

Etiología del falso Orobanche en el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en la región central de Cuba

Etiology of the false Broomrape in the tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in the central region of Cuba

Yunior Miguel Morán Gómez¹, Norma Elena Ávila Fernández², Noyma González Morejón¹, Matilde Sotomayor Pérez¹

1. Instituto de Investigaciones del Tabaco. yunior.moran@iitabaco.co.cu

2. Facultad de Biología. Universidad de la Habana.

RESUMEN. El falso Orobanche es una enfermedad que afecta al tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Su incidencia en las provincias centrales del país se ha incrementado. Los síntomas se manifiestan como tumoraciones en las raíces acompañados o no de enanismo y raquitismo. Un elemento que impide su control es que se desconoce a su agente causal. La etiología pudiera ser de naturaleza biótica o abiótica. El objetivo de este trabajo fue determinar la naturaleza de la etiología del falso Orobanche que afecta a las vegas tabacaleras de las provincias centrales del país. Se realizó un experimento para establecer la presencia del agente causal en el suelo de las zonas tabacaleras afectadas y determinar su naturaleza, donde se empleó un suelo rizosférico de plantas de tabaco afectadas. Se realizaron tres tratamientos: suelo esterilizado, plantado con tabaco a 30 °C, y dos tratamientos de suelo no estéril plantados con tabaco a 30 °C y otro a 18 °C. Estos ensayos se complementaron con un estudio histológico comparativo de las raíces de plantas sanas y enfermas. Se obtuvo que solo las plantas sembradas en suelo no estéril mantenidas a 30 °C manifestaron la enfermedad. El estudio histológico reveló que el agente actúa en sitios específicos de la raíz. El falso Orobanche es causado por un agente biótico que vive en el suelo de las vegas tabacaleras donde se manifiesta la enfermedad.

Palabras clave: Falso Orobanche, histología, raíz, tabaco.

ABSTRACT. False Broomrape, which is a disease affecting tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.), is increasing its incidence to the central provinces of the country. The symptoms are expressed by root-tumours that can be accompanied or not by plant stunting and dwarfing. An element hindering the control of this disorder is due to its causal agent is still unidentified. The aetiology nature could be biotic or abiotic. The aim of this work was to determine the aetiology nature of false Broomrape disease that affects tobacco plantations in the central provinces of the country. An experiment was carried out to establish the presence of the causal agent on the tobacco plantation soils affected and to determine its biotic or abiotic nature. The rhizospheric soil of the tobacco plants affected was used in the three treatments of this experiment. One treatment was based on sterilizing the soil and keeping plants at 30°C. Some plants were sown on no sterilized soil, one group kept at 30°C and the other at 18°C, being the other two treatments. These tests were complemented with a comparative histological study of the radical systems of healthy and sick plants. Only the plants sown on no sterilized soil and kept at 30 °C developed the disease. The histological study revealed that the agent acts at specific root sites. It has been concluded that false Broomrape is caused by a biotic agent living on tobacco plantation soils where the disease is present.

Key words: False Broomrape, histology, root, tobacco.

INTRODUCCIÓN

Un gran número de patologías han sido descritas para el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y son bien conocidos y caracterizados los agentes causales de varias de ellas. Sin embargo, para otras patologías como la denominada falso Orobanche se desconocen los elementos epifitológicos involucrados en su manifestación, por lo que no

existen medidas de control ni tratamiento para enfrentar los daños que ocasionan. Esta afecta a las vegas tabacaleras de Cuba (Méndez y Herrera, 1991; CNSV, 2001; Espino, 2006). Este trastorno se presenta como tumoraciones o excrecencias de masas blanquecinas jugosas a nivel de las raíces de las plantas, que pueden tener brotes por encima de la superficie del suelo y llegar a desarrollar clorofila, por lo que comúnmente se confunde con los síntomas

causados por la planta parásita *Orobanche ramosa* L. Puede afectar el desarrollo normal de las plantas y provocar enanismo y raquitismo. (Lucas, 1965)

Actualmente esta enfermedad constituye un notable problema para el tabaco y la incidencia de la afectación a las cosechas ha ido en incremento y provoca pérdidas económicas considerables para la industria tabacalera. No existe un consenso dentro de la comunidad científica referido a la naturaleza de la etiología de este trastorno, y se especula sobre una posible causa biótica, abiótica o la combinación de ambas. (Hamilton *et al.*, 1972; Shew y Lucas, 1991)

Se ha comprobado que la morfogénesis de los tejidos en plantas de tabaco está relacionada con las concentraciones de citoquininas y auxinas presentes en el medio (Skoog y Miller, 1957). Un desequilibrio hormonal que origine altas concentraciones de citoquininas-auxinas promueve la aparición de rebrotes en las plantas y esto puede ser inducido por diferentes elementos. Dentro de ellos se encuentran las prácticas fitotécnicas, dirigidas a eliminar las yemas apical y axilares; así como otros agentes bióticos con la capacidad de alterar las concentraciones normales de fitohormonas en las plantas que infectan (Skok, 1967; Hamilton *et al.*, 1972). Las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* (Furuya, 2004), *Rhodococcus fascians* (Vereecke *et al.*, 2000), los fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000, Klingaman, 2001) y los nemátodos de las agallas (*Meloidogyne* spp.) (Shew y Lucas, 1991) son los principales candidatos dentro de los agentes bióticos. Algunos experimentos humedeciendo plantas sanas con extractos de tejido radical de tabaco afectados con Falso Orobanche o realizando injertos de tejidos tumorales en raíces de plantas sanas lograron reproducir la sintomatología característica (Newman y Toler, 1970; Arcia y Suárez, 1974). Más específicamente, Nielsen, en 1978, refirió que el agente estudiado posee características similares a las de algunas bacterias fitopatógenas ya que sedimenta a 48 000 g por 20 min.; es retenido en un filtro de 0,45 µm; es inactivado con cloroformo y es insensible al sulfato de estreptomycin. Debido a ello el objetivo de este trabajo fue determinar la etiología del falso Orobanche que afecta a las vegas tabacaleras de las provincias centrales del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

La toma de muestras se realizó en el mes de marzo de 2006 en vegas tabacaleras del poblado de Tamarindo, municipio, Florencia, provincia de Ciego de Ávila. Las vegas con suelo pardo sin carbonatos se plantaron con la variedad 'Habana 92' en noviembre de 2005. Alrededor del 50 % de las plantas de la vega presentaban abundantes tumores en la raíz y síntomas de raquitismo y enanismo. Se tomaron cinco muestras de 1 kg de suelo rizosférico de plantas de tabaco que presentaban la sintomatología descrita para el falso orobanche.

Se mezcló el suelo de todas las muestras y se distribuyó en dos bolsas de tela. Una de ellas fue esterilizada en autoclave a 121 °C durante 45 minutos a 1 atmósfera y la otra se mantuvo a temperatura ambiente.

Con el suelo estéril se rellenaron tres macetas plásticas y con el suelo no estéril se rellenaron seis macetas. En cada maceta se plantaron cuatro plántulas de la variedad susceptible 'Habana 92', para un total de 12, obtenidas en un semillero en bandeja flotante con sustrato estéril.

Para el suelo no estéril se rellenaron 6 macetas, cada una con 4 plántulas, tres macetas se mantuvieron a 30 °C en un cuarto con ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, al igual que el tratamiento con el sustrato estéril, y tres se mantuvieron por igual período de tiempo con iguales ciclos de iluminación a una temperatura de 18 °C.

A los 45 días de sembradas se lavaron las raíces y se evaluaron en busca de la manifestación de los síntomas.

Para el estudio histológico se emplearon plantas de tabaco de la variedad 'Habana 92' de 45 días de trasplantadas, con tumores y sanas. Se realizaron cortes transversales en el órgano de la raíz empleando un micrótopo de congelación con nitrógeno líquido. En el caso de las raíces con tumores, se realizaron cortes seriados por encima del tumor, en la zona afectada por el tumor y por debajo del tumor. Todos los cortes se sometieron a un proceso de fijación en FAA (Formaldehído Alcohol Ácido acético 10%:50%:5% + 35% agua) durante 72 horas. Se realizaron tinciones para

identificar sustancias de reserva y tejidos. Se empleó el lugol para identificar amiloplastos en la corteza radical, el clorhidrato de anilina para destacar fundamentalmente el tejido conductor xilemático y la hematoxilina para la tinción de núcleos en las células tumorales. Todos estos procedimientos se realizaron según el Manual de Prácticas de Laboratorio de Morfología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana (González y otros, 1990).

Las microfotografías se tomaron con una cámara digital acoplada a un microscopio óptico y las imágenes se procesaron mediante el programa Motic Images 2000. Se utilizaron aumentos de distinta magnificación desde 40X hasta 400 X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el suelo no esterilizado que se mantuvo a 30 °C, al cabo de 38 días, en las plantas comenzaron a emerger rebrotes verdes por encima del nivel del suelo a una distancia de 0,5 cm del eje longitudinal del tallo. Cuando se lavó su sistema radical se observó la presencia de tumoraciones y brotes blancos. Las plantas sembradas en suelo esterilizado no presentaron estos síntomas característicos del falso Orobanche (Figura 1), ni las plantas sembradas en el suelo no esterilizado que se mantuvieron a 18 °C.

Este resultado reveló que el proceso de esterilización al que fue sometido el suelo eliminó al agente causal. Si el agente causal fuese de naturaleza abiótica, hubiese persistido en el suelo esterilizado al igual que en el no esterilizado, y las plantas sembradas en el suelo estéril hubieran mostrado los síntomas esperados. Sin embargo, el hecho de obtener tumoraciones y rebrotes solo en las plantas sembradas en el suelo no esterilizado indica la naturaleza biótica del agente etiológico. El tratamiento térmico al que fue sometido el suelo es efectivo para eliminar toda forma de vida, incluso si el agente biótico tuviese estructuras de resistencia como suelen ser las endosporas bacterianas.

La hipótesis de que la agresividad del tratamiento de esterilización empleado pudiera destruir al agente causal abiótico, como del mismo modo elimina toda forma biótica, fue desechada al evaluar las raíces de las plantas sembradas en tierra no estéril y mantenidas a 18 °C, ya que se mostraron asintomáticas durante todo el desarrollo del experimento mientras que sus similares mantenidas a 30 °C sí enfermaron. Con posterioridad al experimento realizado se sembraron nuevas plántulas en el suelo mantenido a 18 °C, pero esta vez se incubaron a 30 °C y al término de 45 días manifestaron síntomas evidentes de la enfermedad. La planta de tabaco tiene una temperatura óptima de desarrollo de alrededor de los 28 °C y al igual

que otras plantas al disminuir la temperatura óptima de desarrollo disminuye el nivel de resistencia a enfermedades producto del estrés al que es sometida (Agrios, 1997). Era de esperar que al disminuir la temperatura hasta 18 °C se incrementaran los síntomas del trastorno si este fuese ocasionado por un factor abiótico, pues la planta sería más susceptible mientras que el componente del suelo implicado en la sintomatología sería más

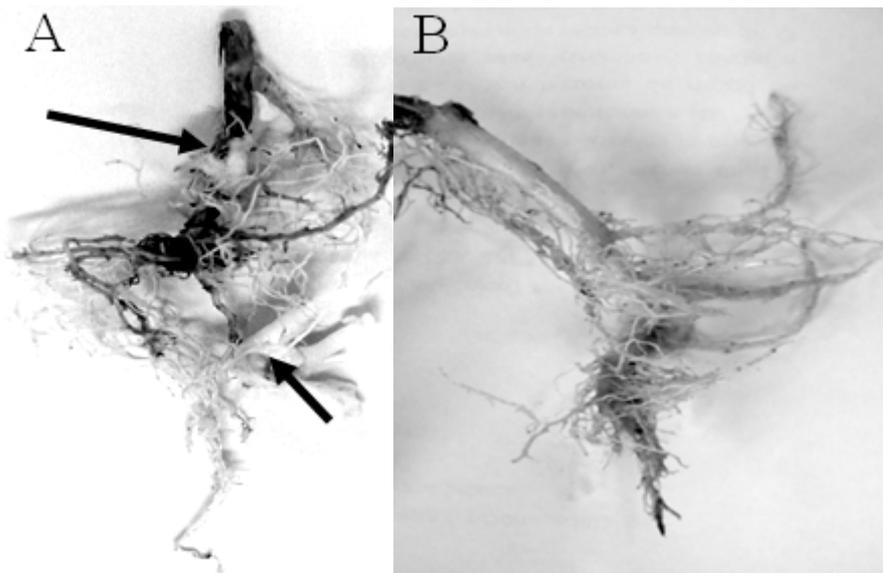


Figura 1. Comparación del desarrollo radical de plantas, de la variedad 'Habana 92' de 45 días de trasplantadas a suelo estéril y no estéril. A: Planta sembrada en suelo no esterilizado. Con flechas se señalan los tumores y los rebrotes que proliferan por debajo del nivel del suelo. B: Planta sembrada en suelo esterilizado, mantenida a 30 °C

estable. El hecho de que ocurriera lo contrario se explica sobre la base de que el agente causal es un elemento biótico cuya temperatura óptima de desarrollo es superior a los 18 °C y la disminución de la temperatura le afecta en mayor medida que a la planta de tabaco.

El examen morfológico del órgano de la raíz de las plantas afectadas mostró que los tumores pueden aparecer tanto en la raíz principal, más gruesa de origen radicular, como en las laterales, secundarias y terciarias de menor grosor. En ambos casos, la mayoría de los tumores se encontraron hacia la porción engrosada con crecimiento secundario, y solo algunos cercanos a los ápices de las mismas. No obstante, los puntos de ramificación o ruptura fueron más susceptibles de ser afectados por tumores indicando un modo de acción localizado del agente causal.

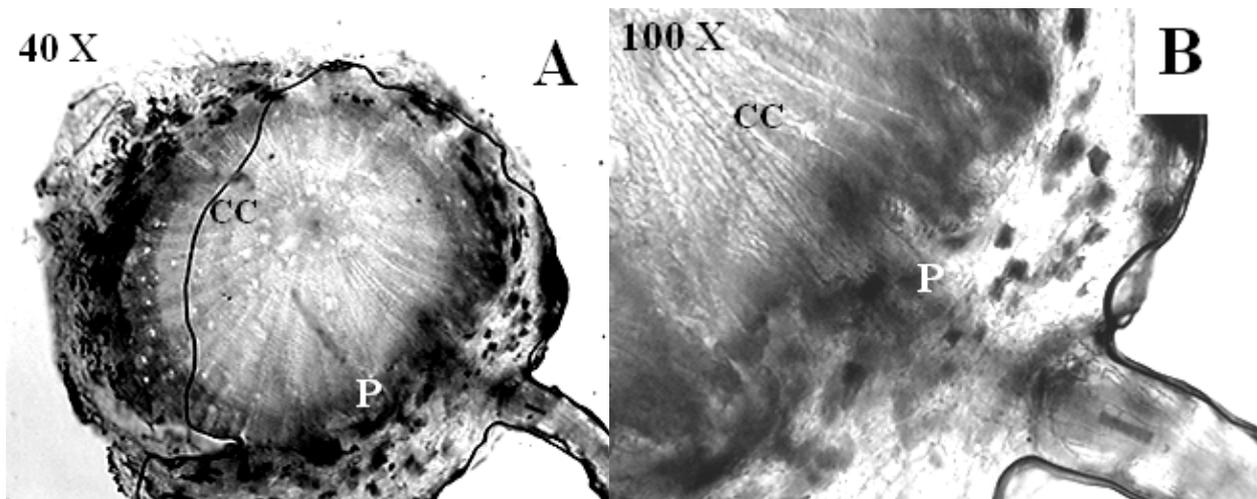
El análisis histológico de la raíz confirmó que el agente causal actúa en zonas localizadas de la misma, ya que por encima y por debajo del tumor la morfología de este órgano se observa de manera similar a la de una planta sana (Figura 2).

En la serie de microfotografías desde A hasta E se describió la afectación que sufre una ramificación secundaria producto de la aparición del tumor en la zona de crecimiento en grosor. La histología de la raíz por encima y por debajo del tumor (Figura 2.

A, B y E), se mostró igual a la de una raíz no afectada (Figura 2. F).

Se observaron, básicamente, dos zonas: el cilindro central (CC) con xilema y floema en distribución concéntrica y la peridermis (P) constituida por felodermis (parénquima cortical secundario), felógeno (meristemo secundario) y como protección el súber. La mayor área la ocupó el xilema, después la felodermis y se observaron de 3 a 4 capas de tejido suberoso. La felodermis presentó plastidios, los cuales no se tiñeron con lugol indicando que no son amiloplastos. En la zona afectada por el tumor (Figura 2. C y D), se observó que los tejidos vasculares perdieron su distribución concéntrica, puesto que se distorsionó el xilema (se indica encerrado en un círculo). Por otra parte, el cilindro central se estrechó en comparación con el observado en la porción de raíz que se encuentra por debajo del tumor. El área del parénquima cortical fue la más afectada puesto que se observó una gran proliferación de sus células (Figura 2. F).

El examen histológico indicó la preferencia del agente causal para actuar en sitios localizados de la raíz similar a como lo hacen algunos microorganismos fitopatógenos, como por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens* causante de la agalla de la corona; *Rhodococcus fascians* causante de la agalla hojosa, y los nemátodos de las agallas de las raíces (*Meloidogyne* spp.). (Shew y Lucas, 1991)



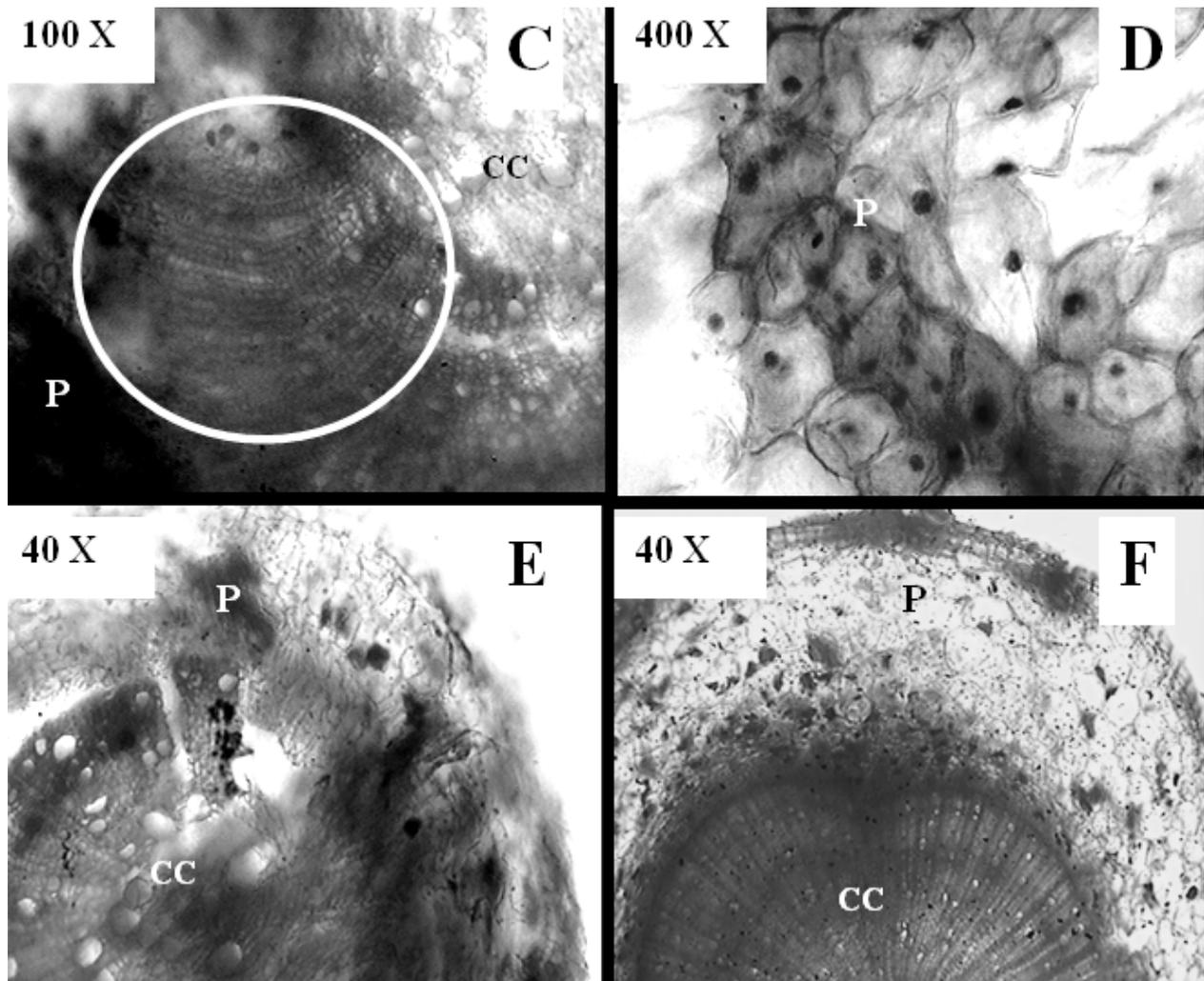


Figura 2. Cortes histológicos de raíces de tabaco sanas y con presencia de tumores. Las microfotografías se tomaron a 40X, 100X y 400X de magnificación. A - E: Raíz con tumores; F: Raíz de planta sana. A y B (pagina anterior): cortes por encima del tumor; C y D: cortes en el tumor y E: corte por debajo del tumor. CC: Cilindro Central; P: Peridermis

CONCLUSIONES

1. El Falso Orobanché que afecta a las vegas tabacaleras de las provincias centrales del país es causado por un agente biótico que vive en el suelo.
2. Este agente no origina síntomas en tabaco cuando la temperatura ambiente es inferior a 18 °C.
3. Este agente actúa sobre sitios específicos de la raíz de la planta de tabaco.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arcia A. y Y. Suárez: "Falsa escobilla del tabaco," *Agronomía Tropical* 24 (5): 391-397, 1974.
2. Agrios, G.: *Plant Pathology*, 4th ed., Academic

Press, San Diego, 1997

3. CNSV: Programa de defensa, Cultivo del tabaco, CNSV, MINAG, Cuba, 2001.
4. Espino, E.: *Manual práctico el supervisor agrícola del tabaco*, segunda edición, p. 55. Agrinfor, MINAG, La Habana, Cuba, 2006.
5. Furuya, N.; F. Shimokusuzono et al.: "Crown gall of tobacco caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 in tobacco fields," *J Gen Plant Pathol.* 70 (1) 39-44, 2004.
6. González, S.; A. Pérez *et al.*: Manual de Prácticas de Laboratorio de Morfología Vegetal, MES, p. 111, 1990.
7. Hamilton, J.; R. Lowe et al.: False Broomrape: "A Physiological Disorder Caused by Growth-Regulator

Imbalance,” *Plant Physiol.* 50, 303-304, 1972.

8. Klingaman, G.: Poinsettia. Looking a lot like christmas. *The Morning News 3C*. P. 1, 2001.

9. Lee, I-M.; R. Davis *et al.*: “Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes,” *Annu. Rev. Microbiol.* 54:221-55, 2000.

10. Lucas, G.: *Diseases of Tobacco*, 2. ed., The Scarecrow Press, Inc., New York and London, p. 778, 1965.

11. Méndez, R. y L. Herrera: “Falso Orobanche en áreas tabacaleras de la provincia de Villa Clara,” *Centro Agrícola* 18 (2): 79-80, 1991.

12. Newman, M. and R. Toler: “Characteristics of false broomrape disease and properties of the etiological agent,” *Phytopath.* 60:1305-1306, 1970.

13. Nielsen, L.: Some properties of the false broomrape causal agent and its persistence in soil and refrigerated and frozen tumour tissues. *Phytopath* 68(7): 1068-1070, 1978.

14. Shew, H. and G. Lucas: *Compendium of tobacco diseases*, APS. Press, St. Paul, MN, 1991.

15. Skok J.: “Tumor and Teratoma Induction in Tobacco Plants by Debudding,” *Plant Physiol.* Jun 42 (6):767-773, 1967.

16. Skoog, F. and C. Miller: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro,” *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131, 1957.

17. Vereecke, D. and S. Burssens: “The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications,” *Planta.* 210:241-251, 2000.

Recibido: 24/Enero/2008

Aceptado: 14/Marzo/2008