

Comportamiento de las accesiones del género *Nicotiana* informadas como fuentes de resistencia frente a aislamientos cubanos de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan



Behavior of accessions of the genus *Nicotiana* reported as sources of resistance against Cuban isolates of *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan <http://opn.to/a/qA9lk>

Angélica de la C. González-Toledo ^{1*}, Verónica Toledo-Sampedro ²

¹Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

²Instituto de Investigaciones del Tabaco, Cuba

RESUMEN: Este trabajo tuvo como objetivo evaluar las accesiones del género *Nicotiana* informadas como fuentes de resistencia frente a aislamientos cubanos de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Los ensayos se realizaron en aisladores biológicos en condiciones semicontroladas; se calculó el índice de infección en 10 accesiones del género *Nicotiana* frente a 20 aislamientos de *P. nicotianae* con agresividad diferencial y obtenidos en Cuba. Dentro de las accesiones evaluadas, se encuentran especies de *Nicotiana* y cultivares de tabaco identificados, internacionalmente, como fuentes de resistencia ante el patógeno. Los valores del índice de infección se utilizaron para clasificar a los cultivares según el nivel de resistencia frente al patógeno, además de efectuarse un Análisis de Agrupamiento Jerárquico con distancia euclidiana y método de Ward. El dendrograma obtenido agrupó a las accesiones en tres grupos, donde el testigo susceptible KY-14 mostró las mayores afectaciones y se separó del resto de los cultivares. Los cultivares Florida 301 y Florida 513 integraron otro grupo con niveles de resistencia variables, entre altamente resistentes y moderadamente susceptibles. Las accesiones *Nicotiana longiflora* Viv., *Nicotiana plumbaginifolia* Cav., tres accesiones de *Nicotiana rustica* L. (3100, 3137, 2834) y los cultivares Beinhart -1000 y Beinhart- 1000-1 se reunieron en un mismo grupo y se comportaron como altamente resistentes frente a la mayoría de los aislamientos cubanos evaluados.

Palabras clave: enfermedad pata prieta, fuentes de resistencia, manejo integrado de plagas, *Nicotiana tabacum*.

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the accessions of the genus *Nicotiana* reported as sources of resistance against Cuban isolates of *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. The tests were performed under semi-controlled conditions in biological isolators, where the infection rate was calculated in 10 accessions of the genus *Nicotiana* in the presence of 20 Cuban isolates of *P. nicotianae* with differential aggressiveness. Among the accessions evaluated, there were *Nicotiana* species and tobacco cultivars internationally identified as sources of resistance to the pathogen. The values of the infection index were used to classify the cultivars according to the level of resistance to the pathogen, in addition to a Hierarchical Grouping Analysis with Euclidean distance and the Ward method. The dendrogram obtained grouped the accessions into three clusters, where the susceptible control KY-14 showed the highest susceptibility and separated from the rest of the cultivars. The cultivars Florida 301 and Florida 513 integrated another group with variable resistance levels, from highly resistant to moderately susceptible. The accessions *Nicotiana longiflora* Viv., *Nicotiana plumbaginifolia* Cav., three accessions of *Nicotiana rustica* L. (3100, 3137, 2834), and the cultivars Beinhart -1000 and Beinhart- 1000-1 clustered into a group, and they behaved as highly resistant to most of the Cuban isolates evaluated.

Key words: black shank disease, sources of resistance, integrated pest management, *Nicotiana tabacum*.

*Autor para correspondencia: correo de contacto: Angélica de la C. González-Toledo. E-mail: agonzalez@fbio.uh.cu, biologia@iitabaco.co.cu

Recibido: 18/02/2019

Aceptado: 09/04/2019

INTRODUCCIÓN

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), planta anual oriunda de América del Sur, representa un cultivo extendido en diversos países (1). Cuba es reconocida a nivel internacional por producir el mejor tabaco, por tanto, su cultivo requiere de una atención priorizada para mantener la exquisita calidad que lo distingue (2).

Desde el punto de vista económico, la primera problemática fitosanitaria del cultivo lo constituye la enfermedad pata prieta, provocada por el fitopatógeno de suelo *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (3). Existen cuatro razas descritas para *P. nicotianae*; sin embargo, en Cuba se ha informado solamente la raza 0 de forma generalizada, con escasos aislamientos de la raza 1 en el año 2003 (4); no obstante, este hallazgo no se ha repetido en la última década (5). Los estudios recientes indican la presencia de la raza 0 altamente variable patogénicamente con aislamientos muy agresivos (5); estos vencen la resistencia de los nuevos cultivares de tabaco cuando las condiciones son propicias para el desarrollo de la enfermedad (6). Para mitigar los daños producidos por *P. nicotianae* se requiere cumplir con medidas integrales de manejo, sobre todo las relacionadas con la incorporación de cultivares que posean diferentes genes de resistencia (7).

Internacionalmente se informan cuatro tipos de fuentes de resistencia contra este patógeno. La resistencia monogénica o completa a la raza 0, atribuida a los genes *Php* y *Phl* introgresados en *N. tabacum*, a partir de las especies *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. y *Nicotiana longiflora* Cav., respectivamente; los cultivares foráneos, donde se introgresaron estos genes, son altamente resistentes a la raza 0 del patógeno y susceptibles a la raza 1 (1). La resistencia poligénica o parcial, procedente del cultivar Florida 301, es la primera y más utilizada en los programas de mejoramiento en el tabaco. Este tipo de resistencia es efectiva para todas las razas del patógeno, pero los cultivares que la presentan expresan de bajos a altos niveles de resistencia (8). Aunque el cultivar de tabaco Beinhart-1000 expresa también altos niveles de resistencia poligénica, en la actualidad son pocos los cultivares que lo presentan en su “pedigree” (9).

Recientemente se informó otro tipo de resistencia proveniente de *Nicotiana rustica* L., ubicada en la región cromosómica denominada “Wz”, que proporciona a los cultivares que la portan una alta resistencia ante aislamientos de *P. nicotianae* de las razas 0 y 1 (1).

En Cuba, los cultivares de tabaco expresan niveles de resistencia de moderadamente susceptibles a altamente resistentes a la raza 0 del patógeno y son susceptibles a la raza 1 (10). Esta situación provoca el desarrollo de aislados cada vez más agresivos que logran vencer la resistencia de los nuevos cultivares que se liberan a la producción en solo unos pocos años de explotación agrícola (11).

Para una resistencia más duradera es importante diseñar esquemas de pirimidización génica que permita la combinación de diferentes fuentes de resistencia en un mismo cultivar. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar las accesiones del género *Nicotiana* informadas como fuentes de resistencia frente a aislamientos cubanos de *P. nicotianae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron accesiones del género *Nicotiana* informadas como fuentes de resistencia ante *P. nicotianae*: *N. plumbaginifolia*, *N. longiflora*, *N. rustica* (accesiones 3137, 3100 y 2834) y los cultivares de tabaco Florida 301 y Beinhart -1000 (B-1000). Se incluyeron otros cultivares como son Florida 513 y Beinhart 1000-1 (B-1000-1), informados también como resistentes al patógeno (9,12). Se empleó el cultivar KY-14 como testigo susceptible.

Los semilleros se desarrollaron en canteros tecnificados con sustrato de cachaza esterilizado a 1,5 atmósferas en una hora. Las medidas de riego y laboreo fueron cumplidas según el Instructivo Técnico del Tabaco, pero sin aplicaciones de fungicidas (13). A los 30 días de edad, las plántulas se trasplantaron de forma individual a bolsas de polietileno negro que contenían 1,1 kg de suelo Ferralítico Rojo Compactado (14).

Todos los aislamientos utilizados en este experimento pertenecen al cepario del laboratorio de micología del Instituto de Investigaciones del Tabaco, ubicado en la provincia Artemisa, Cuba. Se emplearon 20 aislamientos de la raza 0 del

patógeno, caracterizados según la metodología de Toledo (15) para la diferenciación de grupos patogénicos (Tabla 1). El inóculo de cada aislamiento se reprodujo previamente en harina de maíz y arena de río, para posteriormente ser ajustado a 3×10^4 unidades formadoras de colonias (15).

A los 15 días de efectuado el trasplante, se realizó la inoculación de las plantas. Para ello se separó el suelo alrededor del tallo hasta ver las primeras raíces, sobre las cuales se añadió el inóculo. Posterior a la inoculación, las raíces se cubrieron nuevamente con el suelo removido. Se utilizaron 10 plantas por cada aislamiento del patógeno, las que se regaron diariamente con 150 ml de agua para preservar la humedad. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días, extrayendo las plantas de cada una de las bolsas cuidadosamente. Para determinar el índice de infección se utilizó la escala de grado propuesta por Peñalver (16), donde se asigna: grado 0= planta sana; grado 1= presencia de la enfermedad con afectación en raíz; grado 2= afectación en raíz y tallo; grado 3= afectación en raíz, tallo y hojas; grado 4= planta muerta. Con los datos obtenidos se utilizó la fórmula de Townsend y Heuberger para estimar el índice de infección del patógeno (16).

Tabla 1. Cantidad, procedencia y patogenicidad de los aislamientos de *P. nicotianae* utilizados para la evaluación de las accesiones del género *Nicotiana*. / *Quantity, origin and pathogenicity of the P. nicotianae isolates used to evaluate the accessions of the genus Nicotiana.*

Cantidad de aislamientos	Procedencia	Aislamientos del grupo 1 (altamente patogénico)	Aislamientos del grupo 2 (medianamente patogénico)
7	Pinar del Río	4	3
5	Habana	3	2
1	Matanzas	1	0
5	Sancti Spíritus	3	2
2	Granma	2	0

Tabla 2. Clasificación del nivel de resistencia de cada cultivar según el valor del índice de infección. / *Classification of the resistance level of each cultivar according to the value of the infection index*

Escala	Índice de infección (%)
Altamente resistente (AR)	0 a 10
Resistente (R)	11 a 20
Moderadamente resistente (MR)	21 a 30
Moderadamente susceptible (MS)	31 a 40
Susceptible (S)	41 a 50
Altamente susceptible (AS)	≥ 51

$$I = \left[\frac{\sum_{v=0}^j n_v \cdot v}{j \cdot N} \right] \cdot 100$$

donde:

- I* - Índice de infección (%);
- n_v - Total de plantas con grado *v* de la escala
- v* - Grado respectivo de la escala
- N* - Total de plantas evaluadas
- j* - Grado máximo de la escala

El resultado del índice de infección de cada accesión frente a cada aislamiento fue procesado en el programa STATISTICA 8.0 (17), mediante un Análisis de Agrupamiento Jerárquico, con distancia euclidiana y método de Ward. El índice de infección también se empleó para clasificar a los cultivares según la escala del grado de resistencia (12). (Tabla 2)

Se contabilizó la cantidad de aislamientos de *P. nicotianae* donde las accesiones se comportaron con el mismo nivel de resistencia según la escala utilizada; los valores obtenidos se expresaron en porcentaje.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el dendrograma obtenido se evidencia la formación de tres grupos, al considerarse los valores de los índices de infección de cada

accesión frente a los 20 aislamientos del patógeno. (Fig.1)

El cultivar susceptible (KY-14) se separó del resto de las accesiones. Los cultivares Florida 301 y Florida 513 se diferenciaron en otro grupo con valores intermedios de índice de infección; el resto de las accesiones (especies silvestres del género *Nicotiana* y los cultivares de tabaco B-1000 y B-1000-1) presentaron valores más bajos de índice de infección. (Fig.1)

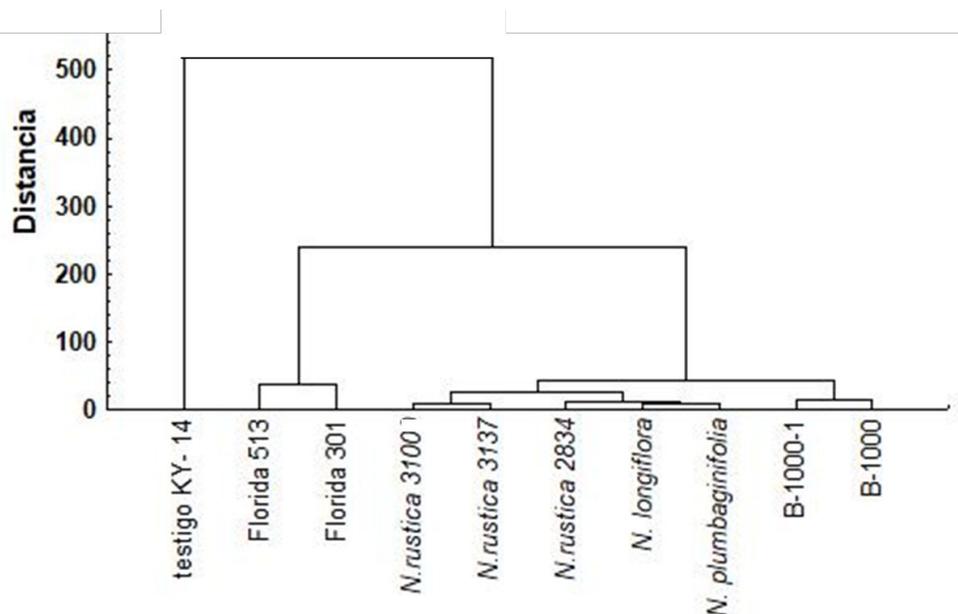
Los niveles de resistencia de cada cultivar clasificados, según los valores del índice de infección, demostraron que el cultivar KY-14 fue altamente susceptible frente a todos los aislamientos del patógeno (Tabla 3). Este cultivar se ha utilizado en otras investigaciones como testigo susceptible y permite corroborar la presencia y la viabilidad de los aislamientos del patógeno (15). El resto de los cultivares exhibieron diferentes niveles de resistencia frente a los 20 aislamientos. Florida 301 y Florida 513 se clasificaron entre altamente resistentes a moderadamente susceptibles (Tabla 3), comportándose como altamente resistentes frente a 25 y 35 % de los aislamientos, respectivamente (Tabla 4). Por su efectividad contra las razas 0 y 1 de *P. nicotianae*, la resistencia poligénica proveniente del cultivar Florida 301 se utilizó

ampliamente durante 40 años en Estados Unidos (8). En la actualidad se informa la adaptación de los aislamientos de *P. nicotianae* a estos genes de resistencia (6). El cultivar Florida 513 presentó similar comportamiento ante los aislamientos, pero no hay informes de que comparta el mismo tipo de resistencia que Florida 301.

Los cultivares B-1000 y B-1000-1 presentaron alta resistencia ante el 90 % de los aislamientos y se clasificaron como resistentes ante el 10 % de estos. (Tabla 4)

Los cultivares Florida 301 y B-1000 presentan resistencia de herencia poligénica a la raza 0 y 1 del patógeno. La principal diferencia entre estos cultivares es que B-1000 muestra alta resistencia en raíces (18); mientras que, en Florida 301, las raíces expresan de bajos a altos niveles de resistencia (11). En ambos cultivares las hojas y los tallos de estas plantas presentan baja resistencia (11,18). Los cultivares B-1000-1 y B-1000 exhibieron iguales niveles de resistencia frente a los aislamientos de *P. nicotianae*. El cultivar B-1000-1 se originó a partir de B-1000 y se clasifica internacionalmente como altamente resistente al patógeno (9).

Las especies *N. plumbaginifolia* y *N. longiflora* exhibieron alta resistencia frente al 100 % de los aislamientos del patógeno (Tabla 4).



Coefficiente cofenético: 0,9914

Figura 1. Dendrograma obtenido mediante el Análisis de Agrupamiento Jerárquico tomando los valores del índice de infección de cada accesión frente a cada aislamiento de *P. nicotianae*. / Dendrogram obtained by the Hierarchical Grouping Analysis taking the values of the infection index of each accession in the presence of each isolate of *P. nicotianae*.

Tabla 3. Clasificación del nivel de resistencia de cada accesión frente a cada aislamiento de *P. nicotianae*. / *Classification of the level of resistance of each accession to each isolate of P. nicotianae.*

Aislados	B-1000	B-1000-1	<i>N. plumbago</i>	<i>N. longiflora</i>	Florida 301	Florida 513	<i>N. rustica</i> 3137	<i>N. rustica</i> 3100	<i>N. rustica</i> 2834	KY-14
935	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AS
817	AR	AR	AR	AR	R	R	AR	AR	AR	AS
853	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AS
918	AR	AR	AR	AR	R	AR	AR	AR	AR	AS
931	R	R	AR	AR	R	MR	R	R	AR	AS
P6	AR	AR	AR	AR	R	R	AR	AR	AR	AS
1004	R	AR	AR	AR	R	R	AR	AR	AR	AS
FP	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AS
1	AR	AR	AR	AR	R	R	AR	AR	AR	AS
17	AR	AR	AR	AR	MR	R	AR	AR	AR	AS
224	AR	AR	AR	AR	MR	MR	AR	AR	AR	AS
N. exigua	AR	AR	AR	AR	MS	R	AR	AR	AR	AS
MTZ	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AS
3	AR	AR	AR	AR	MR	MR	AR	AR	AR	AS
10	AR	AR	AR	AR	R	AR	AR	AR	AR	AS
N2	AR	AR	AR	AR	MS	R	AR	AR	AR	AS
101	AR	AR	AR	AR	MR	MR	AR	AR	AR	AS
130	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AS
Gr-2	AR	AR	AR	AR	MS	MS	AR	AR	AR	AS
EEG-2	AR	R	AR	AR	MR	R	AR	AR	AR	AS

Tabla 4. Porcentaje de aislamientos de *P. nicotianae* con similares valores de índice de infección, donde las accesiones se comportaron con el mismo nivel de resistencia. / *Percentage of P. nicotianae isolates with similar values of infection index, where the accessions behaved with the same level of resistance*

Accesiones	(AR)	(R)	(MR)	(MS)	(S)	(AS)
B-1000	90	10	0	0	0	0
B-1000-1	90	10	0	0	0	0
<i>N. plumbaginifolia</i>	100	0	0	0	0	0
<i>N. longiflora</i>	100	0	0	0	0	0
Florida 301	25	35	25	15	0	0
Florida 513	35	40	20	5	0	0
<i>N. rustica</i> 3137	95	5	0	0	0	0
<i>N. rustica</i> 31000	95	5	0	0	0	0
<i>N. rustica</i> 2834	100	0	0	0	0	0
testigo KY- 14	0	0	0	0	0	100

La resistencia proveniente de estos cultivares es específica ante la raza 0 de *P. nicotianae*, pero no contra la raza 1 del patógeno (19). En las regiones tabacaleras de Estados Unidos el gen *Php*, que se deriva de *N. plumbaginifolia*, ha sido incorporado en cultivares de tabaco tipo Burley y Virginia (6). Según datos no publicados, este gen

no ha sido introgresado en los cultivares comerciales del cultivo en Cuba.

Las accesiones de *N. rustica* 3100 y 3137 se comportaron como altamente resistentes frente al 95 % de los aislamientos y como resistentes frente al 5 %. El cultivar *N. rustica* 2834 resultó altamente resistente frente al 100 % de los

aislamientos (Tabla 4). Recientemente se informó que la mayoría de las accesiones estudiadas de *N. rustica* exhiben niveles muy altos de resistencia a la raza 0 y 1 de *P. nicotianae*. La región genómica "Wz" de la especie silvestre *N. rustica* ha sido introgresada en algunos cultivares de tabaco, como en Virginia en Estados Unidos y en Zimbabwe; se ha desarrollado así una línea estable denominada como "Wz" (20).

Debido a la rápida adaptación del patógeno ante un mismo tipo de genes de resistencia, los programas de mejora deben estar enfocados en el diseño de esquemas de piramidación génica, donde se combinen diferentes genes de resistencia en un mismo cultivar para garantizar una resistencia más duradera (21). Esto no se logra sin la previa evaluación de las accesiones informadas a nivel internacional como donadoras de la resistencia, frente a aislados cubanos del patógeno *P. nicotianae*.

Estos resultados permitirán iniciar nuevos programas de mejoramiento genético en el cultivo del tabaco contra la enfermedad pata prieta en Cuba.

REFERENCIAS

1. Drake KE, Michael JM, Bertrand P, Fortnum B, Peterson P, Lewis RS. "Black Shank resistance and agronomic performance of flue cured tobacco lines and hybrids carrying the introgressed *Nicotiana rustica* Region Wz". *Crop Science*. 2015; 55:1-8.
2. Toledo V, González A, Martínez J. Estabilidad de *Trichoderma harzianum* cepa A-53 en condiciones no controladas. Su influencia en la enfermedad pata prieta. *CUBA TABACO*. 2016; 17 (2):34-41.
3. Toledo V. Compatibilidad del control biológico de *Trichoderma* frente a fungicidas utilizados en el cultivo del tabaco. *CUBA TABACO*. 2014; 15(1):3-9.
4. Toledo V. Primer reporte de la raza 1 de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan en Cuba. *CUBA TABACO*. 2003; 4(1):13- 18.
5. Toledo V, González A. Determinación de la densidad de inóculo y caracterización racial de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan en los suelos tabacaleros de la Empresa Tabacalera Lázaro Peña. *CUBA TABACO*. 2018; 18(2):32-38.
6. Gallup CA, McCorkle KL, Ivors KL, Shew, HD. Characterization of *Phytophthora nicotianae*, the causal agent of tobacco black shank, across North Carolina tobacco production areas. *Plant Dis*. 2017; 102(6):1108-1114.
7. Martínez J. Genes involucrados en la resistencia a la pata prieta y mejoramiento genético en Cuba. *CUBA TABACO*. 2015; 15(1):69-77.
8. Xiao B, Drake K, Vontimitta V, Tong Z, Zhang X, Li M, et al. Location of Genomic Regions Contributing to *Phytophthora nicotianae* Resistance in Tobacco Cultivar Florida 301. *Crop Science*. 2013; 53:473-482.
9. Zhang Y, Guo X, Yan X, Ren M, Jiang C, Cheng Y, et al. Identification of stably expressed QTL for resistance to black shank disease in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) line Beinhart 1000-1. *The Crop Journal*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.12.002>
10. Toledo V. Comportamiento de las cultivares de tabaco negro frente a las razas 0 y 1 de *P. nicotianae*. *CUBA TABACO*. 2006; 7(2):27-31.
11. Kestrel L, McCorkle KL, Drake K, Lewis RS, Shew D. Characterization of *Phytophthora nicotianae* resistance conferred by the introgressed *Nicotiana rustica* Region, Wz, in Flue-Cured Tobacco. *Plant Disease*. 2018; 102(2):309-317.
12. Espino E, Rey X. Habana 7.5.1; nueva variedad de tabaco negro para cultivo bajo tela resistente al moho azul. *Agrotecnia de Cuba*. 1988; 20(1):17- 24.
13. Ministerio de la Agricultura, Cuba (MINAG). Instructivo técnico para el cultivo del tabaco en Cuba, Artemisa, 2012; 148 pp. ISBN: 978-959-7212-07-2.
14. Hernández JA, García MA, Morales MD, Cabrera A. Correlación de la nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba con las clasificaciones internacionales (Soil Taxonomy, FAO-UNESCO y World Reference Base) y las clasificaciones nacionales (clasificación de series de suelos y 2ª

- Clasificación genética de los suelos de Cuba).
Universidad Autónoma de Nayarit, México,
2006; 62 pp.
15. Toledo V. Metodología para la diferenciación de la raza 1 y los tres grupos patogénicos de la raza 0 en los aislamientos de *P. nicotianae* Breda de Haan del tabaco en Cuba. CUBA TABACO. 2009; 10(1):67-71.
 16. Peñalver N. Razas fisiológicas de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Tabaco. 1983; 6:47-64.
 17. Stat Soft, Inc (2007). STATISTICA. Versión 8.0 <http://www.statsoft.com>
 18. Vontimitta V, Lewis RS. Mapping of quantitative trait loci affecting resistance to *Phytophthora nicotianae* in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) line Beinhart-1000. Molecular Breeding. 2012; 29:89-98.
 19. Drake- Stowe K, Bakaher N, Goepfert S, Philippon B, Mark R, Peterson P, et al. Multiple disease resistance loci affect soilborne disease resistance in Tobacco (*Nicotiana tabacum*). Phytopathology. 2017; 107:1055-1061.
 20. McCorkle KL, Drake- Stowe KE, Lewis RS, Shew HD. Characterization of *Phytophthora nicotianae* resistance conferred by the introgressed *Nicotiana rustica* region, Wz, in flue-cured tobacco. Plant Dis. 2017; 102:309-317.
 21. Lewis, RS. "Nicotiana" in Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. p. 85-110. En: C. Kole (Ed) Wild Crop Relatives: Plantation and Ornamental Crops. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 2011. 25 pp.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)