

Fitopatología

Caracterización molecular de *Phytophthora*, agente causal de la pudrición parda del cacao en Cuba

Yannolis Matos-Cueto,* Gelasio A. Matos-Alonso,** Damien Hubeaux*** y Cony Decock****

Resumen

Las especies de *Phytophthora* representan un género de patógenos devastadores de los vegetales, y por consiguiente son la causa de importantes pérdidas económicas. En Cuba es uno de los problemas fundamentales que afectan la producción del cacao. La necesidad de una caracterización actual de los agentes patógenos del fruto condujo a la realización de este trabajo en la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica), desde septiembre de 2010 hasta marzo de 2011. Se analizaron las características moleculares de *Phytophthora* con el objetivo de estudiar la diversidad genética, utilizando técnicas de caracterización molecular como la huella molecular (Fingerprinting M13) y el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Se analizaron 90 muestras del microorganismo, aisladas de plantaciones de Baracoa, provincia de Guantánamo, mayor productor del cultivo en el país. Los resultados mediante el programa CEQ8000 (Beckman Coulter) mostraron que solo dos cepas resultaron ser de la especie *tropicalis*; las otras 88 correspondieron a la especie *palmivora*. Se encontró la presencia exclusiva del tipo A2 en las cepas de *Phytophthora palmivora* B., lo que conlleva a inferir la ausencia de recombinaciones sexuales y la existencia de una población clonal en Cuba. Se observó un débil índice de diversidad genética sin una distribución particular en las plantaciones de esta localidad.

Palabras clave: cacao, *Phytophthora*, diversidad genética, patógeno, producción.

Abstract

Phytophthora's sorts represent pathogenic devastators's kind of the vegetables and for resulting music the cause of important economic losses. In Cuba one becomes of the fundamental problems that affect the production of the cocoa. The need of present-day characterization of the fruit's pathogens, was led to the realization of this work at Lovaina's Catholic University (Belgium) from September 2010 to March 2011. Were examined *Phytophthora's* molecular characteristics, for the sake of going into genetic diversity, utilizing techniques of molecular characterization like the molecular footprint (Fingerprinting M13) and the polymorphism of length of fragments amplified (AFLP). They examined the microorganism's 90 signs, isolated of Baracoa's plantations, Guantánamo province, the bigger producer of harvest at the country. The aftermath obtained intervening the program CEQ8000 (Beckman Coulter), they showed that only 2 ancestries turned out to be of sort *tropicalis*, the others 88 reciprocated to the sort *palmivora*, the *palmivora* found the exclusive presence of the fellow A2 in *Phytophthora's* ancestries, that entails to infer the absence of sexual combinations and population's existence clonal in Cuba. A weak index of genetic diversity without a particular distribution at this locality's plantations was observed.

Key words: cocoa, *Phytophthora*, genetic diversity, pathogenic, production.

Recibido:19/12/2012

Aprobado:23/1/2013

*Estación Experimental Agro-Forestal Baracoa. Guantánamo, Cuba.

**Estación Experimental Agro-Forestal Baracoa. Guantánamo, Cuba.

***Facultad de Agronomía, Biología y Medio Ambiente. Universidad Católica de Lovaina, Bélgica.

****Facultad de Agronomía, Biología y Medio Ambiente. Universidad Católica de Lovaina, Bélgica.

Introducción

El cultivo y uso del cacao (*Theobroma cacao* Lin.) ha estado presente a lo largo de la historia de América Latina. Aun antes de la llegada de los conquistadores, el cacao tiene importancia para las comunidades indígenas. En Brasil su cultivo continúa siendo importante en los ecosistemas tropicales húmedos. En Meso América ya no tiene la importancia económica y cultural de antaño. Sin embargo, aún constituye un cultivo importante en determinadas regiones y comunidades, tales como Boca del Toro (Panamá), Salamanca (Costa Rica) y la costa norte de Honduras (Beer, 1997).

Guest (2007) indica como enfermedad importante en las plantaciones cacaoteras a la pudrición negra o parda, que afecta actualmente la totalidad de los países productores.

Esta enfermedad, causada por *Phytophthora* spp., es la más importante en las plantaciones de cacao (Mayer, 1983; Blaha y Lotodé, 1976).

Akaza (2009) especifica que los destrozos que provoca esta enfermedad varían de un país a otro, en dependencia de las diferentes especies, y señala las cuatro principales: *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora megalakarya*, *Phytophthora affinis capsici* y *Phytophthora affinis citrophthora*.

En Cuba la especie que se encuentra presente causando las mayores pérdidas económicas en el cultivo de *Theobroma cacao* es *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. (Blaha, 1985, citado por Matos *et al.*, 2002).

Las especies del género *Phytophthora* pertenecen a los Oomycetes con crecimiento filamentosos, característica que los había ubicado entre los hongos. Sin embargo, estudios del metabolismo, composición de la pared celular y fundamentalmente la secuenciación de ARNr indican que los Oomycetes tienen más similitud con las chrysophytas, diatomeas y algas pardas (Judelson, 1997; Andersen, 2004). Pertenecen a la clase Oomycetes, orden Peronosporales, familia Pythiaceae (Código Internacional de Nomenclatura Botánica, 2008).

Una nueva caracterización, teniendo en cuenta la nueva clasificación del género *Phytophthora* dentro del reino de los Protistas, utilizando tecnologías novedosas de análisis molecular, nos puede dar una idea más clara de las especies que se encuentran actuando sobre el cacao en Cuba, y nos ayudará a trazar medidas de lucha más eficientes y específicas; por tanto, el objetivo de

nuestra investigación es aislar, identificar y caracterizar a *Phytophthora*, agente causal de la pudrición negra de la mazorca en Baracoa.

Materiales y métodos

El trabajo comenzó en el municipio de Baracoa, provincia de Guantánamo, durante el período comprendido entre abril de 2009 y marzo de 2011, con el objetivo de aislar, identificar y caracterizar a *Phytophthora*, agente causal de la pudrición negra de la mazorca en Baracoa. Para ello se realizó un muestreo de mazorcas dañadas por dicha enfermedad, en numerosas fincas cacaoteras de la región. Se tuvo en cuenta en cada caso las características edafoclimáticas y topográficas, y se hicieron anotaciones en la libreta de campo.

Las muestras extraídas fueron trasladadas al Laboratorio de Micología (MBLA) de la Facultad de Ingeniería Biológica, Agronómica y Medio Ambiental de la Universidad Católica de Lovaina, en Bélgica, en placas de Petri con medio de cultivo Agar V8, con productos antibióticos y selladas con parafilm para evitar la contaminación por otros agentes exteriores.

Para lograr la replicación y purificación del material vivo extraído se preparó nuevamente el medio de cultivo óptimo donde se desarrolló el patógeno *in vitro* para su estudio en el laboratorio. En este caso utilizamos el Agar V8.

Después de preparar el medio de cultivo se procedió a la siembra de los microorganismos. Luego estas placas fueron trasladadas al cuarto de incubación, donde estuvieron en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente de 23 a 25 °C por un período de 8 a 10 días. Luego se observó a simple vista, y con la ayuda del estereoscopio el crecimiento micelial en el interior de la placa para observar las diferentes estructuras reproductivas asexuales (esporangios, zoosporas y clamidiosporas) nos auxiliamos de una preparación al microscopio óptico de la marca Olympus BX50, utilizando preferentemente el ácido láctico y el ocular de 40X para una mejor visualización. Esto nos permitió ver las estructuras reproductivas (asexuales) y el micelio, así como sus características morfológicas para observar las estructuras sexuales (oosporas), y se realizó una prueba de apareamiento (*mating types*). Para esta prueba se utilizaron dos cepas de referencia, una del tipo A1 y otra del tipo A2.

Para la identificación de las especies a partir de la extracción del ADN, utilizando un kit de extracción llamado innuPREP Plant DNA Kit, se emplearon técnicas de análisis moleculares de las muestras, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Fingerprinting y Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP). A partir de los datos obtenidos se realizó una búsqueda en internet y se pudieron conocer las especies implicadas en las muestras estudiadas.

Resultados y discusión

Los resultados muestran la presencia de dos especies de *Phytophthora*, afectando la producción de este cultivo. De las 90 muestras analizadas, 88 resultaron ser de la especie *palmivora* para un 97,8 %, y solo dos muestras fueron de la especie *tropicalis*, que representan un 2,2 %. Esta última se encuentra por primera vez afectando los frutos del cacao en Cuba, aunque con una débil influencia, como muestran los resultados anteriores.

Blaha (1986) señala las cuatro principales especies que afectan indistintamente al cultivo en el mundo. Ellas son *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora megakarya*, *Phytophthora afin capsici* y *Phytophthora afin citrophthora*. De ellas, la más desastrosa es la especie megakarya, que se encuentra localizada en el noroeste de África, donde se concentran los mayores productores, y como especie más extendida la *palmivora*, que afecta la totalidad de los países productores.

En anteriores estudios realizados por Blah (1985), citado por Matos (1989), refieren la presencia de *Phytophthora palmivora* B. como principal especie que ataca el cultivo del cacao en Cuba, principalmente en la región de Baracoa, mayor productor de este rublo económico en el país.

Resultados similares fueron alcanzados por Hu-beaux (2010) al analizar muestras provenientes de plantaciones de cacao en Baracoa, provincia de Guantánamo, Cuba.

Estos resultados evidencian la presencia de una nueva especie para Cuba en el cultivo del cacao que, aunque es ínfima, se le debe seguir de cerca para observar su ciclo de vida y agresividad con el objetivo de trazar medidas de manejo que combatan su proliferación.

La *fig. 1* muestra la diferencia entre las dos especies encontradas, reveladas sobre un gel de electroforesis.

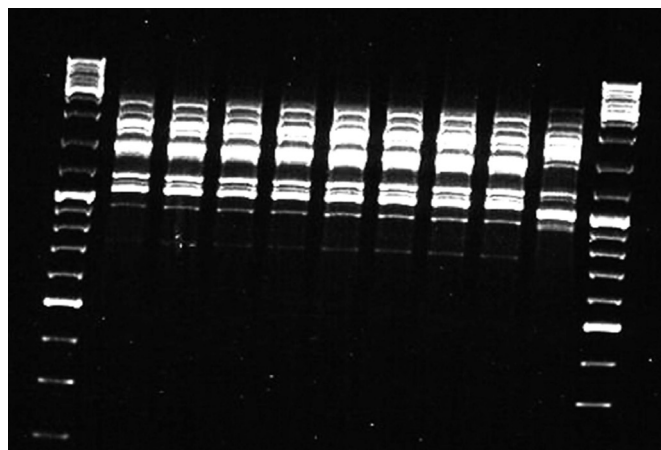


Fig. 1. Muestras reveladas sobre un gel de electroforesis.

Por otra parte, se observa en Cuba la presencia del *mating types A₂* en el 100 % de las cepas analizadas de *Phytophthora palmivora* B. hasta el momento. Según Decock (2011), comunicación personal, en la mayoría de los países de Centro y Sur América, donde se cultiva el cacao, generalmente se encuentra el *mating types A₂*.

Conclusiones

- Se encuentran dos especies de *Phytophthora*, provocando daños al cultivo del cacao en Cuba (*palmivora* y *tropicalis*).
- Se evidencia la presencia del *mating types A₂* en las cepas de *Phytophthora palmivora* B. estudiadas.
- Se reporta por primera vez en Cuba la especie *Phytophthora tropicalis*, como otra especie causante de la enfermedad pudrición parda del fruto del cacao.

Bibliografía

- Akaza, M.J., J.A.K. N'Goran, S-P.A. N'Guetta, Kébé, I., Tahi, G.M., Sangaré. Resistance to *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler Assessed on Leaf Discs of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Hybrid Trees. *Asian Journal of Plant Pathology*. 3 106-118, 2009.
- Andersen R. A. A historical review of heterokont phylogeny. *Jpn. J. Phycol.* 52 (Suppl):153-162, 2004.
- Beer, J. *Theobroma cacao*: un cultivo Agroforestal. *Agroforestería en las Américas* 6 (22): 4, 1999..
- Blaha, G. & R. Lotode. Un criterio primordial de selection du cacaoyer au Camerum: La resistance á la pourriture brune des cabosses (*Phytophthora palmivora*). *Cafe, Cacao, Thé*. 20 (2): 97-116, 1976.

Guest, D. Black Pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology* 97:1650-1653, 2007.

Hubeaux D. Caractérisation du *Phytophthora*, agent de la pourriture brune de la cabosse, à Cuba. Ottignies: Louvain La Neuve. Belgique: Université Catholique de Louvain.; p. 84, 2010.

Judelson, H. The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetic and Biology*. 22: 65-76, 1997.

Matos G. A y G. Blaha. Pérdidas por *Phytophthora palmivora* y otros agentes en plantaciones de cacao para las condiciones de Baracoa. *Cienc. Téc. Agric. Café Cacao* 1(2):7-11, 1989.

Matos G. A., W. Lambertt, M. Menéndez, F.F. Selva, A. Oliveros, A. Nariño & A. Columbié. Prueba de resistencia a *P. palmivora* de 81 clones de Th. cacao Lin. (*Café Cacao* 3(1): 82-83, 2002.

Mayea, S., Y. Herrera & C.M. Andréu. *Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba*. La Habana: Ed. Pueblo y Educación, p. 425, 1983.

RECONVERTIR FINCAS CAFETALERAS EN UNIDADES DIVERSIFICADAS CON PRODUCCIONES SECUNDARIAS ASOCIADAS Y COMO FUENTE DE INGRESO ADICIONAL AL PRODUCTOR



El modelo de producción cafetalero debe estar orientado hacia una agricultura sostenible, que permita el equilibrio del cultivo con su entorno, garantice la estabilidad económica del productor y contribuya a la seguridad alimentaria de la población, con su consiguiente aporte a la conservación del medio ambiente.

Los frutales bien orientados dentro del agroecosistema cafetalero juega un papel importante para lograr estos objetivos. El aguacate (*Persea americana* Mill.), la guanábana (*Annona muricata* L.), pueden cultivarse dentro del cafetal en pequeñas proporciones y fuera de este en áreas puras o asociados a otros cultivos, así como en guardarrayas, límite territorial y áreas marginales. La piña (*Ananas comosus* L. Merr.) puede ser plantada a curva en contorno como barrera viva.

El mango (*Mangifera indica* L.), los cítricos, las sapotáceas, el tamarindo (*Tamarindus indica* L.), diversas especies de anonáceas, la guayaba (*Psidium guajava* L.), la fruta bomba (*Carica papaya* Lin.), entre otros, deben ser orientadas en la periferia del cafetal o en áreas destinadas para este fin.

Otro grupo de especies frutales con características muy singulares pueden ser muy útiles en la agricultura familiar para plantar en patios de viviendas y pequeñas parcelas. Las más significativas son la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), el maracuyá (*Passiflora edulis*), la acerola (*Malpighia emarginata* Sesséet Moc) y el higo (*Ficus carica* L.). Este último se adapta bien a las condiciones de Cuba.

En este sentido, en las montañas de Cuba existen enormes potencialidades productivas, pues existen suelos de buena calidad.

Para mayor información contactar con: agrotecnia3@tercerfrente.inaf.co.cu