



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CARRERA QUÍMICA INDUSTRIAL

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL.

Título: Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua, 2018-2020

Autor:

Br. Taryn Denisse Suazo Ubieta

Tutor:

MSc. Samantha Miranda Calero

Asesores:

MSc. José Prado Arróliga

Ing. Ena Rivers Carcache

Ing. Róger Bolaños

Managua, diciembre 2020



ASPECTOS GENERALES



TÍTULO

Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua, 2018-2020



DEDICATORIA

A Dios, quien me brindó la fortaleza y el coraje para cumplir esta meta.

A mis padres, Sra. Alba Ubieta y Sr. Vicente Suazo, por su apoyo incondicional.

A mi hermana Arq. Iucary Suazo Ubieta, por siempre brindarme su compañía, apoyo y ánimo.

A mis familiares, que siempre estuvieron apoyándome de una u otra forma.

Taryn Suazo Ubieta



AGRADECIMIENTO

A Dios, por guiarme y ayudarme en cada paso de mi vida.

A mis padres, por ser mi ejemplo de perseverancia, especialmente a mi madre quien estuvo en cada momento crucial y sin la cual no llegaría a culminar esta meta. A mi hermana, por ser uno de mis motores. A todos mis familiares, especialmente a mis tíos Taryn Ubieta y Juan Bowie, Karla Ubieta y Gustavo González, quienes me han brindado siempre su consejo y apoyo infinito.

A mi tutora MSc. Samantha Miranda, por todo su apoyo en la realización de esta investigación, además por sus enseñanzas en lo personal, académico y profesional.

Al Laboratorio de Biotecnología, especialmente a PhD. Martha Lacayo, por darme la oportunidad de realizar esta investigación, así como también por darme el espacio para crecer académica y profesionalmente. Además, a cada uno de los investigadores del colectivo que de una u otra forma colaboraron con mi formación analítica, especialmente a la Ing. Anielka Dávila, por su apoyo. A mis asesores, Ing. Ena Rivers y Lic. Juan Carlos Ruiz por su apoyo y enseñanzas tanto en lo experimental como en campo. Además, al Ing. Carlos Umaña por su asesoría estadística.

Al INTA, institución responsable de la concepción y gestión de esta investigación, especialmente a la MSc. Andrea Zamora por su apoyo y al Ing. Róger Bolaños por su asesoría técnica y compromiso en la ejecución de este estudio.

Al MSc. José Luis Prado, por su guía en la estructuración metodológica de esta investigación. A MSc. María Nathalia Jiménez (Q.E.P.D.), por su asesoría metodológica en la etapa inicial de este trabajo. A los docentes del departamento de química, que contribuyeron en mi formación, especialmente a MSc. Karina Brenes, Lic. Leticia Romero y Lic. Kiara Montiel por su apoyo y enseñanzas.

A mis amigos, Kyara Solís, Ángela Cornejo, María Lacayo, José Rojas y Flavia Fajardo, especialmente a Cindy Martínez y Oscar Ruiz cuyo apoyo fue fundamental a cada momento y me dieron las palabras de ánimo que necesité.

A mis compañeros tesisistas y practicantes del Laboratorio quienes me brindaron su ayuda cuando fue necesario en actividades de muestreo y laboratorio, principalmente a mis colegas Elvis Conde, Kristhel Reyes y Nancy Hernández.

Finalmente, a todas las personas que colaboraron de una u otra forma en la realización de esta investigación.

Taryn Suazo Ubieta



CARTA AVAL DEL TUTOR



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
UNAN-MANAGUA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA



“2020: Año de la Educación con Calidad y Pertinencia”

CARTA AVAL DEL TUTOR

Managua, diciembre de 2020

MSc. Frank Medrano Mayorga
Director
Departamento de Química
UNAN-Managua
Su despacho. -

Estimado MSc. Medrano:

Me dirijo a usted en carácter de tutor de la monografía titulada: **“Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua, 2018-2020”**, presentada por la estudiante: Taryn Denisse Suazo Ubieta (N° Carnet: 13-04339-5) para optar al título de Licenciatura en Química Industrial. Este proyecto de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua y financiando por el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) y por este medio hago constar que cumple los requisitos para ser sometido a su presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

Saludos cordiales,



MSc. Samantha A. Miranda Calero
Investigador
Laboratorio de Biotecnología
UNAN-Managua

¡A la libertad por la Universidad!

Recinto Universitario Ricardo Morales Avilés (RURMA) Pabellón D, De la Rotonda Universitaria 1c. al Norte, Managua, Nicaragua. Teléfonos: (505) 22701287/22786769 ext.6023, 6227
biotecnologia@unan.edu.ni



CARTA AVAL DEL ASESOR



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

CARTA AVAL DEL ASESOR METODOLÓGICO



La presente monografía titulada "**Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 2018-2020**", ha sido realizado por la bachillera **Taryn Denisse Suazo Ubieta** bajo mi asesoría metodológica. En mi facultad doy fe de que la bachillera ha cumplido con todas las disposiciones y requisitos académicos en cuanto a la elaboración del presente trabajo de investigación para optar al título de Licenciado en Química Industrial, además declaro la autenticidad de la información reflejada en el documento.

Managua, diciembre de 2020

*MSc. José Luis Prado Arróliga
Coordinador Química Industrial
Departamento de Química
UNAN-Managua*



CARTA AVAL DEL ASESOR



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
UNAN-MANAGUA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA



“2020: Año de la Educación con Calidad y Pertinencia”

CARTA AVAL DEL ASESOR ESPECIALISTA EN CAMPO

Managua, diciembre de 2020

MSc. Frank Medrano Mayorga
Director
Departamento de Química
UNAN-Managua

Estimado MSc. Medrano:

Por este medio hago constar que la monografía desarrollada por la bachillera Taryn Denisse Suazo Ubieta, carnet 13-04339-5, titulada “**Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua, 2018-2020**”, ha sido concluida y revisada bajo mi asesoría, cumpliendo con todas las disposiciones y requisitos relacionados al área de investigación para optar al título de Licenciatura en Química Industrial.

Saludos cordiales,

Ing. Ena Rivers Carcache
Investigador
Laboratorio de Biotecnología
UNAN-Managua

¡A la libertad por la Universidad!

Recinto Universitario Ricardo Morales Avilés (RURMA) Pabellón D, De la Rotonda Universitaria 1c. al Norte, Managua, Nicaragua. Teléfonos: (505) 22701287/22786769 ext.6023, 6227
biotecnologia@unan.edu.ni



CARTA AVAL DEL ASESOR

CARTA AVAL DEL ASESOR TÉCNICO

Managua, diciembre de 2020

MSc. Frank Medrano Mayorga
Director
Departamento de Química
UNAN-Managua

Estimado MSc. Medrano:

Por este medio hago constar que la monografía titulada “Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua, 2018-2020”, desarrollada por la bachillera Taryn Denisse Suazo Ubieta, carnet 13-04339-5, para optar al título de Licenciatura en Química Industrial, ha sido concluida y revisada cumpliendo con todas las disposiciones y requisitos en cuanto a la elaboración de esta investigación.

Saludos cordiales,

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'RIBT', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

Ing. Róger Ilich Bolaños Taleno
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
INTA

Cc: Archivo



RESUMEN

En la presente investigación se realizó la caracterización morfológica y molecular del café (*Coffea Arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal, siendo la primera variedad de café producida en el país a través de técnicas de fitomejoramiento y cuyas características agronómicas de interés incluyen su resiliencia al cambio climático, alta productividad y precocidad, así como también tolerancia a la roya (*Hemileia vastratix* B&B) y buena calidad de taza. El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua en colaboración con el INTA, seleccionando 30 árboles de cada finca de los cuales se colectaron las hojas para ambas caracterizaciones. El análisis morfológico se realizó utilizando los descriptores específicos para café de la UPOV e IPGRI. Para la caracterización molecular se utilizaron diez marcadores microsatélites. A través del análisis estadístico realizado, se encontró que la variedad Catrenic es una planta cónica de porte intermedio con una altura de 2,58 m, con una cobertura foliar de 124 cm con bandolas de 77 cm, presenta ramificación secundaria y terciaria, la cual es una de las características que potencian su rendimiento y capacidad productiva, junto con el hecho de poseer un diámetro basal de 3,33 cm que aporta al buen vigor de la planta, así como también bandolas largas de hasta 16 yemas productivas. Los marcadores fueron altamente polimórficos, con un promedio de 14,7 alelos. Existe variabilidad intrapoblacional e interpoblacional con una diferenciación genética moderada de 0,06 entre los lotes Guanacaste y Mar de arena.

Palabras claves: Café, *Coffea Arabica*, Catrenic, marcadores microsatélites, morfología, variabilidad.



TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	Página
1.1. Introducción	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. Objetivo General.....	6
1.4.2. Objetivos Específicos	6
CAPÍTULO II	
2.1. Marco Teórico.....	8
2.1.1. Origen del café.	8
2.1.2. Generalidades.	9
2.1.2.1. Calidad del café.....	9
2.1.2.2. Producción.....	11
2.1.3. Aspectos botánicos.	11
2.1.3.1. Fenología del cultivo.....	14
2.1.3.2. Condiciones edafoclimáticas para el cultivo de café.	15
2.1.4. Genética del café.....	16
2.1.4.1. <i>Coffea arabica</i>	17
2.1.4.2. Variedad Catrenic.....	22
2.1.5. Marcadores genéticos.	25
2.1.5.1. Ventajas y aplicaciones de los marcadores de ADN.	28
2.1.5.2. Selección del marcador a utilizar.....	28
2.1.5.3. Marcadores microsatélites (Single Sequence Repeats, SSR).....	29
2.1.5.4. Variabilidad genética.	34



2.2. Antecedentes..... 36

2.3. Hipótesis..... 39

CAPÍTULO III

3.1. Diseño metodológico..... 41

3.1.1. Descripción del ámbito de estudio..... 41

3.1.2. Tipo de estudio..... 43

3.1.3. Población y muestra..... 43

3.1.3.1. Población..... 43

3.1.3.2. Muestra..... 44

3.1.4. Variables y Operacionalización..... 45

3.1.4.1. Variables Independientes..... 45

3.1.4.2. Variables Dependientes..... 45

3.1.4.3. Operacionalización de variables..... 46

3.1.4.4. Materiales y métodos..... 54

CAPÍTULO IV

4.1. Análisis de resultados..... 75

4.1.1. Caracterización morfológica de la variedad de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic..... 75

4.1.1.1. Caracterización morfológica de hojas muestreadas de cada árbol..... 75

4.1.1.2. Caracterización morfológica de los árboles muestreados..... 76

4.1.2. Evaluación de las principales características morfológicas de importancia agroindustrial para el rubro café..... 80

4.1.2.1. Altura de la planta..... 80

4.1.2.2. Diámetro del tallo..... 81

4.1.2.3. Presencia de ramificación productiva..... 82

4.1.2.4. Longitud de bandolas..... 83



4.1.2.5. Número de yemas productivas.....	84
4.1.3. Perfil molecular de la variedad Catrenic.....	85
4.1.3.1. Número de alelos (n_A).....	85
4.1.3.2. Tamaño alélico.....	87
4.1.4. Variabilidad intrapoblacional e interpoblacional de las muestras de Catrenic colectadas en las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal.....	88
4.1.4.1. Variabilidad intrapoblacional.....	88
4.1.4.2. Variabilidad interpoblacional.....	95
CAPÍTULO V	
5.1. Conclusiones.....	103
5.2. Recomendaciones.....	105
5.3. Bibliografía.....	106

ANEXO



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Ubicación de los sitios de colecta pertenecientes a las fincas CENECOOP-Fedecaruna del municipio de Masatepe, Masaya y El Rosal de San Marcos, Carazo según sus coordenadas geográficas UTM registradas. Fuente: Obtenido de Google Earth Pro versión 7.3. 41
- Figura 2 Ubicación del Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua según sus coordenadas geográficas UTM registradas. Fuente: Obtenido de Google Earth Pro versión 7.3. 42
- Figura 3 Diseño de selección de plantas y colecta de tejido foliar, donde se seleccionaron 2 plantas por surco para un total de 30 plantas por lote. 62
- Figura 4 Proceso de Caracterización morfológica y molecular del café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua. Fuente: Elaboración propia a través de Microsoft Visio. 73
- Figura 5 Frecuencia de los descriptores cualitativos de las hojas de café de la variedad Catrenic provenientes de los lotes evaluados. 75
- Figura 6 Frecuencia de los descriptores cualitativos de las plantas de café de la variedad Catrenic provenientes de los lotes evaluados. 77
- Figura 7 Altura (m) de las plantas de café variedad Catrenic evaluadas de los lotes Guanacaste y Mar de arena pertenecientes a las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal, respectivamente. 81
- Figura 8 Diámetro del tallo (cm) basal y a la altura al pecho de las plantas de café variedad Catrenic evaluadas de los lotes Guanacaste y Mar de arena pertenecientes a las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal, respectivamente. 82
- Figura 9 Longitud de ramificación (cm) promedio de las plantas de café variedad Catrenic evaluadas de los lotes Guanacaste y Mar de arena pertenecientes a las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal, respectivamente. 84
- Figura 10 Número de alelos por locus registrados en base a cada lote (Guanacaste y Mar de arena). 85



Figura 11 Rango de tamaño alélico registrado por locus en las poblaciones analizadas.

87

Figura 12 Dendograma de conglomerados (distancia euclídea, método de enlace promedio) en base a las variables cuantitativas de las hojas de la variedad Catrenic provenientes de las fincas estudiadas. El corte se realizó a una distancia aproximada de 15 unidades. Colores: azul (conglomerado1), rojo (conglomerado 2), verde (conglomerado 3), amarillo (conglomerado 5) y morado (conglomerado 4).

88

Figura 13 Dendograma de conglomerados (distancia euclídea, método de enlace promedio) en base a las variables cuantitativas evaluadas (altura, diámetro del tallo basal y de altura al pecho, longitud de bandolas, número de yemas productivas por bandolas) en las plantas de la variedad Catrenic provenientes de las fincas estudiadas. Colores: azul (conglomerado1), rojo (conglomerado 2), verde (conglomerado 3), café (conglomerado 5) y rosado (conglomerado 4).

90

Figura 14 Heterocigosidad observada y esperada promedio reflejada por los lotes Guanacaste y Mar de arena.

92

Figura 15 Índice Garza-Williamson en los 10 loci SSR evaluados para ambos lotes de la variedad en estudio.

94

Figura 16 Índice de fijación de ambos lotes evaluados.

100

Figura 17 Coeficiente de diferenciación genética F_{ST} obtenido para ambos lotes en estudio. Fuente: obtenida a través de Arlequin versión 3.6.2.2.

101



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Aspectos botánicos del café	12
Tabla 2 Fenología del cultivo	14
Tabla 3 Taxonomía de la planta de café (<i>Coffea arabica</i> L.)	17
Tabla 4 Características de la variedad de café Catrenic	24
Tabla 5 Materiales	55
Tabla 6 Equipos	57
Tabla 7 Reactivos	59
Tabla 8 Descriptores morfológicos utilizados para la caracterización de los árboles de café Catrenic seleccionados.	63
Tabla 9 Descriptores morfológicos utilizados para la caracterización de las hojas seleccionadas de los árboles de café Catrenic evaluados.	64
Tabla 10 Perfil térmico utilizado para la amplificación del ADN genómico	66
Tabla 11 Componentes del master mix utilizado para la amplificación del ADN genómico	67
Tabla 12 Clasificación de los valores F_{ST} de Wright (1969)	72
Tabla 13 Estadísticos descriptivos de las características cuantitativas las hojas de café Catrenic provenientes de los lotes estudiados.	76
Tabla 14 Estadísticos descriptivos de las características cuantitativas de la matriz vegetal de la variedad Catrenic para ambos lotes evaluados	78
Tabla 15 Conglomerados formados en base longitud y ancho de la hoja, longitud del peciolo foliar	89
Tabla 16 Conglomerados formados en base a la altura, diámetro del tallo (basal y de altura al pecho), longitud de bandolas, número de yemas productivas por bandolas.	90
Tabla 17 Valores estadísticos por grupo y variables medidas en las plantas que sí cumplen con los requisitos de normalidad	95
Tabla 18 Estadísticas por grupo y variables que sí cumplen con los requisitos de normalidad	97
Tabla 19 Análisis AMOVA para ambos lotes en base a los 10 loci utilizados	99



ÍNDICE DE ANEXOS

<u>Anexo 1: Glosario</u>	1
<u>Anexo 2: Café arábica vs robusta.</u> Tabla 1. Diferencias entre el café arábica y el robusta	7
<u>Anexo 3: Distribución del café en Nicaragua.</u> Figura 1. Distribución del cultivo de Café en Nicaragua. Fuente: Extraído de Rodríguez, Maricela (2013) “Efecto económico de la roya en Nicaragua: evaluación y recomendaciones para las áreas cafetaleras de la zona Norte”. Managua: UCA.	8
<u>Anexo 4: Partes de las plantas, frutos y hojas del café.</u> Figura 2. Anatomía del fruto de café. Fuente: Ramos, P., Sanz, J., y Oliveros, C. (2010). Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real, a través de la medición de color. Cenicafé, 315-326. 9	9
Figura 3. Parte de una hoja. Fuente: UNNE. (2013). Morfología de plantas vasculares. Obtenido de Botánica morfológica: http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema2/2_2dicot.htm	9
Figura 4. Morfología de la planta de café. Ubicación de las yemas en las cuales se origina la estructura vegetativa y reproductiva de la planta de café. Fuente: Arcila, J. (2007). Crecimiento y desarrollo de la planta de café. En J. Arcila, F. Farfán, A. Moreno, L. Salazar, y E. Hincapié, Sistemas de producción de café en Colombia (págs. 21-60). Chinchiná: Cenicafé.	9
<u>Anexo 5: Enfermedades y plagas.</u> Figura 5. Guía para reconocer las principales enfermedades, insectos plagas y reguladores naturales. Fuente: Filho, E., Barrios, M., Toruño, I., y CATIE. (2009). ¿Cómo podemos mejorar la finca cafetalera en la cuenca? Managua: CATIE.	10
<u>Anexo 6: Lotes de café variedad Catrenic.</u> Figura 6. Descripción de los lotes evaluados.	11



Anexo 7: Marcadores SSR utilizados. Tabla 2. Lista de pares de cebadores utilizados para amplificar los loci SSR en la caracterización genética molecular de café (*Coffea arabica* L.). 12

Anexo 8: Formato de caracterización de hojas de café. Figura 7. Formato de caracterización de hojas de café. Fuente: Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 14

Anexo 9: Formato de caracterización de árboles de café. Figura 8. Formato (lado A) de colecta de muestra vegetal. Fuente: Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 15

Figura 8. Formato (lado B) de colecta de muestra vegetal. Fuente: Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 16

Anexo 10: Procedimientos 17

Anexo 11: Flujograma del proceso de extracción de ADN, Figura 9. Extracción de ADN genómico de alta calidad de tejidos de plantas recalcitrantes. Fuente: elaboración propia a través Microsoft Visio basado en el protocolo modificado de McLay, T. (4 de septiembre de 2017). Hight quality DNA extraction protocol from recalcitrant plant tissues. Obtenido de protocols.io. 30

Anexo 12: Flujogramas de fotos. Figura 10. Procedimiento de caracterización in situ de los árboles seleccionados y colecta de tejido foliar. 31

Figura 11. Descontaminación del material vegetal colectado para el análisis molecular. 32

Figura 12. Caracterización morfológica de las muestras del tejido foliar colectado. 33

Figura 13. Procedimiento de extracción de ADN genómico seguido según el protocolo estandarizado basado en McLay (2017). 34

Figura 14. Electroforesis horizontal en gel de agarosa. 35

Figura 15. Amplificación de las muestras de ADN genómico utilizando la técnica PCR. 36



Figura 16. Electroforesis vertical en gel desnaturalizante de poliacrilamida UREA-PAGE. 37

Anexo 13: Coordenadas de los árboles seleccionados para la caracterización. Tabla 3. Coordenadas geográficas UTM de los árboles seleccionados para la caracterización morfológica y molecular en los lotes Guanacaste y Mar de Arena. 38

Anexo 14: Resultados del análisis estadístico realizado para la caracterización morfológica. Tabla 4. Resultado de las pruebas de normalidad evaluando características medidas en las plantas de ambos lotes 40

Tabla 5. Pruebas de Levene y T de Student aplicadas a las características medidas en las plantas que cumplen el requisito de normalidad para ambos lotes. 41

Tabla 6. Pruebas de U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon aplicadas en el resto de las variables medidas 42

Tabla 7. Resultado de las pruebas de normalidad evaluando las características medidas en las hojas de los árboles seleccionados de ambos lotes. 43

Tabla 8. Pruebas de Levene y t de Student para la igualdad de medias 43

Tabla 9. Estadísticos de prueba aplicados a la variable de longitud del peciolo foliar. 44

Tabla 10. Centroides de los grupos de plantas formados en cuanto a la similitud de los descriptores evaluados en hojas 44

Tabla 11. Centroides de los grupos de plantas formados en cuanto a la similitud de los descriptores evaluados en plantas 45

Anexo 15: Resultados del análisis molecular realizado. Tabla 12. Resultados del perfil molecular e índices de diversidad genética obtenidos de la caracterización de la variedad Catrenic proveniente de ambas fincas. 46

Tabla 13. Coeficientes de fijación de la variedad Catrenic en base a los dos lotes caracterizados. 47



ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo del fragmento amplificado, del inglés)
AH:	Ancho de la hoja
AMOVA:	Analysis of Molecular Variance (Análisis de Varianza Molecular)
APEN:	Asociación de Productores y Exportadores de Nicaragua
BCN:	Banco Central de Nicaragua
BSA:	Bovine serum albumin (Albúmina de suero bovino)
CAFENICA:	Asociación de cooperativas de Pequeños Productores de Café de Nicaragua
CATIE:	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CDT:	Centro de Desarrollo Tecnológico
CeCALCULA:	Centro Nacional de Cálculo Científico
CENAGRO:	Censo Nacional Agropecuario
CENECOOP:	Centro Nicaragüense de Capacitación y Educación Cooperativa
CENICAFÉ:	Centro Nacional de Investigaciones de Café
CIAT:	International Center for Tropical Agriculture (Centro Internacional de Agricultura)
CICAFÉ:	Centro de Investigaciones de Café
CIFC:	Centro de Investigaçãõ das Ferrugens do Cafeeiro (Centro de Investigaciones de la Roya del Café)
CONACAFÉ:	Consejo Nacional del Café
CTAB:	Cetyltrimethylammonium Bromide (Bromuro de cetiltrimetilamonio)

Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 2018-2020



- DAP: Diámetro del tallo, altura al pecho
- DAF: DNA amplificación fingerprinting (Huellas digitales de amplificación de ADN)
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
- EST-SSR: Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat (Etiqueta de Secuencia Expresada - Secuencias simples Repetidas)
- F: Finca CENECOOP-Fedecaruna
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
- FNC: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia
- FRC: Fincas El Rosal, variedad Catrenic
- GPS: Global Positioning System (Sistema de Posicionamiento Global)
- HRM: High Resolution Melting (Fusión de Alta Resolución)
- ICO: International Coffee Organization (Organización Internacional del Café)
- IICA: Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura)
- IHCAFE: Instituto Hondureño del Café
- INATEC: Instituto Tecnológico Nacional
- INTA: Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria
- IPGRI: International Plant Genetic Resources Institute (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos)
- ISO: International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización)
- LH: Longitud de la hoja
- LPF: Longitud del peciolo foliar



MAGFOR:	Ministerio Agropecuario y Forestal
MAS:	Marker Assisted Selection (Selección Asistida por Marcador)
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NHGRI:	National Human Genome Research Institute (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano)
NTON:	Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense
ONCC:	Organismo Nacional de Certificación del Café
PCR:	Reacción en Cadena de Polimerasa
PIB:	Producto Interno Bruto
QTL:	Quantitative Trait Locus (Locus de Rasgos Cuantitativos)
RAPD:	Random Amplified Polymorphic DNA (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico)
RAMPO:	Random Amplification of Microsatellite Polymorphism (Amplificación Aleatoria del Polimorfismo de Microsatélites)
RFLP:	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, por sus siglas en inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism)
RURMA:	Recinto Universitario Ricardo Morales Avilés
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleótido)
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences (Paquete Estadístico para Ciencias Sociales)
SSR:	Secuencias simples repetidas, del inglés Simple Sequence Repeats.
STR:	Short Tandem Repeats (Repeticiones Cortas en Tándem)
TE:	Tris-EDTA
TEMED:	Tetramethylethylenediamine (Tetrametiletildiamina)

Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 2018-2020



UNAN: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UPOV: International Union for the Protection of New Varieties of Plants (Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades de Plantas)

UTM: Universal Transverse Mercator (Sistema de coordenadas universal transversal)



CAPÍTULO I



1.1. Introducción

El sector cafetalero contribuye con la economía rural y ha sido uno de los rubros que más ha aportado históricamente al PIB nacional. Se ubica de manera oscilante entre los tres primeros lugares de rubros de exportación en Nicaragua, debido a la variación de precios internacionales y el bajo rendimiento por manzana presentado, aun cuando el país cuenta con las principales condiciones agroecológicas para obtener un café competitivo, como lo son: tierras fértiles con alturas adecuadas y cultivos en sombra. Entre los factores que inciden en esta problemática se encuentran el desconocimiento del acervo genético, la falta de tecnología para el mejoramiento del rubro, la poca implementación de técnicas de análisis de suelos y maquinaria adecuada, entre otros.

El conocimiento de las variedades promisorias que potenciarían la producción del café es un aspecto fundamental que contribuye con su posicionamiento en el mercado internacional, entre las cuales se encuentra la variedad Catrenic cuya importancia se basa en su buen rendimiento agronómico, resistencia a roya (*Hemileia vastatrix* B & B), buena calidad de taza y adaptabilidad al cambio climático. Por esta razón, Catrenic forma parte de las prioridades del INTA dentro del proyecto de caracterización morfológica y molecular de variedades de café desarrollado por esta institución desde el 2015 con el objetivo de identificar y conservar genotipos valiosos por sus características de interés para el sector.

El propósito de esta investigación fue la caracterización morfológica y molecular de Catrenic para la obtención de los atributos de mayor relevancia productiva que constituyen un punto de partida para la promoción de esta variedad en el sector cafetalero nacional. Asimismo, la información generada permitirá contribuir con la designación de origen de esta variedad, requisito cada vez más demandado a nivel internacional, que se traduce en la obtención de mejores y mayores oportunidades de mercado para el café nicaragüense.



En este estudio se realizó la caracterización de 60 árboles de café identificados como Catrenic cultivadas en fincas colaboradoras del INTA, procedentes de Masatepe (CENECOOP-Fedecaruna) y San Marcos (El Rosal) utilizando 22 descriptores morfológicos para plantas y hojas designados por UPOV e IPGRI, entre los cuales se evaluaron características de relevancia agroindustrial. Por otro lado, el análisis molecular implicó el uso de 10 marcadores microsatélites para establecer el perfil partiendo del ADN genómico extraído del tejido foliar. En las caracterizaciones se determinó la variabilidad entre las muestras de cada finca y entre ambas localidades.



1.2. Planteamiento del problema

Al igual que en el resto del mundo, en nuestro país la industria del café se caracteriza por un alto grado de competitividad entre los productores en un área de cosecha de 190 000 manzanas de café para el ciclo 2018/2019 (MAG, 2019).

A pesar de su impacto en la economía nacional, el rubro se ve comprometido por factores que van desde la inestabilidad del precio internacional, seguido por el estrés abiótico causado por el cambio climático, así como los niveles de incidencia de enfermedades entre las cuales resalta la roya, que en 2013 afectó a 37% de la población nacional de café, al igual que otras enfermedades que siguen afectando los cultivos como el ojo de gallo y un complejo de plagas como nematodos, minadores, broca, entre otras (MAGFOR, 2013).

En consecuencia, ocurre el estancamiento de la producción y disminución de la cantidad de productores, afectando la economía del país por el decrecimiento de la calidad exportable de este rubro. En este aspecto una de las limitantes nacionales es la escasa implementación de tecnología de caracterización y transformación genética que contribuyan con programas de mejoramiento, así como también, con la renovación de plantaciones más productivas, precoces y resistentes tanto a plagas como a enfermedades.

Por consiguiente, al no realizarse la caracterización de las variedades de café cultivadas se limita su valorización, como en el caso de Catrenic, que no posee un perfil genético ni una caracterización morfológica referente para lo cual pueda extenderse su certificado de origen, mermando de esta manera su valor a nivel internacional. En este contexto, es importante considerar la caracterización de la variedad Catrenic planteándose la siguiente interrogante: ¿Los árboles evaluados de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal presentan variabilidad intrapoblacional e interpoblacional?



1.3. Justificación

Partiendo de la importancia social y financiera de la calidad del café producido en el país, resulta ineludible la implementación de nuevos métodos y técnicas que permitan alcanzar niveles superiores de productividad a mediano y largo plazo que garanticen la competitividad internacional demandada por el mercado de una manera sostenible.

Entre estas alternativas de desarrollo se encuentra en una posición priorizada la ejecución de caracterizaciones genéticas de las variedades promisorias a fin de establecer una línea base sobre la cual puedan identificarse germoplasmas potencialmente resilientes al cambio climático, resistentes a enfermedades, altamente productivas y de calidad organoléptica. Dentro de estas variedades encontramos Catrenic, promovida por el INTA, debido a su resistencia asociada a la roya (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), además de su alta productividad (peso y número del fruto), aroma y cuerpo (Suárez y Picado, 2009).

Además, Catrenic es la primera variedad seleccionada en Nicaragua, supera a otras variedades comerciales como Catuai, Caturra y Pacas en cuestiones de producción. Según Baylón (2020), presenta uniformidad fenotípica y adaptabilidad a diferentes zonas, lo que la hace resiliente. Por estas razones el establecimiento de su perfil o huella genética no sólo la valorizará internacionalmente fortaleciendo la economía de los productores, sino también dará las pautas para la potenciación de la variedad a través del conocimiento de sus características morfológicas de importancia agroindustrial.

A su vez, los análisis realizados proporcionarán la información referente a la presencia de variabilidad entre los árboles evaluados por lote y por finca, identificando grupos en base a sus características más relevantes y su interacción con factores externos de importancia para la promoción de su estabilidad como variedad. Las

Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua. Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 2018-2020



determinaciones de todos estos aspectos, podrían ser utilizados en programas de mejoramiento genético de las variedades de café cultivadas en el país.

En definitiva, como parte de la perspectiva del INTA para el fortalecimiento del rubro, la información resultante es de importancia para la optimización de la conservación del germoplasma de esta variedad, seguido por el fortalecimiento de la colaboración interinstitucional con el Laboratorio de Biotecnología de UNAN-Managua, en cuanto al desarrollo de proyectos similares que generan conocimiento en el área tecnológica agroindustrial.



1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Caracterizar a nivel morfológico y molecular el café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua. Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 2018-2020

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Describir las características morfológicas de la variedad Catrenic provenientes de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal.
2. Evaluar las características morfológicas de relevancia agroindustrial exhibidas por los árboles de café Catrenic seleccionados.
3. Establecer el perfil molecular de la variedad Catrenic utilizando marcadores microsatélites.
4. Determinar la variabilidad intrapoblacional e interpoblacional de las muestras de Catrenic colectadas en las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal.



CAPÍTULO II



2.1. Marco Teórico

2.1.1. Origen del café.

El café se originó en las tierras altas de Etiopía y Sudán, África. Su historia se remonta en Yemen donde se cultivaba posiblemente desde antes del Siglo XV, luego se extendió rápidamente por todo el mundo árabe. En 1699 los holandeses lograron transportar café y empezar a cultivar en Malabar e Indonesia, convirtiéndose en la principal fuente del rubro en Europa. En América se empezó a cultivar en el decenio de 1720, y en 1825 llega a América Central, comenzándose a extender su cultivo poco a poco en todo el mundo (Montalvo y Villalva, 2017).

Según Kùlh (2004), las primeras referencias del cultivo y consumo de café en Nicaragua aparecen desde 1820, introducido en la meseta de Carazo antes de 1825 y sembrándose de manera comercial en las Sierras de Managua desde antes de 1845 así como también en las faldas de los volcanes de Granada y León. Se considera que el cultivo de café en la región norte del país fue fomentado por los presbíteros Policarpo y Gordiano antes de 1860. La cultura del cultivo de café en el país fue creciendo, potenciando su producción y exportación bajo ciertas fluctuaciones en los precios debido a eventos de contexto histórico, reportándose la primera exportación de café nicaragüense hacia Mazatlán, México en 1848.

En Centroamérica, según IICA (2004), se encuentran las condiciones edafoclimáticas ideales para producir todas las variedades del café pero su potencial no se explota plenamente. En el estado salvaje, el café, se desarrolla bajo una cubierta forestal de cuatro estratos y bajo sombra permanente, por lo que los sistemas iniciales con variedades tradicionales, fueron desarrollados bajo una cubierta forestal intentando simular el ambiente en su estado salvaje, no obstante, puede ser cultivado en la ausencia de sombra, ya que varios estudios han demostrado una mayor producción con una mayor demanda de insumos y variación en la calidad del grano.



Los principales regiones donde se cultiva café en Nicaragua son la Región Central Norte (Jinotega, Matagalpa, Boaco, Nueva Segovia, Madriz y Estelí) y la Región del Pacífico (Carazo, Managua y Granada) (Duarte, 2015).

2.1.2. Generalidades.

2.1.2.1. Calidad del café.

De manera general, la calidad de un producto o servicio está determinado por la capacidad de satisfacer a los clientes, incluyendo no sólo la función y desempeño previsto, sino también su valor y beneficio percibido para el cliente (ISO, 2015). Para el café, la definición de calidad y sus atributos varía a lo largo de la cadena de producción hasta llegar al consumidor, ya que en base a Leroy *et al.* (2006), la calidad del café puede ser:

1. A nivel del agricultor: la calidad del café es una combinación de nivel de producción, precio y facilidad de cultivo.
2. A nivel de exportador o importador: la calidad del café está relacionada con el tamaño del grano, falta de defectos, regularidad del aprovisionamiento, tonelaje disponible, características físicas y el precio.
3. A nivel tostador: la calidad del café depende del contenido de humedad, la estabilidad de las características, el origen, el precio, los compuestos bioquímicos y la calidad organoléptica. Cabe señalar que cada mercado de consumo o país puede definir sus propias cualidades organolépticas.
4. A nivel del consumidor: la calidad del café abarca el precio, el sabor, los efectos sobre la salud y el estado de alerta, el origen geográfico, los aspectos ambientales y sociológicos (café orgánico, comercio justo, etc.).

Por tanto, la variación en la definición de calidad del café está determinada por múltiples factores en dependencia de su analista, además involucra varios componentes como procedimientos de cosecha y postcosecha, condiciones climáticas, factores fisiológicos (edad de planta, maduración del fruto, período de recolección, entre otros) y



genéticos, como su origen (especie y genotipo), el cual influirá en gran medida (Leroy *et al.*, 2006).

A nivel genético hay una variación para la calidad del café dentro y entre especies, por lo tanto, mediante estrategias de hibridación interespecíficas o dentro de estrategias de especies se pueden lograr mejoras genéticas para la calidad del café (Leroy *et al.*, 2006).

En Nicaragua, en aras de asegurar la calidad de su café, se aplica la Norma Técnica Obligatoria de Café Verde, Clasificaciones y especificaciones de calidades (NTON 03 025-11), que tiene como objetivo establecer la clasificación, especificaciones de calidad y referenciar los métodos de análisis y muestreo en la comercialización nacional de café verde y exportación (Comité Técnico de Café, 2019). A su vez, establece los parámetros con los que se calculan los números de defectos del café (Cuadras, 2016).

La certificación de la calidad del café verde para la exportación está a cargo del Organismo Nacional de Certificación del Café (ONCC) del Consejo Nacional del Café (CONACAFÉ), el cual supervisa periódicamente dicha certificación para asegurarse que se ajusta a los requisitos del reglamento NTON 03 025-11 (Cuadras, 2016).

Además de las normas para asegurar la calidad del café, se realiza el certamen de la Taza de la Excelencia el cual genera un buen impulso a nivel internacional del café nicaragüense y paralelamente, CAFENICA (Asociación de cooperativas de Pequeños Productores de Café de Nicaragua) integrada por 11 organizaciones de café, implementa “Parcelas de variedades” en las cuales, se cultivan diferentes variedades, entre ellas Catrenic, identificadas previamente y seleccionadas priorizando el equilibrio entre calidad y resistencia a posibles nuevas plagas como la roya, todo esto con el objetivo de mantener la producción de café de calidad en el país (Cuadras, 2016).

Por otro lado, Nicaragua tiene en vigor dos leyes fundamentales que regulan la producción de café. La primera es la ley del café (Ley 368) aprobada el 19 de diciembre del año 2000, misma que por estar dirigida a incrementar el control del comercio exterior



del grano, promovió la redacción de una segunda ley, la 833, llamada “Ley para la transformación y desarrollo de la caficultura” en diciembre 2013. Esta última pretende la renovación y transformación del sector a través de un fondo que permita la renovación de las plantaciones viejas (Cuadras, 2016).

2.1.2.2. Producción.

El orden jerárquico de países productores de café a nivel mundial se ha mantenido estable a pesar las fluctuaciones de volúmenes de producción debidos a la influencia de factores políticos, sociales y climáticos; siendo Brasil el mayor productor de café del mundo produciendo 67,5 millones de quintales de café en el 2017 (Nicafé, 2019).

La producción de Centroamérica presenta una tendencia creciente en los últimos cinco años ante las adversidades como la epidemia de roya y las sequías. Los países que más producen y exportan café en la región son Honduras, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica y El Salvador, en orden descendente según Nicafé (2019).

En Nicaragua, la producción de café en el ciclo 2017/2018 fue de 3,1 millones de quintales y las exportaciones en el 2018 fueron de 3,0 millones de quintales, 8,0 % menor que en 2017, con un área cosechada de 190 mil manzanas, según datos del Banco Central de Nicaragua (BCN, 2019).

El eslabón de producción y beneficiado húmedo está en manos de pequeños productores que se encargan desde labores de cultivo hasta cosecha, componen el 95,2% del total, conformado por 33 737 micro y pequeños productores (Nicafé, 2019).

2.1.3. Aspectos botánicos.

El café pertenece a la familia botánica *Rubiaceae*, que tiene unos 500 géneros y más de 6000 especies. La mayoría son árboles y arbustos tropicales que crecen en la capa más baja de los bosques. Otros miembros de esa familia son las gardenias y las plantas que producen quinina y sustancias útiles, pero el *Coffea* es el miembro más importante de la familia desde el punto de vista económico (ICO, 2018).



Existen numerosas especies de café y diferentes variedades dentro de cada especie (tabla 1), sin embargo las más importantes comercialmente pertenecientes al género *Coffea*, son conocidas como *Coffea arabica* Lineo y *Coffea canephora* Pierre Ex Froehner, también conocida como Robusta (FNC, 2014).

Tabla 1

Aspectos botánicos del café

Familia	Género	Especies (entre otras)	Variedades (ejemplos)
Rubiaceae	Coffea	Arabica	Typica
		Canephora	Robusta
		Liberica	

Fuente: Adaptado de “Aspectos botánicos” por ICO, 2018, International Coffee Organization.5 de diciembre, 2019. Recuperado de http://www.ico.org/es/botanical_c.asp?section=Acerca_del_caf%E9

El café arábica (*Coffea arabica* L.) supone más del 60% de la producción mundial, las otras dos especies que se cultivan en mucha menor escala son el café Libérica (*Coffea liberica*) y el café Excelsa (*Coffea dewevrei*) (ICO, 2018).

Los cafetos son plantas cuyo tamaño va desde pequeños arbustos hasta árboles de tamaño considerable, cuya madera es dura y densa, con inflorescencia pareadas, flores hermafroditas de corolas blancas o ligeramente rosadas. El fruto es una drupa indehisciente formada por dos semillas y con pulpa azucarada (Cenicafé, 2013).

La morfología del café presenta ciertas diferencias entre variedades y según el ambiente en el que se desarrollan, sin embargo, de manera general pueden mencionarse las siguientes características:

- Raíz: el cafeto tiene una raíz principal que penetra verticalmente en suelos sin limitaciones físicas, hasta profundidades de 50 cm, de la cual salen otras raíces gruesas que se extienden horizontalmente y sirven de soporte a las raíces delgadas o absorbentes, llamadas también raicillas (FNC, 2014).



- Tallos y ramas: generalmente el árbol de café se compone de un solo tallo o eje central, nudos y entrenudos (Cenicafé, 2013). Poseen dos tipos de brotes, pueden ser tanto ortotrópicos, que crecen verticalmente y comprenden el tallo principal y los chupones; como plagiotrópicos, que crecen horizontalmente y comprenden las ramas primarias, secundarias y terciarias.

Es importante señalar que, las ramas primarias no se pueden renovar, por lo que, al perderse una rama primaria, el cafeto pierde una zona muy importante para la producción de frutos. La cosecha del cafeto se produce casi en su totalidad en las ramas nuevas, de manera que, a mayor número de ramas nuevas, mayor será la cosecha futura (FNC, 2014).

- Hojas: son opuestas y alternas en el tallo ortotrópico y en ramas plagiotrópicas son opuestas. El color varía entre variedades, por lo general son de color verde oscuro y brillante en la parte superior y verde claro en el interior. Las hojas nuevas presentan una coloración bronceada o verde claro y después toman su coloración definitiva (Rodríguez, Munro y Hugo, 2009).
- Flores: indica la producción y distribución de la cosecha a lo largo del año (Cenicafé, 2013). Se localizan en los nudos de las ramas, hacia la base de las hojas, en grupos de 4 o más. La cantidad de flores presentes en un momento determinado, depende de la cantidad de nudos formados previamente en cada rama (FNC, 2014).
- Frutos: es una drupa globular u ovoide de peciolo corto y se le denomina cereza (Cenicafé, 2013). Cuando maduran los frutos son rojos o amarillos, con dos semillas, en ocasiones solo uno de los óvulos se fecunda y se desarrolla originando una semilla de forma redonda que se le conoce como café caracol (Rodríguez *et al.*, 2009).



- Semillas: son oblongas, plano convexas, representan del 35 al 38% del fruto del café, están constituidas por el endocarpio o pergamino, una película plateada o perisperma, endospermo cotiledón o embrión (Rodríguez *et al.*, 2009).

2.1.3.1. Fenología del cultivo.

La fenología del cultivo define las diferentes etapas de desarrollo (tabla 2) que presentan durante el ciclo de vida de una planta en relación a las condiciones ambientales. En el café se pueden identificar dos: el período juvenil y la fase adulta, siendo ambos el crecimiento vegetativo continuo (Rodríguez *et al.*, 2009).

Tabla 2

Fenología del cultivo

Etapa	Fase	Duración
Semillero	Germinación	50 a 60 días,
	Soldadito	65 a 70 días
	Mariposa	85 a 95 días
Vivero	Trasplante de plántulas en la fase de mariposa hasta obtener plantas con tres o más cruces	1 año
	Trasplante de plantas al lugar definitivo	2 años
Planta reproductiva	Crecimiento acelerado	Hasta los 6 años
	Crecimiento menor	Después de los 6 años
	Máximo crecimiento vegetativo anual	Marzo a septiembre
	Mínimo crecimiento vegetativo anual	Octubre a febrero



Etapas	Fase	Duración
	Crecimiento foliar (hojas) máximo	Marzo a junio
	Crecimiento foliar mínimo	Junio a noviembre
	Floración	Mayo a junio
	Crecimiento del fruto	Junio a octubre
	Cosecha	Noviembre a marzo

Fuente: Adaptado de “Paquete tecnológico para el cultivo del café orgánico en el estado de Colima” de Rodríguez, C., Munro, D., y Hugo, V., 2009, Colima, CEFCAFÉ.

2.1.3.2. Condiciones edafoclimáticas para el cultivo de café.

Las condiciones edafoclimáticas establecen una serie de actividades considerando el sistema del suelo, planta y clima que le permitirán obtener producciones de buena calidad y cantidad (Solórzano, 2005). Es importante señalar que cada variedad puede necesitar leves variaciones de las condiciones de cultivo y manejo agronómico que representarán la importancia y selección de propagación de cada una en base a su adaptación ante diferentes factores edafoclimáticos. Entre las condiciones necesarias se describen de manera general a continuación:

- **Altitud:** incide en forma directa sobre los factores de temperatura y precipitación. La altitud óptima para el cultivo de café se localiza entre los 1 700 m.s.n.m. (CICAFE, 2011).
- **Precipitación:** se considera apropiada para el cultivo una cantidad de lluvia comprendida entre los 1 800 y los 2 800 mm anuales, con una buena distribución en los diferentes meses del año. Se requieren por lo menos 120 mm al mes (FNC, 2014).
- **Temperatura:** el promedio anual favorable para el cafeto se ubica entre los 17°C a 23°C (CICAFE, 2011).
- **Humedad relativa:** debe ser inferior al 85% (CICAFE, 2011).
- **Viento:** fuertes vientos inducen a la desecación y al daño mecánico de tejido vegetal, asimismo favorecen la incidencia de enfermedades, por lo cual, se deben escoger



terrenos protegidos del viento o establecer rompevientos para evitar la acción de este (CICAFFE, 2011).

- Brillo solar y nubosidad: debe ser entre 1600 y 2000 horas de sol al año (4,5 a 5,5 horas de sol al día) (FNC, 2014).
- Suelo: el terreno debe ser plano o poco inclinado y protegido del efecto de los vientos. Los suelos deben ser fértiles, profundos y con buen drenaje. Debe existir disponibilidad de agua para riego y para preparar las aplicaciones de fungicidas y foliares (CICAFFE, 2011).

En Nicaragua se cultiva café en zonas bajas localizados principalmente en la región del Pacífico, con alturas promedios de 200 - 600 m.s.n.m., precipitaciones anuales de 1 400 a 1 600 mm y temperatura promedio de 28°C, los suelos se caracterizan por ser profundos, moderadamente llanos. Las zonas altas se localizan en las regiones norte y central del país ubicadas de 600 a 1 500 m.s.n.m., con suelos de topografía irregular y profundidades variables, temperaturas promedio entre 20 y 22 °C, (Duarte, 2015).

2.1.4. Genética del café.

Según el número cromosómico el género *Coffea* se divide en dos grupos, el grupo grande de las especies diploides ($2n=22$ cromosomas) conformado por *C. canephora*, *C. liberica*, *C. stenophylla*, *C. racemosa*, entre otros y el grupo de los tetraploides ($2n=4x=44$ cromosomas) conformado por *C. arabica*. Esta última es una especie alotetraploide producto de una cruce interespecífica natural entre dos especies diferentes con un número básico de cromosomas $x=11$ (Cárdenas, 2007a), además el genoma del cloroplasto del café es una molécula de ADN circular de 155 189 pb con una estructura típica de cuatro partes como la mayoría de los cromosomas de cloroplastos de plantas terrestres (Samson *et al.*, 2007).

Los recursos fitogenéticos del café Arábico que poseen un genoma común están conformados por 103 especies descritas en el género *Coffea* y las especies menos conocidas del género *Psilanthus* (Cárdenas, 2007a). Parte de los recursos genéticos se encuentran conservadas en los bancos de germoplasma de café en el mundo, los



principales bancos están localizadas en Camerún, Colombia, Costa Rica, Etiopía y Madagascar (Engelmann, Dulloo, Astorga, Dussert y Anthony, 2007).

El material conservado *ex situ* en los bancos de germoplasma representan la base genética del café más accesible para trabajos de mejoramiento genético, la mayoría proviene principalmente *C. arábica* y *C. canephora*, y en escala muy limitada de *C. liberica* (León, 2000).

Esta estrecha base genética también puede ser atribuida a su origen reciente, más de un millón de años, a su evolución y reproducción por semillas producto de la autofecundación (Anthony, Astorga y Berthaud, 1999). Pero en América Latina, la estrecha base genética de los cultivares actuales se debe a la historia particular de su diseminación a partir de problemas de establecimiento de cafetos en países transitorios fríos como Holanda y Francia conllevando a una reducción enorme de la variabilidad original (Cárdenas, 2007).

Según León (2000), las principales fuentes de variación natural son las mutaciones y las hibridaciones intra e interespecíficas, estas últimas cumplen un papel preponderante para la recombinación de genes de resistencia a enfermedades, como *H. vastatrix*, debido a la coevolución patógeno-hospedante en ambientes naturales. Dado este contexto, los materiales silvestres y semi-silvestres constituyen importantes fuentes de diversidad genética del café, principalmente para América Latina (Cárdenas, 2007).

2.1.4.1. *Coffea arabica*.

2.1.4.1.1. Taxonomía.

Tabla 3

Taxonomía de la planta de café (Coffea arabica L.)

Reino	Plantae
Tipo	Espermatofitas
Subtipo	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas



Subclase	Gamopétalas inferiorvariadas
Orden	Rubiales
Familia	Rubiáceas
Género	Coffea
Especie	Arabica

Fuente: Adaptado de “Cultivo y beneficiado del café” por Alvarado, M., y Rojas, G., 2007, 3ra ed. EUNED.

2.1.4.1.2. Variedades del café *C. arabica*.

El *Coffea arabica* fue descrito por primera vez por Linneo en 1753. Las variedades más conocidas son Typica y Bourbon, pero a partir de éstas se han desarrollado muchas cepas y cultivares diferentes, como son Caturra (Brasil, Colombia), Mundo Novo (Brasil), Tico (América Central), San Ramón enano y Blue Mountain (Jamaica). El cafeto normal de Arábica es un arbusto grande con hojas ovaladas verde oscuro. Es genéticamente diferente de otras especies de café, puesto que tiene cuatro series de cromosomas en vez de dos (Clifford y Willson, 1985).

El *C. arabica* es a menudo susceptible a plagas y enfermedades, por lo cual la obtención de resistencia es una de los principales objetivos de los programas de mejora vegetal. Además se cultiva en toda Latinoamérica, en África Central y Oriental, en la India y un poco en Indonesia (Clifford y Willson. 1985).

El *C. arabica* es un tetraploide (44 cromosomas) y se autopoliniza. Históricamente, el Typica se cultivó en Latinoamérica y Asia, mientras que el Bourbon llegó a Sudamérica y más tarde a África Oriental a través de la colonia francesa de Bourbon (Reunión). Debido a que el *C. arabica* se autopoliniza, esas variedades tienden a permanecer genéticamente estables. No obstante, se han cultivado por su propio valor mutaciones espontáneas que mostraban características deseables, además de explotarse con fines de fertilización cruzada (Clifford y Willson, 1985).

Según ICO (2018), entre los mutantes se encuentra el Caturra (una forma compacta de borbón), Maragogipe (typica mutante con grandes granos), San Ramón (un typica enano Purpurascens, con hojas púrpura). Además, se han desarrollado cultivares para



que den rendimiento económico máximo en condiciones regionales específicas tales como clima, suelo, método de cultivo y preponderancia de plagas y enfermedades.

Algunos de los cultivares más conocidos son:

- Blue Mountain: cultivado en Jamaica y Kenia.
- Mundo Novo: cruce de typica y bourbon, originalmente cultivado en Brasil.
- Kent: originalmente desarrollado en la India, muestra alguna resistencia a las enfermedades.
- Catuaí: desarrollado como híbrido de Mundo Novo y Caturra, se caracteriza por sus cerezas amarillas o rojas: Catuaiamarelo y Catuaivermelho, respectivamente.

En Nicaragua según Cuadras (2016):

El 87% del café producido en Nicaragua es café arábico, cultivado en su gran mayoría bajo sombra en la región norte central del país. La variedad de cultivo típica de Nicaragua es mayoritariamente la caturra con el 72% del total de la producción. El 28% restante es café Bourbon, Pacas Catuaí, Catimores, Maragogype y Pacamara. (p. 6)

2.1.4.1.3. Enfermedades y plagas.

La incidencia de plagas en el cafeto es muy variada, las palomillas, escamas y nematodos atacan el sistema radical; los cortadores y taladores, el tallo y las ramas; los cortadores y chupadores, las hojas y la broca, algunos frutos. Otro factor es la edad de la planta ya que las más jóvenes posiblemente son más susceptibles a las escamas que las adultas. Además, se ven influenciadas por las características varietales, siendo los arábigos compactos más susceptibles a las escamas, áfidos, palomillas y nematodos, que el *Canephora*, demostrando cierta tolerancia a plagas del sistema radical (InfoAgro, 2019).

Por consiguiente, el diagnóstico de plagas y enfermedades es una etapa fundamental en el ámbito de la fitoprotección y para realizarlo se deben analizar las condiciones en que se presenta el problema, en especial el manejo del cultivo así como también, las



interacciones planta-agente causal-organismos benéficos-condiciones agroclimáticas (Rodríguez *et al.*, 2009).

En particular, en los agroecosistemas cafetaleros, la presencia de una vegetación formada por los cafetos, árboles, arbustos y plantas arvenses crea condiciones favorables para el incremento en la diversidad de la fauna, logrando con ello, sistemas relativamente estables en los cuales la presencia de plagas y enfermedades es mínima si se compara con los monocultivos (Anacafé, 2019).

2.1.4.1.3.1. Enfermedades.

Entre las enfermedades de mayor importancia económica se encuentran:

- **Roya del cafeto:** es ocasionada por un hongo conocido como *Hemileia vastatrix*, el cual sobrevive en la misma planta afectada, apareciendo de un año para el otro en las lesiones de hojas (Anacafé, 2019). Los primeros síntomas pueden ser observados en las hojas, como pequeños puntos cloróticos o amarillo pálido, de 1 mm a 3 mm de diámetro, luego se agrandan hasta alcanzar 2 cm observándose pústulas de aspecto de polvillo color amarillo o anaranjado que constituyen las esporas del hongo llamadas uredosporas (Anacafé, 2019).

Está ligado a los años de alta producción con epidemias severas. De manera que en cultivos susceptibles, la enfermedad ha causado pérdidas hasta del 23% de la producción acumulada de cuatro cosechas (FNC, 2014). Conviene subrayar, que el principal método de manejo es sembrar material resistente a la roya (FNC, 2014).

Dado a que la roya afecta a la hoja en los procesos vitales e fotosíntesis, respiración y transpiración, genera una reducción del funcionamiento de la planta, produciendo incluso su muerte. De esta manera, puede llegar a reducir el rendimiento de la plantación afectando el llenado y maduración del fruto (Campos, 2015).

- **Mancha de hierro:** es causada por el hongo *Cercospora coffeicola*. Afecta el cafeto durante todos sus estados de desarrollo, desde las hojas cotiledonares hasta los frutos (FNC 2014). Aparece tanto en la época seca en donde hay exceso de insolación y falta de sombra como en época lluviosa, cuando se caracteriza por presentar manchas oscuras y grandes en las hojas (Anacafé, 2019).



Permanentemente, causa la caída de las hojas e incrementa la producción de café pasilla, mediacara y guayaba que afectan la calidad (FNC, 2014).

- Ojo de gallo del cafeto: ocasionada por el hongo *Mycena citricolor*. Se manifiesta en lugares donde hay alta humedad y temperatura. La enfermedad puede ser reconocida en el campo por manifestar manchas redondas en las hojas de aproximadamente 0,5 cm de diámetro, de coloración blanquecina. Posteriormente, hay caída de hojas con la consecuente reducción de la producción (Anacafé, 2019).

2.1.4.1.3.2. Plagas.

- Broca del café (*Hypothenemus hampei* Coleoptera: Scolytidae): es un gorgojo del tamaño de la cabeza de un alfiler por lo que no es fácil distinguirla a simple vista. Ataca el fruto del cafeto en cualquier estado de desarrollo, es decir, frutos verdes, maduros y sobre maduros. (INATEC, 2016).

Es la plaga de mayor importancia económica que afecta al cultivo del café. Entre los principales daños que causa se registran las caídas de las cerezas, los frutos perforados pueden ser atacados fácilmente por enfermedades, además, cuando la broca ataca frutos maduros y pintones se produce café de poco peso o café vano (INATEC, 2016).

- Minador (*Perileucoptera coffeella*): es la larva de una mariposa pequeña que ataca la hoja en la cual hace galerías o minas (InfoAgro, 2019). Su ataque es más grave en condiciones de alta humedad y altas temperaturas, es decir, en cafetales situados por debajo de 1300 m.s.n.m., en zonas con humedades relativas entre 75% y 85%, así como temperaturas entre 22 y 25° C, afectando plantaciones de café de todas las edades, a plena exposición solar y bajo sombrero regulado (INATEC, 2016).
- Nematodos (*Meloidogyne* sp., *Pratylenchus coffea*, *Rotylenchulus* sp.): son organismos microscópicos que tienen forma de gusanos delgados, alargados, cilíndricos e incoloros. Atacan el cuello y las raíces del café, produciendo atrofias en éstos. Entre los síntomas se observan nudos en las raíces atacadas, los árboles muestran amarillamiento y crecimiento reducido de manera que no reaccionan favorablemente a la aplicación de abonos (INATEC, 2016).



2.1.4.1.4. Fitomejoramiento.

La influencia de las enfermedades y plagas en las variedades del istmo centroamericano tanto a nivel económico como ambiental, siendo de mayor impacto las afectaciones causadas por la roya, ha promovido el fitomejoramiento como medida para aumentar la productividad de las variedades susceptibles y eliminar el riesgo de las pérdidas de cosechas.

De modo que, para reducir el impacto generado por la roya se inició la creación de diversas variedades a partir de *C. arabica*, *C. liberica* y *C. canephora* (Robusta), siendo esta última la más utilizada para crear variedades resistentes. Particularmente, el Híbrido de Timor originario del cruce espontáneo entre la variedad Typica de *C. arabica* y Robusta de *C. canephora*, ha generado derivados dentro de los cuales se encuentran las descendencias del cruzamiento entre el mutante natural Caturra Rojo y el Híbrido de Timor conocidas genéricamente como “Catimores” y las del cruzamiento entre Villa Sarchí y el Híbrido de Timor como “Sarchimores” (Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019).

El germoplasma disponible del Híbrido de Timor proviene de prospecciones en la isla de Timor, realizadas por el CIFC (Centro de Investigación de la roya del café, por sus siglas en portugués) en Oeiras, Portugal (Bertrand y Rapidel, 1999). A partir de los intercambios realizados del material entre CIFC, Brasil, Colombia y países centroamericanos, en los años 1971-1973 se introdujeron en Nicaragua del CATIE Turrialba, Costa Rica y de la Estación de Introducción de Plantas de Glendale, Maryland U.S.A., 19 cultivares de café con diferentes factores de tolerancia a Roya, dando inicio a las actividades de Fitomejoramiento (IICA-PROMECAFE, 1993).

2.1.4.2. Variedad Catrenic.

En 1978, con la cooperación de PROMECAFE se introdujeron en Centroamérica varias descendencias de los tres orígenes de Híbrido de Timor: CIFC 832/1, CIFC 832/2, CIFC 1343. Todos estos orígenes tienen alta resistencia contra la roya. El CIFC 832/1 da origen a los Catimores (Bertrand y Rapidel, 1999).



De las descendencias introducidas por PROMECAFE a partir de 1979, se identificó en Honduras la introducción IHC-152, descendencia T5175 (F3 de CIFC Hw26/13) que posteriormente dio origen a la variedad IHCAFE90, de la cual, en Nicaragua se encuentra la variedad Catrenic cercana genéticamente a la anterior (Bertrand y Rapidel, 1999).

A través de varias selecciones realizadas en el Centro Experimental del Café del Pacífico, se logró obtener hasta la fecha este material promisorio denominado Catrenic (IICA-PROMECAFE, 1993), cercana genéticamente a Catimor T5175 introducido en 1971, presentando uniformidad fenotípica, buena producción, buenas características y resistencia a Roya.

Por lo cual, el origen genético de Catrenic es a partir de un cruce realizado en el CIFC entre los materiales CIFC 19/1 Caturra rojo por CIFC 832/1 Híbrido de Timor, cruzamiento denominado CIFC Hw26 (Bettencourt, 1985; citado por Baylón, 2020). Fue introducido a Nicaragua en el año 1971 de Glendale, Maryland, EE.UU. en generación F2 y que, a través de selección individual, realizada por el centro se logró obtener un material con buenas características agronómicas (Baylon y Pizzi, 1994).

Según Baylón (2020), a este material se le denominó Catimor Revolución Nicaragua (Catrenic) en 1985 y registrada como variedad en el 2000 luego de que sus características fenotípicas se estabilizaran en las generaciones F5 y F6. En este mismo año se liberó como variedad comercial a disposición de los productores.

Según Bolaños (2005), las plantas de la variedad Catrenic se caracterizan por hojas de color verde oscuro, brotes bronceados y frutos rojos. Necesita de buen manejo agronómico para expresar plenamente su potencial, presenta alta precocidad, es recomendado para zonas bajas y se desarrolla bien a alturas de los 1000 m.s.n.m.

Paralelamente Cortez y Tercero (2014), mencionan que se caracterizan por su uniformidad en el porte intermedio (mayor a Catuai), buen vigor entrenudos cortos y bandolas largas que producen palmillas secundarias y terciarias. El rendimiento de la variedad, en condiciones del Pacífico de Nicaragua, es de 14 a 24 qq de café oro/mz (1 qq = 46 kg). Las características organolépticas de Catrenic son buenas. Las evaluaciones



realizadas en diversos ensayos señalan que 80 a 85 % de los granos tienen el tamaño 16/64. Entre las características de la variedad se encuentran las mencionadas en la tabla 4.

Tabla 4

Características de la variedad de café Catrenic

Origen (Linaje)	Catimor desarrollado en Nicaragua cruce Híbrido de Timor 832/1 x Caturra
Descripción genética	Introgresión (Catimor)
Características agronómicas	Entrenudos cortos, porte intermedio, ramificación secundaria y terciaria, brote bronceado y verde
Cualidades sobresalientes	Buena capacidad productiva (mayor que Caturra y Catuaí), excelente vigor híbrido, tolerancia a roya, buena taza (como Caturra y Catuaí)
Otras características	Adaptabilidad a diferentes zonas, uniformidad fenotípica.

Fuente: Adaptado en base a “*Varietades de café*” de Contreras, P., 2013, Managua, 69 y “*Genealogía y Obtentores de la primera variedad de café (Coffea arabica L.) Catrenic seleccionada en Nicaragua*” de Baylón, Marisol, 2020. LA CALERA 20 (34): 29-34.

Según el informe del CIAT, de acuerdo a la altitud se debe escoger Catrenic para las zonas bajas y es recomendada para zonas de elevada incidencia de roya junto a Lempira, Catimor y Centroamericano. De igual manera, el aumento de la producción con variedades que siguen manteniendo una calidad aceptable y son de alta productividad (híbridos como Catuaí, Catrenic, Pacamara, entre otros), hace referencia a una de las estrategias para mantener un efecto positivo en el medio socioeconómico de la producción, aunado al cultivo de variedades de muy buena calidad en taza para alcanzar buenos precios pese a tener baja producción (rescatando variedades desplazadas como Typica y Bourbon, además de otras que se señalan de buena calidad como Maragogype, Villa Sarchí, Venecia, etc.) (Läderach y Baca, 2013).



2.1.5. Marcadores genéticos.

Un marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física conocida en un cromosoma. Dichos segmentos se encuentran cerca en un cromosoma y tienden a heredarse juntos, por lo cual se utilizan para rastrear la herencia de un gen cercano que aún no ha sido identificado, pero cuya localización aproximada es conocida (NHGRI, 2019).

A su vez pueden definirse como caracteres que presentan polimorfismo detectable en individuos de una población segregante y un tipo de herencia predecible según las leyes de Mendel (Martínez, Helguera, y Carrera, 2010). Según Hopp (2018), los marcadores moleculares permiten establecer diferencias (*polimorfismos*) entre dos individuos diferentes (*genotipos*) pertenecientes a la misma especie (o a especies emparentadas).

Por consiguiente, se usan para marcar el comportamiento de un gen o la herencia de una característica particular, como puede ser la presencia o ausencia de la característica aportada por el marcador molecular. Otra aplicación es en el mapeo genético como primer paso para encontrar la posición e identidad de un gen desconocido (suponiendo que se conocen regiones contiguas que se heredan juntas). Pueden ser Nucleares, Mitocondrial, Ribosomal, o cualquier elemento extra cromosomal presente en la especie de estudio (CeCalcula, 2013).

De acuerdo a Martínez *et al.*, (2010), un marcador ideal debe ser:

- Altamente polimórfico o variable dentro y entre especies.
- De herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes).
- Insensible a los efectos ambientales.
- De rápida identificación y simple análisis.
- De posible detección en los estadios tempranos del desarrollo.

En los análisis genómicos, se han utilizado varios tipos de marcadores: morfológicos, isoenzimas, proteínas y marcadores basados en ADN. Estos últimos se caracterizan por



ser simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen.

De ahí que los marcadores se clasifiquen en:

➤ **Marcadores morfológicos:** son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño y altura (Martínez *et al.*, 2010). En los procesos de adaptación, la morfología se relaciona con la ecología (ecomorfología) que investiga las relaciones entre la forma de los vegetales y su ambiente.

Es importante señalar, que no todas las formas o caracteres pueden describir consistentemente las plantas, hay que elegir caracteres conocidos como descriptores, codificadores o marcadores morfológicos, es decir, características morfológicas que se manifiesten más o menos establemente bajo diferentes condiciones de medio ambiente (Gómez, 2014).

➤ **Marcadores moleculares:** este tipo de caracterización explora polimorfismos en determinadas moléculas proteicas y en marcadores de ADN para medir la variación genética a nivel poblacional (FAO, 2009). En particular, permite determinar el grado de diversidad genética y su distribución, entre y dentro de poblaciones de una determinada especie; así como, el establecimiento de relaciones filogenéticas (M&O Consulting, 2009).

En efecto, es necesario subrayar que los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además puede detectarse fácilmente. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo, y se pueden aplicar usando a todo el individuo o sólo parte de él (Solís y Andrade, 2005).

La principal razón para usar caracteres moleculares es que son universales. Por ejemplo, las regiones del genoma nuclear de genes ribosomales son muy útiles para reconstrucciones filogenéticas y donde los caracteres morfológicos presentan limitación en resolución (CeCalcula, 2013).



Se habla de marcadores genéticos cuando se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana, por lo que es importante destacar que no todos los marcadores moleculares pueden considerarse como genéticos. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN (Solís y Andrade, 2005).

- a) Marcadores bioquímicos: incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas y constituyen la primera generación de marcadores moleculares (Solís y Andrade, 2005).
- b) Marcadores de ADN: constituyen la nueva generación de marcadores moleculares y solucionaron el problema de la carencia de marcadores que tenían las isoenzimas, pues son capaces de generar una cantidad virtualmente infinita de marcadores. Existen varias técnicas para identificar marcadores de ADN, las que se pueden agrupar en tres categorías: las de hibridación tipo Southern, las de reacción de polimerización en cadena (PCR) y las que combinan PCR o sus productos de ADN con la hibridación tipo Southern (Solís y Andrade, 2005).

Además, se encuentran: las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas son algunas de las técnicas que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares y cubrir la totalidad del genoma de un organismo.

Según Solís y Andrade (2005), dentro de la técnica de hibridación se encuentran los marcadores RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR (secuencias adyacentes que se repiten en número variable). Dentro de la metodología de PCR se encuentran los marcadores llamados RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), PCR iniciada con Microsatélites (MPPCR), AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y DAF (amplificación de huellas del ADN), entre otros (Solís y Andrade, 2005).

Finalmente, Solís y Andrade (2005) mencionan que dentro de las metodologías que combinan la PCR o sus productos de ADN más la hibridación tipo Southern, están los RAHM y RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de Microsatélites).



2.1.5.1. Ventajas y aplicaciones de los marcadores de ADN.

Los marcadores de ADN son muy ventajosos ya que no son afectados por el ambiente, permiten una detección temprana, son universales, muy abundantes, se requiere poca cantidad de ADN para los análisis y el ADN es muy estable y específico para cada individuo (huella génica). Sin embargo, son relativamente costosos, necesitan personal entrenado, equipos sofisticados y un estricto control de la contaminación (Solís y Andrade, 2005).

Según Solís y Andrade (2005), la difusión del uso de marcadores moleculares en los análisis genéticos y en el mejoramiento de plantas ha sido extremadamente rápida. Entre las principales aplicaciones se encuentra la obtención de “huellas genéticas” (fingerprinting) de individuos, variedades y poblaciones; el análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales y de mejoramiento y bancos de germoplasma; el establecimiento de relaciones filogenéticas entre diferentes individuos y especies; la construcción de mapas genéticos de alta cobertura genómica y la localización de genes de interés económico, mapeo de características de herencia cuantitativa QTL (Quantitative Trait Loci) y selección MAS auxiliada por marcadores (Marker Assisted Selection).

2.1.5.2. Selección del marcador a utilizar.

La selección de la metodología para obtener los marcadores moleculares depende de los objetivos y necesidades del estudio. Por ejemplo, para determinar la variación de una población, con un simple análisis de isoenzimas se podría obtener la información necesaria, por lo que no es recomendable emplear una técnica más costosa o complicada. No obstante, si se requiere elaborar el mapa genético de una especie, la cantidad y precisión de la información requerida es mayor, por lo que necesariamente se debe recurrir a los marcadores de ADN (Solís y Andrade, 2005).

A continuación, se debe considerar el costo en sí de la técnica que se va a desarrollar, la necesidad de personal capacitado, el equipo, los reactivos y las instalaciones de laboratorio y condiciones de seguridad que requiere cada técnica. Es siempre



recomendable analizar qué tanto trabajo previo es necesario para llevar a cabo una técnica (Solís y Andrade, 2005).

Dentro de las técnicas que utilizan marcadores de ADN para evaluar la diversidad genética, existe un conjunto de marcadores ya disponibles para detectar polimorfismos del ADN nuclear, entre los que se encuentran la técnica a utilizar denominada Microsatélites o SSR (Repetición de Secuencias Simples) y otras como RFLP (por sus siglas en inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment - Length Polymorphism) y SNP (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism), mencionadas anteriormente.

2.1.5.3. Marcadores microsatélites (Single Sequence Repeats, SSR).

Las secuencias de tipo Microsatélites (SSR o STR, Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats), muy abundantes en los genomas de eucariotas y algunos procariotas, están constituidas por unidades cortas (motivos básicos) de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces. De manera que, cada secuencia SSR se define por el tipo de unidad repetida (lo más frecuente mono, di, tri o tetra, aunque también penta o hexa-nucleótidos) y por el sitio que ocupan en el genoma (locus), (González, 2003).

Así pues, están presentes en regiones codificadoras y no codificadoras de genes, las cuales se caracterizan por tener un alto grado de polimorfismo. Sirven como un código funcional y regulatorio en el genoma eucariótico, se encuentran en regiones promotoras de los genes que ayudan a aumentar la expresión del gen (Wilches, 2004).

En particular, se trata de secuencias altamente variables, entre y dentro de individuos. Dicha variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estas diferencias en longitud surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso. Se ha estimado que la tasa de mutación en los Microsatélites varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo en tamaño es la



acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Picó y Estera, 2012).

El uso de esta técnica ha revolucionado los campos de la biología molecular, la genética cuantitativa y la genética de poblaciones, ya que a pesar de que los Microsatélites poseen altas tasas de mutación, las regiones flanqueantes están más conservadas y se emplean para la amplificación específica de los alelos de cada locus. Según Picó y Estera (2012), los SSR han sido durante muchos años los marcadores preferidos para múltiples objetivos, genética forense, test de paternidad, análisis poblacionales, estudios de diversidad e identificación varietal, construcción de mapas genéticos y estudios de asociación.

Entre las ventajas que ofrecen los microsatélites se encuentra el empleo de amplificación PCR con cebadores largos, específicos de cada locus, ya que el tejido que se utiliza no necesita ser de mucha calidad, e incluso ADN en estado avanzado de degradación es suficiente para ser analizado. Además se puede mencionar su naturaleza codominante, que permite la distinción de homocigotos y heterocigotos, su amplia distribución en el genoma, su reproducibilidad y su elevada variabilidad (multialélicos) los han convertido en uno de los sistemas de marcadores genéticos más informativos y empleados (Picó y Estera, 2012).

2.1.5.3.1. Metodología de los SSR.

Para aplicar la metodología de los SSR se debe considerar los siguientes pasos:

➤ Paso 1. Identificación de loci SSR

Según Picó y Estera (2012), la identificación de secuencias con motivos SSR se puede realizar a partir de genotecas sin embargo, debido al incremento de colecciones de secuencias disponibles en muchas especies, la identificación de estas repeticiones *in silico* a partir de bases de datos mediante ciertos programas y aplicaciones informáticas (Repeat master, Sputnik, Tandem Repeat Finder, etc.) está cobrando especial



importancia. Estas herramientas pueden detectar distintos tipos de Microsatélites tales como:

- a) Microsatélites perfectos: repeticiones en un número mínimo de unidades sin interrupción y sin repeticiones adyacentes (CACACACACACACACACA).
- b) Microsatélites compuestos: dos o más repeticiones con un número mínimo de unidades repetidas ininterrumpidas (CACACACACACACACAGAGAGAGAGA GAGAGAGA).
- c) Microsatélites interrumpidos: repeticiones ininterrumpidas con un número mínimo de repeticiones y separadas por un máximo de 4 pares de bases (CACACA CACACACACACACATTTTCACACACACACACACACA).

Cabe señalar, que los SSR pueden encontrarse tanto en secuencias codificantes como no codificantes, pero el tipo de unidades repetidas y el número de repeticiones puede variar. Picó y Estera (2012) menciona que se pueden clasificar según el número de pares de bases:

- a) Mono (CCCCCCCC o AAAAAA)
- b) Di (CACACACACA)
- c) Tri (CCA CCA CCA CCA)
- d) Tetra (GATA GATA GATA GATA GATA GATA GATA GATA GATA).

➤ Paso 2. Diseño de Primer o cebadores

A pesar de que los Microsatélites poseen altas tasas de mutación, las regiones flanqueantes están más conservadas y por ello se usan para la amplificación del locus correspondiente en los distintos individuos de la especie. La transferencia de cebadores entre especies sólo es posible cuando se trabaja con taxones cercanos, pertenecientes al mismo género o a géneros separados recientemente (Picó y Estera, 2012).

De manera que, una vez detectado el SSR en la secuencia, el siguiente paso es el diseño de cebadores para amplificar la región que lo contiene, para lo cual existen



programas libres como “primer 3” donde es posible manipular los parámetros como rango de tamaños del amplicón, tamaño de los oligos, temperatura de fusión o (T_m), porcentaje de Guanina y Citosina, así como también la penalización de la posibilidad de formación de estructuras secundarias entre los oligos (Picó y Estera, 2012).

➤ Paso 3. Visualización de SSR e interpretación

Tras la amplificación del fragmento que contiene el SSR, se procede a la separación y visualización de estos fragmentos. Entre las diversas metodologías de visualización y la interpretación de resultados se encuentran:

- a) Electroforesis en gel de agarosa: Ciertos alelos SSR con suficiente diferencia de tamaño pueden ser visualizados mediante un simple gel de agarosa con la concentración óptima (2-3%) y posterior tinción con bromuro de etidio (Picó y Estera, 2012).
- b) Electroforesis en geles de poliacrilamida: En otros casos se opta por geles con mayor capacidad de resolución, como los geles de poliacrilamida. La tinción posterior puede realizarse con sales de plata, pudiendo conservar el gel mediante procedimientos especiales, o bien se pueden emplear cebadores marcados con P32 (radiactividad) o con los fluoróforos IRD-700 e IRD-800, para su visualización en analizador de fragmentos LI-COR (Picó y Estera, 2012).

Entre otras técnicas se encuentran a su vez, la electroforesis capilar (analizador de fragmentos) y la detección por HRM. La primera utiliza diferentes fluorocromos para el marcaje de cebadores permitiendo la detección por emisión de fluorescencia de varios productos de PCR, en cambio la segunda implica la desnaturalización gradual de los amplicones y la detección de pequeños cambios en la fluorescencia emitida gracias al uso de fluoróforos de unión al ADN de doble cadena al aumentar la temperatura (Picó y Estera, 2012).



2.1.5.3.2. Marcadores morfológicos.

Como se mencionaba, el uso de marcadores morfológicos constituye una herramienta útil para numerosos estudios en cuanto a variabilidad genética de una o más especies. Tal es el caso de la mayoría de las plantas cultivadas con importancia económica, las cuales tienen sus propios patrones de identificación, caracterización y evaluación, que se han logrado establecer mediante diferentes estudios, permitiendo conocer la variabilidad de los caracteres dentro y entre plantas; de tal forma que se ha llegado a seleccionar todas aquellas características cualitativas y cuantitativas que son más útiles y fáciles de interpretar para la descripción de los individuos en una población (Arciniegas, 2005).

Así pues, la caracterización se define como la descripción de la variación que existe en una colección de germoplasma y que permite diferenciar a las accesiones de una especie, sea en términos de características morfológicas y fenológicas de alta heredabilidad o características cuya expresión es poco influenciada por el ambiente (Abadie y Berretta, 2001).

En particular, para la caracterización morfológica se utilizan descriptores que deben reunir las siguientes características como menciona (Abadie y Berretta, 2001):

1. Ser fácilmente observables.
2. Tener alta acción discriminante.
3. Baja influencia ambiental, lo que permite en algunos casos registrar la información en los sitios de colecta.
4. Ser uniformes, ya que la uniformidad de los descriptores es un requisito para que la caracterización tenga un valor universal, de ahí que se empleen listas de descriptores bien definidos y rigurosamente probados que simplifican considerablemente todas las operaciones de registro de datos, actualización, modificación, recuperación de información, intercambio, análisis y transformación de datos.

Existen diversas instituciones que han propuesto listas de descriptores morfológicos, así como las directrices para la identificación y evaluación del germoplasma de café,



definiendo las características del género *Coffea* dentro de los caracteres morfológicos, como lo es IPGRI, que tiene la misión de proveer la evidencia científica, prácticas de manejo y opciones de políticas para usar y salvaguardar la biodiversidad agrícola para lograr una seguridad alimentaria y nutricional global sostenible (Biodiversity International, 2018).

De igual manera se encuentra UPOV, que proporciona y promueve un sistema eficaz de protección de variedades vegetales, con el objetivo de fomentar el desarrollo de nuevas variedades de plantas, en beneficio de la sociedad (UPOV, 2018). Cabe señalar, que el Convenio de la UPOV proporciona la base para que los miembros alienten el fitomejoramiento otorgando a los obtentores de nuevas variedades de plantas un derecho de propiedad intelectual: el derecho del obtentor (UPOV, 2018).

2.1.5.4. Variabilidad genética.

La variabilidad genética de una especie está conformada por la suma de todos los efectos evolutivos y del ambiente sobre los genes de sus diferentes miembros. Dichos efectos pueden o no expresarse en características visualmente identificables, las cuales son evaluadas y cuantificadas, pueden ser características responsables de la morfología y arquitectura de la planta, características relacionadas con el manejo agronómico y producción, así como también las que pueden ser detectables solo a través de reacciones a estímulos del medioambiente (Franco y Hidalgo, 2003).

Por otro lado, se encuentra la variabilidad que no es detectable a simple vista, denominada caracterización molecular debido a que parte de la identificación de productos o funciones internas de la célula (Franco y Hidalgo, 2003). En este caso, existen estadísticos que aprecian diferentes aspectos de la variabilidad permitiendo cuantificar y comprender esta variable (González, 2011), utilizando varios de ellos de manera complementaria como frecuencias alélicas, heterocigosidad, índices de diversidad genética, índices de fijación y coeficientes de diferenciación, entre otros. De modo que, Franco e Hidalgo (2003) señalan que es necesario identificar el nivel de

Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 2018-2020



variabilidad que se intenta medir o describir para elegir las herramientas, métodos estadísticos y técnicas de laboratorio que permitan analizar los datos resultantes.



2.2. Antecedentes

En base a la importancia del rubro las investigaciones científicas desarrolladas en su mayoría a nivel internacional, parten de la caracterización de variedades y especies para el mejoramiento del rubro, algunas organizaciones como IHCAFÉ y el CATIE, han generado un sin número de investigaciones referentes al rubro, sin embargo en el país, hasta el momento el desarrollo de estas investigaciones han aumentado lentamente.

Internacional

En 2007, Cárdenas realizó una investigación en el CATIE basada en la “*Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (Coffea arabica* L.) del CATIE”, para conocer la estructura fenotípica de la colección y la variabilidad de las características de interés agronómico presentes en las accesiones. En la caracterización agromorfológica de las 73 accesiones evaluadas se encontraron que existen tres grupos fenotípicos diferentes para los 23 descriptores evaluados, resultando más discriminantes las características morfológicas. Por otro lado, la evaluación de las accesiones por incidencia a enfermedades y plagas, en condiciones de campo, reveló que ocho accesiones presentaron menos del 1% de incidencia de roya, 13 accesiones con ausencia total de síntomas de ojo de gallo y seis accesiones con menores porcentajes de daño por broca (25% a 50%) (Cárdenas, 2007).

En el 2010, los investigadores Vieira, Von, Carvalho, Esselink y Vosman, trabajaron en el “*Desarrollo de marcadores microsatélites para identificar variedades de Coffea arabica brasileña*” (traducido del inglés), utilizando 127 marcadores SSR para analizar similitud genética en 25 variedades de *Coffea arabica*, conformadas por diecinueve cafés brasileños comercialmente importantes y seis híbridos interespecíficos de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* y *Coffea liberica*. Así pues, obtuvieron 52 marcadores SSR nuevos derivados de bibliotecas enriquecidas con microsatélites, 56 diseñados en base la secuencia SSR de café, disponibles en bases de datos públicos, 6 publicados y 13 marcadores microsatélites cloroplásticos universales. Sólo 22 fueron polimórficos, estos detectaron 2-7 alelos por marcador, un promedio de 2,5 (Vieira, Von Pinho, Carvalho,



Esselink y Vosman, 2010). Es importante señalar que entre estos marcadores se encuentran los diez que se utilizaron para la presente investigación.

En el 2017, Sánchez realizó una “Evaluación de microsatélites para la identificación del germoplasma de especies del género *Coffea* en Costa Rica” analizando 55 muestras de *Coffea* con 14 marcadores (10 SSR y 4 EST-SSR). Las muestras fueron divididas en 2 grupos: las arábicas (variedades e híbridos) (n=52) y las no arábicas (n=3), en las cuales se encontraron 64 alelos diferentes para las muestras de café arábico mientras que en las otras especies se encontraron 49 alelos. En otras palabras, las muestras de café no arábico presentaron mayor variación genética y mayor polimorfismo que las muestras de café arábico; concluyendo, que el conjunto de marcadores utilizados es altamente polimórfico y son efectivos al permitir diferenciar claramente entre las muestras de arábicas y no arábicas (Sánchez, 2017).

En el 2019, Ricarte desarrolló una “Caracterización genética de tres variedades de *Coffea arabica* L. (Caturra, Pache y Nacional) en seis parcelas de la provincia de Moyobamba, región San Martín” analizando 61 individuos de esta especie mediante 9 marcadores microsatélites, dos (M20 y M24) de los cuales se utilizaron en la presente investigación. El perfil molecular obtenido reveló diferencias entre las variedades Caturra y Pache, pero relación con la variedad Nacional. Además, encontró baja diversidad genética las fincas pertenecientes a la provincia de Moyobamba y la variación genética fue altamente significativa. Los resultados mostraron la efectividad de los microsatélites en la identificación de variedades (Flores, 2019).

Nacional

En el 2003, los investigadores Blanco; Haggar; Moraga; Madriz, Jazmín y Pavón publicaron acerca de la “Morfología del café (*Coffea arabica* L.), en lotes comerciales, Nicaragua”, cuya investigación fue realizada en el Centro de Capacitación y Servicio Regional Pacífico (Jardín Botánico), ubicado en la ciudad de Masatepe, Nicaragua, con el objetivo de caracterizar ocho lotes de café, entre los cuales se encontraba el lote Guanacaste, siendo uno de los que fueron evaluados en esta investigación. La



metodología aplicada por los investigadores contempló cinco puntos por lote y diez plantas por punto; tomando mediciones de cada uno en base a las variables: altura de planta, número de pisos, longitud de bandola, número de hojas por bandola y diámetro del tallo. Los resultados demostraron diferencias entre los lotes de café debido a la variedad sembrada y la influencia del ambiente en el que se desarrollaron, así como también del manejo agronómico aplicado, siendo la variedad Catrenic la que obtuvo mayor aumento en altura de planta y número de pisos (Blanco, Hagggar, Moraga, Madriz y Pavón, 2013).

En el 2012, los investigadores Geleta, Herrera, Monzón y Bryngelsson realizaron un estudio acerca de “*Diversidad genética del café arábica (Coffea arabica L.) en Nicaragua, estimada por marcadores de repetición de secuencia simple*” (traducido del inglés), por sus valores de conservación y reproducción, analizando 26 poblaciones representantes de 8 variedades de café en Nicaragua. A través de la utilización de marcadores de secuencia simple (SSR) se obtuvieron 12 loci de 24 alelos analizando 260 plantas individuales. La diversidad genética total de Nei (HT) y la diversidad genética dentro de la población (HS) fueron 0,35 y 0,29, respectivamente; lo cual es comparable con el que se informó anteriormente de otros países y regiones. La variedad Catimor se registró entre las variedades con mayor diversidad. La variación genética en el café nicaragüense es bastante significativa para ser utilizada en los programas de mejoramiento (Geleta, Herrera, Monzón y Bryngelsson, 2012).

En el 2020, Baylón realizó una publicación titulada “*Genealogía y obtentores de la primera variedad de café (Coffea arabica L.) Catrenic seleccionada en Nicaragua*”, en la cual describe el proceso de obtención y registro de la variedad desde la introducción de las primeras semillas de Catimor al Jardín Botánico de Masatepe, en 1971. Además, señala algunos datos relevantes característicos de la variedad, como excelente vigor híbrido, uniformidad fenotípica, tolerancia a roya, porte intermedio, entrenudos cortos, ramificación secundaria y terciaria, buena capacidad productiva (mayor que Caturra y Catuaí), buena taza (como Caturra y Catuaí) y adaptabilidad a diferentes zonas (Baylón, 2020).



2.3. Hipótesis

En base a la caracterización morfológica y molecular, los árboles de café Catrenic evaluados de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal presentan variabilidad intrapoblacional e interpoblacional.



CAPÍTULO III



3.1. Diseño metodológico

La investigación se desarrolló de febrero 2018 a enero 2020 e incluyó una fase de campo para la colecta del tejido foliar y la caracterización morfológica de los árboles de café Catrenic, seguido por una fase de laboratorio llevada a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua en la cual se realizó la caracterización morfológica y molecular de las hojas colectadas. A continuación, se describen los aspectos concernientes al diseño de la investigación en base a ambas fases.

3.1.1. Descripción del ámbito de estudio.

Para la descripción del ámbito de estudio se registraron las ubicaciones de los sitios de colecta de muestras y caracterización *in situ* de los árboles tomando las coordenadas geográficas UTM (anexo 13, tabla 3).

Ámbito o área geográfica

La fase de campo involucró dos expediciones (figura 1) para colectar las muestras de tejido foliar y la caracterización morfológica *in situ* de cada planta de café Catrenic provenientes de las fincas ubicadas en los departamentos de Masaya y Carazo.

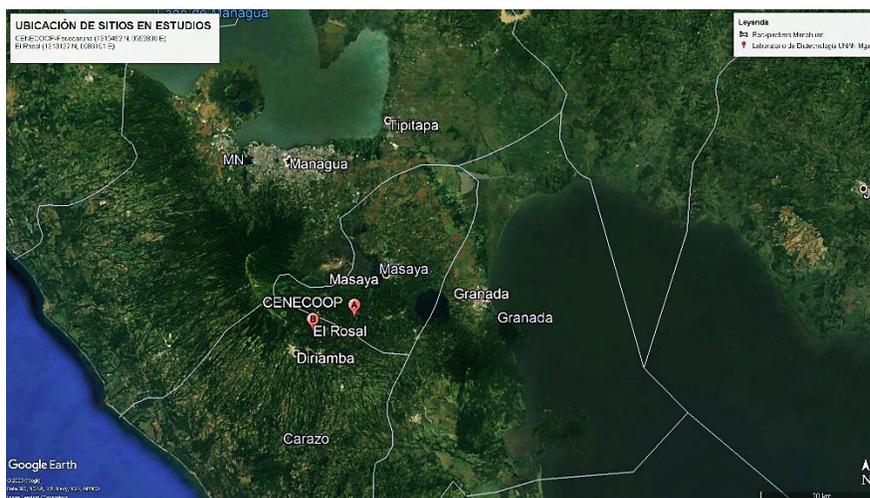


Figura 1 Ubicación de los sitios de colecta pertenecientes a las fincas CENECOOP-Fedecaruna del municipio de Masatepe, Masaya y El Rosal de San Marcos,

Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua, Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 2018-2020



Carazo según sus coordenadas geográficas UTM registradas. Fuente: Obtenido de Google Earth Pro versión 7.3.

- Expedición 1: Finca CENECOOP-Fedecaruna (1315492 N, 0592890 E) con un área de 147 000 m², con una temperatura media de 27°C a 456 m.s.n.m. Ubicada en Masatepe, Masaya. Realizada el 7 de febrero del 2018.
- Expedición 2: Finca El Rosal (1313127 N, 0586151 E) con un área de 45 500 m², con una temperatura media de 26°C a 634 m.s.n.m. Ubicada en San Marcos, Carazo. Realizada el 18 de abril del 2018.

Ámbito o área técnica

La fase del laboratorio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua (1339511 N, 0579042 E), ubicado en el Recinto Universitario Ricardo Morales Avilés (RURMA), con condiciones ambientales de 26°C de temperatura media, una humedad relativa de 69% a 162 m.s.n.m. (figura 2).



Figura 2 Ubicación del Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua según sus coordenadas geográficas UTM registradas. Fuente: Obtenido de Google Earth Pro versión 7.3.



Ámbito o área académica

En base a la metodología utilizada y los objetivos de la investigación, este estudio se vincula con el área académica de Procesos Industriales a través de la línea de Biotecnología Industrial con la temática de interés basada en el uso de técnicas biotecnológicas para la caracterización de materias primas, dentro de la clasificación de las líneas de investigación de la carrera de Química Industrial.

3.1.2. Tipo de estudio.

De acuerdo al alcance de esta investigación es descriptiva, con un enfoque cuali-cuantitativo puesto que consta de dos etapas, una de las cuales se basa en la descripción de las características cualitativas de la muestra para su caracterización morfológica y otra etapa en la que se realizan las mediciones pertinentes y el análisis estadístico necesario para la caracterización morfológica y molecular de las plantas. Además, se trata de un estudio transversal, por el período y secuencia del estudio colectando los datos en un solo momento en base a Hernández Sampieri, Fernández-Collado y Baptista Lucio, (2006). Conviene subrayar que, presenta un grado de experimentación debido a que se emplearon técnicas analíticas en la fase de laboratorio para la caracterización de los árboles evaluados y la recolección de información primaria para el análisis morfológico durante la fase de campo.

3.1.3. Población y muestra.

3.1.3.1. Población.

El universo en base al cual se desarrolla esta investigación está formado por todas las variedades de café cultivadas en las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal, presentes en las fechas de colecta de muestra para febrero y abril del 2018, respectivamente. La población experimental corresponde a cuatro lotes de café variedad Catrenic con extensión individual de aproximadamente 0,73 mz. ubicados en la finca CENECOOP-Fedecaruna y tres lotes de la misma variedad con área aproximada a 0,65 mz. en la finca El Rosal.



3.1.3.2. Muestra.

Las muestras se seleccionaron por medio de un muestreo dirigido debido a que la elección de los árboles no dependió de la probabilidad, sino de causas y propósitos relacionados con las características de la investigación (Hernández Sampieri *et al.*, 2006). Así pues, se seleccionaron 30 árboles de café Catrenic según el estado fitosanitario presentado y siguiendo las indicaciones del productor en el lote Guanacaste de la finca CENECOOP-FEDECARUNA (Masatepe, Masaya) y lote Mar de arena de la finca El Rosal (San Marcos, Carazo), para un total de 60 árboles.

De cada árbol de café se colectaron 10 hojas (jóvenes), de las cuales 6 se destinaron a la caracterización morfológica, seleccionando 5 para efectuar las mediciones y calcular tantos los valores medios como los de mayor frecuencia en relación a cada variable evaluada. Las 4 hojas restantes se destinaron para el análisis molecular.

Cabe señalar que, según las indicaciones del productor, el lote Guanacaste presentaba ocho años de edad al momento de la colecta, seleccionándose debido a que fue uno de los lotes donde se realizó el establecimiento de la variedad. De la misma manera, los lotes de la finca El Rosal se utilizaron para el desarrollo de la variedad, ya que dichas plantas son descendientes del material vegetal de la finca CENECOOP-Fedecaruna. En este caso, se seleccionó el lote Mar de arena de cinco años, que era el de menor edad con relación a los demás lotes del lugar.

3.1.3.2.1. Criterios de Inclusión.

Para plantas:

- Identificadas por el productor de la finca como pertenecientes a la variedad Catrenic.

Para hojas:

- Jóvenes para análisis molecular.
- Maduras para análisis morfológico.



3.1.3.2.2. Criterios de Exclusión.

Para plantas:

- Mal estado fitosanitario.

Para hojas:

- Presencia de plagas y enfermedades.
- Presencia de suciedad, material extraño y daño mecánico.

3.1.4. Variables y Operacionalización.

3.1.4.1. Variables Independientes.

- Variedad en estudio

3.1.4.2. Variables Dependientes.

- Características morfológicas
- Perfil molecular
- Variabilidad genética



3.1.4.3. Operacionalización de variables.

Objetivos Específicos (Columna 1)	Variable Conceptual (Columna 2)	Subvariables o Dimensiones (Columna 3)	Variable Operativa o Indicador (Columna 4)	Técnicas de recolección de datos e Información y actores participantes (Columna 5)				Tipo de variable estadística (Columna 6)	Categorías Estadísticas (Columna 7)
				Cuasi Experimento	Experimento de Campo	Experimento de Laboratorio	Experimento en la Naturaleza		
Objetivo Específico No.1 Describir las características morfológicas de la variedad Catrenic provenientes de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal.	1. Características morfológicas de la variedad Catrenic.	1. 1. Características morfológicas de la planta	1.4.1. Altura 1.4.2. Diámetro del tallo (basal) 1.4.3. Diámetro del tallo (altura al pecho) 1.4.4. Longitud de la cobertura foliar 1.4.5. Longitud de la ramificación (Ramificación productiva) 1.4.6. Longitud del entrenudo (tallo) 1.4.7. Longitud del entrenudo (de una misma bandola)		x			Cuantitativas: de razón	Continuas



Objetivos Específicos (Columna 1)	Variable Conceptual (Columna 2)	Subvariables o Dimensiones (Columna 3)	Variable Operativa o Indicador (Columna 4)	Técnicas de recolección de datos e Información y actores participantes (Columna 5)				Tipo de variable estadística (Columna 6)	Categorías Estadísticas (Columna 7)
				Cuasi Experimento	Experimento de Campo	Experimento de Laboratorio	Experimento en la Naturaleza		
			1.4.8. Longitud de bandolas 1.4.9. Ángulo de bandolas						
			1.1.10 Número de yemas productivas por bandola		x				Discretas
			1.1.1 Presencia de ramificación 1.1.2 Ramificación productiva 1.1.3 Forma del arbusto 1.1.4 Color del brote		x			Cualitativas: nominal	Politómicas
		1.2. Características	1.2.1. Longitud de la hoja		x			Cuantitativas: de razón	Continuas



Objetivos Específicos (Columna 1)	Variable Conceptual (Columna 2)	Subvariables o Dimensiones (Columna 3)	Variable Operativa o Indicador (Columna 4)	Técnicas de recolección de datos e Información y actores participantes (Columna 5)				Tipo de variable estadística (Columna 6)	Categorías Estadísticas (Columna 7)
				Cuasi Experimento	Experimento de Campo	Experimento de Laboratorio	Experimento en la Naturaleza		
		morfológicas de las hojas	1.2.2. Ancho de la hoja						
			1.2.3. Longitud del peciolo foliar						
			1.2.4. Color de la hoja joven		x			Cualitativas: nominal	Politómicas
			1.2.5. Pigmentación antocianica						
			1.2.6. Forma de la hoja						
			1.2.7. Forma del ápice de la hoja						
			1.2.8. Color del peciolo foliar						



Objetivos Específicos (Columna 1)	Variable Conceptual (Columna 2)	Subvariables o Dimensiones (Columna 3)	Variable Operativa o Indicador (Columna 4)	Técnicas de recolección de datos e Información y actores participantes (Columna 5)				Tipo de variable estadística (Columna 6)	Categorías Estadísticas (Columna 7)
				Cuasi Experimento	Experimento de Campo	Experimento de Laboratorio	Experimento en la Naturaleza		
Objetivo Específico 2 Evaluación de las características morfológicas de relevancia agroindustrial exhibidas por los árboles de café Catrenic seleccionados	2. Características morfológicas de relevancia agroindustrial	2.1. Características morfológicas de las plantas	2.1.1 Altura		x			Cuantitativa: de razón	Continua
			2.1.2 Diámetro del tallo (basal)						
			2.1.3 Longitud del tallo						
			2.1.4 Longitud de entrenudos						
			2.1.5 Número de yemas productivas		x				Discreta



Objetivos Específicos (Columna 1)	Variable Conceptual (Columna 2)	Subvariables o Dimensiones (Columna 3)	Variable Operativa o Indicador (Columna 4)	Técnicas de recolección de datos e Información y actores participantes (Columna 5)				Tipo de variable estadística (Columna 6)	Categorías Estadísticas (Columna 7)
				Cuasi Experimento	Experimento de Campo	Experimento de Laboratorio	Experimento en la Naturaleza		
Objetivo Específico 3 Establecer el perfil molecular de la variedad Catrenic utilizando marcadores microsatélites.	3. Genotipos	3.1. Tamaño de los alelos de los Marcadores microsatélites SSR	3.1.1. Número de alelos por locus 3.1.2. Tamaño alélico			x		Cuantitativa: de razón	Continuas
Objetivo Específico 4 Determinar la variabilidad intrapoblacional e interpoblacional de las muestras de Catrenic al e interpoblacional de las muestras de	4. Variabilidad intrapoblacional e interpoblacional de las muestras de Catrenic	4.1. Variabilidad intrapoblacional e interpoblacional a nivel morfológico de la planta	4.1.1. Altura 4.1.2. Diámetro del tallo (basal) 4.1.3. Diámetro del tallo 4.1.4. Longitud de la cobertura foliar 4.1.5. Longitud de la ramificación		x			Cuantitativa: de razón	Continuas



Objetivos Específicos (Columna 1)	Variable Conceptual (Columna 2)	Subvariables o Dimensiones (Columna 3)	Variable Operativa o Indicador (Columna 4)	Técnicas de recolección de datos e Información y actores participantes (Columna 5)				Tipo de variable estadística (Columna 6)	Categorías Estadísticas (Columna 7)
				Cuasi Experimento	Experimento de Campo	Experimento de Laboratorio	Experimento en la Naturaleza		
Catrenic colectadas en las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal.			(Ramificación productiva) 4.1.6. Longitud del entrenudo (tallo) 4.1.7. Longitud del entrenudo (de una misma bandola) 4.1.8. Longitud de bandolas 4.1.9. Ángulo de bandolas						



Objetivos Específicos (Columna 1)	Variable Conceptual (Columna 2)	Subvariables o Dimensiones (Columna 3)	Variable Operativa o Indicador (Columna 4)	Técnicas de recolección de datos e Información y actores participantes (Columna 5)				Tipo de variable estadística (Columna 6)	Categorías Estadísticas (Columna 7)
				Cuasi Experimento	Experimento de Campo	Experimento de Laboratorio	Experimento en la Naturaleza		
		4.2. Variabilidad intrapoblacion al e interpoblacion al a nivel morfológico de la hoja	4.2.1. Longitud de la hoja 4.2.2. Ancho de la hoja 4.2.3. Longitud del peciolo foliar		x			Cuantitativa: de razón	Continuas
		4.3. Variabilidad intrapoblacion al e interpoblacion al a nivel molecular	4.3.1. Heterocigosidad observada 4.3.2. Heterocigosidad esperada 4.3.3. índice Garza-Williamson			x		Cuantitativa: de intervalo	Continua Continua



Objetivos Específicos (Columna 1)	Variable Conceptual (Columna 2)	Subvariables o Dimensiones (Columna 3)	Variable Operativa o Indicador (Columna 4)	Técnicas de recolección de datos e Información y actores participantes (Columna 5)				Tipo de variable estadística (Columna 6)	Categorías Estadísticas (Columna 7)
				Cuasi Experimento	Experimento de Laboratorio	Experimento en la Naturaleza			
			4.3.2. Varianza molecular entre poblaciones 4.3.3. Varianza molecular entre individuos dentro de las poblaciones 4.3.4. Varianza molecular entre los individuos			x		Cuantitativa: de razón	



3.1.4.4. Materiales y métodos.

3.1.4.4.1. Materiales para recolectar la información.

La revisión bibliográfica se realizó utilizando como parámetros de selección su relación con la temática en estudio, consultando de esta manera libros de texto, revistas científicas en línea, artículos científicos, informes técnicos, así como también monografías y tesis de postgrado, censos agrícolas, entre otros. Además, se consideraron fuentes de información de por lo menos diez años atrás exceptuando la inclusión de bibliografía clásica de gran relevancia para la descripción de temáticas relacionadas al rubro y al desarrollo de la variedad.

La utilización de citas textuales, fichas bibliográficas, resúmenes, diagramas de flujo, esquemas y paráfrasis fueron las técnicas necesarias para el desarrollo del documento, así como el uso de tablas, figuras y flujogramas para generar una mejor comprensión del tema. En cuanto a la representación de los resultados se utilizaron gráficas de barra, de pastel y dendogramas.

Para recolectar la información en campo se utilizaron libretas de campo, un rastreador GPS, cámaras fotográficas, formato de colecta de datos para la caracterización morfológica *in situ* de la planta (anexo 9, figura 8). En el laboratorio, una vez que las muestras fueron trasladadas y almacenadas siguiendo el procedimiento de colecta y preservación de las muestras (anexo 10 A), fueron caracterizadas utilizando formatos de colecta de datos morfológicos de las hojas (anexo 8, figura 7) para la recopilación de los datos. Además, se utilizaron bitácoras para el registro de los resultados experimentales.

En el análisis estadístico se construyeron matrices básicas de datos (MBD) de tipo $n \times p$. Para morfología, n corresponde a los árboles evaluados y p a los descriptores medidos. En cambio, para el análisis molecular, n representa las poblaciones evaluadas y p los marcadores moleculares utilizados.



3.1.4.4.2. Materiales para procesar la información.

La información recolectada para el fundamento del presente documento fue procesada mediante el uso de las siguientes herramientas:

- **Microsoft Office Word 2016:** software utilizado para el procesamiento de textos y edición del documento.
- **Microsoft Office Visio 2016:** software de dibujo vectorial a través del cual se realizaron los flujogramas de procesos.
- **Arlequin suite ver 3.5.2.2.** software de análisis genéticos de poblaciones utilizado para el análisis bioinformático de la caracterización molecular.
- **Minitab 19:** software utilizado para la elaboración de gráficos de dispersión y dendogramas para el análisis estadístico de la morfología.
- **IBM SPSS Statistics versión 25.0.** software utilizado para el levantamiento de matrices y análisis de la estadística descriptiva de los datos.
- **R versión 3.6.1.** software utilizado para el análisis estadístico de comparación entre ambos lotes de café evaluados.

3.1.4.4.3. Equipos, reactivos y materiales de laboratorio.

3.1.4.4.3.1. Materiales.

Tabla 5

Materiales

Materiales	Marca	Capacidad
Generales		
Puntas para pipetas	Eppendorf o equivalente	0,5 - 10, 200 y 1000 (µL)
Bandejas plásticas	-	45 x 35,5 cm, con 2,5 cm de profundidad
Tijeras	-	-
Pinzas	-	-
Espátulas de acero inoxidable	Sigma-Aldrich o equivalente	7 ½" de longitud



Materiales	Marca	Capacidad
Espátulas de acero inoxidable	-	9" de longitud
Tubos	Eppendorf	0,5 y 1,5 mL
Tubos cónicos para centrífuga	Falcon™	15 mL, 17 x 120 mm, fondo cónico
Tubos cónicos para centrífuga	Falcon™	50 mL, 30 x 115 mm, fondo cónico
Peras de goma para succión	Sigma-Aldrich, Cat. Z269573	-
Papel para pesar	Fisherbrand o equivalente	-
Platos de aluminio para pesaje y dosificación	Fisherbrand o equivalente	-
Marcadores permanentes de punta fina	-	-
Recipientes para descartar puntas	-	-
Papel toalla	-	-
Guantes de nitrilo	-	-
Tabla Munsell	-	-
Máscara desechable	-	-
Extracción de ADN		
Varillas de vidrio	-	-
Gradillas o racks para tubos de 1,5 mL	-	-
Electroforesis horizontal en gel de agarosa		
Manoplas de protección para mano	-	-
Papel de aluminio	-	-
Máscara con filtro	-	-
Nivel	-	-
Espátula de plástico	-	-
Erlenmeyer	-	250 mL



Materiales	Marca	Capacidad
Recipiente para descartar desechos de gel	-	-
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)		
Recipiente para descartar desechos	-	-
Tubos	Eppendorf	0,2 mL
Máscara desechable	-	-
Gradilla o rack para tubos de 0,2 mL	-	-
Puntas	-	-

3.1.4.4.3.2. *Equipos.*

Tabla 6

Equipos

Nombre	Característica	Modelo/clase	Marca
Instrumentos de medida con dispositivo indicador			
Balanza analítica	Precisión 0,1 mg	Explorer® Pro	OHAUS
pH-Metro	-	pH7310	InoLab
Termociclador de PCR	-	223331	Eppendorf
Microcentrífuga	-	5417R	Eppendorf
Pipetas automáticas	0,05 µL a 1000 µL	-	Eppendorf
Temómetro	-20°C a 110°C	-	Fisher scientific
Congelador	-20°C	-	Cetron
Nevera	4°C	-	Cetron
Temporizador	-	-	Fisher scientific

Instrumentos de medida con dispositivo visualizador

Fuente de alimentación de energía para cámaras de electroforesis	Rango de trabajo 3000 V	Power Pac™ Basic	BioRad
--	-------------------------	------------------	--------



Nombre	Característica	Modelo/clase	Marca
G.P.S.	-	GPSMAP ® 60Cx	GARMIN
Espectrofotómetro		50-BIO	Varian Cary®
Instrumentos de medida materializada			
Balones	10 mL, 50 mL, 100 mL y 1000 mL	Clase A	Pyrex
Beaker	50 mL, 100 mL y 1000 mL	-	Pyrex
Probetas	10 mL 100 mL y 1000 mL	-	Pyrex
Aparatos			
Esterilizador eléctrico de presión a vapor	-	25X-1	All american
Baño María con control analógico	-	Isotemp 110	Fisher Scientific
Agitador Vortex Touch Mixer	-	9 232	Fisher Scientific
Regulador de voltaje	-	Rpc 1200	Aytek
Ordenador portátil	-	LATITUDEIE6400	DELL
Cámara fotográfica	-	-	-
Cámara de electroforesis horizontal	10 pocillos	-	Fisher Scientific
Cámara de electroforesis horizontal	40 pocillos	-	Fisher Scientific
Cámara de electroforesis horizontal	150 pocillos	-	Thermo Scientific
Horno de microondas	-	XB2316T	MASTERTECH
Transiluminador	-	88A	Fisher Scientific



Nombre	Característica	Modelo/clase	Marca
Cámara de electroforesis vertical	40 pocillos	-	BioRad
Transiluminador de luz blanca	-	-	-

3.1.4.4.3.3. Reactivos.

Tabla 7

Reactivos

Nombre	Fórmula química	Grado	Marca
Extracción de ADN			
Nitrógeno líquido	N ₂	-	-
Ácido clorhídrico 37,4 % Concentrado	HCl	Certificado ACS	Fisher Chemical
Hidróxido de Sodio	NaOH	Certificado ACS	Fisher Chemical
Tris (Trisaminometano) Base	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Certificado ACS	Fisher
Ácido Etilendiaminetetracético (EDTA)	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₈	Certificado ACS	Fisher Chemical
Cloruro de Sodio	NaCl	Certificado ACS	Fisher Chemical
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-	Fisher BioReagent
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	Certificado ACS	Fisher Chemical
Acetato de Sodio	C ₂ H ₃ NaO ₂	-	Fisher
β-mercaptoetanol	C ₂ H ₆ OS	-	-
Etanol absoluto	C ₂ H ₅ OH	Certificado ACS	Merk
Proteinasa K	-	-	Fisher BioReagents®
BSA	-	-	SIGMA
CTAB	C ₁₉ H ₄₂ BrN	-	Fisher



Nombre	Fórmula química	Grado	Biología	Marca
Cloroformo 99,9 %	CHCl ₃	Grado Molecular	Biología	Fisher
Isopropanol 99,9 %	C ₃ H ₈ O	Grado Molecular	Biología	Fisher Scientific
Agua destilada	-	-	-	-

Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Tris (Trisaminometano)	Base C ₄ H ₁₁ NO ₃	Certificado ACS		Fisher
Ácido Etilendiaminetetracético (EDTA)	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₈	Certificado ACS		Fisher Chemical
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Grado electroforesis		Fisher Scientific
Bromuro de etidio	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	-		-
Agarosa	-	Grado Molecular	Biología	Fisher Bioreagents
Agarosa Low EEO	-	Grado Molecular	Biología	Fisher Bioreagents
Marcador de peso molecular 100 bp	-	-		Thermo Scientific
Buffer de carga 6X	-	-		Fisher Scientific
Agua destilada	-	-		-

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

GoTaq® master mix	colorless -	-		Promega
Agua libre de nucleasas	-	-		Promega
Cebadores (anexo 7, table 2)	-	-		Eurofins

Electroforesis horizontal en gel de poliacrilamida

Tris (Trisaminometano)	Base C ₄ H ₁₁ NO ₃	Certificado ACS		Fisher
Ácido Etilendiaminetetracético (EDTA)	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₈	Certificado ACS		Fisher Chemical



Nombre	Fórmula química	Grado	Marca
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Grado electroforesis	Fisher Scientific
Acrilamida 40%	C ₃ H ₅ NO	Grado electroforesis	Fisher
Nitrato de plata	AgNO ₃	Certificado ACS	Fisher
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃	Certificado ACS	Fisher
Persulfato de amonio (APS)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Grado electroforesis	Fisher Bioreagents
TEMED 97%	C ₆ H ₁₆ N ₂	Grado electroforesis	Fisher Bioreagents
Formaldehído 37%	CH ₂ O	Certificado ACS	Fisher
Marcador de peso molecular 100 bp	-	-	Thermo Scientific
Marcador de peso molecular 50 bp	-	-	Thermo Scientific
Buffer de carga 6X	-	-	Lonza
UREA	CH ₄ N ₂ O	Certificado ACS	Fisher
Agua destilada	-	-	-

3.1.4.4.4. Método.

El estudio consta de dos componentes, uno conformado por la localización del área geográfica de estudio y colecta de muestra incluida la fase de campo, seguido por otro, compuesto por la caracterización a nivel morfológico y molecular de los árboles seleccionados, dentro del cual se desarrolla a su vez la fase de laboratorio. A continuación, se describen los métodos utilizados para ambos componentes.

3.1.4.4.4.1. Caracterización morfológica de las plantas seleccionadas.

Una vez realizada la selección de la localización para la captación de muestras provenientes de las fincas antes mencionadas, elegidas por el INTA en base a su accesibilidad y familiaridad con el establecimiento de la variedad, se desarrolla la fase de campo.



En esta fase, se realizó la selección de los árboles evaluados en base a los criterios de inclusión y exclusión señalados anteriormente, de manera que según la conformación de los lotes se escogieron 30 plantas haciendo referencia a las réplicas. Por tanto, de las áreas de colecta se seleccionaron 2 plantas por cada surco, para un total de 30 plantas por cada lote establecidas a 0,9 m entre surco y 1,8 m entre plantas (Figura 3). Cabe señalar que las plantas son seleccionadas del centro del lote evitando los árboles de los extremos debido a que estos son los más expuestos a estrés abiótico y por consiguiente a daños mecánicos.

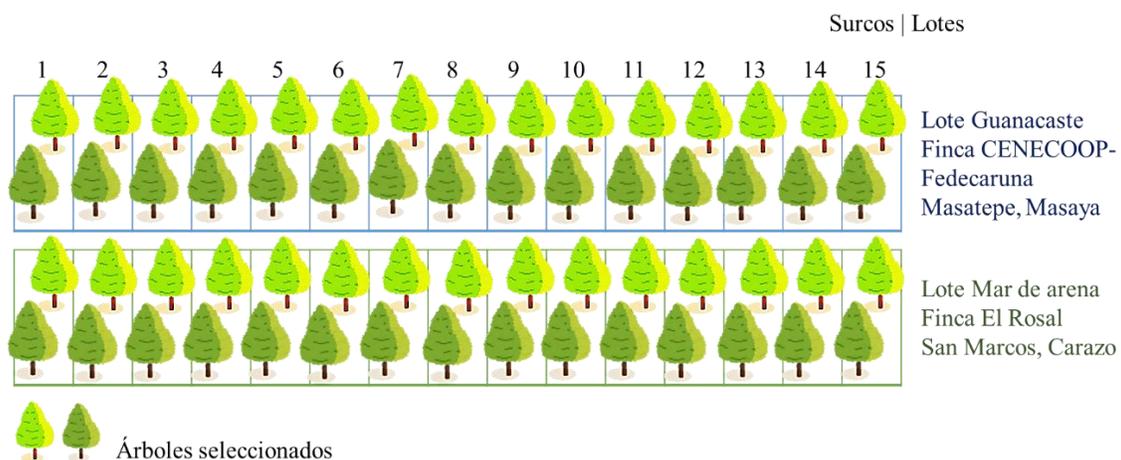


Figura 3 Diseño de selección de plantas y colecta de tejido foliar, donde se seleccionaron 2 plantas por surco para un total de 30 plantas por lote.

En cuanto al registro de los árboles seleccionados se utilizó un rastreador GPS para verificar su posición (anexo 13, tabla 3), además, se les colocó una etiqueta con el código asignado a cada árbol.

La caracterización *in situ* de las plantas se realizó midiendo y registrando los caracteres de interés en su respectivo formato (anexo 9, figura 8) elaborado según los descriptores (Tabla 8) de UPOV e IPGRI, además se incorporaron aspectos agronómicos de interés.



Tabla 8

Descriptorios morfológicos utilizados para la caracterización de los árboles de café Catrenic seleccionados.

Cuantitativos	Cualitativos
Altura	Presencia de ramificación
Diámetro del tallo (basal)	Ramificación productiva
Diámetro del tallo (altura al pecho)	Forma del arbusto
Longitud de la cobertura foliar	Color del brote
Longitud de la ramificación (ramificación productiva)	
Longitud del entrenudo (tallos)	
Longitud del entrenudo (de una misma bandola)	
Longitud de bandolas	
Ángulo de bandolas	
Número de yemas productivas por bandolas	

3.1.4.4.2. Colecta de tejido foliar.

Las muestras de la variedad en estudio fueron colectadas de acuerdo a los procedimientos de colecta de tejido foliar garantizándose que todo el material presentara buen estado fitosanitario. Además, su captación incluyó el almacenamiento apropiado para garantizar la custodia de las muestras, evitando su fenolización, degradación y contaminación cruzada.

El material vegetal destinado para el análisis morfológico se obtuvo seleccionando seis hojas maduras de diferentes bandolas, mayores al tercer nudo de la yema terminal de cada rama como lo indica IPGRI (1996). Para el transporte, preservación y almacenamiento del tejido colectado se siguió el procedimiento descrito en el anexo 10 A.



Es importante señalar que el estado de madurez del tejido foliar del *C. arabica* se diferencia en base al color presentado, siendo las hojas jóvenes de color verde claro y las hojas maduras verde oscuro (Arcila, 2007). A pesar de que la distinción se realiza en base a la coloración e indicaciones del productor y que la distinción de las dos tonalidades de verde es evidente, se utilizó la tabla Munsell para apoyar dicha distinción, tomando como referencia el color verde oscuro con el código 7,5GY4/2.

Para el análisis molecular se seleccionaron cuatro hojas jóvenes de cada árbol debido a que según Rosenthal y Janzen (1979), citado por Jobes *et al.* (1995), los tejidos jóvenes contienen menos compuestos polifenólicos y terpenoides que los más viejos. Considerar dichos componentes fue necesario por la necesidad de aislar ADN genómico, cuya labor puede ser afectada por la cantidad de metabolitos secundarios que junto a la disponibilidad del tejido, procedencia y estado de la matriz conforman factores críticos para el aislamiento exitoso de ácidos nucleicos (Tarieiev, 2015).

3.1.4.4.3. Caracterización morfológica de las hojas colectadas.

La caracterización de la hoja se realizó en el laboratorio una vez transportado y preservado el tejido de la oxidación. Para ello, se realizaron las medidas pertinentes en base a los descriptores cuantitativos y cualitativos (Tabla 9), registrando los datos en su respectivo formato (anexo 8, figura 7).

Tabla 9

Descriptores morfológicos utilizados para la caracterización de las hojas seleccionadas de los árboles de café Catrenic evaluados.

Cuantitativos	Cualitativos
Longitud de la hoja	Color de la hoja joven
Ancho de la hoja	Pigmentación antociánica
Longitud del peciolo foliar	Forma de la hoja
	Forma del ápice de la hoja
	Color del peciolo foliar



3.1.4.4.4. Caracterización molecular.

Dentro de la fase de laboratorio correspondiente al segundo componente de la investigación, se realizó la caracterización molecular para la obtención del perfil genético de la variedad de interés. Fue necesario completar tres etapas de procesamiento, iniciando con la extracción de ADN genómico, amplificación mediante la técnica PCR y procesamiento de los datos moleculares obtenidos.

➤ Extracción de ADN genómico

El aislamiento de ADN genómico de plantas se complica con la abundancia de polifenoles y polisacáridos (Jobes *et al.*, 1995). Estos compuestos son liberados a través de la lisis celular, adhiriéndose al ADN donde son difíciles de separar, provocando la inhibición de diferentes ADN polimerasas y enzimas de restricción (Couch and Fritz 1990; Jobes *et al.* 1995; Lodhi, Weeden, and Reisch 1994; Richards, Reichardt, and Rogers 1994). Razón por la cual debe considerarse el tipo de tejido a utilizar y su estado de madurez como se mencionó en el apartado 3.1.4.4.2.

A su vez, es importante tomar en consideración la matriz vegetal a evaluar, siendo en este caso café, una planta recalcitrante rica en estos y otros compuestos como metabolitos secundarios. De modo que, fue necesario realizar una optimización y estandarización de la metodología de extracción en base al protocolo descrito por McLay (2017) debido a que los investigadores Shepherd and McLay (2011) presentan alternativas para eliminar polisacáridos durante la extracción de ADN incorporando el uso de los buffer STE/CTAB para mejorar la calidad de ADN extraído a partir de plantas recalcitrantes y ricas en polisacáridos. El procedimiento seguido para el aislamiento del ADN genómico de las muestras se describe en el anexo 10 C, con el cual se extrajeron 60 muestras incluyendo 1 control de calidad (blanco) y una réplica por cada 15 muestras.

➤ Cuantificación de ADN

La idoneidad del ADN extraído se valoró mediante su concentración y calidad, determinando su absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro Cary 50-BIO (Varian) con una concentración resultante de 0,99 mg/mL (\approx 990 ng/ μ L). Además, se



determinó que posee una pureza de 2,0 cuantificando la presencia de proteínas a 280 nm y la relación A260/A280 con corrección de turbidez a 320 nm. Procedimiento descrito en anexo 10 D.

Por otra parte, se utilizó la técnica electroforesis horizontal en gel de agarosa 0,8 % (m/v) para observar la integridad del ADN aislado cargando las muestras junto a un patrón o marcador de peso molecular de 100 – 1000 bp. Procedimiento descrito en anexo 10 E.

➤ Amplificación del ADN

Para la amplificación del ADN genómico se utilizó la técnica PCR, con 10 de los marcadores microsatélites más polimórficos (anexo 7, tabla 2) diseñados para variedades del *Coffea arabica* L. por Vieira *et al.* (2010). El perfil térmico optimizado y estandarizado se describe a continuación en la tabla 10.

Tabla 10

Perfil térmico utilizado para la amplificación del ADN genómico

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	3 min	
Desnaturalización	94	30s	
Alineamiento	*	30s	x 30
Extensión	72	45s	
Extensión final	72	3 min	

Nota: * La temperatura de alineamiento depende de cada set de primer o marcador SSR, ver anexo 7 tabla 2.

El master mix utilizado para las amplificaciones de las muestras por cada set de marcador se preparó con los reactivos y concentraciones presentados en la tabla 11. La metodología de amplificación se describe en el anexo 10 F.



Tabla 11

Componentes del master mix utilizado para la amplificación del ADN genómico

Reactivo	Co	Cf	1X (µL)
Agua libre de nucleasas			1,5
GoTaq® Colorless Master Mix	2X	1X	12,5
Marcador SSR forward	20 µM	4 µM	5
Marcador SSR reverse	20 µM	4 µM	5
ADN	990 ng/µL	39,6 ng/µL	1
Volumen total			25

Nota: Para los marcadores CarM050 y CarM092 se utilizó una concentración final de 1 µM en base a la optimización y estandarización realizada con estos primers.

➤ Obtención de datos moleculares

En primer lugar, se verificó la amplificación del ADN genómico de las muestras por cada uno de los 10 marcadores SSR utilizando la técnica electroforesis horizontal en gel de agarosa Low EEO 1,8% de acuerdo al rango de amplificación esperado. Seguidamente, para la estimación del tamaño de los fragmentos de ADN amplificado o amplicón se utilizó la técnica electroforesis vertical en gel desnaturante de poliacrilamida 6% (UREA-PAGE) teñida con una solución de nitrato de plata (AgNO₃) y revelada con una solución compleja de carbonato de sodio (Na₂CO₃) y formaldehído (CH₂O). Ambos procedimientos se describen en el anexo 10 G.

A continuación, se realizó la determinación del tamaño de cada uno de los fragmentos obtenidos por cada amplicón a través de la construcción de una curva estándar de migración. Este sistema de determinación utiliza los datos del marcador de peso molecular cargado junto a las muestras para preparar una curva estándar, con la cual se estima el valor desconocido por interpolación.



Para ello se mide la distancia recorrida o migración de cada fragmento del marcador desde el borde inferior del pozo donde se cargó la muestra hasta el extremo inferior de cada banda, a través de estas medidas se obtiene la curva estándar que se utilizará para el cálculo de la longitud de cada uno de los fragmentos de las muestras, ya que según el método descrito por Southern (1979), la tasa de migración es inversamente proporcional a la longitud de las moléculas.

3.1.4.4.4.5. *Análisis estadístico.*

➤ Caracterización morfológica

Luego de coleccionar los datos de la morfología de las plantas y hojas, se realizó el levantamiento de matrices y el análisis estadístico descriptivo correspondiente utilizando IBM SPSS Statistic (IBM Corp., 2017). Posteriormente se realizó la comparación entre ambos lotes evaluados a través de R (R Core Team, 2019) y la elaboración de gráficos de dispersión y dendogramas en Minitab 19 (Minitab, 2019).

>Análisis intrapoblacional de conglomerados de arbustos y hojas colectadas

Para la caracterización de recursos fitogenéticos se realizan análisis multivariados cuando se trata de un gran número de mediciones sobre cada variedad o accesión, con el objetivo de permitir su descripción tomando en cuenta varias características de manera simultánea, sin omitir la relación existente entre ellas (Franco y Hidalgo, 2003). Entre los métodos multivariados se encuentran los de dependencia para identificar las variables dependientes de otras y los de interdependencia para el análisis simultáneo del conjunto de variables en base a Hair *et al.* (1992) citado por Franco y Hidalgo (2003), de los cuales se seleccionó el tipo de análisis relacionado a los objetivos de la investigación y la cantidad de muestras evaluadas, en este caso se realizó el análisis de conglomerados pertenecientes a los métodos de interdependencia.

Por otro lado, según Bramardi (2002), citado por Franco y Hidalgo (2003) menciona que se debe seleccionar la representación geométrica que mejor se adapte a los objetivos, que a su vez permitan cuantificar la asociación de los individuos y clasificarlos en relación a las variables, para lo cual clasifica los métodos multivariados en métodos



de ordenación y de clasificación. Este último permite la búsqueda de los grupos similares de manera homogénea, en base a los objetivos planteados, específicamente el análisis de clúster jerárquico.

Por tanto, se realizó el análisis de conglomerados porque permite clasificar las accesiones en grupos relativamente homogéneos con base en la similitud existente entre ellos (Franco y Hidalgo, 2003), en este caso verificar la semejanza entre los lotes según las variables cuantitativas medidas en la misma escala a nivel morfológico de planta y hoja.

>Análisis interpoblacional (comparación entre lotes)

Para realizar el análisis estadístico entre las mediciones de carácter cuantitativo obtenidas de ambos lotes evaluados, se realizó en primera instancia pruebas paramétricas que tienen requisitos sobre la distribución de las poblaciones involucradas y pruebas no paramétricas o sin distribución que no requiere que las muestras provengan de poblaciones con distribuciones normales o cualquier otra distribución en particular.

Sin embargo, antes de aplicar dichas pruebas es necesario realizar la comparación de los datos como muestras independientes para verificar si se distribuyen de manera normal, ya que según Peña (2014) no existe un contraste óptimo para probar la hipótesis de normalidad debido a que la potencia relativa depende del tamaño muestral y de la verdadera distribución que generan los datos. En términos generales, el contraste de Shapiro y Wilks es el más conveniente en muestras pequeñas mientras que en el contraste de Kolmogorov- Smirnov es adecuado para muestras grandes ($n > 30$).

Atendiendo a dichos conceptos se realizó el test de normalidad (anexo 14 A, tabla 4) para las variables cuantitativas estudiadas divididas por el factor que serían los dos lotes en estudio, utilizando el software IBM SPSS Statistic. Los valores resultantes reflejaron un valor de p no significativo ($p > 0,05$) en ambos lotes de muestras para las variables: longitud del entrenudo (en una bandola) y longitud de bandolas en ambos lotes, es decir que dichas variables siguen una distribución normal. De manera que, por el tamaño muestral de cada grupo es correcto utilizar el test de Shapiro-Wilks.



Se realizó la prueba t con las variables que cumplen con el requisito de normalidad y la U de Mann Whitney para el resto de estas mediciones, empezando por analizar la estadística por lote de las longitudes de los entrenudos y bandolas. Se calcularon los valores estadísticos (media y desviación estándar) para dichas variables, sin embargo, estos cálculos no permitirían conocer de manera exacta la existencia de diferencias significativas en los lotes, por lo que se realizaron las pruebas de Levene y t de Student (anexo 14 B, tabla 5).

El restante de variables cuantitativas de la matriz vegetal se sometió al test de la U de Mann-Whitney (anexos 14 C, tabla 6), con el fin conocer si la mediana en cada grupo (lote) es igual en cada una de las variables: altura (m), diámetro del tallo basal y a la altura al pecho (cm), longitud de la cobertura foliar (cm), longitud de ramificación (cm), longitud del entrenudo en tallo (cm), ángulo de bandolas (°) y número de yemas productivas por bandolas.

Posteriormente, las variables cuantitativas de la hoja (longitud de la hoja, ancho de la hoja y longitud del peciolo foliar) fueron sometidas a las pruebas de normalidad (anexo 14 D, tabla 7). De la misma manera que con las variables de la planta, se calcularon los valores estadísticos (media y desviación estándar) sin embargo, como se mencionó anteriormente, dichos cálculos no permiten conocer de manera exacta la existencia de diferencias significativas en los lotes, por lo que se realizaron las pruebas de Levene y t de Student (anexos 14 D, tabla 8) con las variables que sí cumplen con el requisito de normalidad y la U de Mann Whitney (anexos 14 E, tabla 9) para la longitud del peciolo foliar.

➤ Caracterización molecular

Una vez calculadas las longitudes de los fragmentos se procesaron los datos utilizando el software Arlequin suite versión 3.5.2.2. (Excoffier, Laval y Schneider, 2005) para estimar la variabilidad intrapoblacional (índices de diversidad genética) e interpoblacional (distancias genéticas) y obtener el perfil molecular de la variedad. En base a todos estos parámetros se determinó la variabilidad genética entre los individuos,



así también dentro y entre las agrupaciones de ambas fincas a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA).

>Análisis intrapoblacional

La variabilidad genética es un componente esencial de los análisis de genética de poblaciones de organismos naturales (Kim y Sappington, 2013) se origina principalmente por mutaciones puntuales, inserciones o deleciones, por tal motivo se considera una base para que dichos organismos presenten diversidad genética (Gorgonio, Clark, Campos, Monsalvo y Alfonso, 2017).

La diversidad genética puede ser medida a través métodos moleculares y cuantitativos (Frankham, Ballou y Briscoe, 2002; citado por Vía y Fernández, 2015), descritos típicamente por el número de alelos (n_A), tamaño alélico (R), heterocigosidad esperada (H_e) o diversidad genética de Nei y heterocigosidad observada (H_o), lo cuales permiten determinar la estructura genética intrapoblacional, existente dentro de una población cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen aleatoriamente, sino que siguen un determinado patrón espacial o temporal (Frankham *et al.* 2002; González 2003; Sosa, Batista, González y Bouza, 2002). Estos parámetros fueron calculados para cada finca utilizando el software antes mencionado.

Como se utilizaron datos generados a partir de marcadores microsatélites, se calculó el índice Garza – Williamson, para medir la relación del número observado de alelos en relación con el número total de posible estados alélicos en el locus, sobre el rango alélico (Garza y Williamson, 2001; citado por Sanín *et al.*, 2017).

>Análisis interpoblacional

La estructura genética interpoblacional se origina de la distribución geográfica, en el espacio de subpoblaciones entre las cuales existen diferencias genéticas (Frankham *et al.* 2002; González 2003; Sosa, Batista, González y Bouza, 2002). Para ello, se calcularon las distancias genéticas por pares a través de los índices de fijación o endogamia de los individuos con respecto a la población total (F_{IT}), los índices de fijación o endogamia de los individuos dentro de cada una de las fincas (F_{IS}) y los índices de



fijación o endogamia de los individuos que ocurre entre las poblaciones (F_{ST}), siendo este último una medida de la diferenciación genética entre las poblaciones.

A través de estos índices correspondientes a los estadísticos F de Wright (1969) se evalúa la estructura genética (Gorgonio *et al.*, 2017). Hartl y Clark (1997), señalan la clasificación de los índices F_{ST} según la valoración descrita por Wright (1969), tabla 12.

Tabla 12

Clasificación de los valores F_{ST} de Wright (1969)

0,00 – 0,05	Diferenciación genética pequeña
0,05 – 0,15	Diferenciación genética moderada
0,15 – 0,25	Diferenciación genética alta
$F_{ST} > 0,25$	Diferenciación genética muy alta

Fuente: Adaptado de “Principles of Population Genetics” Hartl y Clark. 1997, 3ra ed, Sinauer Associates.

Caracterización morfológica y molecular de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua. Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. 2018-2020

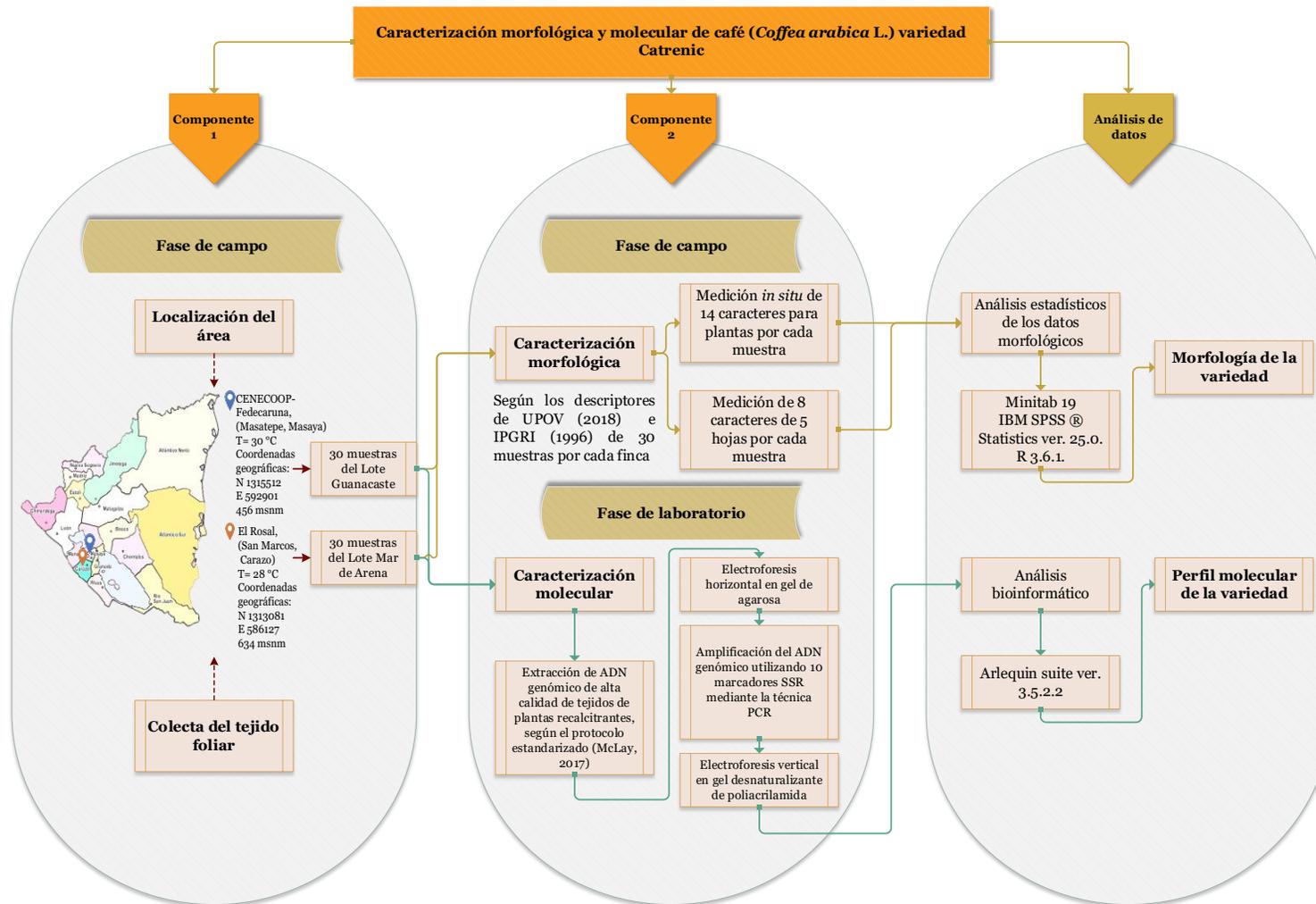


Figura 4 Proceso de Caracterización morfológica y molecular del café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal de Nicaragua. Fuente: Elaboración propia a través de Microsoft Visio.



CAPÍTULO IV



4.1. Análisis de resultados

En base a los objetivos de esta investigación se organizan a continuación los resultados y sus respectivos análisis.

4.1.1. Caracterización morfológica de la variedad de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catrenic.

4.1.1.1. Caracterización morfológica de hojas muestreadas de cada árbol.

4.1.1.1.1. Descriptores cualitativos evaluados.

Según la frecuencia de los datos obtenidos (figura 5), la hoja joven presentó una coloración verde (46,70%) y de manera similar en el peciolo foliar prevaleció el color verde (78,30%). Por otro lado, se caracterizó por presentar una forma elíptica (86,70%) y el ápice de la hoja en forma apiculada (96,70%). La pigmentación antociánica permaneció ausente en un 96,70% de las muestras evaluadas.

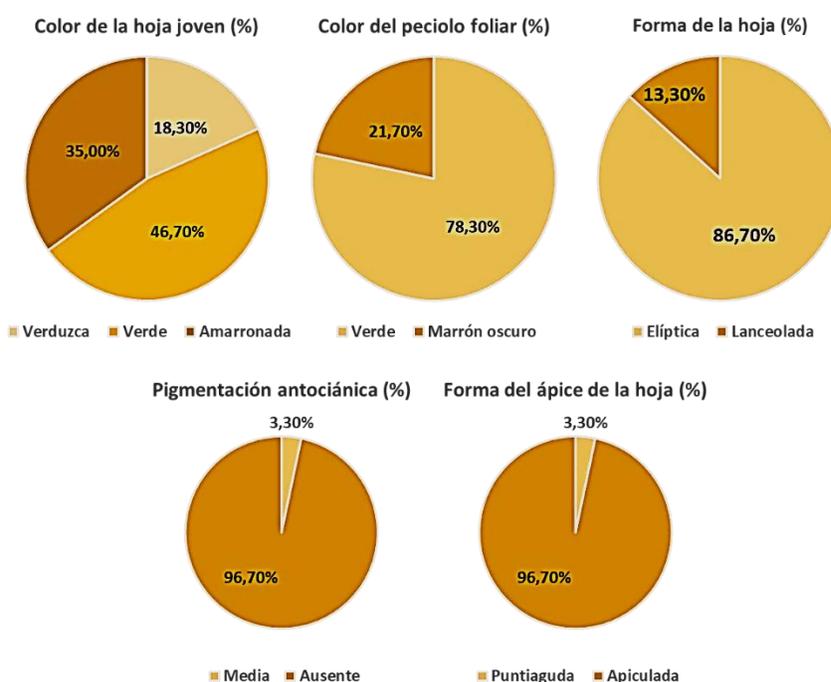


Figura 5 Frecuencia de los descriptores cualitativos de las hojas de café de la variedad Catrenic provenientes de los lotes evaluados.



4.1.1.1.2. Descriptores cuantitativos evaluados.

Los valores medios de la longitud de la hoja (tabla 13.) fueron de 152,51 mm, ancho de la hoja 69,85 mm y longitud del peciolo foliar 10,07 mm, siendo este último el que descriptor que presentó mayor variabilidad (43,59%) en árboles evaluados. Además, la mayor desviación estándar (15,67) se registró en la longitud de la hoja.

Tabla 13

Estadísticos descriptivos de las características cuantitativas las hojas de café Catrenic provenientes de los lotes estudiados.

Descriptor	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Longitud de la hoja (mm) [LH]	60	117,80	182,60	152,51	15,67	10,27
Ancho de la hoja (mm) [AH]	60	50,00	85,80	69,85	7,81	11,18
Longitud del peciolo foliar (mm) [LPF]	60	3,20	24,60	10,07	4,39	43,59

4.1.1.2. Caracterización morfológica de los árboles muestreados.

4.1.1.2.1. Descriptores cualitativos evaluados.

La variedad Catrenic presenta ramificación terciaria a diferencia de otras variedades según la información colectada del productor. En el momento de la caracterización los arbustos evaluados presentaron ramificación secundaria (80,00%) y ramificación terciaria (17,00%). De manera que el porcentaje de ramificación terciaria encontrada puede deberse al manejo agronómico y edad de la plantación en el momento de la evaluación. Por otro lado, la bandola secundaria fue la que prevaleció como ramificación productiva en el momento evaluado. La forma del arbusto es cónica y el color del brote es verde, como se observa en la figura 6.

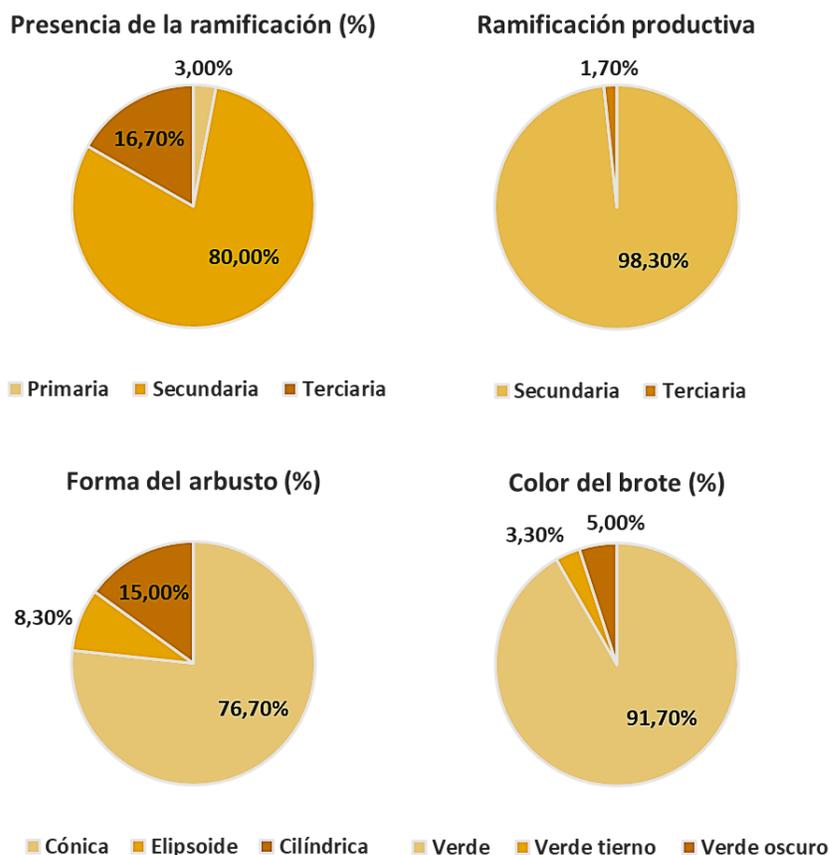


Figura 6 Frecuencia de los descriptores cualitativos de las plantas de café de la variedad Catrenic provenientes de los lotes evaluados.

4.1.1.2.2. Descriptores cuantitativos evaluados.

Según Contreras (2013), las variedades de porte intermedio alcanzan alturas de 2,25 m aproximadamente, la longitud de los entrenudos en una misma bandola es de 5 cm. De manera que, dentro de las variedades de porte intermedio se encuentran los Catimores, de donde proviene la variedad Catrenic, la cual posee según los datos obtenidos a una altura de 2,58 m (tabla 14.); lo que permite afirmar que la variedad en estudio es de porte intermedio ya que según García (2010) citado por Orozco y Hernández (2017) señala que las variedades de porte alto alcanzan alturas de 3 m. Además posee entrenudos cortos de 4,52 cm y ramificación secundaria y terciaria a como la describe Contreras (2013).



Tabla 14

Estadísticos descriptivos de las características cuantitativas de la matriz vegetal de la variedad Catrenic para ambos lotes evaluados

Descriptor	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Altura [m]	60	1,40	3,32	2,58	0,40	15,50
Diámetro del tallo (Basal) [cm]	60	1,40	6,50	3,33	1,17	35,14
Diámetro del tallo (Altura al pecho) [cm]	60	0,96	3,50	2,25	0,74	32,89
Longitud de la cobertura foliar [cm]	60	53,00	240,00	124,44	41,75	33,55
Longitud de ramificación productiva [cm]	60	17,80	130,00	63,08	31,76	50,35
Longitud del entrenudo (Tallos) [cm]	60	2,57	19,67	7,13	4,29	60,17
Longitud del entrenudo (de una misma bandola) [cm]	60	2,70	6,67	4,52	0,85	18,81
Longitud de bandolas [cm]	60	42,67	114,33	77,10	17,51	22,71
Ángulo de bandolas [°]	60	10,00	180,00	83,43	44,88	53,79
Número de yemas productivas por bandolas	60	4,00	28,00	16,23	6,40	39,43

En cuanto a su parentesco con la variedad IHCAFE 90 señalada por Bertrand y Rapidel (1999), descriptivamente podría decirse que ambas variedades se caracterizan por tener hojas de color verde oscuro y ramas largas, según las características de la variedad IHCAFE 90 descritas por Santacreo (2012).

Por otra parte, según IICA-PROMECAFE (1993) la variedad Catrenic es cercana genéticamente a Catimor T5175 como la variedad IHCAFE 90, de manera que en cuanto a su estructura estas últimas variedades se caracterizan por ser de porte bajo en base a lo que reporta World Coffee Research (2018), con una altura de 2,20 m según Anacafé (2019b), a diferencia de la variedad en estudio que se caracteriza por ser de porte



intermedio. Es importante señalar, que la comparación realizada con estas dos variedades es meramente descriptiva ya que han sido establecidas en diferentes condiciones edafoclimáticas.

La altura de la planta de café dentro de su diferenciación entre las variedades de porte bajo e intermedio recalca la importancia en cuanto a la facilidad de recolección y densidad de cosecha, ya que según Echeverri (1980), citado por Guedes (2003) en el procesamiento de mejoramiento genético los progenitores que más se utilizan son las variedades de porte bajo porque facilitan las recolección y se obtiene un mayor número de cosecha además que permiten obtener densidades altas aumentando de esta manera la producción como menciona Cortez (1987), citado por Guedes (2003).

Conviene subrayar, que de la línea Catimor derivada del cruzamiento de plantas de porte bajo (Caturra) y de porte alto (Híbrido de Timor) puede generarse una segregación en cuanto a la altura, cuyo factor de expresión fue identificado en las variedades Villasarchí y Pacas que presentan porte bajo (IICA-PROMECAFE, 1990), caso contrario a lo que sucede con los descendientes del cruce entre el Híbrido de Timor y las variedades Típica y Bourbon que se caracterizan por ser materiales sobresalientes por su vigor vegetativo y por sus dimensiones de porte alto (Anacafé,2019b).

De manera que, la variación encontrada entre las características morfológicas de las variedades mencionadas puede ser explicada según sus procesos evolutivos, forma de reproducción y especiación, lo cual hace que estas características sean más estables dentro de los individuos de la misma especie según Cárdenas (2007). A esto puede añadirse, que según IICA-PROMECAFE (1988) algunos de los descendientes de la variedad T5175 son heterocigotas para porte, por lo cual podría esperarse que no todas las variedades cercanas a ellas sean de porte bajo, como es el caso de Catrenic.

En otras palabras, en los cruces para dar origen a los catimores, el gen Caturra es dominante sobre el porte alto del Híbrido de Timor, esa dominancia en algunos casos no es completa según IICA-PROMECAFE (1984), por lo cual la codominancia presentada en algunas variedades como en el caso de Catrenic podría originar un individuo heterocigoto donde aparecerá el tercer fenotipo, diferente del dominantes y el recesivo,



como un intermedio entre los dos. Asimismo, debe considerarse la interacción del ambiente sobre el fenotipo.

Por otro lado, en la tabla 14 puede observarse que los descriptores presentaron coeficientes de variación mayores de 15 %, siendo el de mayor variabilidad la longitud del entrenudo (tallo) con un coeficiente de variación de 60,17 %, seguido por el ángulo de bandolas (53,79 %) y longitud de la ramificación productiva (50,35 %).

4.1.2. Evaluación de las principales características morfológicas de importancia agroindustrial para el rubro café.

Si bien el conjunto de caracteres que conforman las plantas influye de alguna manera en la producción del fruto y su aprovechamiento industrial, hay ciertos caracteres cuyo impacto es significativo en los cultivos agroindustriales, en base a esto se hará el análisis de dichas variables.

4.1.2.1. Altura de la planta.

La altura es una variable importante ya que nos indica el crecimiento ortotrópico de la planta, lo que va a proporcionar bandolas que garantizarán la producción en los próximos años (Garriz y Vicuna, 1990, citado por Blanco *et al.*, 2013). Además, el tamaño y la altura de la planta de café varía considerablemente y está determinado por la variedad, es importante, ya que por su tamaño se puede determinar la densidad de plantación y la forma de recolectar al momento de cosecha como señalan Blanco (1984), citado por Zelaya y Sotelo (2000).

En el análisis de esta variable el lote Guanacaste de la Finca CENECOOP-Fedecaruna presentó mayor altura (figura 7), con 2,67 m mientras que el lote Mar de arena de la Finca El Rosal presenta 2,48 m, esta diferencia puede deberse a la edad de la plantación y el manejo agronómico aplicado, asimismo si se observan diferencias de altura de las plantas dentro de una misma población se debe a que estas comienzan a competir ante determinados factores esenciales para el crecimiento de acuerdo a las condiciones edafoclimáticas, como afirman (Corrales y Chevez, 1993, citado por Zelaya y Sotelo, 2000).

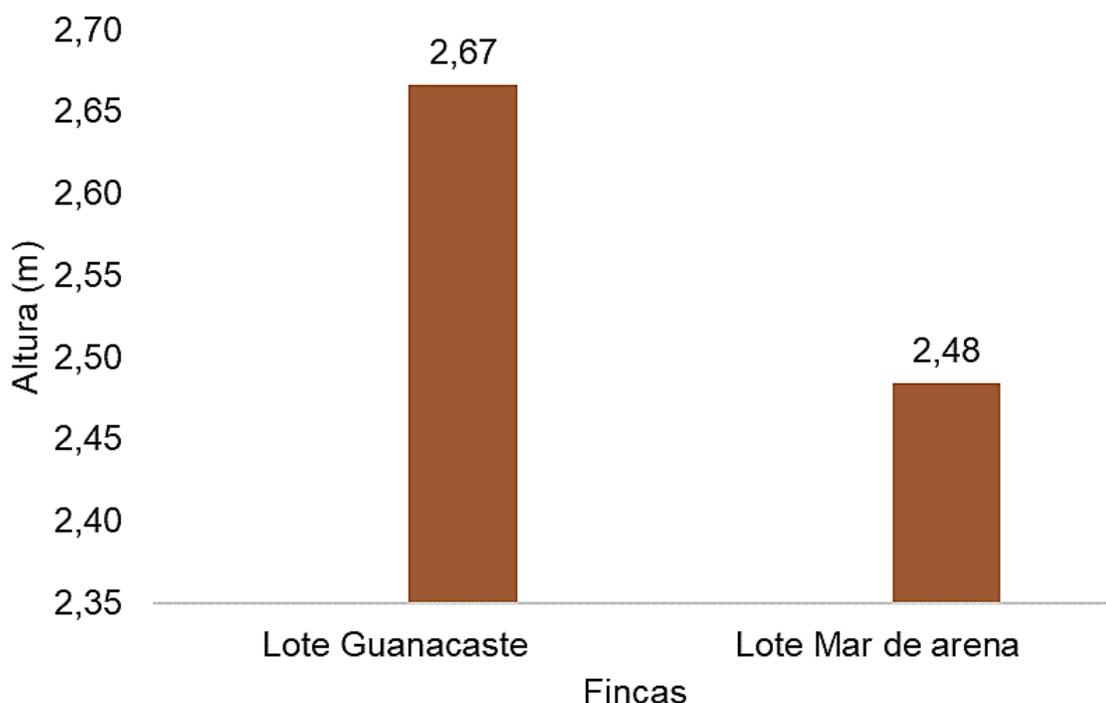


Figura 7 Altura (m) de las plantas de café variedad Catrenic evaluadas de los lotes Guanacaste y Mar de arena pertenecientes a las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal, respectivamente.

4.1.2.2. Diámetro del tallo.

Según Arias *et al.*, (1976), citado por Balladares Valdivia y Calero Moraga (2005), el diámetro del tallo se considera como un índice del vigor de la planta, este es muy importante ya que determina en gran manera la capacidad del tallo en sostener toda la parte aérea de la planta.

En el caso particular de la variedad Catrenic presentó un diámetro de tallo basal (figura 8) de 3,18 cm en el lote Guanacaste mientras que en el lote Mar de arena 3,47 cm; mientras que en el diámetro tomado a la altura al pecho se obtuvieron medidas de 2,47 cm y 2,03 cm, respectivamente.

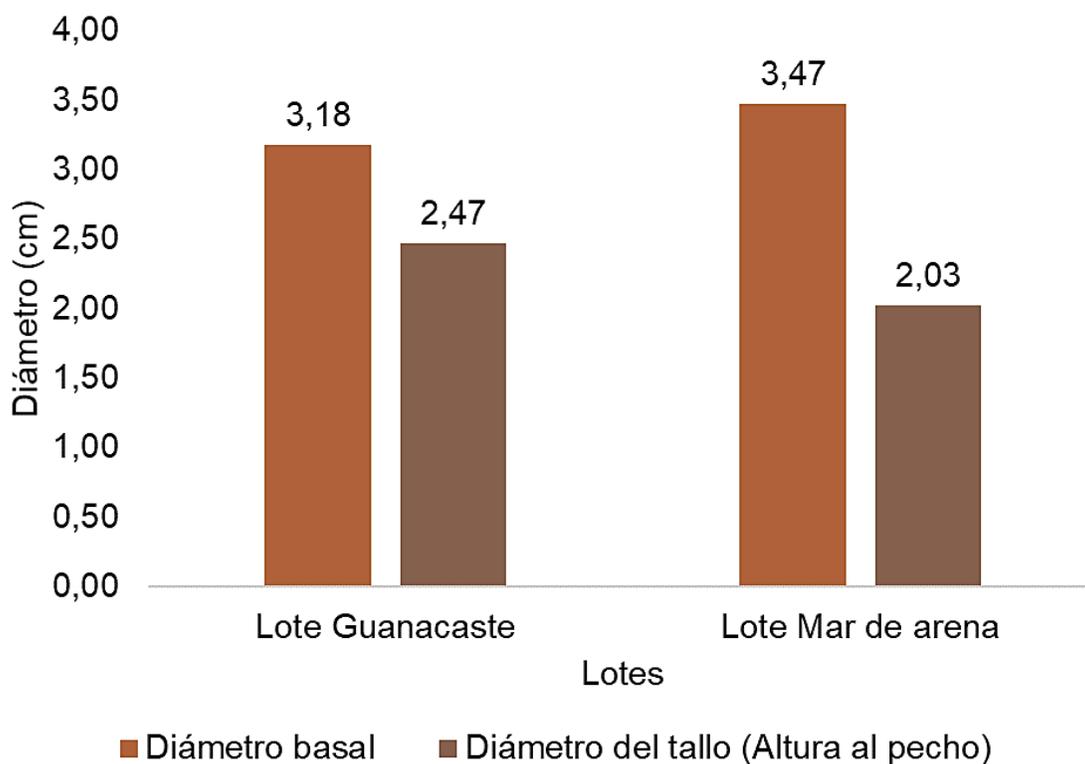


Figura 8 Diámetro del tallo (cm) basal y a la altura al pecho de las plantas de café variedad Catrenic evaluadas de los lotes Guanacaste y Mar de arena pertenecientes a las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal, respectivamente.

Las diferencias de los diámetros obtenidos pueden ser resultado de la influencia de las condiciones edafoclimáticas de la finca, puesto que según Suárez *et al.* (1961) citado por Balladares Valdivia y Calero Moraga (2005), el cafeto a pleno sol posee diámetros inferiores en base a la sombra y en ese mismo aspecto Carvajal (1984) citado por Balladares Valdivia y Calero Moraga (2005), asegura que el cafeto a pleno sol presenta mayor diámetro del tallo, sin embargo el valor promedio del lote Mar de arena es menor, a pesar de que la cantidad de sombra observada en este lote es menor en comparación a la del Lote Guanacaste.

4.1.2.3. Presencia de ramificación productiva.

La variedad en estudio presentó ramificación secundaria con un 80% y terciaria en un 16,7% al momento de la evaluación, lo que coincide con la descripción de (Contreras



2013). Es de vital importancia conocer el tipo de ramificación productiva ya que depende de la variedad y a su vez, el número de ramas primarias es una característica morfológica del cafeto que se relaciona con la productividad (Arias *et al.*, 1976, citado por Balladares Valdivia y Calero Moraga 2005).

En el rubro café según Suárez y Picado (2009), la producción de ramas nuevas en el año tiene una gran importancia con respecto a la capacidad productiva para el siguiente ciclo por la generación de flores y el posterior desarrollo de frutos. Por lo cual, al presentar ramas secundarias se puede esperar que exista mayor productividad de la planta y a su vez el cafeto con mayor número de ramas terciarias tendrán más yemas de serie que incrementarán los rendimientos (Balladares Valdivia y Calero Moraga, 2005), como señala PROMECAFE (1996), citado por Balladares Valdivia y Calero Moraga (2005) que cuando las ramas primarias han perdido su capacidad de floración, la fructificación se traslada a las ramas secundarias y terciarias.

4.1.2.4. Longitud de bandolas.

La longitud de la bandola es fundamental para elevar los rendimientos, ya que una bandola con mayor longitud tendrá mayor número de nudo y hojas como afirman Zelaya y Sotelo (2000), en un futuro producirá más ramas secundarias y terciarias. En las plantas de café caracterizadas se encontraron longitudes entre 17,8 cm y 130,0 cm de ambas fincas, siendo los valores promedios (figura 9) de 39,93 y 86,23 para el lote Guanacaste y Mar de arena, respectivamente.

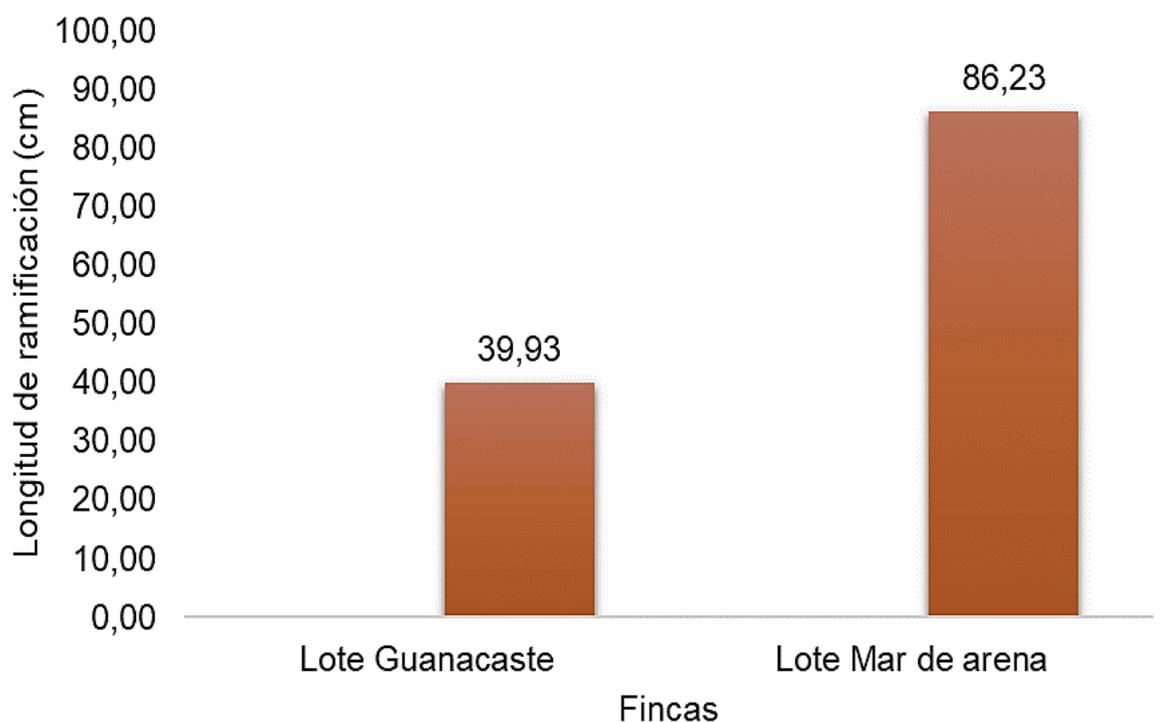


Figura 9 Longitud de ramificación (cm) promedio de las plantas de café variedad Catrenic evaluadas de los lotes Guanacaste y Mar de arena pertenecientes a las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal, respectivamente.

Por otro lado Blanco *et al.* (2013), afirma que el aumento de longitudes son favorecidos por la combinación de factores físicos y el sistema de sombra, ya que el exceso de sombra tiene un efecto negativo en la expresión de alargamiento de los entrenudos de los ejes plagiotrópicos. Por lo cual, la diferencia entre las longitudes de ambos lotes se basa en que la cantidad de sombra suministrada en la finca El Rosal es menor en comparación a lo observado en la finca CENECOOP-Fedecaruna, como se mencionó anteriormente.

4.1.2.5. Número de yemas productivas.

En este caso particular donde se cuantificaron las yemas de los nudos, la variedad Catrenic presentó un promedio de 16 yemas productivas por bandolas. Este descriptor es muy importante porque la formación de nudos potencialmente productivos permitirá



un incremento en la producción según Mestre y Ospina (1994) citado por Cortez y Tercero (2014). Además, es importante señalar como mencionan Balladares y Calero, (2005) citado por Cortez y Tercero (2014), que la importancia de los nudos parte de que de estos originan las ramas primarias que son el tejido nuevo y productivo en los primeros años de vida de un cafeto, al aumentar los nudos aumentan el número de ramas en la planta y por ende la productividad del cafeto a largo plazo ya que estos aumentan conforme la longevidad de la planta.

4.1.3. Perfil molecular de la variedad Catrenic.

4.1.3.1. Número de alelos (n_A).

Se registraron promedios de 14,5 alelos para el lote Guanacaste y 14,9 alelos para el lote Mar de arena en un rango variante de 7,5 a 32. En ambos casos, el locus CarM092 presentó el mayor número de alelos ($n_A= 32$). Los siguientes loci con mayor número de alelos fueron CarM096 ($n_A= 16,5$) y CarM101 ($n_A= 16,0$). De esta manera, estos tres loci fueron los más polimórficos para las poblaciones analizadas (Figura 10).

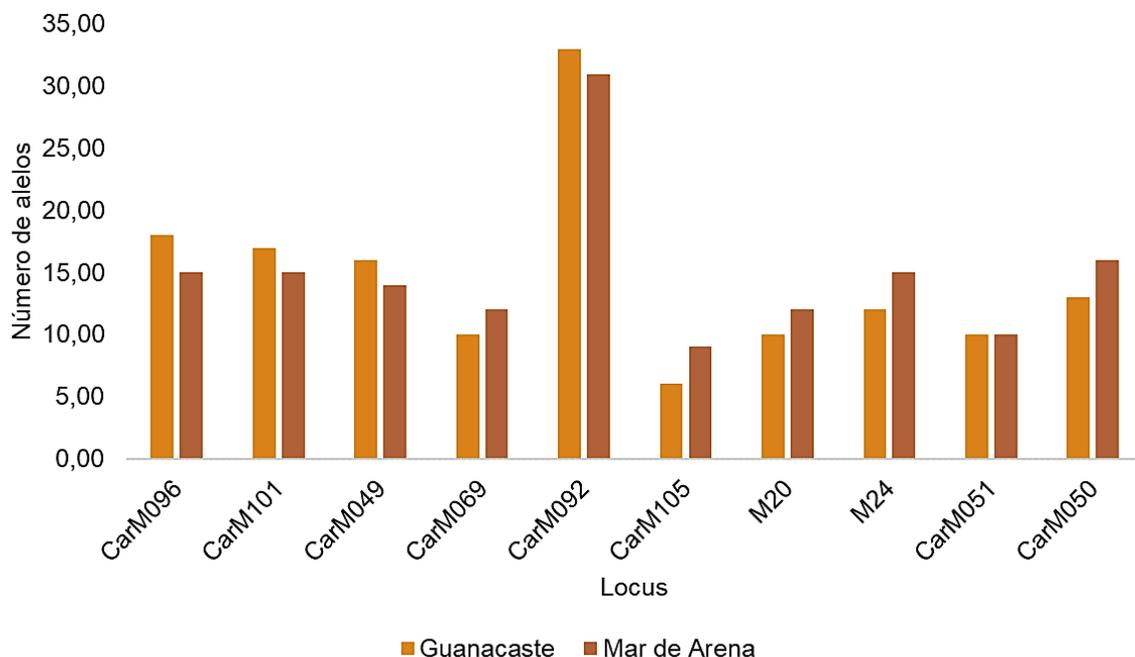


Figura 10 Número de alelos por locus registrados en base a cada lote (Guanacaste y Mar de arena).



El número de alelos por locus obtenido en este estudio es superior al reportado por otros autores. En el caso de Vieira *et al.* (2010), quienes desarrollaron parte de los marcadores microsatélites utilizados, obtuvieron valores inferiores para todos los loci, siendo el locus CarM101 el que presentó mayor número de alelos ($n_A = 7$), seguido por el locus M24 ($n_A = 4$). Para los loci CarM049, CarM069, CarM105 y CarM050 reportan 2 alelos y para CarM096, CarM092 y M20 registraron 3 alelos. Es importante señalar, que los autores antes mencionados evaluaron 25 variedades del *Coffea arabica*, entre ellas muestras pertenecientes a la variedad catimor, en lugar de analizar la identidad de una misma variedad.

Por otro lado, Combes *et al.* (2000) quienes desarrollaron los loci M20 y M24, reportaron un número de alelos de 5 y 6, respectivamente; siendo para Catrenic de 11 y 14 para cada loci. Dichos autores evaluaron 32 individuos del *C. arabica*. Además, Flores (2019) quien incluyó los loci M20, M24, CarM051 y CarM050 dentro de su evaluación de 61 individuos de las variedades Pache, Nacional y Caturra pertenecientes al *C. arabica*, registró 3 alelos para el primero y 2 para el resto de estos loci. Para los lotes Guanacaste y Mar de arena se registraron 10 y 55 alelos para los loci CarM051 y CarM050, respectivamente.

Si bien, dichos autores evaluaron otras variedades con tamaños de muestras distintos, se puede observar que el número de alelos registrados en esta investigación es mayor debido posiblemente a la estrecha base genética de las variedades estudiadas por ellos, ya que como reporta Geleta *et al.* (2012), en su estudio realizado en Nicaragua, la variedad Catimor presenta alta diversidad genética, explicada en parte por el hecho de originarse del cruce entre la variedad Caturra del *C. arabica* y el Híbrido de Timor, el cual a su vez es un híbrido natural entre el café arábica y robusta, linaje del cual proviene Catrenic siendo un catimor originado del cruce entre el CIFC 19/1 Caturra rojo x Híbrido de Timor CIFC 832/1. Cabe señalar, que el café robusta ha sido registrado con altos niveles de diversidad genética en comparación con el arábica (Cubry *et al.*, 2008; Geleta *et al.*, 2012; Moncada y McCouch, 2004).



4.1.3.2. Rango de tamaño alélico.

El mayor rango de tamaño alélico promedio (figura 11) se registró en el locus CarM092 (R=117), seguido por los loci CarM049 (R=40), M24 (R=28) y CarM050 (R=28,5). Dado a que el rango de tamaño alélico (R) es la diferencia entre el número máximo y mínimo de repeticiones para marcadores microsatélites (Excoffier *et al.*, 2005), fue definido por Garza y Williamson (2001) en relación al cuello de botella de una población, ya que el número de alelos será menor que el rango alélico por una reducción en el tamaño de la población, mostrando posiciones libres que propiciarán mutaciones, respaldando la diversidad genética encontrada en base al número de alelos registrados.

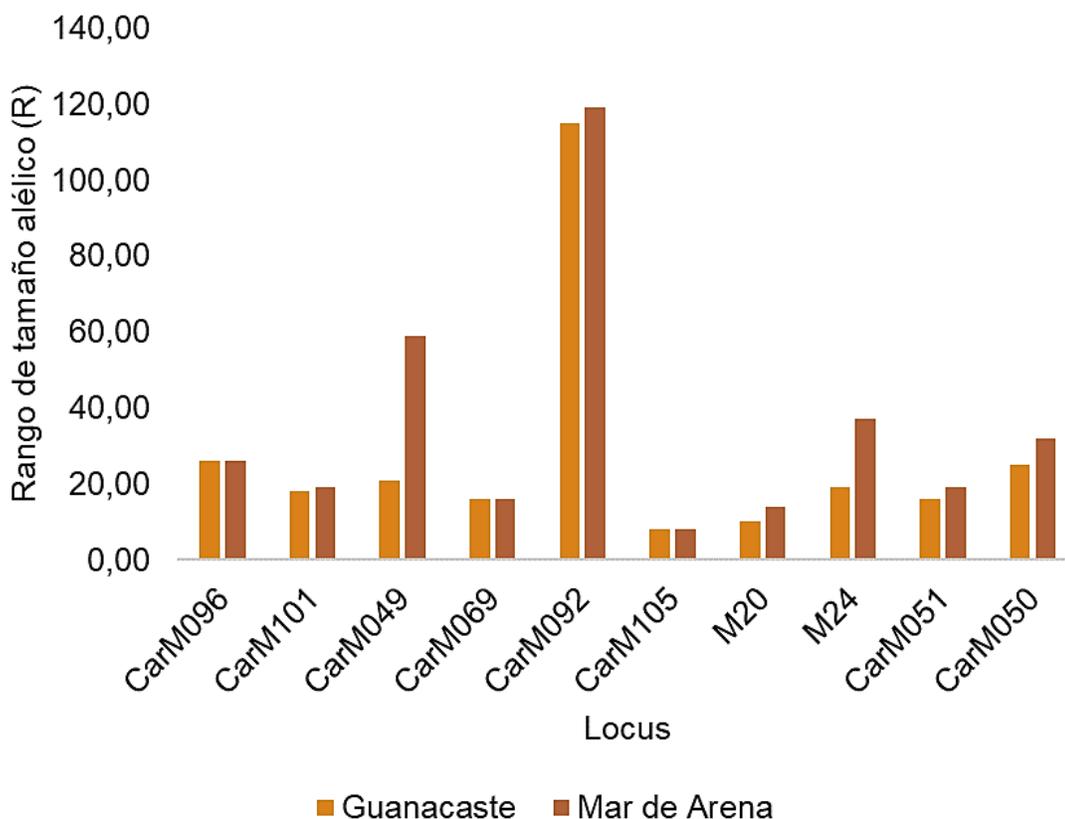


Figura 11 Rango de tamaño alélico registrado por locus en las poblaciones analizadas.



4.1.4. Variabilidad intrapoblacional e interpoblacional de las muestras de Catrenic colectadas en las fincas CENECOOP-Fedecaruna y El Rosal.

4.1.4.1. Variabilidad intrapoblacional.

4.1.4.1.1. Análisis morfológico de conglomerados de los arbustos y hojas colectadas.

Este análisis se realizó utilizando las características cuantitativas de la hoja y la planta de la variedad en estudio, en base a ambas fincas evaluadas. Las variables utilizadas para la formación de los conglomerados fueron la longitud (LH) y el ancho de la hoja (AH), longitud del peciolo foliar (LPF), altura, diámetro del tallo (basal y a la altura al pecho) longitud de bandolas y número de yemas productivas por bandolas, ya que estos descriptores se midieron en la misma escala.

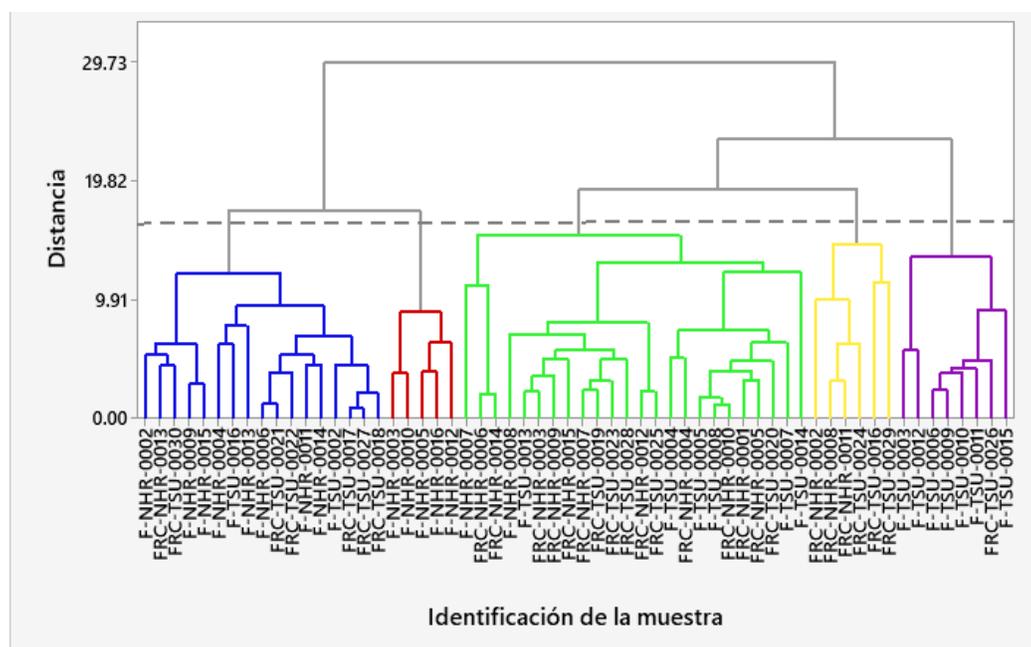


Figura 12 Dendrograma de conglomerados (distancia euclídea, método de enlace promedio) en base a las variables cuantitativas de las hojas de la variedad Catrenic provenientes de las fincas estudiadas. El corte se realizó a una distancia aproximada de 15 unidades. Colores: azul (conglomerado 1), rojo (conglomerado 2), verde (conglomerado 3), amarillo (conglomerado 5) y morado (conglomerado 4).



Se identificaron 5 grupos fenotípicos (figura 12) a una distancia de 15 unidades, utilizando el método del análisis de clúster jerárquico y la distancia euclidiana (tabla 15). Las muestras del conglomerado 4 se caracterizaron por presentar valores bajos en promedio de LH y AH (centroides: 128,775 mm, 58,075 mm) con respecto al total de muestras. El conglomerado 1 tiene valores medios de LH, AH (centroides: 166,094 mm, 73,18 mm). En cambio, las muestras del conglomerado 2 presentaron los valores más altos en promedios de LH y AH (centroide: 179,96 mm, 80,84 mm).

Tabla 15

Conglomerados formados en base longitud y ancho de la hoja, longitud del peciolo foliar

N° conglomerado	Cantidad de muestras
Conglomerado1	17
Conglomerado2	5
Conglomerado3	24
Conglomerado4	8
Conglomerado5	6

Los grupos resultantes se encuentran conformados por muestras de ambas fincas en base a su similitud, a excepción de uno de los grupos que presenta en su mayoría plantas de un solo lote, haciendo referencia al lote Guanacaste (Finca CENECOOP-Fedecaruna).

Por otro lado, en cuanto a las características morfológicas cuantitativas de las plantas evaluadas se obtuvieron 5 grupos fenotípicos (figura 13, tabla 16) a una distancia aproximada de 62,4 conformados alternadamente por muestras provenientes de ambas fincas.



Tabla 16

Conglomerados formados en base a la altura, diámetro del tallo (basal y de altura al pecho), longitud de bandolas, número de yemas productivas por bandolas.

N° conglomerado	Cantidad de muestras
Conglomerado1	16
Conglomerado2	25
Conglomerado3	12
Conglomerado4	3
Conglomerado5	4

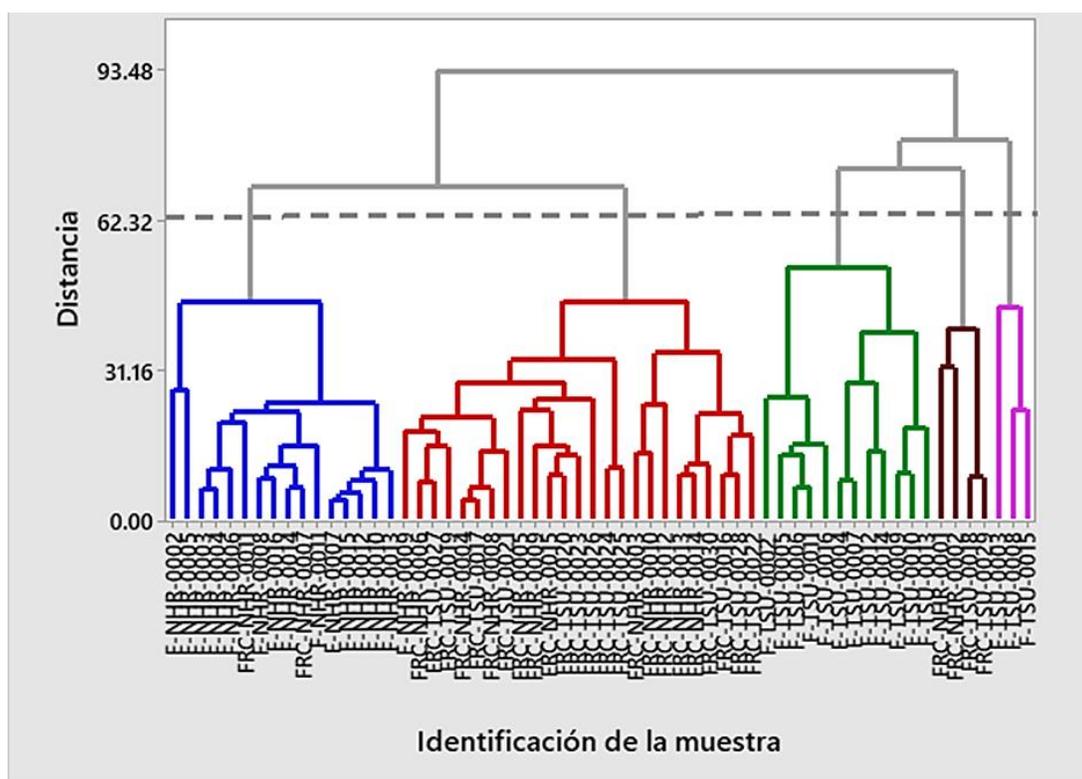


Figura 13 Dendrograma de conglomerados (distancia euclídea, método de enlace promedio) en base a las variables cuantitativas evaluadas (altura, diámetro del tallo basal y de altura al pecho, longitud de bandolas, número de yemas productivas por bandolas) en las plantas de la variedad Catrenic provenientes de las fincas estudiadas. Colores:



azul (conglomerado 1), rojo (conglomerado 2), verde (conglomerado 3), café (conglomerado 5) y rosado (conglomerado 4).

No obstante, en comparación a los grupos formados en la evaluación de las características cuantitativas de las hojas, los conglomerados de plantas están constituidos sólo con árboles pertenecientes a los mismos lotes excepto uno (conglomerado 1) que posee muestras de ambas fincas.

Por otra parte, los centroides entre los grupos fenotípicos formados en base a caracteres de la hoja y de la planta no coinciden en su totalidad y presentan agrupaciones diferentes, esto puede deberse a que entre los descriptores utilizados para este análisis son altamente discriminantes (altura, longitud del peciolo foliar, longitud y ancho de la hoja), según IPGRI (1996). De manera que, en el caso de los descriptores de planta reflejan la influencia de las condiciones edafoclimáticas agrupando las muestras en base a cada finca.

Además, este análisis muestra que la mayor distancia entre las agrupaciones en base a los lugares de colectas se da en la finca CENECOOP-Fedecaruna, para los descriptores medidos en plantas, lo que podría estar asociado a la diferencia de edad de la plantación. A su vez, significaría que los caracteres cuantitativos de la planta permiten analizar más las diferencias entre los grupos fenotípicos en base a la influencia de factores externos, que los caracteres de las hojas.

4.1.4.1.2. Análisis molecular.

4.1.4.1.2.1. Heterocigosidad.

La heterocigosidad observada (H_o) varió entre 0,68 y 1,00 para ambos lotes evaluados, sin embargo el mayor valor registrado de manera independiente fue del locus CarM092 con 0,95 y 1,00 para el lote Guanacaste y Mar de arena, respectivamente. Por otro lado, la heterocigosidad esperada (H_e) varió entre 0,81 y 0,92 para el lote Guanacaste, en cambio para el lote Mar de arena osciló entre 0,83 y 0,96. Puede observarse que tanto los valores independientes como promedios obtenidos de heterocigosidad observada y esperada son similares en ambos lotes (figura 14), la



heterocigosidad observada es mayor que la esperada para algunos loci específicos como CarM096, CarM049, CarM092, CarM105 y M20.

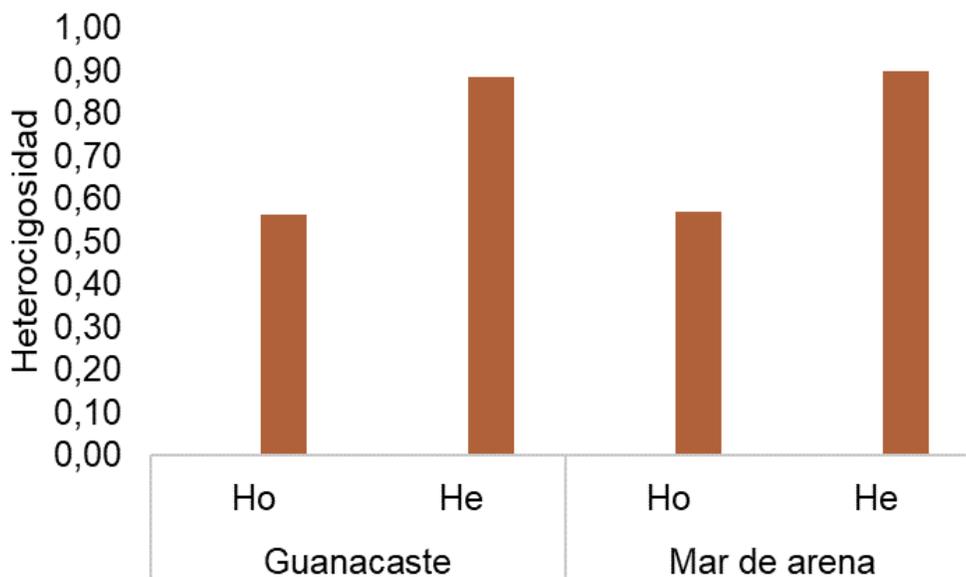


Figura 14 Heterocigosidad observada y esperada promedio reflejada por los lotes Guanacaste y Mar de arena.

Los valores de H_e son considerados altos cuando son mayores a 0,5, ya que según lo descrito por Falk y Holsinger (1991) citado por Argüello (2012) la H_e aumenta cuando se acerca a 1 y disminuye al acercarse a 0, por tanto ambas localidades presentan altos valores de H_e . Con respecto a los valores promedios de H_o (0,57) es menor que la H_e (0,89), lo que indica deficiencia de individuos heterocigotos. Este aspecto, sugiere endogamia, ya que a través de este proceso biológico se alcanza un alto nivel de homocigosis permitiendo la exacta reproducibilidad genética de ciertos individuos a través de autofecundaciones o retrocruzamientos, observados en programas de mejoramiento donde se pretende obtener repetidas generaciones de híbridos con fines comerciales, (FAO, 2001; Vallejo y Estrada, 2013) como es el caso de los procesos de selección realizados entre *C. arabica* y *C. robusta*, de los cuales se originó la variedad Catrenic.



Si bien lo antes mencionado representa una ventaja para ciertos individuos, también está vinculada con efectos negativos en el crecimiento, reproducción, potencial evolutivo, entre otros como menciona Frankham *et al.* (2002), sucede lo contrario en la variedad en estudio debido a que es una variedad híbrida de introgresión y presenta según Baylón (2020) un excelente vigor híbrido entre otras características de interés.

Dicho vigor híbrido o heterosis resulta del fenómeno por el cual la descendencia del cruce entre especies y dentro de una especie, repercute en una mayor velocidad de desarrollo y fertilidad, mayor biomasa, mayor tolerancia a estrés biótico y abiótico con respecto a sus progenitores, (Villegas, 2010). Sin embargo, a pesar de que uno de los progenitores de la variedad (*C. arabica* L.) es una planta autógama, es importante señalar que, la expresión de estas características pertenecientes a los híbridos como mayores rendimientos han sido reportadas sobre la especie *Coffea arabica* L. por Bertrand *et al.* (1999) citado por Suárez *et al.* (2010) debido a la combinación e interacción de genes paternos en la primera descendencia de producción de híbridos.

Es importante resaltar la relevancia de estimar la heterocigosidad, ya que representa una mejor medida de variación genética, además de ser precisa y no arbitraria (Hernández y Trejo-Medina, 2014).

4.1.4.1.2.2. Índice Garza-Williamson (G-W).

El valor promedio del índice Garza-Williamson para ambos lotes de muestras es de 0,61 cercano al valor crítico M que es de 0,68, lo que indica que la población podría haber pasado por un cuello de botella recientemente, es decir que el número de alelos disminuyeron en relación al rango de alelos debido a una reducción en el tamaño de la población, por lo cual el estadístico de G-W será más pequeño en comparación con poblaciones estacionarias cuyo valor se acerca a 1 (Garza y Williamson, 2001).

Por otra parte, si se analizan los valores promedios de cada locus, puede observarse que el índice G-W más bajo se registró en el locus CarM092 con 0,27, seguido por los valores de los loci CarM049 (0,48), M24 (0,49) y CarM050 (0,49), es decir que hubo una baja variación en el tamaño de los alelos en estos loci, aunque es importante mencionar



que el locus CarM092 presentó el mayor rango promedio de tamaño alélico. Por otro lado, los valores más altos los presentaron los loci CarM101 (0,82), CarM105 (0,83) y M20 (0,85), reflejando mayor variación en el tamaño de los alelos (figura15).

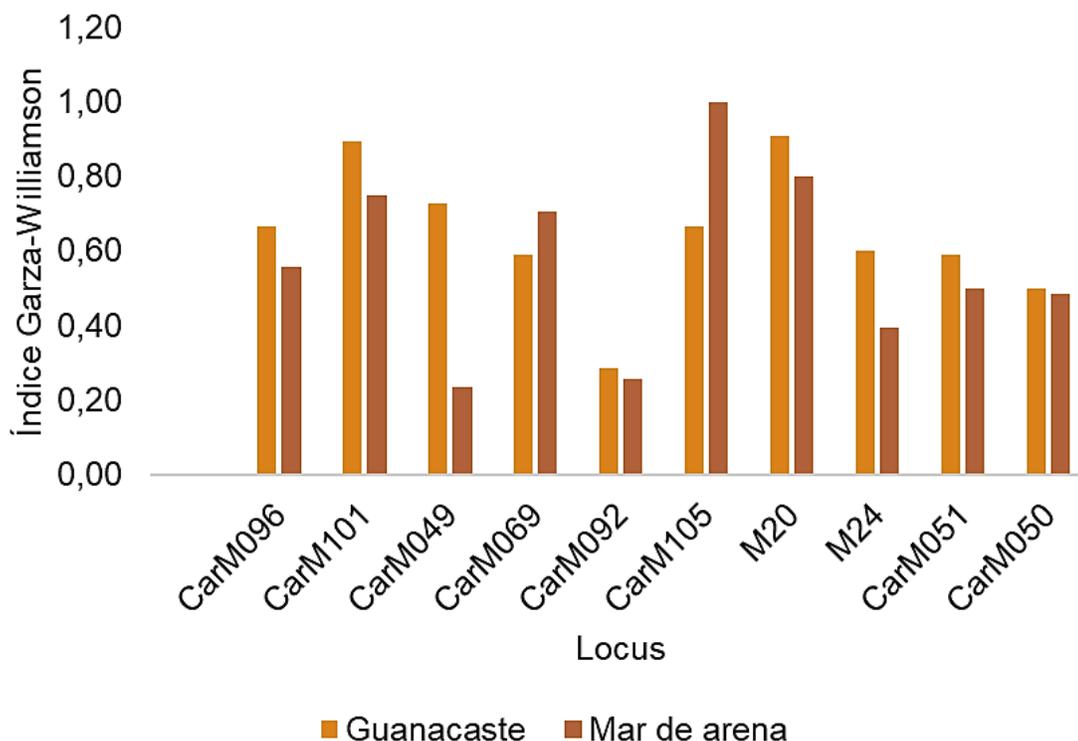


Figura 15 Índice Garza-Williamson en los 10 loci SSR evaluados para ambos lotes de la variedad en estudio.

El cuello de botella reflejado podría deberse a la influencia de uno de los progenitores de la variedad, el *C. arabica*, en el cual se ha reportado dicho acontecimiento a causa de su proceso de domesticación histórica, debido a que la mayor producción de cultivares de café en Latinoamérica se debe en gran medida a partir de la distribución del Bourbon y Typica (Scalabrin *et al.*, 2020; World Coffee Research, 2018), como consecuencia de la reducción en el tamaño de la población del arabica genera en parte su estrecha diversidad genética.

Es importante señalar que el método Garza-Williamson representa una herramienta para la conservación y el manejo de poblaciones que necesitan intervención o



recuperación, a su vez determinará si la población que ha sufrido recientemente una reducción de su variabilidad genética es más estable (Garza y Williamson, 2001), lo cual es un aspecto a considerar en el caso de los cruces realizados para la obtención de híbridos con el objetivo de obtener un mayor vigor, adaptabilidad a diferentes condiciones edafoclimáticas, resistencia a plagas y enfermedades, entre otras características de importancia en el sector de producción de café.

4.1.4.2. Variabilidad interpoblacional.

4.1.4.2.1. Análisis morfológico entre los lotes evaluados.

Antes de realizar las pruebas de Levene y t de Student se calcularon los valores estadísticos (media y desviación estándar) de las dos variables que cumplen el requisito de normalidad, en cuyos resultados se observó que para la longitud del entrenudo (en una bandola), las medias muestran no tener diferencias significativas para ambos lotes, en cambio para la longitud de las bandolas se observa que sí existen diferencias.

Tabla 17

Valores estadísticos por grupo y variables medidas en las plantas que sí cumplen con los requisitos de normalidad

Descriptor	Finca	Lote	N	Media	Desviación estándar
Longitud del entrenudo (en una bandola) [cm]	F	Guanacaste	30	4,4893	0,87
	FRC	Mar de arena	30	4,5410	0,85
Longitud de bandolas [cm]	F	Guanacaste	30	65,995	10,51
	FRC	Mar de arena	30	88,208	16,07

Una vez realizadas las dos pruebas mencionadas se obtuvieron los siguientes resultados para estas variables:



➤ Longitud del entrenudo (en una bandola)

El test de Levene (anexo 14 B, tabla 5) para analizar la igualdad de varianzas entre los dos grupos (lotes), concluye que no existen diferencias significativas entre la variabilidad de dichos grupos ($0,789 > 0,05$). De las dos soluciones para el test de medias que nos proporciona el programa, se seleccionó la primera donde se asume las varianzas iguales y se observa el estadístico t con su p-valor, cuyo dato permite tomar una decisión para la hipótesis planteada; en este caso es mayor que el nivel de significancia ($0,817 > 0,05$), por tanto, no existen diferencias significativas para la longitud del entrenudo (en una bandola) en los dos lotes, resultado que coincide con los datos estadísticos calculados anteriormente.

➤ Longitud de bandolas

En esta variable el test de Levene (anexo 14 B, tabla 5) concluye que existen diferencias significativas entre la variabilidad de los grupos ($p=0,041 < 0,05$). De las dos soluciones para el test de medias que proporciona el programa, se seleccionó la segunda, la cual realiza modificaciones para este tipo de casos. Por lo que, de la comparación de las medias de esta variable en los grupos, se obtuvo que el p-valor es menor a la significancia propuesta ($0,0001 < 0,05$), rechazando de esta manera, la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que existen diferencias significativas en la longitud de bandolas de los lotes en estudio.

Por otro lado, los resultados de este test de la U de Mann-Whitney demuestran que existen diferencias significativas (anexos 14 C, tabla 6) en ambos lotes para las variables: altura (m), diámetro del tallo (altura al pecho), longitud de ramificación, ángulo de bandolas ($^{\circ}$). Debido a que tienen p valores menores al nivel de significancia planteado ($[0,019, 0,025, 0,0001 \text{ y } 0,001] < 0,005$).

Así pues, para las variables: diámetro del tallo (Basal), longitud de la cobertura foliar, longitud del entrenudo (tallo) y número de yemas productivas por bandolas, ambos lotes presentan las mismas características, esto se debe a que tienen p-valores mayores al nivel significancia ($[0,294, 0,549, 0,063 \text{ y } 0,161] > 0,05$).



En cuanto a las características cuantitativas de la hoja, los test de normalidad de Shapiro-Wilks dan un valor de p no significativo ($p > 0,05$) en ambos grupos para las variables: longitud de la hoja, ancho de la hoja en ambos lotes; caso contrario para la longitud del peciolo foliar en donde solo uno de los lotes cumple ese supuesto. Se calcularon primeramente los valores estadísticos (media y desviación estándar) de las dos variables que cumplen el requisito de normalidad.

Tabla 18

Estadísticas por grupo y variables que sí cumplen con los requisitos de normalidad

Descriptor	Finca	Lote	N	Media	Desviación estándar
Longitud de la hoja [mm]	F	Guanacaste	30	154,4267	19,2219
	FRC	Mar de arena	30	150,5867	11,0726
Ancho de la hoja [mm]	F	Guanacaste	30	68,6000	9,1828
	FRC	Mar de arena	30	71,0933	6,0537

A través de estos resultados no se aprecia la diferenciación con exactitud y se procedió a realizar las pruebas de Levene y t de Student (anexos 14 D, tabla 8), obteniéndose los siguientes resultados:

➤ Longitud de la hoja:

A través del test de Levene se concluye que existen diferencias significativas entre la variabilidad de dichos grupos ($0,0001 < 0,05$). De las dos soluciones para el test de medias que proporciona el programa, se seleccionó la primera solución. En otras palabras, dado a que el p-valor asociado a valor t es mayor al nivel de significancia ($0,348 > 0,05$), no se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias, concluyendo que la longitud de la hoja es la misma en ambos lotes.

➤ Ancho de la hoja:

En esta variable el test de Levene concluye que existen diferencias significativas entre la variabilidad de los grupos ($0,010 < 0,05$). De las dos soluciones para el test de medias



que proporciona el programa, se seleccionó la segunda, la cual realiza modificaciones para este tipo de casos. Es decir que, de la comparación de las medias de esta variable en los grupos, se obtuvo que el p-valor es mayor a la significancia propuesta ($0,220 > 0,05$), de manera que no se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que no existen diferencias significativas en el ancho de las hojas para ambos lotes.

Finalmente, se realizó la prueba U de Mann-Whitney para la longitud de peciolo foliar con el objetivo de determinar si la mediana en ambos lotes es la misma para dicha variable, (anexos 14 E, tabla 9). De ahí que, a través de este análisis, se concluye que la longitud del peciolo foliar es diferente ($0,0001 < 0,05$) entre los lotes de las fincas F ($M = 7,9$) y FRC ($M = 11$).

El crecimiento vegetativo y reproductivo de una planta de café se ve influenciado por factores y elementos internos y externos, lo que sugiere que las plantas constituyen por unidades ecomorfofisiológicas según Fournier (2003). Esta capacidad genética les permite reaccionar al estímulo de las variaciones en las condiciones ambientales, de ahí que existan diferencias significativas entre ambos lotes en base a las variables: longitud de bandolas, altura, diámetro del tallo (altura al pecho), ángulo de bandolas, ancho de la hoja y longitud del peciolo foliar.

4.1.4.2.2. Análisis de varianza molecular (AMOVA).

El análisis AMOVA (tabla 19) se realizó en base a la varianza molecular entre ambos lotes, dentro de los lotes y entre los individuos. El mayor grado de variabilidad genética fue reflejado entre los individuos de ambos lotes con un porcentaje de variación de 59,51% ($P < 0,05$), lo cual concuerda con lo reportado por Geleta *et al.* (2012) en cuyo estudio se encontró que las poblaciones de la variedad Catimor fueron las poblaciones más diferenciadas incluso entre sí.



Tabla 19

Análisis AMOVA para ambos lotes en base a los 10 loci utilizados

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación (%)	Índices de fijación*
Entre poblaciones	1	40,671	0,28807 Va	6,06	F _{ST} = 0,06
Entre individuos dentro de poblaciones	118	720,108	1,63672 Vb	34,43	F _{IS} = 0,37
Entre individuos	120	339,50	2,82917 Vc	59,51	F _{IT} = 0,40
Total	239	1100,279	4,75396		

*Nota: Nivel de significancia = 0,05

La variación entre los lotes fue de 34,43% y 6,06 % entre ambos lotes, de modo que al analizarse con un nivel de significancia $P < 0,05$, los valores presentan diferencias significativas para las tres pruebas de diferenciación en los diferentes niveles jerárquicos.

El valor promedio del coeficiente F_{IS} es significativamente diferente de cero ($F_{IS} = 0,37$; $P < 0,05$), respaldando la presencia de endogamia entre los individuos analizados dentro de las poblaciones. Es importante añadir que otra de las razones por las cuales se observa endogamia podría deberse al proceso de obtención de la variedad, ya que según Matus, Munguía, Herrera, Rosales y Solís (1979) citado por Baylón (2020), los materiales establecidos en los campos de observación (Granada, Carazo y Masaya) fueron producto de una selección masal en la generación F4.

Por consiguiente, el método de mejoramiento por selección masal que implica escoger en cada ciclo las mejores plantas, genera endogamia, puesto que en cada generación las plantas seleccionadas estarán cada vez más emparentadas, esperando



de esa manera un incremento en el valor del coeficiente de endogamia (Márquez-Sánchez, 2018; Sahagun-Castellanos y García-Mezano, 2009). Este parámetro es muy importante debido a que aumenta la frecuencia de genes favorables para la expresión de caracteres de interés (Márquez-Sánchez, 2018). Además Contreras (2007), señala que el propósito de la endogamia es desarrollar genotipos que puedan mantenerse homogéneos de una generación a otra para ser utilizados en la producción de semilla.

Por lo que se refiere al coeficiente de endogamia total (F_{IT}), los loci de mayor valor ($F_{IT}=1,0$) fueron CarM069, M24, CarM051 y CarM50. En cambio, los loci CarM096 ($F_{IT}=-0,06$), CarM049 ($F_{IT}=-0,03$), CarM105 ($F_{IT}=-0,12$) y M20 ($F_{IT}=-0,06$) presentaron valores negativos (figura 16). De manera general, se estimó el valor promedio F_{IT} siendo significativamente diferente de cero ($F_{IT} = 0,40$; $P<0,05$) señalando una vez más que la diferenciación de las poblaciones con respecto al total se debe a la endogamia, como señala Magallán, Martínez, Hernández y Oyama (2009).

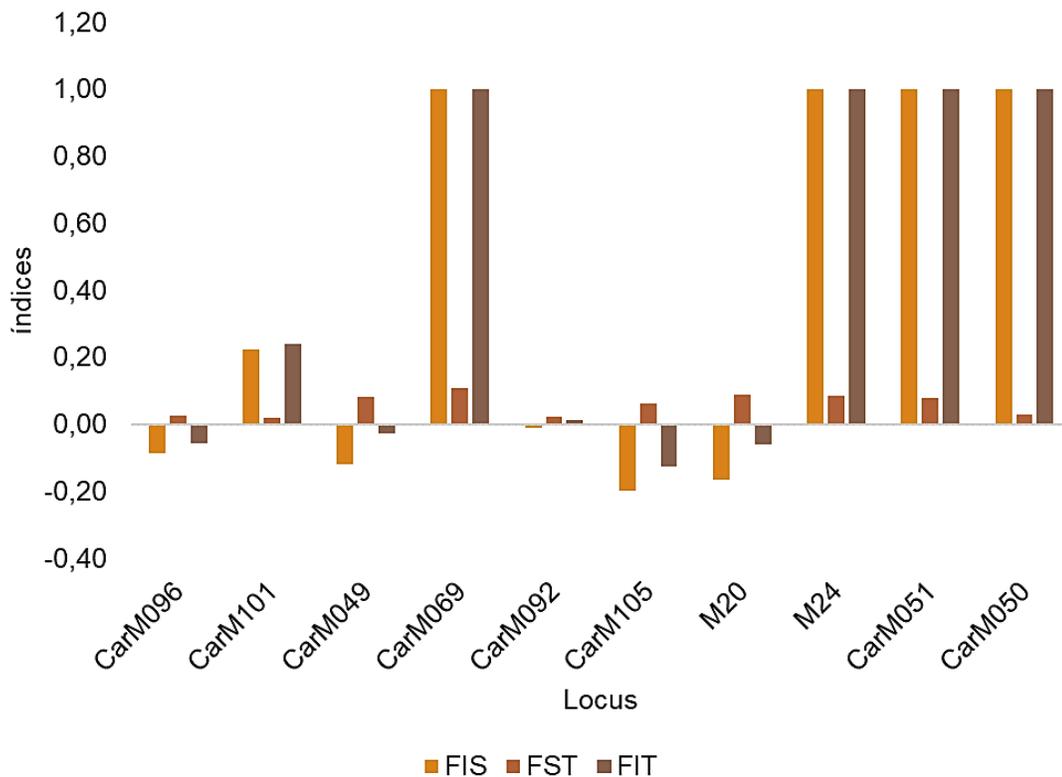


Figura 16 Índice de fijación de ambos lotes evaluados.



En cuanto al coeficiente de diferenciación genética F_{ST} , existe una ligera diferenciación genética, observándose el mayor valor en el locus CarM069 (0,11), seguido por los valores de los loci CarM049 (0,08), M20 (0,09), M24 (0,08) y CarM051 (0,08). Los valores más bajos lo presentaron los loci CarM101 (0,02), CarM096 (0,03), CarM092 (0,02) y CarM050 (0,03) (figura 16).

De manera que, el valor promedio del coeficiente F_{ST} (figura 17) fue de 0,06 lo que representa una diferenciación genética moderada cuando se encuentra entre 0,05 y 0,15, según Hartl y Clark (1997).

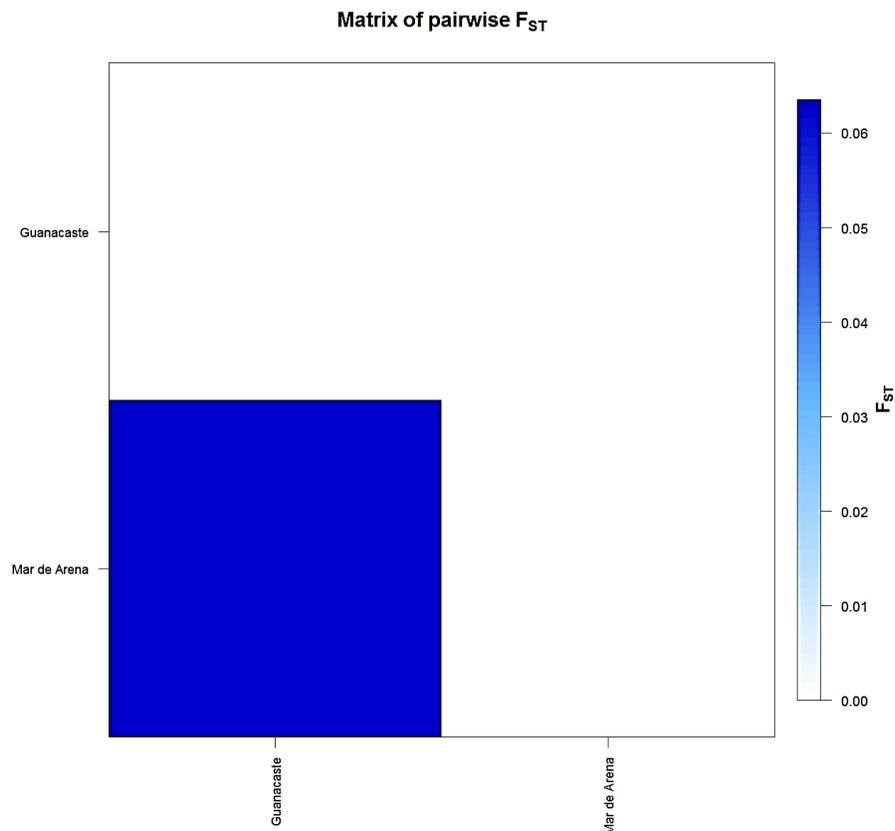


Figura 17 Coeficiente de diferenciación genética F_{ST} obtenido para ambos lotes en estudio. Fuente: obtenida a través de Arlequin versión 3.6.2.2.



CAPÍTULO V



5.1. Conclusiones

En base a la caracterización morfológica y molecular de la variedad Catrenic proveniente de las fincas CENECOOP-Fedecaruna y el Rosal, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La variedad Catrenic se caracteriza por ser una planta cónica de porte intermedio con una altura promedio de 2,58 m, hojas elípticas y brotes de color verde, con una cobertura foliar de 124 cm con bandolas de 77 cm, presenta ramificación secundaria y terciaria.
2. Catrenic posee características sobresalientes que potencian su rendimiento y capacidad productiva, entre ellas la presencia de ramificación productiva secundaria y terciaria, un diámetro basal de 3,33 cm que aporta al buen vigor de la planta, así como también bandolas largas de hasta 16 yemas productivas.
3. El perfil molecular de la variedad presentó un promedio de 14,7 alelos en base a diez marcadores microsatélites utilizados, los cuales fueron altamente polimórficos, resaltando el marcador CarM092 con 32 alelos y tamaño alélico promedio de 117, seguido por marcadores CarM096 (16,5) y CarM101 (16,0).
4. La variabilidad intrapoblacional en base a las características morfológicas cuantitativas de hojas y plantas, agrupó a los árboles en cinco grupos fenotípicos. Los conglomerados formados en base a los caracteres de las hojas incluyeron árboles de ambas fincas, condición que ocurrió únicamente en uno de las cinco agrupaciones formadas de acuerdo a los caracteres de la planta, permitiendo así una mayor diferenciación fenotípica en comparación con los caracteres de hoja evaluados.

A nivel molecular, la variedad presentó mayor heterocigosidad esperada (0,89) con respecto a la observada (0,57) indicando una población endogámica, resultado



respaldado por los coeficientes de endogamia F_{IS} (0,37) y F_{IT} (0,40), ambos significativamente diferentes de cero ($P < 0,05$). El análisis AMOVA determinó una variación de 34,43 % entre los individuos dentro de las poblaciones y 59,51 % de variación entre individuos. Además, el índice Garza-Williamson fue de 0,61 reflejando la posibilidad de que la población evaluada haya pasado por un cuello de botella recientemente.

La variabilidad interpoblacional a nivel morfológico reflejó que no existen diferencias significativas entre el lote Guanacaste (finca CENECOOP-Fedecaruna) y el lote Mar de arena (finca El Rosal) según los descriptores longitud del entrenudo (en una bandola y en tallo), longitud de la cobertura foliar, diámetro del tallo (basal) y número de yemas productivas. En cambio, se encontraron diferencias significativas para los descriptores longitud de las bandolas, altura, diámetro del tallo (DAP), longitud de ramificación productiva, ángulo de bandolas, longitud y ancho de la hoja, así como también en la longitud de cobertura foliar.

A nivel molecular, a través del análisis AMOVA se encontró una diferenciación genética moderada entre las poblaciones con una variación de 6,06 % y un coeficiente de diferenciación genética F_{ST} de 0,06 significativamente diferente de cero ($P < 0,05$).

5. El análisis de la variabilidad intrapoblacional e interpoblacional permitió aceptar la hipótesis planteada.



5.2. Recomendaciones

Al INTA:

1. Complementar los resultados de la investigación con la caracterización morfológica de flores y frutos de la variedad para dar seguimiento a las plantaciones evaluadas.
2. Evaluar el efecto de las condiciones edafoclimáticas en futuras caracterizaciones morfológicas y moleculares de variedades de café.
3. Ejecutar estudios de segregación y flujo de genes para evaluar diversidad genética obtenidas en la descendencia por semilla.

Al Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua:

4. Continuar la caracterización de la variedad mediante la colecta de material existente en otras zonas del país, así como también del resto de variedades de café cultivadas, para conocer la calidad del germoplasma existente.
5. Asegurar que la caracterización se realice en plantaciones de 5 a 10 años de edad.
6. Secuenciar los marcadores más polimórficos a fin de tener una estimación más clara.
7. Construir una genoteca con el objetivo de disponer de patrones que puedan servir para futuras identificaciones.



5.3. Bibliografía

- Abadie, T., and A. Berretta. 2001. "Caracterización y Evaluación de Recursos Fitogenéticos." Pp. 88–95 in *Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur*. Montevideo: PROCISUR.
- Anacafé. 2019a. "Enfermedades Del Cultivo." 4–5. Retrieved January 4, 2019 (https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Enfermedades_del_cultivo).
- Anacafé. 2019b. "Guía de Variedades de Café Guatemala." 49.
- Anthony, F., C. Astorga, and J. Berthaud. 1999. "Los Recursos Genéticos : Las Bases de Una Solución Genética a Los Problemas de La Caficultura Latinoamericana." *Desafío De La Agricultura En Centroamerica* (November 2015):369–406.
- Arcila, Jaime. 2007. "Crecimiento y Desarrollo de La Planta de Café." Pp. 21–60 in *Sistemas de producción de café en Colombia*. Chinchiná.
- Arciniegas, Adriana. 2005. *CARACTERIZACIÓN DE ÁRBOLES SUPERIORES DE CACAO (THEOBROMA CACAO L.) SELECCIONADOS POR EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CATIE*. Turrialba.
- Argüello, Jecsa. 2012. "Caracterización Molecular de 52 Accesiones de Yuca (Manihot Esculenta Crantz) Usando Nueve Marcadores Tipo SSR, CNIAB-INTA, Nicaragua." Universidad Nacional Agraria.
- Arias, S., M. Arias, and Z. Gutiérrez. 1976. "Relaciones Entre Las Características Morfológicas y La Producción En Cinco Cultivares de Café (Coffea Arabica L.)."
- Balladares Valdivia, Deyling Dodany, and José Manuel Calero Moraga. 2005. "Efecto de La Sombra y Fertilización Sobre El Crecimiento, Estructura Productiva, Rendimiento y Calidad Del Café (Coffea Arabica) Variedad Costa Rica 95." 82.
- Baylon, M., and W. Pizzi. 1994. "Variedades de Café En Nicaragua."
- Baylón, Marisol. 2020. "Genealogía y Obtentores de La Primera Variedad de Café (Coffea Arabica L.) Catrenic Seleccionada En Nicaragua." *LA CALERA* 20(34):29–



34.

- BCN. 2019. *Plan de Producción, Consumo y Comercio 2019-2020*. Managua, Nicaragua.
- Bertrand, B., G. Aguilar, R. Santacreo, and F. Anzueto. 1999. "El Mejoramiento Genético En América Central." Pp. 407–56 in *Desafíos de la Caficultura en Centroamérica*. San José: IICA.PROMECAFE.CCRR.FRANCIA.
- Bertrand, Benóit, and Bruno Rapidel. 1999. *Desafíos de La Caficultura En Centroamerica*. San José: IICA.PROMECAFE.
- Bettencourt, A. 1985. "Características Agronómicas de Selecciones Derivadas de Cruzamientos Entre El Híbrido de Timor y Las Variedades Caturra, Villasarchi y Catuaí." *Boletín Promecafé No.28 No.28*.
- Biodiversity International. 2018. "Bioversity International Overview of Our History from 1974-Today." Retrieved May 18, 2018 (<https://www.biodiversityinternational.org/about-us/who-we-are/history/>).
- Blanco, M. 1984. "Cultivos Industriales." 211.
- Blanco, Moisés, Jeremy Haggar, Pedro Moraga, Jazmín Madriz, and Giovanny Pavón. 2013. "Morfología Del Café (*Coffea Arabica* L.), En Lotes Comerciales . Nicaragua." *Agronomía Mesoamericana* 14(1):97.
- Bolaños, M. 2005. "Ensayos de Sistemas de Café. La Calidad Del Café Durante Los Primeros Años Del Ensayo Ciclo Cafetalero 2004/2005."
- Bramardi, S. 2002. "Análisis Multivariado. Su Aplicación En La Caracterización de Recursos Genéticos." 60.
- Campos, O. 2015. "Manejo Integrado de La Roya Anaranjada *Hemileia Vastatrix* Berk et Br. Boletín Técnico CEDICAFÉ (Centro de Investigación En Café)." 19.
- Cárdenas, Severo Ignacio. 2007. "Caracterización Morfológica y Agronómica de La Colección Núcleo de Café (*Coffea Arabica* L.) Del CATIE." CATIE.
- Carvajal, J. 1984. *Cafeto-Cultivo Y Fertilización*. 2da ed. Suiza.



- CeCalcula. 2013. "Clases de Marcadores Moleculares. Bioinformática." P. 28 in, edited by RedClara. Venezuela: Universidad de los Andes.
- CENICAFÉ. 2013. *Manual Del Cafetero Colombiano. Tomo I.* Colombia: CENICAFE.
- CICAFE. 2011. "Guía Técnica Para El Cultivo Del Café." 72.
- Clifford, Michael, and Ken Willson. 1985. *Coffee. Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage.* Wesport: THE AVI PUBLISHING COMPANY.
- Combes, M. C., S. Andrzejewski, F. Anthony, B. Bertrand, P. Rovelli, G. Graziosi, and P. Lashermes. 2000. "Characterization of Microsatellite Loci in *Coffea Arabica* and Related Coffee Species." *Molecular Ecology* 9(8):1178–80.
- Comité Técnico de Café. 2019. *Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense. Café Verde. Clasificaciones y Especificaciones de Calidades. NTON 03 025-11. Segunda Revisión.* Managua: MIFIC.
- Contreras, Mayra. 2007. "Efecto de Una Generación de Endogamia Sobre Caracteres Vegetativos y Productivos En Yuca (*Manihot Esculenta* Crantz)." Universidad Nacional de Colombia.
- Contreras, Patricia. 2013. "Variedades de Café En Nicaragua." 69.
- Corrales, C., and O. Chevez. 1993. "Efecto de Cultivo Intercalado de Frijol (*Phaseous Vulgaris* L.) En Diferentes Épocas de Siembra Sobre Ls Maleas y El Cafeto (*Coffea Arabica* L.)." 61.
- Cortez, Gustavo, and Jonathan Tercero. 2014. "Efecto de Tres Láminas de Riego Por Goteo En Época Seca Sobre El Estímulo de La Floración y Producción de Café (*Coffea Arábica* L. Var. CATRENIC), Finca San Dionisio, San Marcos, Carazo 2013." UNA.
- Cortez, H. 1987. "Diferentes Métodos Para El Control Del Crecimiento, Desarrollo y Su Influencia En La Producción." 59.
- Couch, J., and P. Fritz. 1990. "Isolation of DNA from Plant High in Polyphenolics." *Molecular Biology Reports* 8:8–12.



Cuadras, Susanna. 2016. "Nicaragua. Café Origen." *Forum Del Café* 12.

Cubry, Philippe, Pascal Musoli, Hyacinte Legnaté, David Pot, Fabien de Bellis, Valérie Poncet, François Anthony, Magali Dufour, and Thierry Leroy. 2008. "Diversity in Coffee Assessed with SSR Markers: Structure of the Genus *Coffea* and Perspectives for Breeding" edited by F. Belzile. *Genome* 51(1):50–63.

Duarte, Henry. 2015. "Evaluación de Indicadores Agroecológicos En El Cultivo de Café (*Coffea Arabica* L.) Var. CATRENIC, Bajo Riego Complementario Por Goteo a Pleno Sol y Micro Aspersión Bajo Sombra, San Marcos, Carazo, Nicaragua, 2013-2014."

Echeverri, J. 1980. "Fitomejoramiento Genético Del Café Con Énfases En Resistencia a La Roya (*Hemileia Vastatrix* Berk & Br.) En México, Centroamérica y Panamá." 93.

Engelmann, Florent, M. Dulloo, C. Astorga, S. Dussert, and F. Anthony. 2007. *Conserving Coffee Genetic Resources: Complementary Strategies for Ex Situ Conservation of Coffee (Coffea Arabica L.) Genetic Resources: A Case Study in CATIE, Costa Rica.*

Excoffier, Laurent, Guillaume Laval, and Stefan Schneider. 2005. "Arlequin (Version 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis." *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.

Falk, D., and K. Holsinger. 1991. *Genetics and Conservation of Rare Plants.* edited by D. Falk and K. Holsinger. New York: Oxford University Press.

FAO. 2001. "Políticas y Programa de Semillas En América Latina y El Caribe." 233.

FAO. 2009. *LA SITUACIÓN DE LOS RECURSOS ZOOGENÉTICOS MUNDIALES PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA - Marcadores Moleculares: Una Herramienta Para Explorar La Diversidad Genética.*

Flores, Ricarte. 2019. "Caracterización Genética de Tres Variedades de *Coffea Arabica* L. (Caturra, Pache y Nacional) En Seis Parcelas de La Provincia de Moyobamba, Región San Martín." Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

FNC. 2014. "El Arbol y El Entorno | Café de Colombia." Retrieved November 16, 2019 (http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_arbol_y_



el_entorno/).

Fournier, Luis. 2003. "Equilibrio Ambiental." Pp. 18–42 in *Recursos Naturales*, edited by EUNED. San José.

Franco, Tito, and Rigoberto Hidalgo. 2003. "Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos." 89.

Frankham, Richard, Jonathan Ballou, and David Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

García, Armando. 2010. "Algunas Características Importantes de Las Variedades Más Conocidas En Guatemala."

Garriz, P., and R. Vicuna. 1990. "Variación Anuales En El Crecimiento Vegetativo y La Arquitectura de Canopea de *Coffea Arabica* L. Variedad Caturra Rojo." 30.

Garza, J. C., and E. G. Williamson. 2001. "Detection of Reduction in Population Size Using Data from Microsatellite Loci." *Molecular Ecology* 10(2):305–18.

Geleta, Mulatu, Isabel Herrera, Arnulfo Monzn, and Tomas Bryngelsson. 2012. "Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea Arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers." *The Scientific World Journal* 2012.

Gómez, Rene. 2014. "Guía Para Las Caracterizaciones Morfológicas Básicas En Colecciones de Papas Nativas . Introducción." 1(December): <https://www.researchgate.net/publication/267991711>.

González, E. G. 2003. "Microsatélites: Sus Aplicaciones En La Conservación de La Biodiversidad." *Graellsia* 59(2–3):377–88.

González, Edna. 2011. "Análisis de La Diversidad Genética En Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex Perado* SSP. *Lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene Noctelens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus Aria* (Rosaceae)." Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Google Earth Pro. 2020. "Map of Geographic Location."



- Gorgonio, Montserrat, Ricardo Clark, Jorge Campos, Alejandro Montalvo, and Cecilia Liana Alfonso. 2017. "Diversidad y Estructura Genética de *Quercus Crassifolia* En Sitios de Manejo Forestal y Uso Local En Sierra Juárez, Oaxaca." *Madera y Bosques* 23(2):85–98.
- Guedes, Ricardo. 2003. "Comportamiento Agronómico de Ocho Variedades Café Arábica (*Coffea Arábica* L.) En La Zonas de Quevedo (Provincias de Los Ríos) y Guala (Provincia de Pichincha)." Universidad Técnica de Babahoyo.
- Hair, J., R. Anderson, R. Tatham, and W. Black. 1992. "Multivariate Data Analysis." 544.
- Hartl, Daniel, and Andrew Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sinauer Associates.
- Hernández, Alejandra, and Flor Trejo-Medina. 2014. "Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas Para 15 Marcadores STR Presentes En La Obtención Del Estado de Zacateca Aplicado a La Práctica Forense." *IMedPub Journals* 10(1:1):1–24.
- Hernández, Fabiola, Mahinda Martínez, Luis Hernández, and Ken Oyama. 2009. "Estructura Genética de Poblaciones de *Eriocaulon Bilobatum* (Eriocaulaceae): Una Especie Amenazada de Humedades Temporales." *Boletín de La Sociedad Botánica de México*. N° 85.
- Hernández Sampieri, Roberto, Carlos Fernández-Collado, and Pilar Baptista Lucio. 2006. *Metodología de La Investigación*. 4ta edició. edited by McGRAW-HILL. Obregón.
- IBM Corp. 2017. "IBM SPSS Statistic for Windows, Version 25.0."
- ICO. 2018. "International Coffee Organization - Aspectos Botánicos." *Aspectos Botánicos*. Retrieved December 5, 2019 (http://www.ico.org/es/botanical_c.asp?section=Acerca_del_caf%E9).
- IICA-PROMECAFE. 1984. "IV Reunión Regional de Mejoramiento de Café."
- IICA-PROMECAFE. 1988. "PROMECAFE: Diez Años de Labores 1978-1989." 176.
- IICA-PROMECAFE. 1990. "Curso Regional Sobre La Caficultura Moderna-Módulo II."



263.

- IICA-PROMECAFE. 1993. "XVI Simposio Sobre Caficultura Latinoamericana." 145.
- IICA. 2004. *Cadena Agroindustrial Del Café En Nicaragua*.
- INATEC. 2016. "Manejo Integrado de Plagas." 87.
- InfoAgro. 2019. "El Cultivo Del Café. 4ª Parte." 4. Retrieved January 3, 2019 (<https://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/cafe4.htm>).
- IPGRI. 1996. "Descriptors for IPGRI International Plant Genetic Resources Institute IPGRI Coffee (*Coffea* Spp. and *Psilanthus* Spp.)." 36.
- ISO. 2015. *ISO 9000:2015. Quality Management Systems-Fundamental and Vocabulary*. Fourth edi. ISO.
- Jobes, David, David Hurley, and Leonard Thien. 1995. "Plant DNA Isolation: A Method to Efficiently Remove Polyphenolics, Polysaccharides, and RNA." *Taxon* 44(3):379–86.
- Kim, Kyung, and Thomas Sappington. 2013. "Microsatellite Data Analysis for Population Genetics." Pp. 271–95 in *Entomology Publications*. Iowa: Iowa State University.
- Külh, Eddy. 2004. *Nicaragua y Su Café*.
- Läderach, Peter, and Maria Baca. 2013. "Tecnologías Agrícolas Para Los Medios de Vida de Los Productores de Café En Nicaragua." 183.
- León, Jorge. 2000. *Botánica de Los Cultivos Tropicales - Jorge León - Google Books*.
- Leroy, Thierry, Fabienne Ribeyre, Benoit Bertrand, Pierre Charmetant, Magali Dufour, Christophe Montagnon, Pierre Marraccini, and David Pot. 2006. "Genetics of Coffee Quality." *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(1):229–42.
- Lodhi, M., N. Weeden, and B. Reisch. 1994. "A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species." *Molecular Biology Reports* 12:6–13.
- M&O Consulting S.A.C. 2009. "Estudio de Caracterización Del Potencial Genético Del Cacao En El Perú." 152.



MAG. 2019. "Plan Nacional de Producción Consumo y Comercio 2019-2020." 67.

MAGFOR. 2013. "El Café En Nicaragua."

Márquez-Sánchez, Fidel. 2018a. "Influencia de La Endogamia Sobre La Respuesta Teórica a Largo Plazo En La Selección Masal En El Maíz." *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(11):2115.

Márquez-Sánchez, Fidel. 2018b. "Influencia de La Endogamia Sobre La Respuesta Teórica a Largo Plazo En La Selección Masal En El Maíz." *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(11):2115.

Martínez, María, Marcelo Helguera, and Alicia Carrera. 2010. "Capítulo 5. Marcadores Moleculares." P. 96 in *Biotecnología y Mejoramiento vegetal II*, edited by G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, and L. Mroginski. Buenos Aires.

Matus, Henry, Rodolfo Munguía, Mario Herrera, Orontes Rosales, and Marvin Solís. 1979. "Primera Evaluación de Características Agronómicas de 23 Progenies Provenientes de Tres Cultivares Con Resistencia." Pp. 8–17 in *II Simposio Latinoamericano sobre caficultura*, edited by OEA. Garnica: IICA-PROMECAFÉ.

McLay, Todd GB. 2017. "High Quality DNA Extraction Protocol from Recalcitrant Plant Tissues."

Mestre, Alfonso, and Héctor Opsina. 1994. *Manejo de Los Cafetales Para Estabilizar La Producción En Las Fincas Cafetaleras*. Colombia.

Minitab. 2019. "Minitab 19 Statistical Software."

Moncada, Pilar, and Susan McCouch. 2004. "Simple Sequence Repeat Diversity in Diploid and Tetraploid *Coffea* Species." *Genome* 47(3):501–9.

Mondragón, Juan. 2018. "Seguimiento Técnico de La Empresa RAMAC (Rappaccioli, McGregor S.A.) a Los Productores de Café (*Coffea Arabica* L.) En El Departamento de Carazo y Granada a Través Del Programa Agro Amigo." 33.

Montalvo, Juan, and Mónica Villalva. 2017. "International Coffee Organization - Historia Del Café." 23 Mayo 3. Retrieved January 20, 2019 (<http://www.ico.org/>)



ES/coffee_storyc.asp).

NHGRI. 2019. "Marcador Genético." Retrieved December 15, 2019 (<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Marcador-genetico>).

Nicafés. 2019. *INSTITUCIONALIDAD DEL SECTOR CAFÉ EN NICARAGUA*. Managua, Nicaragua.

Orozco, Edin, and Carlos Hernández. 2017. "Selección de Cultivares de Café (*Coffea Arabica* L.) Adaptados a Las Regiones Cafetaleras de Guatemala Basados En Caracteres Agromorfológicos, Resistencia a Plagas, Enfermedades y Calidad de Taza." 77.

Peña, Daniel. 2014. *Fundamentos de Estadística*. 2da ed. edited by Alianza. Madrid.

Picó, María, and Cristina Estera. 2012. *Marcadores Moleculares Basados En PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats or Short Tandem Repeats). Microsatélites*. Valencia.

PROMECAFE. 1996. *Guía Para La Caficultura Ecológica*. Lima.

R Core Team. 2019. "R: A Language and Environment for Statistical Computing Version 3.6.1."

Richards, E., M. Reichardt, and S. Rogers. 1994. "Preparation of Genomic DNA from Plant Tissue." Pp. 231–37 in *Current protocols in molecular biology*. New York.

Rodríguez, Celerino, David Munro, and Victor Hugo. 2009. *Paquete Tecnológico Para El Cultivo Del Café Orgánico En El Estado de Colima*. Colima.

Rosenthal, G., and D. Janzen. 1979. *Herbivores, Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. New York.

Sadazawka, Angélica, María Carrasco, Rolando Demanet, Hugo Flores, Renato Grez, María Mora, and Alexander Neaman. 2007. "Métodos de Análisis de Tejidos Vegetales. Segunda Edición. Serie Actas INIA N°40." 140.

Sahagun-Castellanos, J., and F. García-Mezano. 2009. "El Coeficiente de Endogamia de



Una Población Bajo Selección Masal.” *Agrociencia* 43(2):119–32.

Samson, Nalapalli, Michael G. Bausher, Seung-bum Lee, and Robert K. Jansen. 2007. “The Complete Nucleotide Sequence of the Coffee (*Coffea Arabica* L.) Chloroplast Genome: Organization and Implications for Biotechnology and Phylogenetic Relationships amongst Angiosperms.” *NIH* 5(2):339–53.

Sánchez, Elodia. 2017. “Evaluación de Microsatélites Para La Identificación Del Germoplasma de Especies Del Género *Coffea* En Costa Rica.” 77.

Sanín, María, Patricia Zapata, Jean Pintaud, Gloria Galeano, Adriana Bohórquez, Joseph Tohme, and Michael Møller. 2017. “Up and Down the Bind Alley: Population Divergence with Scant Gene Flow in an Endangered Tropical Lineage of Andean Palms (*Ceroxylon* Quindiuense Clade: *Ceroxyloideae*).” *Journal of Heredity* 108(3):288–98.

Santacreo, Rodney. 2012. “Variedades y Mejoramiento Genético Del Café.” Pp. 24–40 in *Manual de caficultura*, edited by IHCAFE. Honduras.

Scalabrin, Simone, Lucile Toniutti, Gabriele Di Gaspero, Davide Scaglione, Gabriele Magris, Michele Vidotto, Sara Pinosio, Federica Cattonaro, Federica Magni, Irena Jurman, Mario Cerutti, Furio Suggi Liverani, Luciano Navarini, Lorenzo Del Terra, Gloria Pellegrino, Manuela Rosanna Ruosi, Nicola Vitulo, Giorgio Valle, Alberto Pallavicini, Giorgio Graziosi, Patricia E. Klein, Nolan Bentley, Seth Murray, William Solano, Amin Al Hakimi, Timothy Schilling, Christophe Montagnon, Michele Morgante, and Benoit Bertrand. 2020. “A Single Polyploidization Event at the Origin of the Tetraploid Genome of *Coffea Arabica* Is Responsible for the Extremely Low Genetic Variation in Wild and Cultivated Germplasm.” *Scientific Reports* 10(1):4642.

Shepherd, Lara, and Todd McLay. 2011. “Two Micro-Scale Protocols for the Isolation of DNA from Polysaccharide-Rich Plant Tissue.” *Journal of Plant Research* 124(2):311–14.

Solíís, Laura, and Antonio Andrade. 2005. “¿Qué Son Los Marcadores Moleculares?” *La Ciencia y El Hombre* XVIII:41–48.



- Solórzano, Roger. 2005. "Condiciones Edafo-Climáticas, Morfología y Propagación de Las Plantas. Módulo de Aprendizaje." 1 era:39.
- Sosa, P., F. Batista, M. González, and N. Bouza. 2002. "La Conservación Genética de Las Especies Amenazadas." Pp. 133–60 in *Biología de la conservación de plantas amenazadas: Técnicas de diagnóstico del estado de conservación.*, edited by Á. Bañares, E. Carque, and M. Marrero. España: Organismo Autónomo de Parques Nacionales.
- Southern, E. 1979. "Measurement of DNA Length by Gel Electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 100(2):319–23.
- Suárez, Aurora, and Jaime Picado. 2009. "Comportamiento Agronómico, Fitosanitario y Calidad de Grano de Tres Híbridos y Cuatro Variedades Comerciales de Café (*Coffea Arabica* L) Agroforestal En Masatepe, Nicaragua." 80.
- Suárez, Aurora, Jaime Picado, Rodolfo Murguía, and Jeremy Haggar. 2010. "COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO Y CALIDAD DEL GRANO DE SIETE CULTIVARES DE CAFÉ MANEJADO BAJO SOMBRA, MASATEPE, NICARAGUA." *La Calera* 10(15):28–35.
- Suárez, F., L. Montenegro, C. Aviles, M. Moreno, and M. Bolaños. 1961. "Efeco Del Sombrío En Los Primeros Años e Vida de Un Cafetal." *Café de El Salvador* 31:17–350.
- Tarieiev, Andrii. 2015. "Which Part of the Plant Is Most Preferred for DNA Isolation?" *Foro En Línea*. Retrieved May 17, 2020 (https://www.researchgate.net/post/Which_part_of_the_plant_is_most_preferred_for_DNA_isolation).
- UPOV. 2018. "What Is UPOV? - UPOV." Retrieved May 18, 2018 (<https://www.upov.int/overview/en/upov.html>).
- Vallejo, Franco, and Edgar Estrada. 2013. *Mejoramiento Genético de Plantas*. 2da ed. Cali: Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira.
- Vía, Romina, and Rada Fernández. 2015. "Determinación de La Diversidad Genética de



172 Accesiones de La Colección Nacional de *Chenopodium Quinoa* Willd. 'QUINUA' Mediante Marcadores Microsatélites." Universidad Ricardo Palma.

Vieira, Elisa S. N., Édila V. d. R. Von Pinho, Maria G. G. Carvalho, Danny G. Esselink, and Ben Vosman. 2010. "Development of Microsatellite Markers for Identifying Brazilian *Coffea Arabica* Varieties." *Genetics and Molecular Biology* 33(3):507–14.

Villalta-Villalobos, Jimmy, and Andrés Gatica-Arias. 2019. "Una Mirada En El Tiempo: Mejoramiento Genético de Café Mediante La Aplicación de La Biotecnología 1 A Look Back in Time: Genetic Improvement of Coffee through the Application of Biotechnology." *Agronomía Mesoamericana* 30(2):23.

Villegas, Andrés. 2010. "Bases Genéticas, Moleculares y Predicción de La Heterosis En Una Especie Aloploide Autógama (*Coffea Arabica* L.)." Universidad de Caldas.

Wilches, Aida. 2004. "Descripción de Algunas Herramientas Moleculares y Sus Aplicaciones." 31.

World Coffee Research. 2018. "Arabica Coffee Varieties-A Global Catalog of Varieties." 72.

Wright, Sewall. 1969. *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol. 2. Chicago: University of Chicago Press.

Zelaya, Francisco, and Cristian Sotelo. 2000. "Manejo de La Fertilización Orgánica e Inorgánica En El Cultivo Del Café (*Coffea Arabica* L.), En Dos Años Consecutivos (1998/1999)." 63.



ANEXOS

Anexo 1: Glosario

A

ADN no codificante: Las secuencias no codificantes de ADN no codifican para aminoácidos. La mayor parte del ADN no codificante se encuentra entre los genes en el cromosoma y no tiene función conocida. Otras secuencias de ADN no codificantes, llamadas intrones, se encuentran dentro de los genes. Parte del ADN no codificante desempeña un papel en la regulación de la expresión génica.

Alelo: es la secuencia de ADN en una ubicación cromosómica específica, que se presenta como una variante o forma alternativa de un gen.

Alelo dominante: designado por una letra mayúscula (como “B”), muestra el fenotipo que codifica a través de su presencia en ambas copias de genes o enmascarando la expresión de un segundo alelo recesivo distinto en el mismo locus.

Alelo recesivo: designado por una letra minúscula (como “b”), expresa su fenotipo asociado sólo cuando se empareja con otro alelo recesivo.

Autogamia: corresponden a las plantas que realizan autopolinización y autofecundación.

B

Bandola: cada una de las ramas que nacen del tronco o tallo principal de la planta y en las cuales brotan hojas, flores y frutos.

C

Chupones: vástago que brota en las ramas laterales, en el tronco y en las raíces de los árboles.

Cruza Natural: Polinización cruzada generalmente bajo condiciones naturales, cuya constitución genética es diferente.

Codominancia: es una relación entre dos versiones de un mismo gen, de manera que ningún alelo es recesivo y el fenotipo de ambos alelos es expresado.

Cuello de botella: reducción del tamaño poblacional que provoca la disminución de la diversidad genética de las poblaciones e intensifica la deriva genética.

Cultivo promisorio: es la plantación con potencial de adaptación al cambio climático. Engloba variedades que juegan un papel importante en la agricultura y alimentación, incluyendo los que son resistentes a condiciones climáticas extremas representando de esta manera, una alternativa para mejorar la productividad del cultivo en cuestión.

D

Deleción: pérdida del material genético que puede ser desde un solo par de nucleótidos de ADN hasta todo un fragmento de cromosoma. Es un tipo de mutación genética.

Diversidad Genética: Biodiversidad genética implica variación en los genes de una especie. Se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. Es el resultado de las diferencias que existen entre las distintas versiones (alelos) de las unidades de herencia (genes) de los individuos de una especie. En la diversidad genética, la composición genética de una especie difiere entre los individuos y se puede recombinar diversa para producir una nueva generación.

Diversidad de Especies: Abundancia relativa de especies.

Diversidad Ecológica: La diversidad ecológica se define como la variedad de comunidades biológicas o ecosistemas en un área determinada. Todos los diferentes hábitats y comunidades biológicas son considerados, así como las variaciones dentro de los ecosistemas individuales.

Diversidad funcional: La diversidad funcional es la variedad de respuestas de las especies a los cambios ambientales. Una baja diversidad funcional, que significa que el ecosistema no es estable, ya que algunas especies pueden no reaccionar bien a la

tensión ambiental, mientras que la diversidad funcional de los medios que la comunidad en su conjunto es estable y puede responder y adaptarse bien a los cambios.

Drupa indehiscente: es un tipo de fruto que posee una parte carnosa exterior que rodea el endocarpio con una semilla en su interior, de manera que no se abren espontáneamente para liberar semillas, debido a que el fruto y la semilla se dispersan conjuntamente.

E

Endogamia: es el cruzamiento entre individuos de una misma raza, comunidad o población.

Entrenudo: parte del tallo o de las bandolas comprendidas entre dos nudos consecutivos donde crecerán hojas, flores y frutos.

Epistasis: cuando la expresión de un gen se ve afectada por la expresión de uno o más genes heredados de forma independiente.

Especie: son grupos de poblaciones naturales, actual o potencialmente entrecruzables, los cuales están reproductivamente aisladas de otros grupos similares.

F

Fenotipo: son los rasgos físicos/observados determinados o expresados por un genotipo dado.

Fitomejoramiento: es una técnica de mejoramiento genético de plantas mediante la cual se realizan cruces entre variedades para mejorar sus características, generando plantas más resistentes y productivas.

G

Genoteca: es una colección de clones de ADN reunidos con el objetivo de disponer de una fuente de ADN para realizar análisis funcionales.

Genotipo: es la composición genética de un organismo, es decir su conjunto completo de genes.

Germoplasma: se utilizar el genoma de las especies vegetales silvestres y no modificadas genéticamente de interés para la agricultura. Está conformado por un conjunto de genes conservados a través de semillas, cultivo de tejidos o plantas establecidas en colecciones de campo.

H

Herencia: la trasmisión de caracteres genéticos de los progenitores, a la progenie; los caracteres genéticos transmitidos a un individuo a sus progenitores.

Heterocigoto: un individuo que tiene dos alelos diferentes para el mismo rasgo, con uno codominante sobre el otro alelo recesivo (Bb).

Híbrido: la primera generación de la descendencia de una cruce entre dos individuos que difieren en 1 o más genes.

Homocigoto: individuo con dos copias del mismo alelo, ya sea dominante (BB) o recesivo (bb).

I

In silico: expresión que significa "hecho por computadora o vía simulación computacional", es decir, hecho o producido mediante el uso de programas informáticos.

In situ: expresión referente a "en el sitio" o "en el lugar" utilizada para referirse a un fenómeno observado, medido o manipulado en el lugar.

L

Líneas Isogénicas: Líneas que difieren genéticamente en sólo un locus o muy pocos loci. Las líneas homocigóticas, los clones y los gemelos son idénticos en todos los loci.

Locus: una ubicación cromosómica específica, puede referirse a la ubicación de un gen en un cromosoma o a un elemento de secuencia específico.

Loci: es el plural de locus.

M

Marcador genético: un polimorfismo del ADN que se puede detectar fácilmente mediante análisis fenotípico o molecular. El marcador puede hallarse dentro de un gen o en un ADN sin función conocida.

Mutación: Una variación inesperada en el material hereditario de una célula.

Mutante: Un organismo que ha adquirido una variación hereditaria como el resultado de mutaciones.

N

Nudo: parte de tronco y ramas de una planta, por la cual salen nuevas ramas y emergen los brotes.

O

Ortotrópico: Crecimiento del tallo principal hacia arriba en el cafeto, en busca de aire y luz.

P

Peciollo: parte de la planta que une la hoja con la rama (bandola) o tallo.

Plagiotrópico: crecimiento horizontal de ramas en la planta de café.

Polimorfismos: uno de dos o más variantes de una secuencia particular de ADN. Se distingue de una variante poco común que puede ocurrir en sólo una de cada 1000 personas.

R

Resiliencia: en cultivos, es la capacidad que presentan para resistir un impacto y recuperarse rápidamente tras el mismo.

Retrocruzamiento: es el cruce realizado entre un individuo descendiente híbrido de primera generación con uno de los padres o con un genotipo idéntico al paterno. Se utiliza para determinar si el individuo es homocigoto o heterocigoto.

Región flanqueante: es la región polimórfica o marcador identificable del ADN que se encuentra localizado en un gen, son utilizados en el análisis de ligamiento para analizar la herencia del gen en cuestión.

V

Variabilidad genética: se refiere a las diferencias entre individuos o entre poblaciones, originadas por mutaciones, aunque la reproducción sexual y deriva genética contribuyen a la presencia de variabilidad.

Variedad: Una subdivisión de una especie. Una variedad agronómica es un grupo de plantas semejantes, que por características de estructura y comportamientos se pueden diferenciar de otras variedades dentro de la misma especie.

Variedad de introgresión: son aquellas que poseen algunos rasgos genéticos de otra especie.

Vigor híbrido: se le conoce también como heterosis, hace referencia a la presencia de mayor velocidad de desarrollo y fertilidad, biomasa, tolerancia a estrés biótico y abiótico con respecto a los progenitores de un individuo.

Vigor vegetativo: se caracteriza por la capacidad de crecimiento de la planta, medido contra la superficie foliar y grosor del tallo.

Y

Yema: brote embrionario de los vegetales constituidos por esbozos foliares en el que se desarrollarán ramas, hojas y flores.

Anexo 2: Café arábica vs robusta

Tabla 1

Diferencias entre el café arábica y el robusta

Característica	Arábica	Robusta
Fecha de descripción de la especie	1753	1895
Cromosomas (2n)	44	22
Tiempo que tarda desde la flor hasta la cereza madura	9 meses	10 – 11 meses
Floración	Después de las lluvias	irregular
Cerezas maduras	caen	quedan
Rendimiento (kg granos/ha)	1500 - 3000	2300 - 4000
Raíz	profunda	Poco profunda
Temperatura óptima (media anual)	15°C – 24°C	24°C – 30°C
Precipitación pluvial óptima	1500 - 2000 mm	2000 - 3000 mm
Crecimiento óptimo	1000 – 2000 m	0 – 700 m
Roya (Hemileia vastatrix)	susceptible	tolerante
Koleroga	susceptible	tolerante
Nematodos	susceptible	resistente
traqueomicosis	resistente	susceptible
Enfermedad del fruto del café	susceptible	resistente
Contenido de cafeína del grano	0,8% - 1,4%	1,7 – 4%
Forma del grano	chato	alargado
Características típicas sensoriales del café	acidez	Promedio 2%
Cuerpo	Promedio 1,2%	Promedio 2%

Fuente: Según ICO. (2017). Aspectos botánicos. Obtenido de International Coffee Organization: http://www.ico.org/es/botanical_c.asp?section=Acerca_del_caf%E9

Anexo 3: Distribución del café en Nicaragua



Figura 1 Distribución del cultivo de Café en Nicaragua. Fuente: Extraído de “Efecto económico de la roya en Nicaragua: evaluación y recomendaciones para las áreas cafetaleras de la zona Norte” por Rodríguez, Maricela (2013). Managua: UCA.

Anexo 4: Partes de las plantas, frutos y hojas del café

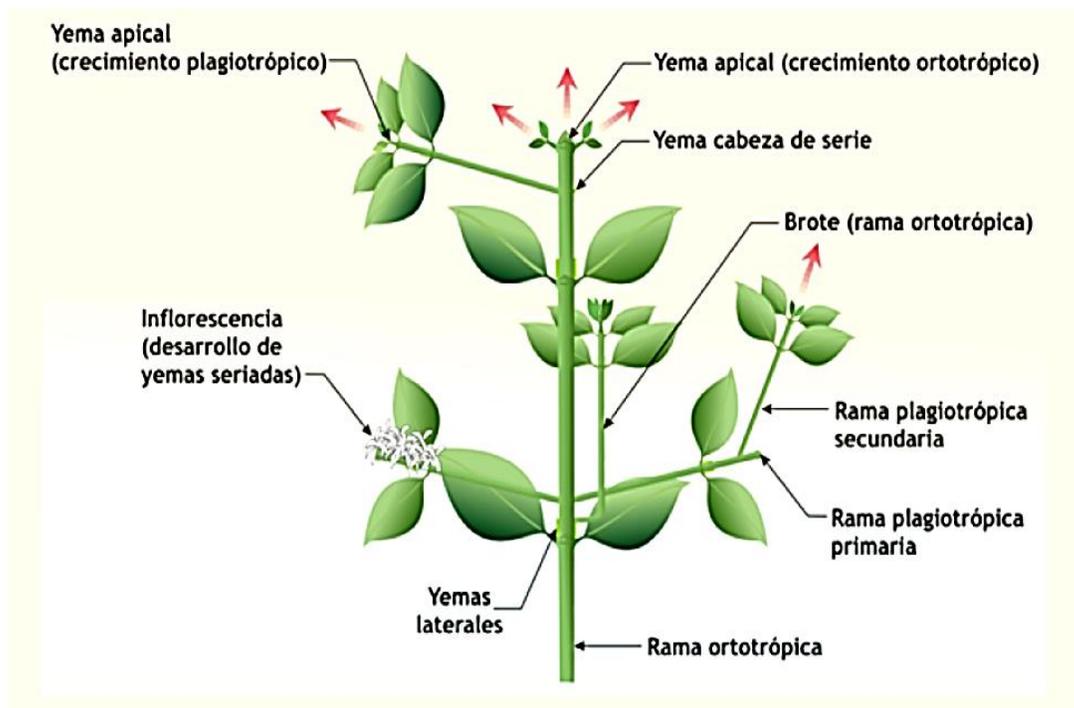


Figura 2. Morfología de la planta de café. Ubicación de las yemas en las cuales se origina la estructura vegetativa y reproductiva de la planta de café. Fuente: “*Crecimiento y desarrollo de la planta de café*” En J. Arcila, F. Farfán, A. Moreno, L. Salazar, y E. Hincapié, *Sistemas de producción de café en Colombia* (págs. 21-60). Chinchiná: Cenicafé.

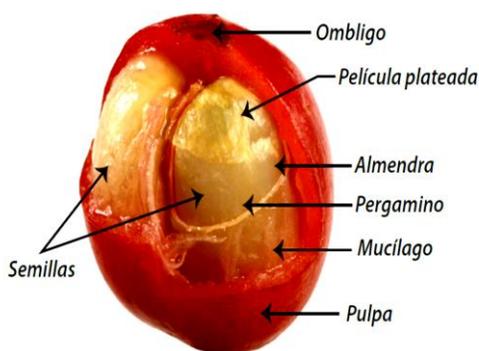


Figura 3. Anatomía del fruto de café. Fuente: “*Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real, a través de la medición de color*” Ramos, P., Sanz, J., y Oliveros, C. (2010). Cenicafé, 315-326.

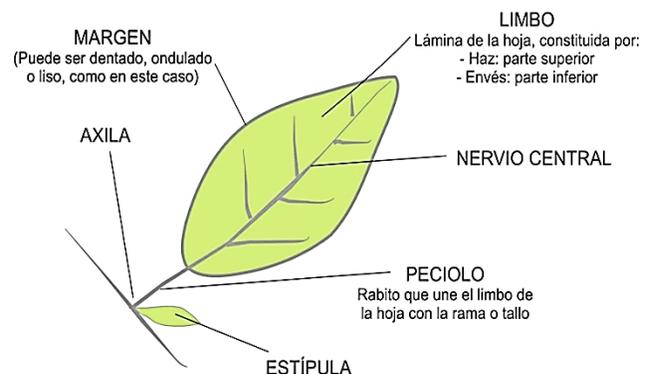


Figura 4. Parte de una hoja. Fuente: “*Morfología de plantas vasculares*” de UNNE. (2013).. Obtenido de Botánica morfológica: http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema2/2_2dicot.htm

Anexo 5: Enfermedades y plagas



Hoja de café con roya



Hoja de café con antracnosis.



Fruto de café con broca



Hoja de café con *Verticillium* sobre roya



Hoja de café con ojo de gallo.



Fruto de café brocado con presencia de *Beauveria*



Hoja de café con mancha de hierro



Hoja de café con minador



Fruto de café con chasparría

Figura 5. Guía para reconocer las principales enfermedades, insectos plagas y reguladores naturales. Fuente: “¿Cómo podemos mejorar la finca cafetalera en la cuenca?” de Filho, E., Barrios, M., Toruño, I. (2009). Managua: CATIE.

Anexo 6: Lotes de café variedad Catrenic



Lote El Guanacaste (Finca CENECOOP-Fedecaruna Masatepe, Masaya): está establecida a 1,8 m y 0,9 m entre plantas, en un área de 0,28 mz. con una plantación de 8 años de edad. Su nombre se deriva del hecho de que la sombra que posee es de árboles de guanacaste. Cabe señalar, que la finca CENECOOP-Fedecaruna, conocida anteriormente como “Centro Experimental de Café del Pacífico (Jardín Botánico) – Masatepe”, fue uno de los lugares donde se estableció el ensayo para realizar las mediciones pertinentes para verificar la uniformidad de la plantación hasta la denominación del material vegetal como una nueva variedad.

Lote Mar de arena (Finca El Rosal San Marcos, Carazo): está establecida entre 2 m y 0,9 m entre plantas, en un área de 6,5 mz. con una plantación de 5 años de edad. Su nombre proviene del tipo de suelo que predomina en esa área. Tomando en cuenta los datos obtenidos de la variedad, se establecieron los descendientes del material obtenido en la finca CENECOOP-Fedecaruna, en dos fincas siendo la finca El Rosal una de ellas.

Figura 6. Descripción de los lotes evaluados. Fuente: información compilada a través de los formatos de caracterización, así como también de las investigaciones de Blanco *et al.* (2013) y Mondragón (2018).

Anexo 7: Marcadores SSR utilizados

Tabla 2

Lista de pares de cebadores utilizados para amplificar los loci SSR en la caracterización genética molecular de café (Coffea arabica L.).

Cebador SSR	Número de accesión (NCBI)	Motivo de repetición	Secuencia del primer o cebador (5'-3')	Temperatura de alineamiento AT (°C)	Tamaño del alelo (bp)
CarM049	-	(GA) ₂₄	F: ATGGCAAAGCAAATGTGGGAAGAG R: CACCTGAAGAAGATGACAACTAAT	53	350-400
CarM050	.	(TC) ₂₀	F: ATCCCTCCACGGCAACCCAAAATA R: ATCCGCAGCCCTCACCATCCA	50	150-190
CarM051	-	(CT) ₁₀	F: GATGTGGAGGAGGCTGCTGCTGAA R: TAGGGCGCCATCTGGTAGGGTTGT	56	250-300
CarM069	AJ308856	(GA) ₇ (GGGA) ₅ (GT) ₈	F: GGCTGGTTTTCTTTTCTG R: ATTTGCTTATTATCCCACATTG	53	250-300

Cebador SSR	Número de accesión (NCBI)	Motivo de repetición	Secuencia del primer o cebador (5´-3´)	Temperatura de alineamiento AT (°C)	Tamaño del alelo (bp)
CarM092	AY102447	(GA) ₂₃	F: AGGCCAGACTTGTGTTGATTTTG R: GGCCCTTCTCGCTTTAGTTG	53	200-300
CarM096	AY102453	(TC) ₂₄	F: TACTGGGGAAGAATTTATCATC R: TTAGGCCATCCAAGAGTATTC	50	280-320
CarM101	AY102459	(CT) ₂₈	F: TATGTCTCTAACTTTCCTATTTT R: AGAGACTACATTTACACAGAAGA	50	170-210
CarM105	AY102463	(GA) ₁₂	F: TGCTCCTACTAAATACCCAAACA R: ATATGCCCAAGAAAATTAGATGAAA	53	230-270
M20	-	(GA) ₅ (GT) ₈ TT (GT) ₄ TT(GT) ₇ (GA) ₁₁ (TC) ₂ (CT) ₃ GT	F: CTTGTTTGAGTCTGTGCTGCTG R: TTTCCCTCCCAATGTCTGTA	55	200-270
M24	-	(CA) ₁₅ (CG) ₄ CA	F: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC	55	150-180

Fuente: Vieira, E. S., Von Pinho, É. V., Carvalho, M. G., Esselink, D. G., y Vosman, B. (2010). Development of microsatellite markers for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. *Genetics and Molecular Biology*, 507-514.

Anexo 8: Formato de caracterización de hojas de café



FORMATO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE HOJAS, FRUTOS Y SEMILLAS DEL CAFÉ (<i>Coffea arabica</i> L.) LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA UNAN- MANAGUA	FCM-BIOTEC-002 Fecha: 2018.02.08 Revisión No 1 Página 1 de 1
--	---



Nombre del proyecto / cliente:											
Identificación de la muestra:											
Datos de hoja:											
1.1) Color de la hoja joven:						1.2) Pigmentación antocianica:					
Nº	1	2	3	4	5	Nº	1	2	3	4	5
1) Verduzca						1) Media					
2) Verde						2) Fuerte					
3) Amarronada						3) Ausente					
4) Marrón rojiza											
5) Bronce											
6) Otro											
1.3) Forma de la hoja:											
Nº	1	2	3	4	5						
1) Obovada											
2) Ovada											
3) Elíptica											
4) Lanceolada											
5) Otra											
1.4) Forma del ápice de la hoja:											
1) Redonda											
2) Obtusa											
3) Aguda											
4) Puntiguda											
5) Apiculada											
6) Espatulada											
7) Otra											
1.5) Longitud de la hoja (mm): * Promedio de cinco hojas maduras (> al 3 nudo de la yema terminal).											
1.6) Ancho de la hoja (mm): * Promedio de cinco hojas de un año, medidas desde la base hasta la inserción con la lámina.											
1.7) Longitud del pecíolo foliar (mm):											
1.8) Color del pecíolo foliar:											
1) Verde											
2) Marrón oscuro											
3) Otro											
1.9) Observaciones:											
Bibliografía: IPGRI. (1997). Descriptores del café (<i>Coffea</i> spp. y <i>Psilanthus</i> spp.). UPOV. (2008). Cafeto, directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. Ginebra.											

Figura 7. Formato de caracterización de hojas de café. Fuente: Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua.

Anexo 9: Formato de caracterización de árboles de café

A

	FORMATO PARA LA COLECTA DE MUESTRA VEGETAL Y ALIMENTO	FCM-BIOTEC-002 Fecha: 2018-04-17
	LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA UNAN-MANAGUA	Revisión No 1 Página 1 de 2

Nombre del proyecto/cliente: _____ Identificación de la muestra: _____
 Lugar de muestreo (Nombre de la propiedad/entidad): _____
 Municipio: _____ Departamento: _____ País: _____
 Coordenadas: Norte _____ Este _____ Elevación (m): _____
 Fecha de muestreo: _____ Hora de muestreo: _____
 Nombre de la persona que suministra la información: _____

Seleccionar matriz y fuente de las que proviene la muestra

MATRIZ	FUENTES
Origen vegetal <input type="checkbox"/>	Total <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Especificar: <input type="checkbox"/>

Análisis/servicios solicitados

Llenar los siguientes datos según el tipo de matriz a muestrear:

Matriz Vegetal

Datos Generales

Nombre común: _____ Grupo genético o Tipo/Genotipo ó clon/Varietal: _____

Características de la planta donante:

Altura: _____ Diámetro del tallo (basal): _____ Diámetro del tallo (altura al pecho): _____

Longitud de cobertura foliar (del tallo al final de la bandola): _____ Presencia de daño foliar: _____

Presencia de rama: Primaria Secundaria Terciaria

Longitud de ramificación productiva: _____ Nota: Especificar rama. _____

Longitud del entrenudo (tallos): _____, _____, _____

Longitud del entrenudo (de una misma bandola): _____, _____, _____

Longitud de bandolas: Superior _____, Medio _____, Inferior _____ Ángulo de la bandola: _____

Número de yemas productivas por bandola: _____ Forma del arbusto: _____



1
conical



2
elipsoid



3
cylindrical

Elaborado por: Juan Ruiz Urbina Especialista en análisis	Revisado por: Samantha Miranda Calero Coordinadora de área	Aprobado por: Katia Montenegro Rayo Coordinadora Técnica	Autorizado por: Martha Lacayo Romero Directora
--	--	--	--

Figura 8. Formato (lado A) de colecta de muestra vegetal. Fuente: Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua.

	FORMATO PARA LA COLECTA DE MUESTRA VEGETAL Y ALIMENTO	FCM-BIOTEC-002 Fecha: 2018-04-17 Revisión No 1 Página 2 de 2	
	LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA UNAN-MANAGUA		

Color del brote: _____

Presencia de domacios: Si No

Presencia de frutos: Si No

Fecha inicial de la cosecha: _____ Fecha final de la cosecha: _____

Producción promedio anual: _____

Forma del fruto: _____ Color del fruto: _____ Madurez del fruto: _____

Presencia de yemas florales: _____ Presencia de patógenos (nombre común): _____

Presencia de insectos: _____ Malezas: _____

Nivel de competencia: 100% 75% 50% 25%

(Número de plantas que rodean a la planta objetivo 100%, 4 cuatro plantas, 75% 3 plantas, 50% dos plantas, 25% 1 planta)

Tamaño de población: _____

Parámetros de campo

Tipo Terreno Plano Ondulado Montañoso Escarpado

Tipo de suelo Pedregoso Arenosos Limosos Arcillosos Calcáreos

Temperatura (°C): _____ Humedad relativa: _____

Cultivo

Procedencia del cultivo: _____ Área de cultivo: _____

Distancia de siembra (m): entre plantas _____ entre surcos: _____ Edad de la plantación: _____

Tipo de fuente semillera: Estaca Semillas Injerto Otros: _____

Tipo de sistema: Monocultivo Policultivo Agroforestal Otros: _____

Sistema de fertilización: Orgánico Químico Sin fertilización Otros: _____

Manejo sanitario implementado: _____

Tipo de muestreo

Puntual: _____ Aleatorio: _____ Transepto: _____ Otro (especificar): _____

Equipo de muestreo utilizado: _____

Nombre de la persona que toma la muestra: _____

Observaciones: _____

Para uso del laboratorio

Nombre del analista a cargo de recibir la muestra: _____

Código de la muestra en el laboratorio: _____

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	Autorizado por:
Juan Ruiz Urbina Especialista en análisis	Samantha Miranda Calero Coordinadora de área	Katia Montenegro Rayo Coordinadora Técnica	Martha Lacayo Romero Directora

Figura 8. Formato (lado B) de colecta de muestra vegetal. Fuente: Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua.

Anexo 10: Procedimientos

A

Colecta de muestras

La preservación de la muestra depende de las condiciones brindadas en cada paso de su colecta desde la selección en base a los criterios de inclusión correspondiente hasta su traslado y posterior almacenamiento para su futuro análisis. Para favorecer el mantenimiento de la calidad del tejido muestreado se siguen los siguientes pasos:

Identificación de la muestra

1. Seleccionar los árboles de interés de manera aleatoria de la parte central del lote de café Catrenic, siguiendo los criterios de inclusión.
2. Colocar la etiqueta a cada árbol muestreado siguiendo el código asignado compuesto primero por tres letras que correspondan a las iniciales de la finca y de la variedad a muestrear, seguido por las iniciales del analista que toma la muestra y finalmente un código de cuatro dígitos junto a la letra G (para análisis genético) o M (para análisis morfológico), dado a que se seleccionarán 4 hojas para análisis genético y 6 hojas para análisis morfológicos. Un ejemplo del código anotado en la etiqueta sería FRC-TSU-0001G o FRC-TSU-0001M.
3. Anotar la información necesaria en cuanto a georeferencias, datos y medidas en el formato de campo para colecta de muestra y caracterización vegetal.
4. Seleccionar las hojas según los criterios de inclusión de manera que el tejido joven sea destinado para el análisis molecular y el maduro para el análisis morfológico, ambos tejidos sin evidencia visual de daño por plagas o fitopatógenos.
5. Documentar cualquier aspecto de importancia en cuanto la selección y colecta de la muestra.

Procedimiento

6. Lavar la tijera de campo y pinzas con agua destilada y etanol 70% antes de cortar la hoja. Repetir este paso con cada árbol seleccionado.
7. Colectar las hojas incluyendo su peciolo, lavar con agua destilada y secar con papel toalla para posteriormente envolverlas en papel toalla seco.
8. Almacenar las hojas para análisis morfológico de cada árbol envolviéndolas con papel Kraft en bolsas plásticas y las hojas para análisis molecular en papel toalla seco, dentro de bolsas Ziploc. Cada bolsa debe ser rotulada con el código de muestra y fecha de muestreo. Sacar el aire de la bolsa y cerrar.
9. Transportar las muestras dentro de un termo, con refrigerantes a los lados y arriba, aislados de las muestras por material absorbente (papel toalla), para evitar su degradación.
10. Realizar estos pasos de manera rápida y cuidadosa para evitar la fenolización del tejido foliar que imposibilitaría la extracción de ADN, asegurando a su vez, el envío pronto de las muestras al laboratorio y su adecuada refrigeración.

Transporte y almacenamiento

11. Garantizar durante el transporte del material vegetal, una temperatura bajo 10°C y almacenar a -20°C al llegar al laboratorio hasta su utilización. Es recomendable que el tiempo de traslado no exceda las 24 horas desde el momento en que se captó la muestra.
12. Antes de ser almacenadas a -20°C, las bolsas de cada muestra deben ser descontaminadas con etanol 70% para evitar la propagación de esporas provenientes del cultivo.

Descontaminación del material vegetal colectado para el análisis molecular

13. Desinfectar el área con agua destilada, hipoclorito 1% y etanol 70%.
14. Desinfectar cada hoja por muestra a utilizar para análisis genético haciendo un lavado con ayuda de una pinza de punta plana y rociando cloro 3% en todo el tejido a ambos lados de la hoja en menos de 30 segundos, inmediatamente lavar con agua destilada, ya que según Sadazawka *et al.* (2007), la concentración interna de la

mayoría de los nutrientes no se afecta significativamente si este proceso no toma más de 30 s, además deben secarse inmediatamente para estabilizar el tejido y detener las reacciones enzimáticas.

15. Secar las hojas y cubrirlas con papel toalla seco nuevo.
16. Almacenar en bolsas ziploc descontaminadas con etanol 70% y secas.
17. Realizar estos pasos de manera rápida y cuidadosa para evitar la fenolización del tejido foliar, almacenar nuevamente a -20°C en menor tiempo posible.

Caracterización morfológica de las muestras de tejido foliar de café

La caracterización morfológica se basa en la recolección y medición de los caracteres de interés según las directrices establecidas por UPOV (2018) e IPGRI (1996) para la identificación de material vegetal aplicado a todas las variedades de café. En base a las directrices mencionadas se elaboró un formato de caracterización, el cual es llenado siguiendo el procedimiento a continuación:

1. Desinfectar el área con agua destilada, hipoclorito 1% y etanol 70%.
2. Seleccionar 5 hojas para la caracterización y secar cada hoja con papel toalla en el caso de presentar humedad.
3. Medir cada uno de los caracteres y realizar las anotaciones necesarias, de manera que cualquier aspecto quede documentado para el análisis de resultados de la caracterización morfológica. A su vez, tomar una fotografía de las hojas caracterizadas.
4. Envolver en papel Kraft y empacar nuevamente en su respectiva bolsa debidamente rotulada.
5. Realizar estos pasos de manera rápida y cuidadosa para evitar la oxidación del tejido foliar que puedan causar la incorporación de datos variantes en cuanto a ciertos caracteres que se ven influenciados por la temperatura del medio, almacenar nuevamente a -20°C el tiempo necesario.

Extracción de ADN de alta calidad de tejidos de plantas recalcitrantes.

Como primera etapa del análisis genético del tejido foliar de café Catrenic (*Coffea arabica* L.), se utilizó el protocolo modificado, basado en el procedimiento modificado descrito por McLay (2017), cuya metodología fue optimizada y estandarizada previamente. Los pasos seguidos se describen a continuación:

Maceración de la muestra

1. Cortar el tejido foliar sin nervadura y colocar en tubos Falcon (capacidad de 50 mL) nuevos y estériles, debidamente rotulados con el código de la muestra. Para cortar el tejido lavar las tijeras y pinzas con etanol por cada muestra.
2. Macerar con nitrógeno líquido con ayuda de varillas de vidrios estériles. Si está trabajando con varias muestras mantenerlas a -20°C para evitar su fenolización.
3. Inmediatamente almacenar los tubos Falcon conteniendo el tejido macerado a -20°C, dentro de bolsas Ziploc estériles, rotuladas.
4. Pesar 0,05 g (50 mg) en bandejas de pesaje estériles y trasladar a tubos eppendorf (capacidad de 1,5 mL) nuevos y estériles. Rotular con el código de la muestra, iniciales del analista y fecha.

Buffer STE

5. Adicionar 1000µL de buffer STE a cada muestra, mezclándose vigorosamente en vórtex hasta obtener una mezcla completa por 1min a cada una.
6. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min. (8°C). Si no se diferencian las fases de manera bien definida centrifugar por 5 min. adicionales.
7. Descartar sobrenadante.

Buffer CTAB

8. Adicionar 500 µL de solución CTAB (C₁₉H₄₂BrN), previamente calentada a 65°C, 2µL de BME (C₂H₆OS) [99.9%], 4 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y 100 µL de NaCl: BSA 5:1. Realizar este paso bajo campana extractora de gases.

9. Agitar en vórtex por 1 min cada muestra asegurándose de obtener una mezcla completa.
10. Incubar por 20h00 en baño maría a 65°C, mezclar en vórtex por 1 min cada muestra 2 veces durante la incubación y 1 vez más al culminar este período.

Primer paso de cloroformo

11. Adicionar de 450 µL de cloroformo (CHCl₃) a cada muestra.
12. Agitar vigorosamente en vórtex por 1 min. cada muestra.
13. Desgasificar las muestras dejando los tubos abiertos por 1 min cubiertos con papel kleenex.
14. Centrifugar por 5 min. a 14 000 rpm (8°C).

Remover sobrenadante

15. Trasegar la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo utilizando una micropipeta de 200 µL ajustada en 190 µL. Tener cuidado de no remover la fase intermedia.

Segundo paso de cloroformo

16. Adicionar 450 µL de cloroformo (CHCl₃) a cada tubo con la fase acuosa removida.
17. Agitar vigorosamente cada muestra en vórtex por 1 min.
18. Desgasificar las muestras dejando los tubos abiertos por 1 min cubiertos con papel kleenex.
19. Centrifugar por 5 min. a 14 000 rpm (8°C).

Remover sobrenadante

20. Trasegar la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo utilizando una micropipeta de 200 µL ajustada en 190 µL. Tener cuidado de no remover la fase intermedia.

Tercer paso de cloroformo

21. Adicionar 450 µL de cloroformo (CHCl₃) a cada tubo con la fase acuosa removida.
22. Agitar vigorosamente cada muestra en vórtex por 1 min.
23. Desgasificar las muestras dejando los tubos abiertos por 1 min cubiertos con papel kleenex.
24. Centrifugar por 5 min. a 14 000 rpm (8°C).

Remover sobrenadante

25. Trasegar la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo utilizando una micropipeta de 200 μ L ajustada en 190 μ L. Tener cuidado de no remover la fase intermedia.

Precipitación del ADN con Isopropanol

26. Adicionar 500 μ L de isopropanol (C_3H_8O) a temperatura ambiente, mezclando gentilmente por inversión 6 veces cada muestra.

Centrifugación con Isopropanol

27. Centrifugar por 10 min. a 14 000 rpm (8°C)

28. Incubar a -20°C por 2 días (una vez culminado el tiempo de incubación colocar a 4°C mientras se prepara el área). Debería observarse el pellet en este paso.

29. Desechar sobrenadante con cuidado.

Lavado y Centrifugación con Etanol

30. Adicionar 500 μ L de etanol (C_2H_5OH) [70%] (4°C), tratar de soltar el pellet de las paredes del tubo pipeteando constantemente.

31. Centrifugar por 5 min. a 14 000 rpm (8°C).

32. Descartar sobrenadante con cuidado.

Secado del pellet

33. Secar el pellet por 2 h dejando los tubos abiertos (pueden cubrirse con papel kleenex).

Resuspensión en Tris-HCl 10mM

34. Adicionar 50 μ L de Tris-HCl 10 mM (pH 8) y resuspender ligeramente.

Lavado con Acetato de Sodio

35. Adicionar 36,25 μ L de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) [2,4 M] y 200 μ L de etanol absoluto a cada tubo. Mezclar por inversión.

36. Centrifugar por 10 min a 14 000 rpm.

37. Desechar sobrenadante. Tener mucho cuidado en este paso puesto que el pellet no se encuentra adherido a las paredes del tubo.

Lavado con Etanol

38. Adicionar 1 000 μL de etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) [70%]. Tratar de soltar el pellet de las paredes del tubo pipeteando constantemente.
39. Centrifugar por 3 min. a 14 000 rpm (8°C).
40. Desechar sobrenadante.

Secado del pellet

41. Secado del pellet por 2h dejando los tubos abiertos, (pueden cubrirse con papel kleenex).

Resuspensión del pellet

42. Adicionar 50 μL de TE y permitir la hidratación del pellet por 5 min. antes de suspender (resuspender el ADN una hora antes de usar).

Al finalizar la extracción el material genético extraído es almacenado a 4°C hasta su evaluación electroforética y posteriormente a -20°C para períodos mayores de almacenamiento.

D

Cuantificación del ADN por espectrofotometría UV/Vis.

Preparación de la muestra

1. Preparar la dilución de la muestra 50/1000 μL a partir de la muestra de ADN extraída, utilizando buffer TE 1X (pH = 8,0).

Preparación del equipo

2. Encender el espectrofotómetro y la computadora, el equipo se verificará e iniciará.
3. Hacer doble clic en el software del equipo "Cary WinUV".
4. Seleccionar en el menú el ícono "Validate". Realizar las pruebas de validación concernientes.
5. Luego de validar, proceder con la calibración seleccionando el ícono "System Information". Pulse la pestaña calibrar.

6. Una vez calibrado, seleccionar la aplicación “Estimación RNA-DNA 3,00”.
7. Establecer los siguientes parámetros: longitud de onda 1 (260,0 nm), longitud de onda 2 (280,0 nm), corrección de fondo (encendido), longitud de onda fondo (320 nm), réplicas (3).

Lectura

8. Trasegar la muestra a la celda.
9. Colocar a celda en el compartimiento de medición.
10. Presionar “Iniciar” y esperar las tres mediciones por muestra.
11. Salvar los datos e imprimir los resultados.

E

Electroforesis horizontal en gel de agarosa.

Montaje del gel de agarosa

1. Armar la caja de electroforesis colocando en la posición indicada las partes de la cámara, nivelando sobre la superficie a trabajar. Verificar la conexión apropiada de electrodos.
2. Verter la solución de agarosa 0,8% o agarosa Low EEO 1,8 % en el molde previamente preparado, colocando el peine apropiado para formar los pozos donde será introducida la muestra y dejar solidificar. Se utiliza un grosor de 5 mm, ya que para obtener una resolución óptima los geles deben tener un grosor entre 5 y 6 mm.
3. Una vez solidificada la agarosa (≈ 30 min), retirar cuidadosamente el peine y adicionar suficiente el buffer TBE 0,5X a los compartimentos de la cámara de electroforesis para sumergir el gel entre 3 a 5 mm; ya que, si se adicionara menos buffer, el gel puede secarse durante la corrida electroforética y si se adicionara demasiado buffer, se disminuye la movilidad del ADN, ya que se promueve la distorsión de las bandas y el calentamiento excesivo del sistema.

Montaje de la muestra en el gel de agarosa

4. Preparar las muestras de ADN, mezclando 4 μL de ADN con 1 μL de buffer de carga 6X.
5. Cargar las muestras en los pozos del gel y el marcador de peso molecular 100pb en uno de los extremos, registrando la localización de cada una de las muestras en una matriz para el análisis posterior de los resultados.
6. Conectar la cámara de electroforesis a una fuente de poder e iniciar la electroforesis a 80 V por 1,5 h, verificar la electroforesis cuando el colorante azul haya recorrido 3/4 partes del gel.

Cabe destacar que la optimización del voltaje se realizó en base a los resultados de las corridas realizadas, además se tomó en cuenta que la corrida del gel generalmente se realiza a un gradiente de voltaje de 5-10 V/cm (la distancia que debe considerarse para determinar el gradiente de voltaje es la distancia entre los electrodos y no la longitud del gel).

7. Apagar la fuente de poder, retirar el gel de la cámara de electroforesis y colocarlo en el Transiluminador UV para observar el patrón de bandas de ADN.
8. Registrar el resultado en la matriz preparada y respaldar con una fotografía.

F

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Preparación de la muestra para PCR

1. Esterilizar el área de trabajo con hipoclorito 1% y luego con agua destilada. Asimismo, limpiar las pipetas con papel toalla humedecido con etanol 70 %.
2. Agregar 24 μL de la solución mixta madre (Master Mix) y 1 μL de la muestra de ADN que amplificará y distribuir las reacciones en tubos de 0.2mL para PCR. Mantener en hielo o a 4°C hasta meterlos al termociclador, para evitar que la polimerasa sintetice fragmentos inespecíficos.

Amplificación de la muestra en el termociclador

3. Encender el termociclador y seleccionar el programa establecido, en base a lo establecido por Vieira *et al.* (2010), se utiliza el perfil térmico que incluye una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, acoplamiento o alineación determinada por cada cebador entre las temperaturas 50°C y 56°C por 30 segundos y un tiempo de elongación 72°C por 45 segundos. Una extensión final 72°C por 3 minutos y enfriamiento a 4°C hasta ser retirado para su evaluación electroforética o almacenamiento.
4. Colocar las muestras en el termociclador, cierre la tapa y tome nota del tiempo que tardará la amplificación.
5. Verificar la amplificación por electroforesis en geles de agarosa Low EEO 1,8%, siguiendo el procedimiento de *Electroforesis horizontal en gel de agarosa*.

G

Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida UREA-PAGE

Preparación de los platos

1. Enjuagar los platos con dH₂O, secar con papel kleenex sin dejar pelusa.
2. Rociar ambos lados con etanol y secar.
3. Limpiar la parte interna del plato corto con papel toalla humedecido con acetona 99,9% y luego enjuagar con etanol 96 %, dejar secar.
4. Colocar los platos en el soporte y agregar etanol para verificar que no haya fugas, decantar el etanol.

Preparación del gel de poliacrilamida 6%

5. Mezclar los componentes para la preparación del gel comenzando por dH₂O, TBE 10X, Urea (CH₄N₂O) y acrilamida (C₃H₅NO) [40%] (bajo campana extractora de gases).
6. Calentar a 55°C en baño maría por 5 min hasta alcanzar una temperatura de 37°C para disolver la urea.

7. Dejar enfriar hasta 30°C y mover la solución cada cierto tiempo.
8. Añadir a la solución del gel 125 µL de solución APS ((NH₄)₂S₂O₈) [10 %] y 12,5 µL de TEMED (C₆H₁₆N₂) [97%], mover gentilmente y usar inmediatamente.

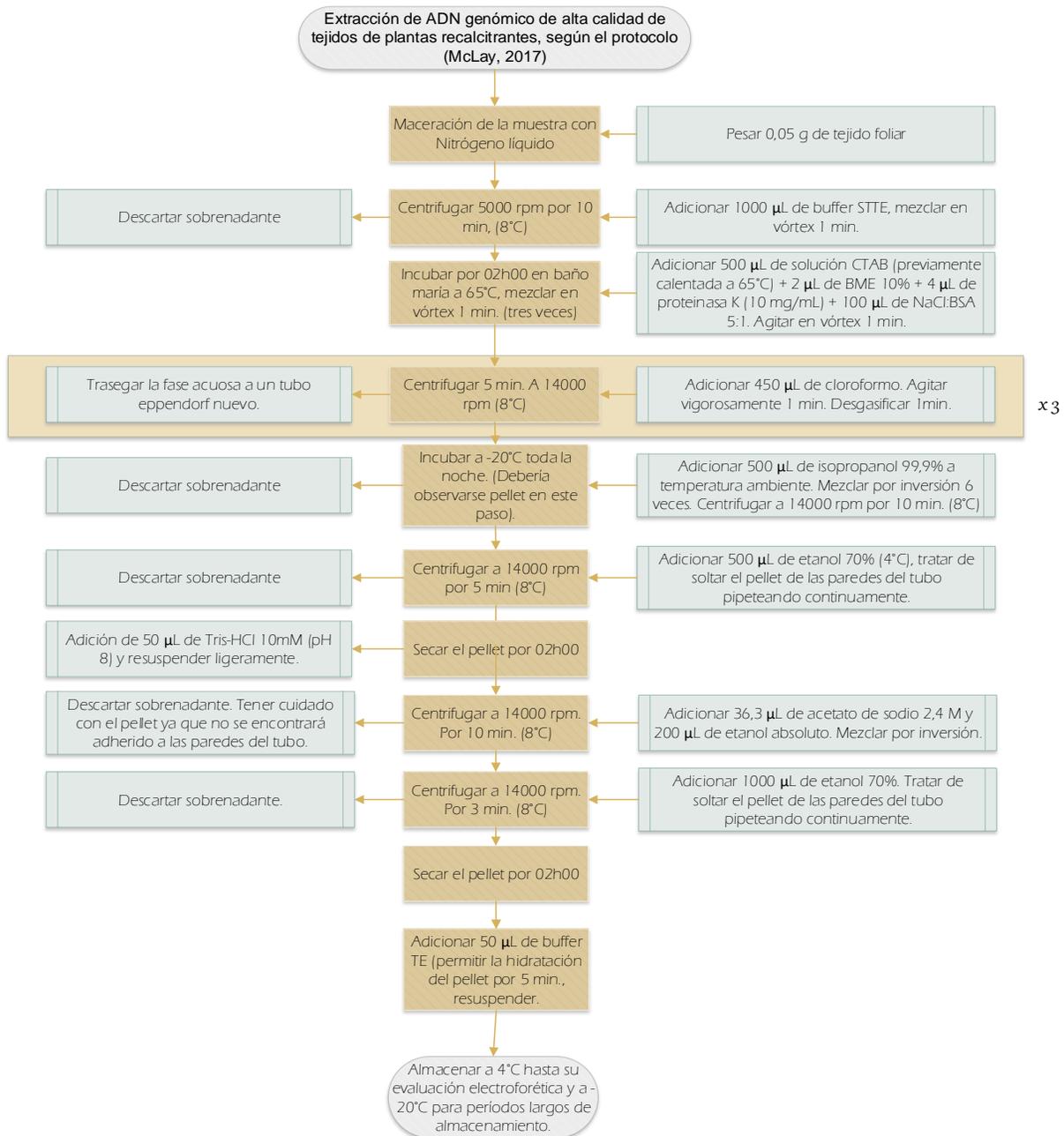
Montaje de las muestras

9. Preparar las muestras de ADN, mezclando 5 µL de ADN amplificado con 3 µL de buffer de carga 6X.
10. Una vez sólido el gel, retirar los peines y colocar los soportes en la cámara vertical.
11. Incubar las muestras en baño maría por 3 min de 90 a 95°C. Concluido el tiempo colocar las muestras en una cubeta con hielo picado y cargar inmediatamente.
12. Conectar la cámara de electroforesis a una fuente de poder e iniciar la electroforesis a 60 V por 3 horas, verificar la electroforesis cuando el colorante azul haya recorrido 3/4 partes del gel.
13. Apagar la fuente de poder, retirar el gel de la cámara de electroforesis y enjuagarlo con dH₂O.
14. Colocar el gel en una bandeja con la solución de fijación (ácido acético 10 %) por 01h00.
15. Transportar el gel a la siguiente bandeja con dH₂O y sumergir por 10 min.
16. Colocar el gel en una bandeja con la solución de tinción (nitrato de plata 0,1 %) por 01h00, proteger de la luz.
17. Transportar rápidamente el gel a una bandeja con dH₂O y sumergirla por 4 s (proteger de la luz).
18. Colocar el gel en una bandeja con solución de revelado fresca (carbonato de sodio 30 % + formaldehído 37 %) por 3 min, proteger de la luz. Deberá cambiarse de solución cuando aparezcan las primeras bandas, observar cada minuto.
19. Repetir el paso 18 en una nueva bandeja con solución de revelado por 5 min, proteger de la luz. Deberán de aparecer el resto de bandas esperadas, retirar antes de que se oscurezca por completo.
20. Transportar el gel a una bandeja con la solución de fijación que se ocupó en el paso 14, sumergir por 3 min.

21. Colocar el gel en una bandeja con dH₂O por 2 min.
22. Colocar el gel en el transiluminador de luz blanca para observar el patrón de bandas.
23. Registrar el resultado en una matriz y respaldar con una fotografía.

COPIA CONTROLADA

Anexo 11: Flujoograma del proceso de extracción de ADN



Fuente: elaboración propia a través Microsoft Visio basado en el protocolo modificado de McLay, T. (4 de septiembre de 2017). High quality DNA extraction protocol from recalcitrant plant tissues. Obtenido de protocols.io.

Anexo 12: Flujogramas de fotos

A



Selección e identificación de los árboles



Caracterización morfológica *in situ* de los árboles seleccionados



Colecta del tejido foliar



Limpieza



Transporte



Descontaminación externa



Almacenamiento -20 °C

Figura 10. Procedimiento de caracterización *in situ* de los árboles seleccionados y colecta de tejido foliar.

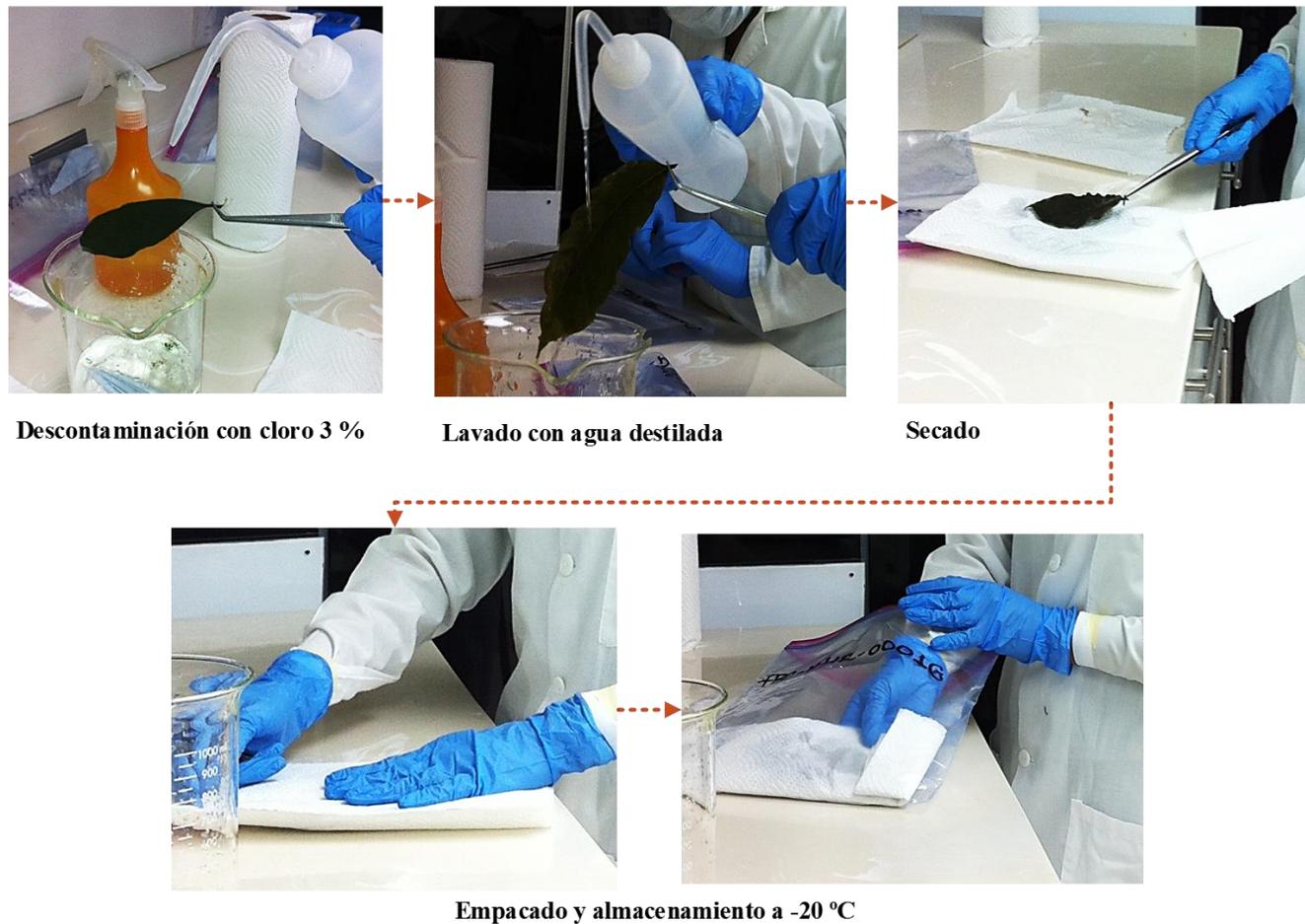


Figura 11. Descontaminación del material vegetal colectado para el análisis molecular.



Figura 12. Caracterización morfológica de las muestras del tejido foliar colectado.

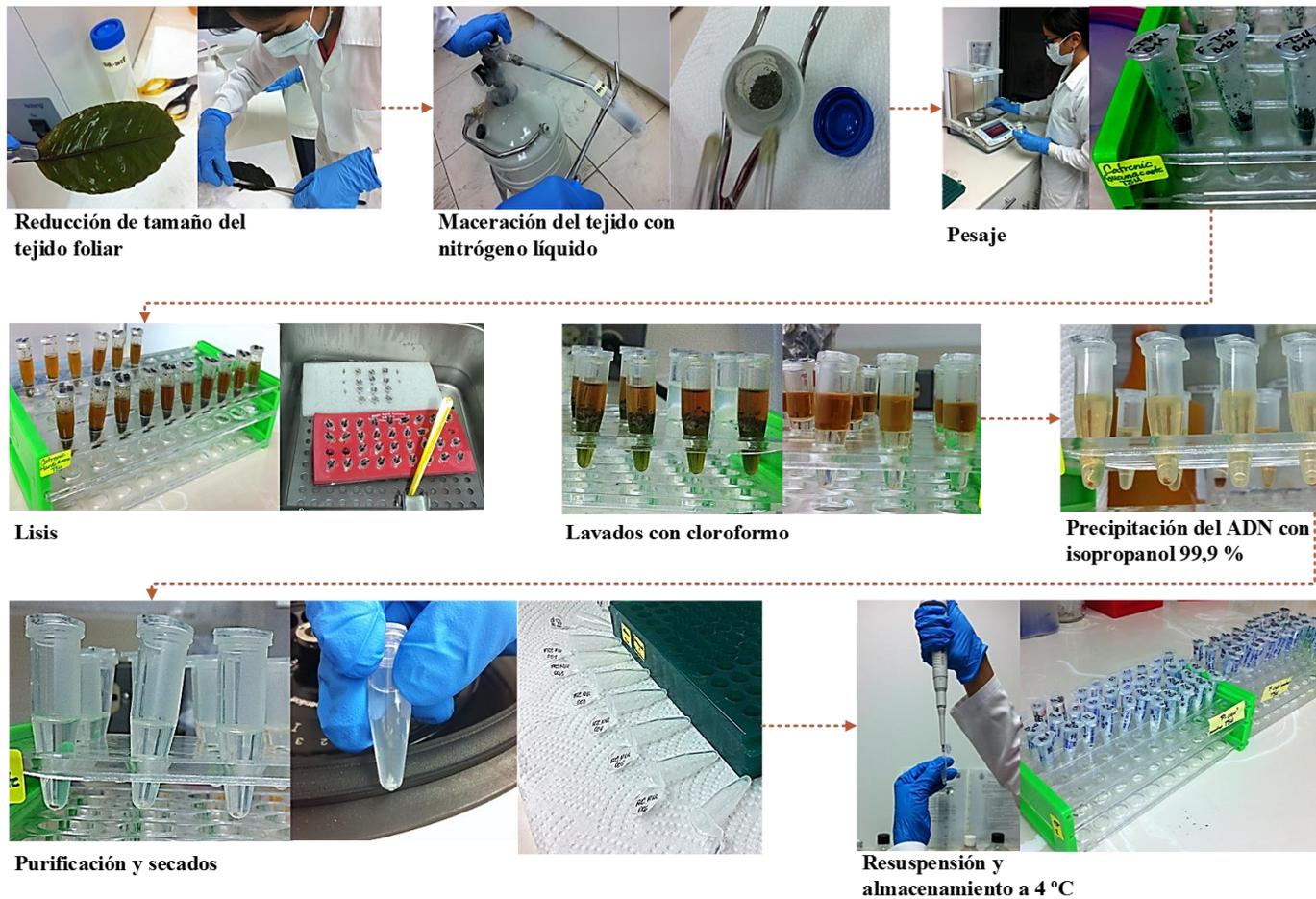


Figura 13. Procedimiento de extracción de ADN genómico seguido según el protocolo estandarizado basado en McLay (2017).

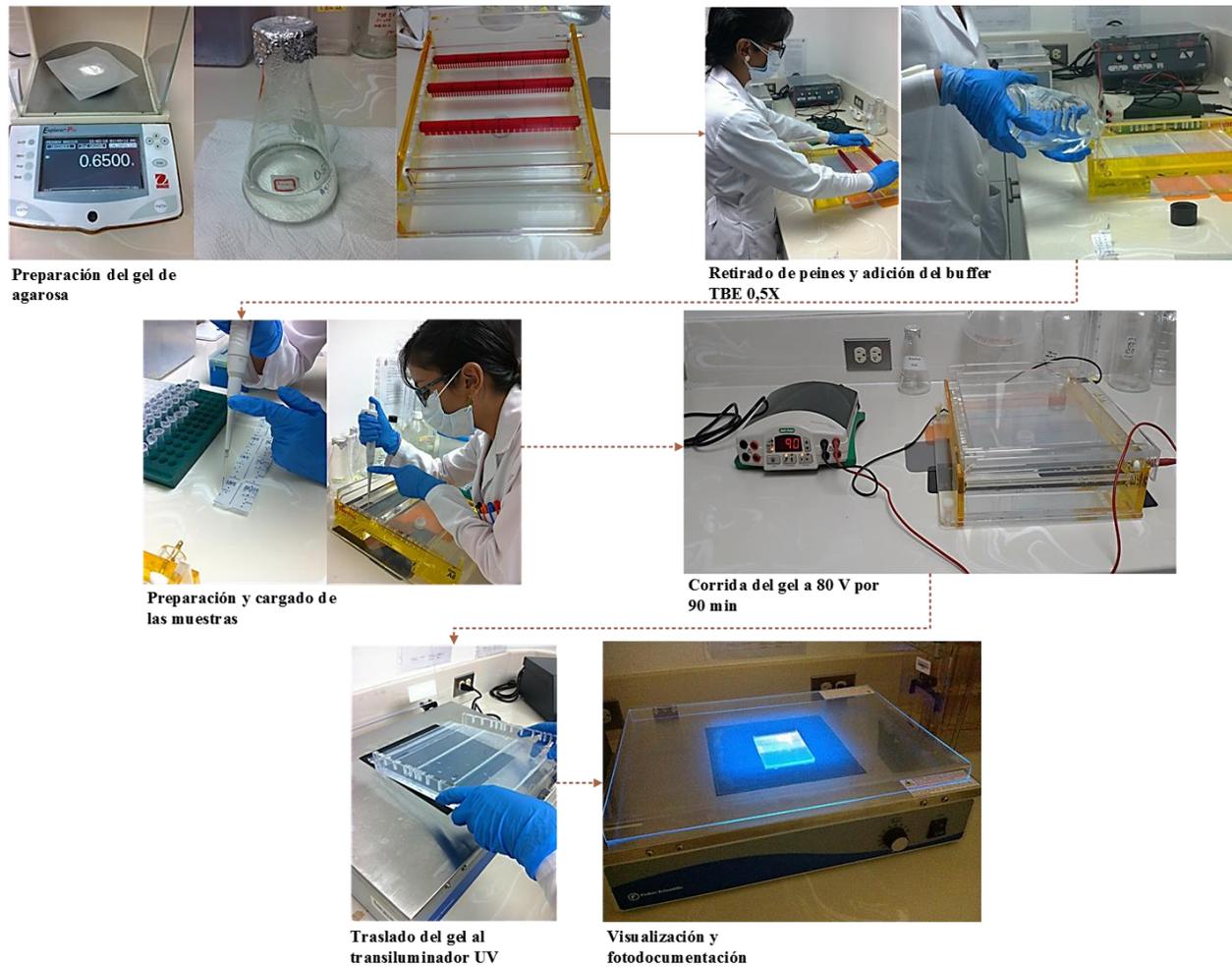


Figura 19 Electroforesis horizontal en gel de agarosa.

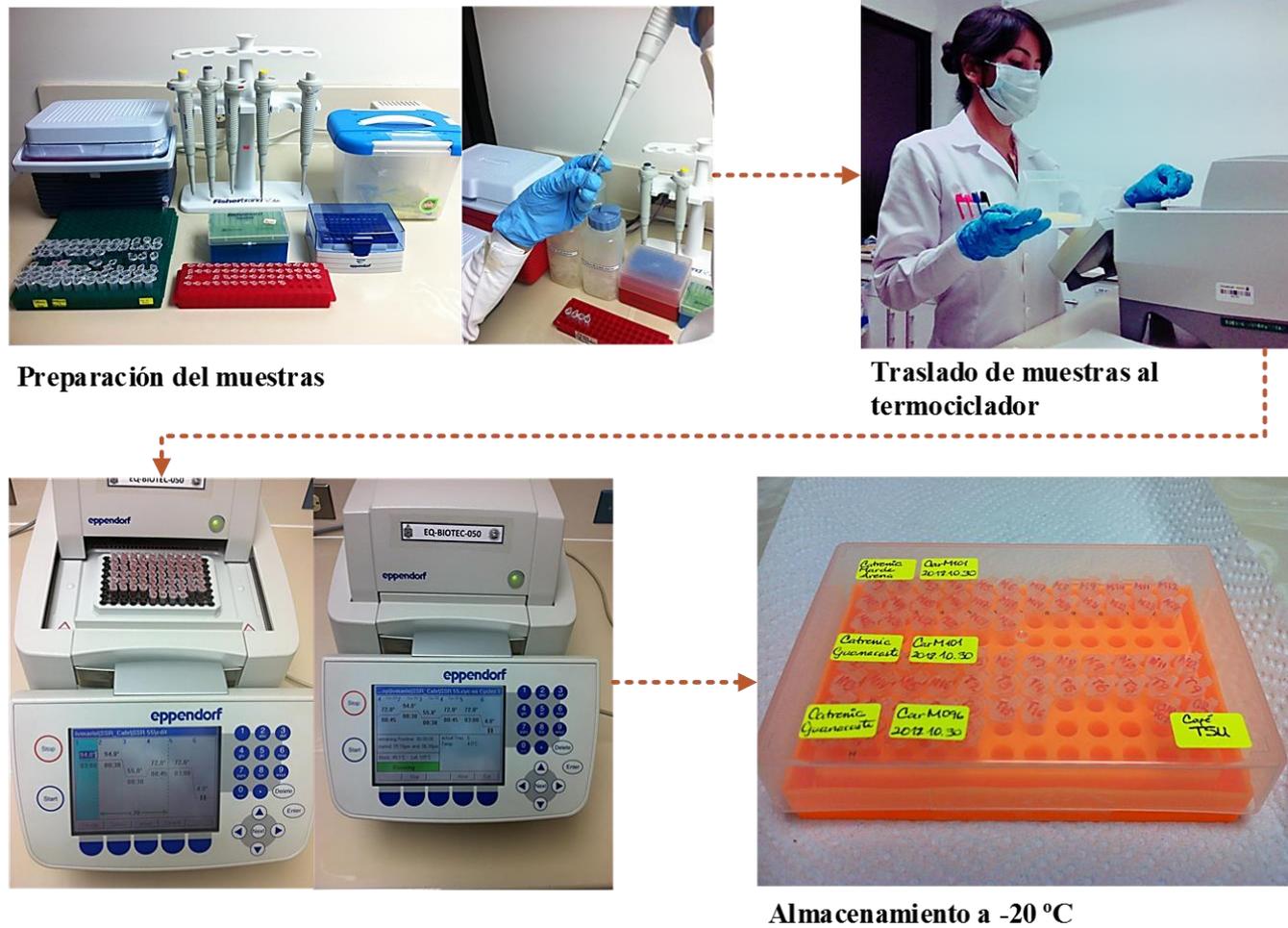


Figura 15. Amplificación de las muestras de ADN genómico utilizando la técnica PCR.



Figura 16. Electroforesis vertical en gel desnaturizante de poliacrilamida UREA-PAGE.

Anexo 13: Coordenadas de los árboles seleccionados para la caracterización

Tabla 3

Coordenadas geográficas UTM de los árboles seleccionados para la caracterización morfológica y molecular en los lotes Guanacaste y Mar de Arena.

N°	Identificación de la muestra	Coordenadas		
		Norte	Este	Elevación (m)
1	F-NHR-0002	1315492	0592890	471
2	F-NHR-0003	1315492	0592890	471
3	F-NHR-0004	1315492	0592890	471
4	F-NHR-0005	1315492	0592890	471
5	F-NHR-0006	1315512	0592890	463
6	F-NHR-0007	1315498	0592824	472
7	F-NHR-0008	1315502	0592884	470
8	F-NHR-0009	1315498	0592979	469
9	F-NHR-0010	1315482	0592881	467
10	F-NHR-0011	1315480	0592879	469
11	F-NHR-0012	1315486	0592877	469
12	F-NHR-0013	1315498	0592878	468
13	F-NHR-0014	1315499	0592878	460
14	F-NHR-0015	1315492	0592877	466
15	F-NHR-0016	1315498	0592877	471
16	F-TSU-0002	1315494	0592875	467
17	F-TSU-0003	1315494	0592875	471
18	F-TSU-0004	1315491	0592869	463
19	F-TSU-0005	1315486	0592868	467
20	F-TSU-0006	1315490	0592859	454
21	F-TSU-0007	1315487	0592852	467
22	F-TSU-0008	1315480	0592859	468
23	F-TSU-0009	1315475	0592870	462
24	F-TSU-0010	1315488	0592861	469
25	F-TSU-0011	1315492	0592869	471
26	F-TSU-0012	1315495	0592872	471

27	F-TSU-0013	1315494	0592852	472
28	F-TSU-0014	1315481	0592855	474
29	F-TSU-0015	1315477	0592852	472
30	F-TSU-0016	1315478	0592858	474
31	FRC-NHR-0001	1313064	0586094	635
32	FRC-NHR-0002	1313073	0586112	635
33	FRC-NHR-0003	1313075	0586219	635
34	FRC-NHR-0004	1313101	0586163	635
35	FRC-NHR-0005	1313101	0586162	635
36	FRC-NHR-0006	1313108	0586154	636
37	FRC-NHR-0007	1313116	0586145	636
38	FRC-NHR-0008	1313117	0586143	636
39	FRC-NHR-0009	1313117	0586141	636
40	FRC-NHR-0010	1313117	0586137	636
41	FRC-NHR-0011	1313128	0586125	636
42	FRC-NHR-0012	1313125	0586121	636
43	FRC-NHR-0013	1313127	0586151	616
44	FRC-NHR-0014	1313135	0586158	630
45	FRC-NHR-0015	1313135	0586168	638
46	FRC-TSU-0016	1313028	0586120	635
47	FRC-TSU-0017	1313031	0586120	636
48	FRC-TSU-0018	1313038	0586132	635
49	FRC-TSU-0019	1313046	0586123	638
50	FRC-TSU-0020	131304	0586111	638
51	FRC-TSU-0021	1313034	0586114	640
52	FRC-TSU-0022	1313053	0586084	636
53	FRC-TSU-0023	1313060	0586095	635
54	FRC-TSU-0024	1313061	0586110	639
55	FRC-TSU-0025	1313069	0586120	636
56	FRC-TSU-0026	1313075	0586113	633
57	FRC-TSU-0027	1313069	0586103	634
58	FRC-TSU-0028	1313065	0586093	635
59	FRC-TSU-0029	1313061	0586093	633
60	FRC-TSU-0030	1313053	0586085	613

Nota: Coordenadas obtenidas al momento de la selección y caracterización *in situ* utilizando un GPSMAP® GARMIN.

Anexo 14: Resultados del análisis estadístico realizado para la caracterización morfológica

A

Tabla 4

Resultado de las pruebas de normalidad evaluando características medidas en las plantas de ambos lotes

Variables medidas en cm	Parcelas	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk			Normalidad
		Estadístico	gl	p-valor	Estadístico	gl	p-valor	
Altura de la planta	F	0.13	30	.200*	0.924	30	0.033	✗
	FRC	0.125	30	.200*	0.913	30	0.017	✗
Diámetro del tallo (Basal)	F	0.1	30	.200*	0.959	30	0.288	✔
	FRC	0.198	30	0.004	0.888	30	0.004	✗
Diámetro del tallo (Altura al pecho)	F	0.067	30	.200*	0.989	30	0.982	✔
	FRC	0.167	30	0.032	0.902	30	0.009	✗
Longitud de la cobertura foliar	F	0.21	30	0.002	0.928	30	0.043	✗
	FRC	0.157	30	0.057	0.858	30	0.001	✗
Longitud de ramificación	F	0.177	30	0.017	0.83	30	0	✗
	FRC	0.099	30	.200*	0.982	30	0.864	✔
Longitud del entrenudo (Tallo)	F	0.2	30	0.003	0.874	30	0.002	✗
	FRC	0.089	30	.200*	0.94	30	0.090	✔
Longitud del entrenudo (En una bándola)	F	0.121	30	.200*	0.982	30	0.878	✔
	FRC	0.072	30	.200*	0.968	30	0.493	✔
Longitud de bándolas	F	0.129	30	.200*	0.961	30	0.324	✔
	FRC	0.089	30	.200*	0.962	30	0.356	✔
Ángulo de bándolas (°)	F	0.178	30	0.017	0.901	30	0.009	✗
	FRC	0.315	30	0	0.777	30	0.000	✗
Número de yemas productivas por bándolas	F	0.232	30	0	0.907	30	0.012	✗
	FRC	0.157	30	0.057	0.931	30	0.053	✔

Tabla 5

Pruebas de Levene y T de Student aplicadas a las características medidas en las plantas que cumplen el requisito de normalidad para ambos lotes.

Variables	Prueba de Levene de igualdad de varianzas	F	p-valor.	t	gl	p-valor	Diferencia de medias
Longitud del entrenado (En una bandola)	Se asumen varianzas iguales	0,072	0,789	-0,233	58,000	0,8170	-0,052
	No se asumen varianzas iguales			-0,233	57,959	0,8170	-0,052
Longitud de bandolas	Se asumen varianzas iguales	4,386	0.041	-6,337	58,000	0,0001	-22,213
	No se asumen varianzas iguales			-6,337	49,992	0.0001	-22,213

Tabla 6

Pruebas de U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon aplicadas en el resto de las variables medidas

Variables	U de Mann-Whitney	W de Wilcoxon	Z	p-valor
Altura (m)	291,0	756,0	-2,351	0,0190
Diámetro del tallo (Basal)	379,0	844,0	-1,050	0,2940
Diámetro del tallo (Altura al pecho)	298,0	763,0	-2,249	0,0250
Longitud de la cobertura foliar	409,5	874,5	-0,599	0,5490
Longitud de ramificación	69,5	534,5	-5,628	0,0001
Longitud del entrenudo (Tallo)	324,5	789,5	-1,856	0,0630
Ángulo de bandolas (°)	232,0	697,0	-3.231	0,0010
Número de yemas productivas por bandolas	355,5	820,5	-1,401	0,1610

* Variable de agrupación: Lote

Tabla 7

Resultado de las pruebas de normalidad evaluando las características medidas en las hojas de los árboles seleccionados de ambos lotes.

Variables medidas en mm	Parcelas	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk			Normalidad
		Estadístico	gl	p-valor	Estadístico	gl	p-valor	
longitud de la hoja	F	0.1	30	.200*	0.95	30	0.173	✓
	FRC	0.078	30	.200*	0.981	30	0.855	✓
ancho de la hoja	F	0.103	30	.200*	0.97	30	0.537	✓
	FRC	0.084	30	.200*	0.969	30	0.515	✓
longitud del peciolo foliar	F	0.104	30	.200*	0.985	30	0.932	✓
	FRC	0.302	30	0	0.763	30	0	✗

Tabla 8

Pruebas de Levene y t de Student para la igualdad de medias

Variables medidas en mm	Prueba de Levene de igualdad de varianzas	F	p-valor	t	gl	p-valor	Diferencia de medias
Longitud de la hoja	Se asumen varianzas iguales	13,919	0,0001	0,948	58,000	0,347	3,840
	No se asumen varianzas iguales			0,948	46,337	0,348	3,840
Ancho de la hoja	Se asumen varianzas iguales	7,151	0,0100	-1,242	58,000	0,219	-2,493
	No se asumen varianzas iguales			-1,242	50,202	0,220	-2,493

Tabla 9

Estadísticos de prueba aplicados a la variable de longitud del peciolo foliar.

Longitud del peciolo foliar (mm)	
U de Mann-Whitney	80,500
W de Wilcoxon	545,500
Z	-5,466
p-valor	0,000

Tabla 10

Centroides de los grupos de plantas formados en cuanto a la similitud de los descriptores evaluados en hojas

Variable	Conglomerado1	Conglomerado2	Conglomerado3	Conglomerado4
LH	166,094	179,960	146,325	128,775
AH	73,188	80,840	67,150	58,075
LPF	8,318	7,080	9,638	8,500

Variable	Conglomerado5	Centroide principal
LH	147,500	152,507
AH	77,700	69,847
LPF	21,300	10,065

Tabla 11

Centroides de los grupos de plantas formados en cuanto a la similitud de los descriptores evaluados en plantas

Variable	Grupo1	Grupo2	Grupo3	Grupo4	Grupo 5	Centroide Principal
Altura	2,663	2,524	2,553	2,760	2,470	2,575
DTB	3,131	3,264	3,362	3,265	4,430	3,326
DTAP	2,206	1,952	2,730	2,724	2,440	2,247
LCF	87,000	108,660	164,667	231,333	172,000	124,442
LR	33,075	87,660	45,008	43,200	98,625	63,082
LET	4,277	5,537	12,931	14,611	5,417	7,126
LEEB	4,494	4,483	4,389	4,944	4,867	4,516
LB	59,694	86,963	68,254	84,222	106,292	77,101

Anexo 15: Resultados del análisis molecular realizado

A

Tabla 12

Resultados del perfil molecular e índices de diversidad genética obtenidos de la caracterización de la variedad Catrenic proveniente de ambas fincas.

Locus#	N° de genes	Número de alelos por locus (n _A)		Tamaño alélico (R)		Índice Garza-Williamson (G-W)		Heterocidad observada (H _o)		Heterocidad esperada (H _e)	
		Guanacaste	Mar de Arena	Guanacaste	Mar de Arena	Guanacaste	Mar de arena	Guanacaste	Mar de arena	Guanacaste	Mar de arena
CarM096	120	18,00	15,00	26,00	26,00	0,667	0,556	1,000	1,000	0,927	0,917
CarM101	120	17,00	15,00	18,00	19,00	0,895	0,750	0,683	0,683	0,862	0,897
CarM049	120	16,00	14,00	21,00	59,00	0,727	0,233	1,000	1,000	0,907	0,884
CarM069	120	10,00	12,00	16,00	16,00	0,588	0,706	0,000	0,000	0,838	0,903
CarM092	120	33,00	31,00	115,00	119,00	0,285	0,258	0,950	1,000	0,966	0,963
CarM105	120	6,00	9,00	8,00	8,00	0,667	1,000	1,000	1,000	0,810	0,861
M20	120	10,00	12,00	10,00	14,00	0,909	0,800	1,000	1,000	0,887	0,833
M24	120	12,00	15,00	19,00	37,00	0,600	0,395	0,000	0,000	0,874	0,919
CarM051	120	10,00	10,00	16,00	19,00	0,588	0,500	0,000	0,000	0,856	0,876
CarM050	120	13,00	16,00	25,00	32,00	0,500	0,485	0,000	0,000	0,903	0,926
Promedio	120	14,50	14,90	27,40	34,90	0,6425	0,568	0,563	0,568	0,883	0,898
Desviación estándar	-	7,49	6,12	31,31	32,95	0,1823	0,246	0,494	0,499	0,045	0,037

Tabla 13

Coefficientes de fijación de la variedad Catrenic en base a los dos lotes caracterizados.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
CarM096	-0,085	0,026	-0,057
CarM101	0,225	0,019	0,239
CarM049	-0,118	0,081	-0,027
CarM069	1,000	0,108	1,000
CarM092	-0,011	0,023	0,013
CarM105	-0,199	0,061	-0,125
M20	-0,165	0,089	-0,060
M24	1,000	0,084	1,000
CarM051	1,000	0,078	1,000
CarM050	1,000	0,031	1,000
Promedio	0,367	0,061	0.405