

# Fuentes alternativas para la resistencia genética contra la roya del café (*Hemileia vastatrix*) a través de inducción de mutaciones

## José Andrés Rojas-Chacón

Estudiante de maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad  
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica  
✉ joseandres97@estudiantes.cr

## Fabián Echeverría-Beirute

Escuela de Agronomía  
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica  
✉ fecheverria@itcr.ac.cr

## Andrés Gatica-Arias

Escuela de Biología  
Universidad de Costa Rica, Costa Rica  
✉ andres.gatica@ucr.ac.cr

## Resumen.

El café (*Coffea* spp) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial y provee sustento económico a millones de personas en países en vías de desarrollo. En Costa Rica, la actividad cafetalera está liderada por pequeños y medianos productores, lo que beneficia a 38 804 familias dedicadas al cultivo distribuidas en ocho regiones del país. La producción de café es especialmente susceptible al ataque de plagas y enfermedades. La roya es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, y considerada la principal enfermedad del café distribuida ampliamente en las regiones productoras. El mejoramiento del café y la obtención de un nuevo cultivar con base en las metodologías tradicionales, es un proceso que requiere alrededor de treinta años. Sin embargo, la de inducción de mutaciones brinda un gran potencial para inducir nueva variación genética necesaria para el mejoramiento del café. Debido a que el café es uno de los cultivos principales en Costa Rica considerado entre los mejores del mundo, la actividad cafetalera del país está en juego ante el ataque de enfermedades como la roya. Por esta razón, es que surge la necesidad encontrar nuevas alternativas de resistencia genética para

el control de la roya. Hasta la fecha el TEC en conjunto con la UCR cuentan con materiales en campo desarrollados por mutagénesis que han sido evaluados ante el ataque de roya. De las poblaciones M2, se han logrado seleccionar genotipos promisorios, los cuales han generado poblaciones en etapa M3. Los materiales con una respuesta de menor incidencia de roya han demostrado que la metodología de mutagénesis indujo variaciones aún no conocidas en el genoma, siendo recursos genéticos con potencial a ser incluidos en programas de mejoramiento genético hacia una resistencia más duradera.

## Palabras clave:

mutagénesis, café, mejoramiento genético, roya, recursos fitogenéticos.

## Introducción

En Costa Rica, el sector cafetalero ha enfrentado una serie de, tales como el cambio climático, y el incremento en los costos de los fertilizantes, que junto los bajos precios internacionales y la antigüedad de los cafetales, en el 2012-2013 la enfermedad de la roya ocasionó pérdidas estimadas en \$500 millones, debido a la reducción en un promedio del 17% con respecto a periodos anteriores. La sostenibilidad y rentabilidad del cultivo es un problema creciente (Avelino et al., 2015; Toniutti et al., 2017) y una de las limitantes es la escasez de diversidad de recursos genéticos, especialmente del café arábico (Alemayehu, 2017; Labouisse et al., 2008).

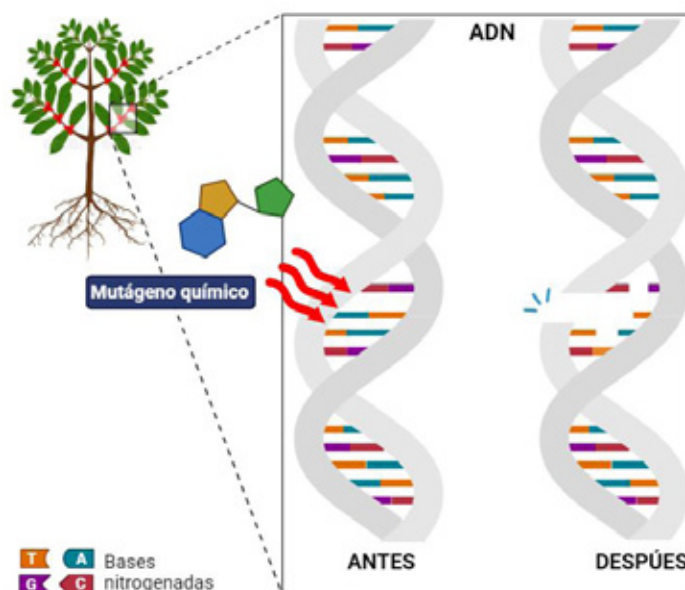
La roya del café es provocada por el hongo *Hemileia vastatrix*, quien cuenta con una gran diversidad de razas patogénicas distribuidas a nivel mundial (Cabral et al., 2016; Talhinhos et al., 2017). En los últimos años, estas razas se han propagado rápidamente y se han detectado aislamientos más virulentos que han logrado superar la resistencia de genotipos que hasta el momento resistían la infección de razas locales (Capucho et al., 2012; Toniutti et al., 2017). El caso más reciente es la variedad Costa Rica-95, la cual, en el año 2019, reveló la pérdida de su resistencia ante la roya (Ramírez, 2019). Igualmente, Obatá, Topazio y otras variedades en Brasil, han sido también reportadas. El vacío en nuevas fuentes de resistencia genética, el aumento de los costos en insumos, así como, los constantes cambios en la dinámica climática, se ve la necesidad de desarrollar nuevas fuentes de resistencia más duraderas.

La incorporación de genes que confieran características de interés agronómico de las variedades comerciales de café mediante mejoramiento genético convencional es un proceso largo y difícil de lograr (Villalta-Villalobos & Gatica-Arias, 2019). Al contrario, la alta abundancia, capacidad de transferencia de los factores de virulencia, mutaciones y ciclos cortos por parte del hongo, posibilita la aparición de diversidad patogénica que fácilmente sobrepasan las barreras genéticas de su hospedero café (Capucho et al., 2012). Debido a ello, el desarrollo de nuevas técnicas para el mejoramiento tradicional, así como no tradicional, deben ser exploradas, validadas y continuamente mejoradas.

En este sentido, esta propuesta de estudio se originó con la necesidad de contar en Costa Rica con nuevas alternativas de resistencia genética para el control de la roya. A este respecto, el desarrollo de nuevos materiales de café por medio de técnicas no convencionales de mejora genética, como lo es la mutagénesis química, podría favorecer a largo plazo, el mantenimiento de una producción estable de café de calidad.

## ¿Qué es la mutagénesis química?

La mutagénesis se describe como una técnica de exposición de cualquier material biológico a un agente mutagénico, que eleva la frecuencia de mutaciones en el ADN por encima de la tasa espontánea natural (Mishra et al., 2020). Los mutágenos químicos reaccionan con las bases nitrogenadas del ADN provocando mutaciones de inserción, eliminación, transición y transversión de las mismas (Kashtwari et al., 2022) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo de la mutagénesis química en genotipos de café. Creado con BioRender.com.

Las nuevas técnicas de mejoramiento incluyen tecnologías para la introducción de nuevas variaciones en las plantas. En el caso de *C. arabica*, la inducción química de mutaciones representa un mecanismo para introducir variaciones genéticas que podrían no estar presentes de manera natural. Por lo tanto, el mejoramiento por mutación se ha vuelto más popular por ser una herramienta eficaz para inducir nuevas alteraciones genéticas, las cuales pueden o no alterar características de rendimiento, tolerancia al estrés abiótico, así como, la resistencia a enfermedades y plagas. Para este caso, la inducción de mutaciones permite generar poblaciones numerosas de plantas, las cuales pueden ser evaluadas en campo, o mediante ensayos de infección ex planta, para detectar posibles modificaciones al fenotipo de susceptibilidad de muchas variedades de *C. arabica* L.

La mutagénesis química también se ha utilizado para el desarrollo de resistencia en contra la marchitez del banano provocada por *Fusarium oxysporum* (Kishor et al., 2017). Otras investigaciones, trabajaron con mutantes que mostraran resistencia al virus de la hoja amarilla (Kona et al., 2019). En Costa Rica, la inducción de mutaciones ha sido utilizada con éxito en la búsqueda de materiales con tolerancia a herbicidas en el cultivo de arroz (Hernández-Soto et al., 2022).

## Metodología

### Preparación de almácigos

La Sede del Atlántico de la Universidad de Costa Rica (UCR), proporcionó frutos maduros de café (*Coffea arabica* L. var Catuaí) M2. Así mismo, el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Escuela de Biología de la UCR cuenta con mutantes candidatos de café M1V1. Ambos materiales fueron generados mediante mutagénesis en estado de semillas y callo embriogénico, respectivamente, y trasladados al Campus Tecnológico Local San Carlos.

El almácigo de café fue sembrado en bolsas de polietileno con un sustrato de 50% suelo, 25% compost orgánico, y 25 % de granza de arroz. Las plantas en almácigo fueron ubicadas en el laboratorio de Ambientes Controlados del Campus San Carlos (Figura 2), bajo condiciones de temperatura >25°C, una humedad relativa >80 % y fotoperiodo de 12 horas. El almácigo posterior a los 4 meses de establecido fue reubicado a invernadero.



**Figura 2.** Plántulas de café M2 establecidas a los 90 días después del trasplante bajo condiciones controladas (temperatura >25°C, una humedad relativa >80 % y fotoperiodo de 12 horas). Laboratorio de Ambientes Controlados, TEC.

### Evaluación de la patogenicidad de la roya

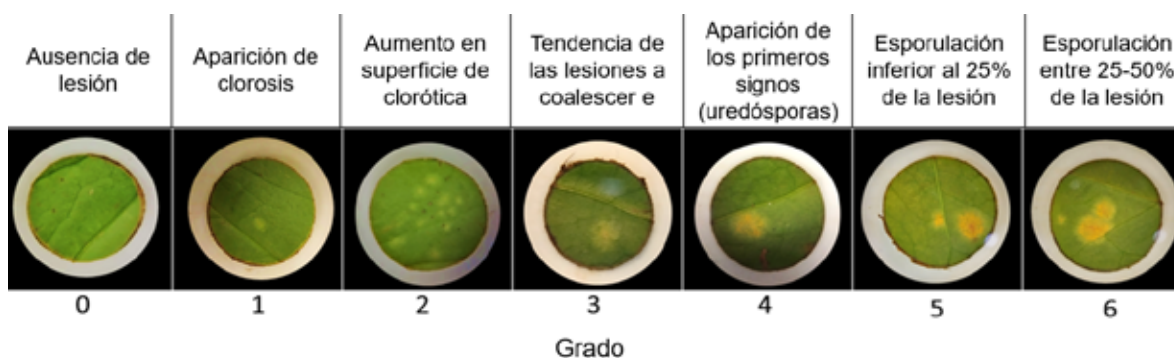
Se visitaron diferentes regiones cafetaleras del país, con distintas variedades y accesiones donde se procedió a coleccionar las muestras de hojas infectadas. Se cortaron discos de hojas de los diferentes genotipos huésped (plantas mutantes y variedades comerciales: Venecia, Costa Rica 95, Catuaí y la especie *C. canephora* var Robusta), y se transfirieron a recipientes transparentes de plástico que contenían una espuma saturada con agua.

La inoculación de los discos de hoja se realizó en la superficie abaxial, donde se colocó una gota de 0.05 ml de la solución de uredósporas de *H. vastatrix* más agua destilada y 2 mM de tween 20, hasta llegar a una concentración de  $2.3 \times 10^5$  uredósporas/ml, y se mantuvo en agitación constante hasta su uso. Después de este procedimiento, los recipientes se transfirieron a una incubadora a total oscuridad, con una temperatura promedio de  $22.5 \pm 1.5$  °C durante 48 h y una humedad relativa cercana al 100 %. Luego de transcurrido este período, los discos foliares se limpiaron con algodón para eliminar las uredósporas que quedaban, para evitar la posterior colonización por hongos hiperparásitos, y se mantuvieron en incubación a  $23 \pm 1.5$  °C y fotoperíodo de 12 h, hasta la aparición de los síntomas y signos del patógeno.

Se logró evaluar semanalmente el comportamiento de incidencia, severidad, período de incubación y latencia de discos foliares de plantas de café al ser inoculados. En cada evaluación se tomaron fotografías generales de cada cámara húmeda, registrando los segmentos con necrosis, manchas cloróticas y estructuras infectivas (uredósporas).

### Resultados

De acuerdo con el comportamiento de la enfermedad, fue posible identificar plantas con diferentes niveles de tolerancia de la enfermedad (valores de severidad cero hasta seis, como máximo) (Figura 3). Esto permitió caracterizar y describir la respuesta de las plantas ante el ataque del hongo, encontrando algunas mutantes de café susceptibles, algunas otras presentaron niveles de tolerancia o hasta resistencia. La respuesta de menor incidencia de roya bajo condiciones controladas de laboratorio demuestra que la metodología de mutagénesis indujo variaciones aún no conocidas en el genoma, siendo recursos genéticos con potencial a ser incluidos en programas de mejoramiento genético hacia una resistencia durable.



**Figura 3.** Comportamiento de la roya de café (*H. vastatrix*) en discos de hoja de plantas mutantes bajo condiciones controladas.

Una vez las plantas evaluadas, estas fueron trasladadas en una pequeña colección de materiales en campo ubicada en el Campus Tecnológico Local San Carlos, en donde, además, se han estado evaluando en términos de crecimiento, producción y adaptación a la zona (Figura 4).

Por otra parte, mediante un trabajo de graduación el estudiante Juan Miguel Zúñiga en la UCR, trabajó en caracterizar morfológica y molecularmente la diversidad genética de los aislamientos de roya recolectados, según condición agroclimática, hospedero y fenología de la planta. Se observó una tendencia de distribución genética según región productora o condición climática, las cuales merecen atención, ya que podrían ser de suma importancia en futuros estudios para comprender si el clima o la localidad, son determinantes en la existencia de la distribución de genotipos diferentes de las muestras de roya, o si más bien, el factor genético del huésped es el de mayor efecto en la variabilidad del patógeno.

El siguiente paso de la investigación consistiría en probar esas nuevas líneas de café promisorias en diferentes localidades del país, para reafirmar si la característica de resistencia se mantiene y entonces valorar la posibilidad de hacer cruces con otros materiales de importancia agronómica. Además, se realizará con la selección de plantas en campo y poblaciones de semillas derivadas en las etapas M3 y M<sub>2</sub>V<sub>2</sub>.



**Figura 4.** Colección de materiales de café (mutantes y variedades comerciales) establecidos en campo, Campus Tecnológico Local San Carlos.

## Consideraciones finales

Se logró obtener una metodología para evaluar la incidencia y severidad en discos foliares de la roya en el café bajo condiciones controladas.

Se logró corroborar los niveles de tolerancia a la roya en las plantas evaluadas, sin embargo, aún se requiere mayor investigación al respecto.

Se logró establecer una pequeña parcela de colección de los materiales mutantes y variedades comerciales en campo, para futuros estudios de investigación y extensión.

En Costa Rica, el principal café cultivado es Arábica y este ha sido un motor clave en el desarrollo socioeconómico. En nuestro país, la actividad cafetalera beneficia a 38 804 familias productoras de café en ocho regiones del país, que suman más de 91 000 hectáreas, lo que representa un 1.8% del territorio nacional. La importancia de este estudio radica en que si no existen nuevos cultivares para la siembra y producción del café, Costa Rica dejaría de percibir alrededor de \$US 352 billones anuales, con su impacto no sólo a la cadena de valor, si no un 7.7 % del PIB. En este sentido, desde el 2015 la UCR junto con el TEC han venido trabajando en generar soluciones novedosas y prácticas en el área de mejoramiento genético en café, promoviendo el acercamiento efectivo y oportuno con el sector cafetalero.

## Bibliografía

- Alemayehu, D. (2017). Review on genetic diversity of coffee (*Coffea arabica*. L) in Ethiopia. *International Journal of Forestry and Horticulture (IJFH)*, 3(2), 18–27. <https://doi.org/10.20431/2454-9487.0302003>
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderach, P., Anzueto, F., Hruska, A. J., & Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303–321. <https://doi.org/10.1007/S12571-015-0446-9/FIGURES/10>
- Cabral, P. G. C., Maciel-Zambolim, E., Oliveira, S. A. S., Caixeta, E. T., Zambolim, L., Bosa, V., Gerais, M., Mandioca, E., Fruticultura, C., & Das Almas, B.; (2016). Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*, 65(2), 196–204. <https://doi.org/10.1111/PPA.12411>
- Capucho, A. S., Zambolim, E. M., Freitas, R. L., Haddad, F., Caixeta, E. T., & Zambolim, L. (2012). Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 7(1). <https://doi.org/10.1007/s13314-012-0081-7>
- Hernández-Soto, A., Méndez-Navarro, D., Perez, J., Gatica-Arias, A., Vargas-Segura, W., Echeverria-Beirute, F., & Abdelnour-Esquivel, A. (2022). Tolerance to aryloxy-phenoxy-propionate (APP) as a model for Lazarroz FL rice in vitro gamma irradiation variability selection. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1950230/v2>
- Kashtwari, M., Mansoor, S., Wani, A. A., Najjar, M. A., Deshmukh, R. K., Baloch, F. S., Abidi, I., & Zargar, S. M. (2022). Random mutagenesis in vegetatively propagated crops: opportunities, challenges and genome editing prospects. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 49, Issue 6, pp. 5729–5749). <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06650-0>
- Kishor, H., Prabhuling, G., Ambika, D. S., & Abhijith, Y. C. (2017). Chemical induced mutations for development of resistance in banana cv. *Nanjanagudu Rasabale*. *Crop Research*, 52(6), 234–239. <https://doi.org/10.5958/2454-1761.2017.00023.7>
- Kona, P., Kumar, M. H., Reddy, K. H. P., Hemalatha, T. M., Reddy, D. M., Reddy, N. P. E., & Latha, P. (2019). Regeneration and evaluation of somaclones of sugarcane variety Co86032 for yellow leaf disease resistance and yield traits. *Journal of Biosciences*, 44(2). <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9846-x>
- Labouisse, J. P., Bellachew, B., Kotecha, S., & Bertrand, B. (2008). Current status of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources in Ethiopia: Implications for conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(7), 1079–1093. <https://doi.org/10.1007/S10722-008-9361-7/FIGURES/4>

- Mishra, S. N., Pradhan, P. C., Kumar, A., & Kumar, M. (2020). Studies on the Effect of Sodium Azide on the Germination Percentage and Yield Product in Tomato Variety (*Solanum lycopersicum*, LINN) Pusa Sadabahar. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(4). <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.904.009>
- Ramírez, J. 2019. ¿Por qué la roya quebró la resistencia de la variedad CR-95 en cafetales de la Península de Nicoya, Costa Rica? Comunicaciones Técnicas de Café. Número 98. Disponible en: <https://www.ramirezcaficulturadesdecostarica.com/ct-98>
- Talhinhas, P., Batista, D., D. I., Vieira, A., Silva, D., Loureiro, A., & do Céu Silva, M. (2017). Pathogen profile the coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18 (8). <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Toniutti, L., Breitler, J. C., Etienne, H., Campa, C., Doulebeau, S., Urban, L., Lambot, C., Pinilla, J. C. H., & Bertrand, B. (2017). Influence of environmental conditions and genetic background of arabica coffee (*C. arabica* L) on leaf rust (*Hemileia vastatrix*) pathogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.02025>
- Villalta-Villalobos, J., & Gatica-Arias, A. (2019). Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 577–599. <https://doi.org/10.15517/AM.V30I2.34173>

## Sobre los autores

### José Andrés Rojas-Chacón

José Andrés Rojas es estudiante de la maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad (DOCINADE), del TEC, Campus Local San Carlos. (<https://orcid.org/0000-0001-8049-532X>).

### Fabián Echeverría-Beirute

Fabián Echeverría es profesor e investigador de la Escuela de Agronomía del TEC. Ingeniero en biotecnología. Actualmente es el coordinador del Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, San Carlos, Alajuela, Costa Rica. (<http://orcid.org/0000-0002-7238-220X>).

### Andrés Gatica-Arias

Andrés Gatica profesor catedrático e investigador de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Ingeniero en biotecnología. San José, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica. (<https://orcid.org/0000-0002-3841-0238>).