

Comunicación corta

El gen *Php* no es una fuente de resistencia en el tabaco cubano

Javier Martínez-Pacheco^{1*}

María del Carmen Castro-Fernández¹

Angélica González-Toledo²

Verónica Toledo-Sampedro¹

¹Departamento de Genética y Fitopatología, Instituto de Investigaciones del Tabaco, Carretera a Tumbadero, km 8 ½, San Antonio de los Baños, Artemisa, Cuba. CP 38100

²Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, calle 25 No.455 e/ J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba, CP 10400

* Autor para correspondencia. jmartinez.iit@gmail.com

RESUMEN

La “pata prieta” es una de las enfermedades principales que afectan a las plantaciones comerciales de tabaco en el mundo. La identificación de genes de tabaco involucrados en la resistencia a la enfermedad, así como su inclusión en las variedades comerciales, constituye un reto importante en la actualidad para los programas de mejora en Cuba. La información sobre el “pedigree” de los cultivares cubanos es escaso y en ocasiones erróneo, por lo que es importante determinar con herramientas moleculares las fuentes de resistencia a la “pata prieta” en el tabaco comercial de Cuba. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del gen *Php*, como fuente de resistencia monogénica a la enfermedad en 29 cultivares de tabaco, mediante el uso de un marcador molecular específico. Se demostró que el gen *Php* estaba ausente en todos los cultivares y que no ha sido introducido a través de programas de mejora durante años. Resulta importante introducir el gen *Php* en nuevos cultivares de tabaco cubano mediante esquemas de piramidación génica, que permitan su combinación con otras fuentes de resistencia poligénica, para hacer más durable la resistencia y que tenga un mayor espectro.

Palabras clave: marcador molecular, *Nicotiana plumbaginifolia*, cultivares, mejora genética

Recibido: 10/08/2018

Aceptado: 23/01/2019

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como “pata prieta” provocada por el oomicetes *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, produce cuantiosas pérdidas anuales a la producción de tabaco en Cuba y el resto del mundo ^(1,2). El control de esta enfermedad se realiza a través de un manejo integrado que comprende: la rotación de cultivos, el uso de productos químicos y las variedades resistentes, siendo esta última la estrategia más económica y duradera ^(3,4).

La obtención de cultivares resistentes a la enfermedad en Cuba, a través de los programas de mejoramiento genético actuales, resulta en un largo período de unos 10 o 12 años. Las diferentes razas de este patógeno son capaces de evolucionar de manera acelerada en cortos periodos de tiempo, desarrollándose aislados mucho más agresivos ⁽⁵⁾; por esta razón, el patógeno logra vencer la resistencia de las nuevas variedades que se liberan a la producción en solo unos pocos años. A esto se suma la posible consanguinidad presente en los cultivares debido al uso recurrente y continuo de los mismos progenitores, que provoca una baja variabilidad genética a la cual le resulta fácil adaptarse el patógeno.

Hasta el momento se encuentran bien identificadas cuatro fuentes de resistencia monogénica y multigénica a *P. nicotianae*. La resistencia parcial, controlada por múltiples genes y raza no específica, que proviene del cultivar 'Florida 301', es una de las más difundidas pero se asocia a bajos rendimientos y a una reducción de la calidad de la hoja curada en tabaco Virginia ⁽⁶⁾.

El cultivar de tabaco negro 'Beinhart-1000' posee una fuerte resistencia a las Razas 0 y 1 del patógeno, pero se emplea poco en programas de mejora por la presencia de compuestos no deseados en la hoja curada ^(1,7). La región genómica conocida como *Wz* proveniente de la especie silvestre *Nicotiana rustica* ha sido introgresada en algunos cultivares de tabaco Virginia en Estados Unidos de América y Zimbabwe a través de una línea estable designada como 'Wz'. Líneas de tabaco, en las cuales ha sido introgresada la región *Wz*, contienen un gen o genes que confieren un alto nivel de resistencia a la Raza 0 y afectan la resistencia a la Raza 1 de *P. nicotianae* ⁽⁷⁾.

Por último, tenemos la transferencia de los genes *Php* y *Phl* a cultivares comerciales de tabaco a partir de las especies silvestres *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. y *Nicotiana longiflora* Cav., respectivamente. Ambos genes poseen efectos similares, con un carácter monogénico dominante que aporta resistencia completa solo a la Raza 0 de *P. nicotianae* ⁽⁸⁻¹²⁾.

En Cuba sólo se informa la presencia de la Raza 0 de *P. nicotianae* y los cultivares cubanos muestran niveles de resistencia variables, desde susceptibles hasta altamente resistentes, en el momento de su liberación a la producción. ⁽⁵⁾

Existe ambigüedad entre los productores y fitomejoradores sobre el origen de la resistencia a *P. nicotianae* en los cultivares de tabaco cubano, por lo que se hace difícil determinar si el gen *Php*

se introdujo en los cultivares comerciales como parte del programa de mejoramiento genético en la década de los 60 y 70 del siglo anterior. Esto impide saber si este gen de resistencia se ha desplegado en el genofondo del tabaco en Cuba a lo largo de más de 40 años de mejoramiento genético.

Una búsqueda intensa y rigurosa en el *pedigree* de los cultivares comerciales de tabaco cubanos, muestra que probablemente solo se introdujo en Cuba la resistencia a la “pata prieta” que proviene de 'Florida 301', a través de cultivares que se emplearon como progenitores en los programas de mejora. Cultivares como 'K326' y el propio 'Florida 301', se utilizaron en la mejora de cultivares de tabaco cubano tipo Virginia unos años atrás ⁽¹³⁾. No tenemos evidencia de la presencia del gen *Php* como fuente de resistencia en el tabaco cubano, un conocimiento fundamental que se necesita para los programas de mejora y para el establecimiento de una adecuada política varietal de tabaco en nuestro país.

Tomando en cuenta lo anterior el objetivo de esta investigación fue identificar la presencia del gen *Php* en cultivares actuales comerciales de tabaco, cultivares que en su momento fueron comerciales y cultivares que se han empleado y emplean en los programas de mejora del tabaco en Cuba como parentales desde hace más de 40 años.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los cultivares de esta investigación se utilizaron o utilizan en los programas de mejora genética del tabaco en Cuba. Se plantaron semillas de 29 cultivares de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y semillas de la especie silvestre *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. (fuente natural del gen *Php*) en bandejas de poliestireno expandido, con 264 alveolos, que contenían sustrato orgánico con la siguiente composición: 70 % de turba negra, 15 % de cáscara de arroz y 15 % de zeolita ⁽¹⁴⁾, basado en la tecnología de bandejas flotantes, según García y Andino ⁽¹⁵⁾. Las bandejas se colocaron en condiciones de cultivo protegido o túneles.

Extracción de ADN

La extracción se realizó de hojas jóvenes de plantas de 45 días de edad, según el método del CTAB modificado ⁽¹⁶⁾. Las concentraciones de ADN se determinaron de forma espectrofotométrica, según las relaciones 260/280 nm y 260/230 nm. La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en agar al 0,8 %.

Condiciones de la PCR

El marcador RAPD, UBC 30₄₉₀⁽⁸⁾, se utilizó para identificar la presencia del gen *Php*. La PCR se realizó en un volumen de 15 µl. Las condiciones consistieron en 25 ng ADN genómico, 0,4 µM de oligo, tampón de reacción 1X TaqPol (Promega, EUA), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de PCR Nucleotide Mix (Promega, EUA), y 1.0 U de Taq Polimerasa (Promega, EUA). El programa de amplificación utilizado fue el de Johnson *et al*, 2008⁽⁸⁾. Brevemente, la reacción fue desnaturalizada inicialmente a 94 °C por 2 min, seguido por tres ciclos a 94 °C por 1 min, 38 °C por 1 min, y 72 °C por 2 min; 35 ciclos a 92 °C por 1 min, 40 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y un paso de extensión final a 72 °C por 5 min. Diez microlitros de cada muestra más dos microlitros de Blue/Orange Dye 6x (Promega, EUA) se cargaron en un gel de agarosa al 1 % y separados a 150 volts por 1 hora en 1X Tris-Borato-EDTA. El ADN se visualizó con SYBR[®] Green Dye (Sigma-Aldrich, EUA), de acuerdo con las especificaciones de los proveedores y la talla del fragmento, se estimó a partir de un marcador molecular de 1 kb (Applichem, Alemania). La talla esperada de la banda para el fragmento ligado al gen *Php* es de aproximadamente 490 pb⁽⁸⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los cultivares testados está ausente el gen *Php*, excepto en *N. plumbaginifolia* que es la fuente natural (Tabla 1 y Figura 2). Los resultados aportan nueva información que sugiere que estos cultivares, que se utilizaron como progenitores en los programas de mejora del tabaco en Cuba a lo largo de más de 40 años, no contienen el gen *Php*. Este tipo de resistencia puede introducirse y explotarse en los actuales y futuros programas de mejora en nuestro país. La evidencia científica sobre la ausencia de *Php* en el tabaco comercial cubano entra en contradicción con lo citado por Espino y citado por Valdés, que afirma que los cultivares cubanos de tabaco tipo Virginia poseen la fuente de resistencia a la enfermedad “pata prieta” que proviene de *N. plumbaginifolia*^(17,18). En ninguno de los 10 cultivares de tabaco Virginia que se analizaron se encuentra el gen *Php*.

Tabla 1. Cultivares utilizados para identificar la presencia/ausencia del gen *Php*, tipo de tabaco y país de origen

Nombre	Tipo de tabaco	País de origen
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Especie silvestre género	Perú, Bolivia, Paraguay,
	<i>Nicotiana</i>	Brasil
Habana-2000	Negro	Cuba
Criollo-2010	Negro	Cuba
Habana-92	Negro	Cuba
Corojo-99	Negro	Cuba
Corojo-2006	Negro	Cuba
Corojo	Negro	Cuba
Burley Pinar 2004	Burley	Cuba
Habana 2.1.1	Negro	Cuba
Corojo-2012	Negro	Cuba
Criollo	Negro	Cuba
Criollo-98	Negro	Cuba
Corojo Especial	Negro	Cuba
KY 910	Virginia	EUA
RxT	Negro	Polonia
Pelo de Oro	Negro	México
GA-955	Virginia	Australia
Bel 61-10	Negro	EUA
KY 17	Burley	EUA
KY 14	Burley	EUA
San Luis 20	Virginia	Cuba
San Luis-21	Virginia	Cuba
San Luis-22	Virginia	Cuba
K 326	Virginia	EUA
Coker 86	Virginia	EUA
B-11	Virginia	EUA
NC-1151	Virginia	EUA
Virginia Isogénica	Virginia	Cuba
Habana Vuelta Arriba	Negro	Cuba
Florida 513	Negro	EUA

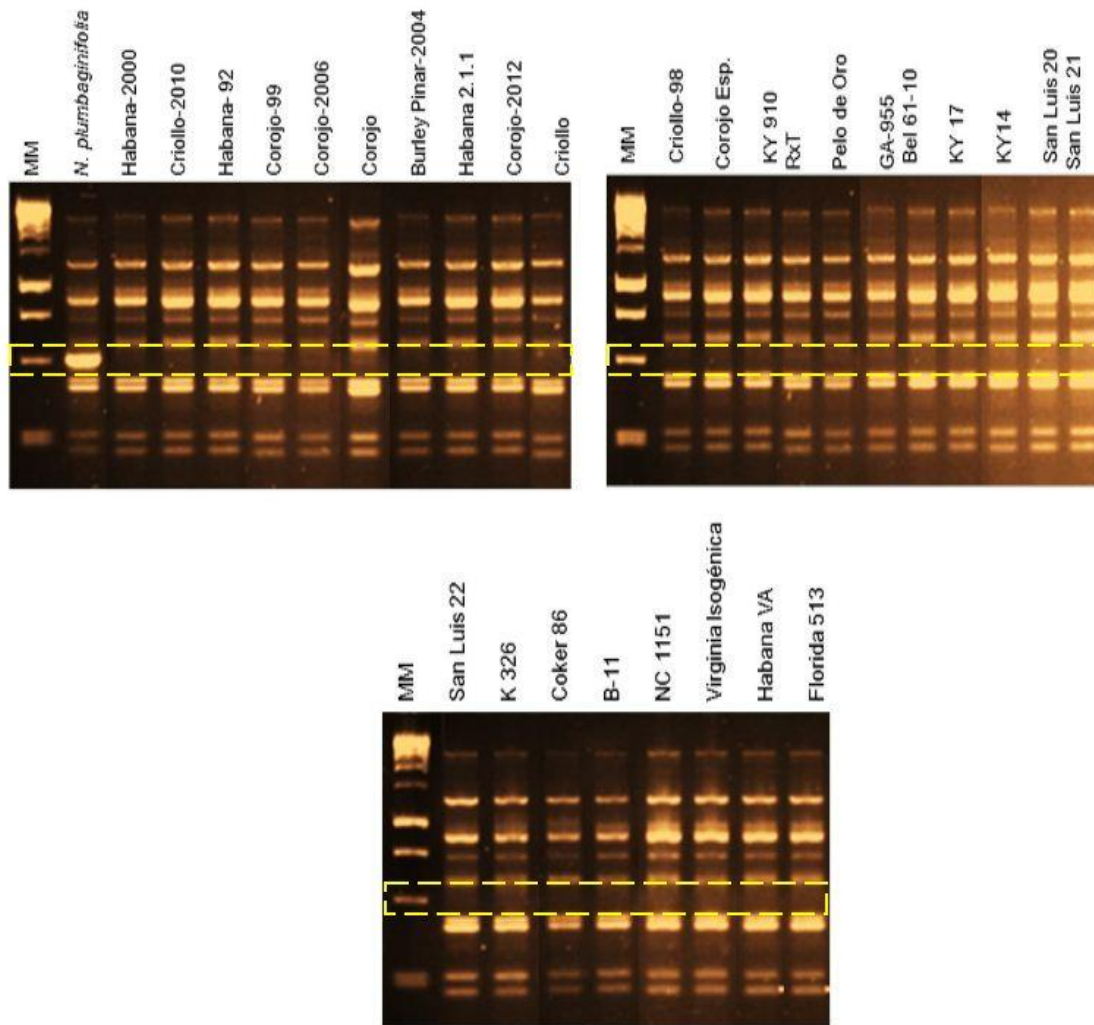


Figura 1. Identificación de la presencia/ausencia del marcador UBC30₄₉₀ en los 29 cultivares analizados y en la especie silvestre *N. plumbaginifolia* mediante, electroforesis en agar al 1 %. Nótese que los rectángulos amarillos de líneas discontinuas señalan la presencia o ausencia de la banda de talla esperada de 490 pb para el gen *Php* y que solo aparece en *N. plumbaginifolia*

Sobre la base de esta nueva evidencia es posible desarrollar programas de mejora que utilicen como parentales un cultivar foráneo que tenga el gen *Php* y un cultivar cubano con buen desempeño agrícola y elevado rendimiento, para así obtener líneas y/o cultivares mejorados en cuanto a la resistencia a la “pata prieta” que posean el típico fenotipo comercial de tabaco cubano muy deseado por los consumidores de Europa. Debido a la baja durabilidad de los mecanismos de resistencia monogénica en tabaco ⁽¹⁹⁾, los programas deben estar enfocados a combinar la resistencia monogénica del gen *Php* con niveles medios o altos de resistencia poligénica que resulta más duradera en el tiempo.

Por esa razón es importante el diseño de esquemas de piramidación génica, que permitan obtener líneas élites de tabaco en cortos períodos de tiempo (tres a cinco años), que posean un amplio espectro de respuesta a las diferentes razas patogénicas de *P. nicotianae*, como resultado de la

combinación de los tipos de resistencias monogénica y poligénica, sin afectar significativamente el rendimiento en la producción.

La existencia de marcadores AFLP, SSR y SCAR para la región genómica *Wz*, el componente de la resistencia en Beinhart-1000 y el gen *Php*, respectivamente ^(1,20), permiten aplicar métodos de mejora que permitan una selección más confiable, rápida y segura de las líneas genéticas resistentes. Uno de estos métodos es el retrocruce asistido por marcadores moleculares, que hace posible la combinación del gen *Php* en estado homocigótico o heterocigótico con otras fuentes de resistencia poligénica, como el fragmento genómico *Wz* en líneas isogénicas cercanas e híbridos isogénicos cercanos.

Se ha demostrado que *Php* y *Wz* se segregan de forma independiente y que la combinación de genotipos *Wz/-Php/-* exhiben niveles de resistencia a la “pata prieta”, que fueron significativamente mayores que los exhibidos por cultivares comerciales de EUA heterocigóticos para el gen *Php*, como NC 196 y NC 71 ⁽⁷⁾. En tabaco, la introgresión de genes de resistencia, a partir de especies silvestres en estado heterocigótico, típicamente exhibe mayor desempeño agrícola y rendimiento en comparación con materiales en estado homocigótico ⁽¹⁹⁾.

En Cuba solo se informa la presencia de la Raza 0 de *P. nicotianae* y existe un debate sobre la presencia real de la Raza 1 ⁽²¹⁾. El gen *Php* confiere inmunidad solo a la Raza 0, pero hay que tener cuidado con las líneas que se deriven de estos programas y que contengan este gen en estado homocigótico o heterocigótico. Es necesario cumplir los esquemas de rotación con cultivares que no posean el gen o que posean una fuente de resistencia diferente para evitar un cambio hacia la Raza 1 y la predominancia final de razas alternativas ^(11,22).

Todas las fuentes de resistencia ejercen presión de selección sobre el patógeno, lo que puede resultar en la selección y establecimiento de nuevas razas y/o poblaciones de patógenos con una mayor agresividad en genotipos de huéspedes resistentes ⁽²³⁾.

En el tabaco, las poblaciones de *P. nicotianae* pueden exhibir mayor agresividad a las plantas con altos niveles de resistencia parcial, después de unas pocas generaciones de hospederos ⁽²²⁾.

Cuando la resistencia completa se distribuye ampliamente en un área geográfica grande, conduce a una selección direccional en la población de patógenos. Esta selección da como resultado un aumento en los mutantes virulentos y la ruptura del gen de resistencia ^(22,23). Por lo tanto, la resistencia completa generalmente no es duradera y, a menudo, da como resultado ciclos de auge y caída en los que el huésped se ve favorecido durante un tiempo, seguido de un cambio a favor del patógeno ⁽²³⁾.

En otro orden, es importante evaluar la calidad química de las nuevas líneas en términos de porcentaje de alcaloides totales y porcentaje de azúcares reductores y que estos valores estén dentro del margen comercial aceptable para el tabaco cubano en el mercado internacional. Las

fuentes de resistencia a la “pata prieta” conocidas, se asocian regularmente con una reducción de los rendimientos y/o de la calidad de la hoja curada, lo que hace difícil el desarrollo de cultivares altamente resistentes, que a la vez produzcan altos rendimientos de hoja curada con características químicas de calidad adecuada ⁽⁷⁾.

Este artículo no cumple con el índice de Price porque que no hay más bibliografía actualizada disponible. Este gen fue descubierto hace más de 20 años y debido a que presenta problemas de ligamiento durante los cruces y en la segregación se ha hecho difícil su estudio y no se ha podido aislar, secuenciar y/clonar y los genetistas ante estas dificultades solo han investigado temas superficiales como su introgresión en cultivares de tabaco susceptibles a la “pata prieta” y han publicado artículos hace más de 10 años fundamentalmente sobre este tema en particular. Desde hace años se dejó de publicar en este tema y se perdió interés por las dificultades anteriormente expuestas y porque ya se tenían variedades con este gen y por el descubrimiento de nuevas fuentes de resistencia proveniente de especies silvestres del género *Nicotiana* que pueden incluirse en el genoma del tabaco comercial y son de más fácil estudio.

Pero para Cuba es un tema completamente nuevo que se está comenzando a explotar en las nuevas variedades de tabaco cubano como parte de un nuevo manejo integrado de plagas en el cual los esquemas de piramidación génica durante los programas de mejora se hacen necesarios para incluir nuevas fuentes de resistencia monogénica en combinación a otras fuentes de resistencia poligénica para desarrollar cultivares con un amplio espectro de resistencia.

CONCLUSIONES

- En este artículo se demostró, que en los 29 cultivares utilizados, no se ha introgresado el gen *Php*, por lo que se clarifica que la fuente de resistencia a la “pata prieta” no proviene de *Nicotiana plumbaginifolia*.
- Se hace necesario introducir este gen en los cultivares comerciales de tabaco, llevando a cabo una óptima estrategia varietal que los alterne con otros cultivares que presenten otro tipo de fuente de resistencia, evitando así la rápida adaptación del patógeno.
- Esfuerzos futuros se deben encaminar en el desarrollo de programas de piramidación génica, para hacer coincidir más de un tipo diferente de resistencia a *P. nicotianae* en un mismo cultivar, siendo de vital importancia como línea base en los programas de mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Luis Pérez Rodríguez, curador del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco, Cuba y a la Dra. Georgina Espinosa de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Drake K, Lewis RS. An introgressed *nicotiana rustica* genomic region confers resistance to *Phytophthora nicotianae* in cultivated tobacco. *Crop Science*. 2013;53(4):1366–74. doi:10.2135/cropsci2012.10.0605
2. Toledo V, Quintana F. Efectividad del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (cav.) para el manejo de enfermedades fúngicas en el cultivo del tabaco. *Cuba Tabaco*. 2015;16(1):18–26.
3. Pacheco JM. Genes involucrados en la resistencia a la pata prieta y mejoramiento genético en Cuba. *Cuba Tabaco*. 2015;16(1):69–77.
4. Liu H, Ma X, Yu H, Fang D, Li Y, Wang X, et al. Genomes and virulence difference between two physiological races of *Phytophthora nicotianae*. *GigaScience*. 2016;5(3):1–8. doi:10.1186/s13742-016-0108-7
5. Toledo V. Compatibilidad del control biológico de *Trichoderma* frente a fungicidas utilizados en el cultivo del tabaco. *Cuba Tabaco*. 2014;15(1).
6. Xiao B, Drake K, Vontimitta V, Tong Z, Zhang X, Li M, et al. Location of genomic regions contributing to resistance in tobacco cultivar Florida 301. *Crop Science*. 2013;53(2):473–81. doi:10.2135/cropsci2012.06.0376
7. Drake KE, Moore JM, Bertrand P, Fortnum B, Peterson P, Lewis RS. Black shank resistance and agronomic performance of flue-cured tobacco lines and hybrids carrying the introgressed *Nicotiana rustica* region, Wz. *Crop Science*. 2015;55(1):79–86. doi:10.2135/cropsci2014.02.0164
8. Johnson ES, Wolff MF, Wernsman EA, Rufty RC. Marker-assisted selection for resistance to black shank disease in tobacco. *Plant Disease*. 2002;86(12):1303–9. doi:10.1094/PDIS.2002.86.12.1303
9. Johnson CS, Wernsman EA, LaMondia JA. Effect of a chromosome segment marked by the *Ph_p* gene for resistance to *Phytophthora nicotianae* on reproduction of tobacco cyst nematodes. *Plant Disease*. 2009;93(3):309–15. doi:10.1094/PDIS-93-3-0309
10. Johnson CS, Reed TD. Impact of resistance associated with the *Ph_p* gene on management of tobacco black shank and tobacco cyst nematode in Virginia. In: Abstracts of Presentations Made at the 2010 Coresta Congress in Edinburgh, Scotland Agronomy and Phytopathology [Internet].

Edinburgh: Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco (CORESTA); 2010 [cited 2019 Feb 1]. p. 10. Available from: <https://www.coresta.org/abstracts/impact-resistance-associated-php-gene-management-tobacco-black-shank-and-tobacco-cyst>

11. Li Y, Harris-Shultz K, Wang H, Wadl PA, Ji P. Population structure and genetic diversity of *Phytophthora nicotianae* from tobacco in Georgia. *Plant Disease*. 2017;101(7):1113–8. doi:10.1094/PDIS-01-17-0142-RE

12. Parkunan V, Johnson CS, Eisenback JD. Effects of Php gene-associated versus induced resistance to tobacco cyst nematode in flue-cured tobacco. *Journal of Nematology*. 2009;41(4):261–6.

13. Espino Marrero E, Torrecilla Guerra G. El tabaco cubano. Recursos fitogenéticos [Internet]. 1ra ed. La Habana, Cuba: Editorial Científico-Técnica; 1999 [cited 2019 Feb 1]. 231 p. Available from: <http://www.libreroonline.com/cuba/libros/18832/espino-marrero-eumelio-torrecilla-guerra-gilberto/el-tabaco-cubano-recursos-fitogeneticos.html>

14. Hernández Y, León Y, Hernández JM, Monroy AL. Nuevos sustratos para la producción de plántulas de tabaco en semilleros flotantes. *Cuba Tabaco*. 2004;5(2):15–9.

15. García M, Andino V. Tecnología de bandejas flotantes en la producción de plántulas de tabaco en Cuba. *Cuba Tabaco*. 2002;3(1):30–3.

16. Zhang YP, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*. 1998;71(1):45–50.

17. Espino E. El mejoramiento genético del tabaco (*Nicotiana tabacum*) en Cuba. *Boletín de Reseñas. Tabaco. CU*. 1988;(14):3–59.

18. Valdés de la Cruz M. Caracterización de la variabilidad genética en una colección de especies del Banco de Germoplasma del género *Nicotiana L.* en Cuba [Tesis de Doctorado]. [La Habana, Cuba]: Universidad de La Habana; 2010. 127 p.

19. Ramsey S L. *Nicotiana*. In: Kole C, editor. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Plantation and Ornamental Crops* [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011 [cited 2019 Feb 1]. p. 185–208. Available from: <https://www.springer.com/la/book/9783642212000>

20. Vontimitta V, Lewis RS. Mapping of quantitative trait loci affecting resistance to *Phytophthora nicotianae* in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) line Beinhart-1000. *Molecular Breeding*. 2012;29(1):89–98. doi:10.1007/s11032-010-9528-8

21. Toledo V. Metodología para la diferenciación de la raza 1 y los tres grupos patogénicos de la raza 0 en los aislamientos de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan del tabaco en Cuba. *Cuba Tabaco*. 2009;10(1):67–71.

22. McDonald BA, Linde C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*. 2002;124(2):163–80. doi:10.1023/A:1015678432355
23. McCorkle K, Lewis R, Shew D. Resistance to *Phytophthora nicotianae* in Tobacco Breeding Lines Derived from Variety Beinhart 1000. *Plant Disease*. 2013;97(2):252–8. doi:10.1094/PDIS-05-12-0480-RE

The *Php* gene is not a resistance source in Cuban tobacco

Javier Martínez-Pacheco^{1*}

María del Carmen Castro-Fernández¹

Angélica González-Toledo²

Verónica Toledo-Sampedro¹

¹Departamento de Genética y Fitopatología, Instituto de Investigaciones del Tabaco, Carretera a Tumbadero, km 8 ½, San Antonio de los Baños, Artemisa, Cuba. CP 38100

²Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, calle 25 No.455 e/ J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba, CP 10400

* Author for correspondence. jmartinez.iit@gmail.com

ABSTRACT

The “black shank” is one of the main diseases that affect the commercial plantations of tobacco in the world. The identification of tobacco genes involved in resistance to the disease, as well as its introgression in commercial cultivars, constitutes a major challenge at present for the genetic improvement programs in Cuba. The information on the “pedigree” of the Cuban cultivars is scarce and sometimes erroneous, so it is important to determine with molecular tools the sources of resistance to the black shank in Cuba's commercial tobacco. The aim of this work was to determine the presence of the *Php* gene, as a source of monogenic resistance to the disease in 29 tobacco cultivars through the use of a specific molecular marker. It was shown that the *Php* gene was absent in all cultivars and that it has not been introduced through improvement programs for years. It is important to introduce the *Php* gene in new cultivars of Cuban tobacco through gene-pyramiding schemes that allow their combination with other sources of polygenic resistance to make the resistance more durable and having a wide spectrum.

Key words: molecular marker, *Nicotiana plumbaginifolia*, cultivars, genetic breeding

INTRODUCTION

The disease known as “black shank” caused by the oomycetes *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, produces large annual losses to tobacco production in Cuba and the rest of the world^(1,2). The control of this disease is carried out through an integrated management that includes:

the rotation of crops, the use of chemical products and resistant varieties, the latter being the most economical and lasting strategy ^(3,4).

Obtaining cultivars resistant to the disease in Cuba, through current breeding programs results in a long period of about 10 or 12 years. The different races of this pathogen are able to evolve in an accelerated way in short periods of time developing much more aggressive isolates ⁽⁵⁾, for this reason the pathogen manages to overcome the resistance of the new varieties that are released to production in only a few years. To this is added the possible consanguinity present in the cultivars due to the recurrent and continuous use of the same parents that causes a low genetic variability to which it is easy to adapt the pathogen.

So far, four sources of monogenic and multigenic resistance to *P. nicotianae* are well identified. The partial resistance, controlled by multiple genes and non-specific race that comes from the cultivar 'Florida 301' is one of the most widespread but is associated with low yields and a reduction in the quality of the leaf cured in Virginia tobacco ⁽⁶⁾.

The cultivar of black tobacco 'Beinhart-1000' has a strong resistance to races 0 and 1 of the pathogen, but it is little used in improvement programs due to the presence of unwanted compounds in the cured leaf ^(1,7). The genomic region known as *Wz* from the wild species *Nicotiana rustica* has been introgressed in some cultivars of tobacco Virginia in the United States of America and Zimbabwe through a stable line designated as '*Wz*'. Tobacco lines in which it has been introgressed the *Wz* region contains a gene or genes that confer a high level of resistance to Race 0 and affect the resistance to Race 1 of *P. nicotianae* ⁽⁷⁾.

Finally we have the transfer of *Php* and *Phl* genes to commercial tobacco cultivars from the wild species *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. and *Nicotiana longiflora* Cav., Respectively. Both genes have similar effects, with a dominant monogenic character that provides complete resistance only to Race 0 of *P. nicotianae* ⁽⁸⁻¹²⁾.

In Cuba, only the presence of Race 0 of *P. nicotianae* is reported and Cuban cultivars show resistance levels varying from susceptible to highly resistant at the time of release to production. ⁽⁵⁾

There is ambiguity among producers and plant breeders about the origin of resistance to *P. nicotianae* in Cuban tobacco cultivars. So it is difficult to determine if the *Php* gene was introduced into commercial cultivars as part of the breeding program in the 60s and 70s of the previous century. This makes it impossible to know if this resistance gene has been deployed in the set, properly preserved, of the variety of genes of tobacco in Cuba over more than 40 years of genetic improvement.

An intense and rigorous search in the *pedigree* of Cuban commercial tobacco cultivars shows that probably only resistance to the "brown leg" that comes from "Florida 301" was introduced

in Cuba through cultivars that were used as progenitors in the programs of improvement. Cultivars such as 'K326' and 'Florida 301' itself, were used in the improvement of Cuban tobacco cultivars type Virginia a few years ago ⁽¹³⁾. We have no evidence of the presence of the *Php* gene as a source of resistance in Cuban tobacco, a fundamental knowledge that is needed for improvement programs and for the establishment of an adequate tobacco policy in our country. Taking into account the above, the objective of this research was to identify the presence of the *Php* gene in current commercial tobacco cultivars, cultivars that were commercial at the time and cultivars that have been used and used in tobacco improvement programs in Cuba as parents for more than 40 years.

MATERIAL AND METHODS

All the cultivars of this research were used or used in tobacco breeding programs in Cuba. Seeds of 29 tobacco cultivars (*Nicotiana tabacum* L.) and seeds of the wild species *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. (Natural source of the *Php* gene) were planted in expanded polystyrene trays with 264 alveoli containing organic substrate with the following composition: 70 % of black peat, 15 % of rice husk and 15 % of zeolite ⁽¹⁴⁾, based on the floating tray technology according to García and Andino ⁽¹⁵⁾. The trays were placed in protected culture conditions or tunnels.

Extraction of DNA

The extraction was made from young leaves of 45-day-old plants according to the modified CTAB method ⁽¹⁶⁾. The DNA concentrations were determined spectrophotometrically according to the 260/280 nm and 260/230 nm ratios. The integrity of the DNA was determined by electrophoresis in 0.8 % agar.

Condicitions of the PCR

The RAPD marker, UBC 30₄₉₀ ⁽⁸⁾, was used to identify the presence of the *Php* gene. PCR was performed in a volume of 15 µl. The conditions consisted of 25 ng genomic DNA, 0.4 µM oligo, 1X TaqPol reaction buffer (Promega, EUA), 2.5 mM MgCl₂, 200 µM PCR Nucleotide Mix (Promega, EUA), and 1.0 U of Taq Polymerase (Promega, USA). The amplification program used was that of Johnson et al, 2008 ⁽⁸⁾. Briefly, the reaction was denatured initially at 94 °C for 2 min, followed by three cycles at 94 °C for 1 min, 38 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min; 35 cycles at 92 °C for 1 min, 40 °C for 1 min, 72 °C for 2 min and a final extension step at 72 °C for 5 min. Ten microliters of each sample plus two microliters of Blue/Orange Dye 6x (Promega, USA) were loaded on a 1 % agarose gel and separated at 150 volts for 1 hour in 1X Tris-Borate-

EDTA. The DNA was visualized with SYBR[®] Green Dye (Sigma-Aldrich, USA) according to the specifications of the suppliers and the size of the fragment was estimated from a molecular marker of 1 kb (Applichem, Germany). The expected length of the band for the fragment linked to the *Php* gene is approximately 490 bp ⁽⁸⁾.

RESULTS AND DISCUSSION

In all the cultivars tested, the *Php* gene is absent except for *N. plumbaginifolia*, which is the natural source (Table 1 and Figure 2). The results provide new information that suggests that these cultivars that were used as progenitors in tobacco improvement programs in Cuba over more than 40 years do not contain the *Php* gene. This type of resistance can be introduced and exploited in current and future improvement programs in our country. The scientific evidence on the absence of *Php* in Cuban commercial tobacco is in contradiction with the cited by Espino and cited by Valdés, who states that Cuban cultivars of Virginia-type tobacco possess the source of resistance to the disease “black shank” that comes from of *N. plumbaginifolia* ^(17,18). In none of the 10 Virginia tobacco cultivars that were analyzed was the *Php* gene.

Table 1. Cultivars used to identify the presence absence of the *Php* gene, type of tobacco and country of origin

Name	Typo of tobacco	Country of origin
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Wild species genus	Peru, Bolivia, Paraguay,
	<i>Nicotiana</i>	Brazil
Habana-2000	Negro	Cuba
Criollo-2010	Negro	Cuba
Habana-92	Negro	Cuba
Corojo-99	Negro	Cuba
Corojo-2006	Negro	Cuba
Corojo	Negro	Cuba
Burley Pinar 2004	Burley	Cuba
Habana 2.1.1	Negro	Cuba
Corojo-2012	Negro	Cuba
Criollo	Negro	Cuba
Criollo-98	Negro	Cuba
Corojo Especial	Negro	Cuba
KY 910	Virginia	USA
RxT	Negro	Poland
Pelo de Oro	Negro	Mexico
GA-955	Virginia	Australia
Bel 61-10	Negro	USA
KY 17	Burley	USA
KY 14	Burley	USA
San Luis 20	Virginia	Cuba
San Luis-21	Virginia	Cuba
San Luis-22	Virginia	Cuba
K 326	Virginia	USA
Coker 86	Virginia	USA
B-11	Virginia	USA
NC-1151	Virginia	USA
Virginia Isogénica	Virginia	Cuba
Habana Vuelta Arriba	Negro	Cuba
Florida 513	Negro	USA

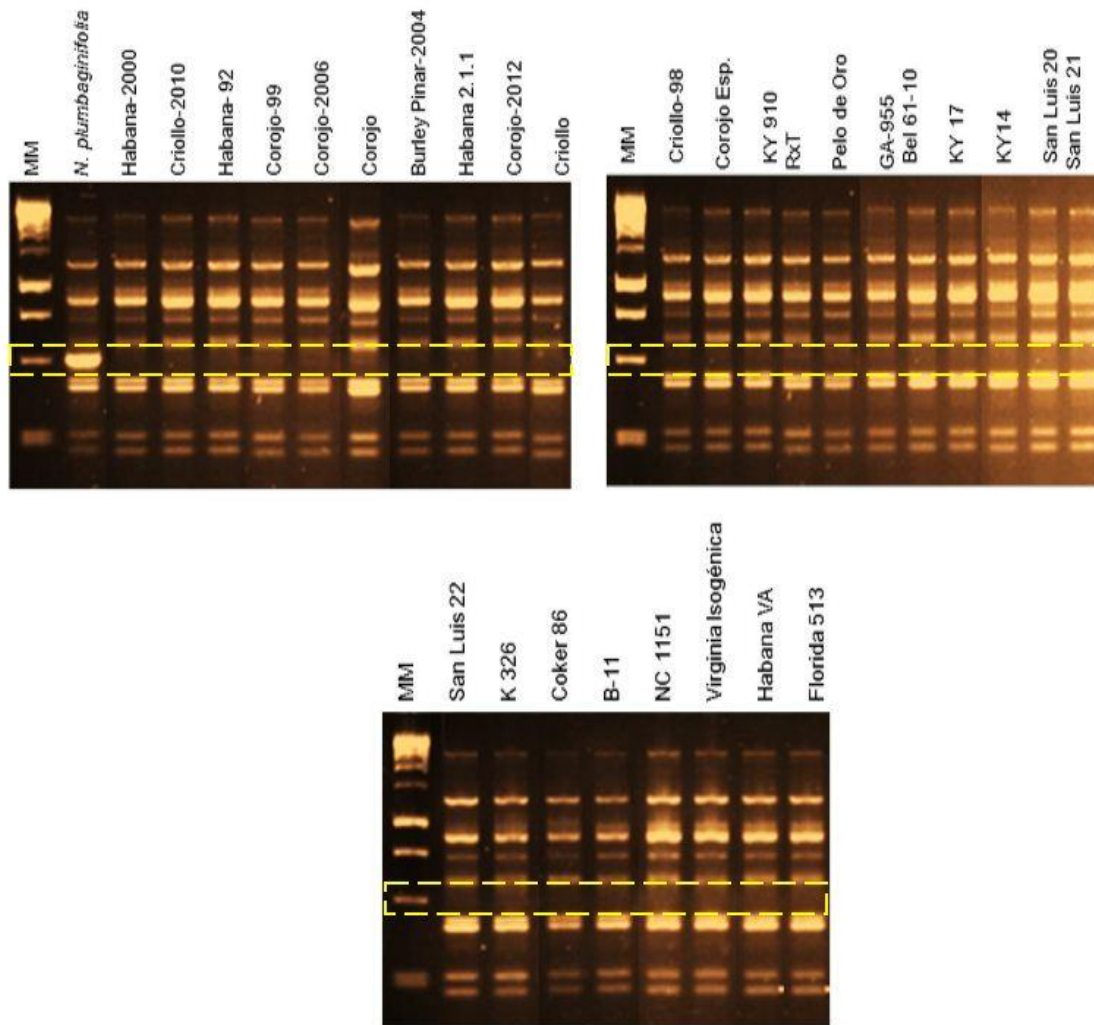


Figure 1. Identification of the presence/absence of marker UBC30₄₉₀ in the 29 cultivars analyzed and in the wild species *N. plumbaginifolia* by electrophoresis in 1 % agar. Note that the yellow rectangles of dashed lines indicate the presence or absence of the expected length band of 490 bp for the *Php* gene and that it only appears in *N. plumbaginifolia*

On the basis of this new evidence it is possible to develop improvement programs that use as a parent a foreign cultivar that has the *Php* gene and a Cuban cultivar with good agricultural performance and high yield to obtain lines and cultivars improved in terms of resistance to the "black shank" that possess the typical commercial phenotype of Cuban tobacco very much desired by consumers in Europe. Due to the low durability of the mechanisms of monogenic resistance in tobacco ⁽¹⁹⁾, programs should focus on combining the monogenic resistance of the *Php* gene with medium or high levels of polygenic resistance that is more durable over time. For this reason, it is important to design genetic pyramid schemes that allow obtaining elite lines of tobacco in short periods of time (three to five years), that have a broad spectrum of response to the different pathogenic races of *P. nicotianae*, as a result of the combination of monogenic and polygenic types of resistances, without significantly affecting production performance.

The existence of AFLP, SSR and SCAR markers for the *Wz* genomic region, the resistance component in Beinhart-1000 and the *Php* gene, respectively ^(1,20), allow the application of improvement methods that allow a more reliable, quick and safe selection of the resistant genetic lines. One of these methods is the backcross assisted by molecular markers that makes it possible to combine the *Php* gene in a homozygous or heterozygous state with other sources of polygenic resistance such as the *Wz* genomic fragment in nearby isogenic lines and nearby isogenic hybrids. It has been shown that *Php* and *Wz* are segregated independently and that the combination of *Wz*/*-Php*/ - genotypes exhibit levels of resistance to the "black shank" that were significantly higher than those exhibited by commercial cultivars of the USA heterozygous for the gene *Php*, as NC 196 and NC 71 ⁽⁷⁾. In tobacco, the introgression of resistance genes from heterozygous wild species typically exhibits higher agricultural performance and yield compared to materials in the homozygous state ⁽¹⁹⁾.

In Cuba, only the presence of Race 0 of *P. nicotianae* is reported and there is a debate about the real presence of Race 1 ⁽²¹⁾. The *Php* gene confers immunity only to Race 0, but care must be taken with the lines that are derived from these programs and that contain this gene in a homozygous or heterozygous state. It is necessary to comply with rotation schemes with cultivars that do not have the gene or that have a different source of resistance to avoid a change to Race 1 and the final predominance of alternative races ^(11,22).

All sources of resistance exert selection pressure on the pathogen, which may result in the selection and establishment of new races and populations of pathogens with greater aggressiveness in genotypes of resistant hosts ⁽²³⁾.

In tobacco, populations of *P. nicotianae* may exhibit greater aggressiveness to plants with high levels of partial resistance after a few generations of hosts ⁽²²⁾.

When complete resistance is widely distributed over a large geographic area, it leads to a directional selection in the pathogen population. This selection results in an increase in virulent mutants and breakdown of the resistance gene ^(22,23). Therefore, complete resistance is generally not durable and often results in boom and bust cycles in which the host is favored for a time followed by a change in favor of the pathogen ⁽²³⁾.

In another aspect, it is important to evaluate the chemical quality of the new lines in terms of percentage of total alkaloids and percentage of reducing sugars and that these values are within the acceptable commercial margin for Cuban tobacco in the international market. Known sources of resistance to the "black shank" are regularly associated with a reduction in the yields and the quality of the cured leaf, which makes it difficult to develop highly resistant cultivars that also produce high yields cured leaf with chemical characteristics of adequate quality ⁽⁷⁾.

This article does not meet the Price index because there is no more updated bibliography available. This gene was discovered more than 20 years ago and because it presents problems of linkage during crossings and segregation, it has become difficult to study and it has not been possible to isolate, sequence and / or clone and geneticists faced with these difficulties have only investigated superficial issues such as its introgression in tobacco cultivars susceptible to "Pata prieta" and have published articles for more than 10 years mainly on this particular issue. For years, this issue has been discontinued and interest has been lost because of the difficulties described above and because varieties with this gene were already available and because of the discovery of new sources of resistance from wild species of the *Nicotiana* genus that can be included in the genome of commercial tobacco and are easier to study.

But for Cuba it is a completely new issue that is beginning to be exploited in the new varieties of Cuban tobacco as part of a new integrated pest management in which gene pyramid schemes during breeding programs become necessary to include new sources. of monogenic resistance in combination with other sources of polygenic resistance to develop cultivars with a broad spectrum of resistance.

CONCLUSIONS

- In this article it was shown that in the 29 cultivars used the *Php* gene has not been introgressed, so it is clarified that the source of resistance to the "brown leg" does not come from *Nicotiana plumbaginifolia*.
- It is necessary to introduce this gene in commercial tobacco cultivars, carrying out an optimal varietal strategy that alternates with other cultivars that present another type of resistance source, thus avoiding the rapid adaptation of the pathogen.
- Future efforts should be directed to the development of genetic pyramid programs to match more than one different type of resistance to *P. nicotianae* in the same cultivar, being of vital importance as a baseline in breeding programs.

ACKNOWLEDGMENT

To Dr. Juan Luis Pérez Rodríguez, curator of the Germplasm Bank of the Tobacco Research Institute, Cuba and to Dr. Georgina Espinosa of the Faculty of Biology, University of Havana.