

# Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru

## Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos zonas productoras de café en el Perú

Cinthia Sheila Quispe-Apaza\*, Roberto Carlos Mansilla-Samaniego, César Fernando López-Bonilla, Rosa Espejo-Joya, Juan Villanueva-Caceda, Criss Monzón, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina S/N, Lima, Perú, C.P. 12056. \*Autor para correspondencia: cinthiashe@gmail.com.

Recibido: 15 de Diciembre, 2016.

Aceptado: 26 de Junio, 2017.

Quispe-Apaza CS, Mansilla-Samaniego RC, López-Bonilla CF, Espejo-Joya R, Villanueva-Caceda J, Monzón C. 2017. Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 418-436.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1612-7

Primera publicación DOI: 04 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 04, 2017.

**Resumen.** Se analizó la diversidad genética del patógeno del café *Hemileia vastatrix*, a través de secuenciación de los espaciadores internos transcribibles del ADN ribosomal (ITS). El análisis se realizó en muestras de roya de 12 predios de dos zonas cafetaleras del Perú, Quillabamba (Cusco) y Villa Rica (Pasco). Se hallaron los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica. Además, se determinaron las semejanzas entre las poblaciones analizadas por medio de una red de haplotipos. Del análisis, se determinó que ambas regiones productoras presentan valores altos de diversidad genética; sin embargo, la zona de Quillabamba albergó la

**Abstract.** The genetic diversity of the coffee pathogen *Hemileia vastatrix* was analyzed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA. The analysis was carried out using samples of rust pustules from 12 properties of two coffee areas in Peru, Quillabamba (Cusco) and Villa Rica (Pasco). Haplotype diversity indexes were found and the similarities among the populations analyzed were determined using a haplotype network. From the analysis, it was determined that both producing regions presented high values of genetic diversity, but Quillabamba harbored the highest haplotype diversity of *H. vastatrix* ( $H_d = 0.977 \pm 0.012$ ). In addition, the haplotype network showed the structure of *H. vastatrix* populations for these two areas, which behave as a large undifferentiated population with the presence of ancestral haplotypes from which new variants of the fungus were generated. We also analyzed the sequences of the ITS region of *H. vastatrix* collected in Peru and those reported in the GenBank, but we did not find any distribution of the populations by geographic region; it was also suggested that the populations of Peruvian

mayor diversidad haplotípica de *H. vastatrix* ( $Hd = 0.977 \pm 0.012$ ). Asimismo, la red de haplotipos permitió evidenciar la estructura de las poblaciones de *H. vastatrix* para cada zona, las que juntas se comportan como una gran población indiferenciada con presencia de haplotipos ancestrales a partir de los cuales se fueron generando nuevas variantes del hongo. También, se analizaron las secuencias de la región ITS de *H. vastatrix* peruanas y las almacenadas en el GenBank, no encontrándose distribución de las poblaciones por región geográfica; además, se determinó que las poblaciones de *H. vastatrix* peruanas presentan haplotipos similares a los de Colombia y a las razas II y XXII.

**Palabras claves adicionales:** Roya amarilla, ITS, *Coffea spp.*, haplotipos

El café (*Coffea spp.*) es el principal producto de agro-exportación del Perú, con un área cultivada de 361 671 ha y una producción de 222 047 t producidas principalmente en las regiones de Cajamarca, Amazonas, Junín, Cusco y San Martín (MINAGRI, 2015). El 95% del café peruano proviene de cultivares de *Coffea arabica* (JNC, 2014) que son muy susceptibles a la roya amarilla, enfermedad cuyo agente causal es el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix* (Berkeley, 1869).

La roya amarilla del café fue reportada por primera vez en el Perú el año 1979, en el departamento de Junín (Scheiber y Zentmyer, 1984). Sin embargo, tuvo su mayor incidencia en el año 2013 ocasionando pérdidas que alcanzaron el 27% de la producción (INEI, 2014), afectando principalmente a los productores orgánicos. Desde entonces esta enfermedad se ha extendido a gran parte de las principales zonas cafetaleras del Perú, entre ellos a Villa Rica (Región Pasco) y a Quillabamba (Región Cusco).

rust presented haplotypes similar to those from Colombia and races II and XXII.

**Key words:** Yellow rust, ITS, *Coffea spp.*, haplotypes

Coffee (*Coffea spp.*) is the main agricultural product exported from Peru, where it is sown on 361 671 ha that produce 222 047 tons mainly in the regions of Cajamarca, Amazonas, Junín, Cusco and San Martín (MINAGRI, 2015). Ninety five percent of Peruvian coffee comes from *Coffea arabica* cultivars (JNC, 2014) that are very susceptible to yellow rust, a disease caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix* (Berkeley, 1869).

Yellow rust of coffee was first reported in Peru in 1979 in the Department of Junín (Scheiber and Zentmyer, 1984). However, in 2013 it had the highest incidence causing 27% production losses (INEI, 2014) that mainly affected organic producers. Since then, yellow rust has spread to most of Peru's main coffee areas, including Villa Rica (Pasco Region) and Quillabamba (Cusco Region).

Yellow rust is considered the most damaging coffee disease worldwide and may cause up to 40% production losses (Rivillas *et al.*, 2011). Two approaches have been proposed to prevent losses caused by this disease. The first is fungicide use, which is expensive and potentially harmful to the environment; the second is to develop improved varieties. However, for the latter it is necessary to know the sources of resistance and the pathogen's diversity.

The mechanisms that promote the emergence of new virulent strains of *H. vastatrix* are still unknown, and it has been suggested that mutations are the main cause of increased fungal diversity (Varzea and Marques, 2005). However, there is evidence of

La roya amarilla es considerada, a nivel mundial como la principal enfermedad del café, puede ocasionar pérdidas hasta del 40% en la producción (Rivillas *et al.*, 2011). En tal sentido se han planteado dos enfoques para evitar las pérdidas ocasionadas por la enfermedad, la primera consiste en el uso de fungicidas, que es una alternativa muy costosa y potencialmente perjudicial para el ambiente, y la segunda a través, del desarrollo de variedades mejoradas. Sin embargo, esta última requiere del conocimiento de las fuentes de resistencia y de la diversidad del patógeno.

Los mecanismos que promueven el surgimiento de nuevas razas virulentas de *H. vastatrix* aún son desconocidos, y se ha planteado que la principal causa para el incremento de la diversidad del hongo son las mutaciones (Varzea y Marques, 2005); aunque, existe evidencia de un nuevo tipo de reproducción sexual oculto dentro de esporas asexuales (criptosexualidad) que podría explicar el origen de las nuevas variantes (Carvalho *et al.*, 2011). Además, se sabe que la elevada tasa de generación de nuevas razas, que ha despertado la atención de los programas de mejoramiento genético, tiene un efecto sobre la forma de generación de nuevas variedades de café, porque el hongo va adquiriendo capacidad de infectar plantas que originalmente fueron resistentes (Alvarado y Moreno, 2005).

Debido a esta capacidad de rápida adaptación a nuevos cultivares de café se ha llegado a considerar a *H. vastatrix* como un patógeno de alto potencial evolutivo cuyas evidencias de variación vienen siendo estudiadas desde 1930 (Rodrigues *et al.*, 1975), en los cuales se ha reportado la presencia de la raza II en casi todos los casos, por lo tanto, se ha sugerido que este podría ser el posible inóculo inicial a partir del cual se han generado naturalmente todas las nuevas razas del hongo encontradas (Zambolim *et al.*, 2005). Estos estudios iniciales fueron realizados por medio de las lecturas de las

a new type of hidden sexual reproduction within asexual spores (cryptosexuality) that could explain the origin of new races (Carvalho *et al.*, 2011). It is also known that the high rate at which new races develop –an issue that has attracted the interest of genetic improvement programs– has affected the way new coffee varieties are generated, because the fungus develops the ability to infect plants that were originally resistant (Alvarado and Moreno, 2005).

Due to the ability of the fungus to quickly adapt to new coffee cultivars, *H. vastatrix* has been considered a pathogen with high evolutionary potential whose variation has been studied since 1930 (Rodrigues *et al.*, 1975). Studies have reported the presence of race II in almost all cases. For this reason, it has been suggested that race II is likely the initial inoculum from which all the new races found today were naturally produced (Zambolim *et al.*, 2005). These initial studies were conducted through readings of the phenotypic expressions of a series of clones of differentiated coffee trees from the Centro de Invesgação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) in Portugal; by 2005, 45 races of *H. vastatrix* had been identified (Varzea and Marques, 2005). However, since these sets of differentiated coffee trees were not enough to characterize new virulent races of the fungus, new techniques (such as molecular markers) (Nandris *et al.*, 1998) and ITS sequencing of ribosomal DNA (Cristancho *et al.*, 2007) were used to determine their variability. Although it was not possible to identify races by using these molecular techniques, they did allow determining the pathogen's genetic diversity. Furthermore, ITS sequences have been used extensively to perform molecular analyses of the diversity of phytopathogenic fungi, characterize new fungal species and separate very closely related species or races of the same species (Grube and Kroken, 2000). Applying ITS sequences to *H.*

expresiones fenotípicas de una serie de clones de cafetos diferenciales del Centro de Invesgação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) en Portugal, identificando hasta antes de 2005 a 45 razas de *H. vastatrix* (Várzea y Marques, 2005). Sin embargo, estos conjuntos de cafetos diferenciales fueron insuficientes para la caracterización de nuevas razas virulentas del hongo, por lo que, se plantearon nuevas técnicas para determinar su variabilidad, como el uso de marcadores moleculares (Nandris *et al.*, 1998) y la secuenciación de los ITS del ADN ribosomal (Cristancho *et al.*, 2007). Si bien es cierto con estas técnicas moleculares no fue posible la identificación de razas, sin embargo, permitieron determinar la diversidad genética del patógeno. Además, las secuencias ITS han sido muy utilizadas en el análisis molecular de la diversidad de hongos fitopatógenos, así como en la caracterización de nuevas especies de hongos, y en la separación de especies muy cercanas o de razas de una misma especie (Grube y Kroken, 2000). Su aplicación a *H. vastatrix* viene ofreciendo nuevos panoramas sobre su diversidad que puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético. En el Perú, donde pocos estudios fueron realizados con esta finalidad, la generación de este conocimiento es fundamental para el manejo del cultivo y en los programas de mejoramiento genético del café peruano. Por ello en el presente trabajo se analizó la diversidad genética de *H. vastatrix* de dos zonas productoras importantes de café en el Perú mediante secuenciación de la región ITS, las que fueron comparadas con las secuencias reportadas en el GenBank para Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Esporas de *Hemileia vastatrix* fueron colectados en 5 predios de la zona cafetalera de Quillabamba,

*vastatrix* has provided new opportunities to use its diversity in genetic improvement programs. In Peru, where few studies have been conducted for this purpose, developing this knowledge is essential for crop management and for Peruvian coffee genetic improvement programs. For this reason, in this research, we analyzed the genetic diversity of *H. vastatrix* from two major coffee producing areas in Peru using sequences of the ITS region and then comparing them with the sequences reported by the GenBank for Colombia.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

*Hemileia vastatrix* spores were collected in five plots in the Quillabamba coffee producing area (Cusco Region) and in seven plots in the Villa Rica coffee producing area (Pasco Region) (Table 1). These areas are geographically distant and considered to be among the highest coffee-producing regions in Peru (Figure 1).

In each plot, we gathered 25 leaves from coffee trees of the Typica and Caturra varieties that are infected with *H. vastatrix* and extracted spores. To obtain enough DNA concentration, samples from one or two plots were grouped to form a compound sample (Table 1).

### Analysis of genetic diversity in Quillabamba and Villa Rica

#### DNA extraction

DNA was extracted using the protocol described by Cristancho *et al.* (2007) with modifications: uredospores were placed in 1.5 tubes to which 150  $\mu$ L of lysis buffer was added (50 mM of tris HCl pH 7,5; 50 mM of EDTA pH 8,0; 3% of

(Región Cusco) y en 7 predios de la zona cafetalera de Villa Rica (Región Pasco) (Cuadro 1). Estas zonas se encuentran distanciadas geográficamente y están consideradas dentro de las regiones cafetaleras con mayor producción de café en el Perú (Figura 1).

En cada predio se colectaron 25 hojas de cafetos de las variedades “Typica” y “Caturra” infectados con *H. vastatrix*, a las que se les extrajeron las esporas. Con la finalidad de obtener suficiente concentración de ADN, las muestras de uno o dos predios se agruparon en una muestra compuesta (Cuadro 1).

### Análisis de la diversidad genética de Quillabamba y Villa Rica

#### Extracción de ADN

El ADN se extrajo utilizando el protocolo descrito por Cristancho *et al.* (2007) con modificaciones: las

SDS; 1% of b mercaptoethanol); the uredospores were then ground for 30 to 45 minutes using a polypropylene pestle. The quality was determined by electrophoresis in 1% agarose gels stained with GelRed (Biotium®). Finally, DNA concentration was determined by spectrophotometry.

#### PCR and Purification

The ITS region was amplified using PCR and ITS1L and ITS4R universal primers (White *et al.*, 1990); as a reference, we used the protocol described by Cristancho *et al.* (2007). The amplification reaction was performed in a 10 µL volume containing 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of dNTPs, 0.4 µM of each primer, PCR 1X buffer, 1.5 units of Taq DNA polymerase and 40 ng of DNA. The amplification procedure consisted of an initial stage at 95 °C for 5 min, followed by 30 denaturation cycles at 94 °C for 1.5 min, alignment at 60 °C for 1 min and extension at 72°C for 2 min, plus a final

**Cuadro 1. Información georreferenciada de los predios en los que se muestrearon las pústulas de un total de 25 hojas de *Hemileia vastatrix* de las dos zonas cafetaleras del Perú y se indican las claves de las muestras compuestas generadas.**

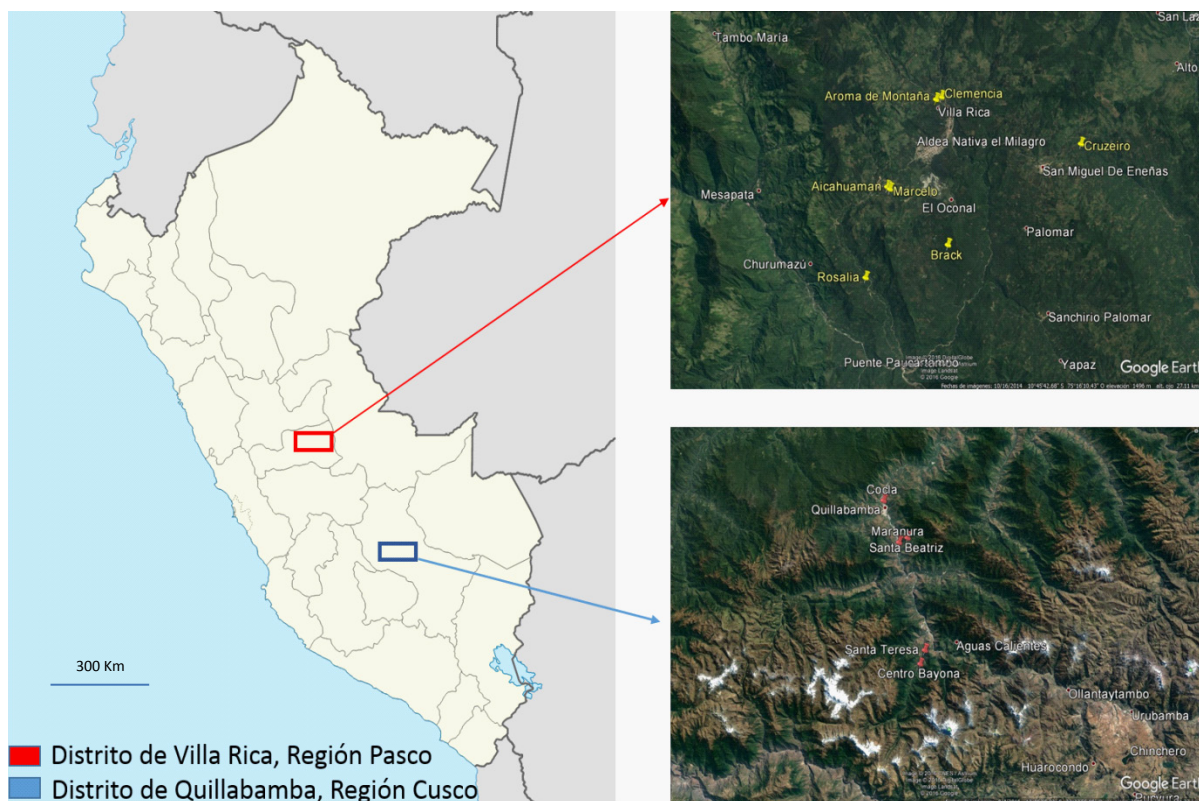
**Table 1. Geographic information of the plots where samples of pustules of 25 leaves of *Hemileia vastatrix* were collected in the two Peruvian coffee production areas; it includes keys of the compounded samples formed.**

Zona Cafetalera	Latitud (S) <sup>x</sup>	Longitud (W) <sup>y</sup>	Predio	Clave de las muestras compuestas	Altitud (msnm)
Quillabamba	12.86021	72.7005	Cocla	HVQ01	1033
	12.95125	72.66411	Maranura	HVQ02	1152
	12.94241	72.64352	Santa Beatriz	HVQ03	1766
	13.18405	72.6043	Santa Teresa	HVQ04	1865
	13.21229	72.61512	Centro Bayona	HVQ05	2076
	10.78518	75.2665	Brack	HVV06	1537
Villa Rica	10.7396	75.19847	Cruzeiro	HVV07	1478
	10.71801	75.2713	Aróma de Montaña	HVV08	1633
	10.79966	75.30816	Rosalía	HVV09	1391
	10.71675	75.2686	Clemencia	HVV10	1549
	10.75821	75.29628	Aicahuaman	HVV11	1750
10.75919	75.295	Marcelo	1776		

<sup>x</sup> S= Sur.

<sup>y</sup> W= Oeste.





**Figura 1.** Localización en el mapa del Perú de los predios donde se colectaron las hojas de café con roya amarilla.  
**Figure 1.** Sites where leaves of coffee infected with yellow rust were collected in Peru.

uredosporas se depositaron en tubos de 1.5 ml, luego se adicionó 150  $\mu$ L de buffer de lisis (50 mM de tris HCl pH 7,5; 50 mM de EDTA pH 8,0; 3% de SDS; 1% de b Mercaptoetanol), posteriormente se trituraron las uredosporas con ayuda de un pistilo de polipropileno durante 30 a 45 minutos. La calidad se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed (Biotium®). Finalmente se determinó la concentración del ADN mediante espectrofotometría.

### PCR y Purificación

Se realizó la amplificación de la región ITS mediante PCR empleando los iniciadores universales ITS1L e ITS4R (White *et al.*, 1990), como

extension at 72°C for 5 min. The amplification products were separated by electrophoresis in 1% agarose gels; a QIAquick gel extraction Kit® was used to purify the DNA fragment of the ITS region.

### Cloning and sequencing

The purified amplified products were cloned in chemocompetent *Escherichia coli* (JM109) using the Pgem T-easy vector system II Kit®, following the protocol recommended by the manufacturer. Then, for each compound sample, 10 white colonies were selected and each was sown in 5 ml of LB medium with 60  $\mu$ g/mL of ampicillin, and then incubated at 37 °C for 24 h. The *E. coli* plasmid containing the DNA fragment

referencia se utilizó el protocolo descrito por Cristancho *et al.* (2007). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 10 µL conteniendo 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada iniciador, Buffer de PCR 1X, 1.5 Unidades de Taq ADN polimerasa y 40 ng de ADN. El programa de amplificación consistió de una etapa inicial a 95 °C por 5 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1.5 min, alineamiento a 60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min; y un paso final de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, la purificación del fragmento de ADN de la Región ITS se realizó utilizando el QIAquick gel extracción Kit®.

### Clonación y Secuenciación

Los productos de amplificación purificados fueron clonados en *Escherichia coli* quimio competente (JM109) utilizando el Pgem T-easy vector system II Kit® según el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, se seleccionaron 10 colonias blancas por cada muestra compuesta para ser sembradas cada una en 5 ml de medio LB con 60 µg/mL de ampicilina, e incubadas a 37 °C por 24 h. La extracción del plásmido de *E. coli* conteniendo el fragmento de ADN de interés, se realizó empleando el protocolo Wizard®Plus SV Minipreps DNA purification system de PROMEGA. La confirmación de la presencia de la secuencia del ADN de la región ITS se realizó mediante digestión con la enzima EcoRI. Los fragmentos fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5%. La secuenciación de los fragmentos clonados fue realizada por la empresa GenBiotek (Argentina).

### Análisis de datos

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y editadas con el programa Codon Code Aligner v

of interest was extracted using the protocol of the Wizard®Plus SV Minipreps DNA purification system from PROMEGA. The presence of the DNA sequence of the ITS region was confirmed through digestion with the EcoRI enzyme. The fragments were visualized in 1.5% agarose gel. The sequencing of the cloned fragments was performed by the GenBiotek company (Argentina).

### Data analysis

The obtained sequences were aligned and edited using the Codon Code Aligner v 2.0.6 program (Codon Code Corporation). As a reference, we used the DNA sequences of the ITS region of *H. vastatrix* stored in the GenBank (Cristancho *et al.*, 2007).

The obtained sequences were aligned using the MAFFT program implemented in the UGENE platform (Golosova *et al.*, 2014). Nucleotide and haplotype diversities (Nei and Li, 1979) were calculated using the DNAsp program version 5 (Librado and Rozas, 2009), and to detect similarities among haplotypes a network was created using the Median Joining algorithm (MJ) implemented in the PopArt program (Bandelt *et al.*, 1999) from which gap sites were excluded.

We also analyzed sequences of the ITS regions of *Hemileia vastatrix* stored in the GenBank, which correspond to *H. vastatrix* from Colombia, and of races II and XXII from CIFC (Cristancho *et al.*, 2007).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Analysis of the genetic diversity in Quillabamba and Villa Rica

From samples of *H. vastatrix* collected in plots in Quillabamba (5 plots) and Villa Rica (7 plots), we

2.0.6 (Codon Code Corporation). Como referencia se utilizaron las secuencias de ADN de la región ITS de *H. vastatrix* almacenadas en el GenBank (Cristancho *et al.*, 2007).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa MAFFT implementado en la plataforma UGENE (Golosova, *et al.*, 2014). La diversidad nucleotídica y la haplotípica (Nei y Li, 1979) se calcularon con el programa DNAsp v 5 (Librado y Rozas, 2009), y para la observación de las semejanzas entre los haplotipos se construyó una red utilizando el algoritmo median Joining (MJ) implementado en el programa PopArt (Bandelt *et al.*, 1999) para el cual se excluyeron los sitios gap.

Adicionalmente se analizaron secuencias de las regiones ITS de *Hemileia vastatrix* almacenadas en el GenBank, que corresponden a *H. vastatrix* de Colombia, y de las razas II y XXII del CIFC (Cristancho *et al.*, 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Análisis de la diversidad genética de Quillabamba y Villa Rica

A partir de las muestras de *H. vastatrix* colectadas en los predios de Quillabamba (5 predios) y de Villa Rica (7 predios) se obtuvieron 106 secuencias de ADN de la región ITS de *Hemileia vastatrix*. Las longitudes de las secuencias se encontraron entre el rango de 910 pb y 918 pb.

Del alineamiento de estas secuencias se obtuvieron 921 sitios alineados, de los cuales 21 resultaron ser *gaps* (inserciones o delecciones). Asimismo, se encontró 101 sitios polimórficos, con 11 posiciones parsimoniosas informativas (Cuadro 2).

Entre las dos zonas cafetaleras se halló un total de 68 haplotipos con una diversidad haplotípica (Hd

obtained 106 DNA sequences of the ITS region of *Hemileia vastatrix*. The length of the sequences ranged between 910 pb and 918 pb.

By aligning these sequences, we obtained 921 aligned sites, of which 21 were *gaps* (insertions or deletions). We also found 101 polymorphic sites with 11 informative parsimonious positions (Table 2).

In the two coffee producing areas, a total of 68 haplotypes was found with haplotype (Hd = 0.953 +/- 0.014) and nucleotide (Pi = de 0.00409 +/- 0.00024) diversity; 62 haplotypes showed unique sequences and 6 haplotypes consisted of more than two sequences (Table 3). Haplotypes Hap\_4, Hap\_8, Hap\_36 and Hap\_21 were found more often and are considered ancestors (Figure 2); they are also distributed across both coffee-producing areas, where they must have arrived at different times and became adapted to each area's environmental conditions. Haplotypes Hap\_4 and Hap\_36 are found more often in Villa Rica, while Hap\_8 and Hap\_21 are found more often in Quillabamba. The distribution of these ancestors in the two areas is explained by the coalescence genetic theory also observed by Santana *et al.* (2007) in populations of the fungus in Brazil.

From the analysis of *H. vastatrix* populations from Quillabamba and Villa Rica, we concluded that the highest genetic diversity is present in the Quillabamba coffee producing area, because of its higher nucleotide and haplotype diversity values (Table 2).

The absence of exclusive nodes by geographic region in the haplotype network in Figure 2 would indicate a large and undifferentiated population of *H. vastatrix* that may have resulted from the flow of spores between the two areas carried by people, seed and/or infected plants. These results are similar to those obtained in Brazil by Cabral *et al.* (2016), who did not observe that *H. vastatrix*



**Cuadro 2. Valores de los parámetros obtenidos sobre las medidas descriptivas de la variabilidad de *Hemileia vastatrix* de las secuencias de la región ITS asociadas a muestras de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y CIFC.**  
**Table 2. Values of parameters obtained from descriptive measures of *Hemileia vastatrix* variability using sequences of the ITS region associated with samples from Quillabamba, Villa Rica, Colombia and CIFC.**

Distritos	Número de secuencias	Número de nucleótidos	Diversidad Nucleotídica (Pi)	Número de Haplotipos (H)	Diversidad de haplotipos (Hd)	Prueba de Tajima (D)	Sitios variables	Sitios variables Singleton	Posiciones informativas parsimoniosas
Quillabamba	49	919	0.00540+/- 0.00038	38	0.977 +/-0.012	-2.35287 P < 0.01	66	57	9
Villa Rica	57	921	0.00293 +/- 0.00026	36	0.934 +/-0.024	-6.09578 P < 0.01	47	42	5
Quillabamba-VillaRica	106	921	0.00409 +/- 0.00024	68	0.953 +/-0.014	-2.66315 P < 0.001	101	90	11
Perú-Colombia-CIFC	121	921	0.00351+/-0.00022	73	0.951 +/-0.013	-2.72541 P < 0.001	103	92	11

CIFC: Centro de Invesgação das Ferrugens do Cafeeiro.

= 0.953 +/- 0.014) y nucleotídica ( $P_i$  = de 0.00409 +/- 0.00024); con 62 haplotipos con secuencias únicas y 6 haplotipos conformados por más de dos secuencias (Cuadro 3). Los haplotipos Hap\_4, Hap\_8, Hap\_36 y Hap\_21, que se encontraron en mayor frecuencia, se podrían considerar como los ancestrales (Figura 2); además, éstos se encuentran distribuidos en ambas zonas cafetaleras, a donde debieron haber llegado en tiempos diferentes adaptándose a las condiciones ambientales de cada zona. Los haplotipos Hap\_4 y Hap\_36 son más frecuentes en Villa Rica; mientras que, Hap\_8 y Hap\_21 son más frecuentes en Quillabamba. Esta distribución de los ancestrales en las dos zonas obedece a la teoría genética de coalescencia observada también por Santana *et al.* (2007) en poblaciones de este hongo en Brasil.

Del análisis de las poblaciones de *H. vastatrix* de Quillabamba y Villa Rica, se ha determinado que la mayor diversidad genética se encuentra en la zona cafetalera de Quillabamba, porque presenta los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica más altos (Cuadro 2).

Al no observarse en la red haplotípica de la Figura 2, nodos exclusivos por región geográfica, se estaría evidenciando una población de *H. vastatrix* grande e indiferenciada, que pudo haberse generado por el flujo de las esporas entre ambas zonas, favorecido por el movimiento de personas, semillas y/o plantas infectadas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Cabral *et al.* (2016) en Brasil, quienes no observan una estructuración de la población de *H. vastatrix* respecto a su origen, hospedero ni razas fisiológicas; sin embargo, la diversidad genética fue relativamente menor a la hallada en el presente trabajo. No obstante, Maia *et al.* (2013) también en Brasil, obtuvieron resultados similares al presente trabajo, a través del estudio de 91 aislados del hongo, proponiendo que *H. vastatrix* se comporta como una gran población

populations were structured based on their origin, host or physiological race. However, the genetic diversity was relatively lower than the diversity found in the present study. However, Maia *et al.* (2013) (also in Brazil) obtained results similar to those of the present study using 91 fungal isolates; they proposed that *H. vastatrix* acts as a large indifferenced population with high genotypic diversity that is not structured based on its geographic origin and host. Therefore, the lack of structure of the two *H. vastatrix* populations by region may be explained by the fact that the fungus is spread over long distances.

Tajima's neutrality test was used for *H. vastatrix* populations from Villa Rica ( $D = -2.50181$ ;  $P < 0.001$ ) and Quillabamba ( $D = -2.35287$ ;  $P < 0.001$ ), and for both areas together ( $D = -2.66315$ ;  $P < 0.001$ ). These values are lower than 0, which indicate that *H. vastatrix* populations are in process of expansion. Also, they may have originated from a few recently introduced genotypes, or may descend from race II, which, according to Scheiber and Zentmyer (1984) exists in Peru since 1979. These Tajima's D test negative values may explain the presence of a high number of unique haplotypes in the haplotype network that are increasing the variability due to accelerated population growth. Therefore, this reflects the status of the *H. vastatrix* population and shows that coffee yellow rust epidemics in Peru, which started in 2013, were initially caused by a few individuals. However, it was not possible to establish the effect of the altitude above sea level on the population, because the Tajima test negative value indicates that there is no evidence of the existence of a selection process. The mechanisms that increase variability and create new *H. vastatrix* races are unknown. Therefore, spontaneous mutations may be the main mechanism responsible for *H. vastatrix* variability, especially in seasons of higher disease incidence.

**Cuadro 3. Distribución regional de frecuencias de haplotipos de *H. vastatrix* generados a partir de las secuencias ITS.**  
**Table 3. Cont'd... Regional distribution of the occurrence of *H. vastatrix* haplotypes obtained from ITS sequences.**

Haplotipos <sup>x</sup>	Frecuencia	Distribución				Secuencias <sup>y</sup>
		Quillabamba	Villa Rica	Colombia	CIFC	
Hap_1	1	1	0	0	0	HVQ_1.1
Hap_2	2	2	0	0	0	HVQ_1.2; HVQ_1.5
Hap_3	1	1	0	0	0	HVQ_1.3
Hap_4	23	7	13	1	2	HVQ_1.4; HVQ_2.4; HVQ_2.10; HVQ_3.3; HVQ_3.5; HVQ_3.10; HVQ_5.9; HVV_6.3; HVV_6.9; HVV_8.5; HVV_9.2; HVV_9.4; HVV_10.2; HVV_10.4; HVV_10.9; HVV_10.8; HVV_11.11; HVV_11.5; HVV_11.6; Race II-1126; HVV_11.9; Race XXII-535; CT_2_N
Hap_5	1	1	0	0	0	HVQ_1.6
Hap_6	1	1	0	0	0	HVQ_1.7
Hap_7	1	1	0	0	0	HVQ_1.8
Hap_8	9	5	4	0	0	HVQ_1.9; HVQ_1.10; HVQ_2.2; HVQ_2.7; HVQ_3.1; HVV_6.6; HVV_8.3; HVV_8.8; HVV_8.10
Hap_9	1	1	0	0	0	HVQ_2.1
Hap_10	1	1	0	0	0	HVQ_2.5
Hap_11	1	1	0	0	0	HVQ_2.6
Hap_12	1	1	0	0	0	HVQ_2.8
Hap_13	1	1	0	0	0	HVQ_2.9
Hap_14	1	1	0	0	0	HVQ_3.2
Hap_15	1	1	0	0	0	HVQ_3.4
Hap_16	1	1	0	0	0	HVQ_3.6
Hap_17	1	1	0	0	0	HVQ_3.7
Hap_18	2	1	0	1	0	HVQ_3.8; VColPa1_2
Hap_19	1	1	0	0	0	HVQ_3.9
Hap_20	1	1	0	0	0	HVQ_4.1
Hap_21	6	2	1	3	0	HVQ_4.6; HVQ_5.6; HVV_9.1; CT_12_v; CTInNa1; CT_7_N
Hap_22	1	1	0	0	0	HVQ_4.10
Hap_23	1	1	0	0	0	HVQ_4.2
Hap_24	1	1	0	0	0	HVQ_4.4
Hap_25	1	1	0	0	0	HVQ_4.5
Hap_26	1	1	0	0	0	HVQ_4.9
Hap_27	1	1	0	0	0	HVQ_4.7
Hap_28	1	1	0	0	0	HVQ_4.3
Hap_29	1	1	0	0	0	HVQ_4.8
Hap_30	1	1	0	0	0	HVQ_5.1
Hap_31	1	1	0	0	0	HVQ_5.2
Hap_32	1	1	0	0	0	HVQ_5.3
Hap_33	1	1	0	0	0	HVQ_5.4
Hap_34	2	1	1	0	0	HVQ_5.5; HVV_11.3
Hap_35	1	1	0	0	0	HVQ_5.7
Hap_36	10	1	7	2	0	HVQ_5.8; HVV_6.2; HVV_8.1; HVV_8.2; HVV_8.4; HVV_8.6; HVV_8.7; HVV_11.8; CTInNa2; CT_13_v
Hap_37	1	1	0	0	0	HVQ_5.10

Cuadro 3. Continuación.

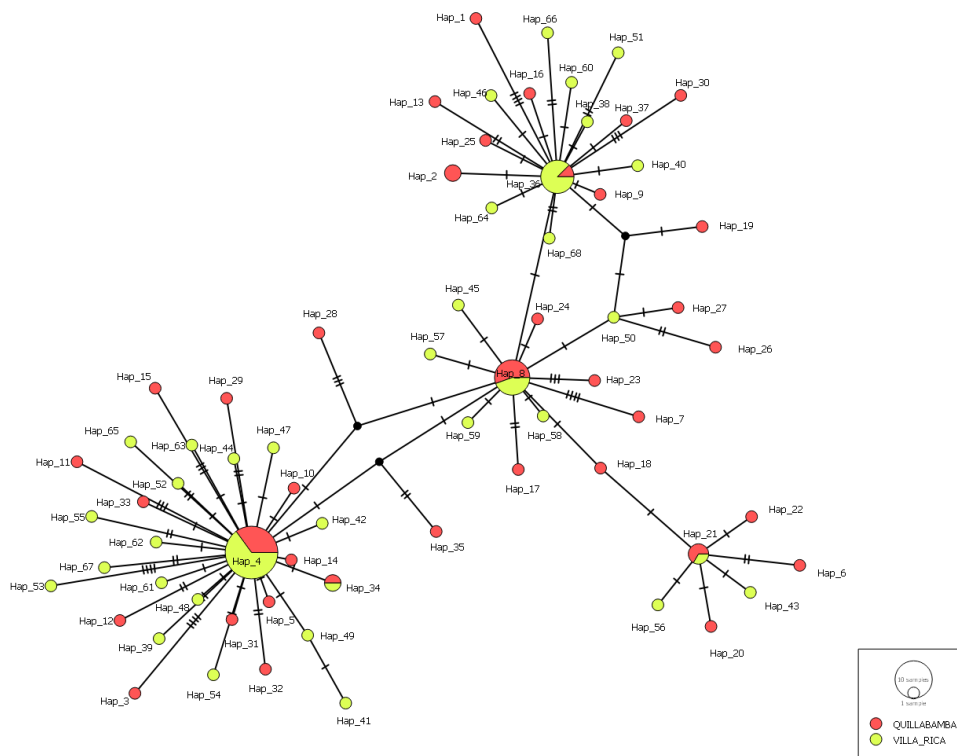
Haplotipos <sup>x</sup>	Frecuencia	Distribución			CIFC	Secuencias <sup>y</sup>
		Quillabamba	Villa Rica	Colombia		
Hap_38	1	0	1	0	0	HVV_6.1
Hap_39	1	0	1	0	0	HVV_6.4
Hap_40	1	0	1	0	0	HVV_6.5
Hap_41	1	0	1	0	0	HVV_6.7
Hap_42	1	0	1	0	0	HVV_6.8
Hap_43	1	0	1	0	0	HVV_6.10
Hap_44	1	0	1	0	0	HVV_7.1
Hap_45	1	0	1	0	0	HVV_7.2
Hap_46	1	0	1	0	0	HVV_7.3
Hap_47	1	0	1	0	0	HVV_7.4
Hap_48	1	0	1	0	0	HVV_7.5
Hap_49	1	0	1	0	0	HVV_7.6
Hap_50	1	0	1	0	0	HVV_7.7
Hap_51	1	0	1	0	0	HVV_7.9
[Hap_52	1	0	1	0	0	HVV_7.10
Hap_53	1	0	1	0	0	HVV_9.5
Hap_54	1	0	1	0	0	HVV_9.6
Hap_55	1	0	1	0	0	HVV_9.7
Hap_56	1	0	1	0	0	HVV_9.9
Hap_57	1	0	1	0	0	HVV_9.10
Hap_58	1	0	1	0	0	HVV_10.1
Hap_59	1	0	1	0	0	HVV_10.5
Hap_60	1	0	1	0	0	HVV_10.6
Hap_61	1	0	1	0	0	HVV_10.10
Hap_62	1	0	1	0	0	HVV_10.7
Hap_63	1	0	1	0	0	HVV_10.3
Hap_64	1	0	1	0	0	HVV_11.10
Hap_65	1	0	1	0	0	HVV_11.1
Hap_66	1	0	1	0	0	HVV_11.2
Hap_67	1	0	1	0	0	HVV_11.4
Hap_68	1	0	1	0	0	HVV_11.7
Hap_69	1	0	0	1	0	CTSol_1
Hap_70	2	0	0	1	1	CTInNa3; RaceXXII-637
Hap_71	1	0	0	1	0	CT_18_N
Hap_72	1	0	0	1	0	CT_28_v
Hap_73	1	0	0	1	0	CT-9-8

<sup>x</sup> Hap: Haplotipo / Hap: Haplotype.

<sup>y</sup> HVQ: *Hemileia vastatrix* de Quillabamba; HVV: *Hemileia vastatrix* de Villa Rica; CT: Muestras de roya amarilla de Colombia; Race XXII y Race II: Muestras que corresponden al CIFC / HVQ: *Hemileia vastatrix* from Quillabamba; HVV: *Hemileia vastatrix* from Villa Rica; CT: Samples of yellow rust from Colombia; Race XXII and Race II: Samples corresponding to CIFC.

indiferenciada con una alta diversidad genotípica, y de igual forma, sin estructuración con respecto a su origen geográfico y de hospedero. Por lo tanto, la falta de estructuración de las dos poblaciones de

Another reason could be the selection pressure exerted by the environment. In this regard, Varzea and Marques (2005) believe that in Brazil the presence of resistance genes in some varieties of



**Figura 2.** Red haplotípica con el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 68 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos perdidos o no muestreados están representados por nodos de color negro.

**Figure 2.** Haplotype network created using the Median Joinig method for 68 haplotypes detected for the ITS region of *Hemileia vastatrix* from Quillabamba and Villa Rica coffee production areas. Circles represent a unique haplotype; the size of the circles is proportional to the number of sequences of a haplotype; transverse lines represent the events of simple mutations, and black nodes lost or non-sampled haplotypes.

*H. vastatrix* por regiones podría explicarse por la dispersión del hongo a grandes distancias.

La prueba de neutralidad de Tajima se realizó para las poblaciones de *H. vastatrix* de Villa Rica ( $D=-2.50181$ ;  $P<0.001$ ), Quillabamba ( $D=-2.35287$ ;  $P<0.001$ ), así como, de ambas zonas juntas ( $D=-2.66315$ ;  $P<0.001$ ). Estos valores menores a 0 indican que las poblaciones del hongo se encuentran en proceso de expansión. Además, éstas se habrían originado a partir de pocos genotipos que fueron introducidos recientemente, o serían los descendientes de la raza II, la cual, según Scheiber

the host species increases the number of virulent mutants in the population. Another factor that could explain the frequent and rapid emergence of new variants is cryptosexuality (Carvalho *et al.*, 2011), which may have an important role in creating *H. vastatrix* genetic variability.

### Comparing *H. vastatrix* haplotypes from Peru to haplotypes from Colombia

In the analysis of the ITS sequences of Peruvian *H. vastatrix* populations, we included 15 DNA



y Zentmyer (1984), existe desde el año 1979 en el Perú. También, estos valores negativos de  $D$  de Tajima explicarían la presencia en la red haplotípica de un elevado número de haplotipos únicos que vienen incrementando la variabilidad, y que es el resultado de un crecimiento acelerado de la población. Por lo tanto, se refleja el estado de la población de *H. vastatrix* y se estaría demostrando que el origen de la epidemia de roya amarilla del café en el Perú que se inició en el año 2013 fue a partir de pocos individuos. Sin embargo, no se ha podido establecer un efecto de la altitud sobre el nivel del mar en la población, puesto que el valor negativo de la prueba de Tajima indicaría que aún no es evidente la existencia de un proceso selección.

Los mecanismos que conducen al incremento de la variabilidad y la creación de nuevas razas de *H. vastatrix* no se conocen. Por lo tanto, se podría considerar a las mutaciones espontáneas como el principal mecanismo responsable de la creación de variabilidad en el hongo, principalmente en las épocas de mayor incidencia de la enfermedad. Además, se debe sumar la presión de selección ejercida por el medio ambiente; al respecto, en Brasil, Varzea y Marques (2005) consideran que la presencia de genes de resistencia de algunas variedades en el hospedero, incrementan el número de mutantes virulentos en la población. Otro factor que podría explicar el surgimiento frecuente y rápido de nuevas variantes es la criptosexualidad (Carvalho *et al.*, 2011), la cual podría estar jugando un papel importante en la generación de variabilidad genética de *H. vastatrix*.

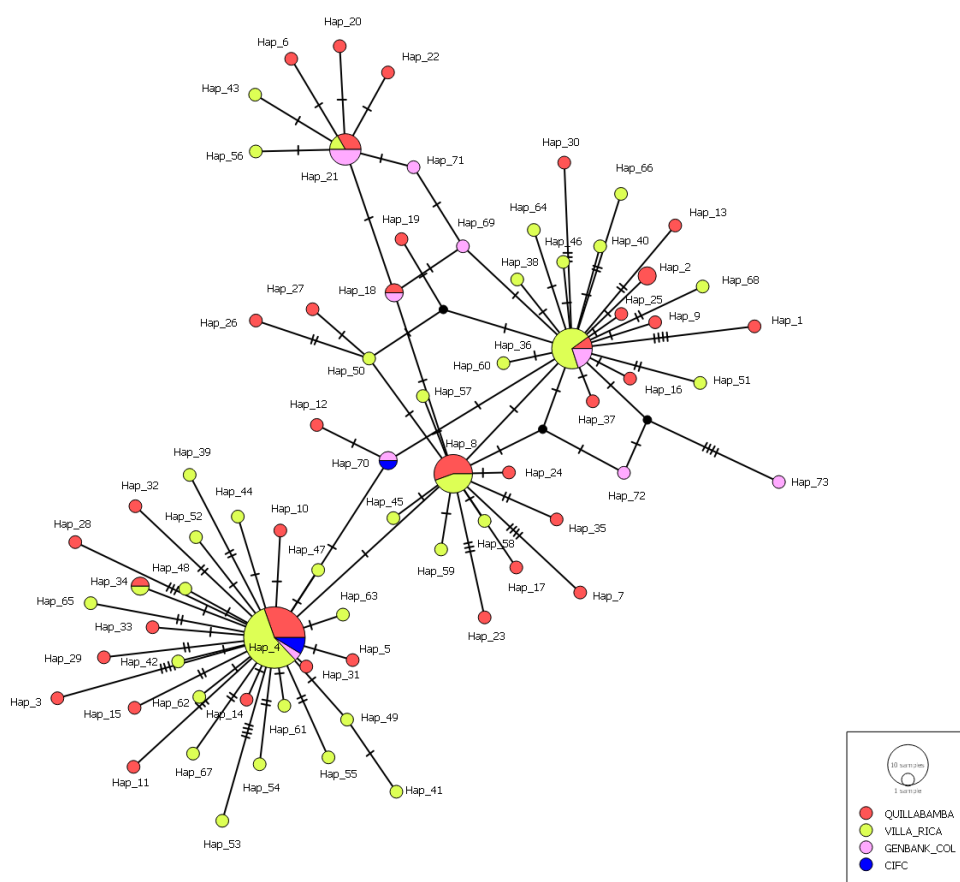
### **Comparación de haplotipos de *H. vastatrix* del Perú con los de Colombia.**

Al análisis de las secuencias ITS de las poblaciones de *H. vastatrix* peruanas se incluyeron 15 secuencias de ADN de la región ITS del hongo que

sequences from the ITS region of the fungus that are stored in the GenBank; of these, 12 sequences correspond to *H. vastatrix* from Colombia, and 3 from CIFC. The latter are race II and XXII haplotypes (Figure 3). The analysis found a total of 73 haplotypes, 65 of which were unique (they had no replications). Also, it was confirmed that haplotype Hap\_4 contains the races II and XXII. It is frequently present and distributed across all the studied areas (7 sequences from Quillabamba, 13 from Villa Rica, 1 from Colombia and 2 from CIFC). Therefore, we may assume that the other haplotypes emerged from this ancestral haplotype, which confirms the findings of Zambolim *et al.* (2005) in Brazil, who suggested that the other races emerged from race II, which prevails in Latin America (Cristancho *et al.*, 2007). It was also observed that haplotypes Hap\_36 and Hap\_21, which are present in Colombia, Villa Rica and Quillabamba, are nodes that appeared later. Haplotype Hap\_8 is present only in Quillabamba and Villa Rica; after being introduced or emerging in Peru, this haplotype was able to better adapt to the environmental conditions of Peru's coffee producing areas. Based on what we observed in the main nodes (in which the presence of *H. vastatrix* sequences from Colombia and Peru is repetitive), it may be that in Peru and Colombia the disease emerged in the same area four years apart (Scheiber and Zentmyer, 1984; Buriticá, 2010). No nodes by origin of provenance were observed in the network, which would indicate that *H. vastatrix* sequences from Colombia are similar to the sequences from Peru. Studies conducted in early 1970 indicate that the wind has an important role in spreading the disease. Martines *et al.* (1975) found uredospores with good germination viability at an altitude of more than 1000 m; it has also been suggested that the introduction and rapid spread of the fungus in South America was caused by the wind (Bowden *et al.*, 1971). Other disease

se encuentran almacenadas en el GenBank, de las cuales 12 corresponden a *H. vastatrix* colombianas y 3 a las del CIFIC, estas últimas son haplotipos de la raza II y XXII (Figura 3). En dicho análisis se hallaron un total de 73 haplotipos, de los cuales 65 fueron únicos (no presentaron repeticiones). Además, se evidenció que el haplotipo Hap\_4 contiene a la raza II y XXII; se encuentra en mayor frecuencia y está distribuida en todas las zonas estudiadas

spreading means have also been mentioned, for example, the disease was introduced into Brazil through plants from Africa carried by people (migrant workers) and seed (Schieber, 1972). Therefore, anthropogenic causes may have had a very important role in bringing the fungus to Peru. Based on the analysis of *H. vastatrix* populations from the studied regions, three hypotheses about the origin of the 2013 yellow rust epidemic in Peru



**Figura 3.** Red haplotípica por el método de unión por la mediana (Median-Joinig) de 73 haplotipos detectados para la región ITS de *Hemileia vastatrix* de Quillabamba, Villa Rica, Colombia y del CIFIC. Los círculos representan un único haplotipo, el tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias que posee un haplotipo, eventos de mutaciones simples están indicados por líneas transversales y los haplotipos no muestreados están representados por nodos de color negro.

**Figure 3.** Haplotype network created using the Median Joinig method of 73 haplotypes detected for the ITS region of *Hemileia vastatrix* from Quillabamba, Villa Rica, Colombia and CIFIC. Circles represent a unique haplotype; the size of the circles is proportional to the number of sequences of a haplotype; transverse lines represent the events of simple mutations, and black nodes lost or non-sampled haplotypes.

(7 secuencias de Quillabamba, 13 de Villa Rica, 1 de Colombia y 2 de CIFC). Por lo tanto, a partir de este haplotipo ancestral, se podría suponer, que surgieron los demás, corroborando lo planteado por Zambolim *et al.* (2005) en Brasil, quien sugiere que a partir de la raza II surgieron las demás razas; y es la predominante en América Latina (Cristancho *et al.*, 2007). Así mismo, se observa que los haplotipos Hap\_36 y Hap\_21 presentes en Colombia, Villa Rica y Quillabamba, son nodos que aparecieron en momentos posteriores. Además, el haplotipo Hap\_8 se encuentra presente solamente en Quillabamba y Villa Rica, el cual luego de ingresar o surgir en el Perú se pudo adaptar mejor a las condiciones ambientales de las zonas cafetaleras peruanas. De acuerdo a lo observado en los principales nodos, en los cuales es reiterativa la presencia de secuencias de *H. vastatrix* colombianas y peruanas, se podría sugerir que en el Perú y Colombia la enfermedad pudo provenir de la misma zona llegando con cuatro años de diferencia (Scheiber y Zentmyer, 1984; Buriticá, 2010). Además, en la red no se observan nodos por origen de procedencia, lo que estaría indicando que las secuencias de *H. vastatrix* colombianas son similares a las secuencias de las peruanas. Existen reportes de estudios que se realizaron a inicios de 1970, que le atribuyen al viento un rol muy importante en la diseminación de la enfermedad. Martines *et al.* (1975) comprobaron la presencia de uredosporas a más de 1000 m de altura con una buena viabilidad de germinación, asimismo la dispersión por el viento fue sugerida como la causa de introducción y rápida diseminación del hongo a Sudamérica (Bowden *et al.*, 1971); también se mencionan otros medios de dispersión de la enfermedad, por ejemplo la introducción de la enfermedad a Brasil a través de plantas procedentes de África, por personas (trabajadores migrantes) y por semillas (Schieber, 1972), por lo tanto, la dispersión antropogénica pudo tener un rol

may be proposed. The first hypothesis assumes that a new *H. vastatrix* race derived from Race II was introduced in Peru and quickly adapted to the environmental conditions of coffee producing areas at altitudes higher than 1000 masl. Also, because the main ancestral haplotypes were found more frequently in Villa Rica, they must have arrived earlier in this area than in Quillabamba. However, in the haplotype network there is more than one main node that is considered ancestral (Hap\_4, Hap\_8, Hap\_21 and Hap\_36). The four haplotypes must have arrived in Peru progressively and in a short time. Haplotype Hap\_4, that corresponds to race II, is more frequently present in both coffee producing areas and includes a CT\_2N sequence from Colombia in its background.

The second hypothesis states that the *H. vastatrix* population evolved from race II and that a variant emerged that is able to infect high-altitude coffee trees. However, based on what we observed in the haplotype network (Figure 3), at least four variants corresponding to the ancestral haplotypes must have developed in high altitude. However, two of those sequences of both Colombia and Peru (Hap\_4 and Hap\_36) may have been introduced to Colombia from Peru, but this is very unlikely because the movement of all plant materials is under government control (Cristancho *et al.*, 2007).

The third hypothesis states that changes in weather conditions may have favored the fungus to reproduce and spread toward areas above 1000 masl. This hypothesis is supported by what is observed in the haplotype network (Figure 3), in which 4 nodes are formed that correspond to the ancestral haplotypes (Hap\_4, Hap\_8, Hap\_21 and Hap\_36) which may have existed years ago, because they are present in both coffee producing areas of Peru, and are spreading. Also, the most frequently found haplotype is Hap\_4, which corresponds to race II and has been present in Peru

muy importante en la llegada del hongo al Perú.

Basados en el análisis de poblaciones del hongo de las regiones estudiadas, se podrían generar tres hipótesis acerca del origen de la epidemia de roya amarilla del café surgida en el año 2013 en el Perú. La primera postularía que existió la introducción de una nueva raza de *H. vastatrix* al Perú, la cual provino de la Raza II, y debió adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales de las zonas cafetaleras, que se encuentran en altitudes superiores a los 1000 msnm. Además, por la mayor frecuencia observada de los principales haplotipos ancestrales en Villa Rica debió llegar antes a esta zona que a Quillabamba; sin embargo, en la red haplotípica existen más de un nodo principal considerados como ancestrales (Hap\_4, Hap\_8, Hap\_21 y Hap\_36). Estos cuatro haplotipos debieron llegar de una manera progresiva y en un corto periodo de tiempo al Perú. Así mismo, el haplotipo Hap\_4 que corresponde a la raza II, está en mayor frecuencia en ambas zonas cafetaleras e incluyen en su conformación a la secuencia CT\_2N colombiana.

La segunda hipótesis postularía que hubo una evolución de la población de *H. vastatrix* a partir de la raza II, generándose una variante capaz de infectar a los cafetos de altura; sin embargo, de acuerdo a lo observado en la red haplotípica (Figura 3), debieron formarse de manera casi simultánea al menos 4 variantes las que corresponden a los haplotipos ancestrales; no obstante, en dos de ellos (Hap\_4 y Hap\_36) se encuentran secuencias tanto de Colombia como de Perú, las cuales debieron generarse simultáneamente en ambos países o de lo contrario pudieron haber sido introducidos desde el Perú, lo cual es una posibilidad poco probable considerando que existen controles sobre el movimiento de todo material vegetal (Cristancho *et al.*, 2007).

La tercera hipótesis, apunta a los cambios en las condiciones climáticas que habrían favorecido la

since 1979. This hypothesis is similar to the one proposed by Cristancho *et al.* (2012) in Colombia as the origin of the coffee epidemic in 2008 that affected Colombian coffee producing areas above 1400 masl.

## CONCLUSIONS

By analyzing *Hemileia vastatrix* genetic diversity using ITS region sequences, we concluded that the haplotypic diversity values for Quillabamba and Villa Rica in Peru were high (0.934 +/- 0.024 and 0.977 +/- 0.012, respectively). However, the nucleotide diversity was low (0.00293 +/- 0.00026 and 0.00540 +/- 0.00038, respectively). However, the highest *H. vastatrix* diversity was found in the Quillabamba coffee producing area. In both studied areas, a large non-differentiated population was found by area of provenance, and their haplotypes are similar to those from Colombia. The sequences of races II and XXII stored in the GenBank that correspond to haplotype Hap\_4 are present both in Quillabamba and Villa Rica. Also, three hypotheses are proposed to explain the increase of rust intensity in Peru.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the students and partners of the Molecular Biology Laboratory of the Instituto de Biotecnología-UNALM and to the coffee growers of Villa Rica and Quillabamba for providing the biological materials. This research was funded by the FONDECYT 149-2013 project.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

reproducción del hongo y su expansión hacia las zonas por encima de los 1000 msnm. Esta hipótesis se sustenta con lo observado en la red haplotípica (Figura 3), en la cual, se han formado 4 nodos correspondientes a los haplotipos ancestrales (Hap\_4, Hap\_8, Hap\_21 y Hap\_36), posiblemente existentes desde hace años atrás, porque se encuentran en ambas zonas cafetaleras peruanas y están en proceso de expansión. Además, el haplotipo de mayor frecuencia es Hap\_4 que corresponde a la raza II, la cual existe desde el año 1979 en el Perú. Esta hipótesis, es similar a la que propusieron, Cristancho *et al.* (2012) en Colombia para el origen de la epidemia de roya del café ocurrido en el año 2008 y que afectó los cafetos colombianos sobre los 1400 msnm.

## CONCLUSIONES

Mediante el análisis de la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* a través de la secuenciación de la región ITS, se determinó que los valores de diversidad haplotípica para las zonas cafetaleras de Quillabamba y Villa Rica del Perú fueron altos (0.934 +/- 0.024 y 0.977 +/- 0.012 respectivamente); no obstante, la diversidad nucleotídica fue baja (0.00293 +/- 0.00026 y 0.00540 +/- 0.00038, respectivamente). Sin embargo, la mayor diversidad de *H. vastatrix* se encuentra en la zona cafetalera de Quillabamba. Entre las dos zonas evaluadas se ha encontrado una población grande no diferenciada por zona de procedencia, y sus haplotipos son similares a los de Colombia. Las secuencias de las razas II y XXII almacenadas en el GenBank que corresponden al haplotipo Hap\_4, se encuentran tanto en Quillabamba como en Villa Rica. Además, se proponen tres hipótesis para explicar el incremento de la intensidad de la roya en el Perú.

## AGRADECIMIENTOS

A los alumnos y colaboradores del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología - UNALM. A los caficultores de las zonas de Villa Rica y Quillabamba por las facilidades del material biológico. El trabajo de investigación fue financiado por el proyecto FONDECYT 149 - 2013.

## LITERATURA CITADA

- Alvarado-Alvarado G and Moreno-Ruiz G. 2005. Cambio de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de Caturra x Híbrido de Timor. *Cenicafé* 56:110–126. <http://biblioteca.cenicafé.org/handle/10778/185>
- Bandelt H, Forster P and Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1):37–48. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/16/1/37.full.pdf+html>
- Berkeley MJ. 1869. [Untitled]. *Gardener's Chronicle* 45: 1157.
- Bowden J, Gregory PH and Johnson CG. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature* 224:500–501. <https://doi.org/10.1038/229500b0>
- Buriticá CP. 2010. La Roya del Cafeto en Colombia: Realizaciones de Impacto Nacional e Internacional en el Siglo XX. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(1): 5285-5292. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179914617007>
- Cabral PGC, Maciel-Zambolim E, Oliveira SAS, Caixeta ET and Zambolim L. 2016. Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea spp.* *Plant Pathology* 65:196–204. <https://doi.org/10.1111/ppa.12411>
- Carvalho CR, Fernandes RC, Carvalho GMA, Barreto RW and Evans HC. 2011. Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *Plos one* 6(11): 6(11):1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026387>
- Cristancho AM, Escobar OC and Ocampo JD. 2007. Evolución de razas de *H. vastatrix* en Colombia. *Cenicafé* 58(4): 340-359. <http://biblioteca.cenicafé.org/bitstream/10778/178/1/arc058%2804%29340-359.pdf>
- Cristancho MA, Roza Y, Escobar C, Rivillas CA and Gaitán AL. 2012. Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. *New Disease Reports*, 25, 19. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.025.019>
- Goloseva O, Henderson R, Vaskin Y, Gabrielian A, Grekhov G, Nagarajan V, Oler AJ, Quiñones M, Hurt D, Fursov M and Huyen Y. 2014. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and CHIP-seq data analyses. *PeerJ* 2: 1-15. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.644>
- Grube M and Kroken S. 2000. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized



- fungi. *Mycological Research* 104: 1284–1294. <https://doi.org/10.1017/s0953756200003476>
- INEI, Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2014. Compendio estadístico del Perú. [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1173/cap12/cap12.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1173/cap12/cap12.pdf)
- JNC, Junta Nacional del Café. 2014. Plan Nacional de Renovación de cafetales. <http://juntadelcafe.org.pe/publicaciones/documento-plan-nacional-de-renovacion-de-cafetales>
- Librado P and Rozas J. 2009. DnaSP v. 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452. <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/53352/1/568571.pdf>
- Maia TA, Maciel-Zambolim E, Caixeta ET, Mizubuti ESG and Zambolim L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology* 42 (5): 533-542. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-013-0213-3>
- Martínez JA, Palazzo DA, Karazawa M, Monteiro MVM e Reu NRN. 1975. Presença de esporos de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. agente causal de ferrugem do cafeeiro, em diferentes altitudes nas principais areas cafeeiras dos estados de Sao Paulo e Parana, Brasil. *O Biológico* 41(3): 77-88.
- MINAGRI, Ministerio de Agricultura y Riego. 2015. Síntesis agroeconómica del café. <http://repositorio.minagri.gob.pe/handle/MINAGRI/51>
- Nandris D, Kohler F, Fernandez D, Lashermes P, Rodrigues Jr. CJ and Pellegrini PF. 1998. Coffee pathosystems modelling: 2. Assessment pathogen biodiversities. In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland. Abstract 2.2.119.
- Nei M and Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10):5269-5273. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Rivillas CA, Serna CA, Cristancho MA and Gaitán A. 2011. La roya del cafeto en Colombia: Impacto, Manejo y Costos de Control. *Cenicafé* 36:1-51. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/594/1/036.pdf>
- Rodriguez CJ Jr, Bettencourt AJ and Rijo L. 1975. Races of pathogen and resistance to coffee rust. *Ann Rev Phytopathology* 13:49-70. <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.py.13.090175.000405>
- Santana MF, Zambolim EM, Oliveira LO, Caixeta ET e Zambolim L. 2007. Análise molecular do rDNA de *Hemileia vastatrix*. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5, Águas de Lindóia, SP. Anais. Brasília, DF: Embrapa Café. file:///C:/Users/Cliente%205/Downloads/Analise-molecular.pdf
- Schieber E. 1972. Economic impact of coffee rust in Latin America. *Annual Review of Phytopathology* 10:491-510. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.002423>
- Schieber E and Zentmyer GA. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 68(2):89-93. [https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n02\\_89.pdf](https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n02_89.pdf)
- Varzea V and Marques DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs Coffee durable resistance. In Zambolim L Zambolim E Várzea VMP Eds Durable resistance to coffee leaf rust. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa Brasil. 53-74p.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Inoculum* 64(1):1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zambolim L, Zambolim EM e Várzea VMP. 2005. Durable resistance to coffee leaf rust. Universidade Federal de Viçosa, Vicoso Brasil. 450p.