

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE TRES
VARIETADES DE *Coffea arabica* L. (CATURRA, PACHE
Y NACIONAL) EN SEIS PARCELAS DE LA PROVINCIA
DE MOYOBAMBA, REGIÓN SAN MARTÍN”**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

AUTOR:


Ricarte Flores Barbarán

IQUITOS - PERÚ
2019

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



.....
Blga. MARTHA ESTELA RENGIFO PINEDO, Dra.
PRESIDENTA




.....
Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZEN JULCA, Mg.Sc.
MIEMBRO



.....
Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.
MIEMBRO

ASESORES



.....
Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.



.....
Blgo. ÁNGEL MARTÍN RODRÍGUEZ DEL CASTILLO



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dirección de Escuela Profesional
de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 052

Iquitos, 15 de febrero de 2019

En la ciudad de Iquitos, a los quince días del mes de febrero del 2019 y, siendo las 17.00 horas; se reunió en el auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de la tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 001-2018-DEP-B-FCB-UNAP, de fecha 03 de febrero del 2018, presidido e integrado por; **Blga. MARTHA ESTELA RENGIFO PINEDO, Dra., (Presidenta)**; **Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZEN JULCA, Mgr., (Miembro)** y **Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc. (Miembro)**, para escuchar, examinar y calificar la sustentación de la tesis titulada: **“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE TRES VARIEDADES DE *Coffea arabica* L. (CATURRA, PACHE Y NACIONAL) EN SEIS PARCELAS DE LA PROVINCIA DE MOYOBAMBA, REGIÓN SAN MARTÍN”**, por el Br. **RICARTE FLORES BARBARAN**.



La Dirección Profesional de Ciencias Biológicas, mediante Resolución Directoral N° 011-2019-DEP-B-FCB-UNAP, de fecha 24 de enero del 2019, declara expedita para SUSTENTAR LA TESIS del Br. **RICARTE FLORES BARBARAN**, promoción 2016-II, graduado con R.R. N° 0716-2017-UNAP de fecha 30 de mayo 2017; se reconoce como ASESORES de la tesis a los profesionales: **Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.** y **Blgo. ÁNGEL MARTIN RODRÍGUEZ DEL CASTILLO**.




Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, teniendo en cuenta los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el Bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dió como veredicto; APROBAR LA SUSTENTACIÓN DE TESIS, CALIFICADA COMO EXCELENTE; quedando en consecuencia el candidato **apto** para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del título profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, la Presidenta del Jurado Calificador y Dictaminador levantó el acto académico siendo las 19.00 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente acta de sustentación por ser triplicado.


Blga. MARTHA ESTELA RENGIFO PINEDO, Dra.
PRESIDENTA


Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZEN JULCA, Mgr.
MIEMBRO


Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.
MIEMBRO

DEDICATORIA

Al señor Jesucristo por la vida, a mis padres **Javier Flores** y **María Elena Barbarán** por ser el constante apoyo emocional, moral y ejemplo de vida repercutida en mi crecimiento personal y profesional.

A mis hermanos **Javier, María** y **Ángel**, por la complacencia de mis logros, además a **Nancy Ramírez** mi abuelita por el ejemplo de fortaleza, perseverancia, coraje y confianza de creer en mí.

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), mi alma mater y segundo hogar, quien me abrió las puertas para conocer el magnífico mundo del saber científico, inculcada por el aprendizaje y experiencias de los educadores durante la formación de un nuevo profesional.
- Al Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana - IIAP, Programa de Investigación en Biodiversidad Amazónica – PIBA, “Laboratorio de Botánica Aplicada Jean-Cristophe Pintaud LBA-JCP”, por brindarme la oportunidad de realizar la presente tesis de investigación.
- A mis orientadores, profesor Blgo. Juan Carlos Castro Gómez Dr, jefe de investigación de la Unidad Especializada de Biotecnología – UEB del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia – CIRNA, quien con sus constantes observaciones y correcciones fortaleció el presente trabajo de tesis. Gracias por la amistad, experiencia, dedicación y humildad profesional, recibe mi gran admiración y estima personal.
- Al Blgo. Ángel Martín Rodríguez del Castillo, Investigador Principal del Programa de Investigación en Biodiversidad Amazónica (PIBA-IIAP San Martín), quien me adentro en el maravilloso mundo de la genética relacionado con los procesos biológicos. Gracias por la amistad, experiencias, confianza y sobre todo por el constante apoyo en la formación de un largo camino en la investigación.
- A María de Fátima Sánchez, por su amistad, colaboración, ardua orientación en el laboratorio y objetividad durante el desarrollo de la tesis.

- Al Ing. Luis Alberto Arévalo, coordinador general del proyecto: *“Biofertilización y Bioprotección de Plantas Clonales de café (Coffea arabica) con Micorrizas Arbusculares en la Región San Martín”*,
- Al Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA, por el financiamiento ofrecido para la ejecución de la presente tesis.
- Al Blgo. Víctor Jiménez, Investigador del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía-UNMSM, por el apoyo durante el procesamiento de datos, recomendaciones y apreciaciones de los resultados de la investigación, además, por la confianza y amistad generada.
- A mis amigos del LBA-JCP y compañeros de trabajo del IIAP, quienes demostraron que el trabajo en equipo fortalece las capacidades y conllevan a cumplir las metas establecidas. A Wheeler José y Ani Taly por brindarme su tiempo, apoyo y demostrarme sus ganas de seguir capacitándose en los diferentes campos de la biología, así mismo, por el compañerismo y enseñarme a deleitar siempre con risueño cada momento de la vida.
- A mis amigos de la UNAP - Ciencias Biológicas, agradecerles por la convivencia durante el desarrollo de la carrera, donde compartimos muchas experiencias que quedaran selladas en nuestra vida personal y profesional. A Grace Vergara, por brindarme su apoyo en la documentación de la tesis, amistad y estima personal.
- Y a todas las personas que de alguna u otra manera estuvieron involucradas en el desarrollo del presente estudio, caficultores, Dirección Regional de Agricultura de San Martín -DRASAM y Universidad Nacional de San Martín – UNSM.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	ii
ASESORES.....	iii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 052	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
INDICE DE CONTENIDO	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Posición taxonómica.....	4
2.2. Distribución	4
2.3. Descripción vegetal	6
2.3.1 De la especie.....	6
2.3.2 De las variedades.....	8
2.4. Marcadores moleculares.....	11
2.5. Microsatélites.....	11
2.6. Diversidad Genética	12
2.7. Variabilidad genética.....	13
2.8. Flujo Genético y Estructura poblacional	13
2.9. Antecedentes sobre el empleo de microsatelites en <i>C. arabica</i>	14

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1.	Descripción del Área de estudio.....	16
3.2.	Lugares de muestreo y números de especímenes analizados.....	16
3.3.	Colecta y preservación de muestras vegetales	17
3.4.	Análisis de Laboratorio	17
3.4.1	Extracción del ADN	17
3.4.2	Determinación de la calidad y concentración del ADN extraído	18
3.4.3	Verificación de la extracción de ADN por electroforesis.....	18
3.4.4	Amplificación de los microsatélites vía PCR	18
3.4.5	Visualización de los productos de amplificación	20
3.4.6	Corrida de las muestras en el analizador genético	21
3.5.	Análisis de Datos	21
3.5.1	Identificación y determinación del tamaño de alelos	21
3.5.2	Diversidad alélica y variabilidad intravarietal	21
3.5.3	Variabilidad Intervarietal.....	22
3.5.3.1	Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).....	22
3.5.3.2	Índice de Fijación (F_{ST})	23
3.5.3.3	Distancia Genética.....	24
3.5.4	Flujo Genético.....	24
3.5.5	Estructuración genética.....	24
3.5.6	Relaciones intervrietales	25
IV.	RESULTADOS	26
4.1.	DIVERSIDAD ALÉLICA	26
4.2.	VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAVARIETAL.....	29

4.3.	VARIABILIDAD GENÉTICA INTERVARIETAL	30
4.3.1	ANÁLISIS FACTORIAL DE CORRESPONDENCIA (AFC)	30
4.3.2	ÍNDICE DE FIJACION (F_{ST})	31
4.4.	DISTANCIA GENÉTICA	31
4.5.	FLUJO GENÉTICO	31
4.6.	ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA.....	31
4.7.	RELACIONES INTERVARIETALES.....	32
V.	DISCUSION.....	35
VI.	CONCLUSIONES	40
VII.	RECOMENDACIONES	41
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXOS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Distribución mundial de <i>Coffea arabica</i> : color verde = nativo de Etiopia, Sudan y Kenya; color morado = introducido en Latinoamérica, Asia y otros (41).	5
Figura 02. Producción Nacional del café en el Perú (números = área cultivada de café por regiones) (42)	5
Figura 03. Principales características morfológicas de <i>C. arabica</i> L.....	7
Figura 04. Principales características morfológicas de la variedad Caturra (A=Entrenudos cortos [flechas marillas]; círculo celeste = ángulo ~45°; B= foliolos juveniles verde).	8
Figura 05. Principales características morfológicas de la variedad Pache (A=foliolos juveniles bronce; flechas amarillas = entrenudos cortos; círculo celeste = ángulo ~60°).	9
Figura 06. Principales características morfológicas de la variedad Nacional (A=foliolos juveniles bronce; flechas amarillas = entrenudos largos; círculo celeste = ángulo ~60°).	10
Figura 07. Mapa de los lugares de colecta del material vegetal de <i>C. arabica</i> en parcelas de la provincia de Moyobamba, región San Martín.	16
Figura 08. Frecuencias alélicas registradas en los nueve loci analizados en las tres variedades de <i>C. arabica</i> procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.	28

Figura 09. Proyección grafica de los resultados AFC para los ejes A) 1 y 3; B) 1 y 2, registrados en los individuos de las tres variedades de <i>C. arabica.</i> , Caturra, Pache y Nacional procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.....	30
Figura 10. Distribución de la estructura genética de cada individuo en los dos clusters deducidos ($K = 2$). Cada ejemplar está representado por una barrera vertical. La longitud del color de las barras respecto al eje principal define la proporción de membresía (Q) al cluster 1 (rojo) y cluster 2(verde).	32
Figura 11. Construcción del dendograma UPGMA estimada por la distancia de PROVESTI para individuos de <i>C. arabica</i> , nótese dos grupos: Caturra + Nacional (celeste) y Pache + Nacional (rojo). Distancia genética 0,02.	33
Figura 12. Proyección gráfica de las tres agrupaciones inferidas: I) Grupos o clusters observados en el dendograma UPGMA; II) Variedades y III) Distritos. Notar mejor estructuración en el primer gráfico.....	34

LISTA DE TABLAS

- Tabla 01.** Nombre, repetición, Fluoróforo, secuencia del primer y tamaño en pb (pares de bases) de los productos de nueve pares de cebadores microsatélites descritos por Combes *et al.*; Rovelli *et al.*; Poncet *et al.*; Bhat *et al.*, y Vieira *et al.*, para *Coffea arabica*. 20
- Tabla 02.** Clasificación de los valores de F_{ST} según Hartl y Clark (76) 23
- Tabla 03.** Valores de la diversidad genética registrados en cada uno de los nueve *loci* microsatélites estudiados para las tres variedades de *Coffea arabica*, Caturra, Pache y Nacional de la provincia de Moyobamba, región San Martín. 27

LISTA DE ANEXOS

Anexo 01. Flujoograma de extracción de ADN de las tres variedades de <i>C. arabica</i> obtenidas de seis parcelas de la provincia de Moyobamba, región San Martín.	55
Anexo 02. Electroforesis de la extracción de ADN de <i>Coffea arabica</i>	56
Anexo 03. Condiciones de amplificación del ADN de <i>Coffea arabica</i> vía Microsatelites-PCR.	56
Anexo 04. Electroforesis de la amplificación del ADN de <i>Coffea arabica</i> vía SSR-PCR..	58
Anexo 05. Obtención de pesos de los alelos usando un Analizador Genético 3130xl (Applied Biosystems)	59
Anexo 06. Electroferogramas de los paneles triplex.	59
Anexo 07. Planilla de lectura de los pesos de los alelos de 61 individuos de <i>C. arabica</i> procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.	60
Anexo 08. Frecuencias alélicas registradas en los 9 loci microsatélites analizadas en las tres variedades de <i>Coffea arabica</i> .,Caturra, Pache y Nacional procedentes de la provincia de Moyobamba, San Martín.....	62
Anexo 09. Alelos privados (A) y sus frecuencias (F) registrados en los nueve locus de <i>C. arabica</i> procedentes de tres variedades colectadas de la provincia de Moyobamba, región San Martín.....	63
Anexo 10. Valores de la variabilidad genética en las tres variedades de <i>C. arabica</i> ., Caturra, Pache y Nacional procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.	63

Anexo 11. Análisis del Índice de fijación (F_{ST}) calculados a partir de la evaluación de nueve loci microsatelites para las tres variedades de <i>C. arabica</i> de la provincia de Moyobamba, región San Martín.	64
Anexo 12. Distancia genética entre las variedades (Nei, 1978) estimada a través del análisis de nueve loci microsatelites para los individuos de <i>C. arabica</i> procedentes de Moyobamba, región San Martín.....	64
Anexo 13. Número de migrantes por generación (N_m) estimado a partir de nueve loci microsatelites para las tres variedades de <i>C. arabica</i> procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.....	64
Anexo 14. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) estimada para las agrupaciones generados hipotéticamente para las tres variedades de <i>C. arabica</i> , Caturra, Pache y Nacional procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.....	65

RESUMEN

El café (*C. arabica* L.) es el cultivo agrícola de gran importancia socioeconómica en nuestro país. La región San Martín presenta suelos, climas, altitudes, recursos hídricos y otras particularidades ideales para la siembra del café. De tal manera, la provincia de Moyobamba contribuye en la mayor producción cafetalera de la región, donde se cultivan tres variedades de gran importancia por su alta calidad en tasa llamadas Caturra, Pache y Nacional. El objetivo de la tesis fue evaluar el estado del material genético y conocer las relaciones inter e intravarietales del café en la provincia de Moyobamba, región San Martín. Se analizaron un total de 61 individuos de *C. arabica* (Caturra, Pache y Nacional) mediante 9 marcadores microsatélites polimórficos. Los perfiles moleculares revelaron diferencias entre las variedades Caturra y Pache, obteniendo relación con la variedad Nacional. El análisis de agrupamiento reveló dos grupos principales: 1) Caturra + Nacional y 2) Pache + Nacional. El AMOVA, demostró variación genética altamente significativa ($p < 0,05$) en el dendograma UPGMA ($p < 0,0009$; 22,78%). Así mismo, se muestra a detalle las relaciones genéticas de las tres variedades de café estudiadas. Los resultados manifiestan la efectividad de los microsatélites para identificar variedades de gran importancia comercial para futuros planes de conservación a través del manejo sostenible y el mejoramiento genético, así mismo, buscar el interés de la academia para posteriores investigaciones en la región San Martín.

Palabras claves: Moyobamba, *Coffea arabica*, variedades y Microsatélites.

I. INTRODUCCIÓN

El café es una de las principales bebidas de mayor consumo en el planeta. Históricamente, fue descubierto y domesticado en Etiopía, considerado uno de los estados más antiguos de África y el mundo entre el año 850 d.C., en ella comenzó su expansión desde Yemen probablemente en el siglo XIV ^(1,2). Esta planta extensamente cultivada, y ampliamente distribuida en países tropicales y subtropicales sustentan a más de 125 millones de personas en Latinoamérica, África y Asia, en tanto, Brasil, Vietnam, Indonesia y Colombia generan las mayores producciones a nivel global ^(3,4). Aproximadamente, 100 especies conforman el género *Coffea*, de las cuales dos son aprovechadas comercialmente a nivel mundial, la primera y más representativa es *C. arabica* comúnmente llamada “café arábigo” (70% de la producción) y *C. canephora* “café robusta” (30%). ⁽⁵⁻¹⁰⁾

Actualmente, *C. arabica* está conformado por 53 variedades sembradas en África, América central, el Caribe, Brasil, Colombia, Ecuador, entre otros ^(11,12). En el Perú, *C. arabica* está representada principalmente por las variedades Caturra, Catimor, Pache, Nacional y Bourbon, convirtiéndose en uno de los principales productos agrícolas que contribuyen al desarrollo económico y social en las regiones de Junín, Pasco, Cajamarca, Amazonas, San Martín, Puno y Cusco ⁽¹³⁻¹⁹⁾. De todas las regiones, San Martín durante el 2014 ocupó el primer lugar en la producción de café a nivel nacional, logrando alcanzar las 82 164 toneladas (32,61%). Entre las provincias cafetaleras en San Martín, destacan Moyobamba (22 661 T), Lamas (11 398 T), Tocache (10 276 T) y otros, donde se cultivan tres variedades de alta calidad en taza: Caturra, Pache y Nacional. ⁽¹⁷⁾

Durante mucho tiempo se ha utilizado diferentes maneras de sembrar el café en nuestro país, observando cultivos integrales con otras especies vegetales (forestales, frutales sobre todo con leguminosas), temporada de siembra, entre otros. En la región San Martín, se cree que los cafetales ubicados a mayores altitudes entre los 800 a 2 000 msnm, producen cafés más aromáticos y dulces. En este contexto, el empleo de estas prácticas habituales genera la siembra indistinta de variedades que podrían cruzarse, por lo que, la falta de asesoramiento técnico para la siembra, manejo y prácticas de poda, sumado al cambio climático (incremento de la temperatura, lluvias, aridez del suelo, destrucción de ecosistemas, etc.) favorecen la aparición de enfermedades como la roya amarilla, que ha diezmoado muchas fincas cafetaleras en Latinoamérica y otros sectores del mundo donde cultivan variedades de alto valor comercial como Bourbon, Nacional, Caturra, Catuái y Pacas susceptibles a esta enfermedad. ^(17,20,21)

Es indispensable caracterizar las variedades de café, debido al alto valor de calidad en tasa que poseen algunas tales como Caturra, Pache y Nacional. Estas variedades poseen, además, ciertas características morfoagronómicas que los diferencian del resto. Pero, estas expresiones fenotípicas deben ser sustentadas con estudios genéticos que ayuden a conocer mejor el estado de conservación de los cultivares. Actualmente, se disponen de varias herramientas moleculares tales como: Polimorfismo de la Longitud de los Fragmento de Restricción (RFLP), Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD), Repetición de Secuencias Inter Simples (ISSR), Secuencias Simples Repetidas (SSR) etc., ⁽²²⁻³⁰⁾, que son apropiadas al realizar estudios

genéticos para realizar la identificación varietal, conocer el centro de origen, inferir procesos evolutivos, de reproducción y resistencia a enfermedades en plantas como el café ^(9,28,31-35). Entre las diferentes herramientas moleculares, los SSR's o microsatélites tienen gran utilidad, porque presentan secuencias repetidas cortas, son informativos, están distribuidos al azar y uniformemente en los cromosomas ^(36,37), son heredables, polimórficos, codominantes entre otros atributos. Además, nos permiten identificar y caracterizar a especies, entre ellas *C. arabica*⁽²⁴⁾. Recientemente, en Villa Rica (Pasco) se realizó un estudio empleando marcadores moleculares universales del tipo RAPD, determinando el estado del material genético presentes en los cafetales ⁽³⁸⁾, en tanto, sugieren la necesidad de ampliar las investigaciones usando otros marcadores moleculares más específicos para conocer mejor las variedades y especies del género *Coffea* de nuestro territorio.

Los resultados de la presente tesis contribuirán a un mejor conocimiento del café, para eso se empleó el marcador molecular microsatélite en tres variedades de *C. arabica*: Caturra, Pache y Nacional, obtenidas de seis parcelas de la provincia de Moyobamba, Región San Martín. Por lo tanto, el principal objetivo fue evaluar el estado del material genético y conocer las relaciones inter e intra varietales del café, determinado por su variabilidad, filogenia y estructura genética, para posteriores planes de conservación, identificación varietal, y sobre todo para su aplicación en futuros planes de mejoramiento genético.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Posición taxonómica

Según el buscador de especies vegetales *TROPICOS* ⁽³⁹⁾ y el nuevo sistema de clasificación APG IV ⁽⁴⁰⁾, *Coffea arabica* se ubica taxonómicamente de la siguiente manera:

Subdivisión	: Angiosperms
Clado filogenético	: Eudicots
Clado filogenético	: Superasterids
Clado filogenético	: Asterids
Clado filogenético	: Lamiids
Clase	: Equisetopsida C. Agardh
Subclase	: Magnoliidae Novák ex Takht
Superorden	: Asteranae Takht.
Orden	: Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Familia	: Rubiaceae Juss
Género	: <i>Coffea</i>
Especie	: <i>C. arabica</i> L.

2.2. Distribución

C. arabica es oriunda de África (Etiopía). Normalmente, crece entre los 950 a 1950 msnm., mundialmente está localizada en regiones tropicales y subtropicales, principalmente en África, Asia y Latinoamérica ⁽⁴¹⁾ (Figura 01). En nuestro país, el Ministerio de Agricultura y Riego - MINAGRI y la Junta Nacional del Café - JNC, manifiestan que la producción del café se centra en las regiones de Junín, Pasco, San Martín, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Amazonas, Huánuco, Loreto ⁽⁴²⁾ (Figura 02).

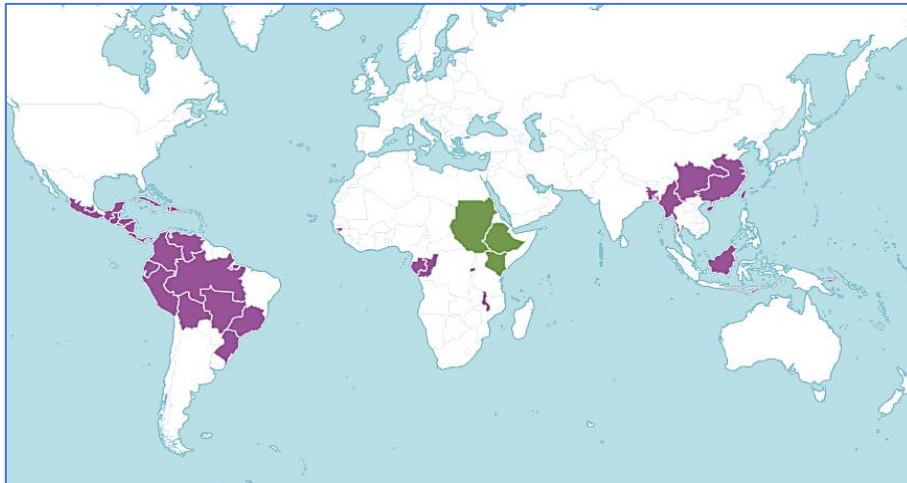


Figura 01. Distribución mundial de *Coffea arabica*: color verde = nativo de Etiopía, Sudán y Kenia; color morado = introducido en Latinoamérica, Asia y otros ⁽⁴¹⁾.

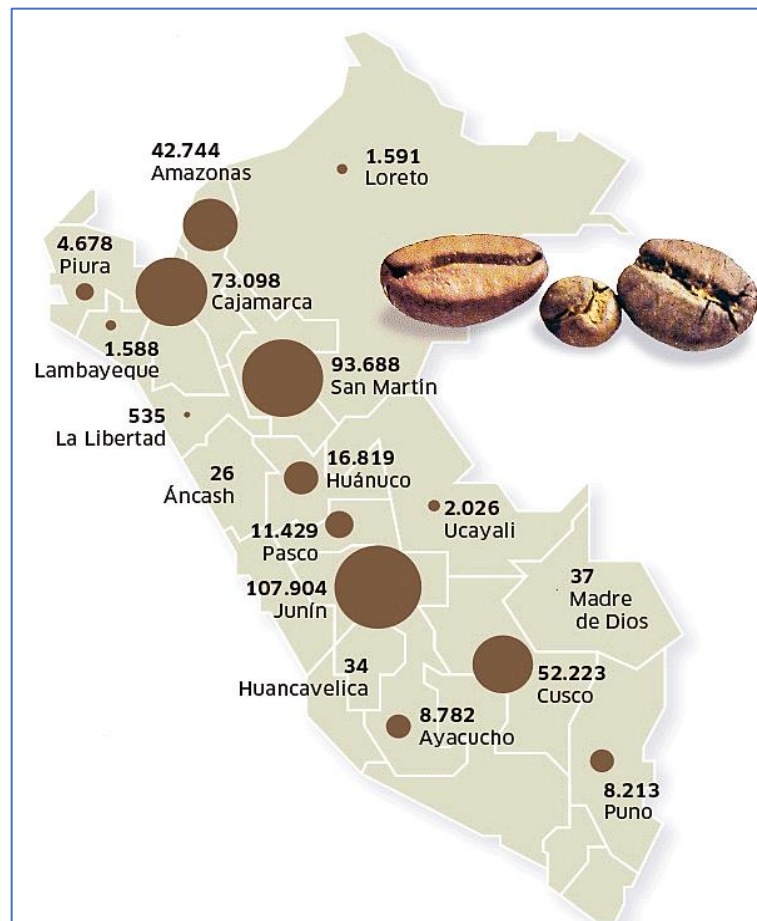


Figura 02. Producción Nacional del café en el Perú (números = área cultivada de café por regiones)⁽⁴²⁾

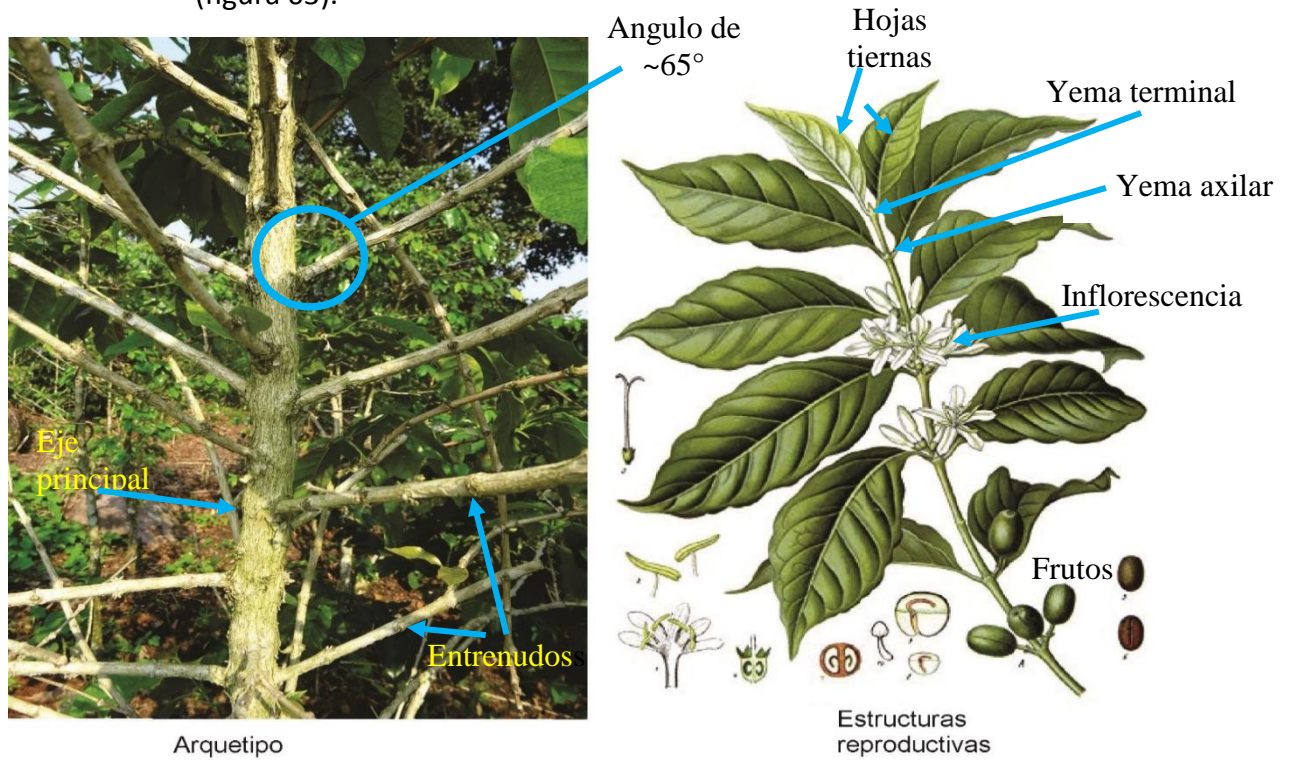
2.3. Descripción vegetal

2.3.1 De la especie

Coffea arabica pertenece a la familia Rubiaceae, arbusto de 2 a 3 m de altura normalmente cilíndrico; con ramas laterales primarias que forman un ángulo medio de $\sim 65^\circ$ con el eje principal, posee extremidades inclinadas hacia abajo con ramas secundarias y terciarias abundantes. El follaje es persistente, de color verde oscuro al madurar, elípticas, ligeramente coriáceas y márgenes algo ondulados. No presentan pelos en el envés de las hojas, eventualmente se encuentran en los márgenes de las aberturas. Las estipulaciones se encuentran en la inserción de los pecíolos, son deltoides, acuminados con una punta de longitud variable. Las flores poseen una corola blanca y se agrupan en glomérulos protegidos por cálculas. El número de flores varía de 2 a 19 por axila de la hoja. El ovario es biloculado o triloculado; El cáliz es rudimentario, denticulado. Los frutos tienen pedicelos cortos, son ovales-elípticas, rojas, con una superficie lisa, brillantes cuando maduran; presentan mesocarpo carnoso y un endocarpo fibroso. Las semillas son planas-convexas, verdosas, cubiertas con una fina capa. El endospermo es córneo, verdoso, localizándose el embrión en la base ^(13,16,35). Muchos autores consideran a *C. arabica* como la única especie alotetraploide (anfidiplóide; $2n = 4x = 44$), con dos genomas diplóides originados por sus parientes silvestres diplóides ($2n = 2x = 22$) *C. canephora* y *C. eugenioides*, además, de ser autofértil. El sistema reproductivo del café es del tipo polinización cruzada, ocurrida por acción del viento e insectos. En cuanto a su biología floral, se considera una

especie principalmente autógama, sin embargo, también puede comportarse como alógama. Observar autopolinización en normal en *C. arabica*, lo cual genera autoincompatibilidad entre sus individuos ^(35,43)

(figura 03).



Planta de *C. arabica*

Figura 03. Principales características morfológicas de *C. arabica* L.

2.3.2 De las variedades

Variedad Caturra

La variedad “Caturra”, es considerada una mutación de la variedad de café “Bourbón” creada posiblemente en Minas Gerais (Brasil). Esta variedad presenta entrenudos cortos, porte bajo, con ramas laterales abundantes, numerosas ramificaciones secundarias que dan a la planta un aspecto vigoroso. Los folíolos juveniles de color verde claro y al madurar verde intenso, un poco más anchas y proporcionalmente más largas que las del “Bourbon”. Es más precoz y presenta una mayor producción en relación con las líneas comunes de Nacional y Bourbon⁽⁴⁴⁾(Figura 04).



Figura 04. Principales características morfológicas de la variedad Caturra

(A= Entrenudos cortos [flechas amarillas]; círculo celeste = ángulo ~45°; B= folíolos juveniles verde).

Variedad Pache

La variedad “Pache” fue creada en Guatemala, presenta buena calidad en taza, de porte bajo con buena ramificación secundaria, entrenudos cortos y mucho follaje terminando en una copa bastante plana o “Pache”. Las hojas son de color bronce, flores y frutos similares a la variedad “Nacional”. En los primeros años su productividad es buena aunque su maduración es prolongada e irregular ⁽⁴⁵⁾ (Figura 05).



Figura 05. Principales características morfológicas de la variedad Pache (A=foliolo juveniles bronce; flechas amarillas = entrenudos cortos; círculo celestre = ángulo ~60°).

Variedad Nacional

También llamada café variedad “Típica”, considerada como la variedad tipo de la especie *C. arabica* por lo que proviene de Etiopía. Tiene el tamaño del grano relativamente grande, calidad superior como bebida, robustez a condiciones adversas de baja fertilidad y sequía, mayor resistencia y flexibilidad de las ramas durante la cosecha, alta productividad, las hojas de color bronceado, oblongas, elípticas, con base y el ápice agudo, emergen del ápice del eje central como de las ramas laterales, forman ángulos entre 50 a 70° con el eje principal. Esta variedad en libre crecimiento alcanza hasta los 4 m de altura. El tallo tiene un solo eje vertical generalmente, y las ramas laterales abundantes y entrenudos largos ⁽⁴⁵⁾ (Figura 06).



Figura 06. Principales características morfológicas de la variedad Nacional

(A=foliolo juveniles bronce; flechas amarillas = entrenudos largos; círculo celeste = ángulo ~60°).

2.4. Marcadores moleculares

Un marcador molecular es un carácter que permite diferenciar por medio de la observación y cuantificación ciertas características fenotípicas fácilmente detectables en los organismos. Normalmente las herramientas basadas en los marcadores moleculares se emplean desde el desarrollo embrionario, el individuo completo o una pequeña parte de ella ⁽⁴⁶⁾. La ventaja de los marcadores radica en la ilimitación de su número, fácil detección, capacidad de heredabilidad y sobre todo no se ven afectados por el ambiente ^(47,48). La utilidad de los diferentes marcadores moleculares se basa en el interés de la investigación. Las diferentes técnicas moleculares representan una fuerte herramienta para el mejoramiento de plantas. De este modo ayuda en la aplicación durante el reconocimiento de la variabilidad genética, selección asistida por marcadores, mapas de ligamiento genético en poblaciones naturales y cultivadas de muchas especies vegetales contribuyendo al mejoramiento genético respaldada por descriptores morfológicos y agronómicos ⁽⁴⁹⁾.

2.5. Microsatélites

Los marcadores moleculares tipo microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR's) son regiones de secuencias pequeñas de dos a diez pares de bases repetidas, las cuales se encuentran arregladas en series y distribuidas por todo el genoma. Estas secuencias de ADN son altamente variables en el genoma de plantas, hongos y animales, pueden o no estar asociadas con genes, además, son *loci* altamente mutables ⁽⁵⁰⁾. Mediante esta herramienta podemos medir la

diversidad entre genotipos amplificando mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la región del ADN genómico de utilidad ⁽⁵¹⁾.

El gran interés de analizar los microsatélites radica en su carácter codominante, multialelista, heterocigosidad y alto grado de polimorfismo, el cual permite la separación exacta entre individuos altamente relacionados. Asimismo, los microsatélites utilizan pequeñas cantidades de ADN. Una gran ventaja de esta herramienta molecular es que es especie – específica⁽⁵²⁾. También, las amplificaciones de los microsatélites son muy variables en comparación de otras técnicas como isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD ⁽⁵³⁾.

Finalmente, las aplicaciones de los microsatélites son muy valiosas debido a su mayor nivel de transferibilidad a especies relacionadas, ya que a menudo pueden ser empleados como marcadores de anclaje para la cartografía comparativa y los estudios evolutivos ⁽⁵⁴⁾.

2.6. Diversidad Genética

La diversidad genética es el componente inferior de la biodiversidad, definiéndose como las variaciones heredables que ocurren en cada ser vivo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie, cuyas condiciones naturales son regularmente estables ^(55,56). Es así, que su conocimiento y comprensión es fundamental para la conservación, evolución genética, domesticación, biomedicina entre otros.

En cuanto a la aplicación de estos conocimientos, podríamos evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante cambios ambientales naturales o provocados por la actividad antropogénica. También, para

determinar los peligros en la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos, estimación de riesgos por enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y/o modificadas genéticamente en las poblaciones, especies nativas y recursos genéticos de plantas, animales y personas ⁽⁵⁶⁾.

2.7. Variabilidad genética

Se refiere a la variabilidad del ADN de una población, especie o el genoma de un organismo, esta variabilidad para ser seleccionada debe estar dispuesta en organismos previamente adaptados, ya que la variabilidad natural de cada especie no puede ser empleada directamente. Por ello, para obtener la variabilidad y adaptación de un individuo se debe recurrir al mejoramiento genético ⁽⁵⁷⁾.

2.8. Flujo Genético y Estructura poblacional

El flujo genético o migración de genes es el conjunto de procesos implicados en el desplazamiento de genes entre poblaciones. Este flujo de genes puede ocurrir de mayor a menor grado tanto de genes nucleares, mitocondriales o cloroplásticos y ocurre por el movimiento de gametos, semillas, individuos jóvenes o adultos (animales y plantas). Otros procesos implicados son la colonización de nuevos espacios geográficos. El estudio del flujo genético ha sido frecuentemente incluido en investigaciones de biología evolutiva porque influye en la estructura poblacional de las especies ⁽⁵⁸⁾, ya que determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva particular ^(59,60).

2.9. Antecedentes sobre el empleo de microsatelites en *C. arabica*

Con el objetivo de ver la capacidad informativa y efectividad de 31 marcadores microsatelites para diferenciar 34 variedades de *C. arabica*, Vieira *et al.*,⁽³³⁾ encontraron en promedio 2.35 alelos por *locus* distinguiendo individuos dentro y entre variedades. Así mismo, reportaron prevalencia de homocigosis en la mayoría de individuos analizados, además, el dendograma revelo 14 grupos genéticos conformado por variedades tales como: Catuaí Vermelo IAC 144, Bourbon amarelo UFV 535, IBC-Palma-2, Sacramento, Araponga y Paraíso entre otros.

Geleta *et al.*,⁽⁶¹⁾ en su estudio “Diversidad genética de *C. arabica* en Nicaragua empleando marcadores de Repetición de Secuencia Simple – SSR”. Reportaron en ocho variedades, 24 alelos usando 12 *locis* conformado por 260 plantas. Respecto a la diversidad general de genes, cada *locus* polimórfico oscilo de 0,01 a 0,55. También, la diversidad genética de cada población varió de 0,23 a 0,47. A nivel de variedad, la diversidad genética media de Nei varió de 0,24 (variedad Maracaturra) a 0,37 (variedad Catimor) con el porcentaje más bajo y más alto correspondiente de 0,33 y 0,52. La Variedad Catimor mostró la mayor diversidad de genes en cinco de los ocho *loci* polimórficos. Finalmente encontraron alelos raros en cinco de las 26 poblaciones empleadas.

Palomino *et al.*,⁽³⁸⁾ durante su investigación “Evaluación de la diversidad genética del café (*C. arabica* L.) en Villa Rica - Perú”. Amplificaron un total de 42 muestras, 18 variedades de *C. arabica* complementados con variedades *C. canephora*, mediante marcadores RAPD. Durante su investigación, registraron

un total de 83 fragmentos de ADN, de las cuales solo 34 (40,96 %) fueron polimórficos y confiables, variando entre 1 a 5 en número, de 316 a 1445 (pb) en tamaño de los fragmentos polimórficos encontrados. Asimismo, observaron un dendograma que abarcaba una mezcla entre individuos de las diferentes variedades estudiadas. Además, determinaron una alta diferenciación genética entre las variedades de *C. arabica* y variedades de *C. canephora*.

Castillo y Rodríguez ⁽⁶²⁾, indican que el AFC es un método que permite estudiar las relaciones entre dos variables cualitativas partiendo de una tabla de contingencia. Es decir, describe las agrupaciones entre las variables de un grupo de individuos, independientemente de su pertenencia a grupos definidos, poblaciones o procedencia geográfica. El objetivo principal es comparar mediante una representación gráfica los individuos entre sí y determinar la relación de similitud que existe entre ellos en un espacio de di o tridimensional.

Juli ⁽⁶³⁾, refiere que el índice de fijación (F_{ST}) mide la división dentro de una población, es decir la interpretación del efecto entre el flujo genético reducido y la deriva genética. Entonces, el F_{ST} indica el grado de diferenciación entre las poblaciones estudiadas, es decir, que tan diferentes o similares pueden ser. De tal manera con los valores del F_{ST} se genera la tasa de migración (flujo genético) que determina el número de migrantes (Nm) efectivos de una población independiente. El autor, manifiesta que la distancia genética mide las diferencias génicas entre dos poblaciones, mientras menor grado de diferenciación posean las poblaciones serán más parecidas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del Área de estudio

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Botánica Aplicada “Jean-Christophe Pintaud” del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP-San Martín), localizado en el Jr. Belen Torres de Tello 135 del Distrito de Morales-Tarapoto, Provincia y Región San Martín.

3.2. Lugares de muestreo y números de especímenes analizados

Fueron analizados un total de 61 individuos de *Coffea arabica* L. variedad Caturra (20), Pache (20) y Nacional (21) procedentes de los Distritos de Jepelacio (Parcela 1, 2 y 3), Indañe (Parcela 4 y 5), y Yántalo (Parcela 6) en la provincia de Moyobamba, región San Martín (Figura 07).

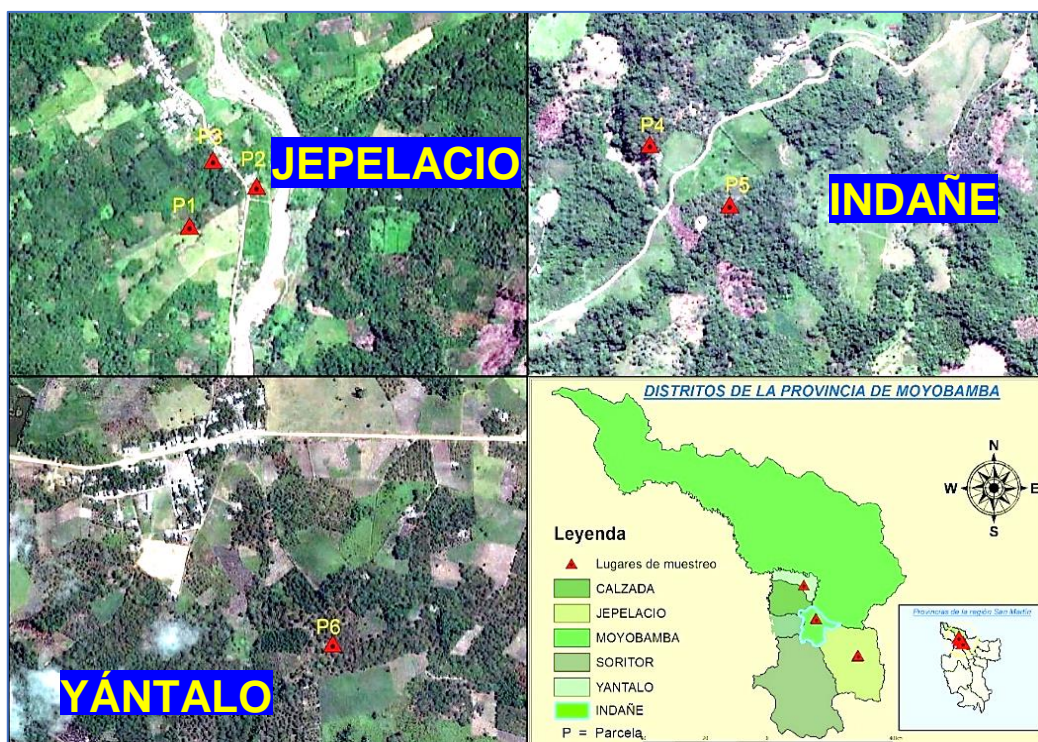


Figura 07. Mapa de los lugares de colecta del material vegetal de *C. arabica*

en parcelas de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

3.3. Colecta y preservación de muestras vegetales

De cada individuo seleccionado, se colectaron fragmentos del tejido foliar (5 x 2 cm). Las muestras colectadas fueron preservadas en bolsas Ziploc de 18 x 20 cm etiquetadas conteniendo ~15 g de Silica gel y almacenadas a temperatura ambiente, posteriormente se trasladó al laboratorio para el proceso de extracción del material genético.

3.4. Análisis de Laboratorio

3.4.1 Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó por el método del Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) de Doyle y Doyle ⁽⁶⁴⁾ modificado, descrito a continuación:

Se colocó ~50 mg de muestra (hojas secas) en un microtubo de 2 ml que contenía cuatro perlas de acero de 2 μ m, luego se trituró en un homogeneizador de tejidos (Omni 25-010; Bead Ruptor 4; USA). Después del triturado se agregó 1 ml de tampón CTAB precalentado a 65°C (CTAB 2%, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M pH 8, Tris Base 0,2 M) y 10 μ l de proteinasa K (10 mg/ml). La mezcla homogenizada fue incubada por 2 h a 65 °C (H. W. Kessel: baño termostático BT0005; Lima - Perú). Para eliminar los contaminantes, se adicionó 1 ml de cloroformo, se homogenizó y centrifugó (Eppendorf; MiniSpin 22331; Hamburgo - Alemania) a 8000 rpm x 5 min a 4 °C. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1,5 ml y añadió igual volumen de isopropanol frío, se homogenizó e incubó por 2 h a -20 °C, después fue centrifugado a 13000 rpm x 15 min a

4 °C. Después de descartar el sobrenadante, el ADN precipitado se lavó dos veces con etanol al 70% incluyendo etapas de centrifugación a 13000 rpm x 15 min a 4 °C entre los lavados, se descartó el sobrenadante y el alcohol remanente fue evaporado a temperatura ambiente por 24 h. Finalmente el ADN genómico fue resuspendido con 30 µl de agua ultrapura (Anexo 01).

3.4.2 Determinación de la calidad y concentración del ADN extraído

Fue determinado con un espectrofotómetro micro-UV/Vis (Thermo Fisher Scientific; NanoDrop One^c; Massachusetts – USA), para lo cual se utilizó 1µl de muestra. En base a la siguiente ecuación el equipo determina la concentración del ADN:

$$[A_{260} \times FD \times 50\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Dónde:
A: Absorbancia
FD: Factor de dilución

3.4.3 Verificación de la extracción de ADN por electroforesis

La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % durante 30 min a 130 voltios y teñidos con gel red (3 mg/ml). Las bandas de ADN fueron visualizadas en un transluminador de luz UV/Vis y fotografiadas con un sistema de fotodocumentación digital (Edvotek; Sistema de Fotodocumentación Digital UV, USA) (Anexo 02).

3.4.4 Amplificación de los microsatélites vía PCR

La amplificación de los *loci* microsatélites fue realizada con 9 pares de cebadores descritos por Combes *et al.*,⁽²³⁾; Rovelli *et al.*,⁽²⁴⁾; Poncet *et al.*,⁽⁶⁵⁾; Bhat *et al.*,⁽⁶⁶⁾ y Vieira *et al.*,⁽⁶⁷⁾ (tabla 01), para la especie *C. arabica* ⁽⁴⁰⁾.

La reacción de amplificación se realizó empleando dos estrategias: el PCR touchdown y el PCR convencional. En ambas estrategias se empleó un volumen final de reacción de 10 μ l, pero con diferencias en la concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y desoxirribonucleótidos (dNTPs) empleados. La primera reacción constó de tampón 1x, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada cebador, 0,25 U de Taq ADN polimerasa, 0,75 ng/ μ l de ADN y agua ultrapura. La segunda reacción contenía tampón 1x, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada cebador, 0,25 U de Taq ADN polimerasa, 0,75 ng/ μ l de ADN y agua ultrapura. Posteriormente, se realizó las amplificaciones con un termociclador (PCRmax Alpha Cycler 1; AC196; UK) empleando dos programas uno con la opción touchdown y la otra de un PCR convencional. El primer programa consistió de una etapa de desnaturalización inicial a 94°C x 2 min, seguido por 13 ciclos de desnaturalización a 94°C x 30 s, hibridación a 67°C/ disminuyendo 1°C cada ciclo x 30 s, y extensión a 72°C x 30s, y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C x 30 s, hibridación a 55°C x 30 s, y extensión a 72°C x 30 s y una extensión final a 72°C por 8 min. El segundo programa constó de una desnaturalización inicial a 94°C x 3 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización 94°C x 30 s, hibridación a 58°C x 30 s, extensión a 72°C x 45 s y una extensión final a 72°C x 3 min (Anexo 03). Los cebadores empleados se indican en la Tabla 01.

Tabla 01. Nombre, repetición, Fluoróforo, secuencia del primer y tamaño en pb (pares de bases) de los productos de nueve pares de cebadores microsátélites descritos por Combes *et al.*,⁽⁶⁸⁾; Rovelli *et al.*,⁽²⁴⁾; Poncet *et al.*,⁽⁶⁵⁾; Bhat *et al.*,⁽⁶⁶⁾ y Vieira *et al.*,⁽⁶⁷⁾ para *Coffea arabica*.

N°	Locus	Repetición	Fluoróforo	Secuencia de Primers (5' – 3')	Tamaño del producto (pb) esperado	Tamaño del producto (pb) observado
1	M47	(CT) ₉ (CA) ₈ /(CT) ₄ /(CA) ₅	FAM	F: TGATGGACAGGAGTTGATGG R: TGCCAATCTACCTACCCCTT	100–132	116-150
2	M24	(CA) ₁₅ (CG) ₄ CA	HEX	F: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC	132–166	162-164
3	M20	(GA) ₅ (GT) ₈ TT(GT) ₄ TT(GT) ₇ (GA) ₁₁ (TC) ₂ (CT) ₃ GT	NED	F: CTTGTTTGAGTCTGTCGCTG R: TTTCCCTCCCAATGTCTGTA	240-270	296-316
4	M782	(GT) ₁₅	FAM	F: AAAGGAAAATTGTTGGCTCTGA R: TCCACATACATTTCCAGCA	114	104-114
5	32-2CTG	(CA) ₁₂	HEX	F:AAGGGGAGTGGATAAGAAGG R: GGCTGGATTTGTGCTTTAAG	128	206-216
6	E6-3CTG	(TG) ₁₆	NED	F: CTGGGTTGGTTCTGATTTTG R: GGTTCCCAGAGATTCTCTCC	341	328-332
7	CofEST-SSR04	(AC) ₁₀	FAM	F: GGTCGCTCACTCATATCTTCCAG R: GCCTGAAAAGCAAACGTCTCA	137–151	142-150
8	CarM050	(TC) ₂₀	HEX	F: ATCCCTCCACGGCAACCCAAAATA R: ATCCGCAGCCCTCACCATCCA	150-190	280-288
9	CarM051	(CT) ₁₀	NED	F:GATGTGGAGGAGGCTGCTGCTGAA R:TAGGGCCCATCTGGTAGGGTTGT	250-300	266-268

3.4.5 Visualización de los productos de amplificación

Los productos amplificados fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, a razón de 3µl de gel red / 3µl de producto. La electroforesis se realizó en tampón tris-borato-EDTA (TBE 1X / TBE 10X: Tris base 121,14 g/mol; Ácido bórico 61,83 g/mol; EDTA 0.5M pH8, y agua destilada) a 130 voltios durante 15 min. La visualización y registro fotográfico se realizó con un transluminador de luz UV y mediante un sistema de fotodocumentación (Edvotek; Sistema de Fotodocumentación Digital UV, USA) (Anexo 04).

3.4.6 Corrida de las muestras en el analizador genético

Se realizó utilizando 1 μ l del producto amplificado homogenizado con 8,7 μ l de formamida y 0,3 μ l del marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX. Esta mezcla fue desnaturalizada a 96°C por 5 min y luego enfriada a 4°C. El tamaño de los amplicones obtenidos se determinó mediante electroforesis capilar en un analizador genético (Applied Biosystems; 3130XL; USA) (Anexo 05).

3.5. Análisis de Datos

3.5.1 Identificación y determinación del tamaño de alelos

Una vez obtenido los electroferogramas, se identificó el tamaño de cada uno de alelos mediante el programa Peak Scanner versión 1.0 (<https://products.appliedbiosystems.com>) (Anexo 06).

3.5.2 Diversidad alélica y variabilidad intravarietal

La diversidad genética fue analizada con el programa Genetix v 4.05.2 ⁽⁶⁹⁾ que nos permitió calcular el número de alelos por locus (N), la riqueza alélica (A_R), la diversidad alélica (A_T), los valores de la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) y el coeficiente de endogamia (F_{is}) en cada *locus* por cada variedad.

El aumento o déficit de heterocigotos promedio en cada *locus* hace referencia que la subdivisión de una población causa un efecto similar a la

endogamia, este efecto se puede medir por la reducción en la proporción de genotipos heterocigóticos, es decir, en términos de H.

El coeficiente de endogamia (F_{IS}) calcula la disminución en la heterocigosidad de un individuo debido a la existencia de cruzamientos no al azar dentro de su subpoblación. Para calcular el F_{IS} se considera dos valores que varían entre -1 y +1. Cuando el valor es negativo uno, indica que existe exceso de heterocigosidad. Por el contrario, si el valor es positivo uno, significa que existe déficit de heterocigosidad ^(70,71).

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S} = \frac{H_E - H_O}{H_E}$$

Dónde : $H_S = H_E$ = Heterocigosidad esperada

$H_I = H_O$ = Heterocigosidad observada

Conjuntamente, con el programa GenAlex v 6.4 se evaluó las frecuencias alélicas por locus y el número de alelos exclusivos (alelos presentes sólo en una variedad). Las diferencias estadísticas significativas fueron estimadas con intervalos de confianza al 95% ⁽⁵⁶⁾.

3.5.3 Variabilidad Intervarietal

3.5.3.1 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC)

Se elaboró una matriz binaria en base a los alelos obtenidos por cada *locus* informativo y se realizó el AFC con el Software Genetix v 4.05.2, este análisis permite estudiar las relaciones interdependientes entre variables categóricas o cualitativas (no métricas) permitiendo conocer

la estructuración de la relación^(69,72), posteriormente los datos se exportaron al programa R⁽⁷³⁾ para la elaboración de las figuras. El AFC fue utilizado como método exploratorio para visualizar si existían diferencias genéticas entre las tres variedades de *C. arabica* estudiadas.

3.5.3.2 Índice de Fijación (F_{ST})

Los F_{ST} fueron calculados con ayuda del Software Genetix v 4.05.2⁽⁶⁹⁾, utilizando el estimador de Weir y Cockerham⁽⁷⁴⁾ y Weir⁽⁷⁵⁾.

$$F_{st} = \frac{\Sigma(A_i)}{\Sigma(A_i + B_i)}$$

Dónde:

A_i = Componente de la variación de los perfiles entre los grupos.

B_i = Componente de la variación de los perfiles dentro de cada grupo.

Tabla 02. Clasificación de los valores de F_{ST} según Hartl y Clark⁽⁷⁶⁾.

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

3.5.3.3 Distancia Genética

Este análisis se realizó con el Software Genetix v 4.05.2, ejecutado por la estimación de la distancia genética de Nei ⁽⁷⁷⁾, este análisis sirve para medir la diferenciación genética entre pares de poblaciones. De tal forma, si se obtiene valores cercanos a 0 se revelan que existe una alta similitud, mientras que los valores cercanos a 1 muestran una completa diferencia entre las poblaciones⁽⁶³⁾.

3.5.4 Flujo Genético

Las tasas de migración (flujo génico) fueron estimadas de forma lineal a partir de los valores del Índice de Fijación (F_{ST}), expresada en número de migrantes por generación (Nm) donde $Nm = (1-F_{st}) / 4 * F_{st}$. Para determinar el número de migrantes por generación se multiplico el tamaño efectivo (N_e) de la población por la tasa de migración (m)⁽⁶³⁾.

3.5.5 Estructuración genética

Para determinar la estructuración genética de las poblaciones, se evaluó el análisis de asignación Bayesiana a través del software Structure v 2.3.1^(78,79). Para estimar la estructura genética los individuos son asignados probabilísticamente a uno de los grupos genéticos (K), donde K puede tomar valores desde uno hasta cualquier número dado por el usuario. Estos datos son corridos 10 veces por cada valor de K y cada corrida tiene un “burn-in” de 10000 pasos, seguidos de 100000 iteraciones⁽⁸⁰⁾. Finalmente, se estableció el número de grupos genéticos que tuvo mayor probabilidad,

determinando el valor máximo de la estadística ΔK , según el método de Evanno *et al.*,⁽⁸¹⁾.

3.5.6 Relaciones intervarietales

Las relaciones entre las variedades se efectuó con el programa R⁽⁷³⁾. En ella, se estimó la distancia genética de PROVESTI⁽⁸²⁾, que refleja el número de diferencias alélicas entre dos individuos, más precisamente la proporción de alelos diferentes, y va en escala de 0 a 1. Posteriormente, se empleó el método de Grupo de pares no Ponderados con Análisis de la Media Aritmética-UPGMA para observar agrupaciones según los datos obtenidos de los microsatelites. Los datos generados en R se exportaron al software MEGA 7⁽⁸³⁾ para visualizar el Dendrograma UPGMA, y los valores que presentan indican la confiabilidad que adopta la topología de los árboles en cada grupo genético que se forma. Finalmente, se realizó el Análisis de Varianza Molecular – AMOVA, para conocer la variación de los datos dentro de cada agrupación inferida hipotéticamente según los objetivos del presente estudio: 1) variación dentro de las variedades, 2) variación dentro de los Distritos y 3) variación dentro del Dendrograma UPGMA. Los valores obtenidos en este análisis indicarían diferencias genéticas altamente significativas.

IV. RESULTADOS

4.1. DIVERSIDAD ALÉLICA

Se registró un total de 25 alelos en 61 individuos de *Coffea arabica* (Caturra, Pache y Nacional) analizados con nueve *Loci* microsatélites. Los mayores números de alelos lo representaron los *locus* M782 y 32-2CTG con 4 alelos independientemente, en comparación con los *locus* M24, CofEST-SSR04, CarM050 y CarM051 que mostraron solo 2 alelos cada uno. Los *locus* obtuvieron un promedio de alelos de $2,7 \pm 0,8$.

Los datos de heterocigidad observada (H_o) variaron de 0 para los *locus* M24 y CarM051 a 0,983 en los *locus* M20 y CarM050, con un promedio de 0,682 respectivamente. En cuanto a la heterocigidad esperada (H_e), los valores fueron de 0,065 para el *locus* CarM051 a 0,649 en el *locus* 32-2CTG, con una media de 0,406. Finalmente se determinó el coeficiente de endogamia (FIS), obteniendo en su gran mayoría valores negativos en los *locis* analizados, indicando predisposición al exceso de heterocigosis. También, se encontró valores positivos en los *locis* M24 y CarM051 (tabla 03).

Tabla 03. Valores de la diversidad genética registrados en cada uno de los nueve *loci* microsatélites estudiados para las tres variedades de *Coffea arabica.*, Caturra, Pache y Nacional de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

LOCUS	A	H _o	H _e	F _{IS}
M47	3	0.224	0.196	-0.091
M24	2	0.000	0.189	1.000
M20	3	0.983	0.521	-0.888
M782	4	1.000	0.515	-0.942
32-2CTG	4	0.952	0.649	-0.495
E6-3CTG	3	1.000	0.522	-0.913
CofEST-SSR04	2	1.000	0.500	-1.000
CarM050	2	0.983	0.500	-0.967
CarM051	2	0.000	0.065	1.000
Media	2.778	0.682	0.406	-0.366

Leyenda: **A:** Numero de alelos; **H_o:** Heterocigocidad observada; **H_e:** Heterocigocidad esperada y **F_{IS}:** Coeficiente de endogamia.

De todos los alelos registrados, los alelos 164 (M24) de la variedad Caturra y 268 (CarM051) de la variedad Pache presentaron las mayores frecuencias alélicas (1,000 cada uno), a diferencia de los alelos 104 y 110 (M782) de la variedad Nacional, que presentaron las menores frecuencias (0,024 independientemente) respectivamente. Los *locus* M47 y CarM051 mostraron superioridad de frecuencia de los alelos 116 y 268 en las tres variedades (variación de frecuencias de 0,833 a 1,000) (Figura 08). Los tamaños de los alelos variaron de 104 a 332 pb (Anexo 08).

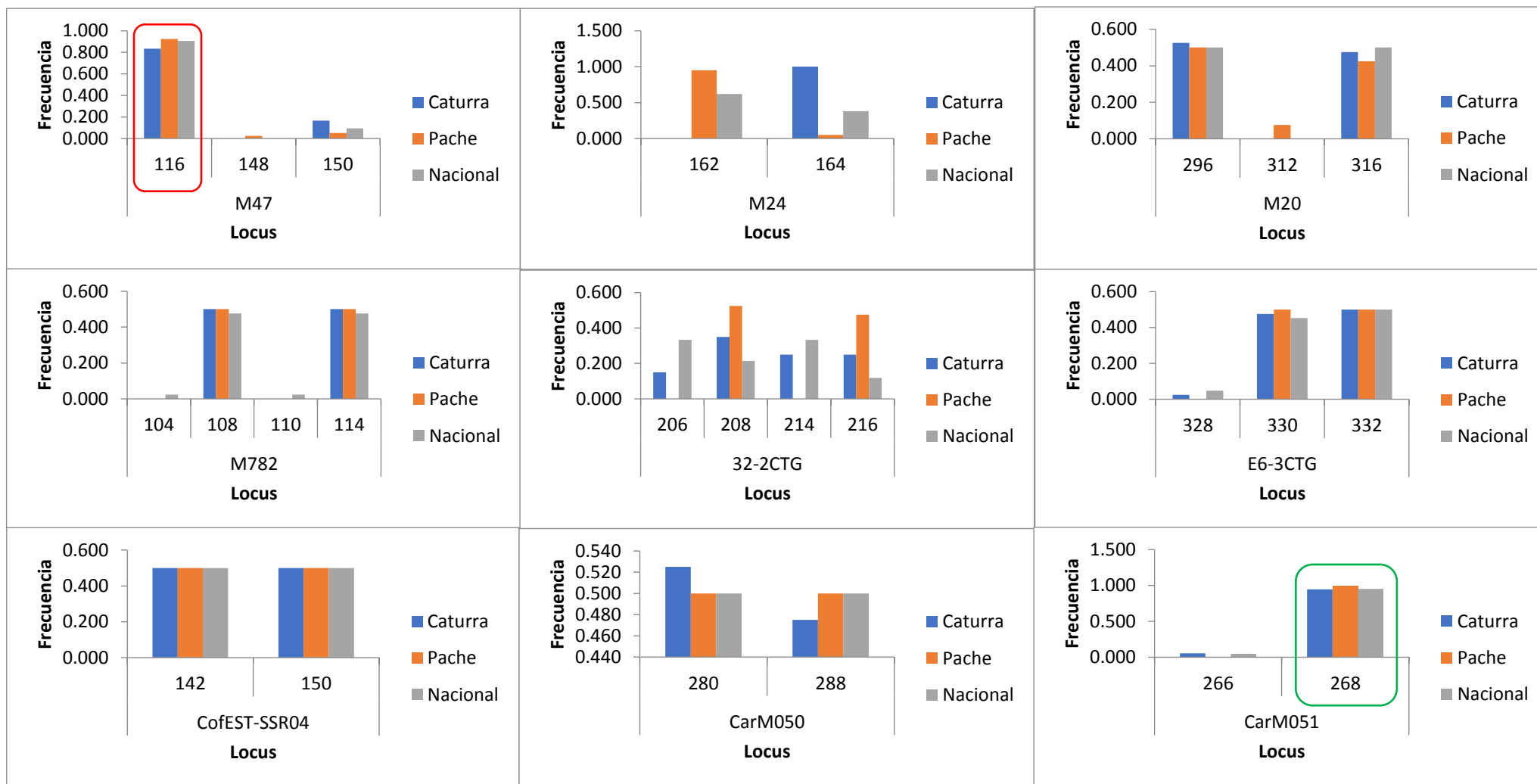


Figura 08. Frecuencias alélicas registradas en los nueve *loci* analizados de las tres variedades de *C. arabica* procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

Alelos privados

Se identificaron cuatro alelos en total (alelos únicos o exclusivos de una variedad) en las variedades Pache y Nacional, no obstante, las frecuencias alélicas (F) fueron menores en relación con los alelos comunes. Las variedades Pache y Nacional presentaron dos alelos propios cada uno. La frecuencia alélica fue mayor en el alelo 312 del *locus* M20 ($F = 0,075$) en la variedad Pache, a diferencia de la frecuencia más baja en los alelos 104 y 110 del *locus* M782 ($F = 0,024$ cada uno) de la variedad Nacional (Anexo 09).

4.2. VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAVARIETAL

De las tres variedades de *C. arabica*, el mayor número de alelos y riqueza alélica lo presentó la variedad Nacional ($A_T = 25$; $A_R = 2,5$), seguido de la variedad Caturra ($A_T = 22$, $A_R = 2,2$), y en menor proporción la variedad Pache ($A_T = 21$, $A_R = 2,1$). Los valores promedios de la H_o siempre fueron mayores que la H_e en las tres variedades de café evaluadas. Todos los valores del Coeficiente de endogamia (F_{IS}) fueron negativos en las tres variedades, siendo el mayor valor negativo para la variedad Pache ($-0,842$) y menor en Nacional ($-0,490$), indicando tendencia al exceso de heterocigocidad de los individuos analizados (Anexo 10).

4.3. VARIABILIDAD GENÉTICA INTERVARIETAL

4.3.1 ANALISIS FACTORIAL DE CORRESPONDENCIA (AFC)

El AFC indica que las variedades presentan estructuración genética, porque grupos genéticos formados corresponden a las tres variedades analizadas. Se observó que las variedades Caturra y Pache muestran una mejor diferenciación entre sí en comparación de la variedad Nacional, ya que comparte espacio con ambas variedades (Figura 09 B).

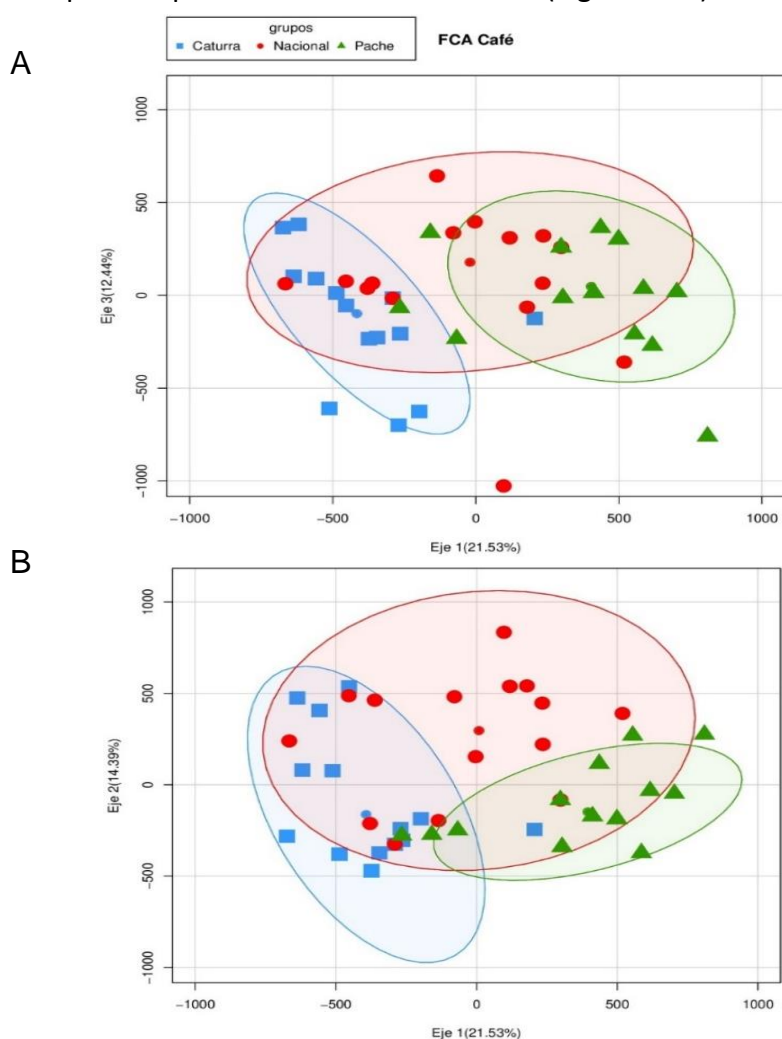


Figura 09. Proyección gráfica de los resultados AFC para los ejes A) 1 y 3; B) 1 y 2, registrados en los individuos de las tres variedades de *C. arabica.*, Caturra, Pache y Nacional procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

4.3.2 INDICE DE FIJACION (F_{ST})

Los resultados de las tres variedades de *C. arabica* manifestaron diferenciación genética altamente significativas y diferentes a cero ($p \leq 0,001\%$). El mayor grado de diferenciación genética se registró entre las variedades Caturra y Pache ($F_{ST} = 0,221$), seguido de Caturra y Nacional ($F_{ST} = 0,091$), y menor entre Pache y Nacional ($F_{ST} = 0,078$) (Anexo 11).

4.4. DISTANCIA GENETICA

Entre las variedades Caturra y Pache existe mayor distancia genética (0,184), seguida de Nacional y Caturra (0,067), y Nacional con Pache presentaron menor distancia genética (0,047) (Anexo 12).

4.5. FLUJO GENETICO

Las variedades Caturra y Pache obtuvieron el menor flujo de genes ($Nm = 0,88$), seguido de Caturra y Nacional ($Nm = 2,51$), mientras que las variedades Nacional y Pache presentaron mayor flujo genético ($Nm = 2,97$) (Anexo 13).

4.6. ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA

Los análisis muestran que las variedades analizadas están divididas en dos grupos genéticos ($K = 2$). Las variedades Caturra (verde) y Pache (rojo) forman grupos genéticos parcialmente independientes porque comparten ciertos alelos, mientras que la variedad Nacional tiene componentes genéticos de las variedades Caturra y Pache (verde y rojo) (Figura 10).

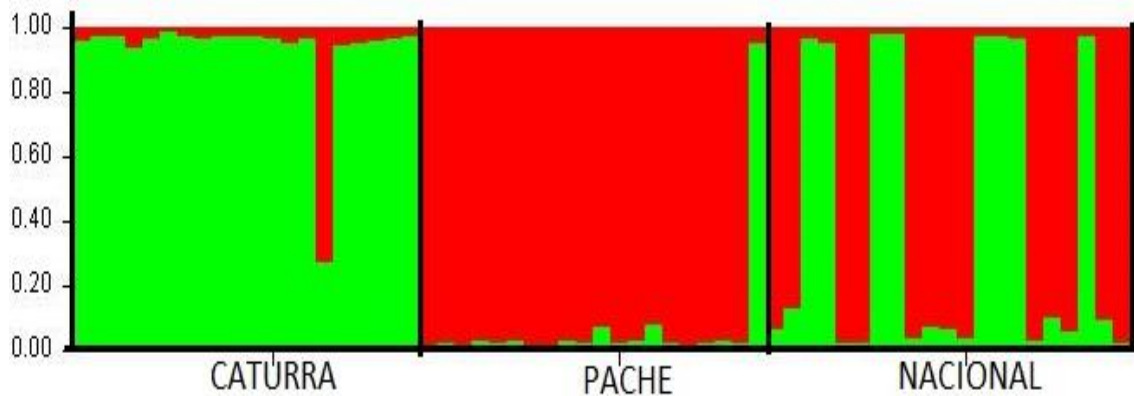


Figura 10. Distribución de la estructura genética de cada individuo en los dos clusters deducidos ($K = 2$). Cada ejemplar está representado por una barra vertical. La longitud del color de las barras respecto al eje principal define la proporción de membresía (Q) al cluster 1 (verde) y cluster 2(rojo).

4.7. RELACIONES INTERVARIETALES

Del total de individuos, cuatro se retiraron (valores externos) para la elaboración de una mejor gráfica. El análisis filogenético con 57 individuos reveló la conformación de dos clados que agrupan a la mayoría de los individuos analizados. El primer clado está constituido principalmente por individuos de la variedad Caturra y en menor proporción por individuos de la variedad Nacional (individuos color celeste), mientras que en el segundo clado predominan los individuos de la variedad Pache seguido de Nacional (individuos color rojo) (Figura 11).

La variación genética dentro cada agrupación realizado por el AMOVA, muestran diferenciación genética altamente significativo ($p < 0,05$) entre el dendograma, distritos y variedades, sin embargo, la mayor y más significativa estructuración se encontró entre los grupos del dendograma ($p < 0,0009$; 22,78 %) (Figura 12) (Anexo 14), estas diferencias indican que los individuos analizados se comportan aparentemente como clones de las tres variedades estudiadas.

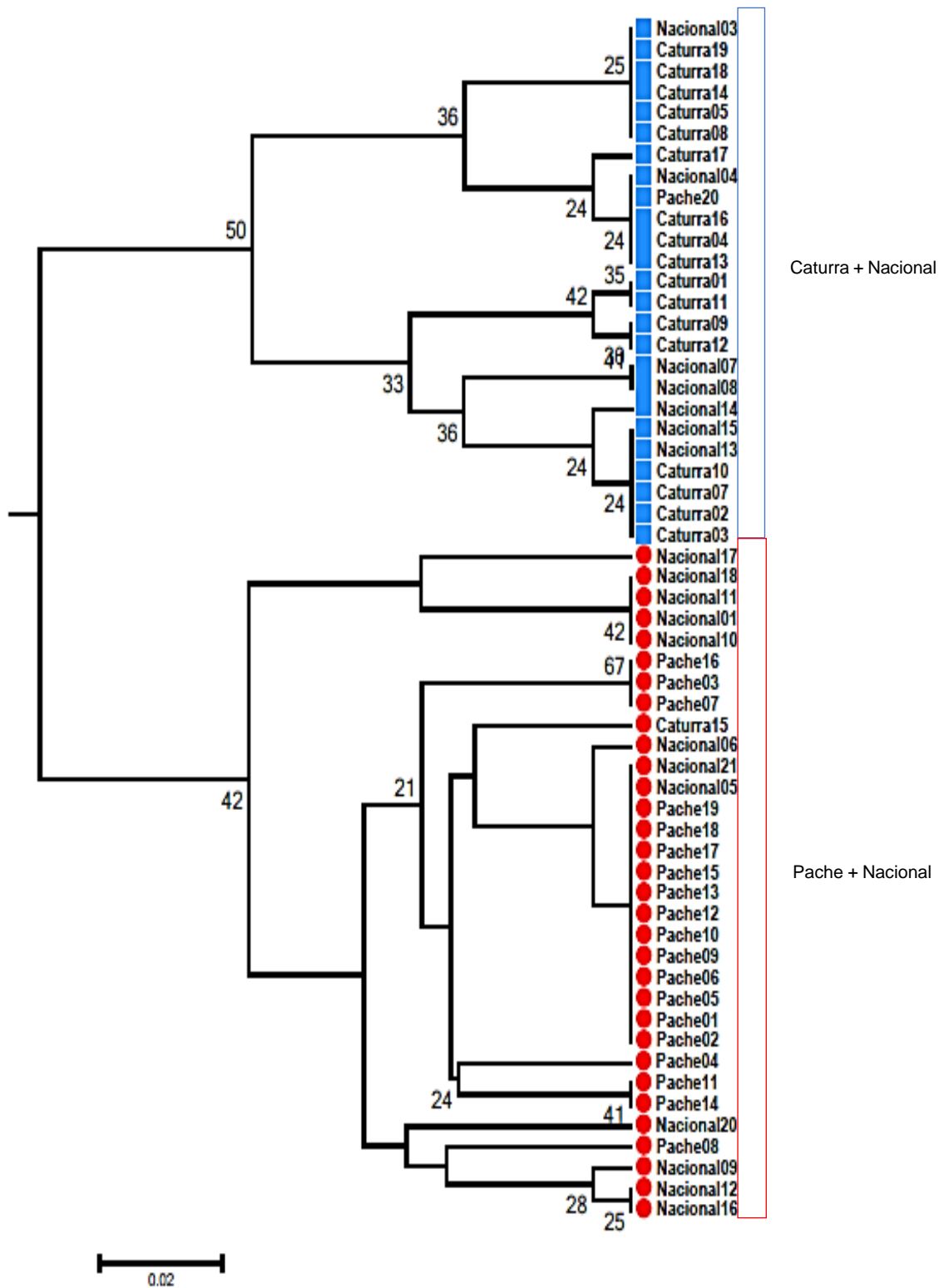


Figura 11. Construcción del dendrograma UPGMA estimada por la distancia de PROVESTI para individuos de *C. arabica*, nótese dos grupos: Caturra + Nacional (celeste) y Pache + Nacional (rojo). Disimilitud 0,02.

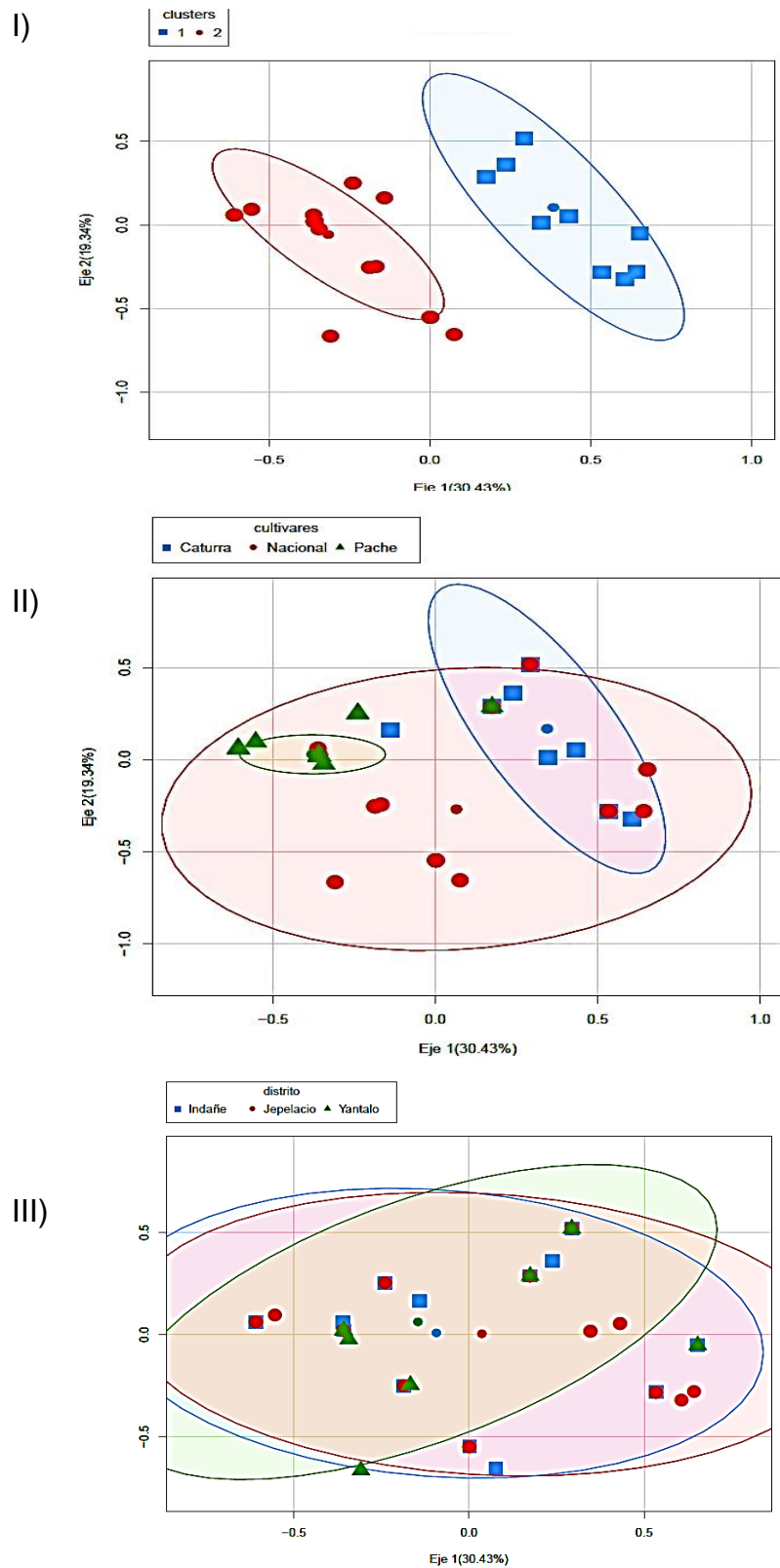


Figura 12. Proyección gráfica de las tres agrupaciones inferidas: I) Grupos o clusters observados en el dendrograma UPGMA; II) Variedades y III) Distritos. Notar mejor estructuración en el primer gráfico.

V. DISCUSION

C. arabica presenta diversidad genética reducida producto de su evolución, biología floral y reproductiva, compuesta de dos juegos cromosómicos (anfidiplóide) obtenido de sus parientes silvestres diploides (*C. canephora* y *C. eugenioides*), además, es considerada una planta autógama principalmente^(35,43). La baja diversidad genética de la especie son los resultados de las pocas accesiones procedentes de los países productores (Costa Rica, Brasil, Colombia y otros) que provinieron de África. Estas escasas accesiones formaron parte de la base genética en todos programas de mejoramiento⁽⁸⁴⁾. Tradicionalmente se han realizado muchos esfuerzos para diferenciar los individuos de *C. arabica*, sin embargo, con la ayuda de múltiples herramientas moleculares (AFLP, RFLP, ISSR, RAPD y SSR's) se ha generado conocimiento sobre el origen, relaciones y diferencias genéticas del cultivo de café en el mundo^(12,38,85,86).

Los cafetales peruanos presentan niveles inferiores de diversidad genética, así lo confirmó un estudio con marcadores universales (RAPD) para conocer el estado del material genético de variedades de *C. arabica* realizado en la localidad de Villa Rica (Pasco) (38). El presente estudio con tres variedades, registró 25 alelos con una media $2,7 \pm 0,8$ alelos por *locus* empleando 9 microsatélites polimórficos, estos resultados son similares a otras investigaciones desarrolladas con 19 y 34 variedades (2,35 y 2,5 alelos por *locus*) cultivadas en Brasil^(33,67). Los valores medios de la H_o demostraron ser mayores a la H_e en las tres variedades (Anexo 10), indicando tendencia a la heterocigosidad de los individuos analizados, sin embargo, también se podría encontrar homocigosidad ^(24,81). Estos hechos, se podrían estar dando por la naturaleza reproductiva de la especie, ya que la polinización cruzada producto del viento y algunos

polinizadores como las abejas, favorecen la autofertilización de los individuos. Estos resultados, también se encontraron en variedades Brasileñas y Nicaragüenses^(33,61). Así mismo, se registraron índices de coeficiente de endogamia (F_{IS}) negativos en las tres variedades, lo cual generó rechazo de la panmixia indicando desequilibrio de Hardy y Weinberg debido a la selección sobredominante⁽⁶³⁾, lo cual es de esperar porque el café es una especie manipulada por su valor comercial. Estos hechos, indican gran flujo genético entre individuos emparentados y un doble comportamiento floral de la especie (autógama y alógama)^(35,43).

Por otro lado, el estudio reveló frecuencias alélicas altas (0,833 a 1,000), siendo mayores a lo reportado por Silva *et al.*,⁽⁸⁷⁾ y Geleta *et al.*,⁽⁶¹⁾ quienes observaron menores frecuencias (0,1 a 0,8), además, se observó que el tamaño de los alelos oscilo de 104 a 332 pb, menores al de Palomino *et al.*,⁽³⁸⁾. Las diferencias del tamaño alélico en los microsatelites se dan por la presentan ciertas mutaciones, ser altamente variables en el genoma y sobre todo por su carácter codominante en los seres vivos^(50,52,87). Si bien el carácter evolutivo y funcional de los SSR's es dudoso, existen tres postulados que explican el proceso evolutivo, de ellos, el salto mutacional señala pérdida o ganancia de una unidad de repetición, en tanto, las mutaciones se expresan en alelos ya fijados en una población, indicando que una próxima mutación ocurriera en el mismo lugar del alelo inicial⁽⁸⁸⁾. Además, el comportamiento ecológico del café en Brasil, Costa Rica, África, Guatemala y Perú, probablemente influye en el tamaño de los alelos, debido a los diferentes sistemas ecológicos (altitud, latitud, precipitaciones, tipo de suelo, y otros atributos) propios de cada zona geográfica^(28,38,61,89).

Los perfiles genéticos de las tres variedades soportados por el Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), Índice de fijación, distancia genética, flujo genético y estructuración genética, demostraron diferencias altamente significativas ($p = \leq 0.001\%$) entre las variedades Caturra y Pache compartiendo algunos alelos con la variedad Nacional ($F_{ST} = 0,221$; $Nm = 0,88$; $K = 2$). El principio de estos análisis se basa principalmente en la diferenciación o relación genética que presentan los individuos de cada población (cultivares)^(63,79,80). De acuerdo a lo expresado, en Nicaragua y Brasil se reportaron resultados similares en las variedades IAC 125 RN, MGS Catigua 3, IPR 99, IPR 100, Catuai rojo, Catimor, Pacas,^(33,61) y otras cultivadas en nuestro país⁽³⁸⁾. Estas diferencias, probablemente se deba a la presencia de alelos únicos de cada variedad, hecho que se constató al reportar alelos únicos en dos variedades^(33,61). Sin embargo, a pesar de la diferenciación de variedades, estudios como los de Krung⁽⁹⁰⁾, Krung y Carvalho⁽¹³⁾ y Palomino *et al.*,⁽³⁸⁾ concuerdan al mencionar la relación de variedades con Bourbon y Nacional, ya que ambas dieron origen a los demás, atribuyéndola a Caturra como una mutación de Bourbon, y Pache con la variedad Nacional^(44,45).

En cuanto al análisis de agrupamiento, el dendograma reveló dos clados principales (figura 11) al igual que Viera *et al.*,⁽⁶⁷⁾ quienes manifestaron agrupación de dos grupos conformados por veinticinco variedades comerciales e híbridos interespecíficos, sin embargo, otros estudios manifiestan mayor número de clados que incluyen a individuos de las variedades Caturra y Nacional en la construcción de los dendogramas^(28,33,61,91). Así mismo, Palomino *et al.*,⁽³⁸⁾ no lograron observar agrupamiento entre individuos de la misma variedad y tampoco una completa separación precisa de las mismas. Estas manifestaciones, probablemente se dieron por la técnica molecular empleada⁽³⁸⁾, tipo

de distancia genética (UPGMA o Neighbour Joining)⁽⁸⁸⁾ para diferenciar los grupos genéticos y el tiempo de las variedades desde su creación. El dendograma obtenido en el presente estudio, reafirma la baja diversidad genética del café peruano, esto posiblemente se dio por la fundación de pequeñas poblaciones introducidas en épocas precolombinas en la selva, comenzando de allí su expansión y multiplicación en nuestro país⁽³⁸⁾, sugiriendo individuos aparentemente clonales de las tres variedades estudiadas.

En otro contexto, no se observó relación del genotipo con las características fenotípicas (color de hojas juveniles, arquetipo de la plata, entre otros) en las tres variedades. Esto podría ser explicado por el factor epigenético que posee el genoma de los organismos, es decir, como los microsatelites no están influenciados por el ambiente no se van a expresar en el fenotipo^(88,92). Conjuntamente, se observó mezcla y proximidad (1, 5 a 2 m) de variedades en una sola finca lo cual generaría cruzamiento de individuos, además, la incorrecta asignación de nombres a las variedades por los caficultores⁽³⁸⁾ podrían haber repercutido en el estudio.

El AMOVA, reveló diferencia genética altamente significativa ($p < 0,05$; Anexo 14) entre distritos, clusters o grupos UPGMA y variedades, siendo la mayor y más significativa estructuración en el dendograma ($p < 0,0009$; 22,78%) (Figura 11). En general, la variación genética del café en la provincia de Moyobamba, región San Martín es muy significativa al igual que otros estudios desarrollados en Centroamérica⁽⁶¹⁾, que sugieren proteger y conservar las variaciones mediante planes de mejoramiento genético.

Finalmente, los microsatelites demostraron ser eficientes para diferenciar perfiles genéticos en las tres variedades café en la provincia de Moyobamba, convirtiéndola en una herramienta molecular de suma importancia para caracterizar especies cultivadas, forestales y silvestres en la región San Martín. Así mismo, con la aplicación de esta herramienta genética, se pretende incluir en proyectos desarrollados por instituciones públicas y privadas, además de gobiernos locales, regionales y nacionales para conocer mejor el estado genético actual de muchas especies vegetales con diferentes intereses.

VI. CONCLUSIONES

- Los análisis genéticos de *C. arabica* en la provincia de Moyobamba muestran que existe una baja diversidad genética en las fincas cafetaleras donde se cultivan tres variedades de café (Caturra, Nacional y Pache).
- El análisis con los microsatélites indica que existe diferenciación genética entre las variedades Pache y Caturra, mientras que la variedad Nacional tiene componentes genéticos de ambas variedades.
- Existe estructuración y diferenciación genética presente en dos grupos genéticos (Caturra + Nacional y Pache + Nacional).

VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios morfoagronómicas para identificar y caracterizar las variedades de cafés en la región San Martín y de otras regiones.
- Incluir estudios epigenéticos de las variedades de café en la región San Martín y otras regiones del Perú.
- Ampliar los estudios genéticos a través de la aplicación de herramientas moleculares (SSR) que ayuden a conservar los recursos genéticos de manera sostenible para posteriores planes de mejoramiento genético.
- Realizar la genotipificación por secuenciamiento de las variedades de café cultivadas en la Región San Martín y de otras regiones cafetaleras del país a fin de determinar con más precisión su diversidad genética.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith R. A History of Coffee. In: Clifford MN, Willson KC, editors. Coffee: Botany, Biochemistry Production of Beans and Beverage. Boston, MA: Springer US; 1985. p. 20.
2. Engelmann F, Dulloo E. Conservation of coffee germplasm. In: Engelmann F, Dulloo M, Astorga C, Dussert S, Anthony F, editors. Conserving coffee genetic resources. Rome: Bioversity International; 2007.
3. Déchamp E, Breitler J-C, Leroy T, Etienne H. Coffee (*Coffea arabica* L .). In: Coffee (*Coffea arabica* L). New York, NY: Springer New York; 2015. (Methods in Molecular Biology; vol. 1224).
4. Berthaud J, Charrier A. Genetic Resources of Coffea. In R.J. Clarke y R. Macrae; 1988. p. 1–42.
5. Rubayiza AB, Meurens M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier transform Raman spectroscopy. J Agric Food Chem. 2005;53(12):4654–4659.
6. Mishra M, Slater A. Recent Advances in the Genetic Transformation of Coffee. Biotechnol Res Int. 2012; 2012:1–17.
7. López G, Rutherford S, Moncada MDP. Análisis de segregación de marcadores moleculares en una población derivada de *Coffea liberica* Hiern x *C. eugenioides* L. Acta Agronómica. 2014;63(2):153–163.

8. Missio RF, Caixeta ET, Zambolim EM, Pena GF, Zambolim L, Dias LAS, et al. Genetic characterization of an elite coffee germplasm assessed by gSSR and EST-SSR markers. *Genet Mol Res.* 2011;10(4):2366–81.
9. da Silva BSR, Cação SB, Ivamoto ST, Silva JC, Domingues DS, Protasio LF. Identificação e Caracterização de Microssatélites de *Coffea arabica* a partir de dados de sequenciamento de RNA e de BACs. *BBR-Biochem Biotechnol Rep.* 2013;2:186–190.
10. Kumar MM, Sandhyarani N, Madhura G, Dandamudi P, Narayana S, Hosahalli S, et al. Genetic Diversity Among Ethiopian Coffee (*Coffea Arabica* L.) Collections Available In Indian Gene Bank Using Sequence Related Amplified Polymorphism Markers. *Plant Breed Seed Sci.* 2014;70(1):29–40.
11. Canet G, Soto C, Ocampo P, Rivera J, Navarro A, Guatemala G, et al. La Situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. Costa Rica; 2016. 1–70 p.
12. World Coffee Research. Las variedades del café arábica: Un catálogo global de variedades que abarca: Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Jamaica, Kenia, Malawi, Nicaragua, Panamá, Perú, República Dominicana, Rwanda, Uganda, Zambia, Zimbabue. 2018.
13. Krug CA, Carvalho A. The genetics of *Coffea*. *Adv Genet.* 1951;4:127–158.
14. Carvalho A. Taxonomia de *Coffea arabica* L. VI: Caracteres morfológicos dos haplóides. *Bragantia.* 1952;12(4–6):201–212.

15. Carneiro MF. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica*. 1997;96(1):167–172.
16. Cramer P. Gegevens over de variabiliteit van de in Nederlandsch-Indië verbouwde koffie-soorten. *Mol Gen Genet*. 1913;13(1):192–192.
17. Dirección de Productividad Agraria - DPA, Dirección Regional de Agricultura San Martín - DRASAM. Diagnostico de la cadena de café. 2016.
18. Elcomercio.pe R. Minagri: El cultivo de café es el sustento de 223 mil familias. 2016. Disponible en: <http://elcomercio.pe/economia/peru/minagri-cultivo-cafe-sustento-223-mil-familias-218472>
19. Castro P, Contreras Y, Laca D, Nakamatsu K. Café de especialidad: alternativa para el sector cafetalero peruano. *Bi-Annu Acad Publ Univ ESAN*. 2004;9(17).
20. Padilla R. Fortalecimiento de las cadenas de valor como instrumento de la política industrial: Metodología y experiencia de la CEPAL en Centroamérica. Chile: CEPAL; 2014.
21. Filho V, Astorga, C. Prevención y control de la roya del café; manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. CATIE; 2015.
22. Lashermes P, Combes M-C, Robert J, Trouslot P, D’Hont A, Anthony F. y otros. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet*. 1999;261(2):259–266.

3. Combes MC, Andrzejewski S, Anthony F, Bertrand B, Rovelli P, Graziosi G, y otros. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Mol Ecol*. 2000;9(8):1171–1173.
24. Rovelli P. *Coffee Biotechnology and Quality*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2000.
25. Etienne H, Anthony F, Dussert S, Fernandez D, Lashermes P, Bertrand B. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 2002;38(2):129–138.
26. Macedo J, Sussumu N, Américo A, Zambolim L, Pereira AA. Avaliação de híbridos f1 de café (*Coffea arabica* L.) e respectivos progenitores com marcadores RAPD. *Ceres*. 2002;49(283).
27. Steiger D, Nagai C, Moore P, Morden C, Osgood R, Ming R. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theor Appl Genet*. 2002;105(2):209–215.
28. Anthony F, Combes MC, Astorga C, Bertrand B, Graziosi G, Lashermes P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor Appl Genet*. 2002;104(5):894–900.
29. Baruah A, Naik V, Hendre PS, Rajkumar R, Rajendrakumar P, Aggarwal RK. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. *Mol Ecol Notes*. 2003 Oct;3(4):647–50.

30. Ruas P, Ruas C, Rampim L, Carvalho V, Ruas E, Sera T. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. *Genet Mol Biol*. 2003;26(3):319–327.
31. Pereira G, Padilha L, Von Pinho E, Teixeira R, de Carvalho C, Maluf M, y otros. Marcadores microssatélites na análise de resistência ao bicho-mineiro em café arábica. *Pesqui Agropecuária Bras*. 2012;46(12):1650–1656.
32. Silvestrini M, Junqueira MG, Favarin AC, Guerreiro-Filho O, Maluf MP, Silvarolla MB y otros. Genetic diversity and structure of Ethiopian, Yemen and Brazilian *Coffea arabica* L. accessions using microsatellites markers. *Genet Resour Crop Evol*. 2007;54(6):1367–1379.
33. Sousa TV, Caixeta ET, Alkimim ER, de Oliveira ACB, Pereira AA, Zambolim L, et al. Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica*. 2017; 213(3).
34. Crochemore ML, Nunes LM, Andrade GA, Molinari HBC, Vasconcellos ME. Varietal identification of coffee seeds by RAPD technique. *Braz Arch Biol Technol*. 2004;47(1):7–11.
35. Lashermes P, Combes M-C, Robert J, Trouslot P, D’Hont A, Anthony F, et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet MGG*. 1999;261(2):259–266.
36. Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 1984;10:12.

37. Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet.* 1994;88(1):1–6.
38. Palomino C, López C, Espejo R, Mansilla R, Quispe J. Evaluación de la diversidad genética del café (*Coffea arabica* L.) en Villa Rica (Perú). *Ecol Apl.* 2014;13(2).
39. Tropicos: *Coffea arabica* L. Disponible en:
<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=27900016&tab=distribution>
40. Chase MW, Christenhusz MJM, Fay MF, Byng JW, Judd WS, Soltis DE, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc.* 2016;181(1):1–20.
41. *Coffea arabica* L. Plants of the World Online - Kew Science. Disponible en:
<http://e-monocot.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:747038-1#distribution-map>
42. La República. Producción de café en el Perú. Disponible en:
<https://larepublica.pe/economia/1077901-produccion-de-cafe-en-el-peru>
43. Sevilla R, Holle M. Recursos Genéticos Vegetales. Luis Leoncio Asociados SRL. Perú; 2004. 278 p.
44. Heredia B. Guía Técnica para el Cultivo del Café. 2011.
45. Anacafé. Variedades de Café. 2014. Disponible en:
<http://anacafe.org/glifos/images/e/e2/Boletin-tecnico-dic-2014.pdf>
46. Solis L, Torres A. ¿Qué son los marcadores moleculares? 2005;41–6.

47. Alzate-Marin AL, Cervigni GD, Moreira MA, Barros EG. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatol Bras.* 2005;30(4):333–342.
48. Mosquera RV. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. 2005;3(1):14–18.
49. Bered F, Neto JFB, Carvalho FIF de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas DNA markers and their application in plant breeding. *Ciênc Rural.* 1997;27(3):513–520.
50. Azoifeifa-Delgado Á. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agron Mesoam.* 2006;17(2).
51. Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Genet.* 1998;97(5):816–827.
52. Becerra V V, Paredes C M. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. 2000;60(3):270–281.
53. Perl-Treves R, Zamir D, Navot N, Galun E. Phylogeny of Cucumis based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. *Theor Appl Genet.* 1985;71(3):430–436.
54. Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 2005 Jan; 23(1):48–55.
55. Noss R. Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach. *Conservation Biology.* 1990;4(4):10.

56. Piñero D, Caballero-Mellado J, Cabrera-Toledo D, Canteros CE, Casas A, Castañeda-Sortibrán A. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Cap Nat México*. 2008;1:437–494.
57. Rimieri P. La diversidad genética y la variabilidad genética: dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal. *BAG J Basic Appl Genet*. 2017;28(2):7–13.
58. Levin DA. Dispersal Versus Gene Flow in Plants. *Ann Mo Bot Gard*. 1981;68(2):233–53.
59. Slatkin M. Gene flow in natural population. *Ecology Systematic*. 1985;16:393–430.
60. Slatkin M. Flujo génico y estructura de las poblaciones. *Ecol Genet*. 1994;
61. Geleta M, Herrera I, Monzón A, Bryngelsson T. Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers. *Sci World J*. 2012;2012:1–11.
62. Castillo W, Rodríguez O. Algoritmo e Implementación del Análisis Factorial de Correspondencias. *Revista de Matematica: Teoría y Aplicaciones*. 1997;4(2):51.
63. Juli Caujapé. Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones. España: Exegen; 2006. 133 p.
64. Doyle J., Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem*. 1987;19:11-15.

65. Poncet V, Hamon P, Minier J, Carasco C, Hamon S, Noirot M. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome*. 2004 Dec;47(6):1071–81.
66. Bhat PR, Krishnakumar V, Hendre PS, Rajendrakumar P, Varshney RK, Aggarwal RK. Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeats markers from robusta coffee variety “CxR” (an interspecific hybrid of *Coffea canephora* x *Coffea congensis*). *Mol Ecol Notes*. 2005 Mar;5(1):80–3.
67. Vieira ESN, Pinho ÉVDRV, Carvalho MGG, Esselink DG, Vosman B. Development of microsatellite markers for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. *Genet Mol Biol*. 2010;33(3):507–514.
68. Combes M-C, Andrzejewski S, Anthony F, Bertrand B, Rovelli P, Graziosi G, et al. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Mol Ecol*. 2000;9(8):1178–1180.
69. Belkhir K, Borsa P, Chikhi P, Raufaste N, Bonhomme F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Montpellier, France: Université de Montpellier II; 2004.
70. Márquez-Sánchez F. Endogamia y predicción de sintéticos de maíz de cruasas dobles. *Rev Fitotec Mex*. 2008;31(3).
71. Sahagún-Castellanos J, García-Mezano F. El Coeficiente de endogamia de una poblacion bajo selección masal. *Agrociencia*. 2008;43(2):119–32.

72. Aranzazu D, Rodríguez B, Zapata M, Bustamante J, Luís Restrepo. Aplicación del análisis de factor de correspondencia múltiple en un estudio de válvulas cardíacas en porcinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2007;20:129–40.
73. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. Disponible en: <https://www.r-project.org/>
74. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. 1984 Nov 1;38(6):1358–70.
75. Weir BS. Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. *Genet Data Anal Methods Discrete Popul Genet Data*. 1990; Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19900180990>
76. Hartl D, Clark A. Principles of population genetics. Tercera. Canada: Sinauer Associates; 1997. 555 p.
77. Nei M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics*. 1978 Jul 20;89(3):583–90.
78. Structure Software for Population Genetics Inference. Disponible en: <https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>
79. Pritchard J, Stephens M, Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Oxf OX1 3TG*. 2000;15.
80. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003;164(4):1567–1587.

81. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005 Jul;14(8):2611–20.
82. Kamvar Z, Niklaus Grunwald. Algorithms and equations utilized in poppr version 1.1.4 2015. Disponible en:

<https://pdfs.semanticscholar.org/6288/7744a01b2cde8697cbf955d0dd3649dc4201.pdf>
83. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870–4.
84. Maluf MP, Silvestrini M, Ruggiero LM de C, Guerreiro Filho O, Colombo CA. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. *Sci Agric*. 2005;62(4):366–373.
85. Omingo DO, Omondi CO, Cheserek J, Runo S, Okun D. Diversity analysis of selected coffee genotypes using microsatellites and random amplified polymorphic DNA in Kenya. 2017;
86. Tesfaye K, Govers K, Bekele E, Borsch T. ISSR fingerprinting of *Coffea arabica* throughout Ethiopia reveals high variability in wild populations and distinguishes them from landraces. *Plant Syst Evol*. 2014 May;300(5):881–97.
87. Silva B, Cação S, Ferreira R, Santos M, Ivamoto ST, Silva JC, et al. Validação de marcadores microssatélites e diversidade genética de genótipos de *Coffea arabica* provenientes da Etiópia. 2015;

88. Aranguren-Méndez JA, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. :14.
89. Dirección Regional de Agricultura San Martín - DRASAM. Ficha técnica del café. 2016
Disponible en:

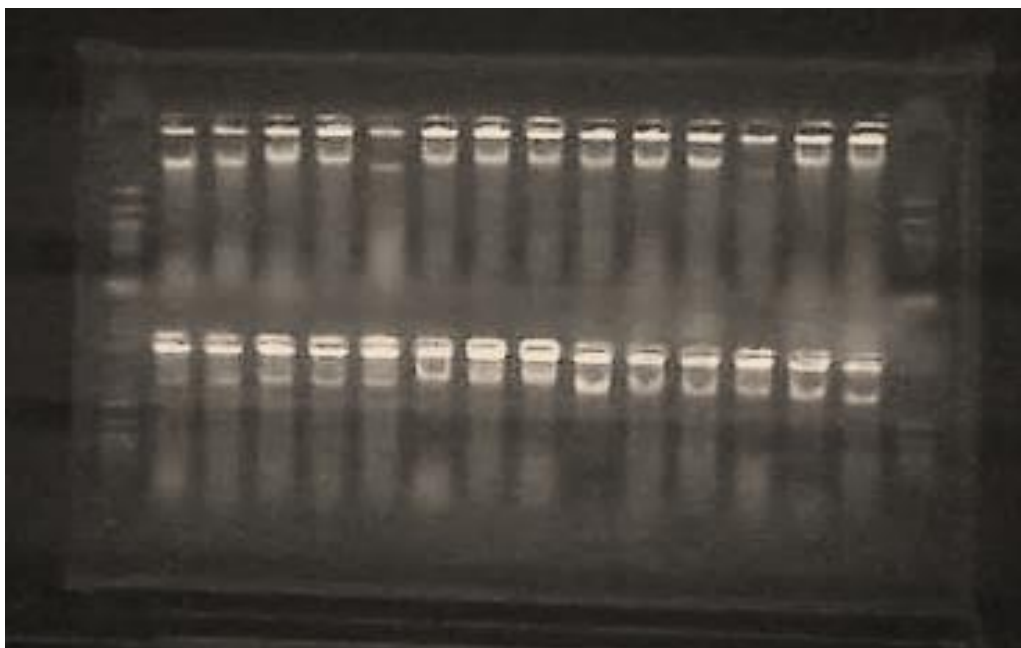
<http://www.drasam.gob.pe/vista/web/docs/FICHA%20T%C3%89CNICA%20DEL%20CAF%C3%89%20-%20DRASAM.pdf>
90. Krug CA. Mutações em *Coffea arabica* L. *Bragantia*. 1949;9(1-4):1-10.
91. López-Gartner G, Cortina H, McCouch SR, Moncada MDP. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. *Tree Genet Genomes*. 2009 Jul;5(3):435-46.
92. Kaminker DP. Epigenética, ciencia de la adaptación biológica heredable. 2007;3.

ANEXOS



Anexo 01. Flujograma de extracción de ADN de las tres variedades de *C. arabica* obtenidas de seis parcelas de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

Anexo 02. Electroforesis de la extracción de ADN de *Coffea arabica*.



Corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, revelando las bandas de ADN genómico extraído del tejido foliar de individuos de *Coffea arabica*.

Anexo 03. Condiciones de amplificación del ADN de *Coffea arabica* con Microsatelites-vía PCR.

3A. Concentraciones para la amplificación de los primers con touchdown:

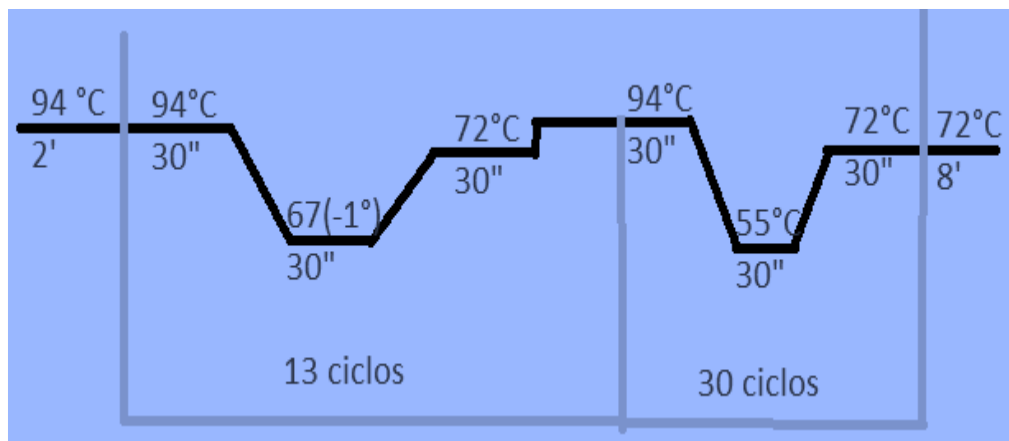
REACTIVO	[] inicial	[] final	Cantidad inicial
Buffer	10X	1X	1 μ l
MgCl ₂	25 Mm	2 mM	0.8 μ l
dNTPs	2Mm	0.2 mM	0.5 μ l
Primer Forward	10 μ M	0.5 μ M	1 μ l
Primer Reverse	10 μ M	0.5 μ M	1 μ l
Taq-polymerasa	5U/ μ l	0.25 U/ μ l	0.5 μ l
PREMIX			4.8 μl
DNA	100ng/ μ l	-	0.75 μ l
H2O MQ	-	-	4.45 μ l
Volumen final			10 μl

3B. Concentraciones para la amplificación de los primers convencionales:

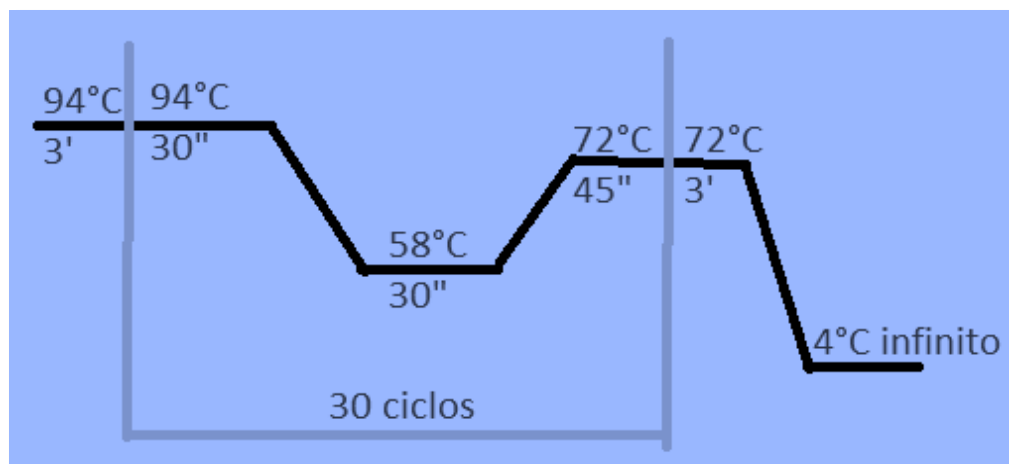
REACTIVO	[] inicial	[] final	Cantidad inicial
Buffer	10X	1 X	1 μ l
MgCl ₂	25 Mm	1.5 mM	0.6 μ l
dNTPs	2Mm	0.1 mM	0.5 μ l
Primer Forward	10 μ M	0.5 μ M	1 μ l
Primer Reverse	10 μ M	0.5 μ M	1 μ l
Taq-polymerasa	5U/ μ l	0.25 U/ μ l	0.5 μ l
PREMIX			4.6 μl
DNA	100ng/ μ l	-	0.75 μ l
H2O MQ	-	-	4.65 μ l
Volumen final			10 μl

3C. Ciclo de Temperatura para la amplificación de los primers.

touchdown



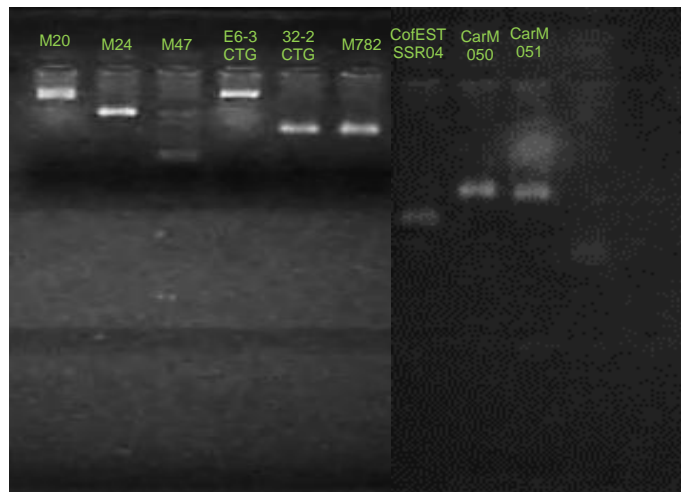
Convencional



3D. Termociclador PCRMax empleado en la PCR del presente estudio.



Anexo 04. Electroforesis de la amplificación del ADN de *Coffea arabica* vía SSR-PCR.



Corrida electroforética en gel de agarosa al 2%, visualizando las bandas de ADN amplificadas en 9 individuos de *Coffea arabica* usando marcadores microsatélites.

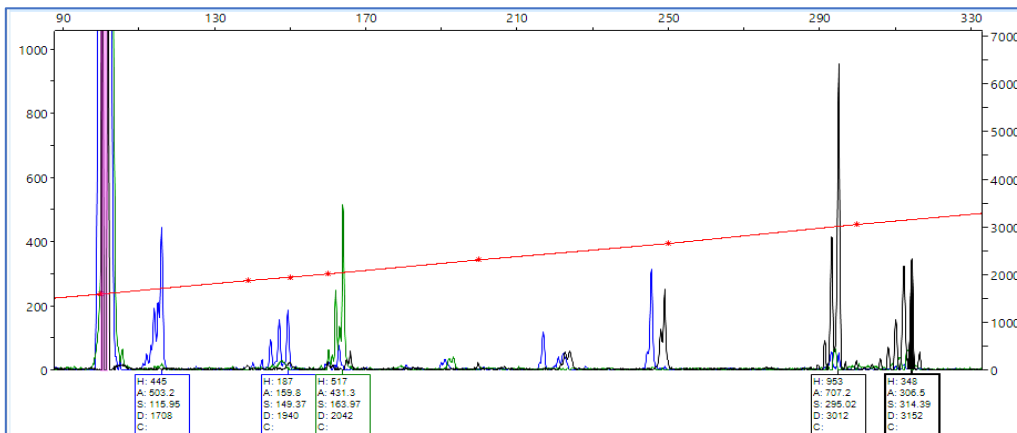
Anexo 05. Obtención de pesos de los alelos usando el Analizador Genético ABI (Applied Biosystems).

Los alelos de los microsatélites fueron examinados empleado electroforesis capilar, para ello se tomó las siguientes condiciones:

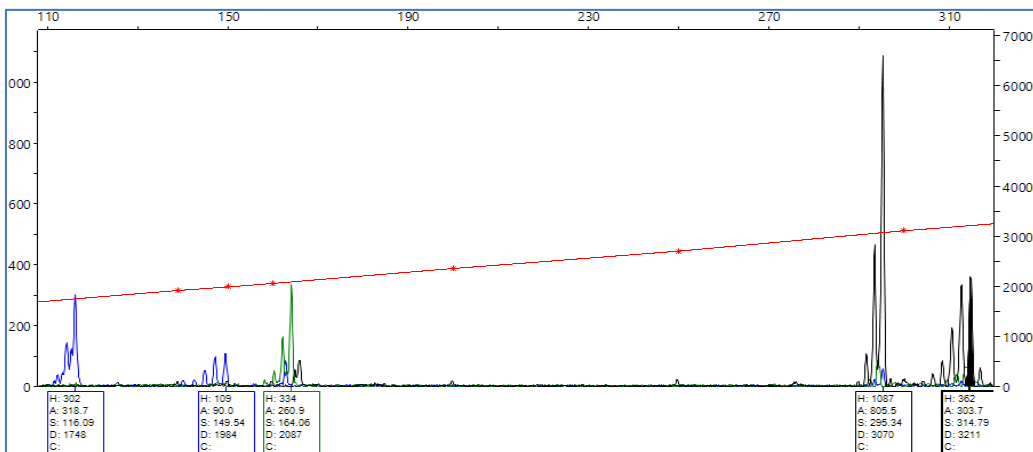
REACTIVOS	CANTIDAD
Formamida	8.7 μ l
ROX	0.3 μ l
PCR	1.0 μ l
Total	10.0 μl

Anexo 06. Electroferogramas de los paneles triplex.

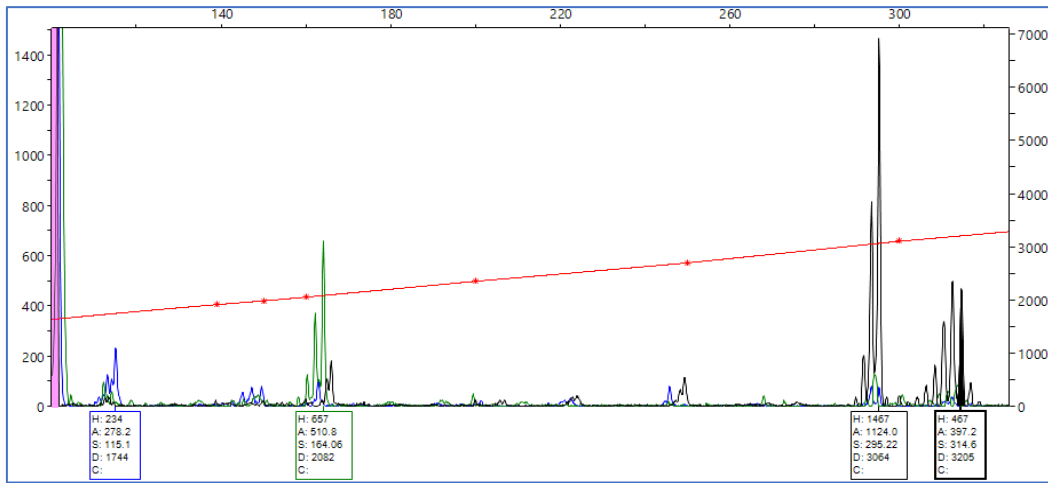
6A. Tríplex 1, empleados en la lectura de los primers M20, M24 y M47.



6B. Tríplex 2, empleados en la lectura de los primers M782, 32-2CTG y E6-3CTG.



6C. Tríplex 3, empleados en la lectura de los primers CofEST-SSR04, CarM050 y CarM051.



Anexo 07. Planilla de lectura de los pesos de los alelos de 61 individuos de *C. arabica* procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

n°	Variedad	M47		M24		M20		M782		32-2CTG		E6-3CTG		CofEST-SSR04		CarM050		CarM051	
1	Caturra01	-9	-9	164	164	296	316	108	114	208	214	330	332	142	150	280	288	268	268
2	Caturra02	116	116	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	-9	-9
3	Caturra03	116	116	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
4	Caturra04	116	116	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
5	Caturra05	116	150	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
6	Caturra06	-9	-9	164	164	296	316	108	114	206	214	328	332	142	150	280	288	266	266
7	Caturra07	116	116	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
8	Caturra08	116	150	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
9	Caturra09	116	116	164	164	296	316	108	114	208	214	330	332	142	150	280	288	268	268
10	Caturra10	116	116	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
11	Caturra11	-9	-9	164	164	296	316	108	114	208	214	330	332	142	150	280	288	268	268
12	Caturra12	116	116	164	164	296	316	108	114	208	214	330	332	142	150	280	288	268	268
13	Caturra13	116	116	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
14	Caturra14	116	150	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
15	Caturra15	116	116	-9	-9	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
16	Caturra16	116	116	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
17	Caturra17	-9	-9	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
18	Caturra18	116	150	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
19	Caturra19	116	150	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
20	Caturra20	-9	-9	164	164	296	296	108	114	206	214	330	332	142	150	280	280	-9	-9

continuación del Anexo 07...

n°	Variedad	M47		M24		M20		M782		32-2CTG		E6-3CTG		CofEST-SSR04		CarM050		CarM051	
21	Pache01	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
22	Pache02	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
23	Pache03	116	116	162	162	296	312	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
24	Pache04	116	148	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
25	Pache05	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
26	Pache06	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
27	Pache07	116	116	162	162	296	312	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
28	Pache08	116	116	162	162	296	316	108	114	208	208	330	332	142	150	280	288	268	268
29	Pache09	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
30	Pache10	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
31	Pache11	116	150	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
32	Pache12	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
33	Pache13	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
34	Pache14	116	150	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
35	Pache15	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
36	Pache16	116	116	162	162	296	312	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
37	Pache17	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
38	Pache18	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
39	Pache19	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
40	Pache20	116	116	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
41	Nacional01	116	116	162	162	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
42	Nacional02	-9	-9	162	162	296	316	104	110	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
43	Nacional03	116	150	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
44	Nacional04	116	116	164	164	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
45	Nacional05	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
46	Nacional06	-9	-9	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268
47	Nacional07	116	150	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	266	266
48	Nacional08	116	150	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
49	Nacional09	-9	-9	162	162	296	316	108	114	208	214	330	332	142	150	280	288	268	268
50	Nacional10	116	116	162	162	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
51	Nacional11	116	116	162	162	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
52	Nacional12	116	116	162	162	296	316	108	114	208	214	330	332	142	150	280	288	268	268
53	Nacional13	116	116	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
54	Nacional14	-9	-9	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
55	Nacional15	116	116	164	164	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
56	Nacional16	116	116	162	162	296	316	108	114	208	214	330	332	142	150	280	288	268	268
57	Nacional17	-9	-9	162	162	296	316	108	114	206	206	330	332	142	150	280	288	268	268
58	Nacional18	116	116	162	162	296	316	108	114	206	214	330	332	142	150	280	288	268	268
59	Nacional19	116	116	164	164	296	316	108	114	206	206	328	332	142	150	280	288	268	268
60	Nacional20	116	116	162	162	296	316	108	114	208	214	328	332	142	150	280	288	268	268
61	Nacional21	116	116	162	162	296	316	108	114	208	216	330	332	142	150	280	288	268	268

Anexo 08. Frecuencias alélicas registradas en los 9 *loci* microsatélites analizadas en las tres variedades de *Coffea arabica.*, Caturra, Pache y Nacional procedentes de la provincia de Moyobamba, San Martín.

Locus	Alelo	Caturra	Pache	Nacional
M47	116	0.833	0.925	0.906
	148	0.000	0.025	0.000
	150	0.167	0.050	0.094
M24	162	0.000	0.950	0.619
	164	1.000	0.050	0.381
M20	296	0.525	0.500	0.500
	312	0.000	0.075	0.000
	316	0.475	0.425	0.500
M782	104	0.000	0.000	0.024
	108	0.500	0.500	0.476
	110	0.000	0.000	0.024
	114	0.500	0.500	0.476
32-2CTG	206	0.150	0.000	0.333
	208	0.350	0.525	0.214
	214	0.250	0.000	0.333
	216	0.250	0.475	0.119
E6-3CTG	328	0.025	0.000	0.048
	330	0.475	0.500	0.452
	332	0.500	0.500	0.500
CofEST-SSR04	142	0.500	0.500	0.500
	150	0.500	0.500	0.500
CarM050	280	0.525	0.500	0.500
	288	0.475	0.500	0.500
CarM051	266	0.056	0.000	0.048
	268	0.944	1.000	0.952

Anexo 09. Alelos privados (A) y sus frecuencias (F) registrados en los nueve locus de *C. arabica* procedentes de tres variedades colectadas de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

LOCUS	Pache		Nacional		TOTAL
	A	F	A	F	
M47	148	0.025			1
M24					
M20	312	0.075			1
M782			104	0.024	2
			110	0.024	
32-2CTG					
E6-3CTG					
CofEST-SSR04					
CarM050					
CarM051					
TOTAL		2		2	4

Anexo 10. Valores de la variabilidad genética en las tres variedades de *C. arabica.*, Caturra, Pache y Nacional procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

VARIEDADES	N	A _T	A _R	Media		
				H _o	H _e	F _{IS}
Caturra	20	22	2.2	0.693	0.404	-0.701
Pache	20	21	2.1	0.678	0.366	-0.842
Nacional	21	25	2.5	0.677	0.449	-0.490

Anexo 11. Análisis del Índice de fijación (F_{ST}) calculados a partir de la evaluación de nueve loci microsatelites para las tres variedades de *C. arabica* de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

	Pache	Nacional
Caturra	0.221***	0.091***
Pache	-	0.078***

*** Altamente significativo ($p \leq 0,0001\%$)

Anexo 12. Distancia genética entre las variedades (Nei, 1978) estimada a través del análisis de nueve *loci* microsatelites para los individuos de *C. arabica* procedentes de Moyobamba, región San Martín.

	Caturra	Pache	Nacional
Caturra	-	0.184	0.067
Pache	-	-	0.047

Anexo 13. Número de migrantes por generación (N_m) estimado a partir de nueve loci microsatelites para las tres variedades de *C. arabica* procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

	Caturra	Pache	Nacional
Caturra	-	0.88	2.51
Pache	-	-	2.97

Anexo 14. Análisis de varianza molecular (AMOVA) estimada para las agrupaciones generados hipotéticamente para las tres variedades de *C. arabica*, Caturra, Pache y Nacional procedentes de la provincia de Moyobamba, región San Martín.

Agrupaciones	Sigma	%
Variación dentro de los distritos	0.505319026	13.36
P – valor	0.000999001	
Variación dentro de las variedades	0.531091004	13.42
P - valor	0.005994006	
Variación dentro de los grupos del dendograma UPGMA	0.975125193	
P - valor	0.000999001	22.78