

## VARIABILIDAD MOLECULAR DE *Hemileia vastatrix* BERK. & BR. EN DOS ESTADOS DE VENEZUELA BASADA EN MARCADORES RAPD Y REMAP

Emma Ramírez Poletto<sup>1</sup>, Dorian Rodríguez<sup>1</sup>, Alexander Hernández<sup>1</sup>,  
Eveline Teixeira Caixeta<sup>2</sup> y Denia Pires de Almeida<sup>2</sup>

### RESUMEN

La roya de la hoja de café, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. (Hv), es la enfermedad económicamente más importante de ese cultivo a nivel mundial. El hongo presenta más de 50 razas fisiológicas identificadas que reflejan considerablemente su diversidad genética bien por mutaciones, o la presencia de genes transponibles. En este estudio, a través del uso de marcadores RAPD y REMAP se caracterizaron, entre las dos técnicas, un total de 21 aislamientos del hongo incluidas la raza XXXIX y dos patotipos Hv01ve y Hv02ve identificados para Venezuela y 3 testigos (Rz II, Rz XXXIII y Hv05) provenientes de Brasil; los aislamientos fueron colectados en los estados Lara y Táchira. Se realizó la extracción de ADN de las diferentes cepas colectadas; y la amplificación de los fragmentos al azar fue realizada con 26 iniciadores de las series OPA, OPB, OPC, OPD, OPE, OPF, OPG, OPH, OPK, OPL, OPM, OPN, OPO y OPP, y la de REMAP con 5 combinaciones LTR/ISSR (48F/D1C, 48R/D1C, 48R/T1C, 81F/D1C y 81F/T1C) mediante protocolos establecidos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InfoGen. Los resultados mostraron que 92,11 % (RAPD) y 96,55 % (REMAP) de bandas amplificadas eran polimórficas (PIC), y el contenido de información polimórfica varió de 0,15 a 0,32, lo que sugiere una alta diversidad genética entre las cepas de Hv. Así mismo, en ambos marcadores se formaron 3 grupos discriminados por ubicación geográfica y piso altitudinal.

**Palabras clave adicionales:** Roya del café, zonificación geográfica

### ABSTRACT

#### Molecular variability of *Hemileia vastratrix* Berk. & Br. in two Venezuelan states based on RAPD and REMAP markers

Coffee leaf rust, caused by *Hemileia vastratrix* Berk. and Br. (Hv), is economically the most important disease of this crop worldwide. More than 50 physiological races have been identified, which indicate its genetic diversity, due to either by genetic mutations or by the presence of transposable genes. In this study, a total of 21 isolates of the fungus were characterized using RAPD and REMAP markers between the two techniques, including race XXXIX, two pathotypes Hv01ve and Hv02ve, which were previously identified for Venezuela, and three control isolates (Rz II, Rz XXXIII and Hv05) from Brazil. Isolates were collected in the states of Lara and Táchira. After DNA extraction, RAPD was performed using twenty six primers of the OPA, OPB, OPC, OPD, OPE, OPF, OPG, OPH, OPK, OPL, OPM, OPN, OPO and OPP series; and REMAP with five combinations LTR/ISSR (48F/D1C, 48R/D1C, 48R/T1C, 81F/D1C and 81F/T1C), using standard protocols. Statistical analysis was realized using the Infogen program. Results showed that 92.11% of RAPD and 96.55% of REMAP amplified bands were polymorphic and its information (PIC) varied from 0.15 to 0.32, which suggests a high genetic diversity among the Hv isolates. In addition, in both markers three groups were formed, discriminated by geographic distribution and altitude.

**Additional keywords:** Coffee rust, geographic zoning

### INTRODUCCIÓN

La roya de la hoja de café (CLR), causada por *Hemileia vastatrix* Berk. y Br., (Hv) es la enfermedad económicamente más importante de ese cultivo (en particular de *Coffea arabica*) donde cultivares susceptibles y sin prácticas de control pueden experimentar pérdidas de producción de más del 50 % (Zambolim y

Teixeira, 2021). Entre los años 2008-2010, se presentó en América Latina una epidemia debido a una combinación de condiciones meteorológicas regionales favorables y factores económicos difíciles que contribuyeron a un manejo sub óptimo del cultivo de café (Avelino *et al.*, 2015). Venezuela no fue la excepción, pues Riera (2022) indica que a pesar de no contar con cifras oficiales desde el año 2007, se sabe por la Confederación

Recibido: Febrero 14, 2025

Aceptado: Agosto 15, 2025

<sup>1</sup>Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía. Barquisimeto, Venezuela.

e-mail: emma.ramirez@ucla.edu.ve (autor de correspondencia); dorianalcides@gmail.com; alexjosehjimenez@gmail.com

<sup>2</sup>Universidad Federal de Viçosa Brasil. e-mail: eveline.caixeta@embrapa.br; denia\_pires@hotmail.com

de Productores Agropecuarios de Venezuela (FEDEAGRO) que la producción de café en Venezuela bajó de 28 a menos de 8 quintales por hectárea, merma considerable, que ha sometido a la pobreza a muchas familias caficultoras del país. La misma pudo deberse a la falta de un plan de monitoreo constante de la incidencia de la roya y de investigación sobre razas y variabilidad genética. A consecuencia de esto, los productores del rubro comenzaron a migrar a cultivos de ciclo corto, con los que podían recuperar más rápidamente la inversión. Por su parte, la introducción de variedades de café de otros países sin cumplir con las normas fitosanitarias, podría ser una fuente de razas nuevas en el país para las que no se disponga de los genes de resistencia.

Los estudios de variabilidad genética del hongo generalmente han sido realizados mediante pruebas de infección en una serie de clones diferenciales de café; como consecuencia de estos trabajos, ha sido posible identificar y caracterizar más de 50 razas del hongo (Zambolim y Texeira, 2021). Sin embargo, Gouveia *et al.* (2005) indicaron que el número de series diferenciadoras existentes no es suficiente para la caracterización de algunos patotipos con un amplio espectro de virulencia, evidenciando que al menos 10 aislados no pudieron ser discriminados por las plantas diferenciadoras del Centro Internacional de la Roya del Café, así como también detectaron razas desconocidas en varios países productores.

Desde 1932, el reporte de razas de Hv ha sido constante; así mismo sus revisiones y reclasificaciones, desde las primeras (razas I y II) hasta las más recientes (razas XXXIII, XXXVII, XXXIX) en plantas derivadas de Catimor (Capucho *et al.*, 2012; Solano, 2017). En Venezuela, Silva *et al.* (1997) identificaron por primera vez las razas I y II en muestras colectadas en el estado Táchira, y desde entonces no se realizaron más estudios sobre este tema hasta el año 2019, cuando se tomó la iniciativa de buscar la causa aparente de la baja producción en los cafetales venezolanos y el surgimiento de la roya como supuesto causante de este hecho; lográndose identificar la raza XXXIX (v2,4,5,6,7,8,9,?) y 2 patotipos: Hv01ve (v1,2,4,5,7,9,?) y Hv02ve (v1,2,4,5,6,7,9,?) nuevos para Venezuela (Ramírez *et al.*, 2024).

El surgimiento de nuevas razas o patotipos, con mayor virulencia, sugiere una rápida

evolución del patógeno (Orozco *et al.*, 2022) lo que conlleva a utilizar otras técnicas como los marcadores moleculares, para estudiar la evolución y variabilidad del patógeno; así como para la interpretación de los mecanismos de defensa en el patosistema café – roya (Borén y Texeira, 2016). Bigirimana *et al.* (2013) realizaron estudios basados en el uso de marcadores RAPD (fragmentos polimórficos amplificados al azar) y SSR (Secuencias Simples Repetidas) para observar la diversidad genética entre germoplasmas de café resistentes a enfermedades. La técnica RAPD se basa en el análisis de marcadores de ADN heredables que son amplificados mediante iniciadores con secuencias arbitrarias de nucleótidos (Legaria, 2010).

Por su parte, Daba *et al.* (2024) realizaron estudios sobre la diversidad genética y estructura del hongo de la roya del café en diferentes sistemas de manejo del cultivo en Etiopía, basándose en la huella genética de marcadores de polimorfismo amplificado relacionados con la secuencia (SRAP) en 40 sitios, que abarcaban cuatro sistemas de producción: café de bosque, café de semi-plantación, café de huerto familiar y café de plantación; y diferentes altitudes, obteniendo una alta diversidad genética entre los aislados y diferencias significativas entre los sistemas de producción.

En la búsqueda de la diversidad se han desarrollado varios sistemas de marcadores basados en retrotransposones, como el polimorfismo amplificado de microsatélites de retrotransposones (REMAP), donde uno de los dos cebadores coincide con un motivo o microsatélite (Biswas *et al.*, 2010). Los micro-satélites o motivos SSR parecen asociarse con retrotransposones y provocar altas tasas de mutación debido al deslizamiento de la polimerasa; por lo tanto, pueden ser loci más efectivos para la diversidad genética, el análisis de la estructura, la filogenia y la genotipificación de plantas dentro de una especie o subespecie (Legaria, 2010; Kalendar *et al.*, 2011).

En los retrotransposones de secuencia repetida en ambos extremos de REMAP (LTR-REMAP) se utilizan nucleótidos de anclaje en los tres extremos del cebador de repetición de secuencia simple, para evitar el deslizamiento del cebador entre los motivos de repetición de secuencia simple individuales (Kalendar y Schulman, 2014). Orozco *et al.* (2022), en un intento por caracterizar

los elementos transponibles dentro de los genomas de Hv, informaron sobre nuevos linajes de retrotransposones de repetición terminal larga (LTR), denominados CO-HUI, Soroa y Baco, que se clasifican en Gypsy, Labe y Mapi; estos elementos CO-HUI y Soroa representan la mayor parte de todos los elementos transponibles de *H. vastatrix*, así como aproximadamente el 37 % de los ensamblajes genómicos disponibles.

El uso de estas técnicas es de importancia para los estudios de *Hemileia vastatrix* porque pudieran generarse librerías transponibles para el hongo, que estuvieran involucrados en la variabilidad genética creando nuevas combinaciones que contribuyan en la evolución de nuevas cepas resistentes o con mayor virulencia. También pueden influenciar en la evolución de la patogenicidad, la expresión de genes existentes en diferentes momentos o en diferentes lugares de la planta o involucrados en la adaptación al ambiente, pudiendo modificar su genoma para responder a cambios en el entorno o la presión de selección (Aime *et al.*, 2017; Maldonado *et al.*, 2022).

Estas herramientas moleculares permiten el estudio del genoma de gran número de cepas y la asociación de sus rasgos hereditarios en poco tiempo, por lo que el objetivo de esta investigación fue generar información sobre la estructura genética de *H. vastatrix* en dos estados de Venezuela, mediante marcadores RAPD y REMAP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron colectadas entre enero y febrero de 2019, en tres localidades: Bramón, estado Táchira; Sanare y Guarico, estado Lara (Cuadro 1). La colecta fue realizada directamente en el campo sobre lesiones en las hojas afectadas de 10 plantas que presentaban uredinosporas ubicadas en la parte media del arbusto. Para ello se utilizaron secciones de pitillo plástico (popote o pajilla), de aproximadamente 3 cm de longitud, y una vez recogidas, se procedió a sellar los pitillos con calor. Se conformó una muestra compuesta por lote, identificadas según el siguiente esquema:

- Categoría Piso altitudinal: 1 (950–1100 msnm), 2 (1101 – 1200 msnm) y 3 (> 1200 msnm).
- Categoría Variedades: Catuai amarillo (1), Catuai rojo (2), Caturra (3), Bourbon (4), Monteclaro (5), L3 INIA01 (6), L4 INIA01 (7), L5 INIA01 (8), L 7INIA01 (9), L8 INIA01 (10), Arausi

(11), S288 T3216 (12) Selección PAT2900 (13), Erithian Mokka (14), Maddang T99214 (15), Delecho Ethiope (16).

Las cepas se preservaron a 4 °C, los pitillos fueron colocados dentro de una bolsa con cierre hermético para luego depositarlos en un desecador que contenía un recipiente con ácido sulfúrico al 32,6 % (Bustamante *et al.*, 2001).

**Extracción del ADN de *Hemileia vastatrix*.** La extracción del ADN fue realizada a la totalidad de las muestras colectadas directamente en el campo, en el laboratorio de BIOCAFE de la Universidad Federal de Viçosa (UFV, Viçosa Mina Gerais, Brasil), siguiendo la metodología utilizada en este laboratorio. Una vez obtenido el ADN, las muestras se diluyeron en soluciones de trabajo de 25 ng·ml<sup>-1</sup>, se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se almacenaron a 4 °C hasta su uso, se cuantificó el ADN con NanoDrop TM spectro-photometer (Thermo Fisher Scientific) colocando 1 µL de la muestra.

**Análisis de RAPD.** La amplificación de los fragmentos al azar fue realizada en termociclador Thermo X2 con 26 iniciadores mostrados en el Cuadro 2. Se seleccionó una muestra de ADN de cada una de las cepas y se aplicó el protocolo para RAPD. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

Quedaron seleccionados 9 iniciadores que mostraron polimorfismo al visualizarse las bandas (Cuadro 3). Los productos de amplificación polimórficos permitieron construir una matriz generada mediante el coeficiente de distancia Dice (1-S) y con ésta, un análisis de agrupamiento por dendrograma y coordenadas principales. Ambos tipos de análisis permitieron visualizar las relaciones genéticas en base a similitudes (análisis fenético) entre los materiales evaluados. Los análisis de varianza molecular (AMOVA) se realizaron utilizando el programa estadístico InfoGen (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), en 18 muestras que presentaron bandas polimórficas nítidas, más dos testigos (Raza II y Raza XXXIII) de los tres provenientes de Brasil.

**Análisis de REMAP.** Para el análisis de REMAP se utilizaron las combinaciones REMAP (polimorfismo de microsatélites de retrotransposones: LTR / ISSR) mostradas en el Cuadro 4, siguiendo el protocolo para REMAP empleado en el Laboratorio de Biotecnología del Café (BIOCAFE, Viçosa, Brasil).

**Cuadro 1.** Muestras de *Hemileia vastratrix* colectadas en dos estados de Venezuela (Lara y Táchira). Datos geográficos y cultivares de origen, consignadas en el Laboratorio BIOCAFE (Viçosa, Brasil)

CÓDIGO CEPA	LATITUD	LONGITUD	ALTURA (msnm)	LOCALIDAD	CULTIVAR
LrG2-1-1	09° 37' 19.0"	069° 48' 26.0"	1120	Finca San Jose Guarico Guarico estado Lara (Lote 1	Catuai amarillo
LrG2-1-2	09° 37' 18.9"	069° 48' 26.5"	1120	Finca San José Guarico Guarico estado Lara (Lote 2)	Catuai amarillo
Lr G3-1-3	09° 37' 14.3"	069° 48' 24.8"	1300	Finca San José Guarico Guarico estado Lara (Lote 3)	Catuai amarillo
LrG3-1-4	09° 37' 14.8"	069° 48' 24.8"	1300	Finca San José Guarico Guarico estado Lara (Lote 4)	Catuai amarillo
LrG1-2-5	09° 36' 40.7"	069° 48' 41.1"	950	Posada Guarico Guarico estado Lara (Lote 1) Troncal 7	Catuai amarillo
LrG1-2-6	09° 36' 39.2"	069° 48' 40.6"	950	Posada Guarico Guarico estado Lara (Lote 2)Troncal 7	Catuai rojo
LrG2-1-7	09° 36' 39.8"	069° 48' 38.8"	1196	Posada Guarico Guarico estado Lara (Lote 3)Troncal 7	Catuai amarillo
Lr S3-4-8	09° 44' 12.1"	069° 37' 23.4"	1481	Finca San Mateo Bojo Sanare estado Lara (Lote1)	Bourbon
LrS3-1-9	09° 44' 12.1"	069° 37' 23.4"	1481	Finca San Mateo Bojo Sanare estado Lara (Lote1)	Catuai amarillo
LrS3-4-10	09° 44' 12.1"	069° 37' 23.4"	1481	Finca San Mateo Bojo Sanare estado Lara (Lote1)	Bourbon
TcR1-3-11	07° 42' 10.1"	072° 21' 12.24"	850	Rubio estado Táchira	Caturra
TcB2-3-12	07° 38' 54.6"	072° 23' 57.8"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	Caturra
TcB2-10-13	07° 39' 07.2"	072° 23' 58.5"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	L8 (INIA 01)
TcB2-8-Hv01ve*	07° 39' 07.1"	072° 23' 58.5"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	L5 (INIA 01)
TcB2-13-15	07° 38' 33.6"	072° 23' 54.8"	1100	Jardín 2 Banco Germoplasma INIA Bramón estado Táchira	Selección PAT2900
TcB2-9-16	07° 38' 38.6"	072° 23' 54.8"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	L7 (INIA 01)
TcB2-7-17	07° 39' 08.6"	072° 23' 22.0"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	L4 (INIA 01)
TcB2-6-Hv02ve*	07° 39' 07.6"	072° 23' 22.3"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramon estado Tachira	L3 (INIA 01)
TcB2-15-Hv02ve*	07° 39' 08.23"	072° 23' 50.41"	1110	Jardín 2 Banco Germoplasma INIA Bramón estado Táchira	Maddang T99214
TcB2-16-XXXIX*	07° 39' 08.29"	072° 23' 49.14"	1110	Jardín 2 Banco Germoplasma INIA Bramón estado Táchira	Delecho Ethiope
TcB2-11-Hv02ve*	07° 39' 08.81"	072° 23' 48.94"	1100	Jardín 2 Banco Germoplasma INIA Bramon estado Tachira	Arausi
TcB2-14-22	07° 39' 08.24"	072° 23' 50.5"	1100	Jardín 2 Banco Germoplasma INIA Bramón estado Táchira	Erithean Mokka
TcB2-12-23	07° 39' 08.98"	072° 23' 49.40"	1110	Jardín 2 Banco Germoplasma INIA Bramón estado Táchira	S288T3216
TcB1-1-Hv02ve	07° 39' 08.23"	072° 23' 50.41"	1100	Campo Experimental El Trompillo Bramon estado Tachira	Catuai amarillo
TcB1-5-25	07° 39' 09.05"	072° 23' 49.79"	1100	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	Monteclaro
TcB2-5-26	07° 39' 06.86"	072° 23' 59.29"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira (Lote A)	Monteclaro
TcB2-10-27**	07° 39' 04.32"	072° 23' 59.60"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	L8 (INIA01)**
TcB-2-8-28**	07° 39' 07.1"	072° 23' 58.5"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	L5 (INIA01)**
TcB2-2-29	07° 39' 08.33"	072° 23' 49.44"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	Catuai rojo
TcB2-9-30	07° 39' 04.32"	072° 23' 59.60"	1110	Campo Experimental El Trompillo Bramón estado Táchira	L7 (INIA 01)

CÓDIGO CEPA: Lr = Lara; S= Sanare; G= Guarico; Tc= Táchira; B= Bramón; R= Rubio. 1ER NÚMERO: MSNM. 1= 850-1100; 2= 1101-1200; 3= > 1200. 2DO NÚMERO: CULTIVAR. 1= Catuai amarillo; 2= Catuai rojo; 3= Caturra; 4= Bourbon; 5= Monteclaro; 6= L3 (INIA 01);7= L4 (INIA 01); 8= L5 (INIA 01); 9= L7 (INIA 01); 10= L8 (INIA 01); 11= Arausi; 12= S288T3216; 13= Selección PAT2900; 14= Erithean Mokka; 15= Maddang T99214; 16= Delecho Ethiope. 3er NÚMERO: Identificación Cepas. \*Razas y patotipos identificados para Venezuela. (Ramírez *et al*, 2024). \*\* Perdida en el manejo de las muestras en el laboratorio. Para los análisis de varianza molecular se utilizaron las cepas que evidenciaron bandas polimórficas definidas.

**Cuadro 2.** Iniciadores (Operon Technologies) utilizados para el análisis RAPD en muestras ADN *Hemileia vastatrix* de Venezuela

INICIADOR	SECUENCIA	INICIADOR	SECUENCIA	INICIADOR	SECUENCIA
OPA-06	AAGTGCACGG	OPG-11	TGCCCGTCGT	OPP-01	GTAGCACTCC
OPA-09	TCGCTTCTCC	OPG-12	CAGCTCACGA	OPP-02	TCGGCACGCA
OPB-10	CTGCTGGGAC	OPG-18	GGCTCATGTG	OPP-06	GTGGGCTGAC
OPC-15	GACGGATCAG	OPH-08	GAAACACCCC	OPP-15	GGAAGCCAAC
OPD-06	ACCTGAACGG	OPH-18	GAATCGGCCA	OPP-17	TGACCCGCCT
OPE-04	GTGACATGCC	OPK-05	TCTGTGCGAGG	OPP-20	GACCCTAGTC
OPE-14	TGCGGGCTGAG	OPL-02	TGGGCGTCAA	-	-
OPE-16	GGTGACTGTG	OPM-10	TCTGGCGCAC	-	-
OPF-08	GGGATATCGG	OPN-02	ACCAGGGGCA	-	-
OPF-10	GGAAGCTTGG	OPO-16	TCGGCGGTTC	-	-

**Cuadro 3.** Iniciadores seleccionados (Operon Technologies) para el análisis RAPD en muestras ADN *Hemileia vastatrix* de Venezuela.

INICIADOR	SECUENCIA	INICIADOR	SECUENCIA	INICIADOR	SECUENCIA
OPA-09	TCGCTTCTCC	OPG-11	TGCCCGTCGT	OPP-17	TGACCCGCCT
OPD-06	ACCTGAACGG	OPO-16	TCGGCGGTTC		
OPE-04	GTGACATGCC	OPP-06	GTGGGCTGAC		
OPF-10	GGAAGCTTGG	OPP-15	GGAAGCCAAC		

Las reacciones se repitieron dos veces por muestra, para determinar la consistencia de los patrones obtenidos y la selección de los Primers. Los productos de la amplificación del ADN, al igual que en el caso del RAPD, permitieron visualizar las relaciones fenéticas entre los materiales evaluados. El análisis de varianza molecular

(AMOVA) se realizó utilizando el programa InfoGen en 18 muestras que presentaron bandas polimórficas nítidas, más dos testigos (RazaII y patotipo Hv05) de los tres provenientes de Brasil. Entre las dos técnicas se analizó un total de 21 aislamientos (que no fueron coincidentes en su totalidad), con dos testigos para RAPD y dos para REMAP.

**Cuadro 4.** Marcadores REMAP (LTR/ISSR) utilizados en el estudio de caracterización molecular de muestras de *Hemileia vastatrix* de Venezuela.

REMAP	T °C hibridación	REMAP	T °C hibridación
48F/D1C	57 °C	81F/D1C	54°C
48R/D1C	55 °C	81F/T1C	49°C
48R/T1C	53 °C	-	-

Las secuencias no se describen porque pertenecen a un estudio de BIOCAFE aún sin publicar

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 26 iniciadores de las series OPA, OPB, OPC, OPD, OPE, OPF, OPG, OPH, OPK, OPL, OPM, OPN, OPO y OPP, sólo 9 presentaron polimorfismo, los cuales generaron un total de 76 bandas polimórficas en 18 aislamientos de *H. vastatrix*; de éstas, 70 bandas fueron polimórficas y 6 monomórficas (Cuadro 5). Todas las bandas se mostraron claras, leíbles y reproducibles, lo cual

permitió detectar las variaciones genéticas entre los aislamientos de *H. vastatrix* estudiados.

En el Cuadro 5 se evidencia que la variación molecular produjo hasta un 92,11 % de bandas polimórficas, lo que representa un alto grado de polimorfismo poco común en los hongos de la roya en comparación con lo expresado por Gouveia *et al.* (2005), quienes reportan un 78 % de polimorfismo en su ensayo utilizando diferentes marcadores y razas del patógeno. Los

valores para el contenido de información polimórfica (PIC) de los 9 iniciadores RAPD utilizados, oscilan entre 0,15 y 0,32, por lo que podrían considerarse que van de informativo a altamente informativo según lo descrito por Arteaga y Reyes (2017) quienes indican que

valores del PIC menores a 0,15 son no informativos, valores entre 0,15 y 0,25 son informativos y mayores a 0,25 como altamente informativos, refiriéndose a la probabilidad de que dos alelos elegidos al azar (en un solo locus) en una las poblaciones, son diferentes entre sí.

**Cuadro 5.** Estadística descriptiva para los datos de marcadores RAPD utilizados en la caracterización de 18 muestras de *Hemileia vastatrix* de Venezuela.

Resumen		Primers	BP	BM	BT	PIC	E.E.
Muestras	18	OPA09	4	1	5	0,150	0,030
Muestras duplicadas	0	OPD06	12	0	12	0,290	0,020
Número de bandas	76	OPE04	9	0	9	0,200	0,020
Bandas monomórficas	6	OPF10	16	0	16	0,270	0,020
Bandas polimórficas (%)	92,11	OPG11	3	0	3	0,150	0,004
Número de primers	9	OPO16	11	0	11	0,270	0,020
		OPP06	6	0	6	0,320	0,010
		OPP15	4	5	9	0,190	0,020
		OPP17	5	0	5	0,310	0,020
Total			70	6	76		

BP= bandas polimórficas, BM= bandas monomórficas, BT= bandas totales, PIC= contenido de información polimórfica, E.E =desviación estándar.

Los iniciadores OPF-10, OPD-06, OPO-16, OPP-17 y OPP-06 presentaron información considerable para el análisis de diversidad de las cepas de *H. vastatrix* estudiadas, con PIC en rangos que oscilan entre 0,270 y 0,320. Por su parte, OPE-04, OPP-15, OPA-09, OPG-11 mostraron PIC entre el rango de 0,15 y 0,25 que se consideran como informativos, todo esto indica que los iniciadores seleccionados proveen buena información para la diversidad genética de la población de *H. vastatrix* estudiada.

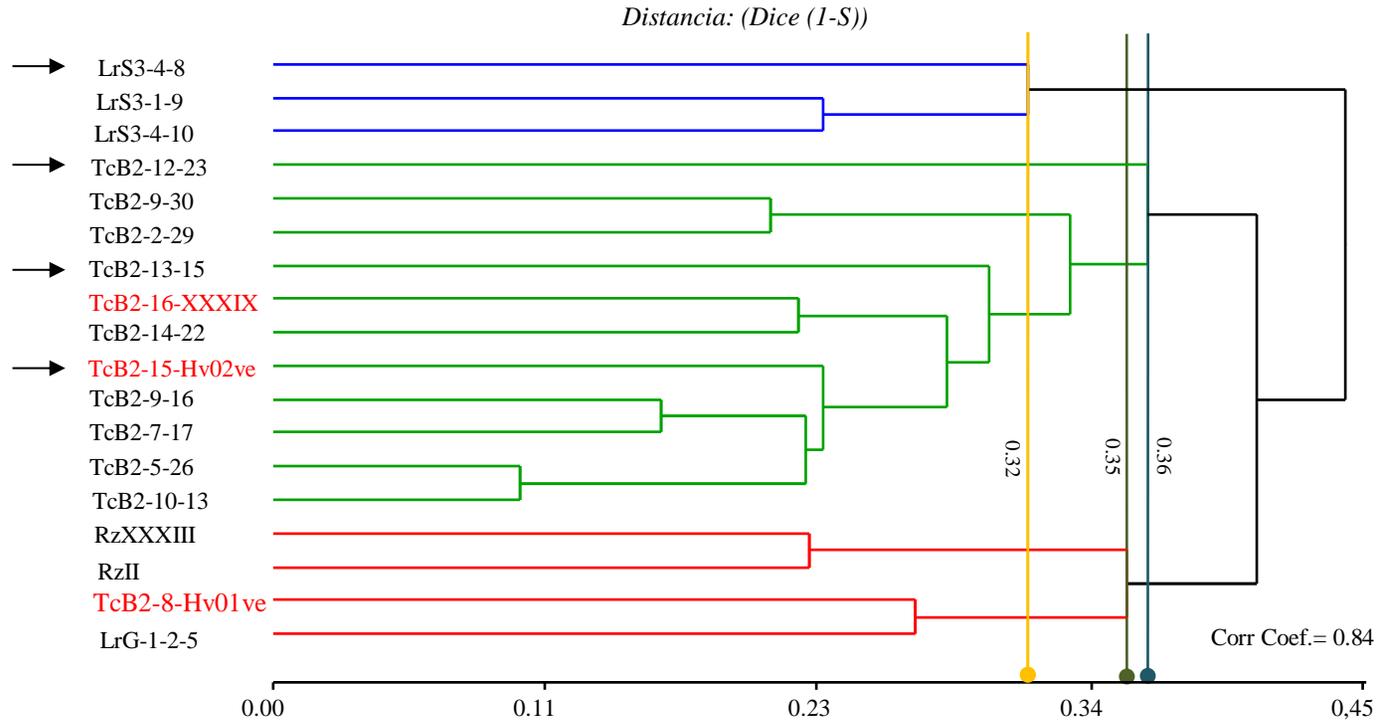
El iniciador OPA-09 fue recomendado por Gouveia *et al.* (2005), debido a que en su estudio discriminaron inequívocamente a las razas XV y VIII; sin embargo, en este estudio aunque no se analizaron estas razas, la raza XXXIX identificada como nueva en el país fue discriminada por este iniciador. Gouveia *et al.* (2005) indicaron que para que un iniciador pueda ser utilizado como marcador específico de una raza, se requieren estudios adicionales de un mayor número de aislamientos.

El dendrograma de relaciones genéticas entre individuos de *H. vastatrix*, obtenido mediante el análisis de 76 bandas, muestra de una manera clara la formación de tres grandes grupos relacionados de las cepas que evidencian más

cercanía genética (Figura 1). Se evidencia que las cepas provenientes de Sanare se agruparon conformando un primer grupo con una distancia (1-S) de 0,32 aproximadamente. El segundo grupo, con una distancia de aproximadamente 0,36, comprende 11 cepas de la localidad de Bramón; y un tercer grupo, con una distancia de 0,35, aproximadamente, con respecto a los otros dos grupos conformados, compuesto por 4 cepas que incluyen los testigos RzXXXIII (Brasil)–RzII (BIOCAFE) y TcB2-8-Hv01ve, LrG1-2-5.

Cabe destacar que el primer y segundo grupo fueron conformados por las cepas que se ubicaron entre los pisos altitudinales >1200 msnm y 1101-1200 msnm de los estados Lara y Táchira respectivamente. El grupo 3 se constituyó con los testigos de Brasil y dos cepas: una de Lara y otra de Táchira.

En referencia al primer grupo formado en el análisis de dendrograma, o cluster, las cepas LrS3-1-9 y LrS3-4-10 se agrupan en duplas indicando este hecho que se encuentran genéticamente más relacionados entre sí. Por su parte, el aislamiento LrS3-4-8 se presenta solo, lo cual deja evidencia que su composición génica es diferente a los otros dos y al grupo general estudiado.



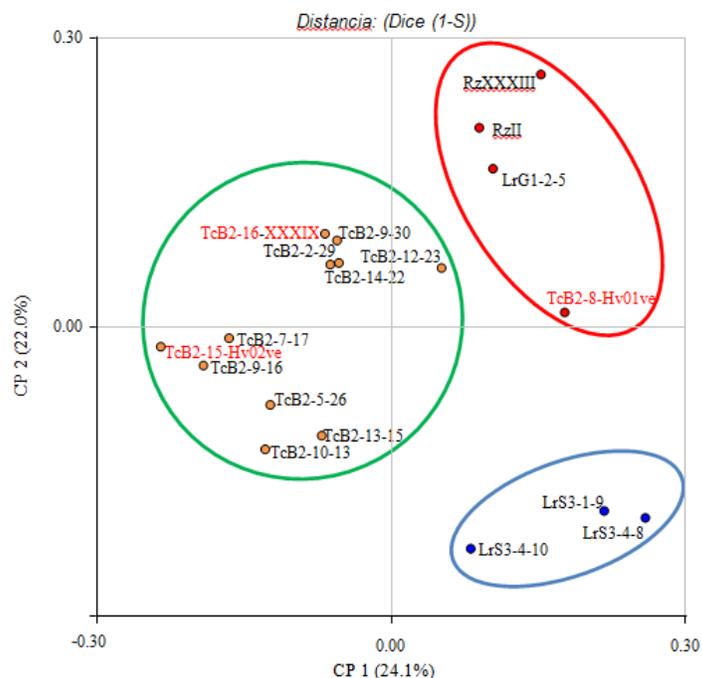
**Figura 1.** Dendrograma obtenido con marcadores RAPD para agrupar 18 cepas de *Hemileia vastatrix* colectados en las localidades de Sanare y Guarico (estado Lara), Bramón (estado Táchira) y 2 razas testigos, RzII y RzXXXIII, procedentes de BIOCAFE (Viçosa, Brasil), mediante el coeficiente de distancia Dice (1-S). Grupo 1 líneas en color azul. Grupo 2 líneas en color verde. Grupo 3 líneas en color rojo. Las flechas indican las cepas que se mostraron de manera individual. Cada grupo se evidencia con un color diferente. Grupo 1: azul; Grupo 2: verde; Grupo 3: rojo

En el 2do grupo se evidencia que de las 11 cepas que lo comprenden, TcB2-12-23, TcB2-13-15, TcB2-15-Hv02ve se presentan como único aislamiento en comparación con los que conforman duplas por lo que su composición génica es diferente al resto de los aislados del grupo. Las duplas formadas por TcB2-9-30–TcB2-2-29, TcB2-16-(XXXIX)–TcB2-14-22, TcB2—9-16–TcB2-7-17, TcB2-5-26–TcB2-10-13 indican que estas cepas están relacionadas entre sí, siendo la última la más cercana al eje y por tanto, son más semejantes entre sí genéticamente. En este grupo se ubicaron solo las de la localidad de Bramón y con piso altitudinal entre 1101 a 1200 msnm. En el 3er grupo se observa que cada par conformado está relacionado genéticamente entre sí, las razas testigos RzXXXIII–RzII se agruparon en duplas lo que hace los resultados confiables.

En cuanto al coeficiente cofenético de

correlación (Corr Coef), éste indica que se conserva la fidelidad de las distancias por pares en un 84% entre los puntos de los datos originales no modelados; es decir la estructura de datos original (distancias verdaderas) se conservó en un 84%, lo que hace confiable el análisis.

El análisis de los datos con el método de coordenadas principales confirma la presencia de 3 grupos (Figura 2). Un grupo queda conformado por tres cepas provenientes del estado Lara, específicamente de Sanare; un segundo grupo se conforma por 11 cepas (todos del estado Táchira) donde se incluyen dos de la raza y uno de los patotipos identificados (XXXIX y Hv02ve); y un tercer grupo, que se conforma de cuatro cepas: los testigos (RzXXXIII (Brasil) – RzII (BIOCAFE)), y las cepas TcB2-8-Hv01ve, LrG1-2-5. La sumatoria de los CP1 y CP2 da como resultado 46,1%.



**Figura 2.** Representación gráfica del análisis de Coordenadas Principales obtenido con marcadores RAPD para agrupar 18 cepas de *Hemileia va.* CP 1 (24.1%) es en las localidades de Sanare y Guarico (estado Lara), Bramón (estado Táchira) y 2 razas testigos, RzII y RzXXXIII, procedentes de BIOCAFE (Viçosa, Brasil), mediante el coeficiente de distancia Dice (1-S). Grupo 1: líneas en color azul; Grupo 2: líneas en color verde; Grupo 3: líneas en color rojo.

Este tipo de agrupación indica que las cepas están cercanas entre sí y son diferentes a los conformados en cada grupo. Al analizar los CP1 y CP2 se evidencia que el 46,1 % explica la

variabilidad entre las cepas de *Hemileia vastatrix* estudiadas. Se constata cómo estos resultados demuestran que los iniciadores RAPD discriminan por ubicación geográfica y piso altitudinal y

sugieren que los marcadores utilizados son eficientes para evaluar la diversidad fenética de las razas de *H. vastatrix*, con respecto a la variación en múltiples loci (76 en este estudio) concordando con lo expuesto por Gouveia *et al.* (2005), y contrastando con el trabajo de Nunez *et al.* (2009), en su estudio de poblaciones de *H. vastatrix* con el uso de iniciadores OPA-09, OPD-05 y OPF-06, cuyos resultados indicaron que no había evidencia de diferenciación genética entre poblaciones asociadas entre las plantaciones de café estudiadas y que no hubo asociación entre el origen geográfico de los aislados con los sistemas de cultivo, ni con la región

Los tres tipos de análisis utilizados permitieron visualizar, comparar y analizar datos, identificar patrones y relaciones, y tomar decisiones basadas en la similitud entre diferentes entidades de las relaciones genéticas entre los materiales evaluados, evidenciando que la constitución génica de los aislados, la ubicación geográfica y el piso altitudinal constituye un factor determinante sobre el comportamiento de los mismos.

Gouveia *et al.* (2005) mencionaron que *H. vastatrix* tiene una estructura poblacional consistente con una reproducción asexual y que esto concuerda con la ausencia de evidencia biológica del comportamiento sexual en condiciones naturales y de invernadero; así mismo, indicaron que teniendo en cuenta la capacidad de dispersión a larga distancia, las cepas pueden propagarse por todo el mundo, experimentando diferenciación mediante mutación, recombinación asexual u otras fuentes de variación genética (mecanismos que ocurren en poblaciones que se reproducen asexualmente y que favorecen el intercambio genético). Así mismo, Nunes *et al.* (2009) concuerdan en que el alto flujo de genes entre subpoblaciones contribuye a prevenir la diferenciación genética. Indican que el hecho de que el inóculo pueda transportarse fácilmente, permite tanto la dispersión de patógenos como la propagación de enfermedades; por tanto, el fácil movimiento de los propágulos puede haber contribuido al flujo de genes.

Los resultados de este trabajo discrepan con los de Gouveia *et al.* (2005) y Nunez *et al.* (2009); esto puede deberse a que, en estudios de diversidad genética, las discrepancias en los resultados entre razas, hospederos y ubicaciones geográficas pueden surgir debido a factores como

la selección natural, deriva genética, flujo genético, mutación, presencia de elementos transponibles y la interacción entre factores genéticos y ambientales. La selección natural puede favorecer diferentes alelos en diversos entornos, mientras que la deriva genética afecta la diversidad genética en poblaciones pequeñas. El flujo genético entre poblaciones puede homogenizar la diversidad genética, mientras que la mutación introduce nueva variación, así como los genes transponibles. Además, la ubicación geográfica puede influir en la adaptación de las poblaciones a factores ambientales específicos, lo que puede generar diferencias genéticas entre ellas (cambios epigenéticos).

Arteaga y Reyes (2017) indican que la técnica de RAPD es ampliamente utilizada para el estudio de relaciones filogenéticas entre organismos para estimar la variación dentro de las poblaciones, así como para probar hipótesis de adaptaciones ecológicas; se usan tanto datos morfológicos como moleculares. Sin embargo, uno de los argumentos que respaldan el uso de los caracteres moleculares es que se trabaja directamente con la base genética de la variación. Los resultados de este trabajo concuerdan con lo reportado por estos autores porque el uso de iniciadores RAPD generó una información de importancia en este estudio de la caracterización molecular de 18 cepas de *H. vastatrix* provenientes de dos estados del país

La conformación de grupos por ubicación geográfica en este ensayo concuerda con lo expuesto por Jennings *et al.* (1997). Sus resultados sobre el estudio de aislamientos de *Puccinia hordei*, demostraron que los marcadores RAPD revelaron polimorfismos entre los aislados de Reino Unido y Australia e incluso entre aislados de la misma raza de *P. striiformis f. sp. hordei* de diferentes países; además, que las razas no comprenden clones mundiales y que existen poblaciones geográficamente separadas que muestran más similitudes dentro del grupo que entre las cepas, ya que los resultados evidenciaron diferencias entre las cepas de las diferentes localidades y pisos altitudinales.

Se han realizados diversos estudios para la variabilidad molecular de Hv utilizando otros marcadores moleculares como AFLP, ITS, SSR logrando diferenciar las cepas. Aunque difieren con las técnicas utilizadas en este en trabajo, todas son eficientes para detectar la variabilidad y los

RAPD es una de las más económicas y sencillas para este fin.

Cabral *et al.* (2016), al evaluar la influencia del hospedante y el origen geográfico en la diversidad y la diferenciación poblacional de *H. vastatrix*, concluyeron que se mostró un bajo nivel de diversidad genotípica, que el 90% de la distribución genética del patógeno se presenta entre los aislamientos dentro de la subpoblación (estados u hospedantes de origen) contrastando con los resultados de este trabajo ya que se obtuvo un 92,11 % de bandas polimórficas. Los autores no observaron correlación entre la distancia geográfica y la genética; el bajo grado de diferenciación de las poblaciones de Hv concuerda con el hecho de que el inóculo probablemente se disemina fácilmente por el viento a largas distancias, lo que permite la dispersión del patógeno entre las zonas cafetaleras de Brasil. Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos en el presente trabajo en cuanto a la discriminación por ubicación geográfica.

Así mismo, Maia *et al.* (2013), al estudiar la estructura poblacional de *Hemileia vastatrix* en Brasil inferida a través de marcadores AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), demostraron que en Brasil el hongo se comporta como una gran población indiferenciada con un alto nivel de diversidad genotípica, sin estructura en cuanto a su origen geográfico y hospedador contrastando también

con los resultados de este trabajo y evidenciándose que los RAPD pueden discernir sobre el comportamiento de las cepas de *H. vastatrix* bajo estudio.

**Análisis REMAP.** La estadística descriptiva para los marcadores REMAP (LTR/ISSR) utilizados para la determinación del genoma de *H. vastatrix* se muestra en el Cuadro 6, donde se evidencia el número de bandas y el tamaño de los iniciadores. Los 5 marcadores REMAP utilizados generaron un total de 29 bandas polimórficas en 18 cepas de *H. vastatrix*; de éstas, 28 fueron polimórficas y 1 monomórfica. El total de bandas polimórficas fue de 96,55 %. Todas las bandas se mostraron claras, leíbles y reproducibles, lo cual permitió detectar las variaciones genéticas entre las cepas de *H. vastatrix* estudiadas. Los valores del contenido de información polimórfica (PIC) para los 5 iniciadores utilizados oscilan entre 0,25 y 0,30, sugiriendo ser altamente informativos (Arteaga y Reyes, 2017); presentando información considerable para el análisis de diversidad de los aislamientos de *H. vastatrix* estudiados. La combinación REMAP/T1C fue la que más bandas polimórficas discriminó, seguida de REMAP/D1C y el ISRR T1C, los ISRR D1C y D2C fueron los que menos bandas presentaron (3 y 2, respectivamente). La combinación de marcador 48R-T1C y 81F-T1C discriminaron la banda única para los aislados de la localidad de Sanare

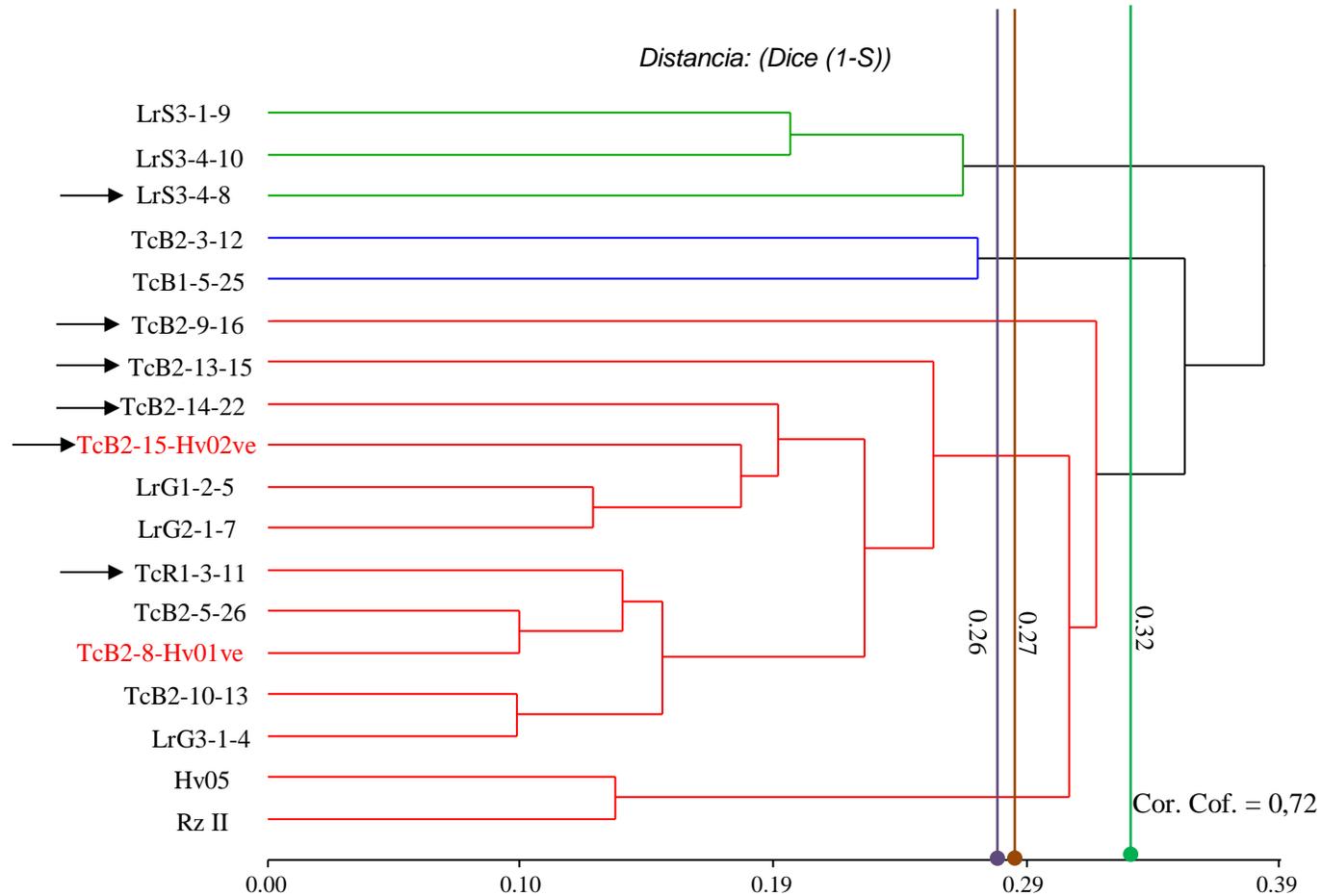
**Cuadro 6.** Estadística descriptiva para datos de marcadores REMAP utilizados en la caracterización de 18 muestras de *Hemileia vastatrix* de Venezuela.

Resumen		Primers	BP	BM	BT	PIC	E.E.
Muestras	18	REMAP/T1C	9	0	9	0,27	0,03
Muestras duplicadas	0	REMAP/D1C	7	1	8	0,30	0,03
Número de bandas	29	D1C	3	0	3	0,25	0,01
Bandas monomórficas	1	D2C	2	0	2	0,28	0,01
Bandas polimórficas (%)	96,55	T1C	7	0	7	0,27	0,02
Número de primers	5						
Total			28	1	29		

BP= bandas polimórficas, BM= bandas monomórficas, BT= bandas totales, PIC= contenido de información polimórfica, E.E =desviación estándar.

El análisis por dendrograma de relaciones fenéticas entre individuos pertenecientes a diferentes cepas de *H. vastatrix* obtenido mediante el análisis de 28 bandas (Figura 3)

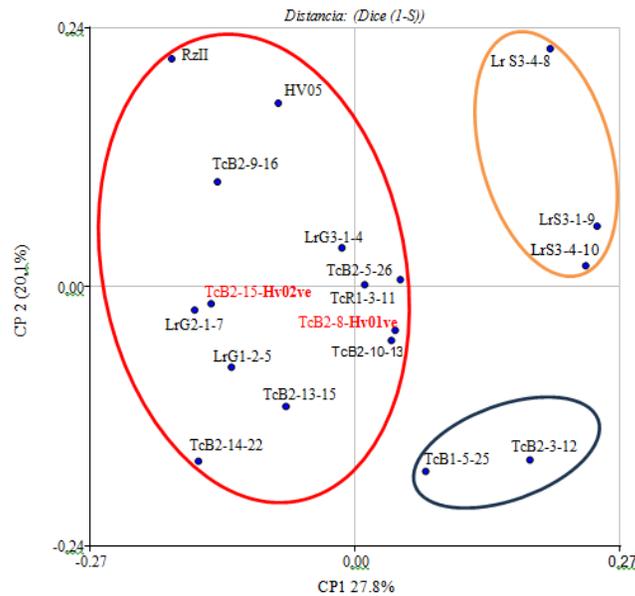
muestra de una manera clara la formación de tres grandes grupos, relacionando las de más cercanía genética. El coeficiente cofenético de correlación fue 0,72 %.



**Figura 3.** Dendrograma obtenido con marcadores REMAP para agrupar 18 cepas de *Hemileia vastatrix* colectados en las localidades de Sanare y Guarico (estado Lara), Bramón (estado Táchira) y las cepas testigos RzII y Hv05, procedentes de BIOCAFE (Viçosa, Brasil), mediante el coeficiente de distancia (Dice (1-S)). Las flechas indican las cepas que se mostraron de manera individual. Cada grupo se evidencia con un color diferente. Grupo 1: azul; Grupo 2: verde; grupo 3: rojo.

También se evidencia que LrS3-1-9, LrS3-4-10 y LrS3-4-8 provenientes de Sanare se conforman como un primer grupo con una distancia (1-S) de 0,26. El segundo grupo lo conforman TcB2-3-12 y TcB1-5-25; esta dupla presenta una distancia de aproximadamente 0,27. Un tercer grupo con una distancia de 0,32 con respecto a los otros dos grupos conformados, está compuesto por 15 cepas como son TcB2-9-16, TcB2-13-15, TcB2-14-22, TcB2-15-Hv02ve, TcR1-3-11, LrG1-2-5, LrG2-1-7, Hv05 (Testigo Brasil), RzII (Testigo

Brasil), TcB2-5-26, TcB2-8-Hv01ve, TcB2-10-13, LrG3-1-4. El análisis de los datos con el método de coordenadas principales confirma la presencia de estos 3 grupos (Figura 4). Un grupo queda compuesto por tres cepas provenientes del estado Lara, específicamente de Sanare; un segundo grupo se conforma con 2 del estado Táchira, y un tercer grupo que se conforma de 13 aislamientos: 8 del estado Táchira, 3 del estado Lara (específicamente Guarico) y las 2 razas testigos.



**Figura 4.** Representación gráfica del análisis de Coordenadas Principales obtenido con marcadores REMAP para agrupar 18 cepas de *Hemileia vastatrix* correspondiente a los estados Lara y Táchira junto a 2 razas de Brasil testigos, mediante el coeficiente de distancia (Dice 1-S). Grupo 1: líneas en color amarillo; Grupo 2: líneas en color azul; Grupo 3: líneas en color rojo

Un coeficiente cofenético de 0,72 indica buena fidelidad en la conservación de las distancias por pares entre los puntos de datos originales no modelados; es decir, la estructura de datos original (distancias verdaderas) se conservó en un 72 % lo que hace confiable el análisis. Al analizar los CP1 y CP2 se puede evidenciar que el 47,9 % explica la variabilidad entre las cepas de *Hemileia vastatrix* estudiadas.

Al comparar los resultados, tanto por los iniciadores RAPD como de REMAP, se evidencia que las cepas provenientes de la localidad de Sanare, estado Lara, se comportan como un único bloque, por lo que

probablemente compartan un origen genético común detectado por los marcadores; lo mismo se aplica para el grupo 2.

En ambos análisis, el aislamiento LrS3-4-8 se comportó de manera individual lo que refuerza la idea de que se trata de una cepa diferente. El aislamiento TcB2-10-13 presentó la misma distancia de 0.10 en ambos análisis. El aislamiento TcB2-13-15, en ambos análisis, se presentó como aislamiento individual lo que indica también que se está en presencia de una raza o patotipo diferente, por lo que estos resultados sugieren que la dispersión de esporas como las diferentes presiones de selección en los distintos sistemas de manejo del café, en las

localidades muestreadas, probablemente pudieran ser responsables de la alta diversidad genética observada en los aislados.

El análisis REMAP (LTR/ISSR) discriminó por ubicación geográfica para todos los grupos, evidenciándose que el grupo 2 estuvo conformado por cepas provenientes de Táchira y Lara específicamente de la localidad de Guarico, por lo que se puede inferir que esta agrupación comparte otros elementos moleculares que se han detectado a nivel de los ISSR

Zayat *et al.* (2021) indican que las plantas contienen extensiones repetitivas, muchos de los cuales son elementos genéticos móviles (transposones) que son capaces de cambiar su posición dentro del genoma. Entre estos elementos transponibles, los retrotransposones constituyen el mayor grupo y se agrupan además en dos clases principales dependiendo de la presencia o ausencia de flanqueo largo de repeticiones directas terminales (LTR). Estos LTR son altamente conservados y se explotan para el diseño de cebadores en el desarrollo de marcadores basados en retrotransposones. Varios sistemas de marcadores basados en retrotransposones se han desarrollado como inter-retrotransposones amplificados polimórficos (IRAP) y retrotransposones microsatélites polimórficos amplificados (REMAP).

Cristancho *et al.* (2014) identificaron cuatro nuevas familias de retrotransposones para *Hemileia vastatrix* e indicaron que la secuencia del genoma del hongo servirá como piloto para comprender el entorno molecular, para estudiar la diversidad de la especie y para el desarrollo de marcadores para distinguir razas/aislamientos.

## CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares RAPD (OPF-10, OPD-06, OPO-16, OPP-06 y OPP-17) proveyeron buena información para la caracterización de la variabilidad genética de las cepas estudiadas de *Hemileia vastatrix*, al igual que el REMAP/T1C demostrando que existe variabilidad genética entre las cepas estudiadas.

Las cepas de la localidad de Sanare, estado Lara se comportan genéticamente diferentes a las provenientes de Guarico estado Lara y Bramón

estado Táchira ya que en ambos análisis (RAPD y REMAP) se agruparon como un solo conglomerado, lo que podría indicar patotipos o razas distintas

Los tres tipos de análisis utilizados evidencian que la constitución génica de los aislados, ubicación geográfica y piso altitudinal, en su mayoría, conforma un factor determinante sobre su comportamiento.

## LITERATURA CITADA

1. Aime, M.C., A.R. McTaggart, S.J. Mondo y S. Duplessis. 2017. Phylogenetics and Phylogenomics of Rust Fungi. *Advances in Genetic* 100: 267-307.
2. Arteaga, L. y J. Reyes. 2017. Análisis de cuatro marcadores RAPD en 41 accesiones de aguacate (*Persea* sp.). Apunte de asignatura: Genética Molecular. Universidad Autónoma del estado de México. pp:1-16
3. Avelino, J., M. Cristancho, S. Georgiou, P. Imbach, L. Aguilar, G. Bornemann *et al.* 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7: 303-321
4. Bigirimana, J., K. Njoroge, J.W. Muthomi, D. Gahakwa, E.K. Gichuru y D.J. Walyaro. 2013. Genetic Diversity among Disease Resistant Coffee Varieties and Cultivars in Rwanda Based On RAPD and SSR Markers. *Journal of Renewable Agriculture* 1(6): 106-112.
5. Biswas M.K, M.N.R. Baig, Y.J. Cheng y X.X. Deng. 2010. Retro-transposon based genetic similarity within the genus Citrus and its relatives. *Genetic Resource Crop Evolution* 57(7): 963-972.
6. Borén A. y E. Teixeira Caixeta. 2016. Marcadores Moleculares. Ed. UFV. Viçosa, Brasil. p 9.
7. Bustamante, J., A. Sarmiento, A. Casanova, E. Contreras, C. Yanez, C. Romero *et al.* 2001. Caracterización de resistencia incompleta a *Hemileia vastatrix* en genotipos de café (*Coffea arabica* L) variedad Bramón I. *Bioagro* 13(2): 65-70.
8. Cabral, P.G.C., E. Maciel-Zambolim, S.A.S. Oliveira, E.T. Caixeta y L. Zambolim. 2016. Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea spp.* *Plant Pathology* 65: 196-204.

9. Capucho, A., E. Zambolim, R. Freitas, F. Haddad, E. Caixeta y L. Zambolim. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. Australasian Plant Dis. Notes 7: 189-191.
10. Cristancho, M., D Botero-Rozo, W. Giraldo, J. Tabima, D, Riaño-Pachón† *et al.* 2014. Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-11.
11. Daba G, R. Daelemans, G. Berecha, M.W.J. Geerinck, C. Verreth, S. Crauwels *et al.* 2024. Genetic diversity and structure of the coffee leaf rust fungus *Hemileia vastatrix* across different coffee management systems in Ethiopia. *International Microbiology* 27(2): 525-534.
12. Gouveia, M., A. Ribeiro, V. Varzea, y C. Rodríguez. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia* 97(2): 396-404.
13. Jennings, J., A.C. Newton y K.W. Buck. 1997. Detection of Polymorphism in *Puccinia hordei* using RFLP and RAPD Markers, Differential Cultivars and Analysis of the Intergenic Spacer Region of rDN A. *Phytopathology* 145: 511-519.
14. Kalendar R, A.J. Flavell, S.T, Ellis, C. Moisy, y A.H. Schulman. 2011. Analysis of plant diversit with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity* 106: 520-530
15. Kalendar R. y A.H Schulman. 2014. Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS. In *Molecular Plant Taxonomy* 1115: 233-255.
16. Legaria-Solano, J.P. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus* spp.). *Fitotecnia México* 33(2): 89-95.
17. Maia, T., E. Maciel-Zambolim, E. Caixeta, E. Mizubuti y L. Zambolim, 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology* 42(5): 533-542.
18. Maldonado, C. E., G. Marín-Ramírez, y C.A Ángel. 2022. Transposable elements library of the genome of *Hemileia vastatrix* (Race I), causative agent of the coffee leaf rust (data set). Biblioteca CENICAFE 10778/4392.
19. Nunes, C.C, L.A. Maffia, E.S.G., Mizubuti, S.H. Brommonschenkel y J.C. Silva. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 38: 445-45.
20. Orozco-Arias, S., M.S. Candamil, P.A. Jaimes, M. Cristancho, R. Tabares-Soto y R. Guyot. 2022. Composition and Diversity of LTR Retrotransposons in the Coffee Leaf Rust Genome (*Hemileia vastatrix*). *Agronomy* 12: 1-17.
21. Ramírez-Poletto, E., D. Rodríguez, L. Zambolim y E. Granados. 2024. Identificación fisiológica de cepas de *Hemileia vastatrix* en el estado Táchira, Venezuela. *Bioagro* 36(3): 277-286.
22. Riera, A. 2022. Afectación de las plantas de café por presencia del hongo de la roya. Recuperado de: <https://n9.cl/pzurlp>
23. Silva-Acuña, R., L. Zambolim y E. Pérez-Nieto. 1997. Identificación de razas fisiológicas de la roya del cafeto en el estado Táchira, Venezuela. *Bioagro* 9: 95-98.
24. Solano-Vidal, R. 2017. Situación actual de las razas fisiológicas de la roya (*Hemileia vastatrix*) del cafeto y un nuevo sistema de nomenclatura. *Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 28-31.
25. Varzea, V.M.P. y D.V. Marqués. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim, L.; E. Zambolim, V.M.P. Várzea, Durable resistance to coffee leaf rust. *eds.* UFV, Viçosa, MG, Brazil. pp. 53-74.
26. Zambolim, L. y E. Texeira. 2021. An overview of physiological specialization of coffee leaf rust-new designation of pathotypes. *International Journal of Current Research* 13(1): 15479-15490.
27. Zayat, M†, A. Hassan, E. Nishawy†, M. Ali y M. Hamdy Amar. 2021. Patterns of genetic structure and evidence of Egyptian Citrus rootstock based on informative SSR, LTR-IRAP and LTR-REMAP Molecular markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19(1): 1-14.