

ARTÍCULO ORIGINAL

## Diversidad genética de *Phytophthora* spp. en plantaciones venezolanas de cacao mediante marcadores ISSR

Sandy Molina<sup>I</sup>, Simón Pérez-Martínez<sup>I,II</sup>, Jhonny Demey<sup>I</sup>, María Alejandra Isturiz Zapata<sup>I</sup>,  
Daynet Sosa<sup>III,IV,\*</sup>

<sup>I</sup>Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle de Sartenejas. Baruta - Miranda, Venezuela. <sup>II</sup>PROMETEO-SENESCYT Universidad Estatal de Milagro (UNEMI), Milagros, Guayas, Ecuador. <sup>III</sup>Facultad de Ingeniería (UNEMI), Milagros, Guayas, Ecuador.  
<sup>IV</sup>Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Guayaquil, Ecuador.

**RESUMEN:** *Phytophthora* spp. engloba cuatro especies responsables del cáncer del tronco y mancha negra de la mazorca en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Venezuela. *Phytophthora palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler es la de mayor distribución, seguida de *Phytophthora megasperma* Drechsler, *Phytophthora capsici* Leonian y *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian. Con el objetivo de conocer la base genética de la población de *Phytophthora* spp. de cacao se analizó la diversidad mediante marcadores moleculares, tipo ISSR. Se realizaron muestreos en fincas productoras de las tres principales zonas cacaoteras de Venezuela. Se identificaron morfológicamente 49 aislados de *Phytophthora* spp. hasta género, a partir de los cuales se generaron los perfiles genéticos con tres, de los seis iniciadores ISSR (880, 888 y 890). Se generó una matriz de 49x55 que se analizó mediante Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), Análisis de Conglomerados y el ajuste de un Biplot Logístico Externo (BLE). Los iniciadores ISSR permitieron la construcción de la huella genética de los aislados estudiados, la misma no mostró asociación con el sitio de origen. El ACoP diferenció tres grupos principales, los cuales pudieran ser predictivos de al menos tres especies y que a su vez serían las más frecuentes que afectan a las plantaciones de cacao del país. Al mismo tiempo, el BLE permitió identificar que del total de 55 fragmentos amplificados, solo tres bandas del iniciador 888 intervienen directamente en la separación de los grupos (1.400pb, 3.200pb y 4.600pb). De este modo, BLE posibilita analizar la relación entre los aislados y, al mismo tiempo, la relación entre aislado-alelo y alelo-alelo.

**Palabras clave:** cacao, ISSR, diversidad genética, *Phytophthora*.

---

### Genetic diversity of *Phytophthora* spp. from Venezuelan cacao plantations by ISSR markers

**ABSTRACT:** *Phytophthora* spp. comprises four species responsible for canker of the trunk and black pod of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Venezuela. *Phytophthora palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler is the most widely distributed species, followed by *Phytophthora megasperma* Drechsler, *Phytophthora capsici* Leonian, and *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian. In order to understand the genetic basis of the population of *Phytophthora* spp. on cacao, its diversity was analyzed by ISSR molecular markers. Samples from the three main cocoa growing areas of Venezuela were collected. Forty nine isolates were morphologically identified at the genus level, from which genetic profiles were generated with three out of six, ISSR primers (880, 888 and 890). A matrix 49x55 was analyzed by Principal Coordinates Analysis (ACoP), Cluster Analysis and External Logistics Biplot (BLE). The ISSR primers allowed the construction of the genetic fingerprinting of the isolates; it showed no association with the site of origin. The ACoP distinguished three main groups, which could be predictive of at least three species, which in turn would be the most frequently affecting cocoa plantations in the country. At the same time, BLE enabled us to identify that, of the total of 55 amplified fragments, only three bands of the primer 888 (1.400pb, 3.200pb, and 4.600pb) were directly involved in the separation of the groups. Thus, BLE showed not only the relationship among isolates, but at the same time the relationship between isolate-allele and allele-allele.

**Key words:** cacao, ISSR, diversity, *Phytophthora*.

---

\*Autor de Correspondencia: Daynet Sosa. Correo electrónico: [daynet.sosa@gmail.com](mailto:daynet.sosa@gmail.com).

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos de Venezuela con una tradición que data desde la época colonial hasta nuestros días. Su excelencia radica especialmente en su aroma, por lo que se considera uno de los cacaos más finos del mundo. A pesar de las condiciones óptimas que poseen los ecosistemas venezolanos para la producción de cacao, existe una fuerte incidencia de enfermedades fungosas, las cuales son uno de los principales problemas de producción del rubro que merman las áreas en producción y la cantidad de almendras (1).

*Phytophthora* spp. es el agente causal del cáncer del tronco y pudrición o mancha parda o negra de la mazorca; género responsable de las enfermedades más devastadoras en plantas dicotiledóneas (2). Debido a esta enfermedad, las pérdidas mundiales se calculan alrededor de 450.000 toneladas métricas, lo que representaría alrededor del 20 al 25% de la cosecha esperada (3). En la actualidad se conoce que en cada continente existe un complejo de especies responsable de la enfermedad que está integrado por *Pytophthora arecae* (Coleman) Pethybridge, *Pytophthora capsici* Leonian, *Pytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian, *Pytophthora megakarya* Brasier & Griffin, *Pytophthora megasperma* Drechsler, *Pytophthora nicotianae* B. de Haan. var. *parasitica* (Dastur) Waterh y *Pytophthora palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler (3). Solo *P. palmivora* se encuentra distribuida a nivel mundial en todas las zonas productoras de cacao, puede causar, en América Central y el Caribe, hasta el 100% de pérdidas en años muy lluviosos (2).

En Venezuela se señalaron, como agentes causales de esta enfermedad, a cinco especies de *Phytophthora*, a saber: *P. palmivora*; *P. parasitica*; *P. citrophthora*; *P. megasperma* y *P. capsici*, de las cuales solamente *P. palmivora* se encuentra presente en todas las zonas productoras del país (1). Las otras especies presentan una distribución geográfica diferencial: se han identificado a *P. capsici* y *P. citrophthora* en la región centro norte costera; en la zona sur del Lago de Maracaibo -zona sur-occidental-, donde se cultivan cacaos criollos «Porcelana» y «Guasare», exclusivos de la región, se identificó a *P. megasperma* (1,4); esta misma especie se encuentra en la zona nororiental, específicamente en la cuenca de Río Caribe, según los autores citados previamente.

El desarrollo y la evolución de técnicas basadas en el estudio del ADN incrementaron la capacidad para identificar y delimitar aislados desconocidos de *Phytophthora* (5). La variación en las secuencias de

tres genes nucleares (el espaciador interno transcrito (ITS), el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1) y el de la  $\beta$ -tubulina) y de dos genes mitocondriales (la subunidad I de la citocromo oxidasa C y la subunidad de la NADH deshidrogenasa), se han convertido en buenos indicadores de la diversidad de *Phytophthora* a nivel de especie (2). También, la diversidad y las relaciones filogenéticas del género se analizaron con otros marcadores moleculares, como son: RAPDs, AFLP, SSR e ISSR. Estos estudios permiten la identificación de nuevas especies, la detección de variaciones dentro y entre poblaciones de diferentes orígenes geográficos y el establecimiento de un consenso filogenético dentro del género, entre otros (5,6). Los marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat, en inglés) han permitido la detección de polimorfismos a nivel inter e intraespecífico en *Phytophthora* spp. (7,8). Por lo tanto, representan una alternativa de gran confiabilidad en estudios de diversidad genética de especies del género *Phytophthora*.

Los estudios de *Phytophthora* spp. que afectan el cultivo del cacao en Venezuela son escasos, de los cuales se pueden nombrar los de Capriles (9) y otro mencionado en 2009 (1) que se basan en la morfología y/o fisiología de los aislados. Al presente no se dispone de información genética publicada. Considerando las posibilidades de los marcadores ISSR en el conocimiento de la base genética de la población del patógeno, el presente trabajo analiza la diversidad genética de *Phytophthora* spp. en plantaciones venezolanas de cacao mediante el empleo de marcadores moleculares ISSR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo, aislamiento e identificación de especímenes:** Se realizaron muestreos en las tres principales zonas cacaoteras de Venezuela: la zona nororiental conformada, en orden de producción cacaotera, por los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro; la zona centro norte costera, formada por los estados Miranda, Aragua y Carabobo; y la zona sur-occidental, conformada principalmente por la cuenca Sur del Lago de Maracaibo que abarca los estados Zulia y Mérida, en esta zona también se incluyen los estados Apure, Barinas y Táchira. Se seleccionaron parcelas utilizando un muestreo no probabilístico –a conveniencia- aquellas parcelas que, en previa observación, presentaban síntomas de cáncer del tronco y mancha parda de la mazorca. El posible sesgo sistemático, debido al muestro de conveniencia, fue corregido al seleccionar las plantas de forma aleatoria dentro de cada parcela. Dentro de cada parcela, que fue

seleccionada por presentar síntomas, se realizó un reconocimiento y se ubicó una población de 100 plantas. En cada parcela se hizo un recorrido al azar y de cada 10 plantas se tomaron muestras de frutos, ramas, hojas y cojines florales con presencia de síntomas de mancha parda. Las muestras colectadas se procesaron en menos de 24 horas. Las muestras de campo se lavaron con abundante agua corriente y se desinfectaron con alcohol (70%). Después, en cabina de flujo laminar, se cortaron porciones de 5mm aproximadamente que incluyen tejido sano y enfermo, los cuales se desinfectaron, se lavaron y se secaron nuevamente. La siembra se realizó en placas Petri con medio papa dextrosa agar y agar agua y se incubaron a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  durante siete días. Donde hubo crecimiento, se aisló el micelio en PDA con antibiótico y se incubaron en las mismas condiciones por 3-5d. Las colonias así purificadas se sembraron en medio agar zanahoria y se observaron macro y microscópicamente para determinar el género (10). Todos los aislados se conservan en solución salina y están depositados en el laboratorio de Fitopatología del IDEA, Caracas.

**Extracción y amplificación del ADN:** Se realizó la extracción de ADN genómico total a partir de micelio de 49 aislados (11), donde se parte de 0,2gr de micelio obtenido de las colonias purificadas. La calidad del ADN obtenido se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, corridos durante una hora a 90 V, en buffer TBE 0,5X (250mM Tris-HCl, 30mM de ácido bórico y 42mM de EDTA); el ADN se cuantificó en un espectrofotómetro marca Eppendorff. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorff, en un volumen total de 20 $\mu\text{l}$  conteniendo 2,5ng de ADN genómico, 3mM de  $\text{MgCl}_2$ , Buffer PCR 1X, 0,2mM dNTPs, iniciador 0,25 $\mu\text{M}$ , 1U de *Taq* ADN Polimerasa Promega®. Los ciclos de PCR se iniciaron con una desnaturalización a  $94^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación con una desnaturalización a  $94^\circ\text{C}$  por 30 segundos, una temperatura de hibridación entre  $50\text{-}53^\circ\text{C}$  por 1 minuto y  $72^\circ\text{C}$  por 2 minutos y una extensión final a  $72^\circ\text{C}$  por 7 minutos. Una vez finalizada la PCR, las muestras se conservaron a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, corridos durante dos horas y media a 90V, los geles se prepararon en buffer TBE 0,5X (250mM Tris-HCl, 30mM de ácido bórico y 42mM de EDTA), el cual también se utilizó como buffer de corrida. Como patrón de comparación se usaron 3 $\mu\text{l}$  de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene®). Para la determinación del peso molecular de los patrones de bandas se utilizó el programa Image Quant TL Versión 2005 de Amersham Biosciences (GE). Se utilizaron seis iniciadores ISSR de la serie 800-900

de la «University of British Columbia Biotechnology Laboratory (UBCBL)»: 812, 880, 885, 888, 890 y 891 seleccionados de la literatura por su carácter aleatorio y universal (12).

**Análisis de datos:** En ausencia del análisis de segregación, no se hizo ningún supuesto sobre la naturaleza genética de los alelos. Los fragmentos de amplificación se codificaron de acuerdo a un marcador dominante, se asignó 1-0 para la presencia-ausencia y generó una columna por locus para cada iniciador. El nivel de polimorfismo y la capacidad discriminadora de cada iniciador se valoró a través del contenido de información polimórfica (PIC) y la probabilidad de obtener parejas idénticas de alelos entre las muestras estudiadas (13). La relación genética entre los aislados de *Phytophthora* spp. se estudió aplicando la estrategia metodológica que plantea el uso combinado del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), el Análisis de Conglomerados (AC) y el ajuste de un Biplot Logístico Externo (BLE) sobre datos de disimilitud utilizando los coeficientes de Jaccard, Emparejamiento simple, Dice y Rogers y Tanimoto (14). El número k de dimensiones a ser retenidas, el coeficiente de similitud que mejor define la estructura de los datos y las medidas de la calidad se calcularon según procedimientos descritos. Para el cálculo de la capacidad informativa y discriminadora de los iniciadores se utilizó Info-Gen ver. 2011p (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>) y para los cálculos y las representaciones gráficas de los procedimientos estadísticos empleados, se utilizó un conjunto de rutinas desarrolladas bajo MatLab versión 2009 (The MathWorks Inc, 2009) que pueden ser obtenidas a través de <http://www.biplot.usal.es>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron morfológicamente 49 aislados de *Phytophthora* spp., provenientes de los estados Aragua, Carabobo, Miranda, Sucre y Zulia a razón de 8%, 2%, 43%, 2% y 45%, respectivamente, y en la planta 2%, 84%, 6% y 8% en flores, frutos, hojas y tronco, respectivamente.

De la serie de seis iniciadores aleatorios ISSR utilizados, solo los marcadores 880, 888 y 890 generaron bandas de buena resolución para todos los aislados; el resto fueron descartados para evitar falsos positivos. Estos tres iniciadores produjeron un total de 55 fragmentos polimórficos, con un tamaño entre 550-4700pb y una proporción de reproducibilidad superior al 75%. Los iniciadores seleccionados generaron, aproximadamente, la misma información, medida esta en términos de número de fragmentos polimórficos y

Contenido de Información Polimórfica; se destaca que este último supera, en los tres casos, al 50% del intervalo teórico de 0,01 a 0,50 (Tabla 1). La región del genoma explorada permite la discriminación de hasta  $10^{33}$  aislados de *Phytophthora* spp. de manera simultánea, ya que la probabilidad media de que dos aislados diferentes tengan igual identidad es de  $3,9 \times 10^{-33}$ . Para ilustrar la capacidad informativa y la variabilidad de los iniciadores, se muestra la huella digital generada por los 55 fragmentos polimórficos amplificados y representados en negro (Figura 1). No fue detectable un patrón debido al sitio de muestreo. Por otro lado, en el código de barras se observan patrones de variabilidad que permiten intuir el papel de cada iniciador en la separación de grupos. El iniciador 888 es el que más series blanco-negro (0-1) presenta, por lo que los fragmentos asociados a este marcador podrán definir la estructura de grupo presente.

Los valores obtenidos del coeficiente de correlación lineal de Pearson, entre los  $n(n-1)/2$  elementos distintos fuera de la diagonal de las matrices de distancias observada  $\Delta$  y estimada  $\hat{\Delta}$ , para los diferentes coeficientes y dimensiones, indican que la disimilitud debida al coeficiente de Dice ( $1-s$ ) en el espacio bidimensional, es el que refleja la mayor coherencia y ofrece una mejor aproximación de las relaciones entre los 49 aislados ( $r=0,65$ ). Es decir, dos aislados con posiciones más cercanas en la representación bidimensional generada del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), utilizando la disimilitud debida al coeficiente de Dice, tendrán patrones más similares de ADN respecto a las secuencias de los ISSR utilizados.

En la Figura 2a se muestra el espacio bidimensional obtenido del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP). Las dos primeras dimensiones explican el 27,03% de la variabilidad total y permiten la formación

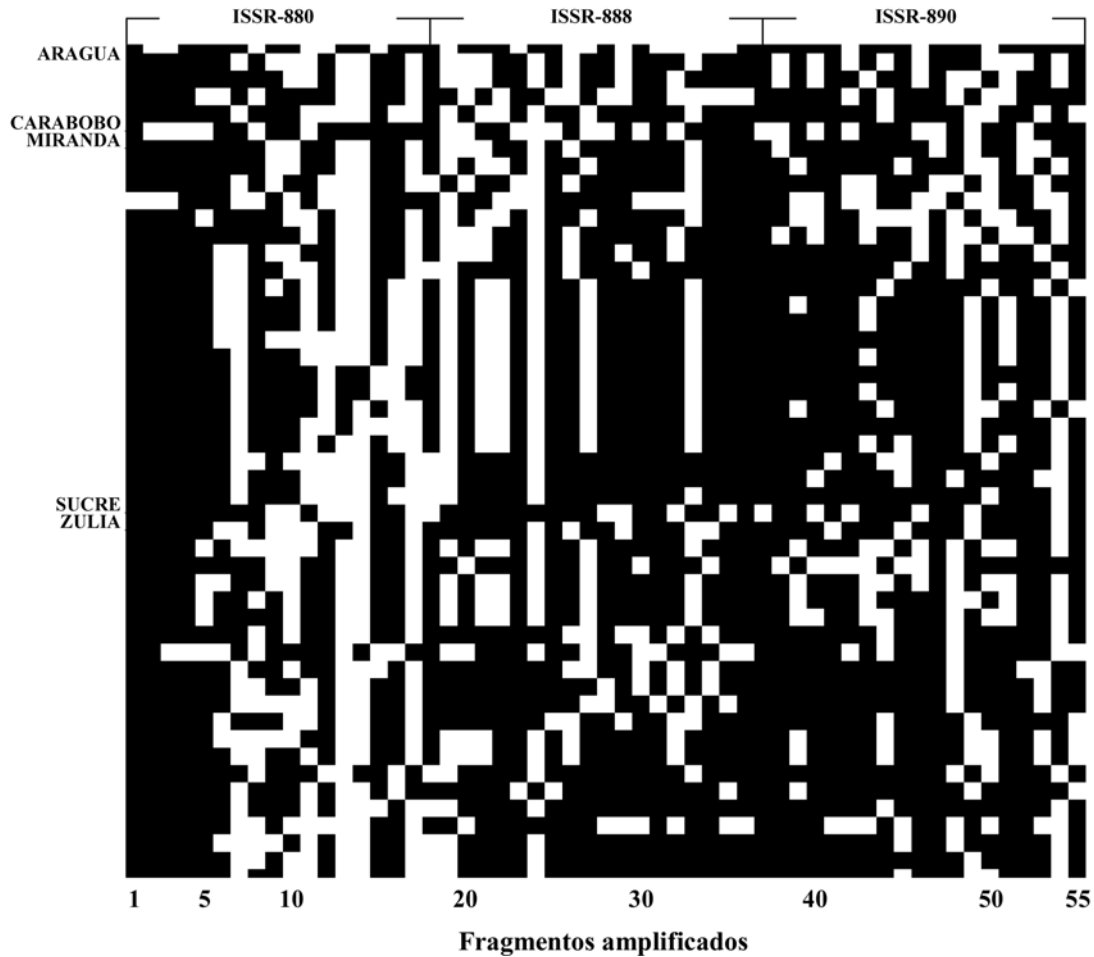
de tres grupos de aislados utilizando los tres iniciadores ISSR y que son claramente demarcados por el diagrama de Voronoi. Adicionalmente, el espacio bidimensional demuestra que no existe un patrón asociado a la procedencia del aislado (estados productores) o por localización del síntoma (en fruto, en tallo o en cojín floral) (Figura 2b). Los aislados de *Phytophthora* spp. encontrados en la cuenca Sur del Lago de Maracaibo, zona sur-occidental y el estado Miranda, zona centro norte costera; se distribuyen en forma aleatoria en los tres grupos, solamente los aislados del estado Aragua, zona centro norte costera, pertenecen a un solo grupo. Respecto a los aislados de los estados Carabobo y Sucre, no es posible inferir ningún comportamiento porque durante el muestreo solo se encontró un aislado para cada sitio.

La composición de los grupos fue: Grupo 1, formado por aislados de los estados Miranda (27%), Sucre (9%) y Zulia (64%); Grupo 2, formado por aislados de los estados Aragua (19%), Miranda (29%) y Zulia (52%) y Grupo 3, formado por aislados de los estados Carabobo (6%), Miranda (70%) y Zulia (24%). Con una diversidad genética de  $0,1707b \pm 0,0315$ ;  $0,3602a \pm 0,0000$  y  $0,1794b \pm 0,0347$  -letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )-, una proporción de loci polimórficos de 0,6182; 0,9636 y 0,4909 -el locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común excede de 0,95- y una calidad de representación calculada con las dos primeras dimensiones de 88,56%, 92,61% y 93,81%, para los primero, segundo y tercer grupos, respectivamente. Obsérvese que la alta calidad de representación en todos los grupos confirma que no es necesario retener dimensiones adicionales para reconocer los aislados con patrones más similares de ADN respecto a las secuencias utilizadas. Por consiguiente, la distribución aleatoria dentro de los grupos de los aislados puede inferir al menos la

**TABLA 1.** Polimorfismo y capacidad discriminatoria de marcadores ISSRs en *Phytophthora* spp. de cacao. / *Polymorphism and screening capacity of ISSR markers on Phytophthora spp. from cacao.*

Iniciador UBCBL	Secuencia	R(PB)	Fragmentos Polimórficos	Contenido de Información Polimórfica <sup>1</sup>	Probabilidad de Igual Identidad <sup>2</sup>
880	5'-GGAGACGACAGGAGA-3'	650-4700	17	0,2482 (0,0262)	$9,6 \times 10^{-10}$
888	5'-BDB(CA)7-3'	550-4600	19	0,2646 (0,0186)	$2,3 \times 10^{-11}$
890	5'-VHV(GT)7-3'	700-4400	19	0,2746 (0,0205)	$1,7 \times 10^{-13}$

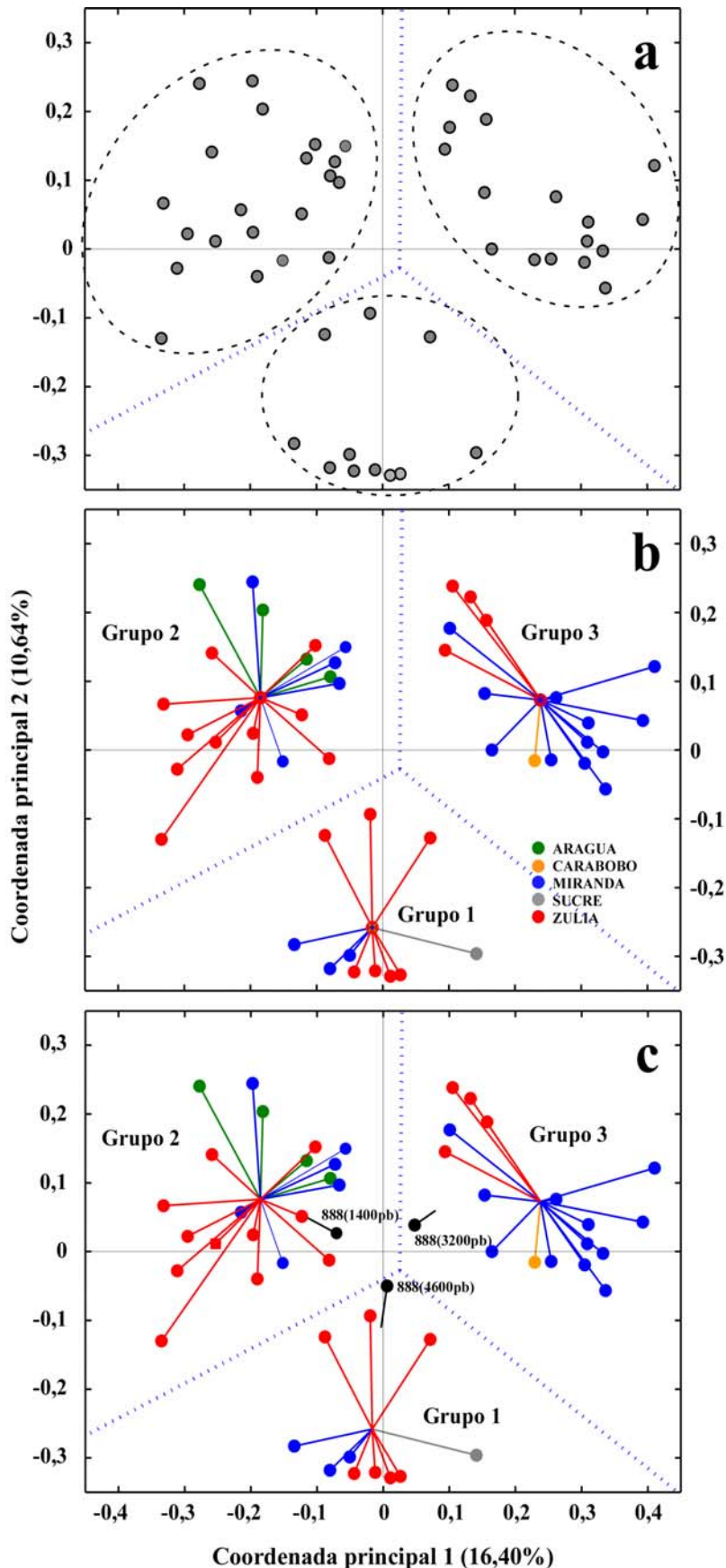
<sup>1</sup>Indica la calidad de un marcador. Su valor depende del número de alelos y de la distribución de frecuencias. Muy informativo:  $> 0,5$ ; Medianamente informativo: 0,25-0,5 y Poco informativo:  $< 0,25$ . Números entre paréntesis se refieren al error estándar Bootstrap (13).  
<sup>2</sup>Probabilidad de que dos aislados tengan igual identidad para el loci evaluado.



**FIGURA 1.** Huella digital generada por los marcadores ISSR para 49 aislados de *Phytophthora* spp. provenientes de fincas de cacao de cinco estados venezolanos./ *Digital fingerprinting of ISSR markers from 49 Phytophthora spp. isolates from cacao farms in five Venezuelan states.*

presencia de tres especies de *Phytophthora* spp. en las zonas productoras de cacao en Venezuela. Este hallazgo concuerda con informes anteriores que describen la presencia de *P. palmivora*, *P. capsici* y *P. citrophthora* en el estado Miranda (9,15), así como de *P. megasperma* en los estados Zulia (16). Por otro lado, es de destacar que ambas zonas privilegian genotipos diferentes de cacao: los criollos «Porcelana» en el caso de la cuenca Sur del Lago de Maracaibo, donde se encuentra el Estado Zulia, y los trinitarios como el tipo «Carenero Superior», en el estado Miranda. Esta distribución general de las especies de *Phytophthora* spp. en Venezuela contrastó, en el año 2007, con la ampliación de la distribución de *P. megasperma* al oriente del país (4). Igualmente, al ser empleados los aislamientos de referencia y el marcador RAPD se distinguieron las especies *P. palmivora*, *P. capsici* y *P. citrophthora* (17).

En la Figura 2c se muestran, en el espacio bidimensional, los grupos de aislados y los fragmentos de amplificación seleccionados después del ajuste del Biplot Logístico Externo (BLE), una vez aplicados acumulativamente los criterios de corrección del ajuste por el p-valor ( $p \leq 0,01$ ), Bonferroni y el pseudo  $R^2$  de Nagelkerke/Cragg & Uhler's ( $R^2 \geq 0,80$ ). Después del ajuste en el Biplot, el porcentaje de coincidencias entre la matriz de los datos binarios original y la estimada de los modelos logísticos o Porcentaje de Clasificación Correcta (PCC) fue mayor al 85%. De los 55 fragmentos amplificados, solo tres fragmentos generados por el iniciador intervienen directamente en la separación de los aislados en los grupos descritos: el primero de los fragmentos 888 (1400pb) altamente correlacionado con el eje 1; los otros dos, 888 (3200pb) y 888 (4600pb), altamente correlacionados con el eje 2. Las dimensiones de la solución de las coordenadas



**FIGURA 2.** Relaciones genéticas entre 49 aislados venezolanos de *Phytophthora* spp. encontrados en las plantaciones venezolanas de cacao. Diagrama basado en la disimilaridad calculada por el coeficiente de Dice y tres iniciadores ISSR. Visualización de los grupos: (a) mediante diagrama de Voronoi que muestra los grupos obtenidos bajo el algoritmo UPGMA con las dos primeras coordenadas principales retenidas; (b) representación respecto al lugar de colecta del aislado; y (c) representación de grupos y fragmentos de amplificación seleccionados después del ajuste del Biplot Logístico Externo (BLE)./ *Genetic relationships among 49 Venezuelans isolates of Phytophthora spp. from cacao. Diagram based on the DICE dissimilarity coefficient and the three ISSR primers. Visualization of the groups: (a) using Voronoi diagram showing the groups obtained under the UPGMA algorithm with the first two principal coordinates retained; (b) representation regarding the place of collection of the isolate, and (c) representation of groups and amplification fragments selected after setting Biplot External Logistics (BLE).*

principales como gradientes genéticos latentes (18). Estas correlaciones, con los fragmentos del iniciador 888, indican que esta región del genoma es la más importante de las estudiadas para la separación entre grupos. No obstante, el iniciador 890 fue el que presentó la mayor capacidad discriminatoria -probabilidad de igual identidad. Esto puede deberse a que el iniciador 888, para un número aproximadamente similar de copias de la región estudiada, detectó 25% más de similitud genética entre los 49 aislados, según la estrategia metodológica usada. Igualmente, en la misma representación se permite estudiar, no solo la relación entre los aislados como en el Análisis de Conglomerados clásico, sino que, además, admite estudiar la relación entre aislado-alelo y alelo-alelo.

Los tres iniciadores ISSR permitieron la construcción de la huella genética de los aislados estudiados y la diferenciación de los mismos en tres grupos principales, los cuales pudieran ser predictivos de al menos tres especies y que, a su vez, serían las más frecuentes que afectan las plantaciones de cacao del país. En Brasil se ha reportado una separación clara entre las especies *P. palmivora*, *P. capsici* y *P. citrophthora* a través del uso de un marcador dominante tipo RAPD; esta se considera con valor diagnóstico para el complejo de especies de *Phytophthora* del cacao (17). Tomando en cuenta la formación de los grupos encontrados en este trabajo, se sugiere una identificación a nivel de especie de los mismos por métodos tradicionales (morfología) o mediante la secuenciación de los genes con mayor capacidad discriminatoria a nivel de especies (ITS, EF-1,  $\beta$ -tubulina, la subunidad I de la citocromo oxidasa C y la subunidad de la NADH deshidrogenasa).

De manera general, los patógenos poseen una ocurrencia natural de variación intraespecífica. Esta variación genética les permite adaptarse a las cambiantes condiciones del medio ambiente y, de esta manera, evolucionar a nuevos patotipos. En *Phytophthora* spp. se ha documentado que la diversidad intraespecífica es modelada por las fuerzas evolutivas, como son la migración o el efecto fundador en nuevas plantaciones (19), así como puede rendir la resistencia existente al emerger nuevos patotipos más agresivos (20). De ahí la importancia de la identificación certera de las especies de *Phytophthora* presentes en las plantaciones de cacao. Esto se convierte en un requisito indispensable para el establecimiento de las mejores estrategias de manejo y los programas de mejoramiento genético del cultivo. Ejemplo de este último caso se señala para un morfotipo dentro de la población de *P. palmivora* en Centroamérica (2).

## AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por el Proyecto de Investigación en Red «Ruta del Chocolate» N° 200500898 del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela. Se agradece a Raisa Rumbos y Dercy Parra por facilitar algunos aislados y a Diamaris Domínguez por la asistencia en el laboratorio.

## REFERENCIAS

1. Parra D, Pérez-Martínez S, Sosa D, Rumbos R, Gutiérrez-Cedeño BJ, Moya A. Avances en las investigaciones venezolanas sobre enfermedades del cacao. *Rev Estud Transdiscipl.* 2009;1(2):55-74.
2. Johnson ES, Aime MC, Crozier J, Flood J, Iwaro DA, Schnell RJ. A new morpho-type of *Phytophthora palmivora* on cacao in Central America. In: Akrofi A., Baah F, editors. Proceedings of INCOPEd 5th Int Seminar 15-17th Oct, 2006, San Jose, Costa Rica. Akim Tafo, Ghana: INCOPEd Secretariat Cocoa Research Institute of Ghana; 2007. p. 31-39.
3. Evans HC. Cacao Diseases-The Trilogy Revisited. *Phytopathology.* 2007;97(13):1640-1643.
4. Rumbos R, Moya A, Quevedo H, Romero K, Parra D, Gutiérrez B, et al. Primer reporte de la mancha de agua en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.), causada por *Phytophthora megasperma* (Drechler) en el sector Bohardal, Rio Chico, Estado Sucre. *Memorias del I Congreso Venezolano del Cacao y su Industria.* Aragua, Venezuela: Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología del Estado Aragua (FUNDACITE-Aragua); 2007. p. 49.
5. Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AW AM, Govers F. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology.* 2012 Apr;102(4):348-364.
6. Appiah AA, Flood J, Archer SA, Bridge PD, Arcia A. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. *Plant Pathol.* 2004;53:209-219.
7. Wiejacha K, Trzewik A, Orlikowski LB, Szkuta G, Orlikowska T. Genotypic differences between isolates of *Phytophthora cinnamomi* Rands and *P. citricola* Sawada obtained from twelve nursery

- plant species. *J Plant Prot Res.* 2004;44(3):189-198.
8. Li P, Cao S, Dai YL, Li XL, Xu DF, Guo M, et al. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* (Pythiaceae) isolates in Anhui Province of China based on ISSR-PCR markers. *Genet Mol Res.* 2012;11(4):4285-4296.
  9. Capriles L, Reyes HE. El género *Phytophthora* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Venezuela. *Jornadas científicas Estación Experimental Caucagua. Caucagua (Venezuela):* 1972. p. 11.
  10. Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ, Hall GS. Revised Tabular Key to the species of *Phytophthora*. *Mycol Pap.* 1990;162:1-28.
  11. Naranjo L, Urbina H, De Sisto Á, León V. Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatalysis and Biotransformation.* 2007. p. 341-349.
  12. Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet.* 1994;89(January):998-1006.
  13. Balzarini M, Bruno C, Peña A, Teich I, Rienzo JA Di. *Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en Info- Gen.* Córdoba, Argentina: Encuentro Grupo Editor; 2010. 228 p.
  14. Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo JA, Robledo CW. *InfoStat, Software estadístico. Manual de usuario.* Córdoba, Argentina: Editorial Brujas; 2008. 336 p.
  15. Parra D, Subero LJ. Especies de *Phytophthora* que afectan al cacao (*Theobroma cacao* L.) en la región de Barlovento, Estado Miranda. *Memorias del I Congreso Venezolano del Cacao y su Industria.* aradhya@ucdavis.edu: FUNDACITE Aragua; 2000. p. 243-244.
  16. Capriles L, Reyes H, Escobar F. Etiología de una nueva enfermedad del fruto de cacao en Venezuela. *Internacional Cocoa Research Conference. Cocoa Research Institute;* 1972. p. 485-486.
  17. Faleiro FG, Luz EDMN, Cerqueira AO, Rocha CSS, Dantas Neto A, Flores AB, et al. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauero com base em marcadores RAPD. *Fitopatol Bras.* 2004 Jun;29(3):303-306.
  18. Demey JR, Vicente-Villardón JL, Galindo-Villardón MP, Zambrano AY. Identifying molecular markers associated with classification of genotypes by External Logistic Biplots. *Bioinformatics.* 2008 Dec 15;24(24):2832-2838.
  19. Garbelotto M, Goss EM, Heungens K, Prospero S. Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Trends Microbiol.* 2012;20(3):131-138.
  20. Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S, Bain RA, Cooke LR, Etherington GJ, et al. Genome Analyses of an Aggressive and Invasive Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen. *PLOS Pathog.* 2012;8(10):14.

Recibido: 1-5-2015.

Aceptado: 8-9-2015.