

Causa de la aparición de la mancha verde en el tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Danneys Armario Aragón (1), Sinesio Torres García (2), Oguelis Rodríguez (3) y Angel Mollineda Trujillo (2)

(1) Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara.

(2) Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara.

(3) Empresa Tabacalera “La Estrella”.

RESUMEN. Esta investigación se efectuó en áreas de la Cooperativa de Créditos y Servicios “El Vaquerito” del municipio de Santa Clara, de enero a junio de 2002. Se utilizó la variedad de tabaco Habana 2000 plantada sobre un suelo pardo con carbonatos. Las plantas fueron subdivididas en tres estratos foliares, inferior (Libre pie y Uno y medio), medio (1^{er} y 2^{do} Centros Ligeros) y superior (1^{er} y 2^{do} Centros Finos). Se realizaron dos tratamientos, con aplicaciones del fungicida (Mancozeb-80 %), bajo el programa establecido por el MINAGRI (1999), y sin aplicación del producto químico (testigo). Se determinó el número de hojas con mancha verde y la concentración de Mn, Zn, Cu, Fe y Mg de las hojas. Los resultados muestran que con el empleo del Mancozeb apareció la mancha, con mayor incidencia en los estratos medio e inferior. Los elementos que componen el Mancozeb-80 % (Mn y Zn), en altas concentraciones sobre la hoja, son los causantes de la enfermedad, que consiste en la conversión de clorofila-Mg en Clorofilina-Mn por sustitución del átomo de Mg central de dicha molécula, lo que hace que la nueva clorofila no pueda ser degradada por las clorofilasas, con lo cual la hoja seca de color verde. La aparición de la mancha verde se observó solamente en aquellas zonas del limbo foliar donde las concentraciones de este elemento (Mn) sobrepasaron los 5,9 mg/g de masa seca.

Palabras clave: Mancha verde, tabaco, manganeso, cinc, Mancozeb, clorofilina.

ABSTRACT. This research was carried out in the Cooperative of Credits and Services “El Vaquerito” from Santa Clara municipality during January to June 2004. The tobacco variety “Havana 2000” was planted on a Carbonated Brown Soil. Plants were sub-divided into three foliar strata: inferior (free foot, and one and a half), medium (1st and 2nd light centers) and superior (1st and 2nd thin centers). Two treatments were followed: (1) application of fungicide (Mancozeb-80 %) under the program established by Plant Health Institute and (2) without applying chemicals (control). The number of leaves with green spots and concentration of Mn, Zn, Cu, Fe and Mg of leaves were determined. When chemicals were used, spots appeared with greater incidence in medium and inferior strata. The elements composing “Mancozeb-80 %” (Mn and Zn) in high concentrations over leaves are causing agents of the disease which consists of chlorophyll-Mg conversion in chlorophyllin-Mn or Zn as substitution of the central Mg atom from such molecule and so, the new chlorophyll can not be degraded by chlorophyllase enzymes, and leaves become dry with green color. Green spots were only observed in parts of the leaf limb where Mn concentrations exceeded 5, 9 mg/g of dry weight.

Key words: Green spot, tobacco, manganese, zinc, Mancozeb, chlorophylline.

INTRODUCCIÓN

La mancha verde es conocida en varias partes del mundo, desde décadas atrás, como “Bassara”, “Verdaramé”, “Aladja”, “Balkir”, “Enfermedad del Cobre” y “Escritura Armenia” (Mickovski, 1962; citado por Lucas, 1969) y puede llegar a dañar hasta un 30 % de las hojas aptas para capa de tabaco torcido con pérdidas millonarias a nivel nacional. El origen puede relacionarse con varias causas, y la principal se vincula directamente con alguna consecuencia

fisiológica desconocida (Lucas, 1969; Akehurst, 1973).

Según la hipótesis de este trabajo, es una posible sustitución del magnesio (Mg) por el manganeso (Mn) o cinc (Zn), en la molécula de clorofila. Esta se basa en los hechos de que ya Pequeño (1964) refería que los protones de hidrógeno sustituyen al Mg para la formación de feofitina y que cuando se añaden Cu y Zn en forma de acetatos a una solución de clorofila y se calienta, esta toma nuevamente su color verde, aunque

un poco más azulado que el verde natural de la molécula, lo que se debe a la formación de clorofilas con Cu o Zn. Por otra parte el manganeso (Mn) puede sustituir parcialmente al magnesio (Mg) en su papel de activador de algunos sistemas enzimáticos de las reacciones de la respiración, del metabolismo de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y de los glúcidos en las cuales participa el Mg (Devlin, 1970). Igualmente, se ha observado que el Zn puede sustituir al magnesio en sistemas octaédricos de los minerales arcillosos (Chapman, 1972). Por otra parte, existe la hipótesis del cambio de las propiedades de la enzima Rubisco, donde es posible con adición de manganeso (Mn) ocasionar el reemplazo del magnesio (Mg) de dicha enzima por el manganeso (Mn), formando la Rubisco-Mn con lo cual tiene una mayor proporción de actividad oxigenasa que carboxilasa (Jordan y Ogren, 1981). Esta hipótesis también se basa en los hechos de que el Mn aparece en los silicatos de hierro (Fe) o magnesio (Mg) como un sustituto menor del Fe o Mg en arcillas (Krauskopf, 1983).

Además, los excesos de Mn provocan, aparte de la mancha verde, la declinación de la fotosíntesis por el daño peroxidativo de la membrana del tilacoide que repercute sobre la actividad fotoquímica de los fotosistemas I y II de los cloroplastos; decrecimiento de la actividad de las enzimas fotosintéticas por los productos de la polifenoxidación (Kitao y otros, 1997); disminución en la actividad de carboxilación de la ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Kitao y otros, 1998), observados en hojas de plantas de trigo y tabaco, con la aplicación de alta concentración de manganeso (Mn). El Mn está preferiblemente acumulado en las áreas marginales de la hoja. La concentración de Mn es mayor en áreas marginales que en áreas intervenales, adyacentes a las venas, y en las venas, donde menos se acumula; además, la concentración de Mn se incrementa desde las hojas jóvenes hacia las viejas (Kitao y otros, 2001)

Las clorofilas sustituidas, conocidas actualmente como clorofilinas (CFL), son derivados de la clorofila en las cuales el magnesio es reemplazado por otros metales como el cobre, el zinc, el cobalto

o el hierro de forma natural (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2005).

El objetivo de este trabajo fue demostrar que la aparición de la mancha verde está relacionada con las aplicaciones excesivas de manganeso como resultado de repetidas fumigaciones con el fungicida Mancozeb

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se efectuó en la Cooperativa de Créditos y Servicios "El Vaquerito", del municipio de Santa Clara, de enero a junio de 2002. Para el montaje del experimento se empleó un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, sobre un suelo pardo con carbonatos de pH 7,2, según Hernández y otros (1995). Se hizo la aplicación de Mancozeb-80 % a 2,5 kg/ha según MINAGRI (1999) y sin aplicarlo (testigo), con cuatro parcelas de 2,70 x 2,80 m (7,56 m²) cada una y que contaron con tres surcos de ocho plantas. Se evaluaron seis plantas del surco central de cada parcela. Se utilizó la variedad de tabaco Habana 2000 y se evaluaron hojas de cada estrato foliar, inferior (Libre Pie y Uno y Medio), medio (1^{er} y 2^{do} Centros Ligeros) y superior (1^{er} y 2^{do} Centros Finos). Se determinó el número de hojas con al menos una mancha verde, por estrato foliar.

Se realizó la cocción de hojas de las plantas tratadas con el fungicida, y no tratadas (testigo) a 100 °C, para de esta forma lograr la ruptura de las membranas y facilitar la sustitución del Mg de la clorofila por protones H⁺ (proveniente de la ionización de los ácidos orgánicos de la vacuola) y convertirla en feofitina de color pardo, según técnicas de Pequeño (1964).

Se determinó el pH del jugo vacuolar, extraído de las hojas verdes calentadas, con un conductímetro-pH metro INOLAB, Level 1, de fabricación alemana.

Se realizó el análisis de la concentración de elementos minerales (Mn, Zn, Fe, Cu y Mg) de zonas del limbo con y sin manchas (de hojas tratadas no manchadas de hojas no tratadas), separadas en cuatro grados según apreciación visual

de las tonalidades del color: Grado 0 (Sin mancha), Grado 1 (Manchado claro), Grado 2 (Manchado medio), Grado 3 (Manchado fuerte) de hojas tratadas y zonas no manchadas de hojas no tratadas. Dicho análisis se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica SP-9 Pyeunican inglés. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple (completamente al azar) y una prueba de significación según Duncan (1955).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aprecia que con el empleo del fungicida (Mancozeb), según la estrategia fitosanitaria propuesta por Sanidad Vegetal para el cultivo, aparecen hojas afectadas por la mancha, con la mayor incidencia sobre los estratos medio e inferior (tabla 1). Sin embargo, el tratamiento donde no se empleó este producto no mostró hojas afectadas en ninguno de los estratos evaluados. Se prueba con este experimento que la causa de la mancha es el fungicida Mancozeb, que con varias aplicaciones sobre las hojas, puede elevar la concentración de manganeso a niveles tóxicos para la planta.

Tabla 1. Número de hojas afectadas por mancha verde por efecto de la aplicación de Mancozeb (12 hojas evaluadas por cada estrato)

Tratamiento	Estratos foliares			ES
	Inferior	Medio	Superior	
Mancozeb	6,50 b (54,16 %)	6,00 b (50 %)	3,50 a (29,16 %)	± 0,40
Sin aplicación	0	0	0	---

Las letras diferentes indican que hay diferencia significativa entre los estratos de la misma variedad ($P < 0,05$).

La concentración endógena de Mn, de las hojas tratadas con el fungicida Mancozeb, estuvo por encima de los niveles que causan toxicidad en esta especie, que según Nable y otros (1988) es de 5 mg/g de peso seco, como se muestra en la tabla 2. El efecto del Mn peroxidativo daña las membranas de los cloroplastos y todo el sistema membranoso, con lo cual hace a las células más permeables, incluso, a este propio ión. En aquellas zonas del limbo foliar donde se acumulan el Mn y el Zn, a

altas concentraciones, puede producirse la penetración de dichos iones hasta el interior de los cloroplastos, con la consiguiente sustitución del Mg de la clorofila, dando como resultado una clorofila con Mn o Zn, muy estable, que perdura aún después de que las hojas se secan. Este último aspecto pudo verse claramente cuando se hirvieron hojas tratadas con Mancozeb y no tratadas. Las hojas no tratadas con el fungicida tomaron el color pardo, propio de la transformación de la clorofila a feofitina, por sustitución del Mg central de la molécula por H^+ .

Es importante recordar, que el jugo celular de las hojas de tabaco tuvo un pH ácido que osciló entre 5,04 y 5,08, el que favorece la transformación de la clorofila hacia feofitina, cuando por calentamiento, estrés hídrico o peroxidación de las membranas éstas se hacen permeables a los protones de hidrógeno que pueden migrar de la vacuola al interior del cloroplasto (Vázquez y Torres, 1995; Ortega y Rodes, 1986) y producir dicha transformación.

Las hojas tratadas con Mancozeb o Zineb mantuvieron su color verde, total o parcialmente, una vez que fueron hervidas. Esto prueba que la clorofila con Mn o Zn no puede ser convertida en feofitina por acción de los protones H^+ , como sucede con la clorofila magnésica. Esta es la causa de que la mancha verde perdure en las hojas secas, aún después del curado.

Es común que los botánicos utilicen el principio de la sustitución del Mg de la clorofila por otros iones divalentes como el Cu ó el Zn para conservar el color verde. Por supuesto, esta sustitución se hace en condiciones artificiales con soluciones concentradas de acetato de Zn ó Cu en caliente (Pequeño Pérez, 1964). García-Rodríguez y Altamirano-Lozano (2005) han reportado la presencia de micronutrientes como el Cu, Fe y Co asociados a esta sustitución en condiciones naturales, pero no existe referencia de la presencia del Mn. Sin embargo, dada su mayor variación en el número de valencias, puede trabajar con 2^+ , 3^+ y 4^+ , en dependencia del pH del medio y la alta concentración (más de 5 mg/g de masa seca) observada en los tejidos de las hojas tratadas con

el fungicida, puede ser el sustituto del Mg de la clorofila en condiciones naturales.

El hecho de que la mancha verde aparezca indistintamente en cualquier zona de las hojas, significa que el efecto de la sustitución del Mg por el Mn, solo se da en aquellos puntos donde la concentración de Mn se iguala o sobrepasa al valor de la concentración de Mg contenido en la hoja. Apareció un manchado ligero con 5,9 mg de Mn/g de masa seca de hoja (grado 1), y donde las manchas se hicieron más intensas (color verde más fuerte, grados 2 y 3), las concentraciones de Mn fueron mayores (tabla 2).

En dicho análisis foliar (tabla 2) se pone de manifiesto, además, la interacción antagónica Zn-Cu, pues como se observa las concentraciones de Cu descienden significativamente cuando se incrementa el Zn. Esta interacción ha sido reportada por Karoly (1972), Gómez (1984) y Salosano (1997).

Tabla 2. Concentración de micronutrientes en el limbo foliar de las plantas (mg/g de masa seca) no tratadas con Mancozeb (testigo), tratadas pero sin manchas (0) y tratadas en que aparecieron manchado ligero (1), medio (2) y fuerte (3)

Grados	(Mg)	(Mn)	(Zn)	(Cu)
Testigo	6,20 cb	0,066 a	0,135 a	0,173 c
0	6,23 cb	0,081 a	0,110 a	0,043 b
1	6,40 c	5,900 b	0,346 b	0,038 a
2	5,60 a b	7,650 c	0,369 b	0,036 a
3	5,40 a	9,310 d	0,396 b	0,045 b
ES	± 0,22	± 0,08	± 0,01	± 0,001

Las letras minúsculas iguales indican que no hay diferencia significativa entre los estratos de la misma variedad para $P < 0,05$.

CONCLUSIONES

1. La causa de la mancha verde del tabaco se debe al exceso de Mn que se produce en algunas zonas del limbo foliar donde se acumula el fungicida (portador de Mn) en altas concentraciones.
2. La concentración mínima de Mn para que apareciera la mancha verde fue de 5,9 mg/g de masa seca foliar.

3. La mancha se produce por una sustitución de Mg de la molécula de clorofila por Mn acumulado en alta concentración en los tejidos foliares, producto de una mala distribución del fungicida.
4. El estrato foliar superior (1^{ro} y 2^{do} Centros finos) con cutículas más gruesas es el menos afectado por la mancha verde mientras los estratos medios e inferiores son más afectados.

BIBLIOGRAFÍA

Akehurst, B. C. (1973): *El Tabaco. Agricultura tropical*. Editorial Ciencia y Técnica, La Habana.

Chapman, H. D. (1972): *Métodos de análisis para suelos, plantas y agua*. Editorial Trilla, México.

Devlin, R. M. (1970): *Fisiología Vegetal*. Edit. Omega, Barcelona, España.

Duncan, D. B. (1955). "Multiple range and multiple F", *Tests Biometrics* 11:1-42.

García-Rodríguez, M. C. y M. Altamirano-Lozano (2005): Sales de sodio y cobre de la clorofila: usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígena, en:

www.zaragoza.unam.mx/depi/revistatip/autores/abc.htm

Gómez López J. A. (1984): El Zinc. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Colombia, Palmaria.

Hernández, A.; J. M. Pérez Jiménez y J. D. Bosch (1995): Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos, Ciudad de La Habana.

Jordan, D.B. & Ogren, W.L. (1981): "A sensitive assay procedure for simultaneous determination of Ribulose-1, 5 bisphosphate carboxylase and oxygenase activities". *Plant Physiol.* 67:237-245.

Karoly S. (1972); *Microelementos en los principales suelos tropicales cubanos y sus problemas de utilización*. Dirección Nacional de Suelos y Fertilizantes, INRA, La Habana, 102 pp.

Kitao, M.; T. T. Lei and T. Kioke (1997): "Comparison of photosynthetic responses to manganese toxicity of deciduous Broad-Leaved trees in Northern Japan". *Environmental Pollution* 197(1-2): 113-118.

_____ (1998): "Application of chlorophyll fluorescence to evaluate Mn tolerance of deciduous broad-leaved tree seedlings native to northern Japan". *Tree Physiology* 18: 135-140.

_____ (1997): "Effects of manganese toxicity on photosynthesis of white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) seedlings". *Physiol.Plant.* 101:249-256.

Kitao, M.; T. T. Lei; T. Nacamura and T. Koike (2001): "Manganese toxicity as indicated by visible foliar symptoms of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japónica*)". *Environmental Pollution* 111: 89-94.

Kraukopf, K. B. (1983): Geología de los microelementos, en Mortvedt y otros (eds.) *Micronutrientes en Agricultura*, Editorial AGT S.A., México, pp. 7-39.

Lucas, G. B. (1969): *Enfermedades del tabaco*. Edición Revolucionaria, La Habana.

MINAGRI (1999): Programa de defensa del cultivo del tabaco. Centro Nacional de Sanidad Vegetal, Ciudad de la Habana.

Nable, R. O.; R. L. Houtz and G. M. Cheniae (1988): "Early inhibition of photosynthesis during development of Mn toxicity in tobacco". *Plant Physiol.* 86: 1136-1142.

Ortega Delgado, E. y Rosa Rodes García (1986): *Manual de Prácticas de Laboratorio de Fisiología Vegetal*. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de La Habana.

Pérez Pequeño (1964): *Prácticas de Fisiología Vegetal*. Ediciones del Consejo Nacional de la Universidad, La Habana, 132 pp.

Solosano, P. R. (1997): "Fertilidad de los suelos, su manejo en la producción agrícola". *Revista Facultad de Agrícolas Rearycay Alcace* 51:157-170. 1997.

Vázquez, Edith y S. Torres (1995): *Fisiología Vegetal*. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de La Habana.