se hace énfasis en la distinción de dos grupos principales: *C. canephora* con origen en Africa Central “congolense”, el cual incluye el café robusta y *C. canephora* con origen en Africa del Oeste “guineo”. En los análisis de polimorfismo enzimático, de estos dos grupos se encontró que producían zimogramas diferentes para siete sistemas enzimáticos. La alta producción de clones del programa de fitomejoramiento del IRCC también podría terminar para dirigirse hacia la producción de cruces entre árboles de diferentes grupos (Van der Vossen, 1985).

El germoplasma disponible del Híbrido de Timor procede de las prospecciones realizadas en la isla de Timor por el CIFIC⁶ de Portugal. A partir de 1972, a través de diferentes intercambios con el CIFIC, Brasil, Colombia y a partir de 1978 con la colaboración de PROMECAFE, los países de América Central introdujeron varias descendencias del Híbrido de Timor identificadas como CIFIC 832, 832 y 1343, etc. Todos estos orígenes tienen alta resistencia a la roya. La descendencia CIFIC 832/1 dieron origen a los Catimores y de ella se derivan las variedades Costa Rica 95 (CR95) e IHCAFE 90.

Del cruzamiento CIFIC 832/2 con la variedad Villa Sarchi se originan los Sarchimores y con el cruzamiento de la descendencia CIFIC 1343 con la variedad Caturra se origina la variedad Colombia y algunas selecciones del Instituto Agronómico de Campinas en Brasil (Bertrand *et al.*, 1999).

Variedad “IHCAFE 90”: Esta variedad se liberó en 1990 en Honduras, se obtuvo de la evaluación y selección de las descendencias de café provenientes del CIFIC 832/1 con el Caturra (F1, Caturra 19/1 x CIFIC 832/1). La variedad se caracteriza por su uniformidad en el porte bajo, hojas anchas de color verde oscuro, brotes bronceados y frutos rojos, ramas largas con entrenudos cortos. Se caracteriza por su alta precocidad para la producción con un descenso en el cuarto o quinto año; se ha evidenciado que esta precocidad conlleva exigencias nutricionales altas. Se recomienda manejarla bajo sombra regulada, se ha observado mayor incidencia de Ojo de Gallo (*Mycena citricolor*) en comparación con las variedades Caturra y Catuai en zonas húmedas y sombreadas.

En condiciones adecuadas esta variedad produce alrededor de 30% más que el Caturra y 20% más que el Catuai bajo las condiciones de Honduras. En Costa Rica con altas densidades, las diferencias productivas son de 20 y 22% respectivamente producto de nueve ensayos en nueve localidades (Bertrand *et al.*, 1999).

Variedad "Costa Rica 95": La variedad Costa Rica 95 es producto de la selección realizada por el ICAFE de Costa Rica a partir de la accesión T8667 introducida y evaluada en el CATIE por PROMECAFE en generación F5.

La variedad CR95 es de porte pequeño con brote bronceado, y de bandolas muy cortas, por lo que se puede sembrar bajo las mismas densidades de siembra que la variedad Caturra. Dependiendo de la zona es una variedad que produce entre 25 y 35% más que las variedades Caturra o Catuai. Por ser una variedad de alto rendimiento, requiere de alta fertilización, o si no se agotaría a partir del tercer año de producción. El grano es más grande (se acerca al del Typica) y supera un poco el tamaño del T 5175 o del Catuai y significativamente al tamaño del Caturra (67,90 contra 65,17%, 63,30% y 53,99% respectivamente sobre un tamiz de 17/64 pulgadas). Produce un poco más de caracoles que el Caturra pero igual al Catuai (alrededor de 6 a 10%). Su alta resistencia a la roya la hace recomendable para las zonas donde es mayor la incidencia de roya. Es importante destacar que tanto CR95 como IHCAFE 90 no presenta resistencia al CBD ni a los nemátodos (*Meloidogyne incognita* y *Pratylenchus sp.*) (Bertrand *et al.*, 1999).

Variedad "Colombia": Esta variedad se originó del cruce de la descendencia CIFC 1343 con la variedad Caturra. Se caracteriza por ser de porte bajo formando poblaciones con altura equivalente a la variedad Caturra, las cuales pueden ser sembradas a la misma densidad utilizada en las variedades Caturra y Catuai. Otros aspectos que se consideran son el tipo de ramificación, la forma, el tamaño y color de la hojas. En estos caracteres existe notable variación en los cruces de Caturra x Híbrido de Timor, pero predominan los caracteres intermedios entre las características de los padres (Moreno y Castillo, 1984).

⁶ Centro de Investigación de la Roya del Café. Oeiras, Portugal.(por sus siglas en ingles)

Las plantas de mejor comportamiento agronómico se seleccionaron como progenitores y que fueran más parecidas al tipo Caturra, lo cual ha dado origen a generaciones más avanzadas de progenies donde predomina los caracteres de esta variedad. Al realizar la selección tomando como límite la producción de los testigos, se ha observado que en todos los sitios se presentan progenies iguales o superiores a las variedades de tipo Caturra. En las características de la semilla son comunes los defectos de las semillas entre los que sobresalen semillas vacías, la presencia de granos de forma de caracol y de tamaño pequeño. Por medio de selección en cada generación han logrado reducir las cantidades de estos defectos a niveles comparables a los que presentan las variedades comerciales.

Los resultados de la calidad de la bebida indican que la mayor parte de las generaciones F3 y F4 que se han probado producen el mismo tipo de bebida que las variedades Typica, Bourbon y Caturra; además la variedad Colombia es resistente a la roya (Moreno y Castillo, 1984).

2. 2. 3. Características de selección del grano de café

El grano de café es una drupa en que los tejidos externos se separan en la madurez por una capa mucilaginoso del endocarpo delgado, duro y coriáceo, que se conoce comúnmente con el nombre de “pergamino”. Este endocarpo envuelve las semillas, de las cuales existen normalmente dos en cada fruto, y las recubre completamente tanto en su parte externa convexa como en la interna y plana. Existen ciertas indicaciones genéticas que sugieren la posibilidad de que el desarrollo del pericarpo está determinado por genes que actúan en forma independiente, los cuales determinan el desarrollo de la semilla, por lo que con frecuencia frutos aparentemente normales contienen una o dos semillas vacías (León y Fournier, 1962).

El principal criterio de selección en mejoramiento genético ha sido la producción, medida en kilogramos de café cereza. La conversión a kilogramos de café oro; denominada peso de café oro y expresada como porcentaje de rendimiento de grano oro, se realiza por medio de una relación estimada para cada genotipo y varía para el caso del café Arabica de 16 a 20%.

Las características de grano caracol y fruto vano son genéticas, pero varían en función del ambiente. El fruto caracol se observa si uno de los óvulos aborta tempranamente. En este caso se atrofia la cavidad locular y la semilla del otro lóculo se desarrolla libremente tomando una forma redondeada (Bertrand *et al.*, 1999). Estudios realizados en Brasil, indican que por cada aumento del 1% de granos caracol, se registra una disminución de la producción de 0,75% (Instituto del Café de Costa Rica, 1995).

El fruto vano corresponde a un aborto tardío del óvulo fertilizado. En este caso se observa el crecimiento del endospermo, pero no de la cavidad locular, se traduce en frutos flotantes durante el proceso de beneficiado por vía húmeda. Ambos efectos tienden a disminuir la densidad aparente del café (relación de café cereza/café oro) y por consiguiente preocupan al beneficiador (Bertrand *et al.*, 1999). El programa cooperativo del Instituto del Café de Costa Rica y el Ministerio de Agricultura permiten un nivel máximo de grano caracol de 8% y para grano vano un máximo de 5% (Jiménez y Ramírez, 1988).

El relleno de los frutos se determina por la relación entre el número total de granos y el número de frutos; por la naturaleza del fruto de café es de esperar una relación igual a 2. Este factor es inferior debido a los problemas de fertilidad como grano flotante y grano caracol (Anthony, 1997).

2. 3. Caracterización de germoplasma

La caracterización de las colecciones de germoplasma es un proceso esencial dentro del manejo de los recursos genéticos porque permiten conocer el germoplasma, seleccionar y organizar los materiales, y sobre todo identificar genotipos valiosos para ser usados directamente en los programas de mejoramiento genético. Por lo tanto un buen sistema de conservación y de caracterización en los programas de Recursos Genéticos es de fundamental importancia para tener información disponible de cada accesión sobre caracteres cualitativos y cuantitativos de importancia económica actual o potencial.

Tradicionalmente las evaluaciones de los genotipos contenidos en las colecciones se han realizado mediante el uso de descriptores morfológicos y agronómicos pero en la actualidad con las técnicas moleculares (RAPD, RFLP, etc.) es posible también evaluar directamente, el contenido de ADN, información que puede ser usada en forma complementaria a la caracterización fenotípica, para organizar en forma más adecuada y eficiente las colecciones de germoplasma y la información, además de conservar materiales promisorios con características de resistencia a patógenos del suelo y del medio ambiente.

La genética molecular desempeña un papel importante en muchos de los aspectos de la conservación tales como la caracterización de la diversidad genética con el propósito de mejorar la adquisición, el mantenimiento y el uso del germoplasma. Con el desarrollo de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), numerosas técnicas moleculares han sido y están siendo desarrolladas, las cuales pueden ser utilizadas para la detección, caracterización y evolución de la diversidad genética. Estas técnicas varían en el sentido de cómo resuelven las diferencias genéticas, en el tipo de datos que generan, en los niveles taxonómicos a los cuales pueden ser más apropiadamente aplicados y a los requerimientos técnicos y financieros. La aplicación de los marcadores moleculares para la resolución de los problemas de la conservación de los recursos fitogenéticos está en sus primeros estados y requiere de una extensa colaboración entre los encargados de la conservación y los biólogos moleculares (Krap *et al.*, 1997).

Las colecciones de germoplasma representan una fuerza de genes útiles para los mejoradores. Sin embargo, el manejo de grandes colecciones es una actividad costosa y compleja, particularmente para asegurar una preservación a largo plazo; y por otra parte, el valor del germoplasma es más notable a partir de que se obtenga información adicional relacionada con su caracterización y evaluación. Por las razones antes expuestas en la actualidad se han propuesto dos soluciones complementarias, dirigidas a incrementar el manejo y la conservación eficiente y sostenible del germoplasma. La primera, implica la identificación y eliminación de accesiones duplicadas y la segunda, la creación de colecciones núcleo o representativas de la diversidad presente en toda la colección, para lo cual se requiere de métodos apropiados y exactos que permitan determinar y monitoriar la variabilidad de forma eficiente (Cornide y León, 1998).

Esta información es valiosa para los fitomejoradores que siempre han tratado de seleccionar individuos que posean más de una característica deseable. Así por ejemplo, se ha dado prioridad a aquellos genotipos que muestran en forma simultánea, resistencia a una enfermedad y por lo tanto alta producción. Este tipo de selección ha sido exitoso para la mayoría de los cultivos alimenticios del mundo, debido en gran medida a su corto ciclo de vida. Sin embargo, y a pesar de los importantes y a veces dramáticos avances alcanzados en la producción de cultivos como arroz, maíz y trigo, es bien conocido que aún en esas especies, el potencial genético permanece virtualmente inexplorado. Esto se debe a que las colecciones de germoplasma para la mayoría de cultivos, contienen miles de introducciones que todavía no han sido evaluadas. Con el desarrollo de descriptores y marcadores de ADN, ha sido posible iniciar el estudio de las colecciones en una forma más eficiente, sistemática y rápida, planteándose objetivos fácilmente alcanzables desde el punto de vista del mejoramiento genético de las plantas (Phillips, *et al.*, 1995; Waugh y Powell, 1992).

Según Taba (1991), la caracterización y evaluación sistemática debe comprender las siguientes fases:

1. Caracterización de las accesiones
2. Agrupación de las accesiones
3. Evaluación en múltiples localidades
4. Formación de los subconjuntos centrales
5. Desarrollo de una base de datos
6. Evaluación final

La caracterización de las accesiones de un banco de germoplasma da una idea de la clase de material genético que se conserva en la colección y puede dar a los encargados del banco ciertas alternativas para promover su utilización (Taba, 1991).

La diversidad genética puede ser evaluada a nivel genotípico a través de marcadores

moleculares y a nivel fenotípico a través de características agro-morfológicas. Los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, su expresión no depende del ambiente y no varían con la edad de la planta (Taba, 1991). Los descriptores cuantitativos son dependientes del genotipo y el medio ambiente e incluyen caracteres morfológicos y agronómicos útiles como por ejemplo precocidad o resistencia a sequía, no todos de ellos son convenientes para el estudio de la biodiversidad (Hamon *et al.*, 1995).

2.3.1. Caracterización agro-morfológica

La mayoría de las plantas cultivadas con importancia económica tiene sus patrones de identificación, caracterización y evaluación. Para llegar a estos protocolos se han realizado estudios básicos de las características en el sentido de conocer la variabilidad de los caracteres dentro y entre plantas; luego se han seleccionado aquellas características cualitativas o cuantitativas que han resultado ser más útiles para la descripción (Enríquez, 1966).

En la mayoría de las plantas cultivadas, los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente; entre estos órganos quizá los más importantes son la flor y el fruto; le siguen en importancia otros como las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares que muchas veces son muy difíciles de caracterizar (Enríquez, 1991).

La resistencia a plagas y enfermedades ha sido estudiada en América Central entre genotipos silvestres de café recolectados por la FAO y IRD en Etiopía. Los resultados de las evaluaciones y las pruebas de laboratorio han mostrado que es posible seleccionar procedencias resistentes a la raza II de la roya (Anthony, 1996; Anthony, 1997). Estudios realizados en Camerún han revelado la existencia de una resistencia incompleta en algunas plantas de origen etíope, que podrían actuar como complemento para obtener una resistencia específica (Gil *et al.*, 1990; Bouharmont, 1995). Anzueto *et al.* (1991) reporta la existencia de plantas de origen etíope resistentes a los nemátodos, las cuales fueron seleccionadas para una raza endémica de

Meloidogyne incognita presente en Guatemala.

La caracterización de la composición bioquímica de los granos de café estudiada por Anthony *et al.*, (1993), reveló la existencia de dos vías metabólicas en las especies de café, los cafés con alto contenido de ácidos clorogénicos y cafeína (4,5 a 9,9% MS y 0,5 a 3,2% MS respectivamente) y los de bajo contenido (0,1 a 2,4% MS y 0 a 0,3% MS respectivamente). La primera vía es común en la mayoría de las especies africanas de *Coffea* y a dos especies Malgaches (*C. lancifolia* y *C. kianjavatensis*); mientras que la segunda está en la mayoría de las especies malgaches y sólo en dos especies africanas (*C. pseudozanguebarie* y *C. salvatrix*).

2. 3. 2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una serie de herramientas para los análisis genéticos o moleculares que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y los ácidos nucleicos (ARN y ADN), ellos han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como, estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. En el área de los recursos genéticos, los marcadores moleculares han provisto de información relevante en áreas claves de la conservación y la caracterización de germoplasma (Otero *et al.*, 1997).

La caracterización molecular usando marcadores moleculares tiene varias ventajas tales como: 1) no es influenciada por el medio ambiente; 2) puede ser usada cualquier parte de la planta en cualquier estado de crecimiento; 3) el número de análisis es ilimitado; 4) se requiere pequeñas cantidades de material vegetal y; 5) ADN es altamente estable (Rao y Riley, 1994).

Los avances históricos de los marcadores moleculares se presentan a continuación:

1953 Descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick.

1954 Se realizan los primeros estudios genéticos usando electroforesis.

1970 Se aisló la primera endonucleasa de restricción.

1974 Marcadores RFLP.

1975 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

- 1989 Marcadores Microsatélites.
- 1990 Marcadores RAPDs.
- 1995 Marcadores AFLP.

Actualmente están disponibles un número creciente de técnicas moleculares para el análisis del ADN (Weising *et al.*, 1995). Los marcadores moleculares son herramientas utilizadas para la caracterización genotípica de colecciones y al ser fenotípicamente neutros presentan una mayor segregación o polimorfismo que los marcadores morfológicos (Tanksley, 1993). Los genotipos pueden ser evaluados desde que la planta está en sus primeros estados de desarrollo, usando toda la planta o parte de ella (Powell, 1992). Aparentemente están libres de efectos epistáticos y virtualmente se pueden evaluar un número ilimitado de ellos. Existen dos grupos de marcadores moleculares: los que analizan las proteínas y los que analizan directamente los ácidos nucleicos (ADN, ARN).

Dentro de los marcadores de ADN se incluye los RFLP (Fragmentos de Restricción de ADN de Longitud Polimórfica) y los marcadores basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), o sea, los RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), los microsatélites, minisatélites y más recientemente los AFLP (Fragmentos Amplificados de Longitud Polimórfica).

2. 3. 3. Análisis PCR/RAPD

Una técnica que en los últimos años ha sido muy usada es PCR para generar RAPDs (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990;). El análisis RAPD puede ser ejecutado en cualquier organismo sin una previa información de la secuencia del ADN. Esta técnica es llevada a cabo usando pequeñas cantidades de ADN. La tecnología es relativamente simple y barata, permitiendo el análisis de un gran número de muestras en un corto tiempo (Williams *et al.*, 1993). Es susceptible a las condiciones del experimento y presenta problemas de reproducibilidad entre

laboratorios y en el tiempo.

Según Lowe *et al.* (1996), el uso de RAPDs provee una valoración de la variación genética de colecciones que día a día va incrementándose. Por esto, es importante que los protocolos usados sean exactamente descritos con la finalidad que puedan ser estandarizados. Sólo sobre esta base se podrán realizar varios tipos de estudios importantes para los curadores de bancos de germoplasma, como son: 1) síntesis de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios con diferentes colecciones de la misma especie, las cuales pueden o no tener duplicados del material; 2) comparación de los resultados obtenidos sobre la misma colección en diferentes épocas, por ejemplo después de un número de ciclos de regeneración y; 3) estimación de la diversidad genética representada por cualquier nueva adición de una colección ya valorada.

El análisis RAPD se basa en la probabilidad de que una secuencia dada de ADN se encuentre en el genoma en cadenas opuestas del ADN y en orientación opuesta dentro de una distancia tal que sea posible su amplificación (Phillips-Mora *et al.*, 1995). Los polimorfismos producidos con esta técnica se denominan marcadores RAPD. Pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del blanco de reacción de PCR “primer” o sea, un segmento corto formado por una cadena simple de nucleótidos con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado (Erlich, 1990); lo cual impide que el “primer” se una a la cadena, o también puede ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la amplificación exitosa del ADN molde (Waugh y Powell, 1992).

El método en esencia implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del “primer” a la cadena desnaturalizada y la síntesis a partir del “primer”, de la secuencia complementaria mediante la acción de la polimerasa.

El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos para llevarse a cabo:

- A) ADN molde: es el ADN de doble cadena proveniente del organismo que se quiere analizar

- B) Blanco de reacción (“Primer”)
- C) Los cuatro dinucleótidos que forman las bases del ADN
- D) Solución Tampón
- E) Enzima Taq-polimeraza

A) *ADN molde*: el método de extracción del ADN no es particularmente importante, aunque la vida del ADN depende de la técnica de extracción y de las condiciones de almacenamiento (Sambrook *et al.*, 1989; Weising *et al.*, 1995). Las técnicas basadas en PCR no requieren preparaciones puras de ADN (Edwards *et al.*, 1991), es así que métodos de extracción simples y rápidos pueden ser empleados. La cantidad final de ADN es importante, cantidades entre 5 y 500ng usualmente proveen buenos resultados (Lowe *et al.*, 1996). Los patrones de RAPD parecen ser afectados por muy bajas concentraciones de ADN (Williams *et al.*, 1993; Weising *et al.*, 1995) pero también las altas concentraciones de ADN pueden afectar la repetitividad de bandas (Munthali *et al.*, 1992). Concentraciones de 10-50 ng/50 µl (volumen de reacción) han sido reportadas como óptimo (Weising *et al.*, 1995).

B) Blanco de reacción: Que son los “primers” son fáciles de sintetizar y varias compañías comerciales los producen (ejemplos: Operon Technologies, Inc, Pharmacia LKB). La concentración de los “primers” óptima es entre 0,4 a 0,6 µM (Williams *et al.*, 1993), y fuera de estos límites usualmente los resultados carecen de amplificación.

C) *Desoxinucleotidos*: se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena

D) *Solución Tampón*: las soluciones deben contener concentraciones óptimas de iones potasio y magnesio y ser calibradas generalmente a un pH de 8,3.

E) *La enzima Taq-polimerasa*: es una enzima producida por la bacteria *Thermus aquaticus* (Erlich, 1989). Esta enzima tiene la propiedad de catalizar la síntesis complementaria de ADN a partir de un punto determinado fijado en este caso por el “primer”.

Una gran variedad de patrones de bandas de los RAPDs pueden ser observados dependiendo de la fuente de Taq polimerasa usada (Williams *et al.*, 1993). En particular, polimerasas truncadas como la Stoffel Fragment (Perkin Elmer) pueden radicalmente dar diferencias en los perfiles de bandas los RAPD comparados con polimerasas que poseen actividad endonucleasa de 5' a 3'; por ejemplo, Taq polimerasa (Promega) y AmpliTaq (Perkin Elmer) (Weising *et al.*, 1995). El uso de la misma marca de Taq polimerasa para experimentos repetidos es esencial, así como su pureza. Las enzimas deben estar libres de cualquier contaminante bacteriano de ADN. Esto generalmente no es un problema con enzimas comerciales, sin embargo, esto es importante si se prepara en el mismo laboratorio la polimerasa (Lowe *et al.*, 1996).

La eficiencia de la técnica RAPDs depende en gran medida de tres factores:

1) Temperatura: La desnaturalización del ADN se realiza mediante la incubación a altas temperaturas, a partir del cual las dos cadenas se separan y permanecen en suspensión hasta que la temperatura se reduzca. La unión del blanco de reacción "primer" en sitios complementarios de la cadena disociada se produce cuando la temperatura se reduce. La síntesis del segmento complementario de la cadena en una dirección específica (5' a 3') a partir de la unión del blanco de reacción, se produce mediante la acción de la polimerasa y la presencia de desoxinucleótidos libres en la solución y otros elementos minerales como el magnesio y el potasio (Figura 1). Esta fase se produce a 72°C, temperatura óptima para la Taq polimerasa.

2) Número de ciclos de amplificación: cuando los tres pasos anteriores se repiten varias veces (30 a 40 veces generalmente), en sólo unas pocas horas se pueden obtener fragmentos amplificados en el orden de microgramos, a pesar de haber iniciado el proceso con cantidades tan reducidas como 5ng.

3) Longitud del ADN: la eficiencia es inversamente proporcional a la longitud del ADN.

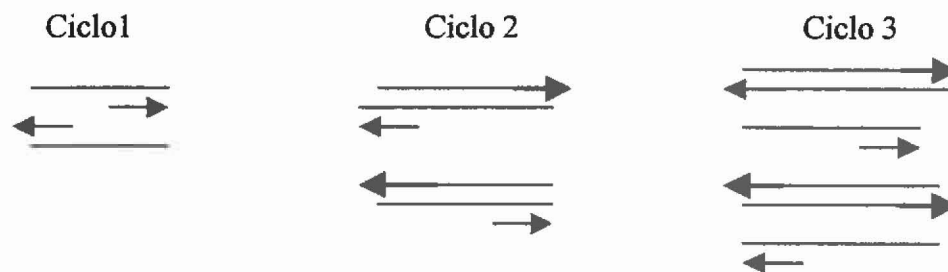


Figura 1. Esquema de producción de los RAPDs por el proceso de amplificación del ADN, mediante la técnica de PCR.

2. 4. Análisis Estadístico

2. 4. 1. Métodos estadísticos multivariados aplicados en biología molecular

Al analizar los datos obtenidos con RAPDs se debe tener en cuenta dos supuestos importantes: 1) cada uno de los marcadores representa un locus mendeliano en el cual el marcador visible, es el alelo dominante, que está en equilibrio de Hardy Weimberg con un alelo recesivo; 2) los alelos marcados para diferentes loci no comigran a la misma posición en el gel (ver síntesis de Otero *et al.*, 1997). A pesar que los heterocigotos no pueden ser detectados por los RAPDs, es posible estimar parámetros de la estructura de la población.

Según Martínez (1995), los métodos y procedimientos estadísticos disponibles para el análisis de los resultados provenientes de ensayos biotecnológicos se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- Aquellos que tienen como propósito evaluar la variabilidad, clasificación, estructura y

composición genética de las poblaciones.

- Los desarrollados para la construcción de mapas cromosómicos o genómicos, cuando se utilizan marcadores genéticos moleculares, y
- Los denominados QTL (Quantitative trait loci), los cuales son loci asociados con caracteres cuantitativos de importancia agronómica, como el rendimiento, y que proveen al fitomejorador de una herramienta molecular ágil, precisa y oportuna de selección indirecta por los caracteres cuantitativos de interés envueltos en el programa de fitomejoramiento.

Para la presente investigación se ocuparán los primeros cuyo uso se enfatiza en poblaciones que convencionalmente se reconocen como recursos genéticos naturales. Los métodos estadísticos más utilizados formalmente son distancias genéticas, índices de similitud, dendogramas y coordenadas principales (Martínez, 1995).

Existen 2 tipos de estimadores los índices similitud entre individuos y de distancias genéticas. Los índices de distancia genética más utilizados son el índice de Jaccard, el índice de diversidad de Shannon, Coeficiente de similitud e Dice, y la distancia genética de Rogers, de Nei y la de Nei y Li. Debido a que existen varias razones posibles para la ausencia de un fragmento, el uso de coeficientes que omitan la consideración de datos ausentes (ejemplo Jackard o Dice) pueden ser más apropiados (Otero *et al.*, 1997).

| | | Individuo B | | Total |
|-------------|---|-------------|-----|-------|
| | | 1 | 0 | |
| Individuo A | 1 | a | b | a+b |
| | 0 | c | d | c+d |
| Total | | a+c | b+d | n |

Donde $n = a + b + c + d$.

Para el cálculo de la identidad entre dos individuos, el índice de Jaccard y el índice Dice no considera la condición d; es decir la doble ausencia de las variables (0-0) en los dos individuos; porque no significa necesariamente que los individuos son idénticos para estos loci.

$$\text{Índice de Dice} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Los estimadores de similitud o de distancia genética pueden ser utilizados para un análisis de clusters UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Sing Arithmetic Averages) y para un análisis de componentes principales para revelar las afinidades genéticas (Otero *et al.*, 1997). El análisis discriminante se utiliza para validar los agrupamientos realizados por los métodos de clasificación.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Estudio de campo

El estudio se realizó en la sección de colecciones de campo “Cabiria”, perteneciente a la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE, ubicada en Turrialba, Costa Rica, a 602 msnm, 9° 38' de latitud norte, 83° 38' de longitud oeste, con una temperatura promedio diaria de 22,5°C y 2645 mm de precipitación anual.

El manejo agronómico de la colección de café se da rutinariamente mediante la ejecución de prácticas culturales y de manejo aplicadas a la producción comercial de café recomendadas por el ICAFE de Costa Rica. Se realizan aplicaciones periódicas de fertilizante, herbicidas y fungicidas, podas de rejuvenecimiento y cortes periódicos de las ramas a los árboles de sombra, sin tomar en consideración los requerimientos de los diferentes genotipos representados en la colección de germoplasma, como el uso de sombra permanente para el material silvestre.

3.1.1. Material experimental

Se evaluó las características de producción y fertilidad se evaluaron en 18 variedades pertenecientes a la colección del CATIE, compuestas por 9 variedades del grupo Typica, y 9 variedades del grupo Bourbon. De cada variedad se evaluó 4 árboles, y se realizó 3 cosechas por árbol durante el periodo de fructificación. El estudio incluyó además cuatro variedades procedentes de material silvestre (Amphilo, Rume Sudan, ET-6 y ET-59) para determinar su semejanza en cuanto a producción y fertilidad con los grupos Typica y Bourbon (Cuadro 1).

El grupo de los introgresados (descendencias del Híbrido de Timor) está representado por 3 poblaciones (832/1, 832/2, y 1343); con 3 introducciones por descendencia. Para la evaluación de características de producción y fertilidad se utilizó 3 plantas por variedad, y se realizó 3

cosechas por planta durante el periodo de fructificación (Cuadro 2). Además, se estudiaron las accesiones T.04387 y T.05286 para verificar si presentan diferencias entre ellas debido a que descienden del mismo progenitor según se indica en la información de pasaporte de estas accesiones (Morera *et al.*, 1993).

Cuadro 1. Variedades de los grupos Typica (T) y Bourbon (B) utilizadas para el estudio de características de producción y fertilidad del grano de café.

| Grupo | Número de Accesión de CATIE | Variedad | Ubicación en la colección del CATIE | |
|-------|-----------------------------------|---------------------|--|--------|
| | | | Sección | Bloque |
| B | T.04264 | Mibirizi | D | 6A |
| B | T.00995 | Bourbon | C | 4B |
| B | T.16707 | ET-18 | F | 4A |
| B | T.03469 | Bourbon Salvadoreño | A | 4A |
| B | T.02723 | I-60 | D | 1B |
| B | T.02308 | Caturra | D | 1A |
| B | T.16708 | ET-19 | F | 4B |
| B | T.02719 | N-100 | D | 1B |
| B | T.02703 | N-313 | D | 1B |
| T | T.03836 | F-840 | D | 5A |
| T | T.00992 | Padang | C | 4B |
| T | T.00996 | Typica | C | 4B |
| T | T.04196 | Pluma Hidalgo | A | 5A |
| T | T.03443 | Híbrido de Ceilán | A | 3B |
| T | T.00977 | Blue Mountain | C | 4B |
| T | T.00971 | Guadeloupe | C | 4B |
| T | T.03838 | H-1 | D | 5A |
| T | T.04265 | Bronze 183 | D | 6A |
| ? | T.02754 | Amhilo | D | 2A |
| ? | T.02744 | Rume Sudan | D | 2A |
| ? | T.16695 | ET-6 | F | 4A |
| ? | T.16739 | ET-59 | F | 4A |

Cuadro 2. Descendencias del Híbrido de Timor (HDT) utilizados para el estudio de características de producción y fertilidad del grano de café.

| Grupo | Identificación del Híbrido de Timor | Número de accesión de CATIE | Ubicación en la colección del CATIE | |
|-------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------|
| | | | Sección | Bloque |
| HDT | CRRC 1343/86 | T.04387 | B | 3 |
| HDT | CRRC 1343/349 | T.04389 | B | 3 |
| HDT | CIFC 2252/2 | T.05289 | B | 3 |
| HDT | CIFC 2252/28 | T.05290 | B | 3 |
| HDT | CIFC 2252/57 | T.05291 | B | 3 |
| HDT | CRRC 1343/86 | T.04387 | D | 5A |
| HDT | CRRC 1343/349 | T.04389 | D | 5A |
| HDT | CRRC 1343/933 | T.04390 | D | 5A |
| HDT | CRRC 1342/258 | T.04452 | D | 5A |
| HDT | CRRC 1343/933 | T.05122 | D | 5A |
| HDT | B-61042 EP-7002 LC-1561 | T.05286 | E | 2A |
| HDT | L 8-154 | T.05206 | E | 3B |
| HDT | L 8-1396 | T.05207 | E | 3B |
| HDR | UFV 1965 (450-63) | T.12859 | F | 5A |
| HDT | CRRC 1343/86 | T.04387 | G | |
| HDT | CRRC 1343/933 | T.04390 | G | |
| HDT | CRRC 1343/933 | T.05122 | G | |

3.1.2. Métodos

Para las características morfológicas se evaluaron 24 variedades; 5 variedades correspondientes al grupo Typica y 19 variedades pertenecientes al grupo Bourbon (Cuadro 3). Se utilizaron 3 árboles por variedad y se evaluaron 5 hojas por genotipo. No se pudo estudiar más variedades del Typica debido a una sub representación de este grupo en el germoplasma del CATIE.

Se realizó el registro de la información correspondiente a los frutos frescos, luego se procesaron las muestras para el registro de la información de los granos secos (Cuadro 4). El proceso consistió en el despulpe y fermentación en agua de los granos por un día, y el secado en horno a 70°C por 4 días hasta alcanzar el 0 % de humedad.

Las características morfológicas evaluadas en las variedades cultivadas fueron:

- Color de la hoja joven
 - 1 = Verde
 - 2 = Verde bronceado
 - 3 = Bronceado
- Angulo de inserción de las ramas plagiotrópicas.
 - 1 = Cerrado ($< 45^\circ$)
 - 2 = Semi-abierto ($46-60^\circ$)
 - 3 = Abierto ($> 60^\circ$)
- Longitud de la hoja en cm.
- Ancho de la hoja en la parte más amplia en cm.

Cuadro 3. Variedades de los grupos Typica (T) y Bourbon (B) utilizadas para la caracterización morfológica de la hoja de café.

| Grupo | N° de accesión de CATIE | Descripción de las Variedades | Ubicación en la colección de CATIE | |
|-------|-------------------------|--|------------------------------------|--------|
| | | | Sección | Bloque |
| B | T.00983 | Bourbon rojo | C | 4B |
| B | T.00995 | Bourbon rojo | C | 4B |
| B | T.02307 | Bourbon rojo, colección 662 PQ x 28603 | B | LOTE 1 |
| B | T.02307 | Bourbon rojo, Colección 662PQ x 28603 | D | 1A |
| B | T.02540 | Bourbon Amarillo | D | 1B |
| B | T.03425 | Bourbon amarillo Brasil x 47127 | A | 3A |
| B | T.03426 | Bourbon rojo Brasil x 47127 | A | 3A |
| B | T.03469 | Bourbon Salvadoreño | A | 4B |
| B | T.03627 | Bourbon Puerto Rico, El Salvador x51289 | A | 5B |
| B | T.03820 | Bourbon amarillo, Puerto Rico x 60396 | D | 4B |
| B | T.03864 | Híbrido Tico 956 (Costa Rica) P x 62089 | D | 5B |
| B | T.03865 | Híbrido Tico 957 (Costa Rica) P x 62089 | D | 5B |
| B | T.04256 | Bourbon Mayaguez 71.2147 | D | 6A |
| B | T.04258 | Bourbon Mayaguez 139 | D | 6A |
| B | T.04261 | Bourbon Salvadoreño | D | 6A |
| B | T.04266 | Bourbon 72 | D | 6A |
| B | T.04274 | Bourbon 72-1523 | D | 6B |
| B | T.04375 | Bourbon amarillo | B | LOTE 3 |
| B | T.02541 | Bourbon amarillo | D | 1B |
| T | T.00996 | Erecta | C | 4B |
| T | T.02316 | Typica Xanthocarpa 452 PQ x 28603 (Autopolinizado) | B | LOTE 1 |
| T | T.02316 | Typica Xanthocarpa 452 PQ x 28603 (Autopolinizado) | D | 1A |
| T | T.03456 | Typica C10 not selfed, Brasil x 47217 | A | 3B |
| T | T.04076 | Typica amarillo | D | 5B |

Las características evaluadas de producción y fertilidad se indican en el cuadro 4, las cuales se utilizaron de base para realizar los cálculos correspondientes para las variables derivadas para el análisis de la información.

Cuadro 4. Características evaluadas de las muestras de frutos y granos de café cosechados de las variedades de café Typica, Bourbon e Híbrido de Timor.

| Características | Formula de Determinación |
|--|--------------------------|
| Número de frutos cosechados por planta | Conteo directo |
| Número de frutos flotantes por cosecha. | Por inmersión en agua |
| Peso fresco de los frutos en g | Registro directo de peso |
| Peso seco del grano a 0% de humedad en g | Registro directo |
| Número de granos caracoles | Conteo directo |
| Número de granos normales | Conteo directo |

A partir de las características de los frutos y granos evaluadas (Cuadro 4), se generaron las siguientes variables para el análisis estadístico de la información:

$$\text{Porcentaje de frutos flotantes} = \frac{\text{Número de frutos flotantes}}{\text{Número total de frutos}} \times 100$$

$$\text{Peso de 100 granos oro (11\% de humedad)} = \frac{\text{Peso seco} \times 100}{\text{Número de granos} \times 0.89}$$

$$\text{Porcentaje de rendimiento de café oro (11\% de humedad)} = \frac{\text{Peso seco}}{0.89} \times \frac{100}{\text{Peso fresco}}$$

$$\text{Relleno de los granos} = \frac{\text{Número de granos}}{\text{Número total de frutos}}$$

$$\text{Porcentaje de granos caracoles} = \frac{\text{Número de granos caracoles}}{\text{Número total de granos}} \times 100$$

3.1.3. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado para el estudio de las características de producción, fertilidad y de la hoja corresponde a un diseño jerárquico balanceado; el modelo matemático es:

$$Y_{(ijk)l} = \mu + \tau_i + \beta_{j(i)} + \lambda_{k(ij)} + \varepsilon_{l(ijk)}$$

$Y_{(ijk)}$ = Variable de respuesta correspondiente al árbol k dentro de variedad j y dentro de grupo i.

μ = promedio de la población

τ_i = Grupo genético: Typica y Bourbon

$\beta_{j(i)}$ = Por variedad y/o accesión dentro de grupo

$\lambda_{k(ij)}$ = Árbol dentro de variedad y dentro de grupo

$\varepsilon_{(ij)k}$ = Error aleatorio de cosecha l, árbol k, variedad j y grupo i.

3. 2. Caracterización molecular

3. 2. 1. Ubicación

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del CATIE.

3. 2. 2. Material experimental.

Para la caracterización molecular se seleccionaron 35 accesiones de las 84 accesiones utilizadas para la caracterización agro-morfológica (una planta por accesión), representativas de cinco grupos genéticos presentes en el germoplasma de café del CATIE, más tres genotipos de *C. canephora*.

La selección de accesiones se realizó teniendo en cuenta las condiciones del equipo de laboratorio, porque el termociclador y la cámara de electroforesis permite migrar 40 muestras, además de los costos de la investigación. En el cuadro 5 se presenta la descripción de cada accesión. La distribución de los individuos por grupo genético caracterizado molecularmente se presenta a continuación:

- 6 Genotipos de variedades derivadas del grupo Typica,
- 6 Genotipos de variedades derivadas del grupo Bourbon,
- 8 Genotipos correspondientes al grupo del Híbrido de Timor,
- 6 Genotipos correspondientes a las “variedades silvestres” recolectadas en Etiopía,
- 9 Genotipos correspondientes a las variedades introgresadas (“Catimores / Sarchimores”),
- 3 Genotipos de la especie *C. canephora*.
Progenitores de la variedad “Nemaya” (T3661 2-1 y T 3751 1-2) más un genotipo del grupo genético “Guineo” de Africa del oeste.

3. 2. 3. Métodos

El material vegetal utilizado para la presente investigación fueron hojas. La metodología para la caracterización molecular consistió en:

- 1- Colectar el material (hojas) de las accesiones a evaluar (1 planta) representativa de la accesión correspondiente a cada grupo genético

cantidad de 0,2 gr.

2- Extracción de ADN.

3- Cuantificación de ADN.

4- Reacción de PCR para generar los marcadores RAPDs.

5- Toma de datos.

6- Análisis de datos.

Cuadro 5. Descripción de los genotipos utilizados para realizar el estudio molecular por grupo: T: Typica, B: Bourbon, HDT: Híbrido de Timor, INT: Introgresado, SIL: Silvestre, CAN: *Coffea canephora*

| Grupo | N° Accesoión | Descripción | Grupo | N° Accesoión | Descripción |
|-------|--------------|-------------------|-------|----------------|--------------------|
| T 1 | T.00996-1 | Typica | HDT 2 | T.05289-2 | CIFC 2252/2 |
| T 2 | T.00982-5 | Híbrido de Ceilán | HDT 3 | T.05290-10 | CIFC 2252/28 |
| T 3 | T.00977-1 | Blue Mountain | HDT 4 | T.017790-5 | CIFC 843 |
| T 4 | T.00992-1 | Padang | HDT 5 | T.04388-4 | CRRC 1343/180 |
| T 5 | T.03629-5 | Pluma Hidalgo | HDT 6 | T.04390-1 | CRRC 1343/933 |
| T 6 | T.02921-3 | Bronze 009 | HDT 7 | T.04387-1 CLON | CRRC 1343/86 |
| B 1 | T.02308-5 | Caturra | HDT 8 | T.05291-4 | CIFC 2252/57 |
| B 2 | T.00995-1 | Bourbon | INT 1 | T.05296-5 | Sarchimor |
| B 3 | T.04270-4 | Mibirizi | INT 2 | T.12844-1 | Catimor |
| B 4 | T.02401-1 | Pantgoer | INT 3 | T.11670-2 | Catimor Colombiano |
| B 5 | T.02719-1 | N-100 | INT 4 | T.16784-1 | SARCHIMOR |
| B 6 | T.02723-1 | I-60 | INT 5 | T.08667-5 | Catimor |
| SIL 1 | T.16707-3 | ET-18 | INT 6 | T.08666-2 | Catimor |
| SIL 2 | T.16708-5 | ET-19 | INT 7 | T.17597-1 | Catimor Colombiano |
| SIL 3 | T.04952-1 | E 20 | INT 8 | T.16786-3 | Sarchimor |
| SIL 4 | T.04472-2 | E 7 | INT 9 | T.05175-1 | Catimor |
| SIL 5 | T.16739-2 | 258 ET 59 | CAN 1 | T.03561-4 | Robusta |
| SIL 6 | T.16695-2 | ET 6 | CAN 2 | T.03751-2 | Robusta |
| HDT 1 | T.04452-3 | CRRC 1342/258 | CAN 3 | T.21255 | Guineo |

3.2.3.1. Aislamiento del ADN

Se utilizó el "Método CTAB- minipreparaciones" (Murray y Thompson, 1980), utilizado en el laboratorio de Biología Molecular del CATIE. El principio se basa en extraer ADN crudo y

de buena calidad a partir de hojas jóvenes y frescas. En la etapa de maceración se rompen las membranas celulares y se liberan las organelas. En las etapas subsiguientes se utilizan sustancias específicas para romper la tensión superficial que se crea en el medio de extracción y se degradan las membranas nucleares y de las mitocondrias, para liberar el ADN (Anexo 1).

3.2.3.2. Cuantificación del ADN

Para cuantificar el ADN se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % p/v lo que permite verificar la cantidad de ADN a la vez (Anexo 2). La metodología consistió en tomar 1µl de la solución de ADN y colocarlo en solución con 17µl de TE (Anexo 5) más 2µl de “loading bufferBpb” (azul de bromofenol). La muestra se coloca en el gel de agarosa contenido en un cámara de electroforesis y se pone a migrar por espacio de una hora.

Para cuantificar el ADN se utilizó el marcador “Lambda Hind III” (SIGMA) y dos muestras de ADN de café como testigo calibradas a 100 ng/µl; la estimación del contenido de ADN de las muestras en estudio se realizó por comparación de grosor e intensidad de la banda que se produce después de un periodo de coloración en bromuro de etidio.

3.2.3.3. Amplificación del ADN

Para la amplificación del ADN se utilizó blancos de reacción de PCR o “primers” de la empresa University of British Columbia (UBC). Los “primers” vienen en una presentación de 10 µg por tubo, los cuales se diluyeron en una solución de TE, a una concentración de 20 µM (solución “stock”) de acuerdo al peso molecular de cada uno de ellos.

Para el estudio se utilizó dos series de “primers” (UBC-600 y UBC-700). Se realizó las pruebas correspondientes para determinar la concentración apropiada de cada uno de los “primers”. Se evaluaron 150 “primers” (100 de la serie UBC-700 y 50 de la serie UBC-600) con cinco muestras de ADN; cada una representando un grupo genético (T.00996, T.00995, T. 04387. T. 16695 y T.03561), para la selección de los “primers” que presentaran polimorfismo. Cada “primer” polimórfico se corrió con las 38 muestras de café.

Además se utilizaron 5 “primers” polimórficos para café (OPI-7, OPJ-19, OPM-4, UBC-220 y OPL-18) seleccionados por el Proyecto Regional de Mejoramiento Genético de Café Arabica (Red PROMECAFE) de la empresa Operon Technology Inc (Francois Anthony, comunicación personal).

Para la producción de RAPDs se utilizó los protocolos desarrollados en el laboratorio de Biología Molecular, en el marco del Proyecto Regional de Mejoramiento Genético de Café Arabica (Red PROMECAFE), con la participación del CATIE y la Cooperación Francesa.

La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer DNAThermal Cycler 480, el programa de amplificación para la “Taq Stoffel fragment”(Perkin Elmer) consistió en: un ciclo inicial de desnaturalización (apertura de la cadena de ADN) de 4 minutos a 95°C; 40 ciclos de 1 minuto a 94°C “desnaturalización del ADN”, 1 minuto a 35°C “annealing” (unión del primer a los sitios complementarios de la cadena disociada) y 2 minutos a 72°C síntesis (síntesis de la cadena complementaria en una dirección específica 5’ a 3’), y un ciclo final de 7 minutos a 72°C “denominado extensión”. Finalizado el programa de PCR, se dejaron enfriar las muestras por 15 minutos a 0°C para estabilizar los productos de amplificación.

El volumen final de la reacción de PCR fue de 25 μ l, conteniendo las siguientes concentraciones y molaridades: 10 ng de ADN genómico, 150 μ M de cada dinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3,5 mM de $MgCl_2$, 12 mM de Tris HCl (pH 8.3), 12 mM de KCl, 1,0 μ M de “primer” y 3 unidades de Taq Stoffel Fragment (Perkin Elmer) (Anexo 4).

Para los “primers” de la empresa Operon se utilizó la “Amplitaq Gold” (Perkin Elmer), el volumen final de reacción fue de 25 μ l, conteniendo las siguientes concentraciones y molaridades: 10 ng de ADN genómico, 150 μ M de cada dinucleótido, (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 12 mM de Tris HCl (pH 8.3), 60 mM de KCl, 3,0 mM $MgCl_2$, 1 μ M de “primer”, y 1 U de “Amplitaq Gold” (Perkin Elmer). El programa de amplificación utilizado para la “Amplitaq

Gold” consistió de 1 ciclo de 10 minutos a 94° C para la activación de la enzima; 40 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 1 minuto a 35°C “annealing” y 2 minutos a 72°C síntesis (Anexo 4); y un ciclo final de 7 minutos a 72°C extensión. Finalizado el programa de PCR se dejaron enfriar las muestras a 0°C por un tiempo de 15 minutos para estabilizar los productos de amplificación.

A cada tubo se le agregó 30 µl de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra de reacción durante el proceso de PCR, este procedimiento se utilizó para los dos protocolos antes mencionados.

Se prepararon cantidades suficientes de reactivos para al menos trabajar cinco días. De este modo se reducen los errores en la preparación de estos reactivos, ya que al requerir cantidades tan pequeñas por muestra se incrementa el riesgo de error preparando diariamente estos reactivos y se ahorra tiempo en cada día de trabajo.

Por último las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % p/v, luego se realizó la tinción por coloración en una solución de bromuro de etidio y el revelado de la electroforesis en una lámpara de luz ultravioleta. El peso molecular de los productos de amplificación se estimaron usando una escalera de ADN de 123 pares de bases (SIGMA), se tomó una fotografía a cada gel para proceder al registro de los datos.

La calificación de los fragmentos polimórficos presentes en los “primers” antes mencionados se realizó asignando un 1 para los casos en que el marcador estuviera presente y 0 para su ausencia.

3.3. Análisis de los datos

3.3.1. Análisis de datos de granulometría y características morfológicas

Los análisis estadísticos de las características de granulometría y morfológicas se

realizaron con el paquete estadístico SAS versión 6.12, en la Unidad de Biometría del CATIE. Para la información de producción y fertilidad del grano de café, se realizaron los análisis de varianza respectivos de acuerdo al modelo jerárquico utilizado. Se realizaron análisis separados para las variedades de café Typica y Bourbon, y para las variedades introgresadas; entre y dentro de grupo genético, variedad, árbol y sus interacciones.

Se realizó la prueba de medias “LSMean” (Prueba de medias ajustadas con una prueba de T de Student) para determinar la similitud y/o diferencia por variedad y árbol dentro del grupo Typica y Bourbon. Para el grupo de introgresados se realizó la prueba de medias de Tukey por variedad y LSMean para árboles. Los niveles de significancia para los análisis de varianza y pruebas de medias se indican en la sección de resultados de la siguiente forma:

| | | | |
|-----|------|-------|-------|
| * | 0,05 | < P < | 0,01 |
| ** | 0,01 | < P < | 0,001 |
| *** | | P < | 0,001 |

Se realizó el análisis de los componentes de la varianza para conocer el aporte efectivo del componente grupo, variedad y árbol en cada grupo genético en estudio por variable. Los componentes de la varianza se utilizaron para estimar el índice de heredabilidad para cada característica dentro de cada grupo genético con la siguiente fórmula:

$$H^2 = \frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_g + \sigma^2_f + \sigma^2_w}$$

donde:

σ^2_g = Debido a grupo

σ^2_f = Debido a variedad

σ^2_w = Debido a árbol

Para clasificar las variedades Amphillo, Rume Sudan, ET-6 y ET-59 en el grupo Typica o Bourbon se realizó un análisis discriminante basado en las características derivadas de los frutos y granos.

Además se realizó un análisis de correlación para las características derivadas de producción y fertilidad por grupo genético para determinar el grado de asociación entre las diferentes variables. La figura 2 presenta en forma esquematizada el procedimiento realizado para el análisis de datos de producción, fertilidad y características morfológicas.

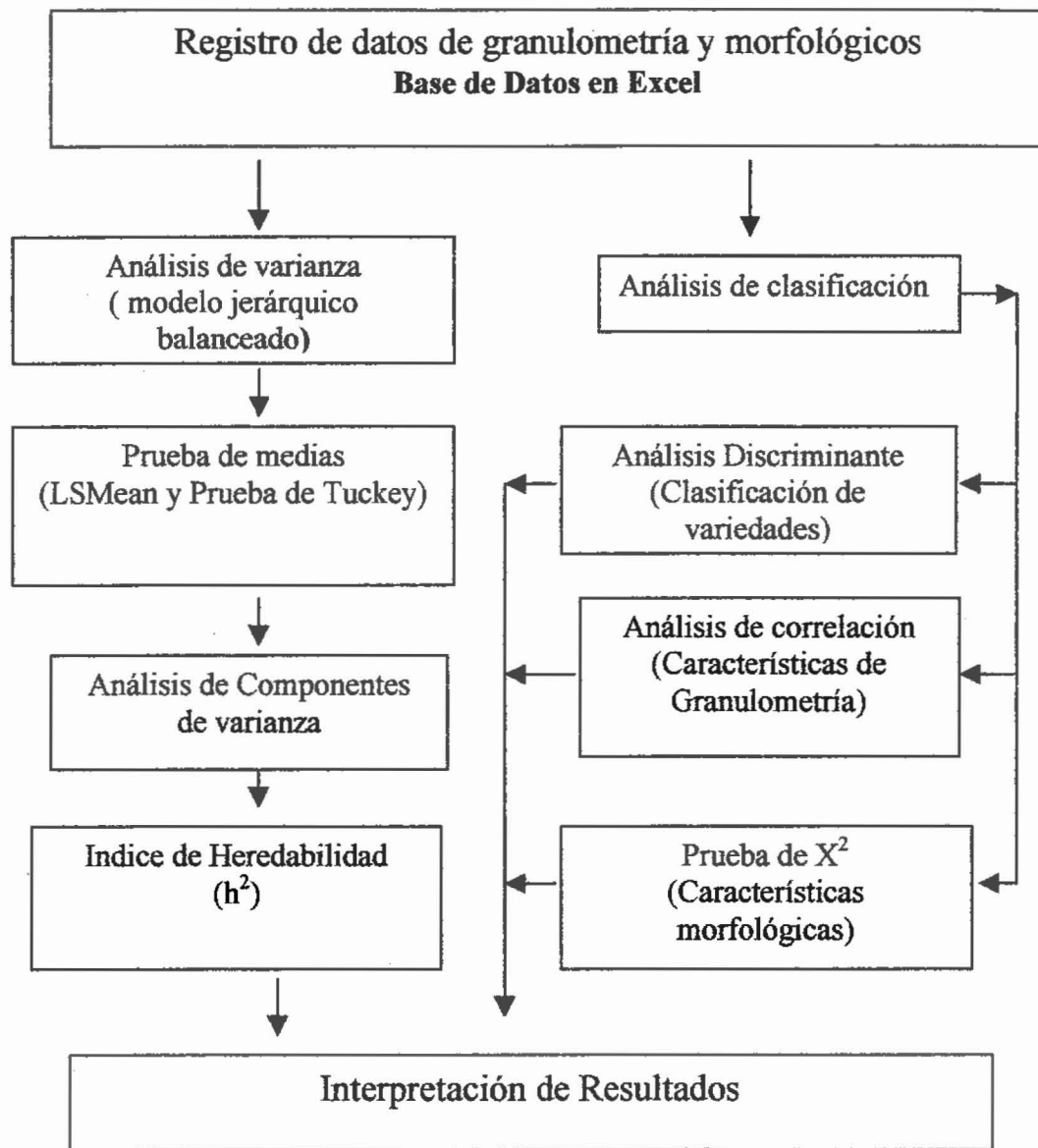


Figura 2. Flujo de análisis estadísticos de los datos morfológicos, producción y fertilidad de café.

3.3.2. Análisis de datos moleculares

3.3.2.1. Matriz de similitud y distancias genéticas

La matriz de distancia genéticas fue calculada de acuerdo a la definición de similitud de Dice (1945):

$$S_{AB} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

donde:

S_{AB} = el coeficiente de similitud entre dos accesiones i y j ,

a = el número de bandas presentes en ambas accesiones i y j ,

b = el número de bandas presentes en i y ausentes en j ,

c = el número de bandas presente en j y ausentes en i .

La definición de similaridad excluye los fragmentos que están ausentes en ambas accesiones, debido a que la doble ausencia no puede ser atribuida a una causa común. La matriz de similitud fue analizada por el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Sing Arithmetic Averages) (Sneath y Sokal, 1973) con el software NTSYS-PC, versión 1.80 (©Applied Biostatistics, Inc.). Los dendrogramas fueron construidos con el programa TREE de NTSYS.

La variación genética entre y dentro de grupos, se analizó con la formula de Nei (1978), la cual toma en consideración un factor de corrección produciendo un resultado insesgado de la medida de identidad y de distancia genética corregido para cuando se trabaja con poblaciones pequeñas. El dendrograma de clasificación de los grupos genéticos está basado en el índice de similitud de Nei (1978) con el método UPGMA modificado por Neighbord con el procedimiento de Philip Versión 3.5 del paquete estadístico Popgene 1.32. (©University of Alberta and Center

For International Forestry Research).

El análisis de componentes principales se realizó con el paquete estadístico STATISTICA (StatSoft, Inc. Versión 5.1) utilizando los loci polimórficos de los grupos genéticos Typica y Bourbon respectivamente. Este análisis permitió determinar los factores o variables canónicas que más contribuyen a explicar la variabilidad genética presente en los grupos de estudio. La figura 3 presenta el flujograma de análisis de la información molecular en el presente estudio.

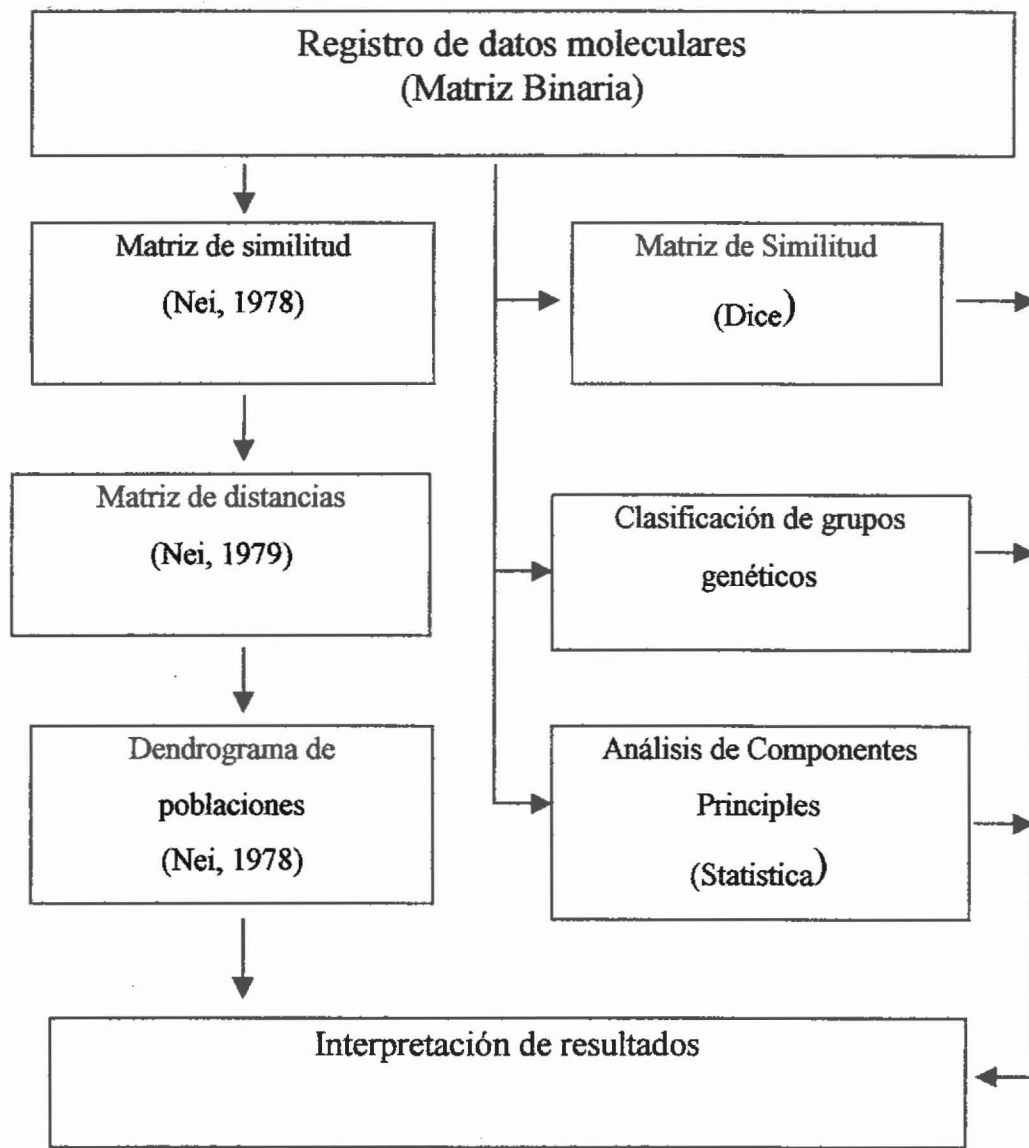


Figura 3. Flujograma de análisis estadísticos de datos moleculares generados con la metodología RAPDs en los grupos genéticos de café.

IV. RESULTADOS

4. 1. Caracterización morfo-agronómica

4. 1. 1. Caracterización morfológica

El análisis de varianza para las características de longitud de la hoja y ancho de la hoja se realizaron bajo el modelo del diseño jerárquico irrestricto al azar establecido desde el inicio de la investigación. El estudio incluyó 2 grupos con 24 variedades y 79 árboles de los cuales hubo una mayor representación del grupo Bourbon (Cuadro 3).

El Cuadro 6 presenta el promedio, coeficiente de variación, desviación estándar y nivel de significancia para las características de hoja evaluadas.

Cuadro 6. Promedio, coeficiente de variación, desviación estándar, nivel de significancia para longitud y ancho de la hoja de café.

| Característica | Promedio | Coeficiente de variación | Desviación estándar | Nivel de Significancia | | |
|---------------------|----------|--------------------------|---------------------|------------------------|----------|-------|
| | | | | Grupo | Variedad | Arbol |
| Longitud de la hoja | 15,20 | 5,28 | 0,90 | * | *** | *** |
| Ancho de la hoja | 6,25 | 5,60 | 0,59 | *** | *** | *** |

En el análisis de medias LSMean realizado por grupo, variedad y árbol, el rango de grupos formados osciló entre 1 y 4. Se observa una tendencia marcada a la formación de tres grupos estadísticamente diferentes para ambas características en la mayoría de las variedades evaluadas (Anexo 5).

Se determinó el aporte de los componentes de la varianza para las características de longitud y ancho de la hoja y el índice de heredabilidad para cada característica. Se observa que el mayor aporte del componente de la varianza procede de la variedad seguido por el componente árbol, mientras que el componente grupo es relativamente bajo respecto a los dos componentes anteriores (Cuadro 7).

El índice de heredabilidad para la característica longitud de hoja es bajo; sin embargo, ambos índices son inferiores al 50% y las posibilidades de selección para estas características se reduce en función de los bajos niveles de heredabilidad que presentan estas características.

Cuadro 7. Componentes de varianza e índices de heredabilidad (h^2) para longitud y ancho de hoja para los grupos Typica y Bourbon e Introgresados de café.

| Característica | Componentes de Varianza | | | H^2 |
|----------------------------|-------------------------|----------|-------|-------|
| | Grupo | Variedad | Arbol | |
| Longitud de la hoja en cm. | 11,3 | 61,4 | 21,4 | 0,30 |
| Ancho de la hoja en cm. | 11,0 | 47,0 | 29,8 | 0,47 |

4. 1. 2. Color del brote y ángulo de inserción

El análisis para las características color del brote y al ángulo de inserción de las ramas plagiotrópicas se realizó con la prueba de X^2 . Los resultados de la prueba de X^2 para el color del brote tienen un valor de 30,93, el cual es altamente significativa ($P \leq 0,0001$) y un coeficiente Phi de 0,750. Con estos valores se demuestra el valor de esta característica para clasificar las variedades de café en el grupo Typica o Bourbon respectivamente.

El resultado del análisis para el ángulo de inserción de la rama plagiotrópica no fue significativo; este resultado indica que esta característica es variable entre las variedades del grupo Typica y Bourbon. Al utilizarse para clasificar variedades se corre el riesgo de hacer una mala clasificación. De acuerdo con la descripción de variedades de Krug *et al.*, (1939) algunas

variedades presentan un alto índice de variabilidad para esta característica, acentuándose en las variedades semi-silvestres.

4.1.3. Características de frutos y granos

La caracterización de las variables de granulometría del grano de café es un proceso importante porque permite conocer los aspectos relacionados con los componentes de rendimiento de cada genotipo y características de fertilidad que influyen directamente en la calidad del producto, e identificar las posibilidades de seleccionar genotipos con características promisorias para apoyar a los programas de mejoramiento genético. A continuación se presentan los resultados de esta fase del estudio.

4. 1. 3.1. Porcentaje de frutos flotantes

El cuadro 8 presenta el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y nivel de significancia para la característica de porcentaje de frutos flotantes, el coeficiente de variación para el grupo cultivado es de 44% y para los materiales introgresados es de 34,6%. Para el grupo Typica y Bourbon se presentan diferencias entre grupo-variedad y grupo-variedad-árbol.

Para el grupo de introgresados se determinó diferencias entre variedad y variedad-árbol. La desviación estándar para esta característica en ambos grupos genéticos es 1,72 y 1,87 respectivamente. El promedio de frutos flotantes para el grupo Typica y Bourbon es de 6,7, mientras para el grupo de introgresados es de 10,1 frutos.

La prueba de medias LSMean al 5% permitió determinar diferencias significativas entre variedades en el grupo Typica y Bourbon. Para esta característica se obtuvo la formación de tres grupos de variedades diferentes. Las variedades introgresadas presentaron diferencias significativas al 5% con la prueba de Tukey y la formación de tres grupos de variedades. (Anexo 6 y 11).

La prueba de medias LSMeans por árbol estableció 11 grupos de árboles para el grupo Typica y Bourbon e introgresados (datos no presentados).

Cuadro 8. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de Porcentaje de Frutos flotantes para variedades cultivadas e introgresadas de café.

| Grupo | Coeficiente de variación | Desviación estándar | Promedio | Nivel de significancia | | |
|-------------------|--------------------------|---------------------|----------|------------------------|----------------|----------------------|
| | | | | Grupo | Grupo-Variedad | Grupo-Variedad-Árbol |
| Typica Bourbon | 43,95 | 1,72 | 6,71 | NS | *** | *** |
| Introgresados | 34,55 | 1,87 | 10,13 | | *** | *** |

4. 1. 3. 2. Peso de 100 granos de café oro

Para la característica peso de 100 granos de café oro (11% de humedad del grano), se determinó que se presentan diferencias en el grupo Typica y Bourbon entre grupo, grupo-variedad y grupo-variedad-árbol, con un promedio de $6,7 \pm 1,00$; para el grupo de introgresados el promedio de $16,5 \pm 1,13$ (Cuadro 9). Se observa en las variedades introgresadas que el peso de 100 granos oro es superior respecto a las variedades Typica y Bourbon.

La prueba de medias LSMeans estableció diferencias entre variedades Typica y Bourbon con la formación de 10 grupos. La prueba de Tukey para las variedades introgresadas identificó diferencias con la formación de 14 grupos (Anexo 7y 12)

La prueba LSMean identificó diferencias entre árboles de las variedades de los grupos genéticos en estudio. Para el grupo Typica y Bourbon se formaron 28 grupos de árboles y para el grupo de introgresados se formaron 14 grupos.

Cuadro 9. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de peso de 100 granos de café oro (11%de Humedad) para variedades cultivadas e introgresadas de café.

| Grupo | Coeficiente de variación | Desviación estándar | Promedio | Nivel de significancia | | |
|------------------|--------------------------|---------------------|----------|------------------------|----------------|----------------------|
| | | | | Grupo | Grupo-Variedad | Grupo-Variedad-Árbol |
| Typica - Bourbon | 6,90 | 1,00 | 14,39 | *** | *** | *** |
| Introgresados | 7,71 | 1,13 | 16,52 | | Variedad | Variedad-Árbol |
| | | | | | *** | *** |

4. 1. 3. 3. Porcentaje de Rendimiento de café oro

El cuadro 10 presenta el coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para las variedades del grupo Typica y Bourbon y las variedades introgresadas. El promedio de porcentaje de rendimiento de café oro es de $17,02 \pm 1,06$ para el grupo Typica y Bourbon y de 17,87; para el grupo de variedades introgresadas, se observa que la diferencia entre ambos promedios es relativamente estrecha superado ligeramente por las variedades introgresadas.

Se establecieron diferencias en el grupo Typica y Bourbon entre grupo, grupo-variedad y grupo-variedad-árbol; en las variedades introgresadas se determinó diferencias entre variedades y entre variedad-árbol.

En la prueba de medias LSMean para porcentaje de rendimiento de café oro, se presentó diferencias entre las variedades Typica y Bourbon, se formaron 9 grupos de variedades (Anexo 8); entre árboles se obtuvieron 28 grupos.

La prueba Tukey entre variedades introgresadas estableció diferencias, y se establecieron 5 grupos de variedades (Anexo 13). La prueba LSMean entre árboles determinó la formación de 13 grupos.

Cuadro 10. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de porcentaje de rendimiento de café oro para las variedades Typica, Bourbon e introgresadas de café.

| Grupo | Coeficiente de variación | Desviación estándar | Promedio | Nivel de significancia | | |
|------------------|--------------------------|---------------------|----------|------------------------|-----------------|----------------------|
| | | | | Grupo | Grupo-Variedad | Grupo-Variedad-Arbol |
| Typica - Bourbon | 6,62 | 1,06 | 17,02 | *** | *** | *** |
| Introgresados | 8,69 | 1,25 | 17,87 | | Variedad *** | Variedad-Arbol * |

4. 1. 3. 4. Relleno del fruto

Para la característica de porcentaje de relleno de fruto, se presentaron diferencias en las variedades del grupo Typica y Bourbon entre grupo-variedad y variedad-árbol y para las variedades introgresadas entre variedad, y variedad-árbol.

El coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para esta característica se presenta en el cuadro 11. Se observa que las variedades del grupo Typica y Bourbon presentan un promedio ligeramente superior a las variedades introgresadas

Cuadro 11. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica relleno del fruto de café para variedades Typica, Bourbon e introgresadas de café.

| Grupo | Coeficiente de variación | Desviación estándar | Promedio | Nivel de significancia | | |
|------------------|--------------------------|---------------------|----------|------------------------|-----------------|-----------------------|
| | | | | Grupo | Grupo-Variedad | Grupo-Variedad-arbol |
| Typica - Bourbon | 6,45 | 0,33 | 1,71 | NS | *** | *** |
| Introgresados | 6,10 | 0,32 | 1,62 | | Variedad *** | Variedad-Arbol *** |

La prueba LSMean entre las variedades de Typica y Bourbon y entre árboles determinó diferencias y formaron 7 grupos de variedades (Anexo 9), y 12 grupos de árboles.

La prueba de Tukey para variedades introgresadas estableció diferencias y formó 2 grupos de variedades (Anexo 14); entre árboles se formaron 6 grupos estadísticamente diferentes.

4. 1. 3. 5. Porcentaje de grano caracol

El cuadro 12 presenta el coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de porcentaje de grano caracol. El promedio para las variedades Typica y Bourbon es de $6,04 \pm 1,71$ mientras que las variedades introgresadas presentan un valor de $7,76 \pm 1,62$.

Para esta característica se encontró diferencias entre grupo-variedad y grupo-variedad-árbol en las variedades de Typica y Bourbon. Para las variedades introgresadas se determinó diferencias entre variedad y variedad-árbol.

El análisis de medias LSMeans para variedad y árbol del grupo Typica y Bourbon estableció la formación de 4 grupos de variedades (Anexo 11), y 14 grupos de árboles estadísticamente diferentes respectivamente. La prueba de Tukey para las variedades introgresadas estableció diferencias entre variedades y variedad - árbol, se formaron 3 grupos de variedades (Anexo 10) y 15 grupos de árboles estadísticamente diferentes.

Cuadro 12. Coeficiente de variación, desviación estándar, promedio y nivel de significancia para la característica de porcentaje de granos caracoles para variedades cultivadas e introgresadas de café.

| Grupo | Coeficiente de variación | Desviación estándar | Promedio | Nivel de significancia | | |
|------------------|--------------------------|---------------------|----------|------------------------|-----------------|-----------------------|
| | | | | Grupo | Grupo-Variedad | Grupo-Variedad-Planta |
| Typica - Bourbon | 46,02 | 1,71 | 6,39 | NS | *** | ** |
| Introgresados | 32,25 | 1,58 | 7,76 | | Variedad *** | Variedad-Arbol *** |

4. 1. 3. 6. Comportamiento de las variables de fertilidad

Se realizó el análisis de frecuencia por mes de cosecha (figura 4), para las variables de fertilidad, de fruto y grano de café: porcentaje de frutos flotantes, relleno del fruto y porcentaje de grano caracol, para los grupos Typica, Bourbon e Introgresados. Para la variable porcentaje de frutos flotantes se determinó que los mayores promedios se presentaron en los primeros meses de cosecha, con una ligera disminución en el periodo de mayor concentración de la cosecha y se

incrementan al final de la misma. Esta variable presentó una desviación estándar alta para todos los periodos de evaluación, claro indicador de la dispersión de los datos y la posible interacción de los factores de medio ambiente y de floración.

La variable relleno de fruto presentó un comportamiento uniforme durante el periodo de evaluación con valores de desviación estándar bajos, esta característica es poco influenciada por los factores del medio y fisiológicos de la planta. Para el porcentaje de granos flotantes se presentaron porcentajes altos para la primera cosecha, disminuyendo en las cosechas posteriores; la desviación estándar presentó un comportamiento similar disminuyendo conforme a la disminución del porcentaje promedio de granos caracoles.

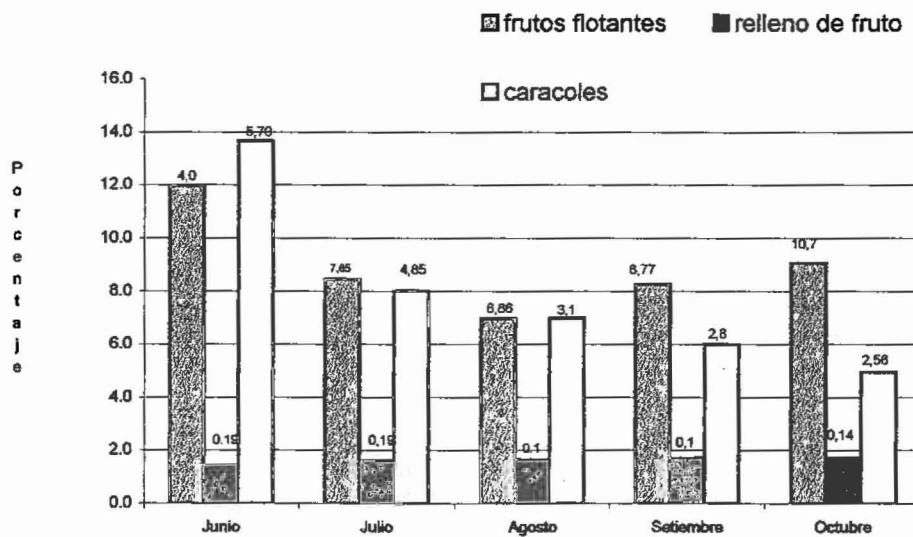


Figura 4. Frecuencias y desviación estándar para las características de porcentaje de frutos flotantes, relleno de fruto y porcentajes de grano caracol de café por meses de cosecha.

4.1.4. Componentes de varianza

El cuadro 13 presenta los componentes de varianza para las características derivadas de granulometría para las variedades de Typica y Bourbon e Introgresadas. Se observa que los mayores aportes se atribuyen a los componentes variedad y árbol en el grupo Typica y Bourbon. El componente grupo presenta bajos porcentajes a excepción de la variable porcentaje de rendimiento de café oro, donde el efecto de grupo es el segundo componente de la varianza .

Para el grupo de variedades introgresadas se encontró que para las variables de rendimiento, peso de 100 granos de café oro y porcentaje de rendimiento de café oro el mayor porcentaje del componente de la varianza se atribuye a variedad; mientras que para las variables de defectos de grano el mayor porcentaje es debido al componente árbol.

Cuadro 13. Componentes de varianza en porcentaje para las variables derivadas de producción y fertilidad de café para los grupos Typica y Bourbon, y variedades introgresadas.

| Variable | Grupos Typica y Bourbon | | | Grupo de Introgresados | |
|---------------------------------------|-------------------------|----------|-------|------------------------|-------|
| | Grupo | Variedad | Arbol | Variedad | Arbol |
| Porcentaje de frutos flotantes | 4,0 | 43,0 | 38,0 | 31,0 | 53,0 |
| Peso de 100 granos de café oro | 1,3 | 53,9 | 29,3 | 54,7 | 19,4 |
| Porcentaje de rendimiento de café oro | 31,5 | 33,4 | 10,8 | 39,0 | 12,0 |
| Relleno del fruto | 4,0 | 32,0 | 24,0 | 23,0 | 38,5 |
| Porcentaje de grano caracol | 2,9 | 15,2 | 23,0 | 10,0 | 42,2 |

4.1.5. Índice de Heredabilidad

El índice de heredabilidad (H^2) se calcula a partir de los componentes de la varianza, determinados a partir de la descomposición de los componentes de la varianza utilizando el cuadrado medio del error.

El cuadro 14 presenta el índice de heredabilidad para cada variable derivada de granulometría en los grupos Typica y Bourbon e Introgresados, para el grupo de las variedades Typica y Bourbon el índice de heredabilidad es inferior al 50% a excepción de la variable porcentaje de granos caracoles que presenta un H^2 de 65%.

Para las variedades introgresadas los índices de heredabilidad son altos para las variables de defecto de grano; y bajos para las variables de rendimiento; peso de 100 granos de café oro y porcentaje de rendimiento de café oro.

Cuadro 14. Índice de heredabilidad (H^2) para los grupos Typica y Bourbon e Introgresados determinados para las variables derivadas de producción y fertilidad del grano de café.

| Variable | Grupo Typica y Bourbon | Ggrupo introgresados |
|---------------------------------------|------------------------|----------------------|
| Porcentaje de frutos flotantes | 0,49 | 0,63 |
| Peso de 100 granos de café oro | 0,35 | 0,26 |
| Porcentaje de rendimiento de café oro | 0,14 | 0,24 |
| Relleno del fruto | 0,46 | * 0,94 |
| Porcentaje de granos caracoles | 0,65 | 0,81 |

4. 1. 6. Correlaciones entre características derivadas de producción y fertilidad

Las correlaciones para las características derivadas de fertilidad y producción fueron analizadas a partir de la información generada por 66 genotipos del grupo Typica y Bourbon y 33 genotipos del grupo de introgresados.

Los resultados del nivel de asociación entre las características de granulometría para ambos grupos se presentan en el cuadro 15.

Cuadro 15. Correlaciones de las características de producción y de fertilidad del grano de café para los grupos Typica y Bourbon, e Introgresados.

| Pares de características | | Correlaciones | |
|--------------------------|--------------------|---------------|-----------|
| | | Positivas | Negativas |
| <u>Typica y Bourbon</u> | | | |
| % de frutos flotantes | % rendimiento oro | | 0,43 |
| | relleno del fruto | | 0,68 |
| Peso de 100 granos oro | % de grano caracol | 0,31 | |
| | % rendimiento oro | 0,61 | |
| % rendimiento oro | relleno del fruto | 0,34 | |
| | % de grano caracol | | 0,27 |
| Relleno del fruto | % de grano caracol | | 0,86 |
| | | | |
| <u>Introgresados</u> | | | |
| % de frutos flotantes | % rendimiento oro | | 0,47 |
| | relleno del fruto | | 0,62 |
| Peso de 100 granos oro | % rendimiento oro | 0,65 | |
| | % rendimiento oro | 0,52 | |
| Relleno del fruto | % de grano caracol | | 0,34 |
| | % de grano caracol | | 0,82 |

Es importante señalar la relación inversa que presentan las características de fertilidad del grano respecto a los componentes de producción (peso de 100 granos oro y porcentaje de rendimiento de café oro). Estas relaciones facilitan los procesos de selección de genotipos con bajos niveles de caracteres indeseables. A su vez, contribuyen a obtener avances significativos en los programas de selección y mejoramiento genético en el corto o mediano plazo.

4. 1. 7. Discriminación entre Typica y Bourbon

Las variedades Rume Sudan, Amphilo, ET-6 y ET-59 presentan caracteres morfológicos que se prestan a confusión, por ejemplo la variedad Amphilo presenta características de hoja semejantes a las de las variedades Bourbon, mientras que la coloración de las hojas nuevas son de color intermedio entre verde y bronceado. La variedad Rume Sudan, las hojas son pequeñas angostas de forma elíptica a oblonga con peciolo muy desarrollados. Esta variedad presenta características intermedias entre los cafés de origen Etíope y los Bourbon. Los cafés de origen Etíope obtenidos de plantas semi-silvestres recolectados en diferentes expediciones son muy polimórficos, presentando tipos muy diversos (Sylvain, 1958).

Por las razones antes mencionadas se procedió a analizar estas variedades por las características de granulometría y clasificarlas a través del análisis discriminante confrontándolas con las variedades cultivadas del grupo Typica y Bourbon. El análisis discriminante mostró una probabilidad de 0,485 para el grupo Bourbon y 0,515 para el grupo Typica. Cuando la proporción esperada era de 0,50 para ambos grupos. Estos valores muestran que los resultados obtenidos son muy cercanos a la probabilidad esperada.

La información de la matriz de covarianza combinada presenta un logaritmo natural determinante de 0,88, para un rango de la matriz de covarianza de 5. El cuadro 16 presenta los coeficientes de agrupamiento de la función lineal discriminante. La variable que más contribuye a la determinación es el relleno del fruto, mientras en las otras variables los valores son bajos.

Cuadro 16. Coeficientes de clasificación del análisis discriminante para las variedades Amphilo, Rume Sudan. Et-6 y ET-59 de café.

| Variable | GRUPO | |
|----------------------------------|---------|--------|
| | Bourbon | Typica |
| Constante | -1630 | -1637 |
| Porcentaje de fruto flotantes | 13,97 | 14,02 |
| Peso de grano oro | 3,96 | 3,52 |
| Porcentaje de rendimiento en oro | 9,70 | 11,10 |
| Relleno del fruto | 1528 | 1522 |
| Porcentaje de granos caracol | 51,48 | 51,42 |

La probabilidad posterior de pertenencia de cada miembro en cada grupo fue calculada con la siguiente formula:

$$Pr_{(j|x)} = e^{(-0,5 D2j (X))} / \sum_k e^{(-0,5 D2k (X))}$$

El porcentaje de error de una clasificación incorrecta sin corregir presentó un valor de 16,64%; mientras, el porcentaje de error insesgado (corregido) produjo un valor de 19,76%, lo cual demuestra que la clasificación realizada por el análisis discriminante tiene un valor de aceptación superior al 80%.

El cuadro 17 presenta la clasificación obtenida de las variedades de origen Etíope a través del análisis discriminante por las características rendimiento y de fertilidad de café.

Cuadro 17. Clasificación de las variedades Amphilo, Rume Sudan, Et-6 y ET59 de café por el análisis discriminante.

| Variedad | Grupo | Valor de clasificación | |
|------------|---------|------------------------|--------|
| | | Bourbon | Typica |
| Amphilo | Bourbon | 0,68 | 0,32 |
| ET-59 | Bourbon | 0,69 | 0,31 |
| ET-6 | Bourbon | 0,71 | 0,29 |
| Rume Sudan | Typica. | 0,27 | 0,73 |

Los variedades Amphilo, ET-59 y ET-6 se clasificaron dentro del grupo Bourbon con valor promedio de 0,70 y la variedad Rume Sudan se clasificó dentro del grupo Typica con un valor de 0,73 para las características de rendimiento y los caracteres de fertilidad evaluados. El análisis discriminante permite realizar la clasificación de variedades de café con un grado aceptable de confiabilidad, y parece ser un mecanismo efectivo para utilizar cuando se desconoce, o se tiene ciertas dudas respecto al grupo a que pertenece un determinado genotipo.

4.1.8. Similitud de las accesiones T.04387 y T.05286

En la colección de germoplasma del CATIE están presentes las accesiones T.04387 procedente del CIFC y T.05286 procedente del Instituto Agronómico de Campinas, Brasil, ambas descendientes del Híbrido de Timor. De acuerdo a la descripción del catálogo “Banco de germoplasma de café del CATIE” (Morera *et al.*, 1993), ambas accesiones son las mismas cuya diferencia radica en la procedencia y el año de introducción al CATIE.

Para corroborar la indentidad de ambas accesiones se realizó el estudio de los caracteres de fertilidad, producción y características morfológicas de la hoja.

Los resultados del análisis de varianza demuestran que no presentan diferencias significativas para la variable de peso de 100 granos oro porcentaje de rendimiento de café oro y para las variables de fertilidad (Cuadro 18).

La prueba de medias de Tukey para los números de accesión T.04387 y T.05286 no identificaron diferencias significativas. La prueba LSMeans para árboles dentro de accesión presentó diferencias significativas para las características de peso de 100 granos oro y porcentaje de rendimiento de café oro con la formación de 2 y 3 grupos respectivamente (datos no presentados).

Cuadro 18. Resultados de probabilidad del análisis de varianza (F) para las características de fertilidad y producción de café de las accesiones T.04387 y T.05286.

| Característica | Para variedad | Para árbol |
|---------------------------------------|---------------|------------|
| Porcentaje de frutos flotantes | 0,16 | 0,89 |
| Peso de 100 granos oro | 0,04* | 0,07* |
| Porcentaje de rendimiento de café oro | 0,19 | 0,18 |
| Relleno del fruto | 0,70 | 0,80 |
| Porcentaje granos caracol | 0,11 | 0,28 |

Las características morfológicas de Longitud y Ancho de la hoja, presentaron diferencias entre accesión y entre árboles (Cuadro 19). La prueba de Tukey para accesiones determinó la separación de las accesiones T.04387 y T.05286 para estas características (Anexo 16).

Cuadro 19. Promedio, coeficiente de variación, desviación estándar y nivel de significancia para las características de longitud y ancho de la hoja de café de las accesiones T.04387 y T.05286.

| Característica | Promedio | Coeficiente de variación | Desviación estándar | Nivel de Significancia | |
|---------------------|----------|--------------------------|---------------------|------------------------|-------|
| | | | | Accesión | Arbol |
| Longitud de la hoja | 14,63 | 7,31 | 1,03 | *** | *** |
| Ancho de la hoja | 6,08 | 8,24 | 0,71 | *** | *** |

Se determinó el aporte de los componentes de la varianza para las características de longitud y ancho de la hoja y el índice de heredabilidad para ambas características (Cuadro 20). Se observa que para la longitud de la hoja el mayor aporte lo realiza el componente accesión-

árbol, mientras, para el ancho de la hoja se presenta mayor variabilidad en el componente accesión. El índice de heredabilidad para la longitud de la hoja es mayor que para el ancho de la hoja, ofreciendo mayores posibilidades de seleccionar genotipos para la característica de longitud de la hoja respecto al ancho de la misma.

Cuadro 20. Componentes de varianza e índices de heredabilidad (H^2) para las características de longitud y ancho de la hoja de café para las accesiones T.0 4387 y T.05286.

| Característica | Componente de varianza | | H^2 |
|----------------------------|------------------------|-------|-------|
| | Accesión | Arbol | |
| Longitud de la hoja en cm. | 10,4 | 17,06 | 0,75 |
| Ancho de la hoja en cm. | 13,7 | 11,73 | 0,40 |

4. 2. Caracterización molecular

4. 2. 1 Aislamiento y determinación de la concentración de ADN

En esta investigación se determinó que utilizando el método CTAB- minipreparaciones (Murray y Tohmpson, 1980), se extrajo suficiente cantidad de ADN, con un peso de muestra fresca de 0,20 a 0,30g a partir de hojas jóvenes recolectadas el mismo día de la extracción. El rendimiento obtenido entre genotipos fue variable, pero suficiente para realizar la investigación. La intensidad de maceración incide directamente en la cantidad de ADN extraído; por lo tanto, es necesario realizar una pulverización completa de la muestra con nitrógeno líquido en el mortero para obtener rendimientos adecuados de ADN. El rendimiento de la extracción de ADN puede verse afectado por el método de extracción, la edad de la hoja a utilizar y del genotipo; así como por la experiencia del investigador durante el proceso de maceración de la muestra en el laboratorio.

A las muestras de ADN de los 38 genotipos de café utilizados para el estudio se les realizó la limpieza de ARN como indica el método de extracción (Cuadro 4), se utilizó la solución de RNasa a razón de 10µg/ml de TE. La limpieza del ADN se hace para evitar posibles interferencias durante el desarrollo de la investigación, asegurar una buena calidad de la electroforesis para el revelado de los RAPDs y cuantificar la cantidad de ADN que contiene cada muestra (Figura 4).

El cuadro 21 muestra el rendimiento de ADN obtenido por genotipo, el cual se determino a partir de las pruebas de dilución realizadas. El cuadro 22 presenta las estadísticas descriptivas de rendimiento de ADN por grupo genético estudiado.

Los contenidos de ADN determinados a través de las pruebas de dilución oscilaron entre 98 y 964ng de ADN/ul. El valor mínimo se presentó en la accesión T.02719-1 correspondiente a la variedad N-100 del grupo Typica y el valor máximo se obtuvo en la accesión T.03751-2 progenitor de la variedad "Nemeya", correspondiente a la especie *C. canephora* (Cuadro 21).

Para llegar a los resultados de concentración de ADN fue necesario realizar gradientes de dilución de cada muestra. Esto debido a que la estimación realizada a partir del marcador “Lambda Hind III (SIGMA), y las dos muestras de café de referencia subestimó el contenido real de ADN en algunas muestras.

Cuadro 21. Concentración de ADN extraído de los genotipos de café Arabica y *C. canephora* seleccionados para el estudio de caracterización molecular.

| Accesión | ng ADN / μ l de TE | Accesión | ng ADN / μ l de TE |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| T.00996-1 | 100 | T.05290-10 | 196 |
| T.02308-5 | 100 | T.05291-4 | 165 |
| T.00982-5 | 100 | T.17790-5 | 320 |
| T.00977-1 | 100 | T.05175-1 | 372 |
| T.00992-1 | 100 | T.17597-1 | 372 |
| T.00995-1 | 100 | T.12844-1 | 370 |
| T.03629-5 | 100 | T.16786-3 | 772 |
| T.04270-4 | 196 | T.11670-2 | 196 |
| T.02401-1 | 404 | T.16784-1 | 196 |
| T.02719-1 | 98 | T.08667-5 | 100 |
| T.02723-1 | 156 | T.08666-2 | 156 |
| T.02921-3 | 388 | T.04952-1 | 308 |
| T.016707-3 | 372 | T.04472-2 | 287 |
| T.16708-5 | 156 | T.16739-2 | 388 |
| T.04387-1 | 740 | T.16695-2 | 100 |
| CLON | | | |
| T.04388-4 | 220 | T.03561-4 | 804 |
| T.04390-1 | 404 | T.03751-2 | 964 |
| T.04452-3 | 196 | T.21255 | 100 |
| T.05289-2 | 452 | T.05296-5 | 404 |

Cuadro 22. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de rendimiento de ADN en $\mu\text{g}/\text{ml}$, por grupo genético de café.

| Grupo | Número de Observaciones | Promedio | Desviación Estándar | Coficiente de Variación |
|---------------------|-------------------------|----------|---------------------|-------------------------|
| Bourbon | 6 | 44 | 35,1 | 13,4 |
| Typica | 6 | 52 | 35,6 | 11,3 |
| Silvestre | 6 | 80 | 34,9 | 7,3 |
| Introgresados | 9 | 98 | 60,5 | 7,9 |
| Híbrido de Timor | 8 | 101 | 58,1 | 7,6 |
| <i>C. canephora</i> | 3 | 187 | 137,8 | 6,3 |

.En la muestra T.05291-4 y T.12844-1 se cuantificó originalmente una concentración de 40 ng/ μl de ADN, y en el resto de las muestras que presentan bandas más intensas se determinó una concentración de 100ng/ μl de ADN, éstas estimaciones sirvieron de base para iniciar la gama de dilusiones hasta obtener una amplificación satisfactoria de las muestras.

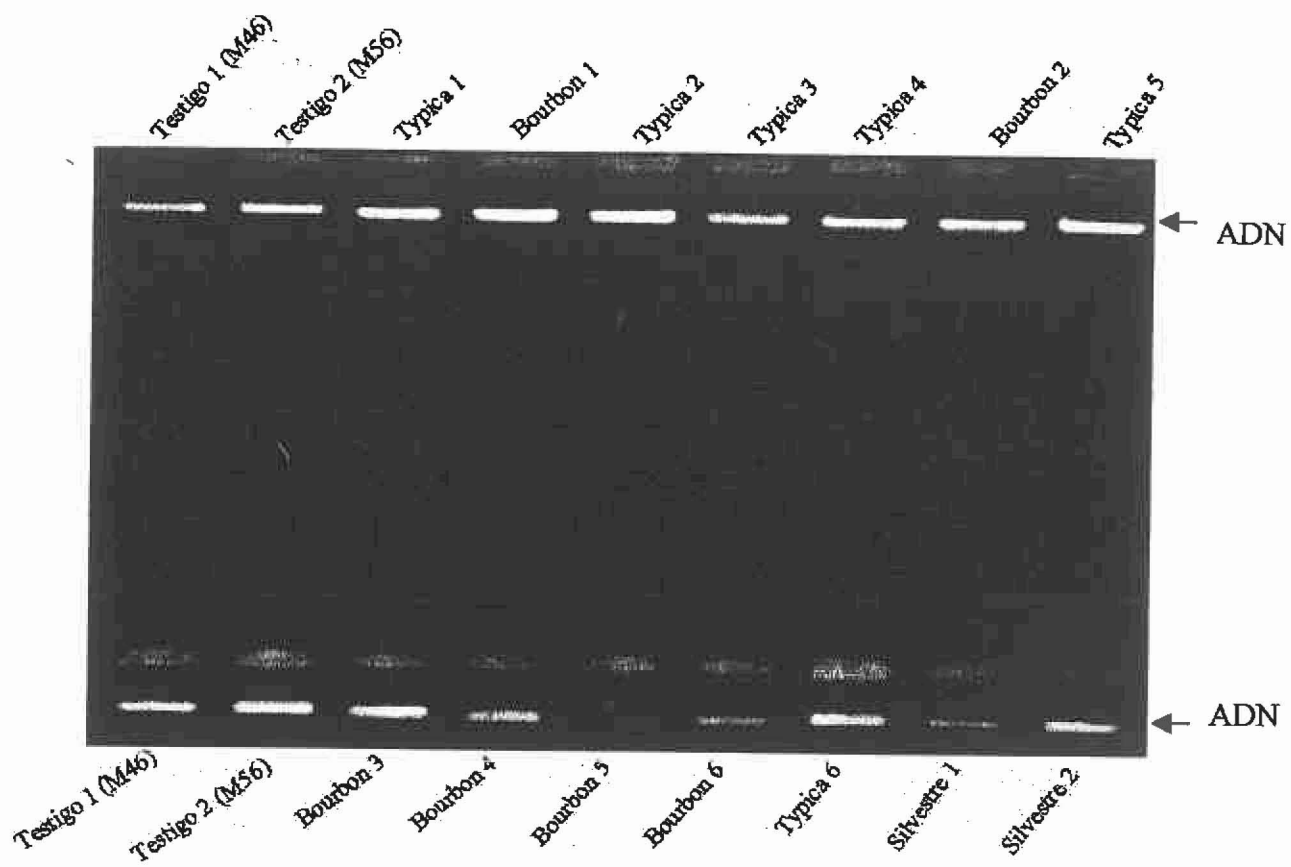


Figura 5. Ejemplo de cuantificación de ADN en gel de agarosa de 14 genotipos de café para el estudio de caracterización molecular.

4. 2. 2 Amplificación de ADN

La amplificación de ADN se realizó con la técnica de RAPDs, no se presentó ningún tipo de contaminación, es decir se realizó una adecuada manipulación de las muestras durante el proceso de extracción del ADN. Se siguió la metodología en forma ordenada para la preparación de los PCR; así como, el manejo de los reactivos y productos de reacción para la preparación de las electroforesis. Know y Higuchi (1989) recomiendan utilizar pipetas separadas para la preparación de los PCR y para la etapa de electroforesis; debido a que los instrumentos son limitantes en el laboratorio, se utilizaron las mismas pipetas sin observar problemas de contaminación en los resultados.

Las pruebas de amplificación de las 38 muestras se realizaron con los “primers” OPX-9, OPN-20 y OPI-7, para comprobar que las diluciones seleccionadas como solución de trabajo presentaran un comportamiento uniforme con el uso de diferentes “primers”.

Se realizaron pruebas para determinar la concentración óptima de cada uno de los “primers”; se determinó que la concentración de $1\mu\text{M}$ producía una amplificación satisfactoria en cada uno de los experimentos. Los dos juegos de “primers” (UBC serie 700, UBC serie 600) utilizados para el estudio se diluyeron a $20\mu\text{M}$ en solución de TE de acuerdo a su peso molecular, esta solución base se utilizó para preparar la solución de trabajo a $1\mu\text{M}$. De acuerdo a la experiencia del personal de laboratorio, los “primers” de la empresa UBC por lo general presentan buenos resultados a la concentración antes mencionada, y para los “primers” de la empresa Operon es posible trabajarlos a concentraciones inferiores (Olman Quiros comunicación personal)

4. 2. 3 Selección de primers polimórficos

Se realizó la selección de los “primers” polimórficos utilizando 5 genotipos, cada uno representativo de un grupo genético incluidos en el estudio (T.00996, T.00995, T. 04387, T. 16695 y T.03561). Se probaron 150 “primers” (100 de la serie UBC 700 y 50 de la serie UBC 600) con las 5 muestras de ADN seleccionadas.

La selección consistió en la identificación de polimorfismos presentes en el producto de PCR, cada primer seleccionado se corrió posteriormente con las 38 muestras de ADN. El producto de selección de “primers” permitió identificar 70 “primers” candidatos para ser incluidos en el análisis con todos los genotipos.

Se trabajo con 70 “primers” candidatos seleccionados (40 de la serie UBC-700 y 30 de la serie UBC 600), más 5 “primers” polimórficos seleccionados por el proyecto de caracterización molecular de la diversidad genética de café (PROMECAFE) cada uno de los cuales se corrió con las 38 muestras para el estudio.

El cuadro 23 presenta la secuencia de nucleótidos de los 40 “primers” útiles para el estudio; los 35 “primers” restantes se descartaron producto de que las amplificaciones no fueron satisfactorias y las bandas polimórficas presentes no eran bien definidas, provocando confusión cuando se analizaban los resultados de PCR con las 38 muestras. Otra razón que contribuyó a eliminar ciertos “primers” fue debido a que al realizar las repeticiones para comprobar la presencia de los polimorfismos revelados en el PCR original no se presentaron, o bien si se presentaba era muy débil, prestándose para confusión. Estas fueron las razones principales que permitieron realizar una selección apropiada de los “primers” útiles para el estudio.

El número de loci amplificados por los “primers” polimórficos fue variable entre genotipos dentro de un mismo PCR; algunos de ellos presentaban un máximo de 12 loci y en otras muestras sólo se obtenía un máximo de 6 loci. Los loci polimórficos se seleccionaron cuando eran bien definidos y además que se presentarán en las pruebas de repetición donde se

seleccionaban algunos genotipos que presentaran los loci polimórficos y otros que no los presentaran; solo en los casos donde el resultado era consistente se procedía a registrar los datos de polimorfismo del experimento.

La proporción de bases Citocina-Guanina presente en los “primers” polimórficos utilizados es igual o superior al 50% (Cuadro 15). Williams *et al.* (1990) menciona que en las cadenas de ADN existe una mayor proporción de bases Adenina-Timina, las cuales requieren de las bases complementarias respectivas al ser amplificadas, la probabilidad de seleccionar “primers” polimórficos se incrementa en aquellos que presenten mayor proporción de las bases complementarias a las que contiene la cadena de ADN.

En la figura 5 se presenta un ejemplo de los resultados señalando los polimorfismos obtenidos con el primer OPM-4 dentro de los genotipos cultivados de Typica y Bourbon, Silvestres e Introgresados. Los polimorfismos presentes se ubican en el rango de 1230-1353pb, 1230pb, 1107-1230pb, 492-615pb,y 246-369pb. Para la determinación del peso molecular se utilizó la escalera de 123 pares de bases, esto facilita la ubicación de los loci polimórficos y el registro de la información. El resultado obtenido con el primer OPM-4 concuerda con los resultados obtenidos por Lashermes *et al* (1996), con la presencia del loci polimórfico ubicado entre 1230-1353pb en una muestra del Typica (T.00996-1 correspondiente a la variedad Typica) utilizado en este estudio.

Cuadro 23. Primers polimórficos utilizados para el estudio de la diversidad genética de Café.

| Primer | Secuencia de Nucleotidos 5' a 3' | G-C % | Primer | Secuencia de Nucleotidos 5' a 3' | G-C % |
|---------|-------------------------------------|-------|---------|-------------------------------------|-------|
| UBC-220 | GTC GAT GTC G | 70 | UBC-706 | GGT GGT TGG G | 70 |
| UBC-601 | CCG CCC ACT G | 80 | UBC-717 | CCC ACA CCC A | 70 |
| UBC-602 | GCG AAG ACT A | 50 | UBC-719 | CCC ACC CAC A | 70 |
| UBC-608 | GAG CCC GAA A | 60 | UBC-726 | GGT GTG GGT G | 70 |
| UBC-609 | ACA GCA CCA T | 50 | UBC-727 | GGG TGT GGT G | 70 |
| UBC-611 | CCA TCG TAC C | 60 | UBC-729 | CCC AAC CCA C | 70 |
| UBC-612 | CCG TGA GTA T | 50 | UBC-730 | CCA CAC CCA C | 70 |
| UBC-613 | TGC ACC CAC G | 70 | UBC-731 | CCC ACA CCA C | 70 |
| UBC-617 | CGG ACT ATG T | 50 | UBC-740 | GGA GGG AGG A | 70 |
| UBC-621 | GTC TGC GCT A | 60 | UBC-742 | CCT CCC TCC T | 70 |
| UBC-622 | ACA GGT GGT T | 50 | UBC-751 | CCC ACC ACA C | 70 |
| UBC-623 | TGC GGG ACT G | 70 | UBC-763 | CAC ACC ACC C | 70 |
| UBC-624 | GTG ATA AGC C | 50 | UBC-773 | GGG TTG TTG G | 60 |
| UBC-625 | CCG CTG GAG C | 80 | UBC-792 | CAA CCC ACA C | 60 |
| UBC-631 | GGC TTA ACC G | 60 | UBC-794 | GAG GGG AAA G | 60 |
| UBC-633 | CGT TGT ATC C | 50 | UBC-795 | TGG TGT GGG T | 60 |
| UBC-634 | CCG TAC ACG C | 70 | OPI-7 | CAG CGA CAA G | 60 |
| UBC-635 | CTC AGC TCA G | 60 | OPJ-19 | GGA CAC CAC T | 60 |
| UBC-636 | GGG ATA TCG C | 60 | OPM-4 | GGC GGT TGT C | 70 |
| UBC-642 | GTG GTC TCG A | 60 | OPL-18 | ACC ACC CAC C | 70 |
| UBC-702 | GGG AGA AGG G | 70 | | | |

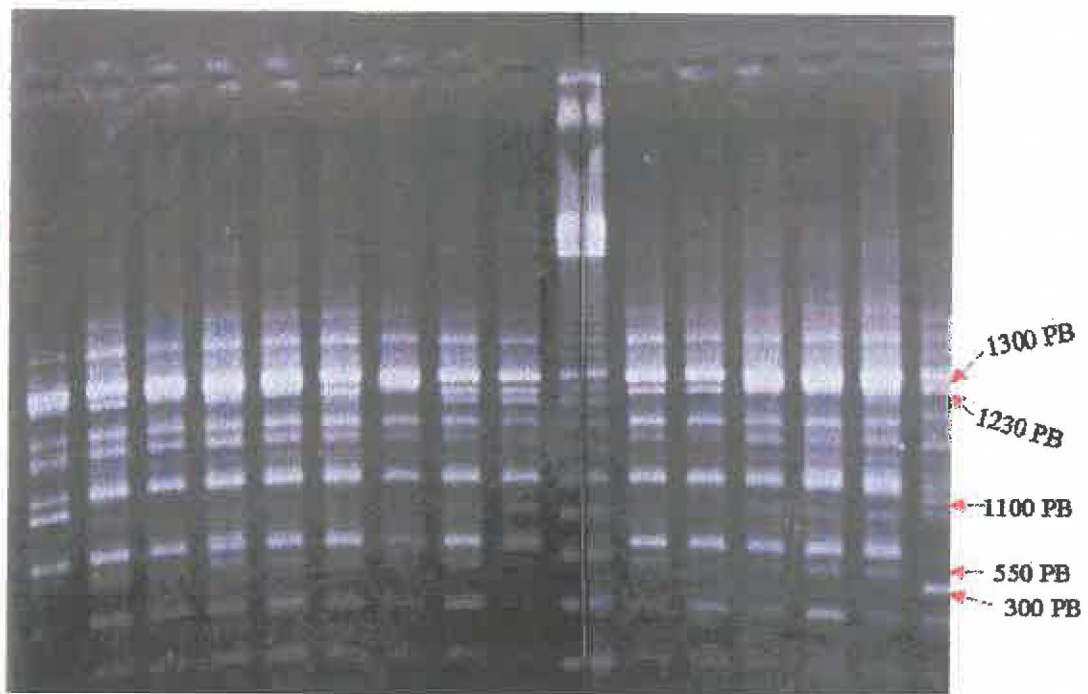


Figura 6. Ejemplo de amplificación de ADN de café con la técnica RAPD's con el "primer" OPM-4 en 16 muestras. " M " o escalera de peso molecular, es el ADN de referencia con fragmentos revelados cada 123 pb

4. 2. 4 Caracterización Molecular

Los RAPDs generados (80 loci polimórficos) fueron usados para determinar las relaciones en 2 grupos de materiales: los silvestres y cultivados, y los introgresados y *C. canephora*. El análisis de las poblaciones usando el paquete estadístico Popgene determinó la frecuencia de loci polimórficos por población (Cuadro 24).

Cuadro 24. Número de loci polimórficos y frecuencia en porcentaje por grupo genético de café.

| Grupo | Número de loci Polimórficos | Frecuencia en % |
|---------------------|-----------------------------|-----------------|
| Bourbon | 42 | 52,5 |
| Typica | 40 | 50,0 |
| Silvestre | 29 | 36,2 |
| Híbrido de Timor | 41 | 51,2 |
| Introgresados | 36 | 45,0 |
| <i>C. canephora</i> | 46 | 57,5 |

El mayor número de loci polimórficos se presentó en *C. canephora*, con una frecuencia de 57.5%, mientras el menor número se presentó en los materiales silvestres de café. Los grupos de café Typica, Bourbon Híbrido de Timor e Introgresados presentan una frecuencia promedio de 50% de loci polimórficos.

El cuadro 25 presenta el número de loci polimórficos comunes (debajo de la diagonal) y diferentes (sobre la diagonal) para los grupos genéticos estudiados. Se determinó que el mayor número de loci polimórficos comunes se presentó entre el grupo Typica y Bourbon (63 loci) y el grupo Silvestre respecto al grupo Bourbon y Typica (57 y 59 loci polimórficos respectivamente), y el menor número de loci polimórficos se presentaron entre el grupo de *C. canephora* y el grupo Introgresado (41 loci).

El mayor número de loci polimórficos diferentes, se presentó entre el grupo de introgresados y *C. canephora*, seguido por el grupo Bourbon (39 y 31 loci respectivamente). El menor número de loci polimórficos se presentaron entre los grupos Bourbon y Typica (7 loci). En términos generales tanto el número de loci polimórficos comunes como diferentes fue muy variable entre los grupos genéticos estudiados.

Cuadro 25. Loci polimórficos comunes (debajo de la diagonal) y loci diferentes (sobre la diagonal) entre los grupos Typica, Bourbon, Silvestre, Introgresados y Robusta de café.

| Grupo | Bourbon | Typica | Silvestre | Introgresados | <i>C. canephora</i> |
|---------------------|---------|--------|-----------|---------------|---------------------|
| Bourbon | *** | 7 | 23 | 16 | 31 |
| Typica | 63 | *** | 21 | 13 | 29 |
| Silvestre | 57 | 59 | *** | 10 | 29 |
| Introgresados | 59 | 67 | 70 | *** | 39 |
| <i>C. canephora</i> | 49 | 51 | 49 | 41 | *** |

4. 2. 5 Matriz de distancias y dendrogramas

La identidad genética (sobre la diagonal) y la distancia genética (debajo de la diagonal) entre los grupos Typica, Bourbon y Silvestres, se determinaron con el paquete estadístico Popgene utilizando las medidas de identidad y distancias genética de Nei (1978) (Cuadro 26).

Cuadro 26. Medidas de distancia genética (debajo de la diagonal) e identidad genética (sobre la diagonal) para los grupos Typica, Bourbon y Silvestres de café.

| Grupo | Typica | Bourbon | Silvestre |
|-----------|--------|---------|-----------|
| Typica | ***** | 0,9456 | 0,9336 |
| Bourbon | 0,0560 | ***** | 0,9058 |
| Silvestre | 0,0688 | 0,0989 | ***** |

La figura 7 presenta el dendrograma de clasificación de los grupos Typica, Bourbon y Silvestres, el cual se determinó a partir de la distancia genética de Nei (1978) con el método UPGMA, modificado por Neighbour procedimiento de Philip versión 3.5 del paquete estadístico Popgene versión 1.32; la clasificación se realizó utilizando 1000 repeticiones.

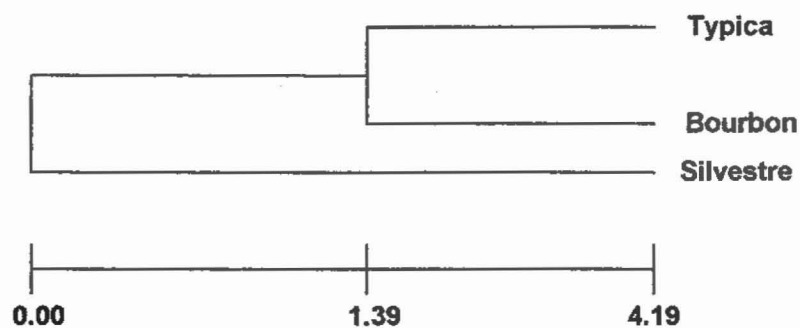


Figura 7. UPGMA, dendrograma (1000 repeticiones) de los grupos Typica, Bourbon y Silvestres de café basado en las distancias genéticas de Nei (1978).

La identidad genética (sobre la diagonal) y la distancia genética (debajo de la diagonal) de las poblaciones Introgresados, Híbridos de Timor y *C. canephora* se determinaron utilizando las medidas de identidad y distancias genética de Nei (1978), fueron calculadas con el paquete estadístico Popgene versión 1.32 (Cuadro 27).

La figura 8 presenta el dendrograma de clasificación de los grupos Introgresados, Híbrido de Timor y *C. canephora* basado en la distancia genética de Nei (1978) con el método UPGMA modificado por Neighbour, con el procedimiento de Philip versión 3.5 del paquete estadístico Popgene versión 1.32.

Cuadro 27. Medidas de distancia genética (debajo de la diagonal) e identidad genética (sobre la diagonal) para los grupos Introgresados, Híbridos de Timor y *C. canephora* de café.

| Grupo | Introgresados | Híbridos de Timor | <i>C. canephora</i> |
|---------------------|---------------|-------------------|---------------------|
| Introgresados | ***** | 0,9583 | 0,7526 |
| Híbridos de Timor | 0,0426 | ***** | 0,7282 |
| <i>C. canephora</i> | 0,2842 | 0,3172 | ***** |

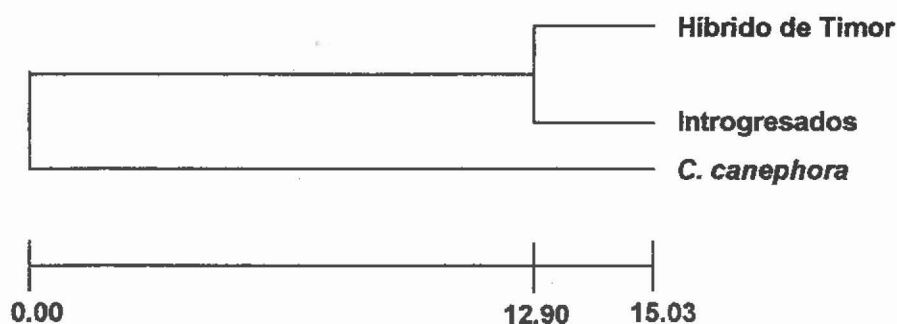


Figura 8. UPGMA, dendrograma (1000) replicaciones de los grupos Introgresados, Híbridos de Timor y *C. canephora*, basado en las distancias genéticas de Nei (1978).

Para el análisis de los genotipos que constituyen los grupos genéticos en estudio, se utilizó el índice Dice estimado con el paquete estadístico May. Se realizó el análisis por separado para los grupos Typica-Bourbon-Silvestres e Introgresados-*C. canephora*.

La clasificación de los grupos Typica, Bourbon y Silvestres estableció claras diferencias entre ellos (Figura 9). Sin embargo se encontró que dos genotipos silvestres ET-20 y ET-18 se clasifican dentro del grupo Typica. Estos dos genotipos presentan una clara afinidad con los genotipos del grupo Typica de acuerdo al análisis molecular, y estrechamente cercanos a la

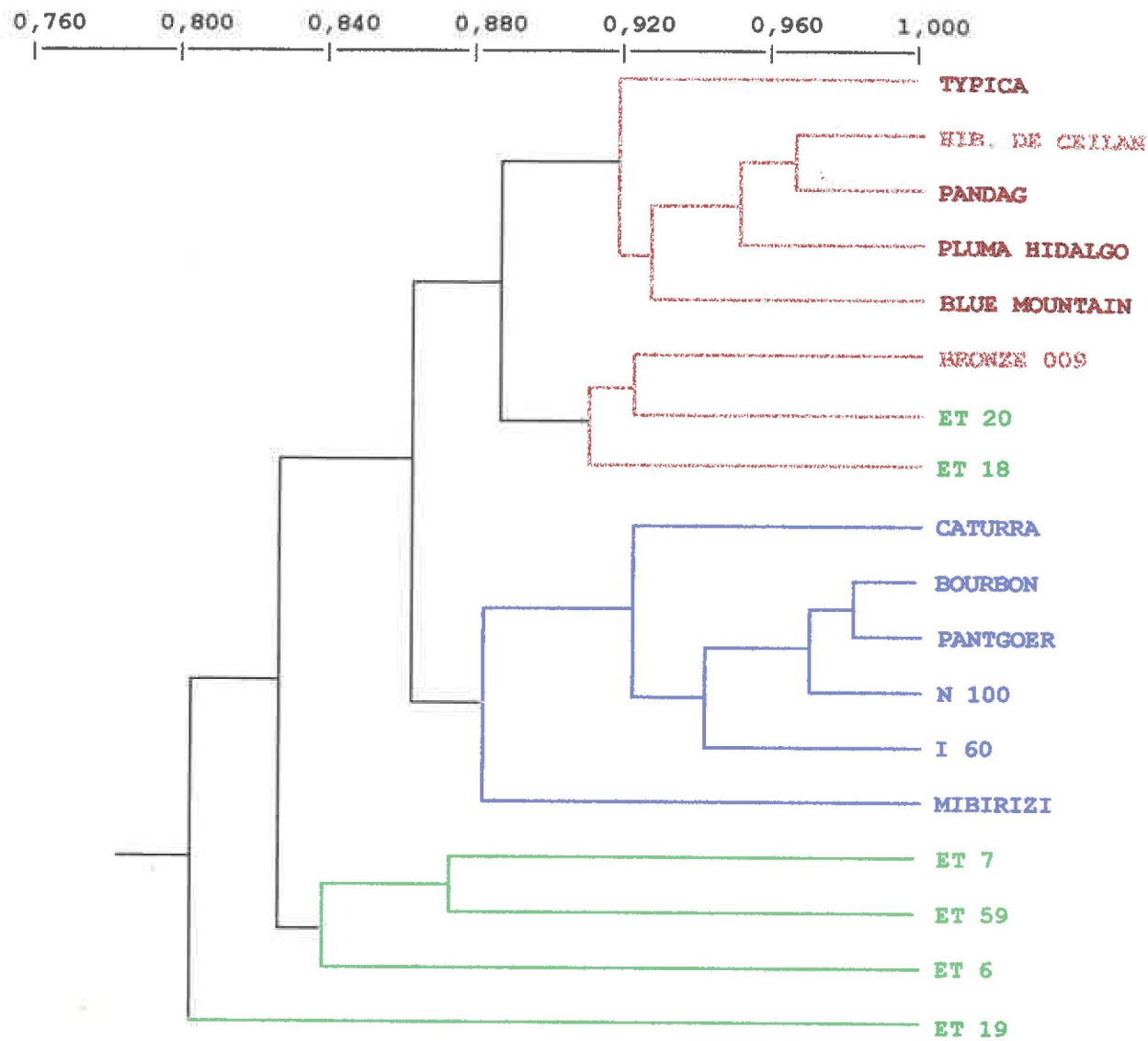
variedad Bronze 009. El grupo Bourbon está representado solo por las variedades cultivadas representativas de este grupo y el grupo de los Silvestres esta representado por 4 genotipos.

La figura 10 presenta el dendrograma de clasificación de los genotipos introgresados y *C. canephora* utilizados en el estudio. Este análisis muestra claramente la separación que existe entre los materiales introgresados y los Robusta. Entre los materiales introgresados no se observa una diferencia clara entre los Híbridos de Timor y los Catimores y Sarchimores representados en este grupo.

4. 2. 6 Análisis de componentes principales para los grupos Typica y Bourbon

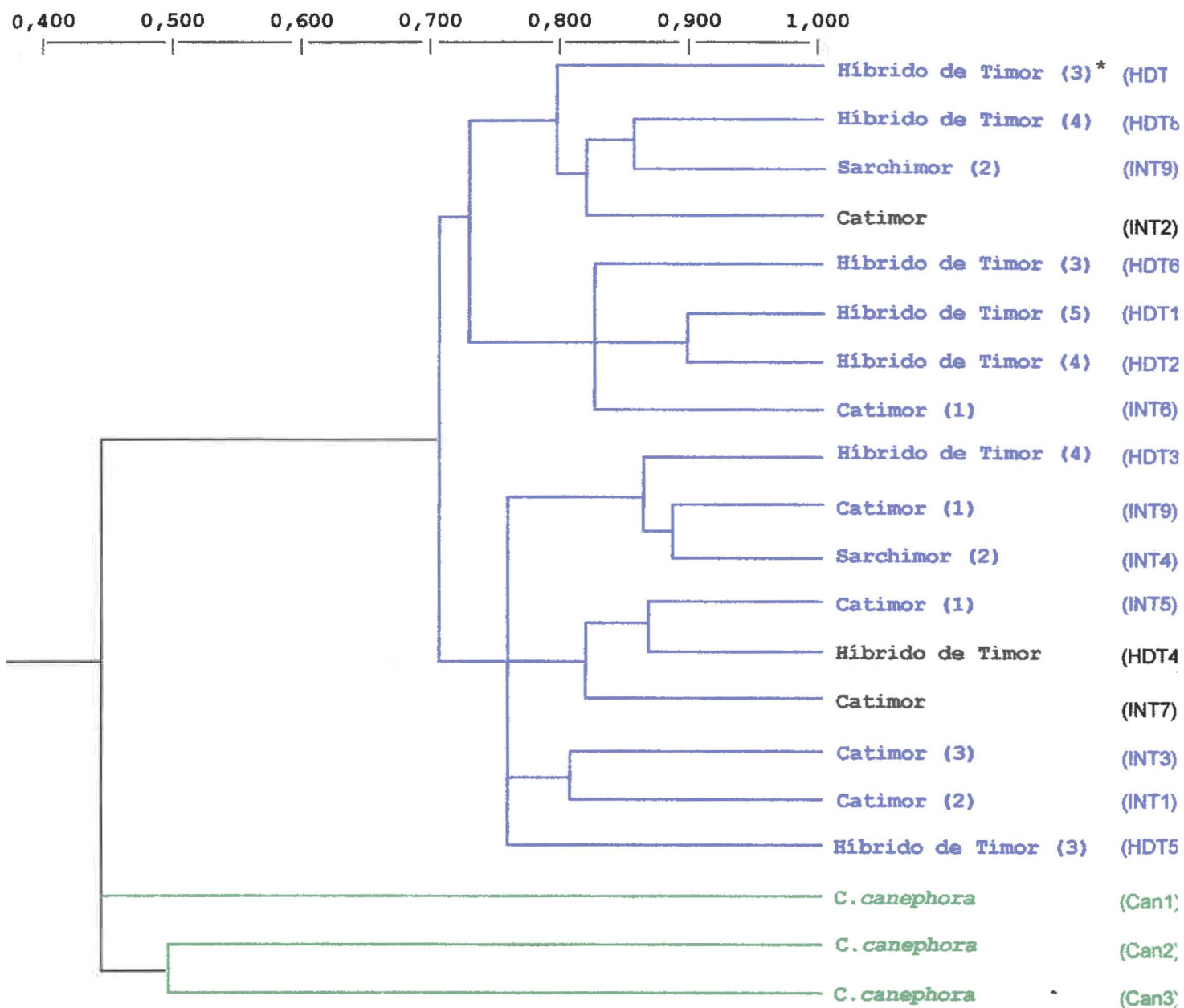
El análisis de componentes principales muestra la distribución de los grupos Typica y Bourbon cuando se analizan las variables moleculares en conjunto. De acuerdo con este análisis el factor 1 es el que mayor influencia tiene en la formación de los grupos, la cual explica el 79,6% de la variabilidad que se presenta en estos dos grupos, el factor 2 y 3 explican el 8,3% y 4,8 % de la variabilidad presente respectivamente.

La figura 11 presenta la distribución espacial de los grupos Typica y Bourbon respecto al plano de los dos primeros factores, lo que corresponde al 90% de la variabilidad determinada. El grupo Typica presenta mayor variabilidad respecto al grupo Bourbon. La variedad Bronze 009 es la que mayor separación presenta dentro del grupo Typica, mientras que las variedades Híbrido de Ceilán y Blue Mountain están estrechamente cercanos. El grupo Bourbon presenta menor variación respecto a las variedades del grupo Typica; las variedades Bourbon, Pantgoer y N-100 están estrechamente cercanas, mientras que las variedades Caturra, Mibirizi e I-60 presentan mayor separación respecto a las variedades antes mencionadas del grupo Bourbon.



- Grupo Typica
- Grupo Bourbon
- Grupo Silvestre

Figura 9. UPGMA, dendograma de los grupos Typica, Bourbon y Silvestres de café, basado en el índice de similitud Dice.



* (1) 832/1; (2) 832/2; (3) 1343/3; (4) 2252; (5) 1342

Figura 10. UPGMA, dendrograma del grupo de Introgresados de Café y Robustas (*C. canephora*), basado en el índice de similaridad Dice.

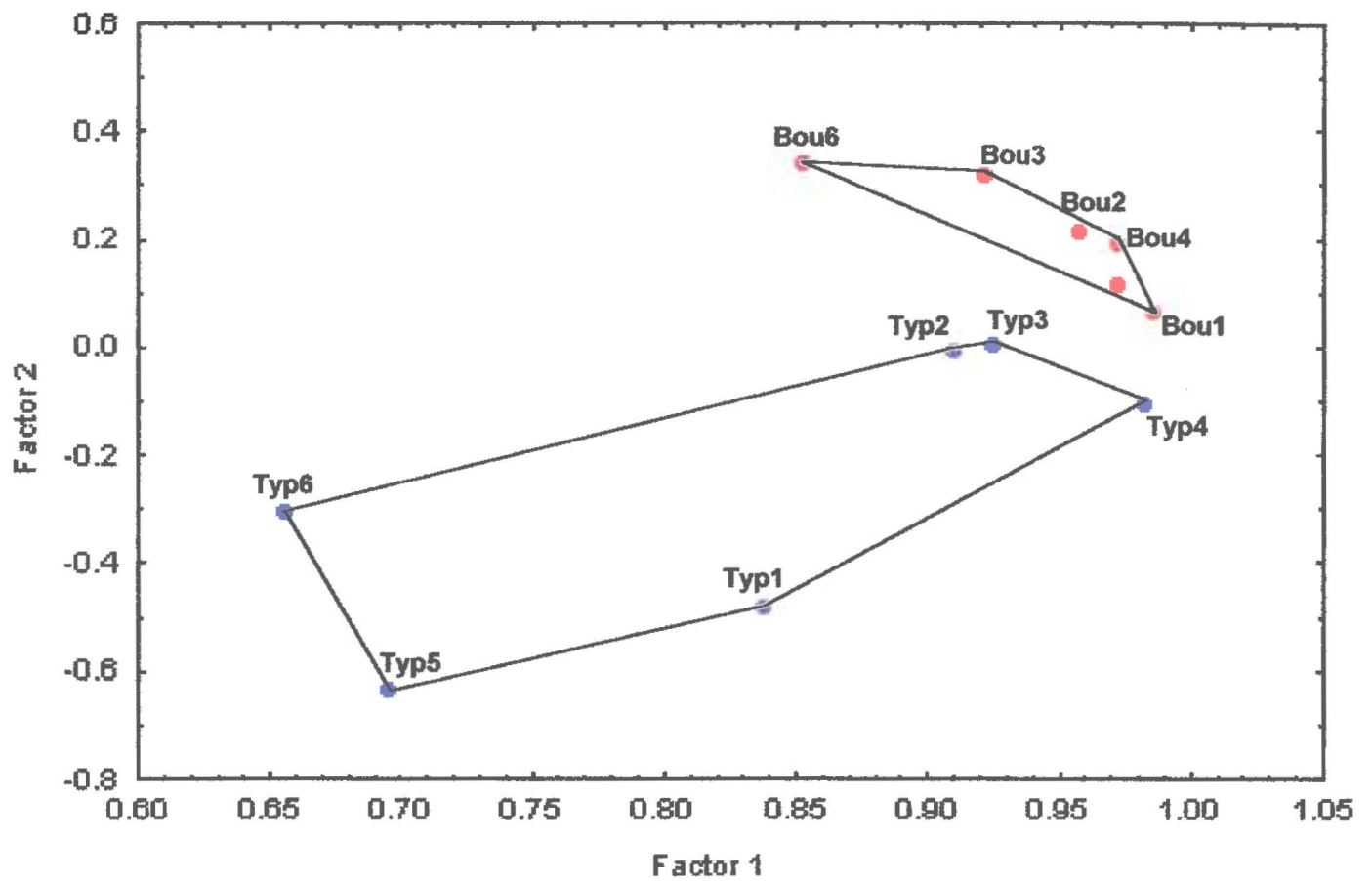


Figura 11. Distribución de genotipos de los grupos Typica y Bourbon de café (*C. arabica*), en función de los componentes principales (Factor 1 y Factor 2) basado en las diferencias genéticas de Nei (1978).

V. DISCUSION

El análisis de la diversidad genética presente en los cultivares de café mediante el uso de marcadores moleculares y de características agro-morfológicas permitió caracterizar las variedades que derivan de las bases genéticas introducidas en el continente americano en los siglos XVIII y XIX, y las variedades introgresadas por genes de *C. canephora*, cuya selección empezó en los años 70.

5.1. Eficiencia de los marcadores moleculares para la caracterización de germoplasma

5. 1. 1. Eficiencia de los protocolos de laboratorio

El protocolo de extracción de ADN “CTAB minipreparaciones” permitió obtener una buena cantidad y calidad de ADN para todas las muestras de café incluidas en el estudio. El promedio de rendimiento de ADN para los seis grupos genéticos fue de 93,6 µg /ml, con un contenido promedio mínimo de 44 µg /ml para el grupo Typica y un contenido promedio máximo de 186µg /ml para *C. canephora*.

El método CTAB-minipreparaciones es universalmente conocido y utilizado; las pequeñas modificaciones realizadas en el laboratorio de biología molecular del CATIE para la extracción de ADN de café por el Programa de Caracterización de la Diversidad Genética de Café en el marco de la red de PROMECAFE, permitió optimizar y maximizar su eficiencia.

El polimorfismo detectado fue alto si se compara con estudios anteriores: de 150 “primers” probados 41 presentaron loci polimórficos correspondiente al 27%. El alto porcentaje de polimorfismos detectados se debe a la presencia en el estudio de muestras de *C. canephora* y los materiales introgresados que presentaron más polimorfismos que los

café Arabica tradicionales. Estos resultados concuerdan con los altos porcentajes de “primers” útiles para detectar polimorfismos informado por Anthony *et al.*, (en prensa 2), Lashermes *et al.* (1996) y Orozco-Castilo *et al.* (1994). El número de marcadores polimórficos por “primer” fue bajo de 1,05%, el cual responde a la heterogeneidad presente entre los grupos genéticos que constituían el estudio.

La presencia de marcadores revelados por primer fluctuó entre un máximo de 12 marcadores para algunas muestras, mientras en las restantes se obtuvo un máximo de 6 marcadores. Estos resultados revelan las buenas condiciones bajo las cuales se desarrolló cada uno de los experimentos, así como, las buenas condiciones de laboratorio que permitieron obtener resultados confiables y reproducibles bajo las mismas condiciones de experimentación.

5.1.2. Análisis del número de RAPDs por grupo de materiales

El grupo de los genotipos Silvestres presentó de 21 y 23 loci polimórficos diferentes respecto al grupo Typica y Bourbon. Este resultado permitió determinar que existe una mayor diversidad genética que permite establecer diferencias entre estos tres grupos. Este resultado demuestra como se establecieron claras diferencias entre los grupos cultivados y los silvestres, y como los procesos de selección han contribuido a alcanzar cierto grado de homogeneidad entre los grupos cultivados como se demuestra con el bajo número de loci polimórficos que diferencian a los grupos Typica y Bourbon mencionado anteriormente.

El grupo de los Introgresados presentó 16, 13 y 10 loci polimórficos diferentes con relación al grupo Bourbon, Typica y Silvestre respectivamente. El grupo de introgresados demuestra como los procesos de selección de los programas de mejoramiento genético se han dirigido hacia el desarrollo de genotipos morfológico y agronómicamente similares a los grupos cultivados. Un aspecto que cabe señalar es el bajo número de loci polimórficos diferentes en el grupo de Introgresados respecto a los cultivados, el cual puede ser atribuido a los procesos de selección.

El grupo de *C. canephora* presentó el mayor número de loci polimórficos diferentes respecto al resto de los grupos estudiados. Se determinó que el número de loci diferentes es de 39 para los Introgresados, 29 para los grupos Silvestre y Typica y 31 para el grupo Bourbon. Esta diferencia era de esperarse al tratarse de especies diferentes respecto a los grupos Bourbon, Typica y Silvestres, mientras que con respecto al grupo de Introgresados podría no haberse presentado de esta manera.

Las razones por las cuales se presentó la mayor diferencia entre el grupo Introgresado y el *C. canephora* pueden deberse a alguno o una combinación de los siguientes procesos: a) durante los procesos de recombinación, en el *C. canephora* pueden haberse perdido o generado nuevos segmentos cromosómicos, b) los procesos de selección de los programas de mejoramiento genético dirigidos hacia el desarrollo de un prototipo de planta semejante al Bourbon tomando como modelo el morfo-tipo de la variedad Caturra generada a partir de una mutación espontánea del Bourbon, c) desechar genotipos que presentaban características indeseables de porte de planta, caracteres de producción, de fertilidad y de adaptación a diferentes ambientes entre otros.

Los 80 loci polimórficos obtenidos en el estudio permitieron determinar el número de loci comunes entre los grupos genéticos. Se determinó que los grupos Typica, Bourbon y Silvestres son los que comparten el mayor número de loci polimórficos. El grupo Silvestre presentó el 84 y 86% de loci polimórficos comunes con los grupos Typica y Bourbon (67 y 69 loci respectivamente). Entre el grupo Typica y Bourbon se determinó el 77% de loci polimórficos comunes (62 loci).

El grupo de *C. canephora* presentó el menor número de loci polimórficos comunes respecto al resto de los grupos incluidos en el estudio. El menor número de loci polimórficos se presentó entre *C. canephora* y el grupo Typica con 56% (45 loci) que comparten entre ellos, seguido por el grupo Bourbon y Silvestres con 61% (49 loci polimórficos respectivamente).

El menor número de loci polimórficos diferentes se presentó entre grupos Typica-Bourbon e Introgresados, mientras que el mayor número se presentó en *C. canephora*. En el grupo Typica y Bourbon se presentaron siete loci polimórficos diferentes, esto contribuye a corroborar la estrecha base genética presente entre los genotipos Typica y Bourbon que representaron estos dos grupos en el estudio, y el grado de similitud presente entre y dentro de los individuos de cada grupo seleccionado para el estudio. Para el grupo Introgresado respecto al *C. canephora* fue de 39 loci diferentes (49%).

5.2. Estructura de la variabilidad agro-morfológica

5. 2. 1. Análisis de las variables

Las características de porcentaje de granos flotantes y porcentaje de grano caracol se deben al aborto de la semilla en estados tempranos de desarrollo y son determinados a nivel genético (Instituto del Café de Costa Rica, 1995), sin embargo, los resultados de distribución de estas características en función de los meses de cosecha sugiere además, que pueden estar influenciadas por el número de flores producidas por la planta, la eficiencia de la polinización y las condiciones ambientales como viento, nubosidad, temperatura, etc. Estos resultados sugieren la necesidad de realizar estudios minuciosos por periodos más largos de tiempo en un mayor número de individuos bajo las mismas condiciones de crecimiento e incrementar el número de repeticiones. Estos resultados son congruentes con los informados por Anthony (1996), donde recomienda realizar muestreos más amplios durante la época de cosecha y ampliar el tamaño de la muestra, debido a que el comportamiento de estas características es muy variable durante la época de cosecha.

La característica relleno del fruto analizada en función de los meses de cosecha, presenta un comportamiento uniforme, con una desviación estándar baja Esta información indica que esta característica es poco afectada por el ambiente y las condiciones de floración. Según observaciones realizadas en Costa de Marfil (Anthony, comunicación

personal), esta característica es más representativa de la fertilidad que las otras características estudiadas.

El análisis de correlación de las características estudiadas permitió determinar el grado de asociación presente entre cada una de ellas. Se determinó para el grupo Typica y Bourbon una relación directa entre el porcentaje de frutos flotantes y el porcentaje de grano caracol, el peso de 100 granos de café oro y el porcentaje de rendimiento de café oro y el porcentaje de rendimiento de café oro con relleno de fruto. Para estas características el coeficiente de determinación fue superior al 40%.

Las características que presentaron una relación inversamente proporcional fueron porcentaje de frutos flotantes con porcentaje de rendimiento de café oro y relleno del fruto, porcentaje de rendimiento de café oro con porcentaje de grano caracol y relleno del fruto con porcentaje de grano caracol. El coeficiente de determinación para estas características fue superior al 50%.

Para el grupo de introgressados se determinó una relación directa entre peso de 100 granos de café oro y porcentaje de rendimiento de café oro, y porcentaje de rendimiento de café oro con relleno de fruto con un coeficiente de determinación superior al 40%. Las características inversamente proporcionales fueron el porcentaje de frutos flotantes con el porcentaje de rendimiento de café oro y relleno del fruto; el porcentaje de rendimiento de café oro con el porcentaje de grano caracol y el relleno del fruto con porcentaje de grano caracol. El coeficiente de determinación superior al 50% se presentó en las variables de relleno del fruto y de porcentaje de grano caracol.

El análisis de los componentes de la varianza permitió determinar los efectos de cada uno de los elementos que están presentes en cada grupo genético. Se determinó para el grupo Typica, Bourbon que el mayor aporte a los componentes de la varianza para las características de producción fue la variedad, seguido por el componente árbol para el peso de 100 granos de café oro. Para el porcentaje de rendimiento de café oro el componente grupo fue el segundo componente de la varianza, este comportamiento tiene su fundamento

porque de acuerdo con Choussy (1935), las variedades del grupo Bourbon son más productivas que las del grupo Typica, razón por la cual los programas de mejoramiento concentraron su atención en el grupo Bourbon. En el grupo Introgresado el mayor componente de la varianza se obtuvo por la variedad seguido por el componente árbol.

Para las características de fertilidad para el grupo Typica Bourbon el mayor aporte al componente de la varianza se obtuvo de la variedad para las variables porcentaje de frutos flotantes y relleno del fruto, mientras para el porcentaje de grano caracol lo realizó el componente árbol. El componente grupo realizó un aporte muy bajo a los componentes de la varianza para el grupo Typica y Bourbon. En el grupo Introgresado, el mayor aporte a los componentes de la varianza se presentó en el componente árbol, seguido por el componente variedad.

Los índices de heredabilidad determinados para las características de fertilidad para el grupo Introgresados fueron altos, mientras en el grupo Typica y Bourbon para estas variables fueron más bajos respecto al grupo Introgresados, sin embargo pueden considerarse intermedios. Estos resultados demuestran la posibilidad de realizar trabajos de selección en estos genotipos por los programas de mejoramiento con bajos índices en las variables de fertilidad, en función del incremento de las características de producción. Los avances genéticos que se puedan alcanzar se podrían beneficiar por la relación inversa que presenta las características de fertilidad con las variables de producción y los progresos genéticos serían mayores.

Para las variables de producción peso de 100 granos de café oro y porcentaje de rendimiento de café oro, los índices de heredabilidad determinados para los grupos Typica, Bourbon e Introgresados son bajos, sin embargo, se presenta la posibilidad de establecer programas de selección para estas características conjuntamente con las variables de fertilidad.

5. 2.2. Variabilidad morfológica

El estudio de las características morfológicas permitió determinar la presencia de diferencias entre la longitud y ancho de la hoja en las variedades del grupo Typica y Bourbon. Las diferencias para estas características se presentaron entre grupo, grupo-variedad y grupo-variedad árbol, estas diferencias permitieron determinar el grado de variabilidad fenotípica presente en las variedades estudiadas. Las diferencias entre grupo, y entre grupo-variedad indican el grado de variabilidad genética presente entre grupo y variedades, sin embargo, la presencia de diferencias entre árboles representa una limitación por ser un indicador que los individuos que constituyen cada variedad son heterogéneos. Debido a la alta homocigocidad de los materiales estudiados, la única explicación obvia que se encuentra a este efecto es que se debe aceptar la presencia de un efecto debido al medio ambiente donde se desarrollan los materiales o bien la necesidad manifiesta de disponer de condiciones homogéneas para la caracterización de germoplasma. Estas condiciones se refieren a la edad de las introducciones o de las partes de la planta a caracterizar, manejo de las plantas y el estado fisiológico de las mismas.

Analizando los componentes de la varianza para la longitud y el ancho de la hoja, se determinó que el mayor efecto en ambos casos fue debido a la variedad, seguido por el componente árbol y por último al efecto de grupo. El índice de heredabilidad determinado para estas características es bajo (0,3 y 0,47 respectivamente), sin embargo permite realizar trabajos de selección y obtener avances importantes en el mejoramiento o selección de estas características entre variedades.

Para las características de color de brote y ángulo de inserción de las ramas plagiotrópicas, la prueba de X^2 determinó diferencias para el color del brote, mientras para el ángulo de inserción de las ramas plagiotrópicas no estableció diferencias. De acuerdo con la descripción de variedades de Krug *et al.* (1939) indica que la característica de color de brote es una característica estable entre variedades del grupo Typica y Bourbon, mientras el ángulo de inserción de las ramas plagiotrópicas es muy variable entre variedades de los grupos antes mencionados. De tal forma que para la clasificación de variedades dentro de

un determinado grupo genético la característica de color de brote es un aspecto importante de tener en cuenta mientras que el ángulo de inserción puede prestarse para confusión.

Las características morfológicas de longitud y ancho de la hoja para las accesiones T.04387 y T.05286 presentaron diferencias entre accesiones y entre árboles, estos resultados fueron congruentes con los determinados para las variedades del grupo cultivado Typica y Bourbon. Los resultados de este estudio permitió determinar que para las características morfológicas estudiadas de los genotipos T.04387 y T.05286 bajo las condiciones donde se realizó la evaluación, son diferentes, y los promedios, desviación estándar y coeficiente de variación para las características estudiadas son semejantes respecto al grupo de variedades introgresadas; así como, de las variedades cultivadas Typica y Bourbon, debido a la selección genealógica (generaciones F5 o F6) hacia los tipos cultivados.

5. 2. 3. Variabilidad de la fertilidad

Los análisis para las características de fertilidad, porcentaje de frutos flotantes, relleno del fruto y porcentaje de granos caracol del grupo Typica y Bourbon, la variabilidad genética presente es debida a los efectos de grupo-variedad y grupo-variedad-árbol, mientras el componente grupo no se manifiesta como factor importante para establecer diferencias entre ambos grupos. Los caracteres de fertilidad como grano flotante y grano caracol se debe a atrofias en el desarrollo del fruto, los cuales pueden estar genéticamente determinados (Instituto del Café de Costa Rica, 1995).

Para las características de producción, peso de 100 granos de café oro y porcentaje de rendimiento de café oro, la variabilidad se debe a los efectos de grupo, grupo-variedad y grupo-variedad-árbol. Para estas características es evidente como el factor grupo es determinante para la selección de genotipos, mientras para las características fertilidad no representa un aspecto a tener en consideración.

Las diferencias determinadas para las características de producción concuerdan con los resultados informados por Choussy (1935), donde establece que la diferencia entre el grupo Typica y Bourbon se debe a una mayor producción y una precocidad más marcada del grupo Bourbon respecto al grupo Typica. Estudios más recientes realizados en Brasil para la selección de líneas dentro de la población de Bourbon resultaron más productivos que el Typica. Estas diferencias se atribuyen a la poca variabilidad de la población de Typica, y a su uniformidad productiva en comparación con las líneas seleccionadas del Bourbon, provocando un abandono progresivo de la selección de los materiales de Typica (Bertrand *et al.*, 1999).

Para el grupo de Introgresados, se determinó un comportamiento similar al determinado para el grupo Typica y Bourbon. Las características de fertilidad presentan diferencias entre variedad y árbol, los valores promedios para estas características son similar a los que se presentan en el grupo Typica y Bourbon, así como el coeficiente de variación y desviación estándar, debido a la homogeneidad de las generaciones F5 y F6 por el proceso de selección genealógica.

La similitud entre el grupo Typica y Bourbon, y el grupo Introgresado, respecto a las características de fertilidad, porcentaje de frutos flotantes, relleno de fruto y porcentaje de granos caracoles y las características de producción, peso de 100 granos de café oro y porcentaje de rendimiento de café oro, se explican por el proceso de selección ejercido a través de las generaciones de la descendencia del Híbrido de Timor y las variedades cultivadas como Caturra y Villa Sarchi principalmente.

Para las características de producción en el grupo de introgresados se determinó diferencias entre variedades y variedad-árbol, el promedio de peso de 100 granos de café oro, y porcentaje de rendimiento de café oro es mayor en el grupo introgresado respecto al grupo Typica y Bourbon, sin embargo, el coeficiente de variación y desviación estándar para estas características son mayores en los introgresados respecto al grupo Typica y Bourbon, lo que demuestra una mayor variabilidad genética del grupo Introgresado.

Moreno y Castillo (1984) y Bertrand *et al.* (1999), mencionan que en el proceso de selección de las progenies del Híbrido de Timor por el cruce con la variedad Caturra se seleccionan los progenitores más parecidos en comportamiento al tipo Caturra. La selección se realiza tomando como límite la producción de los testigos, y han observado que estas descendencias tienen un comportamiento igual o superior al tipo Caturra. Respecto a las características de fertilidad como semillas vacías y granos caracol, se ha determinado que son comunes en estas progenies; por medio de selección en cada generación se ha logrado reducir estos defectos a niveles comparables a los que presentan las variedades cultivadas.

Al analizar el comportamiento de los caracteres de fertilidad a través de los diferentes meses de cosecha, se determinó para el porcentaje de frutos flotantes niveles altos al inicio de la cosecha, disminuyendo en los meses de mayor concentración de la cosecha e incrementándose al final de la cosecha. El porcentaje de grano caracol presenta variación respecto a la fecha de cosecha, el cual puede estar influenciado por la floración y factores ambientales.

En los trabajos de caracterización de germoplasma es un proceso importante conocer cuales son las fuentes que contribuyen más a los componentes de la varianza, el nivel de asociación entre características y los índices de heredabilidad que presentan cada una de las características.

Los análisis de componentes de la varianza para las características de producción en el grupo Typica y Bourbon, el mayor efecto se presentó en el componente variedad, seguido por el componente árbol excepto para el porcentaje de rendimiento de café oro donde el componente grupo presentó un 31,5%. Para el grupo de introgresados se determinó que el mayor efecto del componente de varianza se atribuye al efecto de variedad y en menor grado al componente árbol. Este comportamiento de la varianza permitió establecer claras diferencias entre los grupos genéticos estudiados y comprender mejor la variabilidad observada entre los diferentes genotipos.

Para las características de fertilidad en el grupo Typica y Bourbon, se determinó que el mayor efecto del componente de varianza se presentó en el componente variedad excepto para la variable porcentaje de granos caracol, seguido por el componente árbol; el efecto de grupo para estas características es muy bajo. Para las características de fertilidad en el grupo de introgresados se determinó que el mayor efecto de variabilidad se debe al componente árbol y el componente variedad presentó valores bajos respecto al componente árbol.

El análisis del índice de heredabilidad para los grupos genéticos estudiados revelaron niveles intermedios para las características de producción para los grupos Typica-Bourbon y los Introgresados para la característica de peso de 100 granos de café oro, y para el porcentaje de rendimiento de café oro. Se determinó que los valores son mayores en el grupo introgresado respecto al grupo Typica-Bourbon, esto debido a los procesos de selección y probablemente a la estrecha base genética que derivan estos dos últimos grupos.

Los resultados obtenidos por los componentes de la varianza y los índices de heredabilidad demuestran que es factible poder establecer un programa de selección tanto en el grupo Typica y Bourbon como en el grupo de introgresados para seleccionar variedades o genotipos con buenas características de producción y pocos problemas de fertilidad. Los avances o progresos genéticos que pueden ser obtenidos en los programas de selección o cruzamiento pueden ser grandes, debido a que los índices de heredabilidad así lo indican, además como las características de fertilidad presentan una relación inversamente proporcional con las características de producción, al realizar la selección de genotipos con bajos niveles de problemas de fertilidad y alta producción, los progresos genéticos podrán verse favorecidos debido a que estos dos tipos de características no compiten entre sí, además de aprovechar el efecto de heterosis que se pueda presentar cuando se realizan cruzamientos.

El estudio de similitud de las accesiones introgresadas T.04387 y T.05286 por las características de fertilidad y producción no presentaron diferencias para las características estudiadas por lo que se pudo determinar que bajo las condiciones que se encuentran los

genotipos son iguales para las variables estudiadas. Además los resultados concuerdan con la información de las accesiones disponible, la cual indica que estos materiales descienden del mismo progenitor y fueron introducidas al CATIE del CIFC y del Instituto Agronómico de Campinas (Morera *et al.*, 1993). Los promedios, desviación estándar y coeficiente de variación para las características estudiadas no difieren respecto al grupo de variedades introgresadas así como de las variedades cultivadas Typica y Bourbon, producto de la selección genealógica hacia los tipos cultivados.

5.3. Caracterización de las variedades tradicionales Typica-Bourbon

La caracterización de las variedades tradicionales Typica-Bourbon por marcadores moleculares permitió establecer la agrupación de las variedades Typica, Bourbon y Silvestres. Se observó como los genotipos silvestre ET-20 y ET-18 se clasifican como Typica, mientras los reportes de recolección realizados por Guillaumet y Hallé (1968) reportan estos genotipos como Bourbon. Esta diferencia entre la información de recolección y la obtenida por datos moleculares se debe a que la primera fue una información errónea. Otra razón puede deberse a los procesos de selección que ocurrieron en Camerún, debido a que originalmente las colecciones de materiales silvestres fueron establecidas en fincas de agricultores y posteriormente se retomaron para establecer la colección del IRA (Institut de Recherche Agronomique de Camerún) en un centro de investigación (Anthony, 1995). Los procesos de reintroducción de las accesiones en Camerún se realizó cuando se logró identificar un genotipo representativo de la accesión o bien, por una mezcla de semillas representativa de la accesión. Además cuando se introdujeron estos genotipos al CATIE, no se definió si provienen de un solo genotipo o es una mezcla de los diferentes árboles que constituyen la accesión en Camerún.

Las distancias genéticas determinadas para las variedades tradicionales entre Typica y Bourbon es muy baja (0,056), indicando una estrecha relación entre ambos grupos debido a la estrecha base genética que dio origen a las variedades cultivadas a partir de la difusión de materiales de Yemen desde su centro de origen (Anthony *et al.*, 1999). Otros aspectos

que fundamenta el bajo grado de diferenciación entre los grupos cultivados es el sistema autocompatible de reproducción del café entre 85 y 90% (Carvalho *et al.*, 1991), el método de selección genealógica y el tiempo de selección de aproximadamente 3 siglos, lo que representa alrededor de 15 generaciones.

Además se estableció una separación del grupo cultivado Typica y Bourbon respecto al grupo de los silvestres, la distancia genética del grupo silvestre respecto al grupo Bourbon y Typica fue mayor 0,069 y 0,099 respectivamente, mientras Anthony *et al.* (en prensa 2), encontró una distancia genética entre las variedades silvestres de 0,15 a 0,37 respecto al Typica y de 0,16 a 0,36 respecto al Bourbon, este comportamiento se fundamenta por el reducido muestreo de los materiales silvestres utilizados para el estudio. Por otra parte los materiales silvestres no han sido sometidos a un proceso riguroso de selección, como ha ocurrido con los grupos tradicionales a través, del desarrollo de los programas de mejoramiento genético. Esta diferenciación entre los grupos tradicionales y el silvestre representa una ventaja para los programas de mejoramiento genético porque se presenta la posibilidad de hacer un uso racional de estos materiales para ampliar la base genética de los grupos tradicionales y la incorporación de caracteres de interés para el mejoramiento de las variedades tradicionales (Bertrand *et al.*, 1999).

El análisis de componentes principales determinó una buena separación de los genotipos que representaron a cada variedad dentro del grupo Typica y Bourbon. Los primeros dos factores explican el 88 % de la variabilidad genética presente en la tabla de datos, mientras que el tercer factor únicamente contribuyó a explicar el 4,8% de la variabilidad genética. Los resultados obtenidos del análisis de componentes principales son congruentes con los resultados de la clasificación molecular del grupo Tyica y Bourbon.

La caracterización morfológica por las características de longitud y ancho de la hoja de los grupos tradicionales mostró una alta variabilidad entre y dentro de variedades y dentro de árboles. La variabilidad entre variedades es un indicador claro de la variabilidad genética presente en cada grupo de individuos. La presencia de variabilidad entre árboles que constituyen cada variedad es un indicador de la presencia de factores del medio y/o

fisiológicos que están incidiendo en la respuesta de cada genotipo, la información obtenida por estas características sugiere que debe ser utilizada con discreción por las razones mencionadas en los acápites anteriores.

Para las características de color de brote y ángulo de inserción de las ramas plagiotrópicas, se determinó que la primera es útil para la clasificación de variedades en el grupos *Typica* y *Bourbon*, mientras que en caso del ángulo de inserción de la rama plagiotrópica no mostró ser una característica útil para la clasificación de variedades. Estos resultados concuerdan con la descripción de variedades realizada por Krug *et al.* (1939), en la cual manifiesta que es una característica muy variable entre plantas de una misma variedad.

Los resultados obtenidos para las características de fertilidad no presentaron diferencias a nivel de grupo, pero si se presentaron claras diferencias entre grupo-variedad y grupo-variedad-árbol. Las diferencias entre grupo-variedad fueron atribuibles a las diferencias genéticas que posee cada variedad y por las cuales a través de los procesos de selección dieron origen a las diferentes variedades que constituyen cada grupo genético. Al igual que para las características de longitud y ancho de la hoja, la variabilidad que se presentó a nivel de grupo-variedad-árbol, pone de manifiesto el efecto del medio ambiente y /o fisiológico de los genotipos estudiados.

Los resultados obtenidos en el estudio de variabilidad presente entre variedades y genotipos dentro de variedades y los índices de heredabilidad determinados, indican una posibilidad clara de desarrollar trabajos sistemáticos de selección por características de interés agronómico para implementar programas de selección o de cruzamiento aprovechando el potencial que representa el uso de materiales de origen silvestre para ampliar la base genética de las variedades cultivadas. En efecto el programa de mejoramiento genético en ejecución dentro del marco de la red de PROMECAFE, con el apoyo del CATIE y la Cooperación Francesa se encuentra en este proceso (PPROMECAFE, 1994), sin embargo sería importante utilizar la información generada en

este estudio y planificar en el corto y mediano plazo el desarrollo de estudios complementarios al presente para fortalecer la información disponible.

5.4. Detección de introgresiones del *C. canephora*

El estudio de caracterización molecular permitió identificar 39 marcadores específicos para el grupo *C. canephora*, que nunca se presentan en el grupo de Introgresados y 29, 31 y 29 marcadores para los grupos Typica, Bourbon y Silvestres respectivamente. Esta diferencia en el número de marcadores moleculares específicos para *C. canephora*, permitió establecer las diferencias que existen entre los grupos y explicar como se han eliminado del grupo de introgresados segmentos del genoma de *C. canephora* a través de los procesos de selección para desarrollar genotipos con una arquitectura fenotípica y características de producción semejantes a las variedades cultivadas del grupo Typica y Bourbon más las características de resistencia a la roya y nemátodos de *C. canephora* (Anzueto *et al.*, 1991). Se determinó la presencia de diez marcadores específicos para los progenitores de la variedad Nemaya (T.03561 y T.03751), estos resultados permitirán en el futuro cercano poder realizar estudios para determinar el grado de homocigocidad o heterocigocidad de estos marcadores en la descendencia de estos progenitores.

Se determinó que las líneas introgresadas no se clasifican por el origen del Híbrido de Timor. Las líneas introgresadas tienen como progenitores seleccionados del Híbrido de Timor aquellos denominados CIFC 832/1, CIFC832/2 y CIFC 1343 principalmente, los cuales han dado origen a las variedades denominadas Catimores, Sarchimores y la variedad Colombia, respectivamente. En este estudio la clasificación de los genotipos que tienen origen de estos progenitores y otros utilizados en menor grado, no se presentó una clasificación de acuerdo al origen del progenitor como sería de esperar. La clasificación de las variedades del grupo introgresado se separaron claramente de los genotipos del grupo *C. canephora*. Sin embargo, la distancia genética determinada para la población de los Híbridos de Timor y los introgresados (Catimores y Sarchimores) es muy baja (0,043), mientras la distancia de *C. canephora* respecto a los dos grupos antes mencionados es alta

(0,32 y 0,28 respectivamente). Estos resultados reafirman la observación respecto a la diferenciación que han sufrido los genotipos del grupo introgresado hacia una similitud con las variedades cultivadas del grupo Bourbon (Instituto del Café de Costa Rica, 1995; Moreno *et al.*, 1984).

Un aspecto importante de señalar es respecto a las características de fertilidad de los genotipos introgresados que presentaron diferencias entre variedad y variedad-árbol con valores promedios similares a los obtenidos en el grupo Typica y Bourbon, además las características de producción fueron ligeramente superiores respecto al grupo cultivado. Estos resultados ponen de manifiesto que los genotipos introgresados han pasado por un fuerte proceso de selección para llegar a desarrollar variedades con características similares o superiores a las variedades cultivadas tradicionales, además de la incorporación de las características de resistencia heredadas de la introgresión de *C. canephora*. La razón por la cual no se presenta este tipo de clasificación puede deberse a los criterios de selección para homogeneizar las poblaciones derivadas del Híbrido de Timor a través de las generaciones mencionadas anteriormente o por presentar casi los mismos segmentos introgresados del *C. canephora* en las poblaciones del Híbrido de Timor.

VI. CONCLUSIONES

Caracterización agro-morfológica

- La caracterización morfológica de longitud y ancho de las hojas de café presentó alta variabilidad entre grupo, grupo-variedad y grupo-variedad-árbol, en los grupos Typica y Bourbon.
- El color de brote permite clasificar correctamente las variedades dentro del grupo Typica o Bourbon respectivamente (prueba de X^2). La característica del ángulo de inserción de la rama plagiotrópica no fue significativa, lo cual demuestra que es una característica muy variable y de poco valor para clasificar las variedades.
- Las características de fertilidad, porcentaje de frutos flotantes, relleno del fruto y porcentaje de grano caracol permitieron establecer diferencias entre las variedades cultivadas del grupo Typica y Bourbon y las variedades del grupo Introgresado.
- La característica de producción, peso de 100 granos de café oro permitió conocer la variabilidad genética presente entre variedades del grupo Typica, Bourbon e Introgresado. La característica de porcentaje de rendimiento de café oro permitió determinar la variabilidad entre grupo y variedades del grupo Typica y Bourbon y entre variedades del grupo Introgresado.
- Los componentes de la varianza de las características de fertilidad permitieron determinar la contribución que realiza cada uno de los componentes a la varianza total. Para estas características en general, el componente variedad fue el que más contribuyó a los componentes de la varianza, excepto para el porcentaje de grano caracol en el grupo Typica y Bourbon donde el mayor aporte al componente de la varianza lo realiza el factor árbol.

- Para las características de producción se determinó que el mayor aporte a los componentes de la varianza para la característica peso de 100 granos oro lo realiza el componente variedad en el grupo Typica, Bourbon e Introgresado. Para la característica porcentaje de rendimiento de café oro el mayor aporte a los componentes de la varianza lo realiza el componente variedad para los grupos Typica, Bourbon e Introgresados. En el grupo Typica y Bourbon el componente grupo fue el segundo componente de importancia en los componentes de la varianza.
- El análisis de correlación permitió determinar el grado de asociación entre las características del grano y de fertilidad. Se determinó que se presenta una relación inversamente proporcional entre las características del grano y las características de fertilidad, lo cual podría contribuir a obtener progresos genéticos importantes en los programas de selección o mejoramiento genético de las variedades estudiadas.
- El análisis del índice de heredabilidad determinó altos valores para las características de fertilidad en los grupo Typica, Bourbon e Introgresados, mientras para las características de producción estos fueron bajos para estos grupos genéticos. Estos resultados sugieren que se presenta la posibilidad de establecer programas de selección para mejorar las características de fertilidad y producción en estos genotipos.
- El análisis discriminante permitió clasificar las variedades Rume Sudan, ET-6, ET-59 en el grupo Bourbon, y la variedad Amphilo en el grupo Typica por las características de producción y fertilidad, con un nivel apropiado de confiabilidad por los valores obtenidos de clasificación. La característica que más contribuyó a la clasificación de éstas variedades fue el relleno del fruto.

El estudio de identidad de las accesiones T.04387 y T.05286 por las características de fertilidad y producción demostró que son iguales bajo las condiciones en que se realizó el estudio. Para las características morfológicas de longitud y ancho de las hojas estos

materiales son diferentes, lo que se atribuye a factores de ambiente y fisiológicas del material.

- La caracterización morfológica permitió identificar plantas no conformes a su identificación, lo que permitirá realizar una racionalización del germoplasma conservado.

Caracterización molecular

- El método CTAB-minipreparaciones con las pequeñas modificaciones realizadas por el laboratorio de biología molecular del CATIE, en el marco del programa de caracterización de la diversidad genética de café de PROMECAFE, es efectivo para la extracción de ADN de buena calidad y en cantidades suficientes para el análisis de RAPDs. Se determinó diferencias en el rendimiento de extracción de ADN por muestra y entre grupos genéticos, estas diferencias pueden ser atribuidas a la intensidad de maceración en el proceso de extracción y a diferencias que se presentan entre genotipos.
- El polimorfismo detectado fue alto, el cual se debe a la presencia de genotipos de *C. canephora* y al grupo Introgresado incluidos en el estudio. Si embargo, el número de marcadores polimórficos fue bajo debido a la homogeneidad del grupo genético Typica, Bourbon y Silvestres.
- Se determinó que el número de marcadores comunes es alto entre los grupos Typica, Bourbon, Silvestres e Introgresados, y para el grupo de *C. canephora* es bajo. Por otra parte se determinó que el número de marcadores diferentes es alto para *C. canephora* y bajo para los grupos antes mencionados.
- La clasificación de los grupos Typica, Bourbon y Silvestres por los marcadores moleculares fue clara. La distancia genéticas entre el grupo Typica y Bourbon fue muy baja, lo que demuestro la estrecha base genética de estos grupos. La distancia genética

entre el grupo Typica y Bourbon respecto al grupo Silvestre es más alta representando mayor variabilidad genética entre estos grupos.

- El análisis de componentes principales determinó la separación clara de las variedades que representaron al grupo Typica y Bourbon en el estudio
- La clasificación de las variedades del Híbrido de Timor e Introgresadas y los genotipos de *C. canephora* es clara. Se determinó que las variedades Introgresadas no se clasifican por el origen de la descendencia del Híbrido de Timor debido a los procesos de selección durante el desarrollo de los programas de mejoramiento.
- La caracterización molecular permitió identificar diez marcadores específicos para los progenitores de la variedad Nemaya.
- Los marcadores RAPDs mostraron ser eficientes para detectar los segmentos introgresados de *C. canephora*.

VII. RECOMENDACIONES

- Para futuras evaluaciones de germoplasma de café se recomienda determinar los límites de la caracterización morfológica por edad, y manejo de las plantas, lo que implica la necesidad de ofrecer mejores condiciones de conservación y manejo a las plantas dentro de la colección.
- Se recomienda para evaluaciones futuras de germoplasma de café utilizar las características de producción y fertilidad para determinar el grado de variabilidad genética presente en el germoplasma. También es recomendable ampliar los periodos de observación y el número de repeticiones para asegurar una mayor consistencia de la información y disminuir el efecto del medio ambiente para características cuantitativas.
- Por la facilidad para extraer y amplificar el ADN y por la calidad de la información obtenida cuando se tienen buenas condiciones en el laboratorio y un manejo cuidadoso de las muestras, la técnica de RAPDs es efectiva para la caracterización de germoplasma de café.
- Se recomienda reutilizar los resultados moleculares tomando las precauciones necesarias por ser RAPDs y la eficiencia de estos marcadores es susceptible a las condiciones específicas donde se realizan los experimentos.
- Es recomendable para evaluaciones futuras tomar en cuenta el sistema de muestreo y tratar en la medida de lo posible de tener bien representado cada grupo genético para obtener una mejor información de la variabilidad genética presente en cada grupo genético representado.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Aguilar, G.; Bertrand, B.; Anthony, F. 1997a. Comportamiento agronómico y resistencia a las principales plagas de diferentes variedades, derivadas del Híbrido de Timor, 1. *Noticiero del Café*, 11(94): 1-4
- Aguilar, G.; Bertrand, B.; Anthony, F. 1997b. Comportamiento agronómico y resistencia a las principales plagas de diferentes variedades, derivadas del Híbrido de Timor, 2. *Noticiero del café*, 11(95): 1-4
- Anthony, F. 1992. Les ressources génétiques des caféiers: collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. N° 81. Paris, Francia, ORSTOM. 320 p. (Colección "Travaux et Documents Microfichés").
- Anthony, F. 1995. Convenio de Cooperación entre ORSTOM, el CATIE y el IICA para la investigación en biotecnología del café. Informe de actividades Abril 1993-Abril 1995. F. Ed. Anthony. Ciudad Guatemala, Guatemala, IICA/PROMECAFE. 41 p.
- Anthony, F. 1996. Los recursos genéticos *In*. Primer informe de actividades del Proyecto Regional de Mejoramiento Genético del Café. Informe de actividades. eds. F. Anthony; B. Bertrand; y H. Etienne. Ciudad Guatemala, Guatemala, IICA/PROMECAFE. 95 p.
- Anthony, F. 1997. Los recursos genéticos *In*. Segundo informe de actividades del Proyecto Regional de Mejoramiento Genético del Café. Informe de actividades. eds. F. Anthony; B. Bertrand; y H. Etienne. Ciudad Guatemala, Guatemala, IICA/PROMECAFE. 96 p.
- Anthony, F.; Berthaud, J.; Guillaumet, J. L.; Lourd, M. 1987. Collecting wild *Coffea* species in Kenya and Tanzania. *Plant Genetic Resources Newsletter*, N° 69: 23-29.

- Anthony, F.; Bertrand, B.; Quiros, O.; Wilches, A.; Lashermes, P.; Berthaud, J.; Charrier, A. sf. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* (En prensa).
- Anthony, F.; Clifford, M. N.; Noirot, M. 1993. Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.: chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40: 61-70.
- Anthony, F.; Astorga, C.; Berthaud, J. 1999. Los recursos genéticos: Las bases de una solución a los problemas de la caficultura latinoamericana. *In* Desafíos de la caficultura en Centroamérica.. Eds. B. Bertrand; y B. Rapidel. San José, Costa Rica, IICA.. p. 371-408
- Anthony, F.; Louarn, J.; Bontems, S.; Groell, C.; Charrier, A. sf. Classification of coffee new taxa (*Coffea* sp.) from Central Africa, by enzyme markers and morphological traits. *Canadian Journal of Botany* (En prensa).
- Anzueto, F.; Eskes, A. B.; Sarah, J. L.; Decazy, B. 1991. Recherche de la résistance à *Meloidogyne incognita*. dans une collection de *Coffea arabica*. *In* Coloquio Científico Internacional sobre el Café (14, 1991, San Francisco, California). Vevey, Suiza, ASIC. p. 534-543.
- Berthaud, J. 1978. Variabilité de la teneur en caféine des *Coffea arabica*. *Bulletin I.F.C.C.* N° 14: 52-54
- Berthaud, J.; Guillaumet, J. L.; Le Pierres, D.; Lourd, M. 1980. Les caféiers sauvages du Kenya: prospection et mise en culture. *Café-Cacao-Thé*. 24 (2): 101-112.
- Berthou, F.; Trouslot, P. 1977. L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série. Premiers résultats. *In* Coloquio Científico Internacional sobre el Café (18, 1977, Abidjan, Costa de Marfil). Vevey, Suiza, ASIC. p. 373-384.

- Bertrand, B.; Anzueto, F.; Pena, M. X.; Anthony, F.; Eskes, A. B. 1995. Genetic improvement of coffee for resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Central America. *In* (Coloquio Científico Internacional sobre el Café (16, 1995, Kyoto, Japon). Vevey, Suiza, ASIC. p. 630-636.
- Bertrand, B.; Aguilar, G.; Anthony, F.; Etienne, H.; Santacreo, R. 1997. Comparación de híbridos F₁ con variedades de *Coffea arabica*. *In* Simposio Latinoamericano de Caficultura (18, 1997, San José, Costa Rica).Memorias. San José, Costa Rica, IICA-PROMECAFE. p. 245-251. (Reuniones, Resultados y Recomendaciones de eventos técnicos A1/ SC N°. 97-05)
- Bertrand, B.; Aguilar, G.; Santacreo, R.; Anzueto, F. 1999. El mejoramiento genético en América Central. *In* Desafios de la caficultura en Centroamérica. Eds.B. Bertrand y B. Rapidel. IICA, San José, costa Rica, IICA. p 407-456.
- Bouharmont, P. 1995. La sélection du caféier Arabica au Cameroun (1964-1991). Paris, Francia, CIRAD. 81 p.+ anexos.
- Bouharmont, P.; Montagnon, C. 1995. Diversité phénotypique de *Coffea arabica* observée en collection au Cameroun. *In* (Coloquio Científico Internacional sobre el Café (16,1995 kyoto, Japón). Vevey, Suiza, ASIC. pp 829-838
- Bridson, D.; Verdcourt, B. 1988. *Coffea*. *In* Flora of tropical East Africa. *Rubiaceae* (Part 2). Ed. R. M. Polhill. Rotterdam, Países Bajos, A.A. Balkema. P. 703-723.
- Carvalho, A. 1946. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie Arabica. Bolétim da Superintendência dos Serviços do Café 21 (229): 174-180.
- Carvalho, A. 1988. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. *In*: Coffee, Volume 4: Agronomy. Eds. R.J. Clarke; R. Macrae. Londres, Reino Unido, Elsevier Applied Science. p. 129-165.

- Carvalho, A.; Ferwerda, F. P.; Frahm-Leliveld, J. A.; Medina, P. M.; Mendes, A. J. T.; Monaco, L. C. 1969. Coffee. *In: Outlines of perennial crop breeding in the tropics.* Eds. F. P. Ferwerda; F. Wit. Wageningen, Países Bajos, Veenman & Zonen NV. p. 189-241.
- Carvalho, A.; Medina Filho, H. P.; Fazuoli, L. C.; Guerreiro Filho, O.; Lima, M. M. A. 1991. Aspectos genéticos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Genética.* 14 (1): 135-138
- Charrier, A. 1978. Etude de la structure et de la variabilité génétique des caféiers. Résultats des études et des expérimentations réalisées au Cameroun, en Côte d'Ivoire et à Madagascar sur l'espèce *Coffea arabica* L. collectée en Ethiopie par une mission ORSTOM en 1966. *Bulletin IFCC N° 14:* 1-100.
- Chevalier, A. 1947. Les caféiers du globe. 3 Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. Paris, Francia, P. Lechevalier. 356 p. (Encyclopédie biologique N°28).
- Chevalier, A.; Dagrón, M. 1928. Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique. Paris, Francia. 38 p. (Academia de las Ciencias Coloniales)
- Choussy, F. 1935. El café.. San Salvador, El Salvador. T. 1, 161 p.
- Cornide, M.T. y León, O. 1998. Principales aplicaciones de los marcadores moleculares. *In. Uso de marcadores moleculares en la genética y la selección de plantas.* La Habana, Cuba. CNIC. p 18-25
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302
- Dussert, S.; Chabrilange, N.; Engelmann, F.; Anthony, F.; Noirot, M.; Hamon, S. 1997. *In vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) germplasm. *In Conservation of genetic resources in vitro.* Eds. M.K. Razdan; E.C. Cocking. Nueva York, Science Publishers. V. 1, p. 287-305.
- Edwards, A.; Johnstone, C.; Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic ADN for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* 19: 1349.

- Enríquez, G. 1966. Selección y estudio de las características de la flor, la hoja y la mazorca, útiles paa la identificación y descripción de cultivares de cacao. Tesis Mag. Sci. Turrialba, Costa Rica, IICA. 97 p.
- Enríquez, G. 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. *In* Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. Eds. R. Castillo; J. Estrella, C. Tapia. Quito, Ecuador Editorial Porvenir. p. 116-160.
- Erlich, H. A. ed. 1989. PCR technology: Principles and applications for DNA amplification. New York, Stockton. 246 p.
- Eskes, A. B. 1983. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Ph. D. Thesis. Wageningen, Países Bajos. Universidad de Agricultura, 140 p.
- Eskes, A. B. 1989. Identification, description and collection of coffee types in P.D.R. Yemen. Informe de recolección. Montpellier, Francia, CIRAD. 22 p. + anexos.
- FAO. 1968. FAO coffee mission to Ethiopia 1964 - 1965. Informe de recolección. Roma, Italia, FAO. 200 p.
- Gil, S.L.; Berry, D.; Bieysse, D. 1990. Recherche sur la résistance incomplète à *Hemileia vastatrix* Berk et Br. dans un groupe de génotypes de *Coffea arabica* L. d'origine éthiopienne. *Café-Cacao-Thé* 34 (2): 105-133.
- Guillaumet, J. L.; Halle, F. 1978. Echantillonnage du matériel récolté en Ethiopie. *Boletín I.F.C.C.* 14: 13-18.
- Hamon, S.; Dussert, S.; Noirot, M.; Anthony, F.; Hodgkin, T. 1995. Core collections - accomplishments and challenges. *Plant Breeding Abstracts* 65 (8): 1126-1133.
- IICA. 1998. *Boletín PROMECAFE*. Ed. J. R. Hernández. E. L.Ibarra. Tegucigalpa, Honduras. *Boletín* 80, Setiembre-Diciembre 1998. 20p.
- IICA. 1999. *Boletín PROMECAFE*. E. L.Ibarra ed. Guatemala, Guatemala. *Boletín* 81, Enero-Abril 1999. 20p.
- Instituto del Café de Costa Rica. 1995. Variedad Costa Rica 95. Comp. German Aguilar Vega. San José, Costa Rica, : Convenio ICAFE – MAG. 30 p.

- IPGRI. 1996. Descriptores del café (*Coffea* spp. y *Psilanthus* spp.). Roma, Italia, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. 36 p.
- Jiménez, E.; Ramírez, L.G. 1988. Avances sobre el estudio del comportamiento y rendimiento de nueve híbridos de cafeto catimor con resistencia a roya (*Hemileia vastarix* Berk & Br.). Investigaciones Agrícolas. 2 (1): 18-21.
- Jones, P. A. 1956. Notes on the varieties of *Coffea arabica* in Kenya. Monthly Bulletin of the Coffee Board of Kenya 21: 305-309.
- Krap, A.; Kresovich, S.; Bhat, K.V.; Ayad, W.G.; Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. Rome, Italy. International Institute for Plant Genetic Resources. 47 p. (Technical Bulletin N° 2)
- Krug, C. A.; Mendes, J. E. T.; Carvalho, A. 1939. Taxonomía de *Coffea arabica* L.: descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo. Instituto Agronômico do Estado em Campinas, Brasil. Bolétim Técnico N° 62. 55 p.
- Lashermes, P.; Trouslot, P.; Anthony, F.; Combes, M. C.; Charrier, A. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87: 59-64.
- Lebrun, J. 1941. Recherches morphologiques et systématiques sur les caféiers du Congo. Bruselas, Bélgica, Instituto Real Colonial Belga. 184 p. (Mémoires n° 11)
- León, J. 1962. Especies y cultivares (variedades) de café. Turrialba, Costa Rica, IICA. 69 p. (Materiales de enseñanza de café y cacao N° 23)
- León, J.; Fournier, L. 1962. Crecimiento y desarrollo del fruto de *Coffea arabica* L. Turrialba 12 (2): 65-74.
- Lowe, A.; Hanotte, O.; Guarino, L. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). Plant Genetic Resources Newsletter. N° 107: 50-54
- Moreno, G.; Castillo, Z. 1984. La variedad Colombia. Una variedad de café con resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. Br.). Chinchina, Colombia, Centro Nacional de Investigaciones del Café. 25 p.

- Morera, J.; Umaña, C.; Mora, E.; Hidalgo, G. 1993. Bancos de germoplasma de café del CATIE. Turrialba, Costa Rica. CATIE. sp.
- Munthali, M.; Ford-Lloyd, B.; Newbury, H. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR. Methods Appl.* 1: 274-276.
- Murray, M.; Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Orozco-Castillo, C.; Chalmers, K. J., Waugh, R.; Powell, W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934-940.
- Otero Arnaiz, A.; De La Cruz, M.; Oyana, K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. México.* 60: 85-117.
- Perrard, O. 1993. Graine sans frontières. *Geo.* 176: 140-143.
- Phillips-Mora, W.; Rodriguez, H.; Fritz, P. J. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Turrialba, Costa Rica, CATIE. 183 p. (Serie técnica. Informe técnico n° 252).
- Powell, W. 1992. Plant genomes, gene markers and linkage maps. *In* Biotechnology and crop improvement in Asia. Ed. J.P. Moss. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p 297-322.
- PROMECAFE, 1994. Proyecto Regional de mejoramiento Genético de *Coffea arabica* del PROMECAFE con la participación del CATIE y de la Cooperación Francesa (CIRAD, ORSTOM). San José, costa Rica, IICA PROMECAFE. 27 p.
- Rao, R.; Riley, K. 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter* n° 97: 3-19.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, sp.

- Sneath, H.F.; Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomic. The principles and practice of numerical classification. Eds. D. Kennedy; R.B. Park. San Francisco, W.H. Freeman. 573 p.
- Stoffelen, P. 1998. *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae) in tropical Africa: a systematic and palynological study, including a revision of the West and Central African species. Ph. D. Thesis. Belgica, Universidad católica de Louvain. 270 p.
- Sylvain, P.G. 1958. Ethiopian coffee: its significance to world coffee problems. *Economic Botany* 12: 111-139
- Taba, S. 1991. Caracterización y evaluación de germoplasma de maíz. *In: Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales*. Eds. R. Castillo; J. Estrela; C. Tapia. Quito, Ecuador, Editorial Porvenir. p. 161-166.
- Tanksley, S. D. 1993. Mapping polygenes. *Ann. Rev. Genet.* 27: 205-233.
- Thomas, A. S. 1942. The wild Arabica coffee on the Boma Plateau of Anglo-Egyptian Sudan. *Empire Journal of Experimental Agriculture* 10: 207-212.
- Van Der Vossen, H. A. M. 1985. Coffee selection and breeding. *In Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*. Eds. M.N. Clifford; K.C. Willson. Londres, Reino Unido, Croom Helm. p. 48-96.
- Waugh, R.; Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 10: 186-192.
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolff, K.; Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Raton, USA, CRC Press. sp.
- Welsch, J. y McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Researcher* 18 (24): 7213-7218.
- Williams, J.; Kubelik, K.; Livak, K.; Rafalski, J.; Tingey, S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6231-6235.
- Williams, J.; Hanafey, M.; Rafalski, J.; Tingey, S. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic markers. *Methods Enzymol.* 218: 704-740.

ANEXOS

ANEXO 1

Metodo CTAB-Minipreparaciones

(Murray y Thompsom (1980) modificado por F. Anthony y O. Quiros)

Macere muy bien 0,2g de hojas en un mortero con Nitrógeno líquido. Coloque el polvo en un eppendorf de 1,5ml y agregue 100µl de buffer 2X CTAB. Macere fuertemente con un pistilo.

Adicione 900µl de buffer y luego 2µl de mercaptoetanol (en la cámara de gases). Cierre la tapa, agite con el vortex hasta uniformizar.

Incube en Baño María a 65° C por 30 minutos. Deje enfriar 4 minutos.

Adicione 400µl de una solución 24:1 de cloroformo-isoamil alcohol a temperatura ambiente (cámara de gases) y mezcle fuertemente con el vortex. Microcentrifugue a 13.000 rpm por 5 minutos.

Transfiera cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio y repita el paso anterior.

Transfiera el sobrenadante a un tubo limpio con ayuda de una micropipeta de 1ml. Llene el tubo con isopropanol (-20° C) y mezcle ligeramente para precipitar el ADN. Deje reposar por 60 minutos en el congelador.

Centrifugue a 13.000 rpm por 5 minutos. Elimine el alcohol.

Adicione 1000 µl de buffer de lavado (76% etanol y 10 mM de acetato de amonio) y deje reposar por 20 minutos a temperatura ambiente.

Elimine el buffer de lavado invirtiendo el tubo y deje secar al aire.

Agregue 100 µl de TE(0,5M, pH 7.4 y oscuridad) y resuspenda agitando levemente.µ

Eliminación de ARN:

11. Llene cada tubo con etanol absoluto y deje precipitar el ADN toda la noche a -20° C.

Centrifugue a 10.000 rpm durante 3 minutos. Elimine la fase acuosa y deje secar los tubos a temperatura ambiente, invirtiendolos sobre papel toalla.

13. Agregue a cada tubo una solución 300 µl de una solución de RNAsa a 10 µg/ml de TE.

Deje incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.

14. Precipite nuevamente con etanol, dejando los tubos toda la noche a -20°C .
15. Centrifugue a 10.000 rpm durante 3 minutos. Elimine la fase acuosa y deje secar los tubos a temperatura ambiente, invirtiendolos sobre papel toalla.
16. Agregue 100 μl de TE (0,5 M, pH 7.4 y oscuridad) y resuspenda agitando levemente.

Buffer de extracción 2X CTAB

La composición del buffer de extracción se indica a continuación:

| Compuesto | Concentración |
|-----------------|---------------|
| Tris-HCL pH 8.0 | 100mM |
| EDTA, Disodium | 20mM |
| NaCl | 1,4M |
| CTAB | 2% (P/V) |
| PVP | 1% |

Buffer TE.

El buffer se constituye de los siguientes reactivos:

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN |
|----------------|---------------|
| EDTA 0,5M | 1mM |
| Tris-HCl 1M | 10mM |
| Agua destilada | |

ANEXO 2

Metodología para la cuantificación de ADN con electroforesis en gel de agarosa.

Preparar suficiente buffer TBE 0,5 (Anexo 4) para la cámara de electroforesis y para el gel. Preparar 100ml de una solución de agarosa al 1,2% en TBE 0,5X (200ml para el análisis RAPD). Calentar en horno microondas hasta que la agarosa se disuelva agitando cada 30 segundos (3' 30" en microondas con poder 10).

Cuando la solución se haya enfriado lo suficiente para poder sostenerla en la mano (aprox 60°C) verter el contenido en la cubeta de electroforesis.

Para cada muestra de ADN coloque en los tubos Eppendorf que sean necesarios los siguientes compuestos: 1 µl de ADN más 17 µl de TE más 2 µl de "loading buffer" Bpb

Para análisis RAPDs: 10 µl de Master Mix más 5 µl de Taq más 5 µl de primer más 5 µl de ADN

Utilizar un ADN que se encuentre a una concentración determinada (de preferencia 100 ng) Agitar cada muestra con el vortex y colocar en los pozos del gel con ayuda de una micropipeta. Ubicar adecuadamente el marcador de peso molecular.

Llenar la cámara de electroforesis con aproximadamente 2 l de buffer TBE 0,5X hasta 0,5 cm por encima de la superficie del gel.

Cerrar la cámara, conectar los cables adecuadamente a la fuente de poder aplicar 5 voltios por cada cm de longitud entre los polos de la cámara. Dejar migrar las muestras por 60 minutos para determinación de la concentración de ADN y 120 minutos para análisis RAPDs.

Al finalizar la electroforesis, transferir el gel a una solución de bromuro de etidio durante 90 minutos. Lavar el exceso de la solución en una bandeja con agua destilada por 10 minutos.

Colocar el gel sobre una lámpara de luz ultravioleta para observar el resultado de la electroforesis y tomar la fotografía del gel.

Determinar la concentración del ADN comparando la intensidad y grosor de las bandas del marcador molecular con las bandas obtenidas con las muestras.

ANEXO 3

Composición del buffer TBE 0,5X (Tris Borato EDTA).

Preparar una solución madre 5X de TBE de acuerdo a las siguientes proporciones:

| SOLUCIÓN | VOLUMEN TOTAL | |
|-------------------------------|---------------|--------|
| | 0,5 l | 1,0 l |
| EDTA 0,5 M pH 8 | 10,0 g | 20,0 g |
| TRIS BASE pH 8 | 27,0 g | 54,0 g |
| ACIDO BORICO | 13,8 g | 27,6 g |
| AGUA DESTILADA (aforar hasta) | 0,5 l | 1,0 l |

Composición del buffer Bpb.

| REACTIVO | VOLUMEN |
|---------------------|-------------|
| Azul de bromo fenol | 100 μ l |
| Glicerol | 500 μ l |
| EDTA 0,5 M pH8 | 100 μ l |
| Agua destilada | 10 ml |

ANEXO 4

Preparación de “Master Mix”.

Descongelar, centrifugar y mezclar uniformemente en un tubo Eppendorf los oligonucleótidos (10mM) en proporciones iguales (320 μ l / nucleótido) y diluir a 5 mM con agua desionizada.

En un tubo limpio y preferiblemente autoclavado adicionar los siguientes reactivos:

| Reactivo | Taq Stoffel | AmpliTaq Gold |
|----------------------------|-------------|---------------|
| Oligonucleótidos (5 mM) | 180 μ l | 180 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM) | 180 μ l | 180 μ l |
| Buffer de reacción Stoffel | 180 μ l | 180 μ l |
| Agua desionizada | 30 μ l | |
| Gelatine | | 60 μ l |

Por reacción se utilizan las siguientes molaridades y volúmenes:

| Reactivo | Concentración | Volumen | |
|----------------------------|-----------------|-------------|---------------|
| | | Taq Stoffel | AmpliTaq Gold |
| Oligonucleótidos: | | 3,0 μ l | 3,0 μ l |
| dATP | 0,15 mM | | |
| dCTP | 0,15 mM | | |
| dGTP | 0,15 mM | | |
| dTTP | 0,15 mM | | |
| MgCl ₂ | 3,5 mM / 3,0 mM | 3,5 μ l | 3,0 μ l |
| Buffer de reacción Stoffel | | 3,0 μ l | |
| Buffer II | | | 3,0 μ l |
| Tris HCl | 12 mM / 60 mM | 3,5mM | 60 mM |
| KCl | 12 mM | 12 mM | 12 mM |
| Agua deionizada | | 0,5 μ l | |
| Gelatine | | | 1,0 μ l |

ANEXO 5. Prueba de medias LSMeans por variedad del grupo Typica y Bourbon para las características longitud (LH) y ancho de hoja (AH) de café.

| Grupo genético | INTRODUCCIÓN- PLANTA | LONGITUD HOJA | INTRODUCCIÓN- PLANTA | ANCHO HOJA |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| BOURBON | | | | |
| | T.00983-6 | 16,34 A | T.00983-6 | 6,78 A |
| | T.00983-5 | 14,80 B | T.00983-5 | 6,28 B |
| | T.00983-2 | 14,64 B | T.00983-2 | 5,98 B |
| | T.00995-4 | 15,44 A | T.00995-3 | 6,50 A |
| | T.00995-3 | 15,24 A | T.00995-9 | 6,02 B |
| | T.00995-9 | 13,84 B | T.00995-4 | 5,96 B |
| | T.00995-6 | 12,82 C | T.00995-6 | 5,44 C |
| | T.02307-13(B) | 16,96 A | T.02307-13 | 6,84 A |
| | T.02307-5(B) | 15,10 B | T.02307-5 | 6,56 A |
| | T.02307-1(B) | 13,84 C | T.02307-2 | 6,00 B |
| | T.02307-2(B) | 13,58 C | T.02307-1 | 5,58 B |
| | T.02307-1(D) | 15,54 A | T.02307-1 | 6,56 A |
| | T.02307-5(D) | 15,42 A | T.02307-5 | 6,54 A |
| | T.02307-6(D) | 15,26 A | T.02307-6 | 6,28 A B |
| | T.02307-2(D) | 13,86 B | T.02307-2 | 6,08 B |
| | T.02540-8 | 16,72 A | T.02540-8 | 6,78 A |
| | T.02540-7 | 15,62 B | T.02540-7 | 6,50 A B |
| | T.02540-1 | 15,32 B | T.02540-1 | 6,34 B |
| | T.03425-3 | 16,18 A | T.03425-7 | 6,44 A |
| | T.03425-7 | 16,08 A | T.03425-3 | 6,40 A |
| | T.03425-6 | 14,12 B | T.03425-6 | 6,02 A |
| | T.03425-15 | 12,02 C | T.03425-15 | 4,86 B |
| | T.03426-14 | 15,12 A | T.03426-15 | 6,76 A |
| | T.03426-15 | 14,82 A | T.03426-14 | 6,42 A |
| | T.03469-12 | 15,00 A | T.03469-4 | 6,44 A |
| | T.03469-14 | 14,50 A | T.03469-14 | 6,36 A |
| | T.03469-6 | 14,38 A | T.03469-12 | 6,32 A |
| | T.03469-4 | 14,10 A | T.03469-6 | 6,24 A |
| | T.03627-15 | 15,60 A | T.03627-15 | 7,00 A |
| | T.03627-13 | 15,36 A | T.03627-5 | 6,88 A |
| | T.03627-5 | 15,32 A | T.03627-13 | 6,26 B |
| | T.03627-9 | 14,16 B | T.03627-9 | 6,06 B |
| | T.03820-6 | 16,04 A | T.03820-6 | 6,66 A |
| | T.03820-5 | 15,16 A B | T.03820-5 | 6,50 A B |
| | T.03820-8 | 14,68 B | T.03820-8 | 6,10 B |
| | T.03820-2 | 14,16 B | T.03820-2 | 6,08 B |

Continuación Anexo 5.

| Grupo genético | INTRODUCCIÓN- PLANTA | | LONGITUD HOJA | | INTRODUCCIÓN- ANCHO PLANTA | | HOJA | |
|----------------|-------------------------|-------|------------------|------------|-------------------------------|------|------|--|
| | T.03864-5 | | 14,80 | A | T.03864-5 | 6,38 | A | |
| T.03864-3 | | 14,40 | A | T.03864-3 | 6,14 | A | | |
| T.03864-2 | | 14,06 | A | T.03864-2 | 5,96 | A | | |
| T.03865-4 | | 15,98 | A | T.03865-7 | 6,50 | A | | |
| T.03865-7 | | 15,84 | A | T.03865-4 | 6,46 | A | | |
| T.03865-1 | | 15,06 | A | T.03865-1 | 6,42 | A | | |
| T.04256-4 | | 16,74 | A | T.04256-4 | 6,80 | A | | |
| T.04256-8 | | 16,40 | A | T.04256-6 | 6,48 | A | | |
| T.04256-6 | | 16,02 | A | T.04256-8 | 6,40 | A | | |
| T.04258-3 | | 17,20 | A | T.04258-3 | 7,16 | A | | |
| T.04258-5 | | 15,34 | B | T.04258-5 | 6,22 | B | | |
| T.04258-8 | | 14,72 | B | T.04258-4 | 6,04 | B C | | |
| T.04258-4 | | 14,66 | B | T.04258-2 | 5,88 | B C | | |
| T.04258-2 | | 14,56 | B | T.04258-8 | 5,64 | C | | |
| T.04261-1 | | 16,18 | A | T.04261-1 | 6,56 | A | | |
| T.04261-7 | | 15,58 | A | T.04261-7 | 6,44 | A | | |
| T.04264-5 | | 14,56 | BC | T.04261-2 | 6,20 | A | | |
| T.04261-2 | | 14,50 | C | T.04261-5 | 6,10 | A | | |
| T.04266-6 | | 16,00 | A | T.04266-6 | 6,06 | A | | |
| T.04266-2 | | 14,90 | B | T.04266-2 | 5,88 | A | | |
| T.04375-1 | | 16,76 | A | T.04375-1 | 7,16 | A | | |
| T.04375-4 | | 16,12 | A | T.04375-4 | 6,78 | A | | |
| T.04375-6 | | 16,04 | A | T.04375-2 | 6,32 | B | | |
| T.04375-2 | | 15,02 | B | T.04375-6 | 6,30 | B | | |
| TYPICA | | | | | | | | |
| T.00996-2 | | 14,98 | A | T.00996-1 | 5,94 | A | | |
| T.00996-7 | | 14,72 | A | T.00996-2 | 5,74 | A B | | |
| T.00996-1 | | 14,12 | A | T-00996-7 | 5,50 | B | | |
| T.02316-4 | | 16,92 | A | T.02316-13 | 6,66 | A | | |
| T.02316-13 | | 16,58 | A B | T.02316-4 | 6,24 | A B | | |
| T.02316-2 | | 15,60 | B C | T.02316-10 | 6,06 | B | | |
| T.02316-10 | | 14,68 | C D | T.02316-2 | 5,86 | B C | | |
| T.02316-3 | | 14,22 | D | T.02316-3 | 5,30 | C | | |
| T.03456-6 | | 16,50 | A | T.03456-6 | 6,14 | A | | |
| T.03456-2 | | 16,06 | A | T.03456-2 | 6,12 | A | | |
| T.03456-10 | | 14,30 | B | T.03456-10 | 5,80 | A | | |
| T.04076-1 | | 16,56 | A | T.04076-3 | 6,30 | A | | |
| T.04076-3 | | 16,02 | A B | T.04076-1 | 6,26 | A | | |
| T.04076-2 | | 15,28 | BC | T.04076-2 | 6,16 | A | | |
| T.04076-5 | | 14,78 | C | T.04076-5 | 5,98 | A | | |

ANEXO 6. Prueba de medias LSMean por variedad para los grupos Typica (T) y Bourbon (B) para la variable porcentaje de granos flotantes de café.

| Variedad | Grupo | Promedio | Clasificación LSMean |
|-------------------|--------------|-----------------|---------------------------------|
| Mibirizi | B | 23,71 | A |
| F-840 | T | 20,00 | B |
| Padang | T | 6,17 | C |
| Typica | T | 6,13 | C |
| Bourbon | B | 6,00 | C |
| ET-18 | B | 5,29 | C |
| Bourbon Salvador | B | 5,21 | C |
| I-60 | B | 5,19 | C |
| Caturra | B | 5,17 | C |
| ET-19 | B | 5,08 | C |
| Pluma Hidalgo | T | 4,87 | C |
| N-100 | B | 4,83 | C |
| Hibrido de Ceilan | T | 4,67 | C |
| Blue Mountain | T | 4,50 | C |
| N-313 | B | 4,12 | C |
| Guadeloupe | T | 3,61 | C |
| H-1 | T | 3,58 | C |
| Bronze 183 | T | 3,46 | C |

ANEXO 7. Prueba de medias LSMeans por variedad para los grupos Typica (T) y Bourbon (B) para la variable peso de 100 granos oro de café.

| Variedad | Grupo | Promedio | Clasificación LSMean |
|-------------------|--------------|-----------------|---------------------------------|
| ET-18 | B | 17,69 | A |
| Guadeloupe | T | 17,23 | AB |
| Bronze 183 | T | 16,74 | BC |
| Hibrido de Ceilan | T | 16,47 | BC |
| ET-19 | B | 16,02 | BCD |
| Pluma Hidalgo | T | 15,54 | CDE |
| Mibirizi | B | 15,47 | DE |
| Blue Mountain | T | 14,96 | EG |
| Padang | T | 14,48 | GH |
| F-840 | T | 14,10 | GHI |
| Typica | T | 13,85 | GHI |
| N-313 | B | 13,77 | HI |
| Bourbon Salvador | B | 13,61 | I |
| N-100 | B | 13,09 | IJ |
| Caturra | B | 12,67 | J |
| I-60 | B | 11,78 | K |
| Bourbon | B | 11,31 | K |
| H-1 | T | 11,11 | K |

ANEXO 8. Prueba de medias LSMean por variedad para los grupos Typica (T) y Bourbon (B) para la variable porcentaje de rendimiento de café oro.

| Variedad | Grupo | Promedio | Clasificación LSMean |
|-------------------|-------|----------|-------------------------|
| Pluma Hidalgo | T | 19,48 | A |
| Bronze 183 | T | 19,25 | A |
| Hibrido de Ceilan | T | 18,85 | AB |
| Typica | T | 18,00 | BC |
| Blue Mountain | T | 17,84 | BC |
| ET-19 | B | 17,69 | CD |
| Padang | T | 17,53 | CD |
| Bourbon Salvador | B | 17,43 | CD |
| ET-18 | B | 16,82 | DE |
| I-60 | B | 16,18 | EF |
| N-100 | B | 15,94 | EFG |
| Caturra | B | 15,45 | FG |
| Bourbon | B | 15,29 | FG |
| H-1 | T | 15,27 | G |
| Mibirizi | B | 15,23 | G |
| F-840 | T | 15,01 | G |
| Guadeloupe | T | 15,01 | G |
| N-313 | B | 14,98 | H |

ANEXO 9. Prueba de medias LSMean por variedad para los grupos Typica (T) y Bourbon (B) para la variable relleno del fruto de café.

| Variedad | Grupo | Promedio | Clasificación LSMean |
|-------------------|--------------|-----------------|---------------------------------|
| H-1 | T | 1,82 | A |
| Guadeloupe | T | 1,82 | A |
| Bourbon Salvador | B | 1,81 | AB |
| Caturra | B | 1,77 | ABC |
| N-313 | B | 1,77 | ABC |
| Typica | T | 1,76 | ABCD |
| N-100 | B | 1,75 | ABCD |
| Hibrido de Ceilan | T | 1,75 | ABCD |
| Pluma Hidalgo | T | 1,75 | ABCD |
| Bourbon | B | 1,73 | BCD |
| I-60 | B | 1,73 | BCD |
| Bronze 183 | T | 1,72 | CDE |
| Blue Mountain | T | 1,69 | CDE |
| Padang | T | 1,68 | DE |
| ET-19 | B | 1,67 | DE |
| ET-18 | B | 1,63 | E |
| Mibirizi | B | 1,52 | F |
| F-840 | T | 1,41 | G |

ANEXO 10. Prueba de medias LSMean por variedad para los grupos Typica (T) y Bourbon (B) para la variable porcentaje de granos caracoles de café.

| Variedad | Grupo | Promedio | Clasificación LSMean |
|-------------------|--------------|-----------------|---------------------------------|
| F-840 | T | 12,88 | A |
| ET-18 | B | 9,71 | B |
| Mibirizi | B | 7,21 | C |
| I-60 | B | 6,82 | C |
| Bourbon | B | 6,55 | C |
| Blue Mountain | T | 6,46 | C |
| Bronze 183 | T | 6,24 | CD |
| Padang | T | 6,18 | CD |
| ET-19 | B | 6,05 | CD |
| Pluma Hidalgo | T | 6,02 | CD |
| Typica | T | 5,94 | CD |
| Hibrido de Ceilan | T | 5,75 | CD |
| N-100 | B | 5,68 | CD |
| N-313 | B | 5,43 | CD |
| Caturra | B | 5,39 | CD |
| Bourbon Salvador | B | 4,91 | CD |
| H-1 | T | 4,38 | CD |
| Guadeloupe | T | 3,79 | CD |

ANEXO 11. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable porcentaje de granos flotantes de café.

| Variedad | Promedio | Clasificación |
|------------------|-----------------|----------------------|
| CRRC 1342/258 | 27,42 | A |
| CRRC 1343/349 | 23,85 | A |
| CIFC 2252/2 | 12,50 | B |
| UFV 1965 (450-63 | 12,17 | B |
| CIFC 2252/28 | 9,17 | BC |
| B-61042 EP-7002 | 8,68 | BC |
| L 8-1396 | 8,28 | BC |
| CRRC 1343/933 | 7,67 | BC |
| CRRC 1343/86 | 6,70 | BC |
| CIFC 2252/57 | 5,50 | C |
| L 8-154 | 4,94 | C |

ANEXO 12. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable peso de 100 granos de café oro.

| Variedad | Promedio | Clasificación |
|------------------|-----------------|----------------------|
| CRRC 1343/933 | 19,62 | A |
| UFV 1965 (450-63 | 17,67 | AB |
| CRRC 1343/86 | 17,34 | ABC |
| CRRC 1342/258 | 16,98 | BC |
| CIFC 2252/57 | 16,34 | BCD |
| CIFC 2252/2 | 16,15 | BCD |
| B-61042 EP-7002 | 16,04 | BCD |
| L 8-1396 | 15,33 | BCD |
| CRRC 1343/349 | 14,45 | CDE |
| L 8-154 | 12,98 | E |
| CIFC 2252/28 | 12,45 | E |

ANEXO 13. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable porcentaje de rendimiento oro de café.

| Variedad | Promedio | Clasificación |
|-------------------|-----------------|----------------------|
| CIFC 2252/5 | 19,82 | A |
| CRRC 1343/9 | 19,76 | A B |
| UFV 1965 (450-63) | 18,95 | A B C |
| CIFC 2252/2 | 18,89 | A B C |
| CRRC 1343/86 | 18,45 | A B C D |
| CIFC 2252/28 | 16,96 | B C D E |
| CRRC 1343/349 | 16,96 | B C D E |
| B-61042 EP-7002 | 16,94 | B C D E |
| L 8-154 | 16,49 | C D E |
| L 8-1396 | 15,90 | D E |
| CRRC 1342/258 | 14,69 | E |

ANEXO 14. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable relleno del fruto de café.

| Variedad | Promedio | Clasificación |
|-------------------|-----------------|----------------------|
| CIFC 2252/28 | 1,73 | A |
| L 8-154 | 1,71 | A |
| CRRC 1343/86 | 1,69 | A |
| CIFC 2252/2 | 1,67 | A |
| CRRC 1343/933 | 1,64 | A |
| L 8-1396 | 1,60 | A |
| UFV 1965 (450-63) | 1,58 | A |
| B-61042 EP-7002 | 1,57 | A |
| CIFC 2252/5 | 1,57 | A |
| CRRC 1343/349 | 1,57 | A |
| CRRC 1342/258 | 1,28 | B |

ANEXO 15. Prueba de Tukey por variedad para el grupo introgresado, para la variable porcentaje de grano caracol de café.

| Variedad | Promedio | Clasificación |
|------------------|-----------------|----------------------|
| CRRC 1342/258 | 13,11 | A |
| CIFC 2252/57 | 10,97 | A B |
| UFV 1965 (450-63 | 9,48 | A B |
| L 8-1396 | 9,26 | A B |
| B-61042 EP-7002 | 8,97 | A B |
| CRRC 1343/349 | 6,91 | B C |
| CRRC 1343/86 | 6,90 | B C |
| CRRC 1343/933 | 6,77 | B C |
| L 8-154 | 6,53 | B C |
| CIFC 2252/2 | 6,49 | B C |
| CIFC 2252/28 | 4,33 | C |

ANEXO 16. Prueba de Tukey por accesión para el Híbrido de Timor T.04387 y T.05286 , para las características longitud y ancho de la hoja de café.

| Característica | Promedio | Clasificación de Tukey | N° de accesión |
|----------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------|
| Longitud de la hoja en cm. | 15,18 | A | T.05286 |
| | 14,52 | B | T.04387 |
| Ancho de la hoja en cm. | 6,40 | A | T.05286 |
| | 6,01 | B | T.04387 |

Anexo 17

Cálculo del índice de heredabilidad para características de producción y fertilidad

Grupo Typica y Bourbon

Porcentaje de frutos flotantes de café:

$$H^2 = \frac{22,43}{22,43 + 25,42 + 2,64} = 0,49$$

Peso de 100 granos oro de café:

$$H^2 = \frac{1,86}{1,86 + 3,41 + 0,085} = 0,347$$

Porcentaje de rendimiento de café oro:

$$H^2 = \frac{0,56}{0,56 + 1,74 + 1,64} = 0,142$$

Relleno del fruto de café:

$$H^2 = \frac{0,006}{0,006 + 0,008 + 0,001} = 0,46$$

Porcentaje de grano caracol:

$$H^2 = \frac{3,38}{3,38 + 2,23 + 0,43} = 0,65$$

Grupo Introgresado

Porcentaje de fruto flotantes:

$$H^2 = \frac{41,59}{41,59 + 24,64} = 0,628$$

Peso de 100 granos de café oro:

$$H^2 = \frac{1,20}{1,20 + 3,42} = 0,26$$

Porcentaje de rendimiento de café oro:

$$H^2 = \frac{0,60}{0,60 + 1,92} = 0,238$$

Relleno del fruto de café:

$$H^2 = \frac{0,10}{0,10 + 0,0061} = 0,942$$

Porcentaje de grano caracol:

$$H^2 = \frac{5,53}{5,53 + 1,3} = 0,809$$