

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Caracterización de *Phytophthora*, agente etiológico de la pudrición negra de la mazorca del cacao en Cuba y Guyana Francesa

Characterization of *Phytophthora*, the etiological agent of black pod rots of cocoa cob in Cuba and French Guiana

Yurelkys Fernández Maura¹, Philippe Lachenaud², Cony Decock³, Amauri Díaz Rodríguez⁴ y Noryaisi Abreu Romero⁴

¹ Universidad de Guantánamo, Facultad Agroforestal, Avenida Che Guevara km 1.5 Carretera Jamaica, Guantánamo, Cuba.

² Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), UPR 106, BP 701, 97398 Kourou Cedex, France.

³ Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (MUCL, BCCMTM), Earth and Life Institute – Microbiology (ELIM), Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2 bte L7.05.06, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

⁴ Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz. El Salvador. Guantánamo, Cuba.

E-mail: yurelkys@cug.co.cu

RESUMEN

La pudrición negra de la mazorca es la enfermedad fúngica de *Theobroma cacao* L. predominante en todas las áreas de su cultivo. Es causada por varias especies de *Phytophthora*. En América Latina, el agente etiológico es diverso y taxonómicamente poco conocido, especialmente en los países pequeños productores como Cuba y Guyana Francesa. En este trabajo, se estudiaron dos sets de cepas de *Phytophthora* aisladas de mazorcas enfermas y originarias de Cuba y Guyana Francesa, y se combinaron aspectos morfológicos, biológicos y moleculares para identificar las especies involucradas. Los análisis filogenéticos fueron realizados basados en la secuencia del ácido desoxirribonucleico en dos lugares geométricos, el espaciador interno transcrito ribosomal y el parcial β -tubulina. Dos especies fueron identificadas en Cuba, nombradas *P. palmivora* y *P. tropicalis*, y dos especies en Guyana Francesa, *P. tropicalis* / *capsici* complex y una nueva especie *Phytophthora* sp. En Cuba, *P. palmivora* fue la especie dominante (98 % de los aislados) y las cepas estudiadas pertenecen al Mating Type A2 (88 de los 90 aislados). En Guyana Francesa, *P. tropicalis* / *capsici* complex fue la especie dominante en el muestreo (7 de 8 aislados).

Palabras clave: espaciador interno transcrito, β -Tubulina, *Theobroma cacao*

ABSTRACT

Black pod is one of the major like-fungal diseases of *Theobroma cacao* L. in all its cultivation areas. It is caused by several species of *Phytophthora*. In Latin America, the etiological agents of the black pod disease are more likely diverse and, in a taxonomic perspective, incompletely known, especially in small producing countries, such as Cuba and French Guiana. In the present work, we studied two sets of *Phytophthora* strains isolated from diseased pods and originating from Cuba and French Guiana, combining morphological, biological and molecular approaches to identify the species involved. Phylogenetic analyses were performed based on DNA sequence data from two loci, ribosomal internal transcribed spacer and partial β -tubulin. Two species were identified in Cuba, *P. palmivora* and

P. tropicalis, and two species in French Guiana, *P. tropicalis* / *capsici* complex and a potential novel *Phytophthora* sp. In Cuba, *P. palmivora* was by far the dominant species (98 % of the isolates) and the strains studied belonged to the Mating Type A2 (88 out of 90 isolates). In French Guiana, *P. tropicalis* / *capsici* complex was the dominant species in our sampling (7 out of 8 isolates).

Keywords: internal transcribed spacer, β -Tubulin, *Theobroma cacao*

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es afectado por varias enfermedades fúngicas en todas las zonas de cultivo. Una de las enfermedades más devastadoras es la pudrición negra de la mazorca, la cual es causada por varias especies de *Phytophthora* (Oomycota). La taxonomía de las especies de *Phytophthora* asociadas al cacao ha sido controversial por largo tiempo. Históricamente, las cepas aisladas de tejidos afectados se identificaron como una sola especie, *P. palmivora*. Brasier y Griffin (1979) reconocieron la presencia de un complejo de especies y más tarde definieron cuatro especies principales: *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici* y *P. citrophthora*. De estas especies, *P. palmivora* es la más devastadora y extendida a nivel mundial (Bailey *et al.*, 2015), mientras que *P. megakarya* es la más agresiva en África (Ploetz, 2016).

En la región de Latinoamérica la situación de las especies de *Phytophthora* asociadas al cacao es la más compleja; están implicados varios taxas, cuyas identidades, diversidad genética, distribución geográfica e impacto están aún bajo discusión (Fister *et al.*, 2016). Esto puede estar ligado al hecho de que América del Sur es el área nativa de *T. cacao* con antiguas poblaciones dispersas a través del cauce del río Amazonas.

Cuba centra la producción de cacao en el municipio de Baracoa, región oriental del país. Esta área posee condiciones climáticas apropiadas para el cultivo; alto nivel de precipitaciones, humedad y temperatura (Hartmann y Larramendi, 2011).

Las plantaciones cubanas de cacao son severamente atacadas por la pudrición negra de la mazorca, en parte debido al pobre manejo de las mismas. Igualmente, la Guyana Francesa es un país pequeño productor de cacao y sus plantaciones (mayormente antiguas, del siglo XIX) están dispersas. No obstante, es posible encontrar poblaciones nativas de *T. cacao* y especies locales de *Phytophthora* en la zona centro-sur del país. Durante estudios previos, un set de cepas de *Phytophthora*, originarias de antiguas plantaciones de cacao fueron tentativamente identificadas

como *P. capsici* (Lachenaud *et al.*, 2015). Sin embargo, en Cuba no se ha realizado un estudio detallado, con el empleo de técnicas modernas de caracterización, para identificar las especies de *Phytophthora* que afectan al cultivo.

El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar dos sets de cepas de *Phytophthora* aisladas de mazorcas enfermas con pudrición negra, originarias de Cuba y la Guyana Francesa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de cepas

Se aislaron noventa cepas de *Phytophthora* de mazorcas con síntomas de pudrición negra, durante varias expediciones a diferentes plantaciones en Baracoa (Tabla 1). Ocho aislados se obtuvieron en la Guyana Francesa (Tabla 2), todos originarios del área de Régina. Los aislados se mantuvieron en agar V8 en un rango de temperatura de 24-29 °C.

Caracterización morfológica

Se observaron varios caracteres morfológicos de las cepas (micelio, esporangio, oosporas, clamidosporas) con un microscopio Olympus BX50. Se tomaron fotografías de las estructuras fúngicas usando el programa Ulead Photo explore SE (V 7.0). El crecimiento del micelio se observó en placa Petri para cada individuo.

Test de cruzamiento

El mating type (MT) de las cepas aisladas de *Phytophthora* se determinó por cruzamientos con las cepas de referencia de MT, A1 y A2 de *P. palmivora* (MUCL 52539 y MUCL 52540) en agar V8. Para realizar los cruces con las 88 cepas cubanas se asumió que estas pertenecían a *P. palmivora*. Cada aislado a estudiar se colocó a un lado de una placa Petri y, en el lado opuesto de la misma se colocó el mating type de referencia. Las placas Petri se incubaron a 25°C, en oscuridad, alrededor de 14 días. Según la aparición de oosporas, los aislados en estudio se clasificaron como mating type A1 y A2 (Tooley *et al.*, 1989).

Tabla 1. Cepas de *Phytophthora* colectadas en Baracoa, Cuba

Zona	Localidad	Cepas		Fecha
Poa, El Chocolate	20°17'19,39"N 74°27'56,10"W	PHYTO15	PHYTO20	Abril, 2009 Abril, 2010
		PHYTO16	Poa1	
		PHYTO17	Poa2	
		PHYTO18	Poa3	
		PHYTO19	Poa5	
Boris Miraflores, El Porvenir	20°13'47,20"N 74°26'45,90"W	PHYTO25	PHYTO30	Abril, 2009
		PHYTO26	PHYTO31	
		PHYTO27	PHYTO32	
		PHYTO28	PHYTO33	
		PHYTO29	PHYTO34	
Lomo de Camagüay	20°30'41,12"N 74°42'34,90"W	CU/09-41	CU/09-42	Noviembre, 2009
		CU/09- PL6812	CU/09-43 CU44	
		CU/09- PL6813	CU0944 CU/0944c CU/09-44d	
		CU/09-50	CU/09-75	
		CU/09-60	CU/09-76	
Juan Romero	20°12'25,86"N 74°23'17,08"W	CU/09-63	CU/09-77	Noviembre, 2009
		CU/09-71A	CU/09JR06	
		CU/09-71B	CU09JR08	
		CU/09-73	CU/09JR10B	
		CU/09-74	CU/09JR11A	
Naranjal del Toa	20°23'49,69"N 74°32'55,62"W	PHYTO36	PHYTO40	Abril, 2009
		PHYTO39		
Arroyo de la vieja finca	20°12'29,52"N 75°38'27,42"W	CU/09-56	CU/09-61	Noviembre, 2009
		CU/0957	CU/09-62	
Capiro, Nueva vista	20°13'06,24"N 74°23'29,34"W	CU0958	Cuba	Noviembre, 2009
		CU/09-59		
Esteban Silot	20°13'34,49"N 74°30'21,89"W	CU/09- SILOT3	CU/09- SILOT5	Noviembre, 2009
Los hoyos de Sabanilla	20°16'51,32"N 74°27'52,87"W	Est1	Est5	Abril, 2010
		Est2	Est6	
		Est3	Est7	
		Est4		
Cayayal	20°15'44,02"N 74°27'51,28"W	Cay1	Cay2	Abril, 2010
Paso de Cuba	20°20'03,72"N 74°28'05,66"W	P-C1	P-C3	Abril, 2010
		P-C2		
Santa Rosa	20°21'20,47"N 74°31'58,65"W	S-R1	S-R2	Abril, 2010
Mabujabo, Silina	20°19'06,92"N 74°26'49,33"W	Mab1	Mab2	Abril, 2010

Tabla 1. Cepas de *Phytophthora* colectadas en Baracoa, Cuba (continuación)

Zona	Localidad	Cepas		Fecha
Guayabo	20°26'24,98"N 74°36'12,74"W	Gua1	Gua2	Abril, 2010
Saibá	20°26'02,89"N 74°36'27,70"W	Sai1		Abril, 2010
San Luis, Victor Prieto	20°18'11,43"N 74°25'56,35"W	S-L2		Abril, 2010
Jamal	20°16'34,65"N 74°25'32,35"W	Jam1		Abril, 2010
Jobo Dulce	20°19'22,55"N 74°26'46,31"W	Job2		Abril, 2010
Sabanilla	20°16'42,11"N 74°27'52,86"W	Hur1		Abril, 2010

Tabla 2. Cepas de *Phytophthora* colectadas en Guyana Francesa

Zona	Localidad	Cepas		Fecha
Régina, Crique Courouaïe, right bank	4°16'07,24"N 51°57'52,13"W	Reg 2-1 Reg 2-3 Reg 2-4 Reg 2-6	Reg 2-7 Reg 2-8 Reg 2-10	Marzo 2009-2014
Régina, Approuague River, left bank	4°20'43,95"N 52°02'01,35"W	Reg 3-1		Marzo 2014

Determinación de secuencias de AND y análisis filogenéticos

Se extrajo el ADN, de micelio fresco, de cepas cultivadas en agar malta a 25°C, en condiciones de oscuridad. Las extracciones se realizaron con el empleo de QIAGEN Dneasy plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany), y posteriormente se purificaron con GeneClean[®] III kit (Q-Biogene, USA), según las recomendaciones del fabricante. Los pares de primer TUBUR1-TUBUF2 (Kroon *et al.*, 2004) y NS7-ITS4 (White *et al.*, 1990) se emplearon para la amplificación de β -tubulin, respectivamente.

Los ensayos de PCR resultaron en una simple banda observada a 0,8 %, m/v, en gel de agarosa, que corresponde aproximadamente a 900 bps (ITS) y 500 bps. Los productos PCR se purificaron con el empleo de QIAquick[®] PCR purification kit (250) (QIAGEN Inc., Hilden, Germany), según las instrucciones del protocolo del fabricante.

Las reacciones de secuenciación se realizaron con el empleo de CEQ DTCS Quick Start Kit[®] (Beckman Coulter Inc), con los primers ITS2, ITS3, e ITS4 (White *et al.*, 1990), Bt2a y Bt2b. Las secuencias de nucleótidos se determinaron con el secuenciador capilar automático CEQ 2000 XL (Beckman Coulter Inc). Inicialmente, las secuencias de nucleótidos se alinearon automáticamente con Clustal X para MacIntosh (version 1.5b), y posteriormente ajustadas manualmente con el editor PAUP* (version 4.0b10).

Los análisis filogenéticos de las secuencias alineadas se realizaron por el método de máxima parsimonia de PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 2002) con los gaps tratados como una quinta base. Los árboles más parsimoniosos se identificaron mediante búsquedas heurísticas con un intervalo de adición de secuencia (1000), max tree set a 100, y una seguida evaluación por análisis de bootstrap, reteniendo los clados compatibles con el 50 % en

el consenso de los árboles en bootstrap. La cepa de *Phytophthora multivora* (CBS 124094) se usó como grupo externo.

Las secuencias de ITS y β -tubulin se compararon con las encodadas en Genbank, con el empleo de la opción de búsqueda del BLAST en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica

Las observaciones microscópicas mostraron que 88 cepas cubanas tienen un patrón de crecimiento petaloide en medio V8. Dos cepas cubanas (CU58 y PHYTO40) y las 8 cepas de la Guyana Francesa mostraron un patrón de crecimiento en crisantemo, en medio V8 (figura 1).

Al microscopio, se observó abundante producción de esporangios, de formas ovoides a elipsoidal, (pedicelio $\leq 4 \mu\text{m}$ de longitud), los cuales tienen un rango entre 38-60 μm en longitud y 27-40 μm de ancho, con un radio L / A (largo / ancho) que varió desde 1.25 a 1.92 (figura 2a). En la figura 2c se observan las clamidosporas formadas, las que presentaron un diámetro de 32.5-43.5 μm . Estas características morfológicas observadas en 88 aislados cubanos, corresponden a las observadas en *P. palmivora* (Ali *et al.*, 2014; Bush *et al.*, 2006).

En dos aislados cubanos (CU58 y PHYTO40) y en todos los aislados de la Guyana Francesa, los esporangios midieron 37-50 μm de longitud y 22-32 μm de ancho, con un radio L / A en una relación 1.8-2.4.

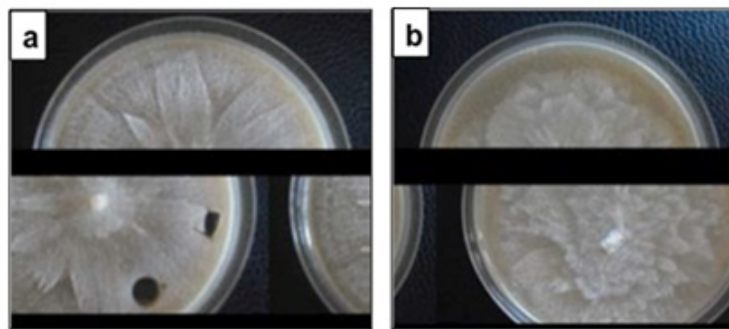


Fig. 1. Características morfológicas de las especies de *Phytophthora* aisladas de cacao en medio agar V8 después de 4 días de crecimiento a 24-29°C, en la oscuridad

a: forma petaloide (cepa MAB1) b: forma crisantemo (cepa CU58)

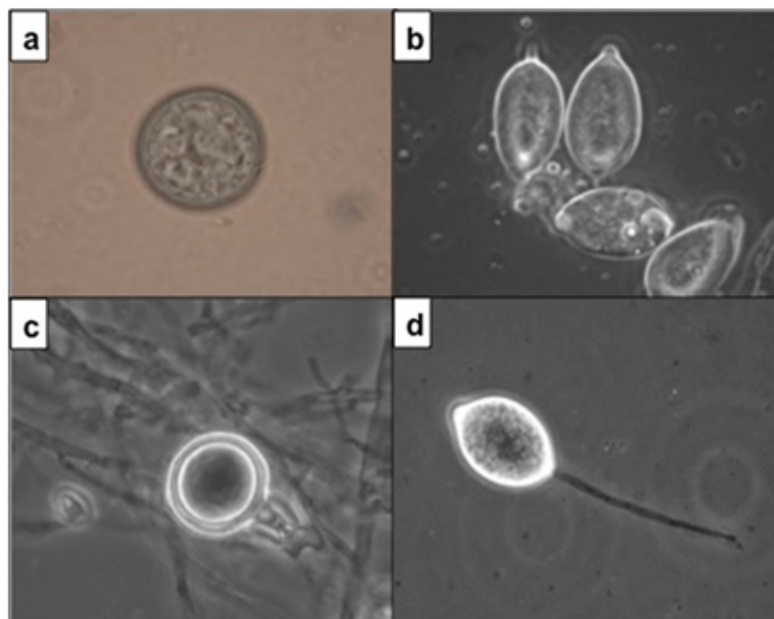


Fig. 2. Estructuras morfológicas de las cepas de *P. palmivora* y *P. tropicalis* aisladas en Cuba. a: oosporas de *P. palmivora* (cepa MAB2) b: esporangio ovoide-elipsoidal de *P. palmivora* (cepa MAB2) c: clamidosporas (cepa MAB2). d: esporangio de *P. tropicalis* (cepa PHYTO40)

En estos esporangios se observó una larga hifa (longitud de 50 µm) (figura 2d). Acorde a estas características estas cepas pertenecen al complejo *P. capsici* - *P. tropicalis* cuyos caracteres morfológicos no permiten distinguirlos (Aragaki y Uchida, 2001).

Cruzamientos

Se encontró que las 88 cepas cubanas eran compatibles con la cepa correspondiente al mating type A, y dio como resultado la formación de oosporas. Las oosporas se observaron con un aspecto globoso, y presentaron un diámetro de 25 µm (figura 2b).

Dos cepas cubanas, CU58 (MUCL 55783) y PHYTO40 (MUCL 55782), resultaron estériles en presencia de cada uno de los mating type de referencia de *P. palmivora*.

Análisis filogenéticos

Las cepas de *P. palmivora* comparadas mostraron un alto grado de similaridad (figuras 3, 4); con una pequeña variación intraespecífica en las regiones de ADN analizadas. Basados en esto, una selección de cepas se utilizó en la construcción de árboles filogenéticos de la región ITS y el gen TEF1- α. Se observó un máximo de 5 bp entre los 700 pares de bases de

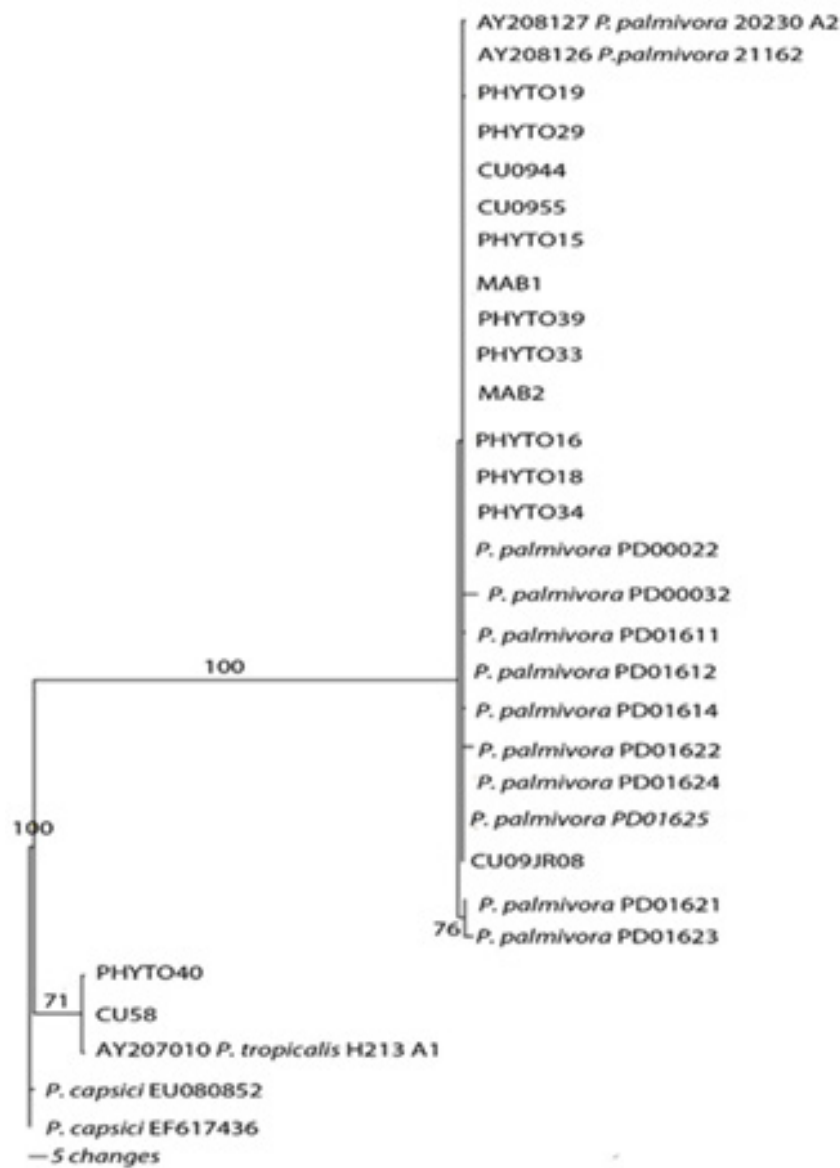


Fig. 3. Árbol filogenético que muestra las cepas cubanas de *Phytophthora* basado en las secuencias de la región ITS, inferido por análisis de máxima parsimonia

*Los números en los nodos indican los valores de soporte de bootstrap

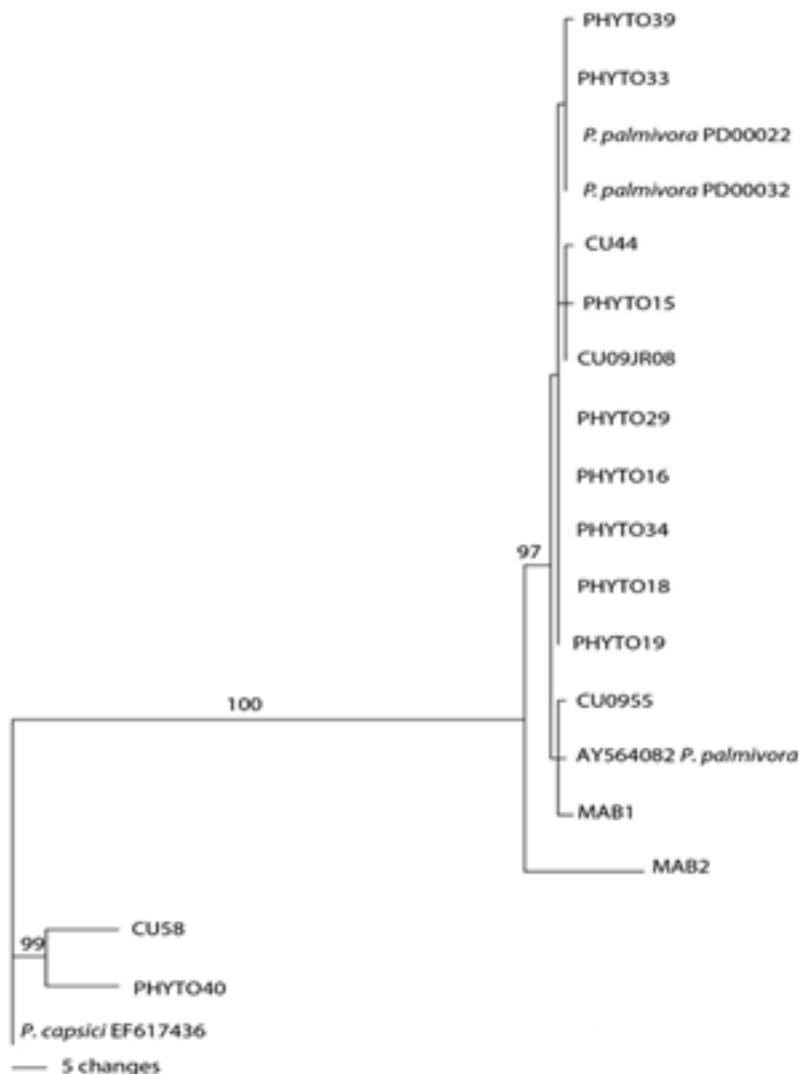


Fig. 4. Árbol filogenético que muestra las cepas cubanas de *Phytophthora* basado en las secuencias del factor de elongación 1 α gene, inferido por análisis de máxima parsimonia
 *Los números en los nodos indican los valores de soporte de bootstrap

longitud de la región ITS, lo que corresponde a una proporción de sitios variables de alrededor de 0,01. La región TEF1- α de 1000 pares de bases de longitud fue más variable con un máximo de 20 bp diferentes, lo que corresponde a una proporción de sitios variables de alrededor de 0,02 bp.

Complejo *P. tropicalis* / *capsici* β -tubulin data set

Los análisis filogenéticos de β -tubulin incluyeron 40 taxa y *P. multivora* (CBS 124094) como grupo externo. El set de datos contó con un total de 865 bp, de los cuales 67 fueron informativos para la parsimonia. El análisis resultó en 981 árboles más parsimoniosos (MPT) (140 steps in length, CI = 0,771, RI = 0,904), de

las 1000 búsquedas heurísticas. De estos árboles se seleccionaron dos topologías concurrentes para las cepas de la Guyana Francesa (figuras 5 y 6). Estas topologías forman un clado bien soportado, pero las afinidades no están bien soportadas.

En los árboles filogenéticos y en todas las secuencias utilizadas (ITS, β -tubulin), los aislados de Cuba (CU58, PHYTO40) tentativamente identificados como *P. tropicalis* / *capsici* complex se agruparon en el clado *P. tropicalis* s.s.; este clado contiene a la cepa tipo de *P. tropicalis* (CBS434.91), otras cepas de varios orígenes y varios hospederos y está bien soportado. Las cepas cubanas difieren de *P. tropicalis* (type) en 4 a 5 bp, 6 a 7bp, 3 a 5bp, en ITS y β -tubulin, respectivamente.

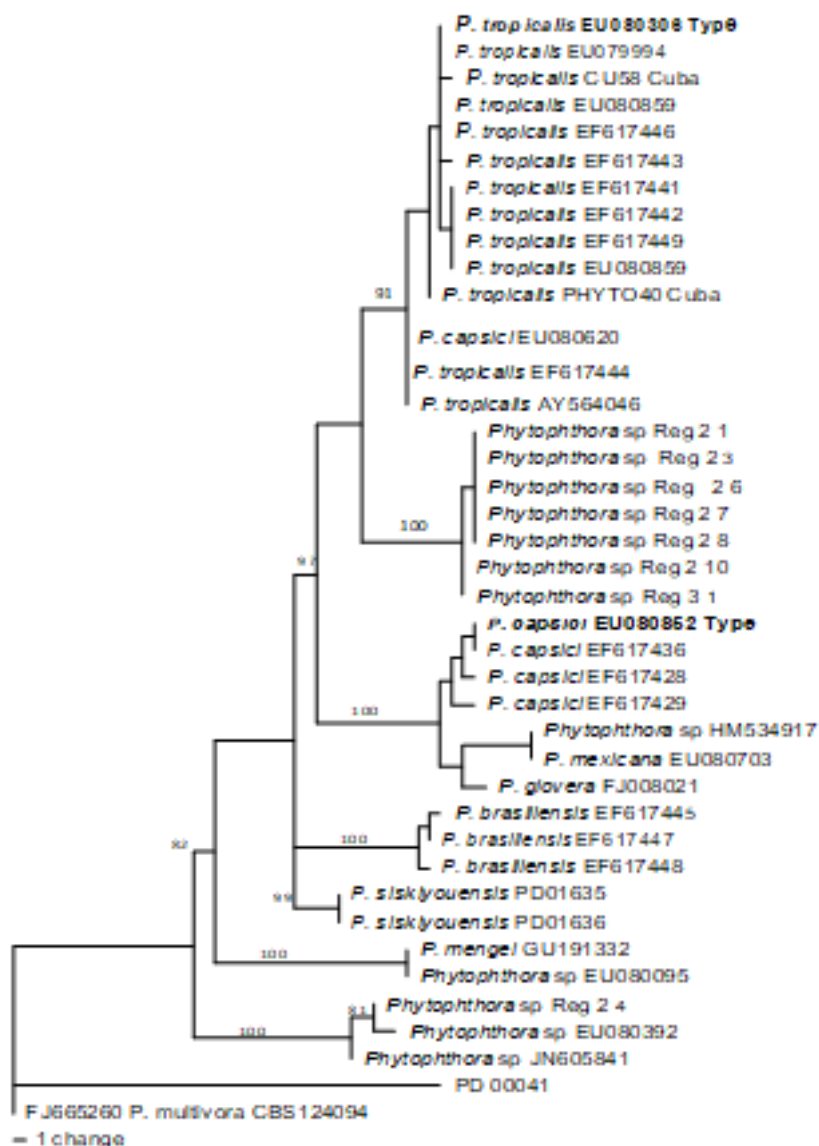


Fig. 5. Árbol filogenético que muestra las cepas cubanas de *Phytophthora* basado en las secuencias del gen β -tubulin, inferido por análisis de máxima parsimonia (topología más frecuente)

*Los números en los nodos indican los valores de soporte de bootstrap

En negrita las cepas tipo de *P. tropicalis* y *P. capsici*

Los aislados de la Guyana Francesa tentativamente identificados como *P. capsici* (Lachenaud *et al.*, 2015) se ubicaron en todas las filogenias en dos diferentes linages, lo cual está correlacionado con sus diferencias morfológicas.

El primer “clado” comprende 7 cepas mientras el segundo clado contiene una cepa (Reg 2-4). El linage Reg 2-4 fue en todas las filogenias, distantemente relacionado con *P. tropicalis* y *P. capsici* linage. Las otras 7 cepas forman un clado bien soportado en los tres análisis filogenéticos, aquí referido como “Guyana linage”.

En las inferencias filogenéticas basadas en los análisis de β -tubulin, el linage de Guyana formó un

clado bien soportado (Bootstrap 100) que se ubicó en una posición aislada. Sin embargo, sus afinidades no están resueltas. Se obtuvieron topologías concurrentes del análisis individual de cada gen, en su topología dominante (figura 5), el clado de Guyana fue asociado al clado de *P. tropicalis* (type). En la topología menos frecuente (figura 6), este clado se asoció a *P. capsici*. No obstante, ninguna de estas posiciones fue bien soportada.

CONCLUSIONES

Dos especies de *Phytophthora* son causantes de la pudrición negra de la mazorca del cacao en

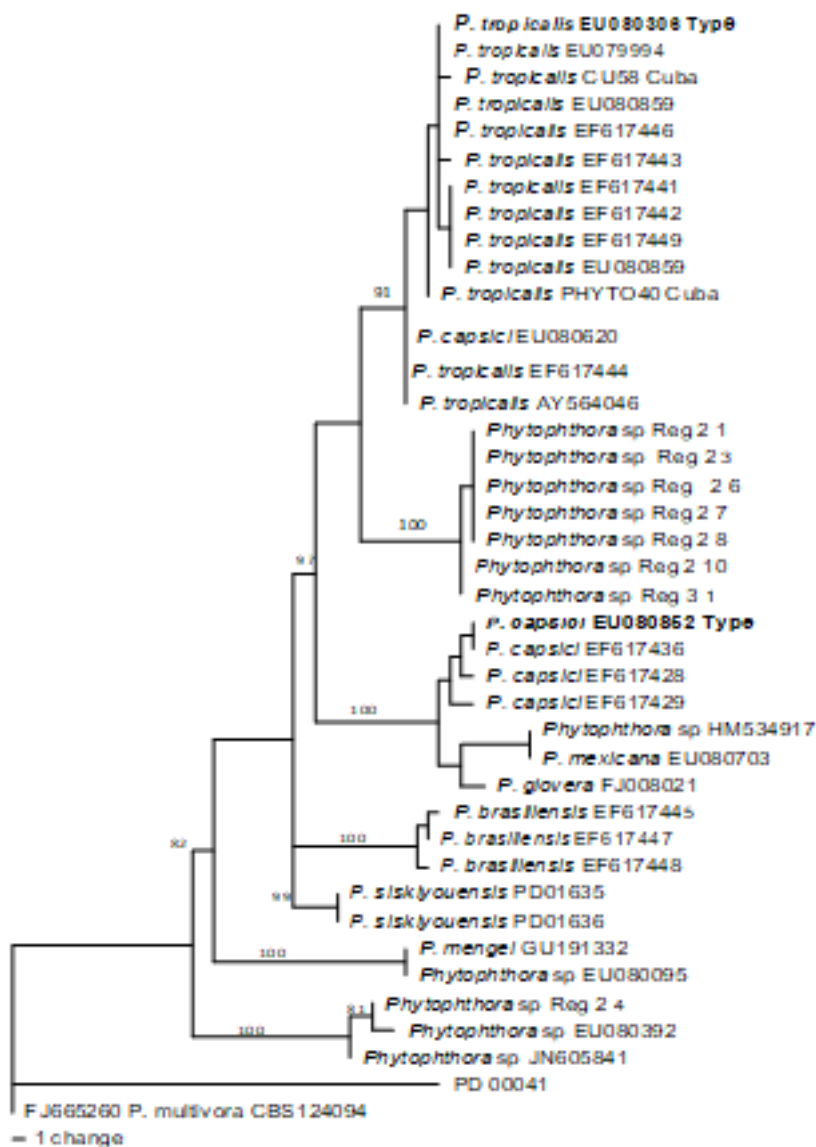


Fig. 6 Árbol filogenético que muestra las cepas cubanas de *Phytophthora* basado en las secuencias del gen β -tubulin, inferido por análisis de máxima parsimonia

*Los números en los nodos indican los valores de soporte de bootstrap
En negrita las cepas tipo de *P. tropicalis* y *P. capsici*

Cuba, viz. *P. palmivora*, la cual fue predominante en nuestro muestreo y *P. tropicalis*, detectada con una baja frecuencia.

En la Guyana Francesa se identificaron dos especies de *Phytophthora*, de ellas *P. tropicalis* / *capsici* complex dominante en nuestro muestreo y una nueva especie representada por un simple aislado.

BIBLIOGRAFÍA

- ALI, S. S., MELNICK, R. L., CROZIER, J., PHILLIPS-MORA, W., STREM, M. D. and SHAO, J. 2014. Successful pod infections by *Moniliophthora roreri* result in differential *Theobroma cacao* gene expression depending on the clone's level of tolerance. *Mol. Plant Pathol.*, 15: 698–710.
- ARAGAKI, M. and UCHIDA, J. Y. 2001. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. Nov. *Mycologia*, 93(1).137-145.
- BAILEY, B. A., ALI, S. S., AKROFI, A. Y., MEINHARDT, L. W. 2015. *Phytophthora megakarya*, a causal agent of black pod rot in Africa, in Cacao Diseases: A History of Old

- Enemies and New Encounters, eds. Bailey, B. A., Meinhardt, L. W., editors. New York, NY: Springer International Publishing, 267–303.
- BRASIER, C. M. and GRIFFIN, M. J. 1979. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. *Trans. Bri.Mycol. Soc.*, 52:273-279.
- BUSH, E. A., STROMBERG, E. L., HONG, C., RICHARDSON, P. A. and KONG, P. 2006. Illustration of Key Morphological Characteristics of *Phytophthora* Species Identified in Virginia Nursery Irrigation Water. *Plant Health Progress*, DOI: 10.1094/PHP-2006-0621-01-RS.
- FISTER, A. S., MEJIA, L. C., ZHANG, Y., HERRE, E. A., MAXIMOVA, S. N. and GUILTINAN, M. J. 2016. *Theobroma cacao* L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. *BMC Genomics*, 17:363 10.1186/s12864-016-2693-3.
- HARTMANN, A. and LARRAMENDI, J. 2011. Baracoa, birthplace of cacao in Cuba. Editorial Stockmans Publishing.
- KROON, L., BAKKER, F. T., VAN DEN BOSCH, G. B. M., BONANTS, P. J. M. and FLIER, W.G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 766-782.
- LACHENAUD, Ph., ROSSI, V., THEVENIN, J. M. and DOARE, F. 2015. The Guiana genetic group: a new source of resistance to cacao (*Theobroma cacao* L.) black pod rot caused by *Phytophthora capsici*. *Crop Protection*, 67:91-95.
- PLOETZ, R. 2016. The impact of diseases on cacao production: a global overview. In: Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., editors. Cacao diseases. Springer International Publishing, New York, USA. p. 33–59,
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP*- Phylogenetic Analysis Using Parsimony- (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TOOLEY, P., THERRIEN, C., RITCH, D. 1989. Mating type, race composition, nuclear DNA content, and isozyme analysis of Peruvian isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 79: 478-481.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. Innis M. A. *et al.* eds., Academic Press, New-York, pp. 315-322.

Recibido el 9 de mayo de 2017 y aceptado el 15 de junio de 2018