# Variabilidad genética en germoplasma de tabaco Tipo Virginia empleando marcadores moleculares

**Daniela Cuellar[1], Mónica Aparicio[1,5], Guadalupe Mercado Cárdenas[2], Marta Galván[1,5], Gisel Taboada[1,5], Juan Galli[4], Mario Martínez[4], Luis Ibarra[3], María del Carmen Menéndez Sevillano[3] y María Elena Toncovich[4].**

1- EEA INTA Salta, Laboratorio de Biotecnología. 2- EEA INTA Salta, Sanidad Vegetal. 3- EEA INTA Salta, Banco de germoplasma. 4- EEA INTA Salta, Grupo Tabaco y diversificación. 5- CONICET.

Correo: martazgalvan@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la actividad agraria de la provincia de Salta, el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tiene una apreciable participación en la economía regional, tanto desde el punto de vista de la producción y exportaciones provinciales, como por su relevancia en la generación de empleo.

Desde fines de los años noventa la actividad tabacalera se vio afectada por una sintomatología que se visualiza con distintas manifestaciones externas como: marchitamiento de la parte aérea de la planta, clorosis o amarillamiento y posterior necrosis de los tejidos, que puede terminar con la muerte de la planta. Coincidente con aquella manifestación aérea, el sistema radicular se presenta con escaso desarrollo y en su mayoría con presencia de raíces con podredumbre, visualizándose muchas veces en el cuello necrosis total o parcial (7).

Recientemente se detectaron diferentes patógenos que desencadenan enfermedades radicales, además de la presencia de nematodos y gusano minador como vectores (productores de heridas) de las mismas. El marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum*) y podredumbre radicular (*Rhizoctonia solani*), son las enfermedades con mayor prevalencia e incidencia que conforman el complejo del amarillamiento en tabaco (11).

En sus comienzos esta sintomatología se manifestaba en forma aislada, pero en los últimos años se expandió por toda la zona tabacalera transformándose en uno de los problemas fitosanitarios más importantes de este sector productivo. Además, entre otros factores la manifestación de esta patología es atribuida a la degradación de los suelos producto del sistema de labranza convencional y monocultivo (12). La estrecha base genética de los cultivares comerciales también condiciona el estado sanitario del cultivo.

Las variedades comerciales que se utilizan en la producción tabacalera del NOA tienen origen en Brasil y EE.UU, por lo cual presentarían baja adaptación a las condiciones agroecológicas de la zona. El manejo sanitario que comúnmente se realiza es la aplicación de agroquímicos, que además de encarecer la producción, contaminan el medio ambiente. Por lo tanto, la incorporación de resistencia genética en las variedades comerciales es una estrategia de interés para incrementar la producción en el marco de un desarrollo agrícola sustentable.

Actualmente el mejoramiento genético convencional para resistencia a factores bióticos y abióticos puede ser asistido por técnicas moleculares que hacen más eficiente y confiable al proceso. El desarrollo de las técnicas empleadas actualmente en Biología Molecular permite a genetistas y mejoradores realizar estudios de variabilidad a nivel de ADN de una manera sistemática. Los marcadores moleculares basados en la amplificación del ADN mediante PCR (reacción en cadena de la

polimerasa) demostraron ser herramientas de utilidad para la identificación y estudios de similitud genética entre variedades, con la ventaja de no ser afectados por el medio ambiente. Diferentes marcadores moleculares fueron utilizados para estudios de diversidad genética y caracterización de variedades en tabaco, como ser RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)(18, 14) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (19, 17, 8).

La técnica de SSR o microsatélites consiste en la amplificación de regiones del ADN que contienen secuencias simples (1 a 4 nucleótidos) repetidas y adyacentes. Para ello se utilizan "primers" de una secuencia específica de 20 a 30 bases, que son complementarios a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite (15). Actualmente se dispone de numerosas secuencias de SSR que fueron recientemente reportadas para *N. tabacum* las cuales son de dominio público y pueden ser de gran utilidad para estudios de variabilidad genética y caracterización de variedades (1, 2). Los marcadores ISSR (inter simple sequence repeats), que utilizan secuencias de microsatélites como primers y amplifican regiones inter-microsatelitales, también demostraron ser una técnica altamente reproducible para el análisis de variabilidad genética en *N. tabacum* (16). La técnica de ISSR emplea un único primer que hibrida en múltiples sitios del genoma y permite la amplificación de segmentos de ADN de distinta longitud (20).

El objetivo del trabajo fue conocer la variabilidad genética existente entre variedades de tabaco Virginia conservadas en el Banco de germoplasma del NOA (BANOA) y variedades comerciales para aportar nuevos materiales a los programas de mejoramiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Material biológico*

Se analizaron 12 variedades comerciales de tabaco Tipo Virginia de importancia para la región (Cuadro 1) y 5 variedades conservadas en el BANOA: BANOA29 (INTA Güemes 74), BANOA33 (Virginia San Pedro INTA), BANOA49 (INTA Cerrillos 90A), BANOA50 (INTA Cerrillos 91B) y BANOA51 (INTA Cerrillos 69). Estas últimas fueron generadas como resultado de 30 años de trabajo (entre 1960 y 1990) en el programa de mejoramiento de tabaco del INTA EEA Salta por el Ing. Agr. Darío Fernandez de Ulivarri.

Para el análisis se emplearon plántulas de tabaco de 100-120 días, mantenidas en almácigo flotante.

*Análisis molecular*

La extracción de ADN se realizó a partir de hojas de plántulas de tabaco empleando el

**Cuadro 1. Variedades de tabaco Tipo Virginia analizadas en el presente trabajo. TMV: Tobacco Mosaic Virus; PVY: Potato Virus Y; R: Resistente; T: tolerante; S: Susceptible; nd: dato no disponible.**

| Variedades Comerciales | TMV | PVY | Black Shank *P. parasitica* | Nematodos *M. incognita* | Marchitez Bacteriana *R. solanacearum* |
|---|---|---|---|---|---|
| MB 47 | nd | nd | nd | T | T |
| PVH 2299 | R | S | T | R | T |
| MB 37 | nd | nd | nd | T | T |
| PVH 2248 | nd | nd | nd | nd | nd |
| NC 567 | R | R | T | R | T |
| K 394 | S | S | R | S | T |
| K 149 | S | S | T | R | R |
| PVH 2291 | S | S | S | R | R |
| K 326 | S | S | T | R | T |
| PVH 2241 | R | S | T | R | T |
| K 346 | S | S | R | R | R |
| PVH 2254 | R | S | T | R | T |

protocolo de CTAB de Doyle y Doyle (5) modificado (3). La calidad y cantidad de ADN se midió en geles de agarosa 0.8% utilizando un marcador de peso molecular (DNA Ladder, Genbiotech). A partir del ADN extraído se realizó la amplificación mediante PCR empleando marcadores ISSR y microsatélites distribuidos en todo el genoma de tabaco (2). Se probaron 8 primers ISSR con bases selectivas en los extremos 5` (anclaje 5`) o 3` (anclaje 3`) y sin anclaje (Cuadro 2). Las reacciones de ISSR-PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl utilizando 20-50 ng de ADN genómico, 2,5 mM $Cl_2Mg$, 0,7 µM de primer, 10 mM de Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM de ClK, 200 µM de cada dNTP y 1,25 U de Taq polimerasa (INBIO, Tandil). La amplificación del ADN consistió en una desnaturalización inicial de 7 min. a 94° C seguida de 33 ciclos de 1 min. a 94° C, 1 min.15 seg. a T° de annealing del primer y 4 min. a 72° C, con una extensión final de 7 min. a 72° C.

**Cuadro 2. Primers ISSR y miscrosatélites utilizados para el análisis de 17 variedades de tabaco Tipo Virginia.**

| Primer | Secuencia (5'-3') | Tº annealing (ºC) |
|---|---|---|
| ***ISSR*** | | |
| AA3 | $(AC)_8TA$ | 52 |
| C | $(AG)_8CG$ | 52 |
| LA5 | $CAG(AAC)_5$ | 53 |
| G | $GAG(CAA)_5$ | 58 |
| BA5 | $GAG(GAA)_5$ | 53 |
| FA5 | $TAC(GA)_8$ | 56 |
| ***microsatélites*** | | |
| 50610 | F: CACATTTGACCGTTCAACCA<br>R: CTACACGGTAACTGCTCCAAA | 62 |
| 51838 | F: TTGCTGTGAGTAGCTGCTGAG<br>R: TTGAGACATGCCATAACCACA | 64 |
| 52260 | F: GCCAACAAATAAGGTACGGG<br>R: CCACTTGGCGAAATGAGAAT | 64 |
| 61512 | F: TCGGACCCAAAGTTTAAGAAA<br>R: CAAATGACGACCAGGGAAAT | 63 |
| 60209 | F: TGCACAAATTAAAGGCAACTCA<br>R: ACGACAAGACGTCAAACGAA | 64 |
| 52643 | F: ACAGGGCATCAGAATTGTTT<br>R: CATGACATACTACAGGTGACCCA | 64 |
| 52858 | F: TGAATTATGCGGTGCACATT<br>R: ATATTCCAACGTGGGCTGAA | 65 |
| 52838 | F: CCATTTCGATTGTGATGCAA<br>R: AACATCATCCGAGGCCTAAA | 65 |

Se analizó un total de 24 marcadores microsatélites distribuidos en todos los grupos de ligamiento de *N. tabacum* según el mapa publicado por Bindler *et al.* (2). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 µl utilizando 20 ng de ADN genómico, 2,5 mM $Cl_2Mg$, 0,2 µM de cada primer (forward y reverse), 10 mM de Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM de ClK, 125 µM de cada dNTP y 1 U de Taq polimerasa (INBIO, Tandil). La amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 7 min. a 94° C seguida de 30 ciclos de 1 min. a 94° C, 1 min. a 62-65° C y 2 min. a 72° C, con una extensión final de 7 min. a 72° C.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% para los marcadores ISSR y de poliacrilamida 10% (29:1 acrilamida: bis-acrilamida) para los microsatélites, utilizando para el revelado la tinción con GelRed™. Los geles fueron fotografiados para la documentación y genotipado de los materiales con cada uno de los marcadores probados. El tamaño de las bandas amplificadas se determinó utilizando como patrón de comparación un marcador de peso molecular (Marcador de ADN, INBIO, Tandil). Se realizaron repeticiones tanto de las extracciones de ADN como de las reacciones de PCR.

*Análisis de datos*

Con los patrones de bandas obtenidos se construyó una matriz que fue utilizada para generar un árbol de Neighbor-Joining usando el programa Powermarker (9) y la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (4). Para determinar la robustez de los agrupamientos se generó un arbol consenso a partir de 1000 repeticiones de bootstrap (7).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó un total de 17 variedades de tabaco Tipo Virginia empleando marcadores ISSR y microsatélites.

Los mismos mostraron patrones de bandas repetibles con tamaños entre 250 pb y 3 Kb. El promedio de bandas amplificadas por primer fue de ocho. Sin embargo no se observaron patrones polimórficos que permitieran mostrar diferencias entre los materiales analizados (Figura 1). Por ello se optó por utilizar marcadores SSR para el análisis ya que se caracterizan por mostrar elevado polimorfismo debido a la variación en el número de repeticiones de los microsatélites y permitir la detección de individuos heterocigotas para los diferentes loci. Tales características hacen que los microsatélites sean muy útiles como marcadores genéticos, aún en materiales altamente relacionados.

El tamaño de las bandas amplificadas empleando marcadores SSR varió entre 100 y 250 pb. En todos los casos se obtuvieron bandas del tamaño esperado según la bibliografía. Del total de primers analizados el 33% mostró polimorfismo entre las variedades estudiadas (Figura 1). El promedio de alelos amplificados por primer fue de tres y los valores de PIC (contenido de información polimórfica) variaron entre 0,20 y 0,67 con un promedio de 0,42, evidenciándose que el marcador 50610 fue el menos polimórfico (Cuadro 3). Los marcadores utilizados permitieron diferenciar a todas las variedades estudiadas mostrando la existencia de variabilidad genética entre las mismas (Figura 2).

**Cuadro 3. Polimorfismo detectado por cada marcador microsatelite utilizado en el análisis de 17 variedades de tabaco Tipo Virginia del NOA.**

| Marcador | Grupo de ligamiento | Nro de alelos | Alelo más frecuente | PIC |
|---|---|---|---|---|
| **51838** | 3 | 2 | 0.5294 | 0.37 |
| **61512** | 7 | 3 | 0.5882 | 0.48 |
| **52260** | 8 | 3 | 0.5882 | 0.50 |
| **60209** | 11 | 4 | 0.3750 | 0.67 |
| **50610** | 13 | 3 | 0.8824 | 0.20 |
| **52643** | 17 | 3 | 0.6667 | 0.41 |
| **52838** | 21 | 2 | 0.6471 | 0.35 |
| **52828** | 24 | 3 | 0.7500 | 0.37 |
| **Media** | | 3 | 0.6284 | 0.42 |

La existencia de una estrecha base genética en las variedades de tabaco comúnmente utilizadas a nivel mundial fue reportada por diferentes autores (13, 19, 17). Es probable que una gran proporción de germoplasma de tabaco se haya perdido por la mayor popularidad de ciertas variedades comerciales y la constante selección artificial (19). Para ampliar la base genética de los cultivares elite es necesario realizar cruzamientos con variedades genéticamente distantes o especies silvestres (10). Por esto la variabilidad revelada entre las variedades estudiadas en el presente trabajo es un gran aporte para los programas de mejoramiento.

El árbol de Neighbor-Joining generado em-

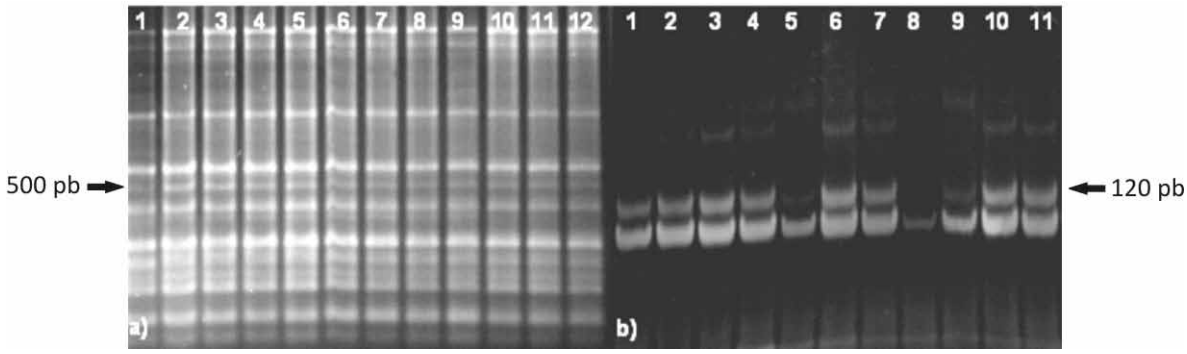


**Figura 1. Amplificación de ADN de variedades de tabaco Tipo Virginia del NOA empleando marcadores moleculares. a) ISSR AA3, b) microsatélite 51838. Para la nomenclatura ver Cuadro 1.**

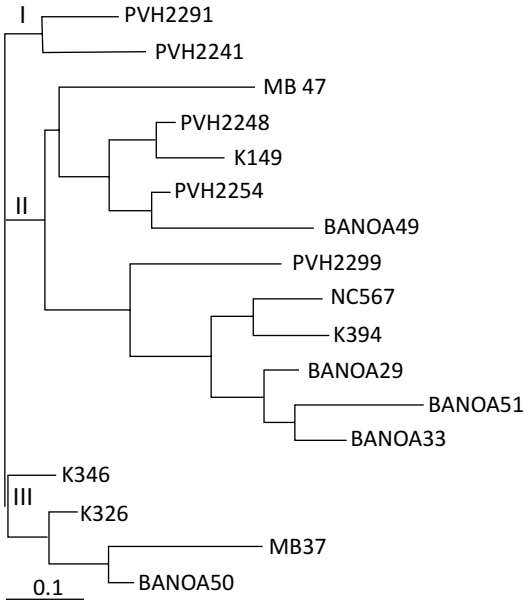


**Figura 2. Árbol de Neighbor-Joining de 17 variedades de tabaco Tipo Virginia analizadas empleando marcadores microsatélites.**

pleando los datos moleculares agrupó a las variedades con buen rendimiento a campo y conservación de calidad en estufado (K326, K346) en el mismo grupo o cluster (cluster III) (Figura 2). Mientras que el resto de las variedades que presentan mediano a bajo rendimiento, pero son resistentes a nematodos, virosis y enfermedades radiculares, se agruparon en clusters separados (clusters I y II). BANOA 49 y BANOA 51 mostraron gran divergencia genética con el resto de las variedades revelado por la mayor longitud de las ramas del árbol. Las mismas evidenciaron mayor tolerancia a *Rhizoctonia solani* en ensayos de patogenicidad utilizando diferentes variedades comerciales (com. pers. Mercado Cárdenas). El empleo de las variedades BANOA en programas de mejoramiento (principalmente en cruzamientos con K326 y K346) sería de gran interés para generar materiales con probada adaptación a las condiciones del NOA y a las exigencias del mercado.

El presente trabajo representa el primer reporte de marcadores moleculares aplicados al análisis de variedades de tabaco Tipo Virginia en el país.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA


1. Bindler G., Hoeven R., Gunduz I., Plieske J., Ganal M., Rossi L., Gadani F. and Donini P. 2007. A microsatellite marker based linkage map of tobacco. Theoretical and Applied Genetics 114: 341-349.
2. Bindler G., Plieske J., Bakaher N., Gunduz I., Ivanov N., Van der Hoeven R., Ganal M., and Donini P. 2011. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. Theoretical and Applied Genetics 123: 219-230.
3. Bornet B., and Branchard M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19: 209-215.
4. Cavalli-Sforza L.L., and Edwards A.W. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. American Journal of Human Genetics 19: 233–257
5. Doyle J. J., and Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
6. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on fylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783- 791.
7. Gimenez Monge J.L., Mercado Cárdenas G.E., Ortega A., Lacci F., y Arzeno J.L.. 2009. Un enfoque integral del amarillamiento en tabaco. Panorama Agropecuario de Salta y Jujuy. 10(52): 4-7.
8. Jessada D., Tianrat P., and Matchima N. 2010. Genetic Polymorphism between Tobacco Cultivar-groups Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. Journal of Agricultural Science 2(2): 41-48.
9. Liu K., and Muse S. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics 21: 2128–2129.
10. Liu X., and Zhang H. 2008. Advance of molecular marker application in the tobacco research. African Journal of Biotechnology 7(25): 4827-4831.
11. Mercado Cárdenas G. E., Alfaro R., y Gimenez Monge J. L. 2010. Prevalencia e incidencia de las enfermedades radiculares y virales de *Nicotiana tabacum* en las provincias de Salta y Jujuy, Argentina. *In*: Actas del XXI Congreso

Peruano de Fitopatologia, Tarapoto, p.8.
12. Mercado Cárdenas, G., Aciar M. y Sánchez C. 2011. Análisis espacial con aplicación de transectas de la distribución de una enfermedad radicular y su relación con variables de suelo en el cultivo de tabaco en Salta (Argentina). *In*: Actas del Primer Seminario Nacional de Cartografía Digital, San Luis, formato digital.
13. Ren N., and Timko MP (2001). AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild Nicotiana species. Genome. 44(4): 559-571.
14. Saraka K., and Rao R.V. 2008. Genetic diversity in Indian FCV and burley tobacco cultivars. Journal of Genetics. 87(2): 159-163.
15. Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general sources for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research. 17: 6463-6471.
16. Yang B, Xiao B, Chen X. and Shi C. 2007. Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using intersimple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. Annals of Applied Biology 150: 393–401.
17. Zhang H., Liu X., He C., and Yang Y. 2008. Genetic diversity among Flue-cured tobacco cultivars based on RAPD and AFLP markers. Brazilian Archives of Biology and Technology 51(6): 1097-1101.
18. Zhang H.Y., Liu X.Z., He C.S., and y Zheng C.M. 2005. Random amplified DNA polymorphism of *Nicotiana tabacum* L. cultivars. Biologia Plantarum. 49: 605-607.
19. Zhang H.Y., Liu X.Z., Li T.S., and Yang Y.M. 2006. Genetic diversity among flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) revealed by amplified fragment length polymorphism. Botanical Studies 47: 223-229.
20. Zietkiewicz E., Rafalski A., and Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176–183.

# Aportes para el manejo del corcovo del tabaco en la región del NOA®

**Ana C. Ramallo[1], Paola M. López Lambertini[2], Daniel A. Ducasse[2]**
1-GEA Agronegocios S.R.L. 2-Instituto de Patología Vegetal (IPAVE), CIAP-INTA (ex-IFFIVE).
Correo-e: ana.ramallo@gea-ide.com.ar

## INTRODUCCIÓN

El corcovo del tabaco o *"vira-cabeça"* como también se denomina a esta enfermedad, es uno de los principales problemas sanitario de este cultivo en la Argentina y está causado por diferentes especies virales pertenecientes al género *Tospovirus*. Sus síntomas más conspicuos son amarillamiento, detención de crecimiento, estrías necróticas en tallos, dibujos necróticos en hojas y un encorvamiento característico del cogollo.

Actualmente, existen por lo menos 24 especies de tospovirus citadas a nivel mundial (1, 19). En la Argentina han sido reportados cinco especies de tospovirus: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV) (4, 7, 12, 13). Con excepción del IYSV, las demás especies presentes en Argentina tienen capacidad de infectar tabaco, ya sea natural o experimentalmente. El corcovo del tabaco ha sido reportado en Argentina desde la primera mitad del siglo pasado (3, 5). Estudios posteriores determinaron al TSWV como el agente causal de esta virosis (23) y a los trips *Thrips tabaci* y *Frankliniella paucispinosa*, como sus vectores (24). Actualmente esta última especie se denomina *Frankliniella schultzei* (9). En el 2002, se confirmó al GRSV como el nuevo agente

® Datos extraídos del trabajo de Tesis Doctoral de la primera autora: *Relevamiento y evaluación de la variabilidad de Tospovirus en cultivos comerciales y malezas más comunes de Tucumán, Argentina.2008.*