

Resistencia de nuevos híbridos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) derivados del cultivar Beinhart-1000-1 frente a *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan



<https://cu-id.com/2247/v38e24>

Resistance of new tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) hybrids derived from the cultivar Beinhart-1000-1 against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan

Angélica de la C. González Toledo¹, Verónica Toledo Sampedro^{2*}

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

²Instituto de Investigaciones del Tabaco, San Antonio de los Baños, Artemisa, Cuba.

RESUMEN: El trabajo tuvo como objetivo evaluar la resistencia de nuevos híbridos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) frente a *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, con incorporación de genes de resistencia provenientes de 'Beinhart-1000-1'. Los experimentos de semilleros se realizaron bajo un Diseño de Bloques al Azar con tres réplicas, y 200 plantas por genotipo. Se evaluó, cada tres días, el porcentaje de plantas afectadas por la enfermedad, hasta que el testigo susceptible 'KY-14' alcanzó, el 100 % de plantas enfermas. Para el experimento en plantación, se empleó otro semillero, trasplantando las plantas a los 45 días de edad, bajo un Diseño Completamente Aleatorizado con dos réplicas. Cada cultivar ocupó una parcela con cinco surcos, de 20 plantas cada uno. En ambos experimentos se calculó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) con los datos del porcentaje de plantas enfermas, para luego efectuar un Análisis de Varianza de Clasificación Simple, Modelo de Efectos Fijos. Aunque en la etapa de semillero los valores del ABCPE fueron más altos (menos resistentes) con respecto a los valores en la etapa de plantación, en ambos experimentos y en los dos años de investigación, se observó que los híbridos y 'Beinhart-1000-1' mostraron los menores valores del ABCPE. Los progenitores femeninos alcanzaron valores del ABCPE más altos (menos resistentes) y se diferenciaron de sus descendientes F1. Los cinco híbridos de tabaco mostraron altos niveles de resistencia frente a *P. nicotianae*, superando la resistencia de los parentales femeninos, pero no la del progenitor masculino 'B-1000-1'.

Palabras claves: Tabaco, *Phytophthora nicotianae*, híbridos, 'Beinhart-1000-1'.

ABSTRACT: The objective of the work was to evaluate the resistance of new tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) hybrids to *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan by incorporating resistance genes from 'Beinhart-1000-1'. Two hundred plants per genotype were included in seedbed experiments, where a randomized block design with three replicates was used. The percentage of plants affected by the disease was evaluated until the susceptible control 'KY-14' reached 100% of diseased plants. For the plantation experiment, 45 day old plants were transplanted from another developed seedbed, and a completely randomized design with two replications was used. Each cultivar occupied a plot with five furrows of 20 plants each. The data on the percentage of diseased plants in both experiments allowed determining the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) to subsequently perform a Simple Ranked Analysis of Variance, Fixed Effects Model. The AUDPC values were higher (less resistant) at the seedling stage than at the planting stage in both experiments, and it was observed that the hybrids and 'Beinhart-1000-1' showed the lowest AUDPC values in the two years of research. The female parents achieved higher AUDPC values (less resistant) and differed from their respective F1 offspring. All five tobacco hybrids showed high levels of resistance to *P. nicotianae*, exceeding the resistance of the female parents, but not that of the male parent 'B-1000-1'.

Key words: Tobacco, *Phytophthora nicotianae*, hybrids, 'Beinhart-1000-1'.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad pata prieta es considerada como la primera problemática fitosanitaria del cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) debido a las grandes pérdidas económicas que provoca. La contaminación de los suelos con una alta densidad de inóculo de *Phytophthora nicotianae*, Breda de Haan, precisa de la obtención de cultivares cada vez más resistentes

al patógeno (1). En Cuba, los cultivares se logran a través de programas de mejoramiento genético y demoran entre 10 a 12 años, aspecto que dificulta poder introducir en cortos periodos de tiempo nuevos cultivares para mitigar la enfermedad pata prieta (2). El análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados de ADN (AFLP) en los cultivares de tabaco cubano, muestra una alta similitud genética (3). La posible consanguinidad presente en los cultivares,

*Correspondencia a: Verónica Toledo Sampedro. E-mail: toledoveronica480@gmail.com

Recibido: 31/10/2023

Aceptado: 17/11/2023

debido al uso recurrente y continuo de los mismos progenitores, provoca una baja variabilidad genética, a la cual al patógeno le resulta fácil adaptarse (4). Recientemente, se informó la adaptación de aislamientos de *P. nicotianae* a la resistencia parcial de cultivares cubanos. Estos aislamientos, más agresivos, son capaces de causar severos daños en cultivares informados como resistentes (5).

En el mundo se informan cuatro diferentes fuentes genéticas de resistencia contra el patógeno *P. nicotianae* (6). Los cultivares de tabaco Negro 'Florida 301', 'Beinhart-1000' (B-1000) y 'Beinhart-1000-1' (B-1000-1) poseen resistencia poligénica. No obstante, a pesar de ser efectiva frente a diferentes razas del patógeno, los cultivares que la presentan, expresan de bajos a altos niveles de resistencia (7). Los cultivares 'B-1000' y 'B-1000-1' son considerados, hasta el momento, como los de mayor resistencia frente a todas las razas de *P. nicotianae* (8). Los fitomejoradores del cultivo del tabaco consideran que las bases genéticas para la resistencia a *P. nicotianae* en ambos cultivares ('B-1000' y 'B-1000-1') son las mismas, debido a su similar origen. El cultivar 'B-1000-1' se seleccionó a partir de 'B-1000', y en ensayos frente a *P. nicotianae* revelan iguales comportamientos de resistencia (9).

Una búsqueda intensa y rigurosa en el *pedigree* de los cultivares comerciales de tabaco cubano, exponen que probablemente sólo se introdujo en el país, genotipos con los genes de resistencia proveniente de 'Florida 301' (4). Este aspecto pudiera justificar que los cultivares de tabaco expresen niveles de resistencia de moderadamente susceptibles a altamente resistentes a la raza 0 y susceptibles a la raza 1 de *P. nicotianae*. Además, que el patógeno puede adaptarse a estos genes en cortos periodos de tiempo (5).

Los resultados de evaluación de todas las fuentes de resistencia reconocidas internacionalmente frente a aislamientos cubanos de *P. nicotianae*, demostraron una alta resistencia en B-1000' y 'B-1000-1' frente al 90 % de los aislamientos, clasificándose como resistentes frente al 10 % de estos (10). Ambos cultivares pudieran constituir fuentes de resistencia poligénica potencial en los programas de mejoramiento del cultivo y también, una vía de solución para mitigar el impacto que produce esta enfermedad en las áreas tabacaleras del país (10).

El objetivo de la presente investigación es evaluar la resistencia frente a *P. nicotianae* de nuevos híbridos de tabaco, con incorporación de genes de resistencia provenientes del cultivar 'Beinhart-1000-1'

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los cinco híbridos, se seleccionaron cinco cultivares comerciales de tabaco negro cubano como progenitores femeninos, los cuales se polinizaron de manera independiente con el cultivar

foráneo 'B-1000-1'. Como premisa fundamental en la selección de los cultivares cubanos, además de la resistencia a las principales enfermedades (pata prieta y moho azul) se consideraron los resultados en rendimiento, calidad y propiedades organolépticas de las hojas. Los cruzamientos se efectuaron mediante el método de cruzamiento intervarietal con polinización controlada. Los cinco progenitores femeninos cubanos no pueden ser declarados por acuerdo confidencial y propiedad intelectual del Instituto de Investigaciones del Tabaco (Tabla 1). El comportamiento de resistencia frente a *P. nicotianae* de los cinco híbridos y sus parentales (femeninos y masculinos) se evaluó durante dos campañas tabacaleras, en los periodos comprendidos de diciembre a marzo de 2020-2021 y de 2021-2022, en condiciones de semillero y plantación, incluyéndose como testigo susceptible el cultivar 'KY-14'.

Tabla 1. Simbología utilizada para denominar a los parentales e híbridos utilizados en este estudio/Symbology used to name the parents and hybrids used in this study

Parentales femeninos	Parental masculino (Pm)	Combinación híbrida obtenida
P1	'B-1000-1' (Pm)	H1
P2		H2
P3		H3
P4		H4
P5		H5

Para el experimento en semillero, se utilizó la tecnología de canteros tecnificados a base de cachaza y cascarilla de arroz, como materia orgánica (3:1) infectada de manera natural con *P. nicotianae*, y determinando antes su concentración de inóculo por el método de cebo (3 propágulos /g de suelo) (11). El sustrato se homogenizó con instrumentos de labranza para asegurar igual concentración de inóculo de *P. nicotianae* en todas las parcelas experimentales. Los experimentos se realizaron bajo un Diseño de Bloques al Azar con tres réplicas, donde se consideraron como bloques cada cantero y como unidad experimental, cada parcela de 1 m² con 200 plantas por genotipo. Se evaluó, cada tres días, el porcentaje de plantas afectadas por la enfermedad a partir de la aparición de los primeros síntomas, hasta que el testigo susceptible 'KY-14' alcanzó el 100 % del área afectada.

De forma paralela al experimento anterior y con la misma proporción de sustrato estéril para garantizar plántulas sanas, se desarrolló otro semillero libre de enfermedades y sin aplicaciones de fungicida, garantizando la cantidad de plantas suficientes para el experimento en plantación. Las plántulas de los diferentes genotipos, trascurridos 45 días de edad, se trasplantaron a parcelas experimentales donde cada uno ocupó cinco surcos, con un promedio de 20 plantas por surco. El experimento se realizó bajo un Diseño Comple-

tamente Aleatorizado con dos réplicas, y se consideró como unidad experimental cada surco con 20 plantas. El ensayo se realizó bajo condiciones de inoculación natural del patógeno, en suelos con informes de alta incidencia de la enfermedad, lo cual se comprobó, previamente, a través del método de cebo (4 propágulos/g de suelo de *P. nicotianae*) (11).

Las evaluaciones del porcentaje de plantas enfermas con pata prieta, en todos los genotipos, comenzaron a los 20 días del trasplante, y se realizaron cada 15 días hasta los 80 días de establecido el cultivo en el campo.

En ambas etapas, a los valores del porcentaje de plantas enfermas, se les comprobaron las premisas de normalidad con el test de Shapiro Wilks y la homogeneidad de varianza con el test de Levene, ambos realizados de forma independiente en el programa InfoStat v. 2016 (12). Luego, para el análisis de esta variable, se calculó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) descrito por Madden *et al.* (13) usando la fórmula del punto medio:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

t_{i+1} : tiempo de evaluación $i+1$ (días después de la siembra)

t_i : tiempo de evaluación i (días después de la siembra)

y_i : porcentaje de plantas enfermas o área afectada con la enfermedad en la evaluación i

y_{i+1} : porcentaje de plantas enfermas o área afectada con la enfermedad en la evaluación $i+1$

n : cantidad de evaluaciones realizadas

El ABCPE es una variable que estima la intensidad de la enfermedad a lo largo del experimento. Se calcula a través de los valores del porcentaje de plantas enfermas en cada evaluación o de área afectada por la enfermedad (es decir, la acumulación diaria del porcentaje de los valores de infección) y se interpreta de

manera directa y sin transformación. Cuanto más alto es el ABCPE, más susceptible es el cultivar (14).

A los datos del ABCPE se les realizó un Análisis de Varianza de Clasificación Simple, Modelo de Efectos Fijos, en tanto, para la comparación de las medias se utilizó la prueba a posteriori de la Mínima Diferencia Significativa (LSD). Todos los análisis estadísticos requeridos en cada experimento, se realizaron en el programa InfoStat v. 2016 (12)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación del ABCPE durante la fase de semillero demostró, que los híbridos presentaron un comportamiento similar en ambas campañas tabacaleras. El parental masculino B-1000-1' presentó el menor valor del ABCPE en las dos campañas, mostrando la mayor resistencia a *P. nicotianae* (Fig. 1). Todos los híbridos manifestaron valores del ABCPE intermedios entre el parental masculino 'B-1000 -1' y sus parentales femeninos correspondientes. Los híbridos que presentaron los valores más bajos de ABCPE fueron H3 y H4, en ambos momentos de evaluación; mientras, el resto de los híbridos presentaron valores superiores y sin diferencias significativas entre ellos. Los progenitores femeninos alcanzaron valores variables del ABCPE y se diferenciaron de sus descendientes F1. Entre los progenitores se destacaron el P3 y P4 con los valores de ABCPE más bajos, diferenciándose del resto de los progenitores femeninos. Todos los genotipos evaluados se diferenciaron por mostrar niveles de resistencia superiores al testigo susceptible 'KY-14' frente a *P. nicotianae*. (Fig. 1A.).

En ambas campañas tabacaleras y en la fase de plantación, los resultados de la evaluación de la resistencia ante *P. nicotianae* muestran que el cultivar 'B-1000-1' y el híbrido H3 presentaron los menores valores del ABCPE (Fig. 2). En el primer año de

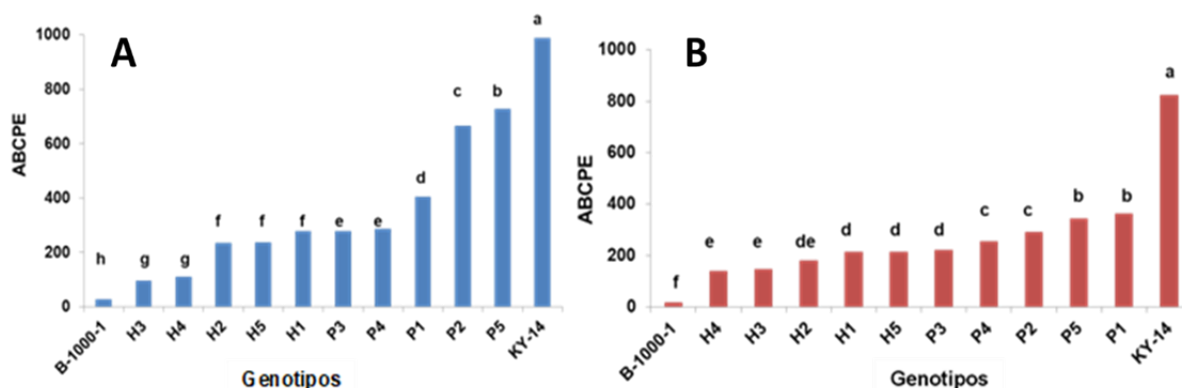


Figura 1. Valores medios del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) para parentales e híbridos en etapa de semillero. A: ABCPE en la campaña tabacalera 2020-2021. B: ABCPE en la campaña tabacalera 2021-2022 Letras asignadas por la prueba a posteriori de la Mínima Diferencia Significativa. Letras distintas indican diferencias significativas con ($p < 0,005$) / Mean values of the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) for parents and hybrids at seedling stage. A: AUDPC in the 2020-2021 tobacco season. B: AUDPC in the 2021-2022 tobacco season Letters assigned by the Least Significant Difference a posteriori test. Different letters indicate significant differences with ($p < 0.005$).

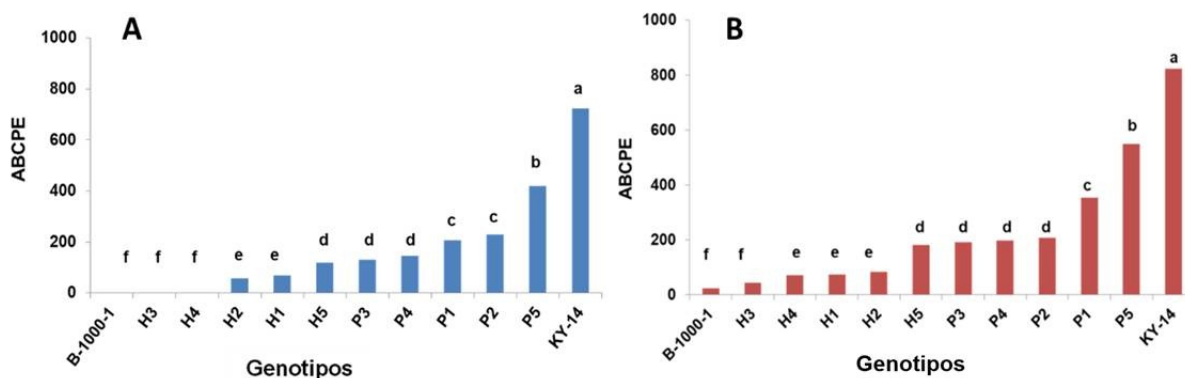


Figura 2. Valores medios del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) para parentales e híbridos en etapa de plantación. A: ABCPE en la campaña tabacalera 2021-2022. B: ABCPE en la campaña tabacalera 2021-2022, Letras asignadas por la prueba a posteriori de la Mínima Diferencia Significativa, Letras distintas indican diferencias significativas con ($p < 0,005$) / Mean values of the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) for parents and hybrids at planting stage. A: AUDPC in the 2021-2022 tobacco season. B: AUDPC in the 2021-2022 tobacco season, Letters assigned by the Least Significant Difference a posteriori test Different letters indicate significant differences with ($p < 0.005$)

evaluación, se agruparon con el parental masculino el híbrido H4 y H3; sin embargo, en el segundo año, el valor del H4 lo reunió con los híbridos H1 y H2 (Fig. 2 A y B). El resto de los híbridos exhibieron valores de ABCPE intermedios y con diferencias significativas entre el parental masculino 'B-1000-1' y los parentales femeninos. En ambas campañas, el híbrido H5 presentó los mayores valores de ABCPE, diferenciándose del resto de los híbridos y clasificándose como el de más baja resistencia entre ellos. Además, este híbrido, se agrupó con los parentales femeninos P3 y P4; mientras, que P5 obtuvo el mayor valor del ABCPE, siendo el de resistencia más baja entre los progenitores femeninos cubanos. El testigo susceptible 'KY-14' presentó el mayor valor de ABCPE, diferenciándose de todos los genotipos evaluados. Ligeras diferencias e incremento de temperatura, según registros meteorológicos consultados, pudieron influir en la campaña 2021-2022 (entre los meses de enero a marzo del 2022 con respecto a igual periodo de 2021) propiciaron un leve incremento del desarrollo de la enfermedad en la etapa de plantación. La enfermedad pata prieta se favorece en climas cálidos, alta humedad y períodos lluviosos (8).

Los híbridos y parentales mostraron el mismo comportamiento en cuanto a la resistencia ante el patógeno, tanto en la etapa de semillero como en la de plantación. Los genotipos más resistentes en semillero (parental masculino e híbridos) coincidieron en la etapa de plantación, mostrando los menores valores ABCPE (Fig. 1 y 2).

Se observó que en la etapa de semillero se muestran valores más altos del ABCPE, respecto a los valores obtenidos en la etapa de plantación. La mayor susceptibilidad en etapas tempranas del desarrollo de los cultivos, se ha evidenciado en diferentes interacciones planta-patógeno. Bajo el término general "resistencia relacionada con la edad", se exponen resultados que demuestran una ganancia de resistencia a la enferme-

dad contra un determinado patógeno cuando las plantas son adultas (15) Estudios han correlacionado un incremento de la resistencia frente a los patógenos al transitar la planta del estado juvenil al estado adulto. El desarrollo morfológico de la planta es una adaptación clave a las fluctuaciones de la población de patógenos en la naturaleza. La presencia de genes que controlan la morfología y el desarrollo fenotípico de las plantas tienen un efecto pleiotrópico sobre la resistencia a las enfermedades (16).

Estos resultados coinciden con lo informado para los híbridos F1, obtenidos a partir del cruce entre 'B-1000-1' y 16 parentales con diferentes niveles de resistencia a *P. nicotianae*. Los híbridos resultantes expresaron valores intermedios de resistencia entre ambos parentales, y mayores niveles de resistencia respecto a híbridos obtenidos de los cultivares resistentes 'Rg' y 'N.C. 5346', derivados de 'Florida 301' (17). Investigaciones con las líneas derivadas de 'B-1000-1' demostraron ser más resistentes que las líneas que procedían de 'Beltsville', con resistencia derivada de *N. plumbaginifolia* (18).

La presente investigación pudiera servir de referencia a nuevos programas de mejoramiento genético, que permitan combinar, en un mismo genotipo, los genes de resistencia provenientes de dos fuentes de resistencia poligénicas (del cultivar 'B-1000-1' y 'Florida 301'). Esta combinación contribuiría a frenar el progreso de la enfermedad pata prieta, puesto que en los híbridos se manifiestan niveles de resistencia superiores a los cultivares cubanos.

CONCLUSIONES

Los cinco híbridos de tabaco obtenidos mostraron altos niveles de resistencia frente a *P. nicotianae*, superando la resistencia de los parentales femeninos, pero no la del progenitor masculino 'B-1000-1'.

REFERENCIAS

1. McCorkle KL, Drake KE, Lewis RS, Shew HD. Characterization of *Phytophthora nicotianae* resistance conferred by the introgressed *Nicotiana rustica* region Wz, in flue-cured tobacco. *Plant Dis.* 2018;102(2):309-317. DOI: [10.1094/PDIS-03-17-0339-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0339-RE)
2. Martínez J. Genes involucrados en la resistencia a la pata prieta y mejoramiento genético en Cuba. *Cubatabaco.* 2015;16(1):69-77.
3. Domínguez Y S, Pérez MA, Magallanes J A, Chávez. Analysis of genetic polymorphism in wild *Nicotiana* species and Cuban cultivated tobacco (Solanaceae) through AFLP. *Biotecnol Apl.* 2018;35(2):2201-2205.
4. Martínez J, Castro M, Toledo V, González A. El gen *Php* no es una fuente de resistencia en el tabaco cubano. *Cultivos Tropicales.* 2019;40(1):1-19.
5. Toledo V, González A. Agresividad de aislamientos de *Phytophthora nicotianae* Breda Haan adaptados a la resistencia parcial del cultivar cubano de tabaco 'Criollo 2010'. *Rev. Protección Veg.* 2022;37(1):e03. Cu-iD: <https://cu-id.com/2247/v37n1e03>
6. Vanegas DM, Navarro RA, Alfador L, Gutierrez JA, Morales JG, Gaviria BM. Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates from tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) in Colombia. *Rev. Ceres, Viçosa.* 2022;69(1):078-091. DOI: [10.1590/0034-737x202269010011](https://doi.org/10.1590/0034-737x202269010011)
7. 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 Sci.* 2013;53(2):473-482. DOI: [10.2135/cropsci2012.06.0376](https://doi.org/10.2135/cropsci2012.06.0376)
8. Zeng JM, Nifong J, Liu C, Huang J, Fang DH, Lewis RS. Evaluating diverse systems of tobacco genetic resistance to *Phytophthora nicotianae* in Yunnan, China. *Plant Pathology.* 2019;68(9):1616-1623. DOI: [10.1111/ppa.13091](https://doi.org/10.1111/ppa.13091)
9. Tong ZB, Xiao J, Fangchan F, Dunhuang J, Zeng X, et al. Large-scale development of SSR markers in tobacco and construction of a linkage map in flue-cured tobacco. *Breeding Science* 2016;66(3):381-390. DOI: [10.1270/jsbbs.15129](https://doi.org/10.1270/jsbbs.15129)
10. González A, Toledo V. Evaluación de fuentes de resistencia del género *Nicotiana* frente a aislamientos cubanos de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. *Rev. Protección Veg.* 2019;34(1). Available from: <https://censa.edicionescervantes.com/index.php/RPV/article/view/1018>
11. Fernández A, Toledo V, Rey X. Determinación de parámetros óptimos para la detección de *Phytophthora nicotianae* en suelo mediante un método de cebo. *Fitosanidad.* 1998;2(1-2):7-10.
12. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. Infostat versión 2016. Grupo infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available from: <https://www.infostat.com.ar>
13. Madden LV, Hughes G, Van der Bosch F. The study of plant disease epidemics. APS Press. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 2007. 421 pp. ISBN 978-0-89054-354-2.
14. Forbes G, Pérez W, Andrade Piedra J. Procedimiento para Evaluación Estándar y Manejo de Datos de Clones Avanzados de Papa. En: Modulo 3: Evaluación de la Resistencia en genotipos de papa a *Phytophthora infestans* bajo condiciones de campo. Guía para Colaboradores Internacionales. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa (CIP). 2014. 50 pp
15. Ruifang S, Yujiao T, Waqar G, Zhengxiong Z. Unraveling the expression of differentially expressed proteins and enzymatic activity in response to *Phytophthora nicotianae* across different flue-cured tobacco cultivars. *BMC Microbiology.* 2022;22(1):112. DOI: [10.1186/s12866-022-02531-z](https://doi.org/10.1186/s12866-022-02531-z)
16. Hu L, Yang L. Time to fight: Molecular mechanisms of age related resistance. *Phytopathology.* 2019;109(9):1500-1508. DOI: [10.1094/PHYTO-11-18-0443-RVW](https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-18-0443-RVW)
17. Silber G, Heggstad H. Comparative black shank resistance of Beinhart 1000 (Quin Diaz), N.C. 5346 and Rg in F1 generation involving various tobacco types. *Tob. Sci.* 1963;7:144-147.
18. Heggstad H, Lautz W. Some results of studies on resistance to tobacco black shank. *Phytopathology.* 1957;47:452-452

Conflicto de intereses: los autores no poseen conflicto de intereses

Contribución de los autores: **Gonzalez Angélica:** conceptualización, análisis formal, Investigación, metodología, supervisión, validación, visualización, redacción del borrador original, redacción y edición. **Toledo Verónica:** conceptualización, investigación, metodología, Administración de Proyecto, validación, visualización, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).

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/)