



# EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA AL FALSO OROBANCHE CAUSADO POR *Nocardia* sp. EN *Nicotiana* spp.

## Evaluation of resistance to false Orobanche caused by *Nocardia* sp. on *Nicotiana* spp.

Yunior M. Morán Gómez<sup>1✉</sup>, Juan L. Pérez Rodríguez<sup>2</sup>,  
Antonio Núñez Mansito<sup>2</sup>, Rosario Domínguez Larrinaga<sup>1</sup>,  
Gilberto Torrecilla Guerra<sup>2</sup>, María del C. Córdoba Sellés<sup>3</sup>  
y Felipe L. Herrera Isla<sup>4</sup>

**ABSTRACT.** False Orobanche affects tobacco production in Cuba. Diseased plants development abundant shoot proliferation and tumour in the root, and they're showing dwarfism and rickets. Cuban Black tobacco cultivars are susceptible to *Nocardia* sp., causal agent of this disease. The incorporation of resistance genes into Cuban cultivars through genetic improvement will be an important element in the strategy for integrated management of this disease. However, there were not known sources of resistance to the disease and there isn't an available procedure for the assessment of potential resistance sources present in the tobacco germplasm of Cuba. The objective of this research is to develop a method of assessing the level of resistance to the causal agent of false Orobanche of tobacco germplasm accessions. Fourteen accessions of different species and types of tobacco were inoculated with T42 strain of *Nocardia* sp. From the showing of symptoms was developed an empiric visual scale for calculating the plant's damage degree. Accessions were located into four levels of reaction (resistant, moderately resistant, moderately susceptible and susceptible) according to plant's damage degree. Resistant genotypes were identified within the tobacco germplasm bank of Cuba. Also within susceptible evaluated cultivars, plants carrying resistance genes were found with which they could immediately begin a genetic improvement program by selection of pure lines.

**RESUMEN.** El falso Orobanche afecta a la producción tabacalera de Cuba. Las plantas afectadas desarrollan abundante proliferación de brotes y tumores en las raíces, muestran enanismo y raquitismo. Los cultivares de tabaco Negro cubano son susceptibles a *Nocardia* sp., agente causal de esta enfermedad. La incorporación de genes de resistencia a este agente fitopatógeno en los cultivares cubanos, mediante el mejoramiento genético tradicional, constituirá un elemento de peso en la estrategia de manejo integrado de esta enfermedad. Sin embargo, no se conocen fuentes de resistencia a la enfermedad dentro de *Nicotiana* spp., ni se dispone de un procedimiento para la búsqueda de estas fuentes en la amplia diversidad de accesiones presentes en el banco de germoplasma de tabaco de Cuba. El objetivo de esta investigación es desarrollar un procedimiento de evaluación del nivel de resistencia frente al agente causal del falso Orobanche de las accesiones del banco de germoplasma de tabaco de Cuba. Catorce accesiones de diferentes especies y tipos de tabaco fueron inoculadas con la cepa T42 de *Nocardia* sp. A partir de la manifestación de los síntomas se elaboró una escala visual empírica que permite calcular el grado de afectación de las plantas. En correspondencia con el grado de afectación se ubicaron las accesiones en cuatro niveles de reacción (resistente, moderadamente resistente, moderadamente susceptible y susceptible). Se identificaron accesiones resistentes a la enfermedad dentro del banco de germoplasma de tabaco de Cuba. También dentro de cultivares evaluados de susceptibles se encontraron plantas portadoras de genes de resistencia con las que se pudiera comenzar de inmediato un programa de mejoramiento genético por selección de líneas puras.

**Key words:** bacteria, tumour, shoot proliferation, germplasm, resistance

**Palabras clave:** bacteria, tumor, proliferación de brotes, germoplasma, resistencia

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), carretera a Tumbadero, km 8 ½ San Antonio de los Baños. Artemisa. CP 32500.

<sup>2</sup> Estación Experimental del Tabaco de Cabaiguán, carretera a Santa Lucía, km 2, Cabaiguán, Sancti Spiritus. Cuba.

<sup>3</sup> Universidad Politécnica de Valencia (UPV), camino de Vera s/n, 46022 Valencia. España.

<sup>4</sup> Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, carretera a Camajuani, km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

✉ yunior.moran@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad denominada “falso Orobanche” es uno de los factores que afectan la producción tabacalera de Cuba. En los primeros estadios, las plantas de tabaco afectadas desarrollan pequeños sobrecrecimientos blancos en cualquier posición de la raíz principal o en las raíces laterales secundarias o terciarias<sup>A</sup>.

Con el desarrollo de los síntomas, de las excrecencias de masas blanquecinas jugosas e irregulares, comienzan a diferenciarse pequeños brotes con hojas abortadas sin clorofila. En esta etapa, también se pueden observar tumores en las raíces que pueden alcanzar hasta ocho centímetros de diámetro. Durante estas etapas que ocurren bajo tierra, las estructuras que se desarrollan se asemejan a una planta de *Orobanche ramosa* L. que se encuentra entre las fases fenomenológicas de “nódulos” y “emergencia”; en las cuales la planta parásita se observa con un bulbo carnoso del cual emerge un tallo con una o dos ramas con varias inflorescencias sin abrir; todas estas estructuras son de color amarillo pálido<sup>A</sup>.

Alrededor de los 45 días después del trasplante de las plántulas de tabaco a la vega, esta enfermedad induce la producción de estructuras que muestran una clara diferencia con *O. ramosa*, de ahí que el trastorno se denomine “falso Orobanche”. En este período, los sobrecrecimientos que despuntan sobre la superficie del suelo, con la exposición a la luz solar comienzan a tomar una coloración verdosa y la apariencia de los brotes normales de la planta de tabaco. Estos brotes diferenciados a partir de las masas blanquecinas pueden llegar a producir órganos vegetales, como si se tratara de una planta de tabaco independiente y es en este momento que los síntomas pueden ser fácilmente observados en el campo<sup>A</sup>.

El primer informe de esta enfermedad en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en el país fue realizado en la segunda mitad del siglo pasado<sup>A</sup> y desde entonces ha tenido un notable incremento en su distribución y en la intensidad de los daños causados(1).

En la zona central del país, en el cultivar de tabaco negro ‘Pelo de Oro’, se determinaron pérdidas económicas que en promedio ascendían hasta los \$ 2 511,73 pesos por hectárea, derivadas en lo fundamental al enanismo, raquitismo y clorosis en las plantas afectadas, lo que influye negativamente en el rendimiento y la calidad del cultivo<sup>A</sup>.

Recientemente se demostró que el agente causal de esta enfermedad es un actinomiceto perteneciente al género *Nocardia* (2). La identificación del agente causal

del falso Orobanche abre nuevos espacios de acción para realizar el manejo integrado de esta enfermedad del tabaco. En este sentido la incorporación de la resistencia al agente a los cultivares comerciales de tabaco, mediante el mejoramiento genético, constituirá un elemento de peso en su futuro manejo, como lo ha sido para otros cultivos afectados por diversos agentes fitopatógenos (3, 4). La determinación de fuentes de resistencia en los materiales presentes en los bancos de germoplasma es de gran importancia, pues permitiría la incorporación de genes de resistencia a los cultivares de interés (5).

Sin embargo, poco se ha avanzado en la búsqueda de materiales del género *Nicotiana* que muestren resistencia frente al falso Orobanche. En la década de los 90 del siglo pasado se determinó que los cultivares comerciales de tabaco Negro cubano (*N. tabacum*) ‘C-30’, ‘Cabaiguán-72’, ‘Habana-92’, ‘Burley-37’ y ‘Corojo’, aunque resultaron afectados por la enfermedad, presentaron en ese orden menos afectaciones que el cultivar ‘Pelo de Oro’<sup>A</sup>. Este resultado indica la posibilidad de encontrar fuentes de resistencia a esta enfermedad.

Actualmente no se conocen fuentes de resistencia a la enfermedad dentro de *Nicotiana* spp., ni se dispone de un procedimiento para la búsqueda de estas fuentes en la amplia diversidad de accesiones presentes en el banco de germoplasma de tabaco de Cuba. Para lograr esto es necesario disponer de una escala para la evaluación del grado de resistencia de las plantas, frente al agente etiológico de la enfermedad.

En concordancia con lo anterior, el objetivo de esta investigación fue desarrollar un procedimiento de evaluación del grado de resistencia frente al agente causal del falso Orobanche en las accesiones pertenecientes al banco de germoplasma de tabaco de Cuba, en base a una escala empírica de observación de los síntomas de la enfermedad en condiciones controladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PREPARACIÓN DEL ENSAYO

**Germoplasma empleado.** Se emplearon 14 accesiones pertenecientes al género *Nicotiana* presentes en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco de Cuba, ubicado en la Estación Experimental de Tabaco de Cabaiguán, Sancti Spíritus, donde se encuentra una de las colecciones más grandes de América Latina y del Caribe con más de 800 accesiones de *Nicotiana tabacum* L. y 40 especies silvestres del género<sup>B</sup>. Siete accesiones fueron de tabaco tipo Virginia

<sup>A</sup> Méndez, R. *Característica, distribución y daños del falso orobanche en el cultivo del tabaco* [Tesis de Maestría], Universidad Central de Las Villas, Las Villas, Cuba, 1998, 66 p.

<sup>B</sup> Torrecilla, G.G. y Cabrera, E.M. “Colección del género *Nicotiana*, una experiencia al servicio de la ciencia y la sostenibilidad”, *Tobacco Irrigation*, vol. 1, no. 1, 2010, pp. 20-25.

(*N. tabacum* cv. 'Fogía D' Oro'; 'L AFC 53'; 'Virginia 110'; 'Virginia SL 32'; 'Novaga 768'; 'K 358'), dos de tipo Negro (*N. tabacum* cv 'Habana 92'; 'Corojo 2006'), uno de tipo Oriental (*N. tabacum* cv 'Xanthi UR') y las cuatro restantes fueron especies silvestres (*Nicotiana alata*; *Nicotiana nesophila*; *Nicotiana sylvestris*; *Nicotiana rustica* cv. '3001').

Estos materiales se seleccionaron para este estudio porque en áreas tabacaleras con presencia natural del patógeno, se observó que mostraban un comportamiento diferencial en la expresión de los síntomas. Algunas de ellas, como los cultivares de tabaco Negro y Virginia, mostraban gran cantidad de tumores en las raíces y el desarrollo excesivo de rebrotes abortados en raíces y cuello del tallo; mientras que las especies, o no mostraban ningún tipo de sintomatología, o su expresión era muy leve.

**Preparación del inóculo del agente causal del falso Orobanché.** De una placa con medio de cultivo D2 sólido (6) sembrada por agotamiento desde hacía 10 días con la cepa *Nocardia* sp. T42, agente causal del falso Orobanché (2) se tomó una colonia pura y sin agar de 1 mm de diámetro con un asa de platino. La colonia se transfirió a un frasco Erlenmeyer de 500 mL de capacidad con 200 mL de medio D2 líquido. Siguiendo este mismo proceder, se inocularon otros dos frascos Erlenmeyer en iguales condiciones. Este preinóculo se incubó durante siete días a 30 °C con agitación constante en zaranda orbital a 150 rpm.

Con este preinóculo se inocularon 100 frascos Erlenmeyers de 100 mL de capacidad contentivos de 45 mL de medio D2 líquido. Cada frasco Erlenmeyer se inoculó con 5 mL del preinóculo. El inóculo se incubó durante siete días a 30 °C con agitación constante en zaranda orbital a 150 rpm. El cultivo del microorganismo se realizó de manera separada en alícuotas de 45 mL para favorecer la aireación del medio, ya que este microorganismo muestra una alta dependencia del oxígeno en su desarrollo (2).

Al concluir el tiempo de incubación cada uno de los cultivos se filtraron por papel cuantitativo de filtración lenta (Whatman 390) empleando embudos de cristal. Este procedimiento se realizó sobre la mesa de trabajo. Para garantizar la homogeneidad del inóculo toda la masa microbiana, obtenida en el papel de filtro se resuspendió vigorosamente en 1 000 mL de solución salina estéril (solución acuosa de NaCl al 0,85 %) en un beaker de 5 000 mL de capacidad.

Mediante el procedimiento de recuento de viables en placa (7), realizado a la suspensión bacteriana se estableció que la concentración celular de *Nocardia* sp. cepa T42 fue de  $6,2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

**Procedimiento de inoculación de las plántulas correspondientes a cada accesión del banco.** En una bandeja plástica de dimensiones 50 x 40 x 10 cm, desinfectada con hipoclorito de sodio al 5 % por

30 minutos, se vertieron nueve litros de solución salina estéril y a este volumen se le agregó el litro de inóculo, estimándose una concentración poblacional para la cepa T42 de alrededor de  $6,2 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> en el nuevo volumen. La altura del líquido vertido no sobrepasó los 5 cm en el depósito empleado, con lo que se garantizó que solamente las raíces de las plántulas pudieran sumergirse en el inóculo.

Las plántulas de las diferentes accesiones de 45 días de edad se obtuvieron en semilleros de bandejas flotantes con sustrato (turba negra húmica-sustratos agrícolas Ltda. Chile-, mezclada con 10 % de Fertilzol [Zeolita] Empresa Geominera Oriente. Cuba) esterilizado en autoclave a 121 °C, 1 013 hPa, 45 min.

Por cada entrada del banco se tomaron 20 plántulas al azar y se amarraron por el tallo con un cordel para formar un grupo. Cada grupo se identificó con el nombre de la entrada y las raíces de las plántulas se lavaron con abundante agua corriente para eliminar todo el sustrato adherido a ellas. Los 14 grupos de plantas se sumergieron en el inóculo, durante cuatro horas y a intervalos de una hora se homogenizó el contenido del recipiente, agitándolo suavemente de forma manual durante cinco minutos.

**Trasplante de las plantas inoculadas.** Todas las plántulas inoculadas se trasplantaron en bolsas de polietileno negro de 1 L de capacidad rellenas con 500 g de Pardo Sialítico sin diferenciación de carbonatos (8). Este se obtuvo de una vega tabacalera de Cabaiguán con antecedentes históricos de manifestación del falso Orobanché. Antes de llenar las bolsas todo el suelo se tamizó, se mezcló exhaustivamente y se esterilizó en autoclave a 121 °C a una presión de 1 013 hPa durante 45 minutos. El valor de pH del suelo luego de la esterilización, determinado como pH en KCl fue de 6,05. Se empleó este tipo de suelo para asegurar la persistencia del agente luego del trasplante, pues se ha observado que en las zonas tabacaleras afectadas por la enfermedad, esta se manifiesta en algunos tipos de suelos y en otros no<sup>c</sup>. En cada bolsa se plantaron dos plántulas con un total de 10 bolsas por accesión.

También se trasplantaron directamente en bolsas con suelo estéril otras 10 plántulas de cada accesión, obtenidas del mismo semillero (dos plantas por bolsa). Estas plántulas no inoculadas constituyeron los controles del experimento. Todas las plantas se mantuvieron hasta el momento de su evaluación en condiciones de aislador a  $30 \pm 2$  °C y cada tres días recibieron un riego de mantenimiento.

**Evaluación de las plantas de tabaco.** La evaluación se realizó a los 45 días del trasplante. Para esto se extrajeron las plantas de las bolsas y se lavaron con abundante agua corriente, para eliminar el suelo de

<sup>c</sup>Morán, Y.M. Caracterización del agente etiológico del «falso Orobanché» del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en Cuba. Propuesta de un método para su detección [Tesis de Doctorado], Universidad Central de Las Villas, Las Villas, Cuba, 2012, 100 p.

las raíces. Se procedió con el máximo cuidado para no desprender ningún brote o tumor. Las mediciones del tamaño de las estructuras (brotes y tumores) se realizaron con ayuda de un Pie de Rey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas evaluadas en el estudio mostraron cuatro tipos de expresión de tumores y brotes. Estos tipos de expresión de los síntomas causados por esta enfermedad, se definieron a partir de un criterio visual empírico que describió la magnitud del desarrollo de los tumores y proliferaciones de brotes

en las raíces y el cuello del tallo de los materiales evaluados en el experimento, teniendo en cuenta la medición del tamaño de estas estructuras y su grado de diferenciación. Los elementos descriptivos de cada uno de los cuatro tipos de expresión se detallan en la Tabla I y la figura.

En todas las accesiones donde se presentaron los síntomas se pudo apreciar que la raíz principal resultó la de mayor afectación. También se observó que una misma planta podía presentar tumores y brotes de diferentes tipos, pero generalmente en esa planta los tumores y brotes de tipo 1 y 2 superaban en número a los tumores y brotes de tipo 3 y 4.

**Tabla I. Características de cada uno de los cuatro tipos de expresión de tumores y brotes que manifestaron las plantas afectadas por la enfermedad falso Orobanché a los 45 días de ser trasplantadas del semillero e inoculadas.**

Tipos de expresión de tumores y brotes	Tamaño de las estructuras	Grado de diferenciación
Tipo 1	$\text{Ø} \leq 4 \text{ mm}$	Rebote simple blanco a la altura del cuello del tallo; o masa compacta globular (tumor) de color blanco en las raíces.
Tipo 2	$4 \text{ mm} < \text{Ø} \leq 12 \text{ mm}$	Rebotes ramificados blanco-amarillosa la altura del cuello del tallo o en las raíces; o masa compacta globular de color blanco-amarillo en las raíces.
Tipo 3	$12 \text{ mm} < \text{Ø} \leq 24 \text{ mm}$	Rebotes ramificados reverdecidos a la altura del cuello del tallo o en las raíces; o masa compacta globular de color blanco-amarillo en las raíces con pequeñas proliferaciones de brotes abortados de color blanco.
Tipo 4	$24 \text{ mm} < \text{Ø}$	Rebotes con desarrollo de órganos foliares completos a la altura del cuello del tallo o en las raíces; o masa compacta globular de color pardo, con desarrollo de brotes y órganos foliares.



Con flechas se señalan las diferentes estructuras. A, B, C y D: brotes con tipos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. E, F, G y H: tumores con tipos 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

**Diferentes tipos de expresión de tumores y brotes mostrados por las plantas de tabaco inoculadas con el agente causal del falso Orobanché a los 45 días de ser trasplantadas del semillero.**

Para poder elaborar la escala de evaluación se necesitó una medida del grado de afectación de cada accesión frente al agente causal del falso Orobanche. Esta variable que se denominó "Grado medio de afectación" (GMA) se calculó a partir de cuatro tipos de expresión de los tumores y los brotes que causó el agente causal de esta enfermedad en los diferentes materiales evaluados, empleando la siguiente fórmula:

$$GMA = \frac{\sum_{i=1}^n (T4_i * 4 + T3_i * 3 + T2_i * 2 + T1_i)}{n}$$

donde:

- T4<sub>i</sub>: total de tumores y brotes tipo 4 de la planta i
- T3<sub>i</sub>: total de tumores y brotes tipo 3 de la planta i
- T2<sub>i</sub>: total de tumores y brotes tipo 2 de la planta i
- T1<sub>i</sub>: total de tumores y brotes tipo 1 de la planta i
- n: número de plantas evaluadas (solo las vivas)

En la Tabla II se muestran tres ejemplos de las fichas elaboradas para el cálculo del GMA que mostraron tres de las accesiones empleadas en el estudio.

Con respecto a las plantas muertas encontradas en el material inoculado, es importante mencionar que también dentro de las plantas testigo hubo materiales muertos. En general los síntomas encontrados en estas plantas muertas se describieron como marchitamiento de la planta, ennegrecimiento y pudrición en la raíz (síntomas estos que nunca han sido asociados a la

manifestación del falso Orobanche y sí asociados a hongos fitopatógenos del suelo). El diagnóstico de laboratorio confirmó la presencia de *Phytophthora nicotianae* Brenda de Hann (agente causal de la Pata Prieta). Posiblemente la causa de la infección se deba a los riegos realizados con agua no estéril con presencia de los propágulos del hongo (zoosporas), ya que se ha planteado que el agua de riego contaminada es una de las principales fuentes de inóculo y modo de dispersión de este agente fitopatógeno (9).

Es fundamental disponer, como mínimo, de una cantidad de 20 réplicas de plantas por cada accesión para realizar el estudio y para los cálculos del GMA en cada accesión no se deben emplear menos de 10 plantas.

**Escala de evaluación de la reacción de los materiales ante el agente causal del falso Orobanche.** La designación de los grados de escala de resistencia siguió un criterio empírico, pero se tuvo en cuenta un grupo de elementos que permitieron correlacionar, de una manera razonable, el valor calculado de la variable "Grado medio de afectación" con la respuesta de resistencia de un determinado material.

Debido a que los cultivares comerciales de tabaco cubano son un conjunto de genotipos homogécicos (10), se valoró la posibilidad de encontrar, dentro de una entrada evaluada como resistente, una pequeña proporción de individuos mostrando síntomas de la enfermedad. De este modo, se estableció que la proporción de individuos con síntomas dentro de la accesión considerada resistente no

**Tabla II. Fichas para el cálculo del GMA de las entradas *N. sylvestris*, *N. tabaco* cv. 'Novaga 768' y *N. tabacum* cv. 'Habana 92'.**

Réplica	Material vegetal											
	<i>Nicotiana sylvestris</i>				<i>N. tabaco</i> cv. 'Novaga 768'				<i>N. tabacum</i> cv. 'Habana 92'			
	Tipo de expresión				Tipo de expresión				Tipo de expresión			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1						1		X	X	X	X
2	X*	X	X	X					1	1	2	
3		1			1							
4	2				1	1	1			1	1	
5						3	1		1		2	1
6		1							X	X	X	X
7					X	X	X	X	X	X	X	X
8									6	2		
9		1						1		1	1	
10					1				X	X	X	X
11					1	2	1	1	1	4	1	
12	X	X	X	X			2		2			
13	X	X	X	X	1	3	1				2	1
14					X	X	X	X	X	X	X	X
15							2	2	X	X	X	X
16					1						2	1
17					2		2		2		1	2
18	X	X	X	X						1	2	
19									X	X	X	X
20					X	X	X	X	1	4		1
Total	3	3	0	0	8	9	11	4	14	14	14	6
	(3*1+3*2)/16 GMA: 0,56				(8*1+9*2+11*3+4*4)/17 GMA: 4,41				(14*1+14*2+14*3+6*4)/13 GMA: 8,31			

\* X:Planta muerta (no evaluada).

debe ser superior al 40 % del total evaluado y la expresión de brotes y tumores en estos individuos, no debe ser superior al tipo 2, ni el total de tumores o brotes en cada individuo debe ser mayor de 2.

En concordancia con lo anterior el "Grado medio de afectación" para una accesión que se determine resistente debe de ser inferior o igual a la unidad. La presencia de algún individuo aberrante (extremada cantidad de tumores o brotes en estados avanzados) dentro de este grupo de plantas resistentes no debe considerarse para el cálculo. Aquellas accesiones con  $GMA \leq 1$ , pero que no cumplan con el requisito de que, al menos el 60 % de sus individuos no presenten síntomas, serán ubicadas dentro del grupo de las moderadamente resistentes, al igual que aquellas accesiones con valores del "Grado medio de afectación" entre 1 y 4.

En la Tabla III se resumen los cuatro niveles de la escala empírica propuesta para evaluar la reacción de resistencia a los 45 días de ser trasplantadas del semillero e inoculadas con el agente causal de la enfermedad falso Orobanché, de los genotipos del banco de germoplasma de tabaco, en base al grado medio de afectación calculado.

**Tabla III. Escala empírica de cuatro categorías.**

Tipo de reacción de la accesión	Sigla	Valores del GMA
Resistente	R	$GMA \leq 1$
Moderadamente resistente	MR	$1 < GMA \leq 4$
Moderadamente susceptible	MS	$4 < GMA < 7$
Susceptible	S	$7 \leq GMA$

Las escalas empíricas han sido ampliamente empleadas para definir, de un modo simple, el grado de respuesta de los materiales presentes en colecciones de germoplasma de diversos cultivos frente a un patógeno particular. Todas, en sus extremos, ubican los tipos de reacciones resistente y susceptible. Difieren en lo fundamental en la cantidad de grados intermedios que utilizan para caracterizar adecuadamente la reacción del material durante el enfrentamiento al organismo fitopatógeno, empleando en algunos casos hasta nueve grados de reacción (5, 11, 12). Esta caracterización se basa siempre en la observación que se realiza de los síntomas que manifiestan las plantas retadas con el agente patógeno y la evaluación puede realizarse en condiciones de campo o invernadero (11, 13, 14, 15).

La escala de cuatro grados desarrollada en este estudio reúne las características descritas para la escala empírica. Esta escala permite la caracterización de la reacción de los materiales presentes en el germoplasma de tabaco frente al agente causal del falso Orobanché y constituye una importante herramienta para determinar las posibles fuentes de resistencias presentes en el banco de germoplasma de tabaco de Cuba. Este es el primer procedimiento del que se dispone para determinar la respuesta de

resistencia del género *Nicotiana* frente al agente causal del falso Orobanché.

Es importante establecer la presión de inóculo para este ensayo en un valor cercano a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de la cepa T42 de *Nocardia* sp., ya que esta variable es crítica para que los resultados sean repetibles, reproducibles y confiables. Se ha estimado que la concentración mínima de propágulos de este agente fitopatógeno que debe estar presente en el suelo debe ser superior a  $1,2 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>, para que las plantas de tabaco que se trasplantan a este suelo manifiesten la enfermedad<sup>c</sup>.

El potencial de inóculo empleado en este estudio, al ser superior (en más de 10 000 veces) a la concentración mínima requerida para que las plantas trasplantadas en un suelo contaminado del agente causal de esta enfermedad expresen los síntomas, es una garantía de que las entradas evaluadas de resistente realmente lo sean (al menos durante el período evaluado) y al enfrentarse a un trasplante a una vega contaminada con el agente patógeno seguirán comportándose de igual manera.

Otro elemento fundamental a tener en cuenta es el hecho de que la evaluación de los materiales se realice siempre a los 45 días de la inoculación con el agente causal, para así lograr la reproducibilidad de los resultados, pues aunque en este estudio se está manejando el término de resistencia, realmente esa condición no se evalúa en todas las etapas del desarrollo fenomenológico de la planta de tabaco, por lo que no se puede afirmar nada sobre un comportamiento posterior de los materiales evaluados como "resistentes". Se plantea que la reacción de la planta ante un patógeno es o bien de inmunidad, o sea que ni siquiera en las condiciones más favorables es atacada, o bien de resistencia que puede variar desde un nivel muy alto hasta ser imperceptible o nula, lo cual da una respuesta de alta susceptibilidad (16, 17).

En la Tabla IV se muestran los resultados de la aplicación de los criterios del procedimiento propuesto a las 14 accesiones del banco de germoplasma de tabaco empleadas en este estudio, al evaluar la reacción de los materiales a los 45 días de haber sido inoculadas con el agente causal del falso Orobanché.

De los 14 materiales evaluados, la especie *N. sylvestris* resultó resistente. Los materiales moderadamente resistentes resultaron ser *N. nesophila*, *N. rustica* cv. '3001', *N. tabacum* cv. 'Georgia 1469' y *N. alata*. De los cultivares de *N. tabacum*, 'Novaga 768', 'Corojo 2006', 'K 358', 'Virginia 110', 'Fogia D' Oro', 'Habana 92', 'Xanthi UR', 'Virginia SL 32' y 'LAF 53', los cuatro primeros reaccionaron como moderadamente susceptibles y los restantes cinco resultaron susceptibles.

**Tabla IV. Tipo de reacción de 14 accesiones pertenecientes al banco de germoplasma de tabaco frente al agente causal del falso Orobancha a los 45 días de ser inoculadas.**

Material	Tipo de tabaco	Valor	Reacción
<i>Nicotiana sylvestris</i>	especie	0,56	R
<i>Nicotiana nesophila</i>	especie	0,94	MR
<i>Nicotiana rustica</i> cv. '3001'	especie	2,60	MR
<i>N. tabacum</i> cv. 'Georgia 1469'	Virginia	2,69	MR
<i>Nicotiana alata</i>	especie	3,18	MR
<i>N. tabacum</i> cv. 'Novaga 768'	Virginia	4,41	MS
<i>N. tabacum</i> cv. 'Corojo 2006'	Negro	5,00	MS
<i>N. tabacum</i> cv. 'K 358'	Virginia	6,37	MS
<i>N. tabacum</i> cv. 'Virginia 110'	Virginia	6,86	MS
<i>N. tabacum</i> cv. 'Fogia D' Oro'	Virginia	7,24	S
<i>N. tabacum</i> cv. 'Habana 92'	Negro	8,31	S
<i>N. tabacum</i> cv. 'Xanthi UR'	Oriental	8,70	S
<i>N. tabacum</i> cv. 'Virginia SL 32'	Virginia	9,43	S
<i>N. tabacum</i> cv. 'LAFC 53'	Virginia	13,89	S

R: resistente; MR: moderadamente resistente; MS: moderadamente susceptible; S: susceptible.

*Nicotiana nesophila*, a pesar de que en el cálculo de GMA tuvo un valor inferior a uno, no se incluyó dentro de los genotipos resistentes, porque tuvo un porcentaje de individuos con síntomas superior al 40 % (43,8 %; 7 sintomáticos de 16 evaluados).

El hecho de que *N. tabacum* cv. 'Habana 92' se ubicara como susceptible está en concordancia con lo expresado por Méndez<sup>A</sup> y con lo que se observa en la producción (1).

De forma general, se apreció la existencia de genotipos resistentes dentro de las especies pertenecientes al banco de germoplasma de tabaco. Este hecho es de gran importancia e interés para los genetistas porque les permite disponer de fuentes con genes de resistencia a esta enfermedad (5, 18, 19, 20, 21).

Aunque la presencia de plantas asintomáticas dentro de una accesión que haya sido evaluada como susceptible no es un elemento que indique directamente que ese material presenta genes de resistencia a la enfermedad (pues pudiera deberse a dificultades imputables a otros factores del proceso de infección ajenos a la planta) no se debe despreciar la posibilidad de que en verdad ese material presente dichos genes. Como se ha explicado, los cultivares comerciales de tabaco cubano son una mezcla de genotipos homocigóticos seleccionados para determinados caracteres estables (10), por lo que es posible encontrar en el conjunto de individuos de esta accesión designada como susceptible, alguna planta que presente genes de resistencia para esta enfermedad, ante la cual no se ha hecho ningún tipo de selección para este carácter con anterioridad.

Este pudiera ser el caso de la tercera réplica evaluada del cultivar 'Habana 92' (Tabla I), quien se mostró asintomática durante todo el experimento. Con posterioridad a este estudio, esta planta se inoculó tres veces en la raíz en diferentes estados fenomenológicos y nunca manifestó los síntomas de

la enfermedad, a la vez que mantuvo un desarrollo normal a diferencia de otras plantas testigo del mismo cultivar que sí enfermaron al inocularlas con el agente causal de esta enfermedad. Con este tipo de plantas se puede comenzar de inmediato un proceso de selección de líneas puras, siguiendo el esquema de Johanssen (22) y de una forma rápida incorporar la resistencia a este cultivar, sin necesidad de buscar fuentes de resistencia en cruces intraespecíficos, ni mucho menos interespecíficos.

La introducción de genes de resistencia de una especie a otra por repetidos cruzamientos es un proceso muy largo en el tiempo, el cual usualmente toma muchas generaciones híbridas antes de que el cruzamiento tenga éxito (20).

La introducción en la práctica agrícola del procedimiento aquí descrito requerirá de la validación del mismo a través de la realización de experimentos de campo en áreas tabacaleras naturalmente afectadas, que permitan determinar si el uso de los rangos de la escala propuesta para condiciones controladas se ajusta al comportamiento de las accesiones en las condiciones de campo y durante períodos más largos de evaluación de los materiales.

Se ha planteado que la exactitud y precisión de las escalas de evaluación dependen del entrenamiento del evaluador más que del tipo de intervalo seleccionado y que la reproducibilidad se obtiene con la práctica y la discusión de resultados. Por lo tanto, en la medida en que esta escala sea puesta a punto en los diferentes ensayos y en los sucesivos años, surgirán los ajustes necesarios para que finalmente se constituya en una herramienta que pueda responder a las necesidades planteadas (23).

## CONCLUSIONES

- ◆ Se desarrolló el primer procedimiento para la determinación de la respuesta de resistencia del material presente en el germoplasma de tabaco de Cuba frente al agente causal del falso Orobanche, el cual se establecerá en una importante herramienta para el trabajo de los fitomejoradores.
- ◆ Este procedimiento emplea una escala de cuatro niveles para la evaluación de las accesiones que las ubica en resistente, moderadamente resistente, moderadamente susceptible y susceptible.
- ◆ Para que los resultados de este ensayo sean repetibles, reproducibles y confiables se requiere de una presión de inóculo con un valor cercano a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de la cepa T42 de *Nocardia* sp., y el empleo de una cantidad mínima de 20 réplicas de plantas por cada accesión, para realizar el estudio y para los cálculos del GMA en cada accesión no se deben emplear menos de 10 plantas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de la Agricultura. *Guía para el cultivo del tabaco 2008-2009*, edit. AGRINFOR, La Habana, Cuba, 2008, p. 47, ISBN 978-959-246-204-5.
2. Morán, Y.; Chacón, O.; Córdoba-Sellés, M. del C.; Domínguez-Laminaga, R.; Herrera, L. y Borrás-Hidalgo, O. "Identification and Molecular Characterization of *Nocardia* sp. as a New Causal Agent of Tobacco False Broomrape", *Journal of Phytopathology*, vol. 161, no. 2, 1 de febrero de 2013, pp. 86-91, ISSN 1439-0434, DOI 10.1111/jph.12029.
3. Tadesse, W.; Reents, H.J.; Hsam, S.L.K. y Zeller, F.J. "Relationship of seedling and adult plant resistance and evaluation of wheat germplasm against tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*)", *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 58, no. 3, 22 de junio de 2010, pp. 339-346, ISSN 0925-9864, 1573-5109, DOI 10.1007/s10722-010-9577-1.
4. Hayes, R.J.; McHale, L.K.; Vallad, G.E.; Truco, M.J.; Michelmore, R.W.; Klosterman, S.J.; Maruthachalam, K. y Subbarao, K.V. "The inheritance of resistance to Verticillium wilt caused by race 1 isolates of *Verticillium dahliae* in the lettuce cultivar La Brillante", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 123, no. 4, 13 de mayo de 2011, pp. 509-517, ISSN 0040-5752, 1432-2242, DOI 10.1007/s00122-011-1603-y.
5. Lagarde, P.; Medina, A.; Ramis, C. y Maselli, A. "Evaluación de la resistencia a la bacteriosis común causada por *Xanthomonas phaseoli* en plantas F3 de caraota (*Phaseolus vulgaris*)", *Fitopatología Venezolana*, vol. 23, no. 2, 2013, pp. 35-39, ISSN 0798-0035.
6. Schaad, N.W.; Jones, J.B. y Chun, W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. [en línea], 3.ª ed., edit. APS Press, 2001, ISBN 0-89054-263-5, [Consultado: 10 de septiembre de 2015], Disponible en: <<http://www.apsnet.org/apsstore/shopapspress/Pages/42635.aspx>>.
7. Prescott, L.M.; Harley, J.P. y Klein, D.A. *Microbiología* [en línea], 7.ª ed., edit. McGRAW HILL, 2009, p. 1124, ISBN 978-84-481-6827-8, [Consultado: 10 de septiembre de 2015], Disponible en: <[http://www.elkar.eus/es/liburu\\_fitxa/microbiologia-de-prescott-harley-y-klein-7.-ed/willey-joanne-m./9788448168278](http://www.elkar.eus/es/liburu_fitxa/microbiologia-de-prescott-harley-y-klein-7.-ed/willey-joanne-m./9788448168278)>.
8. Hernández, A.; Pérez, J.; Bosch, D. y Castro, N. *Clasificación de los suelos de Cuba 2015*, edit. Ediciones INCA, Mayabeque, Cuba, 2015, p. 93, ISBN 978-959-7023-77-7.
9. Das, A.K.; Bawage, S.S.; Nerkar, S.G. y Kumar, A. "Detection of *Phytophthora nicotianae* in water used for irrigating citrus trees by Ypt1 gene based nested PCR", *Indian Phytopathology*, vol. 66, no. 2, 2013, pp. 132-134, ISSN 0367-973X, 2248-9800.
10. López, M. del C.; Espino, E. y García, H. "Capero-1: primer híbrido androestéril comercial de tabaco negro cubano (*Nicotiana tabacum* L.)", *Cultivos Tropicales*, vol. 29, no. 1, marzo de 2008, pp. 51-51, ISSN 0258-5936.
11. Sharma, B.P.; Forbes, G.A.; Manandhar, H.K.; Shrestha, S.M. y Thapa, R.B. "Determination of Resistance to *Phytophthora infestans* on Potato Plants in Field, Laboratory and Greenhouse Conditions", *Journal of Agricultural Science*, vol. 5, no. 5, 15 de abril de 2013, p. 148, ISSN 1916-9760, DOI 10.5539/jas.v5n5p148.
12. Pérez, W.; Ñahui, M.; Ellis, D. y Forbes, G.A. "Wide Phenotypic Diversity for Resistance to *Phytophthora infestans* Found in Potato Landraces from Peru", *Plant Disease*, vol. 98, no. 11, 7 de mayo de 2014, pp. 1530-1533, ISSN 0191-2917, DOI 10.1094/PDIS-03-14-0306-RE.
13. Sharma, M.; Rathore, A.; Mangala, U.N.; Ghosh, R.; Sharma, S.; Upadhyay, H.D. y Pande, S. "New sources of resistance to Fusarium wilt and sterility mosaic disease in a mini-core collection of pigeonpea germplasm", *European Journal of Plant Pathology*, vol. 133, no. 3, 3 de febrero de 2012, pp. 707-714, ISSN 0929-1873, 1573-8469, DOI 10.1007/s10658-012-9949-9.
14. Mota, F.C.; Alves, G.C.S.; Giband, M.; Gomes, A.; Sousa, F.R.; Mattos, V.S.; Barbosa, V.H.S.; Barroso, P.A.V.; Nicole, M.; Peixoto, J.R. y others "New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms", *Plant Pathology*, vol. 62, no. 5, 2013, pp. 1173-1183, ISSN 1365-3059.
15. Vasudevan, K.; Vera Cruz, C.M.; Gruissem, W. y Bhullar, N.K. "Large scale germplasm screening for identification of novel rice blast resistance sources", *Frontiers in Plant Science*, vol. 5, 2 de octubre de 2014, p. 505, ISSN 1664-462X, DOI 10.3389/fpls.2014.00505, [PMID: 25324853/PMCID: PMC4183131].
16. Isla de Bauer, M. de L. de la. *Fitopatología*, edit. Ed. Limusa, México, D.F, 1987, p. 384, ISBN 978-968-18-2352-8.
17. Vanderplank, J.E. *Disease Resistance in Plants*, edit. Elsevier, 2 de diciembre de 2012, p. 209, ISBN 978-0-323-16198-5.

18. Lebeau, A.; Daunay, M.-C.; Frary, A.; Palloix, A.; Wang, J.-F.; Dintinger, J.; Chiroleu, F.; Wicker, E. y Prior, P. "Bacterial Wilt Resistance in Tomato, Pepper, and Eggplant: Genetic Resources Respond to Diverse Strains in the *Ralstoniasolanacearum* Species Complex", *Phytopathology*, vol. 101, no. 1, 26 de agosto de 2010, pp. 154-165, ISSN 0031-949X, DOI 10.1094/PHTO-02-10-0048.
19. Chen, X.; Vosman, B.; Visser, R.G.; Vlugt, R.A. van der. y Broekgaarden, C. "High throughput phenotyping for aphid resistance in large plant collections", *Plant Methods*, vol. 8, no. 1, 17 de agosto de 2012, p. 33, ISSN 1746-4811, DOI 10.1186/1746-4811-8-33, [PMID: 22901796].
20. Gururani, M.A.; Venkatesh, J.; Upadhyaya, C.P.; Nookaraju, A.; Pandey, S.K. y Park, S.W. "Plant disease resistance genes: Current status and future directions", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 78, abril de 2012, pp. 51-65, ISSN 0885-5765, DOI 10.1016/j.pmp.2012.01.002.
21. Merk, H.L. y Foolad, M.R. "Parent-offspring correlation estimate of heritability for late blight resistance conferred by an accession of the tomato wild species *Solanum pimpinellifolium*", *Plant Breeding*, vol. 131, no. 1, 1 de febrero de 2012, pp. 203-210, ISSN 1439-0523, DOI 10.1111/j.1439-0523.2011.01898.x.
22. Müller-Wille, S. "Hybrids, pure cultures, and pure lines: from nineteenth-century biology to twentieth-century genetics", *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, vol. 38, no. 4, diciembre de 2007, pp. 796-806, ISSN 1369-8486, DOI 10.1016/j.shpsc.2007.09.012.
23. Ploper, L.D.; Escobar, D.; Ivancovich, A.; Diaz, C.G.; Sillon, M.; Formento, N.; De Souza, J.C.; Cabrera de Alvarez, G.; González, V. y Galvez, M.R. "Propuesta de protocolo para muestreo y evaluación de la roya asiática de la soja en Argentina", *Avance agroindustrial -Estación Experimental Agro-Industrial Obispo Colombes*, vol. 27, no. 3, 2006, pp. 35-37, ISSN 0326-1131.

Recibido: 7 de mayo de 2014

Aceptado: 26 de septiembre de 2014

#### ¿Cómo citar?

Morán Gómez, Y. M.; Núñez Mansito, A.; Pérez Rodríguez, J. L.; Domínguez Larrinaga, R.; Torrecilla Guerra, G.; Córdova Sellés, M. del C. y Herrera Isla, F. L. "Evaluación de la resistencia al falso Orobanché causado por *Nocardia* sp. en *Nicotiana* spp" [en línea]. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. 4, pp. 108-116. ISSN 1819-4087. [Consultado: \_\_\_\_]. Disponible en: <-----/>.