

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL GERMOPLASMA DE *Coffea liberica* BULL EX HIERN EN COLOMBIA

Ifigenia Hurtado*; Juan Carlos Herrera Pinilla*

HURTADO, I.; HERRERA P. J. C. Estudio de la diversidad morfológica y molecular del germoplasma de *Coffea liberica* bull ex hiern en Colombia. Revista Cenicafé 64 (2): 31-47. 2013

El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad genética tanto intra- como inter-poblacional entre las diferentes accesiones de *Coffea liberica* que hacen parte de la Colección Colombiana de Café (CCC) de Cenicafé, mediante el uso de descriptores morfológicos y marcadores moleculares. Se evaluaron 56 accesiones pertenecientes a seis poblaciones, usando 17 descriptores cuantitativos, cuatro índices morfológicos y seis descriptores cualitativos específicos para café. Paralelamente se determinó el polimorfismo molecular generado por 40 marcadores iPBS (*inter-primer binding site*). Más de la mitad de los descriptores morfológicos mostraron diferencias significativas entre las accesiones, pero solo aquellas relacionadas con el tamaño del fruto fueron discriminantes entre las poblaciones de Libéricas y Excelsas. Los marcadores iPBS generaron un promedio de 13,8 bandas por locus, con un máximo de 24. Aunque solo el 32,5% de los marcadores resultaron polimórficos, éstos se revelaron altamente variables con una frecuencia de loci polimórficos de 78,6% en Libéricas y de 71,4% en Excelsas, mientras que los porcentajes de heterocigocidad alcanzaron valores de 0,288 y 0,286, respectivamente. La mayor parte de la varianza genética observada (99%) se explicó por el polimorfismo entre accesiones, en detrimento del polimorfismo entre poblaciones. La elevada variabilidad intra-poblacional revelada en *C. liberica*, se constituye en una fuente importante de genes para la especie cultivada *C. arabica*, la cual puede ser explotada a través de puentes genéticos por la vía del retrocruzamiento. Este es el primer estudio exhaustivo sobre la diversidad del germoplasma de una especie diploide en Colombia.

Palabras clave: Hibridación interespecífica, Especies diploides, Colección de germoplasma, Polimorfismo molecular, Heterocigosis.

STUDY ON THE MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DIVERSITY OF *Coffea liberica* BULL EX HIERN GERMOPLASM IN COLOMBIA

Genetic variation in species related to *Coffea arabica* L. represents the main source of genes for the cultivated arabica coffee. Therefore characterization and evaluation of germplasm collections seeking traits with agronomic interest remain a priority for almost all breeding programs around the world. The aim of this study was to evaluate the intra- and inter-population variability of the different accessions of the *C. liberica* species present in the coffee germplasm collection of Cenicafé, using both morphological descriptors and molecular markers. A total of 56 accessions from 6 different *C. liberica* populations were evaluated through 17 quantitative and 6 qualitative coffee descriptors, as well as 4 morphological indexes. Similarly, molecular polymorphism was investigated using 40 inter-primer binding site (iPBS) markers. Although most of the morphological descriptors exhibited differences among accessions, only those related to the fruit size allow us to differentiate among the two main taxonomic groups: *Libericas* and *Excelsas* (i.e. *Dewevrei*). The 32.5% of the iPBS markers were polymorphic and unexpectedly variable, exhibiting 13.8 bands per locus, with a maximum of 24. The number of polymorphic loci varied from 78.6 in *Libericas* to 71.4 in *Excelsas*, while the percentages of heterozygosity attained 0.288 and 0.286, respectively. Most of the observed variance (99%) was due to intrinsic genetic variation among accessions rather than among populations. The elevated intra-population variability revealed here could be exploited by generating genetic bridges to the cultivated *C. arabica* throughout a backcross strategy. This study represents the first comprehensive description of the germplasm diversity of one diploid coffee species in Colombia.

Keywords: Interspecific hybridization, Diploid species, Germplasm collection, Molecular polymorphism, Heterozygosis.

* Investigador Asociado (hasta septiembre de 2012) e Investigador Científico III, respectivamente, Disciplina de Mejoramiento Genético, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas Colombia.

La elevada susceptibilidad a plagas y enfermedades que caracteriza a la especie cultivada *Coffea arabica* es una consecuencia de la estrecha base genética que posee la especie. La búsqueda de variabilidad genética útil, con propósitos de mejoramiento, solo es posible si se cuenta con una colección de germoplasma caracterizada, que permita identificar y posteriormente transferir los caracteres de interés agronómico a los nuevos genotipos mejorados.

En el continente americano, el género *Coffea* está representado en tres colecciones de germoplasma importantes (4). La primera se encuentra en Brasil y es mantenida por el Instituto Agronómico de Campinas, IAC; la segunda está en Costa Rica, en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE; y la tercera se localiza en Colombia, y está a cargo del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

La Colección Colombiana de Café (CCC) de Cenicafé fue creada en 1940, y está representada por más de 1.000 accesiones o entradas, de las cuales el 87% (956) pertenecen a la especie *Coffea arabica*. El porcentaje restante incluye nueve especies diploides, siendo la especie *C. canephora* la que se encuentra mejor representada, con 98 accesiones (8,8%), seguida de la especie *C. liberica* con 19 (1,7%). Adicionalmente se tienen 18 híbridos interespecíficos introducidos, de origen tanto natural como artificial, que completan el grupo de materiales disponibles (31). Si bien esta colección ha sido objeto de varios estudios, solo el germoplasma silvestre de *C. arabica*, representado por introducciones de Etiopía, ha sido evaluado intensivamente, debido al interés particular que éste tiene para el mejoramiento de las variedades cultivadas (11, 12, 15, 27, 28, 32). Dentro de la limitada muestra de especies diploides relacionadas con *C. arabica*, solo *C.*

canephora ha sido utilizada para el desarrollo de nuevas líneas mejoradas, sea a través de los híbridos triploides (37) o por duplicación previa del parental diploide (10). En Cenicafé se ha beneficiado la primera estrategia. Es así como a partir de la década de 1970 se empezó a trabajar en el desarrollo de un número importante de híbridos triploides, los cuales luego de uno o dos retrocruzamientos dieron origen a progenies avanzadas con excelentes características agronómicas. Producto de este trabajo, actualmente se tiene un número importante de líneas que ofrecen elevada resistencia a enfermedades como la roya del cafeto (*Hemileia vastarix*) o la llaga macana (*Ceratocystis* sp.), excelente producción y muy buena calidad en taza (2, 13, 14, 36).

Aunque menos conocida que *C. canephora*, la especie *C. liberica* constituye otra fuente de mucha importancia para el mejoramiento de *C. arabica*. Si bien existen reportes de sus características generales, su poca utilización en los programas de mejoramiento se explica en buena parte por el desconocimiento y poca representatividad que existe de esta especie en las colecciones internacionales. Esta especie fue descrita originalmente en 1876, usando como tipo una planta proveniente de Sierra Leona (África Occidental). Aunque sus frutos producen un café de aceptable calidad, su importancia comercial está restringida a mercados muy locales, de unos pocos países Africanos, en donde tuvo un auge relativamente importante entre 1930 y 1950 (4).

Al igual que *C. canephora*, *C. liberica* pertenece al grupo de especies de la sección Guineo-Congolesa, cuya distribución geográfica comprende una amplia región de África Central y Occidental (6, 18, 30). Desde el punto de vista altitudinal, *C. liberica* se distribuye desde los 80 hasta los 1.800 m, preferiblemente en zonas de bosques

húmedos (5). Su apariencia es particularmente variable, encontrándose arbustos de 5 m hasta grandes árboles que pueden llegar a los 15 m de altura. Sus hojas son grandes y muy coriáceas, llegando a medir hasta 35 cm de longitud. Los frutos son gruesos, de coloraciones rojas muy variadas, generalmente dispuestos en grupos de hasta 15 cerezas por verticilo (16).

Diferentes estudios han encontrado elevados contenidos de ácidos clorogénicos en *C. liberica*, las cuales desempeñan un papel importante en la producción de aromas en la bebida (3). Además, se sabe que posee resistencia genética contra la roya, tolerancia elevada al ataque de nematodos y buena resistencia a las bajas temperaturas (5). Recientemente se ha encontrado que las semillas de *C. liberica* poseen un mecanismo de antibiosis que parece estar limitando la oviposición de la broca, *Hypothenemus hampei* Ferrari (20, 42), la mayor plaga conocida de este cultivo en el mundo.

Conscientes de la importancia potencial de *C. liberica* para el mejoramiento de la especie cultivada *C. arabica*, el presente estudio tuvo como objetivos: (i) Determinar la variabilidad morfológica y molecular existente entre las diferentes accesiones de esta especie contenidas en la colección de germoplasma de Cenicafé; e (ii) Identificar y caracterizar las relaciones genéticas que existen entre los principales grupos o poblaciones representados en ella.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Los individuos de *C. liberica* que hacen parte de la CCC, se encuentran sembrados en la Estación Central Naranjal (municipio de Chinchiná, Caldas). De acuerdo con los registros de la Colección, se trata de árboles adultos,

pertenecientes a 19 accesiones, representadas cada una por uno a cinco clones, que fueron introducidos al país entre 1947 y 1964 (Figura 1). En una primera etapa del estudio se verificó la numeración y el estado general de cada árbol, con el fin de seleccionar las accesiones que presentaban al menos dos árboles en los cuales se realizaría la evaluación. A partir de esta información, se seleccionaron 56 árboles pertenecientes a 18 accesiones (Tabla 1), las cuales de acuerdo con su registro de entrada a la colección, fueron separadas en seis poblaciones o grupos taxonómicos, así: Libérica, Excelsa, Abeokutae, Neoarnoldiana, Pasypagor y Aruwinensis.

Evaluación de descriptores morfológicos cuantitativos. La caracterización morfológica de las plantas de *C. liberica* se basó en 17 descriptores establecidos por el Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos, IPGRI (21), como discriminantes para especies de los géneros *Coffea* y *Psilanthus*. La siguiente es la lista de descriptores, seguida por su sigla:

1. Longitud de la hoja (LH)*
2. Ancho de la hoja (AH)*
3. Longitud del pecíolo foliar (LPF)*
4. Longitud de la arista de la estipula (LAE)*
5. Número de flores por fascículo (NFF)
6. Número de fascículos por nudo (NFN)
7. Número de pétalos por flor (NPF)
8. Número de estambres por flor (NEF)
9. Tamaño del botón floral (TBF)*
10. Longitud del fruto (LF)*
11. Ancho del fruto (AF)*
12. Espesor del fruto (EF)*
13. Largo del disco del fruto (LDF)*
14. Ancho del disco del fruto (ADF)*
15. Longitud de la semilla (LS)*
16. Ancho de la semilla (AS)*
17. Espesor de la semilla (ES)*

* Para estos descriptores, las mediciones fueron realizadas con un nonio de precisión y expresadas en milímetros (mm).

Adicionalmente, se estimaron los siguientes índices:

18. Índice de forma de la hoja (LH/AH)
19. Índice de área foliar (LH x AH)
20. Índice de forma del fruto (LF/AF)
21. Índice de volumen del fruto (LDF x ADF x EF)

Como complemento a este estudio morfológico, se consideraron seis descriptores cualitativos, los cuales se calificaron según las categorías previamente establecidas (21), así:

1. Forma de la hoja (FH): (a) obovada; (b) ovada; (c) elíptica; (d) lanceolada; (e) otra.
2. Forma del ápice de la hoja (FAH): (a) redonda; (b) obtusa; (c) aguda; (d) puntiaguda; (e) apiculada; (f) espatulada; (g) otra.
3. Forma de la estípula (FE): (a) redonda; (b) oval; (c) triangular; (d) deltoide; (e) trapeciforme; (f) otra.
4. Color del fruto (CF): (a) amarillo; (b) amarillo naranja; (c) naranja; (d) naranja rojizo; (e) rojo; (f) rojo púrpura; (g) púrpura; (h) púrpura violeta; (i) violeta; (j) negro; (k) otro.
5. Forma del fruto (FF): (a) redondeada; (b) obovada; (c) oval; (d) elíptica; (e) oblonga; (f) otra.
6. Forma del disco del fruto (FDF): (a) no marcada; (b) marcada pero no prominente; (c) prominente; (d) picuda.

Estudio de la variación molecular. Para los análisis del polimorfismo molecular, se extrajo ADN genómico total de cada uno de los 18 individuos pertenecientes a igual número de accesiones, las cuales representaron las seis poblaciones de estudio. Para la extracción se partió de tejido foliar joven y se utilizó el kit de extracción *DNeasy Plant Maxi Kit* (Qiagen®). Todas las muestras de ADN fueron diluidas a una concentración final de 25-50 ng.µL⁻¹.

El polimorfismo molecular se evaluó usando marcadores iPBS (*inter-Primer Binding Site*), los cuales corresponden a una nueva generación de marcadores propuestos por Kalendar *et al.* (22) desarrollados a partir de secuencias conservadas de regiones internas del gen que codifica para la enzima transcriptasa reversa (*TR*), propia de elementos repetitivos transponibles de las familias *Gypsy* y *Copia*. La amplificación de los marcadores es favorecida por la presencia de estos sitios internos de anclaje, denominados también *inter-PBS*, (*primer binding sites*), generando un elevado polimorfismo. Gracias a la abundancia de los retrotransposones en el genoma de las plantas y los animales, los iPBS son una manera rápida y eficiente de analizar el polimorfismo molecular en especies que carecen de información genómica previa. En el presente trabajo, se evaluó por primera vez el potencial de los iPBS para el estudio de la variabilidad molecular en una especie de café diploide.

En total, se evaluaron 40 combinaciones iPBS, repartidas en: Diez combinaciones de *primers* cortos (con 12 ó 13 nt) y diez de *primers* largos (con 18 nt), todas ellas reportadas por Kalendar *et al.* (22). Para la amplificación PCR y la visualización de bandas se siguieron las indicaciones del autor, con mínimas modificaciones. Se utilizaron entre 50 y 100 ng de ADN total por muestra. Los ciclos de amplificación PCR consistieron en: Una fase de denaturación inicial a 95°C por 3 min., seguido de 28 a 30 ciclos compuestos de una denaturación a 95°C por 15 s, una fase de anillamiento a 50-60°C por 60 s, y una de extensión a 68°C por 60 s, finalizando con una extensión adicional a 72°C por 5 min. La visualización del polimorfismo se hizo utilizando geles de agarosa (1,7%) de alta pureza (*Ultrapure TM Agarose* Ref.15510-027, Invitrogen®). Para lograr una máxima resolución, se fabricaron



Figura 1. Fenotipo de algunas de las accesiones de *C. liberica* que hacen parte de la Colección Colombiana de Café. **a.** ejemplar de *C. liberica* var. *Excelsa* CCC1028; **b.** Ramas productivas de esta misma variedad. **c.** Árbol de una población de *Abeokuta*.

geles de 20 x 25 cm, los cuales fueron corridos por espacio de 10 a 12 h, usando 70 voltios de corriente. La visualización de las bandas se hizo mediante un transiluminador tipo Image Master VDS FUJIFILM FTI-500.

Análisis de datos. Con el fin de determinar diferencias entre las accesiones de *C. liberica* con respecto a cada una de las variables cuantitativas e índices morfológicos relacionados con hojas, frutos, disco del fruto y semillas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), considerando cada introducción como la unidad experimental.

La cercanía entre individuos se determinó con base en una matriz normalizada derivada de los datos morfológicos, a partir

de la cual se estimaron los respectivos coeficientes de similitud de DICE (44), mediante el programa NTSYS (*Numerical Taxonomy System for personal Computer*, versión 2.10p). Seguidamente se construyó un dendrograma, usando el método de agrupamiento UPGMA, basado en los promedios aritméticos no ponderados.

El análisis de la variabilidad molecular se realizó con base en los perfiles de segregación de los marcadores iPBS que resultaron polimórficos. Con esta información se generó una matriz binaria (presencia-ausencia), a partir de la cual se estimaron las distancias genéticas mediante el coeficiente de similitud de DICE (34). Adicionalmente, y usando el método UPGMA, se agruparon las seis

Tabla 1. Accesiones de la especie *Coffea liberica* presentes en la Colección Colombiana de Café (CCC).

Grupo, cultivar, población	Accesión código	Origen (Año de entrada)	No. de plantas
Libérica	CCC 769	Desconocido (1947)	4
Libérica	CCC 1032	Nigeria (1947)	5
Libérica	CCC 1033	Filipinas (1974)	2
Libérica	CCC 1034	Ceilán (1974)	3
Libérica	CCC 1035	Malasia (1974)	4
Libérica	CCC 1036	África Occidental (1974)	2
Excelsa	CCC 1026	Desconocido (1969)	4
Excelsa	CCC 1027	El Salvador (1969)	4
Excelsa	CCC 1028	Filipinas (1969)	5
Excelsa	CCC 1029	Ceilán (1969)	2
Excelsa	CCC 1030	África ecuatorial (1974)	3
Excelsa	CCC 1031	Madagascar (1974)	2
Abeokutae	CCC1022	Ceilán (1974)	4
Abeokutae	CCC 1024	Puerto Rico (1969)	2
Abeokutae Col 6	CCC 1023	Desconocido (1969)	1
Neoarnoldiana	CCC 1037	África ecuatorial (1969)	3
Pasypagor	CCC 1038	Ceilán (1974)	4
Aruwimiensis	CCC 1025	Ceilán (1969)	2

poblaciones estudiadas, con base en los coeficiente de disimilaridad de Nei (35).

Para investigar en detalle las diferencias entre los tres grupos más representativos de la especie *C. liberica*: los Excelsa, los Abeokutae y los Libérica, a partir de los datos moleculares se estimaron diferentes parámetros de diversidad poblacional: el índice de variabilidad (*Fst*) entre los grupos, así como el número de alelos (*Na*), el número de alelos efectivos (*Ne*), el porcentaje de heterocigosidad esperada (*He*), el índice de diversidad promedio poblacional de Shannon (*I*) y el porcentaje de polimorfismo para cada grupo. Estos parámetros se determinaron usando el programa GenAlEx 6.5 (38).

La partición de la variación genética entre y dentro de grupos detectada por el análisis molecular, se realizó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA). Finalmente, se generó un dendrograma de similaridad entre

los tres grupos representativos de *C. liberica*, usando para ello las distancias mínimas de Nei (35). Las poblaciones se agruparon con ayuda del método UPGMA, considerando un mínimo de 1.000 permutaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica de las poblaciones de *C. liberica*. El análisis de las variables cuantitativas mostró diferencias significativas ($p < 0,05$ y $p < 0,001$) entre accesiones, para 13 de las 17 variables evaluadas (Tabla 2). Esta variación fue evidente a nivel de todas las partes de la planta analizadas, es decir, hojas, flores, frutos y semillas (Figuras 2 y 3). Al comparar los índices morfológicos entre poblaciones, se presentaron diferencias significativas relacionadas con el área foliar y la forma y volumen de los frutos (Tabla 3), mientras que la forma de las hojas y de las semillas fueron similares. Los Neoarnoldiana presentaron las

hojas más grandes, seguido de los Libéricas y los Excelsas, mientras que los Abeokutae tuvieron las hojas más pequeñas (Figuras 2d, 2e, 2f). Los frutos más alargados se presentaron en las accesiones de Abeokutae, mientras que los más grandes se encontraron entre los Libéricas y los Pasypagor. El grupo Aruwimiensis fue excluido de este análisis debido a la falta de datos (Figura 3).

Dentro de las variables cualitativas, se destaca la predominancia de accesiones con hojas elípticas, ápices apiculados, estípulas ovales y frutos redondeados. En general, el disco del fruto fue apenas marcado en la mayoría de accesiones, con la excepción de los Abeokutae y los Aruwimiensis que se destacaron por tener un disco muy prominente (Figuras 3a y 3d). Otro carácter que mostró diversidad entre accesiones fue el color del fruto (Figura 3), el cual varió entre el rojo, exhibido por los Abeokutae, pasando por el

rojo-púrpura de los Aruwimiensis, hasta el púrpura-violeta bastante generalizado entre los Excelsas y los Libéricas.

Al agrupar las accesiones por su distancia genética, estimada a partir de los datos morfológicos, no se observó una separación clara entre las accesiones pertenecientes a la misma población o grupo genético (datos no mostrados).

Diversidad molecular y proximidad genética. De los 40 iniciadores iPBS evaluados, solo 13 (32,5%) resultaron polimórficos (Tabla 4). De este grupo, cinco correspondieron a *primers* cortos (12 nt) mientras que ocho fueron largos (12-13 nt). La longitud de los *primers* no mostró relación con el número de bandas polimórficas. Este número varió entre seis, para el iniciador IPBS2373, y 24, para el iniciador IPBS2295. En total, el conjunto

Tabla 2. Caracterización morfológica de las introducciones de *C. liberica* presentes en la CCC.

Variables	Valor F	P > F	Significancia ^{1/}
1. Longitud de la hoja (LH)	1.412	0,245	NS
2. Ancho de la hoja (AH)	1.988	0,092	NS
3. Longitud del pecíolo foliar (LPF)	6.534	0,000	**
4. Longitud de la arista de la estípula (LAE)	0.806	0,626	NS
5. Número de flores por fascículo (NFF)	4.200	0,005	**
6. Número de fascículos por nudo (NFN)	3.376	0,013	**
7. Número de pétalos por flor (NPF)	8.402	0,000	**
8. Número de estambres por flor (NEF)	7.195	0,000	**
9. Tamaño del botón floral (TBF)	1.492	0,225	NS
10. Longitud del fruto (LF)	2.733	0,027	*
11. Ancho del fruto (AF)	2.467	0,041	*
12. Espesor del fruto (EF)	2.707	0,028	*
13. Largo del disco del fruto (LDF)	9.477	0,000	**
14. Ancho del disco del fruto (ADF)	11.137	0,000	**
15. Longitud de la semilla (LS)	6.704	0,000	**
16. Ancho de la semilla (AS)	3.932	0,004	**
17. Espesor de la semilla (ES)	5.092	0,001	**

^{1/} NS, diferencias no significativas entre accesiones; * significativas a $p < 0,05$; ** significativas a $p < 0,001$

Tabla 3. Variabilidad de las poblaciones de *C. liberica* con base en cinco índices morfológicos relacionados con las hojas, los frutos y las semillas.

Índice / Accesoión	Excelsa	Libérica	Abeokutae	Neoarnoldiana	Pasypagor
Forma de la hoja (LH / AH)					
Promedio (ns ^{1/})	2,2 a ^{2/}	2,2 a	2,4 a	2,1 a	2,2 a
Rango	1,7 - 2,6	1,8-2,6	1,8-2,9	2,0-2,3	2,1-2,3
Área foliar (LH x AH)					
Promedio - cm ² (*)	283,2 ab	293,1 ab	217,8 b	365,6 a	207,4 b
Rango	157,2- 403,5	154,2-374,7	165,7-273,2	284,9 – 429,1	192,6 – 230,6
Forma del fruto (LF / AF)					
Promedio (**)	1,1 b	1,0 b	1,2 a	1,1 ab	1,0 b
Rango	0,9 – 1,2	1,0 – 1,2	1,1 – 1,3	1,0 – 1,1	0,9 – 1,0
Volumen del fruto (LF x AF x EF)					
Promedio – cm ³ (**)	4,0 ab	5,2 a	4,8 ab	3,7 c	5,1 a
Rango	3,2 – 5,0	3,5 – 6,3	4,0 – 5,9	3,2 – 4,3	4,3 – 5,5
Volumen del fruto (LF x AF x EF)					
Promedio – cm ³ (**)	1,4 a	1,5 a	4,8 ab	1,5 a	1,4 a
Rango	1,2 – 1,6	1,3 – 1,8	4,0 – 5,9	1,4 – 1,7	1,3 – 1,4

^{1/} ns, diferencias no significativas entre genotipos; * significativas a $p < 0,05$; ** significativas a $p < 0,001$.

^{2/} Los tratamientos seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas.

de marcadores iPBS permitió identificar 179 bandas polimórficas. La frecuencia de bandas polimórficas osciló entre 66,7% y 100%, encontrándose que ocho de los 13 marcadores presentaron frecuencias mayores al 80%.

La agrupación de las diferentes accesiones con base en las distancias genéticas estimadas a partir del polimorfismo de los marcadores iPBS, mostró una agrupación similar a la observada con base en la información morfológica, caracterizada por la presencia de grupos o *clusters* heterogéneos que no guardan correspondencia con el origen genético de las accesiones (Figura 4). Se destaca la separación clara de accesiones como Abeokutae1022, así como la agrupación de las accesiones Pasypagor1038 y Neoarnoldiana1037, en un *cluster* con 87% de similaridad.

Al agrupar las seis grandes poblaciones de *C. liberica* estudiadas (Figura 5), se observó que las poblaciones de Excelsas y Libéricas son más próximas entre sí, respecto a los Abeokutae. Además, hay una separación clara entre estos tres grupos y las poblaciones de Neoarnoldiana, Aruwimiensis y Pasypagor, siendo este último el más distante de todos.

Los índices de variación molecular entre los tres grupos más representativos de *C. liberica* en la colección, revelaron diferencias en el número de alelos efectivos y de loci polimórficos entre el grupo Abeokutae respecto a los Excelsas y los Libéricas (Tabla 5). Estos dos últimos grupos mostraron la variación más alta, como lo demuestran los mayores porcentajes de loci polimórficos, así como las mayores frecuencias de polimorfismo (>80%).

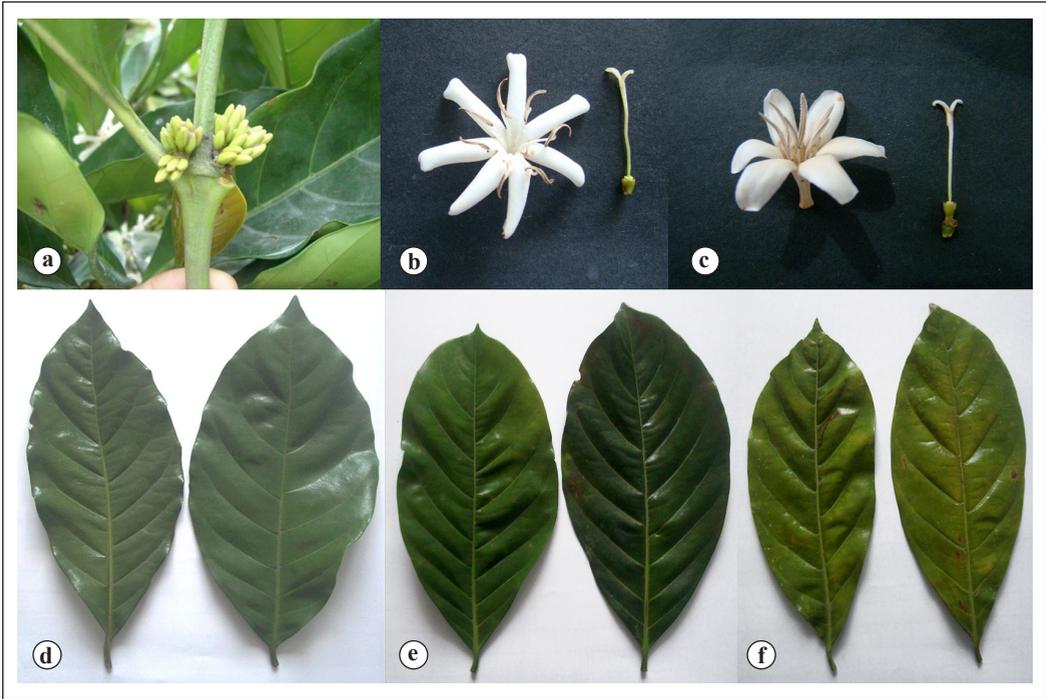


Figura 2. Variabilidad morfológica en flores y hojas de *C. liberica*. **a.** Yemas con botones florales en estado quiescente; **b.** y **c.** Flores abiertas de las variedades Excelsa y Libérica, respectivamente; **d.** Hojas adultas de una accesión de Nearnoldiana; **e.** Hojas adultas de Libérica; **F.** Hojas adultas de Pasypagor. Barra = 1 cm. apróx.

Estos valores se reflejaron también en un mayor número de alelos efectivos (N_e) en la población, mayores porcentajes de loci polimórficos, mayor heterocigocidad (H_e) y mayor polimorfismo (Tabla 5). Los índices de diversidad promedio de Shannon (I) para las poblaciones de Excelsas y Libéricas fueron de 0,4, mientras que para el grupo de los Abeokutae alcanzó un valor de 0,25.

Aunque estas diferencias son claras, debe tenerse en cuenta que los índices de diversidad pueden verse afectados tanto por las diferencias en el número de individuos disponibles por cada grupo (seis para Libéricas y Excelsas y tres para Abeokutae), como por el número de loci polimórficos utilizados, generando en algunos casos sub-estimaciones de la variación.

Finalmente, la partición de la variación genética entre y dentro de las poblaciones o grupos estudiados, estimada a partir de un análisis AMOVA de los datos derivados de los marcadores iPBS (Tabla 6), reveló que prácticamente toda la variabilidad genética observada (99%) es atribuible a las diferencias propias entre accesiones, mientras que sólo el 1% de ésta es explicada por las diferencias entre los grupos.

Coffea liberica es una especie que empezó a cultivarse en África mucho antes de la colonización europea. Numerosas subespecies, variedades, formas y razas fueron descritas en el pasado, sin embargo fue Lebrun (25), quien en 1941, propuso un nuevo agrupamiento de todas estas formas conocidas en dos variedades claramente



Figura 3. Variabilidad morfológica en frutos y semillas de *C. liberica*. **a.** Frutos de una accesión del grupo *Abeokutae*; **b.** Frutos de una accesión de Pasypagor; **c.** Semillas del grupo Libérica (arriba) y Excelsa (abajo); **d.** Frutos de una accesión de Arawimensis. La flecha blanca en a y d, muestra la posición y apariencia del disco del fruto.

separadas: *C. liberica* var. *liberica* que agrupaba los cafés tipo Libérica o Liberiano y *C. liberica* var. *dewevrei*, también conocido como cafés Excelsa. La elevada plasticidad genética de este último grupo, se tradujo en la existencia de muchos tipos intermediarios, que dieron origen a una proliferación importante de subgrupos con epítetos como, Aruwimiensis, Arnoldiana, Neoarnoldiana y Abeokutae, entre otros (40). De acuerdo con Bridson (8), la clasificación sugerida por Lebrun (25) parece ser la más adecuada y práctica desde el punto de vista taxonómico, ya que permite distinguir aquellas formas

silvestres y semi-silvestres de *C. liberica* de las altas montañas del Oeste de Uganda, de las formas cultivadas representadas por las variedades Excelsa. De acuerdo con esta clasificación, las formas conocidas por los cultivadores como café liberiano y café excelsa, estarían en el rango de variación definido para las variedades Libérica y Dewevrei, respectivamente. A pesar de ello, muchos autores reconocen que al interior de estos dos grupos o variedades, continúan existiendo muchas formas o tipos intermedios difíciles de clasificar (9, 17).

Tabla 4. Secuencia de los iniciadores iPBS y descripción del polimorfismo observado en las diferentes accesiones de *Coffea liberica*.

Marcador	Secuencia del iniciador	No. total de bandas	Frecuencia de bandas polimórficas (%)
IPBS2074	GCTCTGATACCA	19	84,2
IPBS2075	CTCATGATGCCA	7	71,4
IPBS2385	CCATTGGGTCCA	14	78,6
IPBS2079	AGGTGGGCGCCA	13	92,3
IPBS2375	TCGCATCAACCA	8	75
IPBS2253	TCGAGGCTCTAGATACCA	11	100
IPBS2257	CTCTCAATGAAAGCACCA	9	100
IPBS2373	GAACTTGCTCCGATGCCA	6	66,7
IPBS2224	ATCCTGGCAATGGAACCA	14	92,8
IPBS2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	15	93,3
IPBS2238	ACCTAGCTCATGATGCCA	16	93,7
IPBS2295	AGAACGGCTCTGATACCA	24	79,2
IPBS2298	AGAAGAGCTCTGATACCA	23	91,3

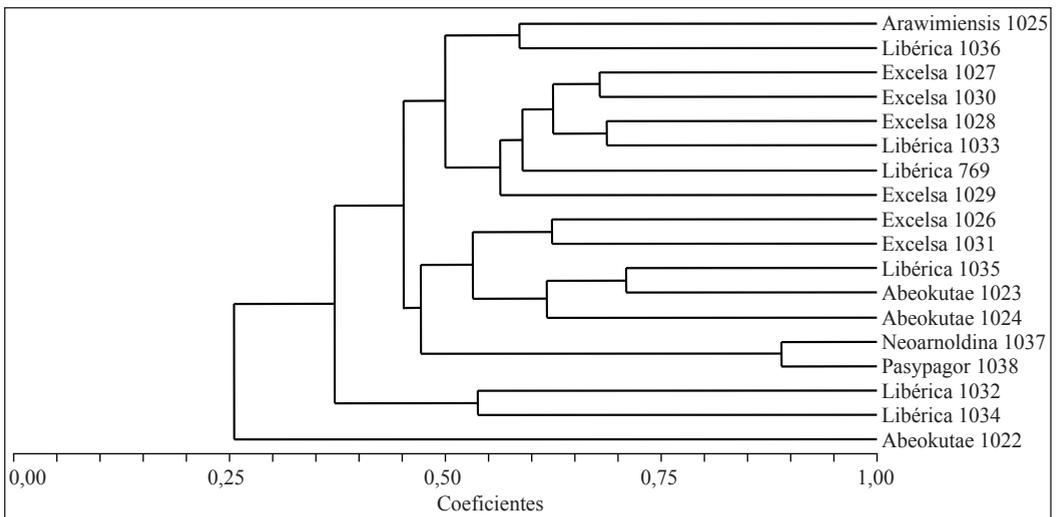


Figura 4. Dendrograma generado a partir de la segregación de 13 loci iPBS polimórficos para las 18 accesiones de *C. liberica* presentes en la CCC. Las distancias fueron estimadas a partir de los coeficientes de similitud de DICE.

El estudio de la variabilidad presente en las colecciones de germoplasma representa el primer paso para determinar sus posibilidades de uso en cualquier programa de mejoramiento a través de un esquema de hibridación interespecífica. Durante los últimos años, la

caracterización de los diferentes bancos de germoplasma de café alrededor del mundo, ha permitido la selección de múltiples genotipos, que posteriormente han sido usados como progenitores para el desarrollo de variedades locales (24).

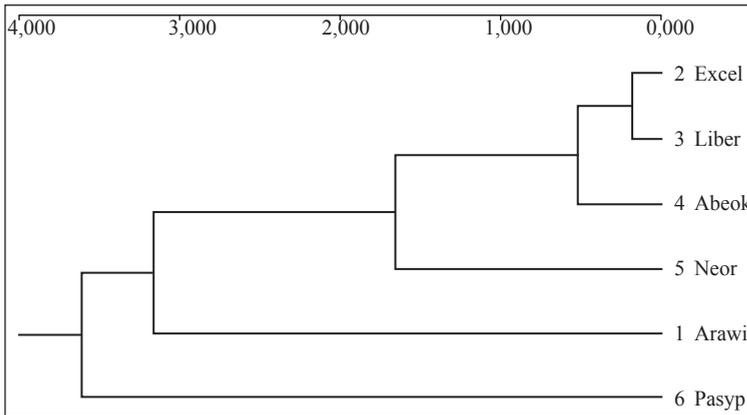


Figura 5. Dendrograma basado en la segregación de 13 loci iPBS polimórficos para las seis poblaciones de *C. liberica* representadas en la CCC. Las distancias fueron estimadas a partir de los coeficientes de similitud de DICE.

Tabla 5. Variabilidad genética estimada a partir del polimorfismo molecular observado en las tres poblaciones de *Coffea liberica* (por ejemplo, Libéricas, Excelsas y Abeokutae) más representativas de la CCC.

Población	No. alelos observados N_a	No. alelos efectivos N_e	Loci polimórficos %	Heterocigocidad esperada H_e	Polimorfismo %	Índice de Shannon I
Libérica	1.714	1.453	78,57	0,288	80,32	0,398
Excelsa	1.429	1.446	71,43	0,286	81,91	0,390
Abeokutae	1.214	1.296	42,86	0,203	62,23	0,248

Tabla 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las tres poblaciones analizadas, utilizando los datos obtenidos de once marcadores iPBS.

Fuente de variación	g.l. ^{1/}	SC ^{2/}	CM ^{3/}	Varianza estimada	Variación (%)
Entre poblaciones	2	6,350	3,175	0,042	1
Entre individuos	12	33,250	2,771	0,000	0
Dentro de individuos	15	49,500	3,300	3,300	99
Total	29	89,100		3,342	100

^{1/} g.l.: Grados de libertad; ^{2/} SC: Suma de cuadrados del error; ^{3/} CM: Cuadrado medio del error.

En este trabajo se presentan los resultados de la primera evaluación intensiva realizada al germoplasma de una especie diploide de la CCC. *C. liberica*, aunque sólo representa el 1,7% de las accesiones de la colección, es portadora de características de mucho interés para el mejoramiento de *C. arabica* como son: La resistencia a la roya del café (*Hemileia vastatrix*), la tolerancia a los nematodos (*Meloidogyne* spp.), a las bajas temperaturas o la baja oviposición de

la broca (*Hypothenemus hampei*) en sus frutos (1, 7, 19, 20, 41, 42).

Variabilidad morfológica inter e intrapoblacional. Inicialmente se evaluó la variación de múltiples caracteres morfológicos entre las diferentes accesiones de la especie *C. liberica* presentes en la CCC. La mayoría de ellos (>75%) mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para al menos una de las accesiones, reflejando la existencia de una variabilidad importante a nivel de

las diferentes accesiones que hacen parte de la colección.

Cuando se compararon los dos grupos más representativos de *C. liberica*: los Libéricas y los Excelsas (también denominados Dewevrei), se observó que sólo el tamaño del fruto permitió diferenciarlos. Este resultado concuerda con lo reportado por Bridson (8), quien estableció que ésta es la característica morfológica que mejor diferencia las dos variedades, siendo el tipo más grande, característico de Libérica. Según Bridson (8), otros atributos como el número de partes de la corola o el color de los frutos pueden también llegar a ser discriminantes, aunque no en todos los casos. Para N'Diaye *et al.* (33), las principales diferencias morfológicas entre estos dos grupos radican en el tamaño de las hojas, el número de inflorescencias por nudo (mayores en Dewvrei) y el tamaño del fruto (mayor en los Libéricas).

En este estudio, si bien la longitud del fruto no fue un carácter diferencial entre Libérica y Excelsa, sí lo fue el ancho del fruto (18,0 vs 16,5 mm, respectivamente). El número de pétalos por flor, aunque variable, no presentó diferencias significativas entre estos dos grupos, ni el color de los frutos. Aunque el ancho del disco del fruto no se considera un carácter taxonómico relevante para la diferenciación entre Libérica y Excelsa, sí parece serlo entre éstas y las formas Abeokutae, las cuales mostraron una distancia genética mayor con aquellas.

Considerando el conjunto de las seis poblaciones de *C. liberica* presentes en la CCC, cabe destacar que el grupo Neoarnoldiana presentó las hojas más grandes y los frutos más pequeños; mientras que los individuos pertenecientes a las poblaciones Libérica y Pasypagor, se distinguieron por presentar los frutos más grandes.

Polimorfismo molecular y eficiencia de los marcadores iPBS. En una de las primeras evaluaciones moleculares hechas a la CCC (28), se evaluó el polimorfismo generado por marcadores microsátélites en diferentes accesiones de *Coffea*, incluidas cinco especies diploides y 23 tetraploides. En promedio, se encontraron 3,6 alelos por locus en los diploides contra 2,5 en los arábigos silvestres, y solamente 1,9 en los arábigos cultivados. Las dos accesiones de *C. liberica* analizadas mostraron una elevada variación intraespecífica, con un coeficiente de similitud de 0,29, comparable al calculado para especies como *C. eugenioides* o *C. canephora*. En otro estudio similar Montoya *et al.* (29) estudiaron el potencial de diferentes marcadores microsátélites para la detección de polimorfismo en una muestra de especies diploides y tetraploides de la CCC, donde se incluyó *C. liberica*. Los resultados mostraron que este tipo de marcadores produjo en promedio 7,7 bandas polimórficas por locus, con un máximo de 20, siendo las especies diploides las que generaron mayor número de bandas y, por ende, de polimorfismo (PIC=0,77). En un tercer trabajo, se estudió el potencial de 110 microsátélites para ser transferidos a otras especies de café. La evaluación hecha sobre seis especies diploides, incluidas *C. canephora* y *C. liberica*, mostró una frecuencia de amplificación entre 72,7% y 82,4%, corroborando la importancia de estos marcadores para la caracterización de especies del género *Coffea* (39).

En el presente estudio, el uso de marcadores iPBS permitió obtener un alto polimorfismo en la especie *C. liberica*. En comparación con los estudios citados anteriormente, en los cuales se usaron marcadores microsátélites, los iPBS evaluados por primera vez en café tienen un alto potencial como herramienta para el estudio de la variabilidad del germoplasma. Su eficiencia radica en el hecho que permiten revelar un

polimorfismo asociado a inserciones puntuales de elementos repetitivos del tipo LTR, muy frecuentes en los genomas vegetales, incluido el mismo café, donde se ha comprobado su gran abundancia (23, 26). Adicionalmente, tienen la ventaja de poder separarse sobre geles de agarosa, evitando así la preparación de geles de poliacrilamida, necesarios para la visualización de marcadores como los AFLP o los microsatélites. A pesar de estas ventajas, la mayor limitante de los iPBS frente a los microsatélites, es el hecho de ser marcadores dominantes, generando por lo tanto, información parcial sobre la segregación de cada locus.

Distancias genéticas entre poblaciones. Al igual que lo observado para las variables morfológicas, la caracterización molecular no permitió separar en forma clara las seis poblaciones de *C. liberica*. Esto reafirma la existencia de una baja diversidad genética entre las poblaciones representadas en la CCC. Al comparar los valores de heterocigosidad esperada (*He*) y de diversidad poblacional promedio (*I*), entre los Libérica y los Excelsa se observa una variación importante dentro de cada grupo. Sin embargo, esta variabilidad intra-poblacional es menor para el caso de los Abeokutae, el otro grupo con mayor representación en la colección.

Los análisis mostraron que existe una relación más estrecha entre los Excelsa, Libérica y Abeokutae, que la observada entre éstos y los grupos menos representados como Nearnoldiana, Aruwimiensis y Pasyagor. En general, todos los grupos comparten muchas características morfológicas y parte del polimorfismo molecular, lo que al final se traduce en una separación incipiente en términos de distancias genéticas.

Una evaluación molecular realizada en la colección de germoplasma del Instituto

Agronómico de Campinas, IAC (Brasil), usando marcadores RAPD, mostró una muy baja diversidad entre las accesiones de *C. liberica*. Al examinar el origen de las accesiones se encontró que de los nueve individuos estudiados, dos resultaron ser hermanos medios, mientras que los siete restantes eran clones derivados de una sola planta original que llegó a la CCC en los años 40 (43). En ese mismo trabajo, los valores de diversidad estimados por el índice de Shanon fueron menores a los encontrados en el presente estudio. Por ejemplo, para las poblaciones de Libérica y Excelsa, Silvestrini *et al.* (43) encontraron valores de 0,042 y 0,175, respectivamente, mientras que en este trabajo los valores fueron de 0,40 y 0,39, respectivamente (43). La población de Abeokutae por su parte, tuvo un índice ligeramente inferior al observado en dicho reporte (0,25 vs 0,29).

De acuerdo con la información disponible en la CCC, las accesiones de *C. liberica* llegaron al país en diferentes años (1947, 1969, 1974) enviadas por el CATIE, a donde habían llegado provenientes de países como Sri Lanka (antiguo Ceilán), Filipinas e incluso Madagascar. Una vez recibidas en la CCC, las semillas fueron sembradas y conservadas de manera separada mediante propagación vegetativa. Sin embargo, no se descarta que algunas accesiones hayan sido objeto de multiplicación por semilla ante la dificultad de obtener clones. Como lo muestra el análisis de varianza, casi toda la variación genética observada (>99%) se explica por el polimorfismo encontrado entre accesiones, independientemente del grupo o población a la que éstas pertenecen. Tanto la selección artificial ejercida previamente sobre algunas poblaciones originales como los Excelsa, así como el reducido número de accesiones presentes en la colección, son dos factores que sin duda han influido en la

estructura genética que muestran actualmente las poblaciones de *C. liberica* de la CCC.

La presente investigación se propuso contribuir al conocimiento de la diversidad genética de la especie *C. liberica* en la CCC. Los resultados revelaron una elevada variabilidad en cuanto a caracteres como el tamaño y color de los frutos, el tamaño de las hojas y el número de fascículos por nudo, entre otros, los cuales tienen interesantes posibilidades para el mejoramiento futuro de *C. arabica*. El uso combinado de descriptores morfológicos junto con marcadores moleculares tipo iPBS, usados por primera vez en café, permitió evidenciar la presencia en la colección de individuos portadores de características propias de los dos grupos más representativos de la especie: Libéricas y Excelsas (también conocidos como Dewevrei).

Con base en esta información, el paso siguiente será la planeación de experimentos destinados a estudiar el comportamiento de esta especie frente a, por ejemplo: plagas y enfermedades, suelos pobres en nutrientes o incluso adaptación a zonas muy secas.

Desde el punto de vista de la conservación y uso del germoplasma, la baja diversidad inter-poblacional encontrada obliga a pensar en estrategias como: (i) Realizar esfuerzos tendientes a adquirir nuevas accesiones con el fin de aumentar no solo la diversidad genética, sino el tamaño efectivo de las poblaciones de *C. liberica* presentes en la CCC; (ii) Seleccionar dentro de cada población aquellos individuos portadores de la mayor diversidad, a fin de incluirlos en un plan de cruzamientos con líneas cultivadas de *C. arabica*, buscando generar materiales pre-mejorados que sirvan de puentes genéticos para la transferencia de caracteres de interés, usando la vía de los híbridos

triploides; y (iii) Comparar la diversidad de las poblaciones presentes en la CCC, con muestras tipo representativas de los dos grandes grupos Libérica y Dewevrei. Esto con el fin de determinar su pureza genética y eventualmente establecer el grado de flujo génico que ha ocurrido antes o durante su entrada a la colección de germoplasma.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de Laura F. Gonzales en la optimización de los marcadores iPBS, y a los auxiliares John E. Quintero y Carlos A. Vera de la Disciplina de Mejoramiento Genético, en la recolección de muestras en el campo. A los doctores María del Pilar Moncada, Hernando Cortina y François Anthony por sus comentarios y sugerencias, que contribuyeron a mejorar el texto final de este manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. AHMAD, J.; VISHVESHWARA, S. *Coffea liberica* Bull ex Hiern: A review. Indian Coffee. 44 (2-2): 29-36. 1980.
2. ALVARADO, G.; CORTINA, H. Comportamiento agronómico de progenies de híbridos triploides de *Coffea arabica* var. Caturra X (Caturra X *Coffea canephora*). Cenicafé. 48 (2): 73-91. 1997.
3. ANTHONY, F., CLIFFORD, M., NOIROT, M. Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.: chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. Genetic Res Crop Evol, 40: 61-70. 1993.
4. ANTHONY, F., DUSSERT, S., DULLOO, E. The coffee genetic resources. EN: Engelmann F, Dulloo E, Astorga C, Dussert S, Anthony F (Eds) Complementary strategies for *ex situ* conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources: a case study in CATIE, Costa Rica. Topical reviews in agricultural biodiversity. Bioversity International, Rome, Italy, pp 12–22. 2007.
5. ANTHONY, F., BERTRAND, B., ETIENNE, H., LASHERMES, P. *Coffea* and *Psilanthus*. IN: C. Kole (Ed), Wild Crop Relatives: Genomic and

- Breeding Resources, Plantation and Ornamental Crops, Chapter 3. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2011.
6. BERTHAUD, J. Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. Montpellier, France. ORSTOM, Collection travaux et documents. 379 p.1986.
 7. BETTENCOURT, A.J., C.J. RODRIGUES, Jr. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. EN: Clarke RJ, Macrae R (Eds) Coffee. Vol 4. Elsevier, London, UK. pp. 199-234. 1988.
 8. BRIDSON, D.M. The lectotypification of *Coffea liberica* (Rubiaceae). Kew Bulletin. Vol 40 (4): 805-807. 1985.
 9. BRIDSON, D.M. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* for part 2 of "Flora of Tropical East Africa": Rubiaceae. Kew. Bulletin, 36: 817-860. 1982.
 10. CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. EN: Clarke RJ, Macrae R (Eds) Coffee. Vol 4. Elsevier, London, UK. pp. 129-165. 1988.
 11. CASTILLO, J., PARRA, H.J. Exploración en el contenido de cafeína, grasas y sólidos solubles en 113 introducciones de café. Revista Cenicafé, 24: 3-29. 1973.
 12. CASTILLO, J. Producción y características de grano de germoplasma de café introducido a Colombia. Revista Cenicafé, 26: 3-26. 1975.
 13. CASTRO, B.L., CORTINA, H.A., ROUX, J., WINGFIELD, M.J. New coffee (*Coffea arabica* L.) genotypes exhibiting high resistance to leaf rust and *Ceratocystis* canker derived from the *Coffea canephora* species. Tropical Plant Pathology. 2013a (en prensa).
 14. CASTRO, B.L., CORTINA, H.A., ROUX, J., WINGFIELD, M.J. Selection of coffee genotypes with resistance to coffee leaf rust and *Ceratocystis* canker from interspecific hybrids (*Coffea arabica* x *Coffea canephora*). Plant Breed Appl Biotechnol, 2013b (en prensa).
 15. CHAPARRO, A.P., CRISTANCHO, M.A., CORTINA, H., GAITÁN, A. Genetic variability of *Coffea arabica* L. accessions from Ethiopia evaluated with RAPDs. Genetic Resources and Crop Evolution 51: 291-297. 2004.
 16. CHEVALIER, A. Les caféiers du globe. Recherches sur la classification et l'anatomie des caféiers et de quelques Rubiacées. Partie I. pp. 170-185. 1947.
 17. DAVIS, A.P., GOVAERTS, R., BRIDSON, D.M., STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). Bot. Jour. Linnean Soc., 152: 465-512. 2006.
 18. DUSSERT, S., LASHERMES, P., ANTHONY, F., MONTAGNON, C., TROUSLOT, P., COMBES, M.C., BERTHAUD, J., NOIROT, M., HAMON, S. Le caféière *Coffea canephora*. IN: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC. (Eds) Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. Collection Repères, CIRAD Editions. pp 175-194. 1999.
 19. FAZUOLI, L.C., LORDELLO, R.A. Resistencia de *Coffea liberica* e *C. dewevrei* a *Meloidogyne exigua*. Soc. Brasil. Nemat. Public. No. 2. 197-199. 1977.
 20. GÓNGORA, C., MACEA, E., CASTRO, A.M., IDARRAGA, S., CRISTANCHO, M.A., BENAVIDES, P., GAITAN, A., GALBRAITH, D., VANIER, C. Interaction between coffee plants and the insect coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. EN: 24 International Conference on Coffee Science. November 11-16. p 57. Oral presentation A12. 385 p. 2013.
 21. IPGRI. Descriptores del café (*Coffea* spp. y *Psilanthus* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma, Italia. 36 p. 1996.
 22. KALENDAR, R., ANTONIUS, K., SMÝKAL, P., SCHULMAN, A.H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theor Appl Genet, 121:1419-1430. 2010.
 23. KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. Genetica, 115: 49-63. 2002.
 24. LASHERMES, P., BERTRAND, B., ETIENNE, H. Breeding Coffee (*Coffea arabica*) for Sustainable Production. EN: Jain S.M., Priyadarshan P.M. (Eds), Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species, Chapter 14. Springer Science-Business Media. pp 525 -543. 2009.
 25. LEBRUN, J. Recherches morphologiques et systématiques sur les caféiers du Congo. Publications de L'institut National pour l'Étude Agronomique du Congo Belge. 11: 1-186. 1941.

26. LOPES, F.R., CARAZOLLE, M.F., GUIMARAES, G.A., COLOMBO, C.A., CARARETO, C.M.A. Transposable elements in *Coffea* (*Gentianales*: Rubiaceae) transcripts and their role in the origin of protein diversity in flowering plants. *Mol genet genomics*, 279: 385-401. 2008.
27. LÓPEZ, G., CORTINA, H., McCOUCH, S., MONCADA, M. del P. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. *Tree Genet Genom*. 5: 435-446. 2009.
28. MONCADA, M. del P., McCOUCH, S. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome* 47:501–509. 2004.
29. MONTOYA, J.C., MONCADA, M. del P., MENDOZA, G., LOPEZ, G. Optimización y caracterización de SSRs en una muestra del banco de germoplasma de *Coffea* de CENICAFÉ” Revista fitotecnia Colombiana Vol.6 No. 2. Página 44-51. 2006.
30. MONTAGNON, C., LEROY, T. Réaction à la sécheresse de jeunes caféiers *Coffea canephora* de Côte d’Ivoire appartenant à différents groupes génétiques. *Café, Cacao, Thé*, 37: 179-190. 1993.
31. MORENO, G., CASTILLO, J. Germoplasma existente en la Colección Colombiana de Café e información disponible sobre algunas de sus características. Documento Cenicafé, FNC. Chinchiná, Caldas. 1979.
32. MORENO, G., CORTINA, H., ALVARADO, G., GAITÁN, A. Utilización de los recursos genéticos de café en el programa de mejoramiento genético de *C. arabica* en Colombia. IN: Mejoramiento sostenible del café Arabica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, con énfasis en la resistencia a los nematodos. Memorias Taller del CATIE. p. 33-38. Eds. CATIE-IRD. Turrialba, Costa Rica. 98 p. 2000.
33. N’DIAYE, A., PONCET, V., LOUARN, J., HAMON, S., NOIROT, M. Genetic differentiation between *Coffea liberica* var. *Liberica* and *C. liberica* var. *Dewevrei* and comparison with *C. canephora*. *Plant Syst Evol* 253:95–104. 2005.
34. NEI, M., LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76: 5269-73. 1979.
35. NEI, M. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292. 1972.
36. OROZCO, F.J. La hibridación interespecífica en café y las posibilidades de los híbridos triploides. Conferencias Conmemorativas 50 años de Cenicafé. pp. 54-64. Federación Nacional de Cafeteros. Chinchiná. 255 p. 1990.
37. OROZCO, F.J. Utilización de los híbridos triploides en el mejoramiento genético del café. P. 485-495 IN: Colloque Scientifique International sur le Café. N° 13: Agosto 21-25, 1989: Paipa, Colombia. ASIC. 1989.
38. PEAKALL, R. SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539. 2012.
39. PONCET, V., HAMON, P., MINIER, J., CARASCO, C., HAMON, S., NOIROT, M. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome* 47:1071–1081. 2004.
40. PORTÈRES, R. Note botanique sur le *Coffea excelsa* A. Chev. (*sensu lato*) et le *Coffea macrochlamys* K. Schum. *Revue de botanique appliquée et d’Agriculture tropicale*. Vol. XVI, No. 173. 1936.
41. PRAKASH, N.S., MARQUES, D.V., VARZEA, V.M.P., SILVA, M.C., COMBES, M.C., LASHERMES, P. Introgression analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica*. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 1311-1317. 2004.
42. ROMERO, J. V., CORTINA, H. Fecundidad y ciclo de vida de *Hypothenemus hampei* (*Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae*) en introducciones silvestres de café. *Cenicafé*. 55 (3): 221-231. 2004.
43. SILVESTRINI, M., MALUF, M.P., SILVAROLLA, M.B., GUERREIRO-FILHO, O., MEDINA-FILHO, H.P., VANINI, M.M.T., OLIVEIRA, A.S., GASPARI-PEZZOPANE, C., FAZUOLI, L.C. Genetic diversity of a *Coffea* Germplasm collection assessed by RAPD markers. *Genet Res Crop Evol*, 55:901–910. 2008.
44. SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco. USA. 573 p.