

## PERONOSPORA HYOSCYAMI F. SP. TABACINA. VARIABILIDAD DE LAS POBLACIONES EN CUBA (I)

Berta Lina Muiño García<sup>1</sup> y Yordanka González Guardiola<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, bertam@inisav.cu

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera El Tumbadero Km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana

### RESUMEN

Se evaluó la capacidad germinativa del hongo *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*, el período de incubación y latencia, la capacidad esporulativa e infectiva y el área esporulada en diferentes variedades de tabaco sensibles y resistentes a la enfermedad por el método de discos de hojas flotantes. Los aislamientos procedentes de Holguín, Ciego de Ávila, Pinar del Río, Cienfuegos y La Habana mostraron la capacidad germinativa más elevada. Se observó variabilidad entre los aislamientos por la presencia de períodos de incubación y latencia cortos, como el procedente de Ciego de Ávila y un aislamiento de la provincia de La Habana con períodos de cinco días, área esporulada y capacidad infectiva del 100% y una elevada capacidad esporulativa incluso en variedades resistentes a la enfermedad. Les siguieron los aislamientos de Pinar del Río y algunos de La Habana con períodos de incubación y latencia de seis y siete días, al igual que el área esporulada y capacidad esporulativa en las variedades susceptibles y resistentes a la enfermedad. El aislamiento de Matanzas y uno de La Habana mostraron baja agresividad con los períodos de incubación y latencia más largos (ocho y diez días), menor capacidad infectiva, esporulativa y área esporulada en variedades resistentes a la enfermedad. El aislamiento de Holguín mostró agresividad baja en las variedades resistentes a la enfermedad, con períodos de latencia e incubación largos (ocho y diez días) y baja capacidad esporulativa, infectiva y área esporulada en variedades resistentes, no así en las susceptibles, donde fue más agresivo.

Palabras claves: variabilidad, *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*, tabaco

### ABSTRACT

The germination capability of *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* was assessed along the incubation period and latency. Sporulation and infective capability and the sporulated area on different blue mold sensitive and resistant tobacco varieties were also assessed by floating leaf discs method. Isolates originated from the provinces of Holguín, Ciego de Ávila, Pinar del Río, Cienfuegos and La Habana showed the highest germination capability. A significant variability was observed among the different isolates, which was particularly evident due to the occurrence of short incubation and latency periods; specially in the isolates obtained from Ciego de Ávila and one specific isolate obtained from La Habana with a five days period, 100% sporulated area and infective capability, and a high sporulation capability even on blue mold resistant varieties. Isolates from Pinar del Río and some others obtained from La Habana were the following ones with incubation and latency periods of six and seven days, and sporulated area and sporulation capability on blue mold susceptible and resistant varieties. The isolate obtained from Matanzas and one from La Habana were less aggressive, with incubation and latency periods of eight and ten days. A lower infective and sporulation capability and sporulated area was also registered for these isolates on blue mold resistant varieties. The Holguín isolate showed a low aggressiveness on the blue mold resistant varieties, with latency and incubation periods of eight and ten days, a low infective and sporulative capability and also a low sporulation and infective capability and sporulation area on resistant varieties although it was much more aggressive on the susceptible ones.

Key words: variability, *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*, tobacco

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han intensificado considerablemente las áreas de plantaciones de tabaco, en las que la introducción de nuevas variedades con diferentes grados de resistencia al moho azul constituye una de las principales medidas para el control de la enfermedad. Este carácter prevalece en especies del género *Nicotiana* nativas de Australia. En estas especies silvestres hay un alto nivel de resistencia, que se reduce después de transferida a *Nicotiana tabacum*, mientras que *Nicotiana debneyi* constituye la principal fuente de resistencia en muchos

países de Europa, en Australia y Estados Unidos, y esta propiedad frente a *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* reside en ocho cromosomas [Rufty y Main, 1989; FAO, 2002].

Otras especies con resistencia al hongo son *N. goodspeedii*, *N. megalosiphon*, *N. rosulata* [Knotop et al., 1979], *N. maritima* [Dorossiev et al., 1978], *N. velutina*, *N. excelsior* [Gillham et al., 1977], *N. exigua* [Manolov, 1980], *N. otophora* [Gajos, 1979], a partir de las que se han obtenido variedades y líneas con diferentes grados de resistencia.

En Cuba se han desarrollado diversas variedades de tabaco con estas características, entre las que se destacan Habana 92, Habana 2000, Habana Vuelta Arriba [Espino *et al.*, 1999], así como SS 96, Criollo 98, Corojo 99, Habana PR, Corojo Especial, Cabaiguán 7, San Juan 1, BH-13 [García *et al.*, 1997]; BR-26, Virginia Resistente, Virginia San Luis 40, Virginia Iso, destinadas a la producción del tabaco con diversos fines en la cadena productiva.

El presente trabajo persiguió como objetivo determinar la variabilidad de las poblaciones de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* a partir de la cuantificación de la capacidad germinativa de los esporangios, períodos de incubación y latencia, la capacidad esporulativa e infectiva y el área esporulada en 13 aislamientos del patógeno, obtenidos de áreas de tabaco de diferentes regiones del país, respecto a diferentes variedades del cultivo resistentes y susceptibles a la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante las campañas de tabaco 2001-2002 y 2002-2003 se realizaron muestreos en las provincias de Pinar del Río, La Habana, Matanzas, Cienfuegos, Ciego de Ávila y Holguín. Una vez que apareció el primer foco de moho azul se colectaron al azar hojas con lesiones y esporulaciones activas del hongo por cada foco de la enfermedad. Se colocaron envés con envés en una bolsa de nailon transparente, con papel de filtro previamente humedecido para mantener altos niveles de humedad relativa, se selló e identificó su procedencia y se trasladaron al laboratorio.

El inóculo se preparó a partir de esporulaciones activas del hongo en hojas, con un pincel se colectaron los esporangios y se preparó la suspensión en agua destilada estéril. La concentración se ajustó entre  $1-5 \times 10^4$  esp · mL<sup>-1</sup> mediante conteo en la cámara de Neubauer.

Para la conservación de los aislamientos se utilizaron plántulas de la variedad Corojo Tradicional obtenidas a partir del cultivo de los semilleros en el laboratorio. Una vez que las pequeñas plántulas alcanzaron 2 cm de altura, alrededor de los 15-20 días de sembradas se trasplantaron a pequeños potes plásticos de 7 x 7 x 10 cm, previamente preparados con suelo estéril. Se sembraron dos plantas por pote, se mantuvieron bajo régimen de luz y oscuridad de 12:12 h sin exceso de humedad hasta que alcanzaron la fase de cuatro a cinco hojas, en la cual se realizó la inoculación de las plan-

tas, para lo que se depositaron de tres a cuatro gotas de 10 µL de la suspensión en cada una de las hojas, además de los aislamientos conservarse en pequeñas hojas tomadas directamente de los semilleros, las cuales se hicieron flotar en 12 mL de agua destilada estéril en placas de Petri de 10 cm de diámetro. En cada hoja se depositaron 10 µL de la suspensión de esporangios. Después de la inoculación las placas se incubaron bajo oscuridad completa durante cuatro horas en un cubículo climatizado, a temperatura de entre 16 y 18°C durante la noche, entre 20 y 22°C durante el día, y una proporción de luz-oscuridad de 12:12 h con intensidad 4500 lux y humedad relativa por encima del 95%.

La variedad de tabaco Corojo Tradicional se tomó como referencia por ser susceptible a la enfermedad, respecto a plántulas de tabaco de variedades comerciales susceptibles y resistentes. Los semilleros de cada una de las variedades en estudio se prepararon de acuerdo a como se describió anteriormente.

Para evaluar la capacidad germinativa se depositaron 10 µL de la suspensión de esporangios a la concentración de  $5 \times 10^4$  esp · mL<sup>-1</sup> en un portaobjetos excavado, y se cuantificó el número de esporangios germinados a las cuatro horas. El conteo se realizó al azar en 100 esporangios y se determinó el porcentaje de los germinados con respecto al total evaluados.

Los indicadores fenotípicos se midieron mediante la inoculación de las variedades de 35 a 40 días de sembradas, con los aislamientos en estudio. Se empleó el método de discos de hojas descrito por Muiño (1990), el cual fue modificado. Se depositaron 7 mL de agua destilada estéril en placas de Petri de 7 cm de diámetro, y se hicieron flotar cinco discos de hojas de 12 mm de diámetro en el agua, para un total de 10 discos en dos placas por variante. Cada disco se consideró como una réplica en todos los experimentos, y para la inoculación se depositó una gota de 10 µL de la suspensión en cada uno.

En las primeras cuatro horas después de la inoculación todos los ensayos se incubaron bajo oscuridad completa, en un cubículo climatizado a temperatura entre 16 y 18°C durante la noche, y entre 20 y 22°C durante el día; posteriormente se mantuvieron bajo régimen de luz-oscuridad de 12:12 h con intensidad de 4500 lux y humedad relativa por encima del 95%.

El período de incubación se determinó por la cuantificación del número de días desde la inoculación hasta la aparición de las primeras lesiones cloróticas antes de la esporulación, mientras que el período de latencia se evaluó por el conteo del número de días desde la inoculación hasta la detección de las primeras esporulaciones a través del microscopio estereoscópico.

El área del disco esporulada se determinó mediante el porcentaje que ocupaba la esporulación en el disco a los siete y diez días de inoculados, en cada variedad, para cada uno de los aislamientos. La capacidad esporulativa de los aislamientos en cada variedad se evaluó a los 12 días de inoculados los discos. Los discos esporulados se sumergieron en 0,5 mL de agua destilada estéril, y con ayuda del pincel se recogió toda la esporulación y se realizó el conteo en la cámara de Neubauer para cuatro réplicas.

La evaluación de la capacidad infectiva se realizó mediante la cuantificación del número de discos con pre-

sencia de esporulaciones, respecto al total de discos inoculados, y se calculó el porcentaje para cada aislamiento en cada una de las variedades.

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza simple con test de significación de Newman Keuls al 5% de probabilidad, con previa transformación de los datos a  $\sqrt{x}$  [Dagnelie, 1984]. Para el análisis de agrupamiento se codificaron los datos obtenidos para cada uno de los componentes fenotípicos, se construyó la matriz básica de datos y se procesaron a través del programa estadístico Minitab para Windows versión 11.2 de 1996.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron trece aislamientos (*Tabla 1*), siete de La Habana, dos de Pinar del Río, uno de Matanzas, uno de Cienfuegos, uno de Ciego de Ávila y uno de Holguín.

**Tabla 1. Descripción de los aislamientos de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* obtenidos**

<i>Cepa</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Fecha de aparición</i>	<i>Variedad</i>
H 01	CCS Camilo Cienfuegos	7/12/00	Habana 92
C 02	CCS Lázaro Peña	13/12/01	Habana 92
M02	CCS Pedro Betancourt	15/12/01	Criollo 98
LP 02	Empresa tabacalera Lázaro Peña	6/12/01	Habana 92
S02	La Sabana	8/12/01	Criollo 98
LP 0301	Empresa tabacalera Lázaro Peña UBPC La Reserva	3/12/02	Criollo 98
LP0302	Empresa tabacalera Lázaro Peña UBPC La Reserva	5/12/02	Habana 92
LP 0303	Empresa tabacalera Lázaro Peña Las Marías	6/12/02	Criollo 98
LP 0304	UBPC Ubaldo Díaz	13/12/02	Criollo 98
LP 0305	UBPC S. Pombill	16/12/02	Criollo 98
PR0301	CCS Carlos Marx	30/12/02	Criollo 98
PR0302	CCS 26 de Julio	8/1/03	Criollo 98
CA0301	CCS A. Guiteras	12/2/03	H 92

Los parámetros fenotípicos se estudiaron en ocho variedades de tabaco con diferentes grados de resistencia a la enfermedad, las cuales se describen en la *Tabla 2*.

A las cuatro horas los aislamientos que tuvieron la menor capacidad germinativa fueron M02, LP0302 y LP02,

un segundo grupo de aislamientos con valores intermedios (H01, C02, S02, LP02, LP0301, LP0303, LP0304, LP0305, PR0301, PR0302 CA0301, LP0305, PR0301, PR0302), y el valor más alto correspondió al aislamiento CA0302 (*Fig. 1*).

Tabla 2. Características de las variedades de tabaco utilizadas en el estudio

Variedad	Genotipos empleados en la selección de la variedad	Categoría	Sistemas de producción de tabaco
Habana 92	Corojo Tradicional x Variedad Polaca R x T	Resistente	Cultivo al sol y recolección en hojas o mancuernas
Habana 2000	Corojo Tradicional x Habana 2.1.2	Resistente	Cultivo bajo tela, sol ensartado y en determinadas condiciones al sol en palo
Habana Vuelta Arriba	Corojo Tradicional x Variedad Australiana GA-955	Resistente	Cultivos al sol ensartado y sol en palo
Burley Habana 13	Kentucky 17 x Burley Habana 11	Moderadamente resistente	Destinado a las zonas de Pinar del Río
Corojo Tradicional	Criollo	Susceptible al moho azul	Cultivo bajo tela para producción en capa
Criollo Tradicional	Selección en una población heterogénea	Susceptible al moho azul	—
Criollo 98	Habana 92 x Habana PR	Resistente	Cultivo bajo tela, sol ensartado y al sol en palo
Corojo 99	Habana 92 x Habana PR	Resistente	Cultivo bajo tela y al sol ensartado

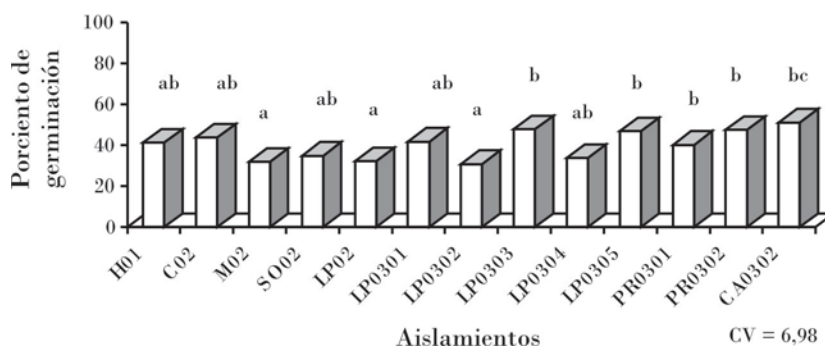


Figura 1. Capacidad germinativa de los aislamientos a las cuatro horas.

Los resultados muestran valores que oscilan entre el 30 y el 46% de capacidad germinativa, al tercer día después de haberse observado las primeras esporulaciones visibles en las hojas de tabaco. Zheng *et al.* (1998) plantean que la capacidad germinativa de los esporangios del hongo se encuentra estrechamente relacionada con el tiempo de la esporulación, y que en esporangios con dos días de evidenciada la presencia de esporulaciones visibles presentan valores de germinación del 80%; al tercer día comienza a disminuir y los valores alcanzan entre el 40 y el 30%, los cuales muestran valores similares a los obtenidos en estos resultados.

Respecto al período de incubación, la presencia de los primeros síntomas de la enfermedad, caracterizado por el cambio de coloración en los discos de las hojas, varió entre una y otra variedad, y entre los aislamientos. Generalmente estos síntomas se presentaron antes de la presencia de la esporulación del hongo, es decir, el cambio de coloración de un verde intenso a un verde más claro. En la mayoría de los discos se observó el día antes de la esporulación, aunque hubo donde se observaban pequeñas esporulaciones; sin embargo, el cambio de coloración apenas se podía distinguir.

Los aislamientos LP0305 y CA0301 presentaron los períodos de incubación más cortos en discos de variedades de tabaco susceptible y resistente a la enfermedad, seguidos por los procedentes de Pinar del Río y el aislamiento LP0303. Un grupo de aislamientos se caracterizó por presentar períodos de incubación intermedios de siete y ocho días, entre los que se encuentran

LP02, SO2, LP0301, mientras que los aislamientos M02 y LP0302 mostraron los períodos de incubación más largos (Tabla 3). El aislamiento H01 mostró períodos de incubación cortos en las variedades susceptibles, no así en las resistentes a la enfermedad, donde se presentaron períodos de incubación más largos de nueve y diez días.

**Tabla 3. Período de incubación (días) de los aislamientos de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* en cada una de las variedades**

Variedades	Aislamientos												
	H01	CO2	M02	SO2	LP02	LP0301	LP0302	LP0303	LP0304	LP0305	PR0301	PR0302	CA0301
Corojo tradicional	6	7	7	6	6	9	6	6	5	6	6	5	6
Criollo tradicional	6	7	8	6	7	6	10	6	6	5	6	6	5
BH13	10	7	10	6	7	6	10	6	6	5	6	6	6
H92	6	9	9	6	7	7	6	6	7	5	6	5	5
Hab. VA	9	6	7	6	6	9	0	6	7	6	6	6	5
H2000	10	5	7	7	6	6	9	6	5	5	6	6	5
Criollo 98	10	6	8	10	7	6	6	6	6	6	6	6	6
Corojo 99	10	6	10	10	6	6	7	6	6	5	6	6	6

Resalta el aislamiento de Cienfuegos (CO2) con un comportamiento diferenciado frente a los discos de la variedad de tabaco Habana 2000, que mostró un período de incubación de cinco días; sobresale este comportamiento del resto de los aislamientos obtenidos en la primera campaña en esta variedad de tabaco, además de que evidencias prácticas en las áreas de producción confirman la presencia de afectaciones de tipo sistémicas del hongo en condiciones de campo en plantaciones de la variedad de tabaco negro Habana 2000.

Para el período de latencia existe un comportamiento similar a lo observado respecto al período de incubación. Los aislamientos LP0305 y CA0301 presentaron los períodos de latencias más cortos respecto al resto de los aislamientos en todas las variedades que se evaluaron. Los valores intermedios de períodos de latencias correspondieron a los aislamientos CO2, LP02, LP0301, LP0303, LP0304 y los procedentes de Pinar del Río (Tabla 1), con valores de siete días. El procedente de Matanzas presentó un período de latencia de ocho días, y el más largo fue para el aislamiento LP0302 (Tabla 4).

Es importante destacar que existe una marcada variabilidad entre los aislamientos respecto a estos dos parámetros, y es de notar los períodos de incubación y de latencia más cortos en aislamientos procedentes de las zonas tabacaleras de las provincias de La Habana y Ciego de Ávila. También es necesario señalar que los aislamientos procedentes de la provincia de Pinar del Río mostraron cortos períodos de incubación y latencia. No obstante, se presentó un diverso comportamiento en aislamientos de la provincia de La Habana con períodos de incubación y latencias cortos y largos (LP0302), por lo que es importante el hecho de que en una misma zona geográfica exista variabilidad en este parámetro.

En cuanto al área del disco esporulada, todos los aislamientos procedentes de la segunda campaña de estudio (LP0301, LP0302, LP0303, LP0304, LP0305, PR0301, PR0302 y CA0301) tuvieron los valores más altos de área esporulada en todos los discos evaluados, en cada una de las variedades resistentes a la enfermedad. En las variedades susceptibles, excepto los aislamientos SO2 y LP02 que tuvieron valores inferiores al 50% del área

esporulada en la variedad Criollo Tradicional, el resto igual que los aislamientos H01 y el CO2 procedentes de los aislamientos superó el 50% de esporulación al la primera campaña (*Tablas 5 y 6*).

**Tabla 4. Período de latencia (días) de los aislamientos de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* en cada una de las variedades**

Variedades	Aislamientos												
	H01	C02	M02	S02	LP02	LP0301	LP0302	LP0303	LP0304	LP0305	PR0301	PR0302	CA0301
Corojo tradicional	6	7	8	7	7	7	9	7	7	6	7	7	6
Criollo tradicional	7	7	8	7	7	7	10	7	7	6	7	7	6
BH13	10	8	10	7	7	7	10	7	7	6	7	7	7
H92	7	10	10	7	7	8	7	7	8	6	7	7	6
Hab. VA	10	7	8	7	7	9	0	7	8	6	7	7	6
H2000	10	5	8	7	7	7	9	7	7	6	7	7	6
Criollo 98	10	7	8	7	10	7	7	7	7	7	7	7	7
Corojo 99	10	7	10	7	10	7	8	7	7	6	7	7	7

**Tabla 5. Promedio del área de disco esporulada (%) a los siete días**

Aislamientos	Variedades							
	Corojo trad.	Criollo trad.	BH13	H92	Hab. VA	H2000	Criollo 98	Corojo 99
H01	30,3b	17,5bc	0a	0,62a	0a	0a	0a	0a
C02	32,5b	6,56ab	0a	0a	35cd	12,2abc	0,3ab	0,94a 0a
M02	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0,6a
S02	0,62a	10ab	2,5a	5,62ab	20bc	5ab	0,3ab	0a
LP02	50b	10,94ab	26,24ab	22,9bc	15,6ab	13,12abc	0a	10ab
LP0301	25b	50de	0a	0a	0a	7,84abc	28,8c	0a
LP0302	0a	0a	0a	30,64cd	0a	0a	30,6c	13,4ab
LP0303	55,3b	18,2bc	13,1ab	5,94ab	10,3ab	21,26bc	1,56ab	15,3ab
LP0304	3,1a	21,7bc	17,5ab	0a	0a	27,1cd	0,6ab	76,9d
LP0305	76,9d	71,9e	58,8c	33,44cd	27,1bcd	52,82e	15,9abc	25,6bc
PR0301	27,5b	35cd	4,7a	50,6cd	40,3d	13,4ab	22,2ac	24,4bc
PR0302	29,4b	77,48cd	29,7b	47,18cd	42,8d	9,39abc	35,2c	35c
CA0301	66,56d	62,82de	13,76ab	61,3e	40,3d	51,26de	59,2d	35c
CV (%)	14,4	13,4	18,8	15,6	16,6	15,2	16,5	16,5



**Tabla 6. Promedio del área de disco esporulada (%) a los 10 días**

Aislamientos	Variedades							
	Corojo Trad.	Criollo Trad.	BH13	H92	Hab. VA	H2000	Criollo 98	Corojo 99
H01	100c	100c	5a	5a	5a	0,32a	3,76a	3,4ab
C02	91c	100c	63cd	4,4a	75,32cd	100d	10a	15,7ab
M02	90,3c	62,84c	3,12a	8,12a	35,32ab	60,9c	20,3a	20,3a
S02	55a	25a	25ab	14,4a	48,62bc	28,62b	25ab	10,62b
LP02	100c	45,3ab	41,24bc	70b	35,62ab	55,3c	10,3a	10ab
LP0301	100c	100c	55cd	82,5b	55bc	100d	100e	100c
LP0302	85b	100c	0,62a	95b	0a	20ab	90de	95c
LP0303	100c	50,64ab	80,32de	68,92b	80,32cd	100d	60,32cd	100c
LP0304	100c	100c	100e	70,6b	100d	100d	55bc	100c
LP0305	100c	100c	100e	90,32b	100d	100d	71,56cde	100c
PR0301	100c	100c	100e	100b	100d	100d	100e	100c
PR0302	100c	100c	100e	100b	100d	100d	100e	100c
CA0301	100	100	100e	100b	100d	100d	100e	100c
CV (%)	5,72	8,84	7,82	8,90	5,46	9,78	9,90	8,84

Es de importancia también la correspondencia que existe entre los parámetros de variabilidad fenotípicos anteriores con los aislamientos procedentes de Pinar del Río, Ciego de Ávila y La Habana, los cuales mostraron un valor alto del área de disco esporulada a los siete y

diez días, aislamientos que fueron obtenidos precisamente en zonas de grandes áreas destinadas a la producción, y donde se presentan severas afectaciones del hongo en variedades supuestamente resistentes a la enfermedad.

**Tabla 7. Promedio de la capacidad esporulativa ( $\times 10^5$ ) de los aislamientos de *P. hyoscyami* f. sp *tabacina* respecto a las variedades**

Aislamientos	Variedades							
	Corojo Trad.	Criollo Trad.	BH13	H92	Hab. VA	H2000	Criollo 98	Corojo 99
H01	2,96d	3,01f	0,02a	0,04a	0,08a	0,04a	0,21a	0,09a
C02	2,13b	3,42h	3,02fg	2,85f	2,75ef	4,14i	1,38bc	0,69a
M02	2,88d	1,52b	0,61ab	0,91b	2,04cd	2,67e	0,86b	0,57a
S02	2,99d	3,01ef	0,94b	1,27c	1,67bc	1,82d	0,87b	0,47a
LP02	2,08b	2,16c	2,19cd	1,98d	1,19b	1,67cd	0,85ab	0,49a
LP0301	2,57c	2,75d	3,18g	2,95fg	2,00cd	1,61c	1,44bc	2,67bcd
LP0302	1,48a	1,17a	0,08a	2,54e	0,00a	0,89b	2,26d	2,82cd
LP0303	2,82d	3,09fg	2,58cdefg	1,26c	2,23cde	2,76ef	1,86cd	2,13b
LP0304	2,94d	3,15g	2,02c	1,16c	2,92f	3,48h	2,13d	2,38bc
LP0305	2,89d	2,82d	2,69defg	2,54e	2,43def	3,00g	2,32d	2,05b
PR0301	3,55f	3,90j	2,42cdef	2,99g	2,30cdef	3,41h	3,11e	3,30d
PR0302	3,70f	3,77i	2,27cde	3,56h	2,62def	3,54h	3,25e	2,99cd
CA0301	3,19e	2,88de	2,84efg	2,46e	2,58def	2,93fg	2,99e	2,95cd
CV (%)	8,57	6,60	9,54	9,72	6,78	9,67	9,15	8,73

Hubo una alta capacidad esporulativa en la variedad susceptible Corojo Tradicional. Se destacan los aislamientos procedentes de Pinar del Río, Ciego de Ávila y LP0305. Es interesante en este parámetro el comportamiento del aislamiento de Cienfuegos con valores que llegaron a alcanzar  $4,14 \times 10^5$  esp/cm<sup>2</sup> en la variedad Habana 2000; sin embargo, esta combinación aislamiento-variedad presentó períodos de incubación y latencia cortos, y mayor área de disco esporulada a los siete y diez días.

Por otra parte, todos los aislamientos presentaron una capacidad infectiva alta en los discos de las va-

riedades susceptibles Corojo Tradicional y Criollo Tradicional (Tabla 8). Los aislamientos LP0301, LP0303, LP0304, LP0305, PR0301, PR0302 y CA0301 alcanzaron el 100% en los discos de las variedades resistentes, a diferencia del aislamiento LP0302, que presentó baja capacidad infectiva en los discos de las variedades BH13 y Hab 2000, y no infectó los discos de la variedad Hab. VA. El aislamiento procedente de Holguín mostró una baja infectividad frente a los discos de las variedades resistentes a la enfermedad.

**Tabla 8.** Capacidad infectiva de los aislamientos de *P. hyoseyami* f. sp. *tabacina* en cada una de las variedades

Variedades	Aislamientos												
	H01	C02	M02	S02	LP02	LP0301	LP0302	LP0303	LP0304	LP0305	PR0301	PR0302	CA0301
Corojo tradicional	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Criollo tradicional	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
BH13	20	80	40	60	60	100	20	100	100	100	100	100	100
H92	20	100	60	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100
Hab. VA	20	100	60	100	40	100	0	100	100	100	100	100	100
H2000	20	100	100	80	60	100	40	100	100	100	100	100	100
Criollo 98	80	20	100	20	40	100	100	80	100	100	100	100	100
Corojo 99	60	40	80	20	20	100	100	100	100	100	100	100	100

El carácter área de disco esporulada permitió separar los aislamientos en dos grandes grupos (Fig. 2). En un primer grupo se encuentran los aislamientos LP0301, LP0303, LP0304, LP0305, PR0301, PR0302 y CA0301, y en un segundo los aislamientos H01, C02, M02, LP02, S02, y el aislamiento más alejado LP0302.

Dentro del primer gran grupo se encuentra en un subgrupo los aislamientos PR0301, PR0302, CA0301 y LP0305, que fueron los más agresivos, los que mostraron los períodos de incubación y latencia más cortos, y presentaron mayores áreas de disco esporulada y las capacidades esporulativas e infectivas más altas. En la zona de Pinar del Río, en la década de los noventa hasta la fecha, se han presentado epidemias severas de la enfermedad, lo que puede estar dado por la presencia de aislamientos agresivos, dado que es una zona donde se cultiva tabaco de forma intensiva. Sobresale también el aislamiento de Ciego de Ávila, aislado de variedades resistentes en condiciones desfavorables para el

desarrollo de la enfermedad, y que muestra gran agresividad en todos los parámetros evaluados. Bajo condiciones favorables a la enfermedad, la presencia de aislamientos con estas características puede ocasionar grandes epidemias en la región donde se presenta. Finalmente, el aislamiento LP0305 de La Habana tuvo características similares al procedente de Ciego de Ávila.

En el segundo subgrupo se encuentran los aislamientos que mostraron períodos de incubación, latencia y capacidades esporulativas e infectivas intermedias, y menos agresivos a los aislamientos que se encuentran en el primer grupo.

El aislamiento más alejado en el análisis de agrupamiento es el LP0302, que presentó los períodos de incubación y latencia más largos, las capacidades esporulativas e infectivas más bajas de todos, y por tanto el menos agresivo (Fig. 2).



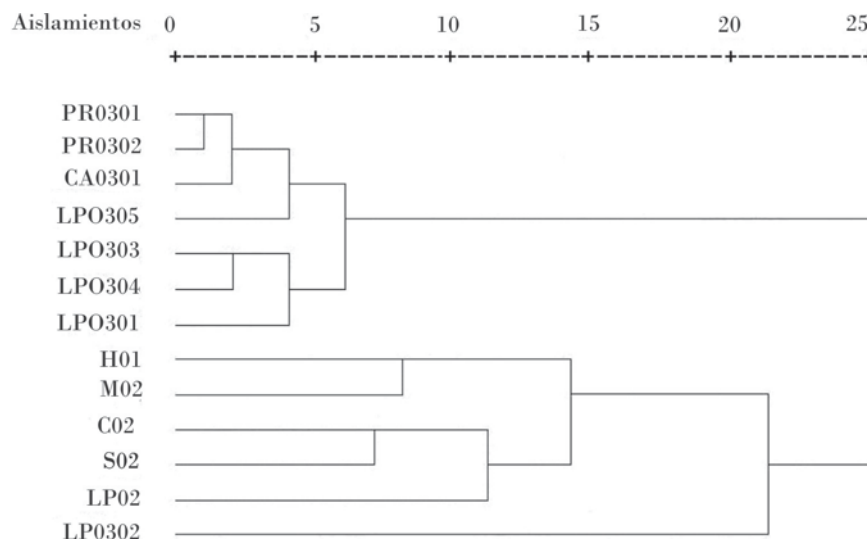


Figura 2. Análisis de agrupamiento de los aislamientos de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*.

Por primera vez en Cuba se evidencia la variabilidad de aislamientos de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* referente a parámetros fenotípicos. A nivel mundial pocos estudios se relacionan con la variabilidad fenotípica del patógeno, principalmente por el hecho de ser un parásito obligado, difícil de conservar en condiciones de laboratorio; sin embargo, las investigaciones recientes apuntan hacia el estudio de la variabilidad genética en las poblaciones del hongo, en aislamientos sensibles y resistentes a fungicidas, los cuales muestran variabilidad en su comportamiento. La aplicación de los marcadores moleculares como RADP demostró la existencia de variabilidad genotípica en aislamientos procedentes de diferentes regiones [Wiglesworth *et al.*, 1994; Wiglesworth, 1994]. En Estados Unidos se han utilizado marcadores moleculares no solo para la identificación precoz del hongo, sino para el estudio de la variabilidad de las poblaciones [Sukno *et al.*, 2002a; 2002b; Ristaino *et al.*, 2007]. Estudios realizados por el grupo de moho azul de Coresta confirman la presencia de dos genotipos genéticamente diferentes y que difieren además respecto a la sensibilidad a los fungicidas [Zipper *et al.*, 2007; Spring *et al.*, 2007]. En Cuba se han encaminado también estudios de la genética poblacional, a partir de su interrelación con las respuestas desde el punto de vista epidemiológico y fenotípicas de las poblaciones de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* como contribución a la mejora de las estrategias de manejo de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

- Se obtuvo un total de 13 aislamientos de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*, dos procedentes de la provincia de Pinar del Río, siete de La Habana, uno de Matanzas, Cienfuegos, Ciego de Ávila y Holguín.
- Los aislamientos de Pinar del Río, Ciego de Ávila y dos de La Habana manifestaron los valores más altos de capacidades germinativas.
- El aislamiento procedente de Ciego de Ávila y el LP0305 de La Habana tuvieron los períodos de incubación y latencia más cortos con cinco días, en variedades susceptibles y resistentes a la enfermedad, mientras que los períodos más largos los mostraron el aislamiento de Matanzas y otro procedente de La Habana.
- Los aislamientos de Pinar del Río, Ciego de Ávila, Cienfuegos y tres procedentes de La Habana mostraron las capacidades esporulativas e infectivas más elevadas en las variedades resistentes a la enfermedad.
- Se demostró que existe variabilidad fenotípica en los aislamientos estudiados, donde los más agresivos proceden de las provincias de Pinar del Río, Ciego de Ávila y La Habana.

## REFERENCIAS

Dagnelie, P.: «Theoretical Methodes Sttistiques», *Les Presses Agronomiques de GrenmbLOUR* 2:242-250, Francia, 1984.

- Dorossiev, L.; M. Palakarcheva; L. Stanoeva; L. Petkova: «Overcoming the Sterility in F1 of Interspecific Hybrids of the Genus *Nicotiana* Using the Methods of Tissue Culture», *Bulletin d'Information Coresta*, Special Number 1978, pp. 80 y 81.
- Espino, E.; X. Rey; A. L. Pino; G. Quintana; N. Peñalver; C. Baños: «Habana Vuelta Arriba, variedad de tabaco negro para cultivo en la región central y oriental de Cuba», *Cubatabaco* 1(1):40-44, La Habana, 1999.
- FAO: «Selected Texts for *Peronospora hyoscyami* f. sp. *Tabacina*», compilación de textos, versión digital, 2002.
- Gajos, Z.: «Attempt to Use Hybrids of *Nicotiana tabacum* L.X *Nicotiana otophora* Gris. For Breeding Tobacco Resistant to *Peronospora tabacina* Adam PT2 and Other Diseases», *Central Laboratorium. Przemyskie Tyton Biuletyn* 1(2):11-23, Polonia, 1979.
- García, H.; V. García; A. L. Pino; E. Espino: «Burley Habana 13 (BH 13), primera variedad comercial de tabaco obtenida en Cuba por cultivo de anteras con resistencia al moho azul (*Peronospora tabacina*), pata prieta (*Phytophthora nicotianae*) y al virus del mosaico del tabaco (VMT)», *Cubatabaco* 1(1):49-54, La Habana, 1997.
- Gillham, F. E. M.; D. C. Wark; E. K. S. Harrigan: «Disease Resistant Flue-Cured Tobacco Breeding Lines for North Queensland I. Resistance to Blue Mold, *Peronospora tabacina*», *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 17(87):652-658, 1977.
- Knotop, A. I.; R. P. Silanteva; V. A. Vinagrov: «The Resistance of Varieties of Tobacco and Wild *Nicotiana* Species to Blue Mold», *Aktualproblemy razvitiya-tabkovod-Moldavii*, 1979, pp. 27-34.
- Manolov, A.: «The Transference of *Peronospora tabacina* Resistance from *Nicotiana exigua* to Oriental Tobacco», *Bulgarski-Tyutyun*, 25:11-18, Bulgaria, 1980.
- Muiño, B. L.: «Plaguicidas. Determinación de resistencia al metalaxil. *Peronospora tabacina*», NRAG. Minag, La Habana, 1990.
- Ristaino, J. B.; A. Johnson; M. Blanco-Meneses; B. Liu: «Identification of the Tobacco Blue Mold Pathogen, *Peronospora tabacina*, by Polymerase Chain Reaction», *Plant Disease* 91:685-691, EE. UU., 2007.
- Ruffy, R. C.; C. E. Main: «Components of Partial Resistance to Blue Mold in Six Tobacco Genotypes Under Controlled Environmental Conditions», *Phytopatology* 79(5):606-609, EE. UU., 1989.
- Spring, O.; S. Keil; R. Zipper: «Field Monitoring Reveals Two Genotypes of *Peronospora tabacina* in German Tobacco Cultures», *Advances in Downy Mildew Research*, Kostelec na Hane, República Checa, 2007, pp. 107-111.
- Sukno, S. A.; A. M. Taylor; M. L. Farman: «Development of Contamination-Free Restriction Fragment Length Polymorphism Probes for the Obligate Biotroph *Peronospora tabacina*, an Oomycete Causing Blue Mold of Tobacco», *Phytopathology* 92:1227-1235, EE. UU., 2002a.
- : «Genetic Uniformity Among Isolates of *Peronospora tabacina*, the Tobacco Blue Mold Pathogen», *Phytopathology* 92:1236-1244, EE. UU., 2002b.
- Wiglesworth, M. D.; W. C. Nesmith; M. R. Siegel; M. R. Bonde; C. E. Main: «Distinguishing Isolates of *Peronospora tabacina* from Geographic Regions Utilizing Tobacco Leaf Disk and Fluorescence Microscopy», *Plant Disease* 78(5):456-460, EE. UU., 1994.
- Wiglesworth, M. D.: «Differentiation and Detection of *Peronospora tabacina* Adam Using the Polymerase Chain Reaction», PhD Thesis, Department of Plant Pathology, University of Kentucky, Lexington, 1994.
- Zheng, Z. Q.; P. S. W.; G. Q. Zhong: «Pathological Characteristics of Tobacco Blue Mold for Plant Quarantine», *Acta Phytopat. Sinica* 28(2):131-138, 1998.
- Zipper, R.; R. Hammer; O. Spring: «Spring PCR-Based Monitoring of Recent Isolates of Tobacco Blue Mold from Europe Reveals the Presence of Two Genetically Distinct Phenotypes Differing in Fungicide Sensitivity», University of Hohenheim, Institute of Botany, Garbenstr. 30, 70593 Stuttgart, Alemania, 2007.