

Universidad de Matanzas
"CAMILO CIENFUEGOS"
Facultad de Agronomía



Maestría en Ciencias Agrícolas

Tesis de Maestría

- **Título:** *Densidad de inóculo y caracterización patogénica de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan en el cultivo del tabaco del municipio de Pedro Betancourt, provincia de Matanzas.*

Autora: Ing. Lilia María Bon Sosa.

Tutora: Lic. Verónica Toledo, Dra. C.

Matanzas

2011

Pensamiento

“El tabaco de Cuba no es el primero en el mundo en cuanto a cantidad, pero lo es en calidad”.

Juan Tomas Roig.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Tribunal

Tribunal

Tribunal

Tribunal

Evaluación

DECLARACIÓN DE AUTORIDAD

Declaro que yo, Lilia María Bon Sosa, soy la única autora de este Trabajo, por lo que autorizo a la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” a hacer uso del mismo con la finalidad que estime conveniente.

Lilia María Bon Sosa.

DEDICATORIA

A todas las personas que me quieren bien.

AGRADECIMIENTOS

- A la profesora Luz María Samaniego.
- A la investigadora Verónica Toledo Sampedro.

Sin ellas no lo hubiera logrado.

- A la Revolución que me abrió dos veces las puertas de la Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos".
- A los profesores de la Facultad de Agronomía, fue un placer reencontrarlos.
- A los trabajadores del Instituto de Investigaciones de Tabaco y de la Empresa de Acopio y beneficio de tabaco Matanzas, por su empeño.
- A mis amigos, compañeros de trabajo, vecinos y familiares, miembros activos del grupo apoyo.

A todos: Muchísimas Gracias.

OPINIÓN DEL TUTOR

En Cuba el cultivo del tabaco representa una de las principales fuentes de ingresos en divisas por lo que requiere de una atención priorizada, no sólo para lograr altos rendimientos, sino para mantener la exquisita calidad y fama que lo distingue en el mundo. La enfermedad pata prieta, causada por el patógeno del suelo *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, constituye una de las principales mermas de importancia económica del cultivo. El municipio de Pedro Betancourt, ubicado en la provincia de Matanzas, no está exento de esta problemática. Con el objetivo de trazar alternativas de manejo para disminuir los daños que ocasiona este patógeno, se determinaron las causas de la alta incidencia de la enfermedad pata prieta en las áreas tabacaleras de este municipio.

En este contexto, el trabajo realizado por la Ing. Lilia María Bon Sosa incorpora metodologías en la práctica productiva: El cálculo de la densidad de inóculo y la determinación de las razas y grupos patogénicos de *P. nicotianae* son herramientas novedosas para la selección adecuada de los suelos tabacaleros y para alternativas fitosanitarias de manejo de la enfermedad más racionales y dirigidas. De aquí la actualidad e importancia de este trabajo en los momentos en que el país exige un uso más racional de los suelos y reorganiza su agricultura.

Es de destacar la dedicación que la estudiante mostró en la elaboración del trabajo de tesis y sobre todo, la independencia con que trabajó en la redacción del documento final, así como la responsabilidad asumida durante toda la etapa del montaje y conducción de los experimentos.

Considero que el trabajo realizado, así como los resultados obtenidos y todo lo expuesto en la tesis que se defiende, son merecedores del otorgamiento del Título de Máster en Ciencias Agrícolas.

Tutora: Dra. Verónica Toledo Sampedro

RESUMEN

En Cuba, las principales mermas de importancia económica en el cultivo del tabaco son ocasionadas por la enfermedad pata prieta, causada por el patógeno del suelo *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. El municipio de Pedro Betancourt, ubicado en la provincia de Matanzas, no está exento de esta problemática. Con el propósito de determinar las posibles causas de la alta incidencia de esta enfermedad en las áreas tabacaleras de dicho municipio, se identificó y estableció una colección de aislamientos de *P. nicotianae* proveniente de los principales suelos tabacaleros, se calculó la densidad de inóculo de este patógeno en los suelos y se realizó la identificación de razas y la caracterización patogénica de los aislamientos de la raza 0 del patógeno. En todos los suelos monitoreados (27) se identificó el patógeno, lo cual demuestra su alta distribución en el municipio. El 72% de los suelos mostró niveles de inóculo calificados entre medio y alto, en los cuales, las mayores afectaciones de pata prieta se produjeron donde las densidades de inóculo resultaron más altas. Las razas 1, 3 y 4 de *P. nicotianae* no se identificaron entre los aislamientos caracterizados. Los mayores porcentajes de aislamientos de la raza 0 (55,6 y 29,6 %) coincidieron con los grupos de alta e intermedia patogenicidad. La no rotación de cultivo, la alta densidad de inóculo y el gran porcentaje de aislamientos de alta patogenicidad de la raza 0 de *P. nicotianae* son factores que, conjuntamente con estrategias varietales inapropiadas, favorecen la alta incidencia de la enfermedad pata prieta en el municipio Pedro Betancourt de la provincia de Matanzas.

ÍNDICE

1.	Introducción.	1
2.	Problema.	3
3.	Hipótesis.	4
4.	Objetivos.	5
5.	Revisión Bibliográfica.	6
5.1	El tabaco. Generalidades.	6
5.2	Distribución geográfica de una de las principales plagas que lo afectan: la pata prieta.	6
5.3	Ubicación taxonómica del agente causal de la pata prieta.	7
5.4	Síntomas de la enfermedad pata prieta en el tabaco.	8
5.5	Condiciones que propician la aparición y diseminación del patógeno.	9
5.6	Sobrevivencia, detección y cuantificación de los propágulos en el suelo.	10
5.6.1	Detección de los propágulos.	10
5.7	Razas y variabilidad patogénica de <i>Phytophthora nicotianae</i> Breda de Haan.	11
5.8	Distribución de las razas del patógeno en el mundo.	12
5.9	Razas del patógeno en Cuba.	13
5.10	Alternativas de manejo de la enfermedad pata prieta.	14
5.10.1	Medidas agrotécnicas contra la enfermedad.	14
5.10.1.1	Selección del terreno.	15
5.10.1.2	Preparación de suelo, materia orgánica y nutrición.	15
5.10.1.3	Estrategia varietal.	17
5.10.1.4	Época de plantación.	18
5.10.1.5	Rotación de cultivos.	18
5.10.1.6	Selección negativa.	19
5.10.2	Medidas biológicas.	19
5.10.2.1	Criterios generales para la aplicación de Medios biológicos.	19
5.10.2.2	Desinfección de posturas.	20
5.10.2.3	Colonización con <i>Trichoderma</i> .	21
5.10.3	Medidas químicas.	21
5.10.4	Otras medidas.	21
6.	Materiales y Métodos.	23
6.1	Obtención e identificación de los aislamientos de <i>P. nicotianae</i> en las zonas tabacaleras del municipio Pedro Betancourt.	23
6.2	Determinación de la densidad de inóculo de <i>P. nicotianae</i> en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt.	24
6.3	Identificación de las razas de <i>P. nicotianae</i> en el municipio Pedro Betancourt.	25
6.4	Identificación de los grupos patogénicos de la raza 0 de <i>P. nicotianae</i> en el municipio Pedro Betancourt.	27
7.	Resultados y Discusión.	29

7.1	Obtención e identificación de los aislamientos de <i>P. nicotianae</i> en las zonas tabacaleras del municipio Pedro Betancourt.	29
7.2	Determinación de la densidad de inóculo de <i>P. nicotianae</i> en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt.	31
7.3	Identificación de las razas de <i>P. nicotianae</i> en el municipio Pedro Betancourt.	33
7.4	Identificación de los grupos patogénicos de la raza 0 de <i>P. nicotianae</i> en el municipio Pedro Betancourt.	36
7.5	Posibles causas de la alta incidencia de la enfermedad pata prieta en las áreas tabacaleras del municipio de Pedro Betancourt, provincia de Matanzas.	39
8.	Conclusiones.	45
9.	Recomendaciones.	46
10.	Referencias Bibliográficas.	
11.	Anexos.	

1. INTRODUCCIÓN

La cultura del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en nuestro país proviene de muchos siglos atrás. Cuando Cristóbal Colón llegó al continente Americano en 1492, observó que los indígenas del Caribe fumaban hojas de tabaco enrolladas o valiéndose de una caña o tubo llamado Tobago. Desde la época de los indígenas y hasta la fecha, Cuba ha continuado cultivando, cosechando y comercializando esta solanácea hasta lograr imponerla a nivel mundial por sus cualidades. Este cultivo constituye una de las principales fuentes de ingreso en divisas de nuestro país, por lo que es de vital importancia cumplir con los compromisos nacionales e internacionales que se adquieren con su comercialización, lo que convierte esta tarea en un constante reto para las Empresas Tabacaleras, que ven disminuidos sus rendimientos por diversos factores, entre ellos el ataque de plagas.

Desde el punto de vista económico, una de las principales mermas de importancia económica para el tabaco la ocasiona la enfermedad pata prieta, causada por el patógeno del suelo *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Este hongo afecta esencialmente las raíces y partes basales del tallo, lo que trae consigo una disminución considerable en los rendimientos. En Cuba, la incidencia de la enfermedad ha aumentado desde la campaña de 1988, con la ocurrencia de brotes epifitóticos significativos. En la campaña tabacalera de 2007, el principal problema fitosanitario lo constituyó esta enfermedad, con afectaciones del 46 % del área total sembrada. La siembra de variedades resistentes es la práctica más utilizada y generalizada para mitigar las afectaciones de *P. nicotianae* en la fase de plantación. Aunque todas las variedades de tabaco que se cultivan en Cuba son resistentes a *P. nicotianae*, las mismas no muestran el mismo comportamiento y esto depende del grado de virulencia de los aislamientos del patógeno.

Los estudios de caracterización de la patogenicidad de *P. nicotianae* en el país han demostrado la presencia de aislamientos de la raza 1 en las provincias de Pinar del Río, La Habana, Sancti Spiritus y Ciego de Ávila, además de informarse la presencia de tres grupos patogénicos dentro de la raza 0. Esta problemática ha originado medidas fitosanitarias relacionadas con la Sanidad Vegetal del cultivo,

que incluyen la prohibición de la siembra de tabaco en lugares donde se detecte la raza 1. Debido a la importancia del tabaco, la dirección del país trazó la estrategia de extenderlo a todo lo largo de la isla a finales de la década del 90, por lo que el cultivo retorna a la provincia de Matanzas, municipio Pedro Betancourt, en 1997. En esos momentos, el pueblo lo recibe con beneplácito, pues ésta es una etapa en que los cultivos fundamentales (caña de azúcar, cítricos y otros) estaban muy deteriorados, lo que hace que miles de personas se consagren y trabajen en el cultivo desde la etapa de semillero hasta el beneficio. En la campaña tabacalera 2007-2008, de 107,36 Ha sembradas, se vieron afectadas por pata prieta un total de 89,77 Ha, sin que hasta el momento se conozcan las causas de tan alta incidencia. El uso de metodologías recientemente introducidas en la práctica productiva, como son el cálculo de la densidad de inóculo del patógeno y la determinación de las razas y grupos patogénicos de *P. nicotianae*, son herramientas que facilitarán la caracterización del patógeno en cuanto a la determinación de la alta incidencia de la enfermedad pata prieta en el municipio de Pedro Betancourt, todo lo cual brindará una mejor información para la adecuada selección de los suelos tabacaleros y la estrategia fitosanitaria a utilizar.

2. PROBLEMA

La alta incidencia de la enfermedad pata prieta en áreas tabacaleras del municipio de Pedro Betancourt de la provincia de Matanzas.

3. HIPÓTESIS

La identificación de razas, la caracterización patogénica de los aislamientos de *P. nicotianae* y el cálculo de la densidad de inóculo en los suelos tabacaleros, contribuirán a determinar las posibles causas de la alta incidencia de la enfermedad pata prieta del tabaco en el municipio de Pedro Betancourt, de la provincia de Matanzas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- ★ Determinar las posibles causas de la alta incidencia de la enfermedad pata prieta en las áreas tabacaleras del municipio de Pedro Betancourt, provincia de Matanzas, para trazar nuevas alternativas de manejo que permitan disminuir los daños que ocasiona este patógeno.

4.2 Objetivos Específicos

- Establecer una colección de aislamientos de *P. nicotianae* proveniente de los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt.
- Determinar la densidad de inóculo de *P. nicotianae* en los suelos destinados a la siembra del cultivo del tabaco en el municipio.
- Identificar las razas presentes de *P. nicotianae* en los suelos tabacaleros del municipio.
- Caracterizar la patogenicidad de los aislamientos raza 0 de *P. nicotianae* procedentes de diferentes suelos tabacaleros del municipio Pedro Betancourt.

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1 El tabaco. Generalidades.

El tabaco constituye un importante rubro de negocios en el mundo entero, pues el valor de sus hojas lo han convertido en la hierba más soberana que la tierra ha ofrecido al hombre (Fairholt, 1859). En Cuba, este cultivo requiere de una atención priorizada, no sólo para lograr altos rendimientos, sino también para mantener la exquisita calidad y la fama que lo han distinguido en el mundo por más de 400 años y por representar una de las fuentes más importantes de ingresos en divisas para el país (Espino, 1996). Es una planta anual de la familia *Solanaceae*, cuyas hojas se tuercen para preparar un enrollado que sirve para fumar (Gómez, 2002).

5.2 Distribución geográfica de una de las principales plagas que lo afectan: la pata prieta.

La enfermedad pata prieta, causada por el patógeno *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, fue descrita por primera vez 1896, en semilleros de tabaco en Java. En 1915, se notifica en el Sur de Georgia, en los Estados Unidos y en 1922 se había extendido a todo el distrito tabacalero de la Florida. En 1930, se informa en las áreas de tabaco Flue-Cured y Burley en Carolina del Norte, Tennessee y Kentucky, donde permaneció hasta 1937, fecha en que se le localizó en el condado de Pitt, unas 200 millas más al este, informándose posteriormente en más de 20 países (Lucas, 1975). En Cuba, la enfermedad se observó por primera vez en 1905, pero el agente causal no fue aislado e identificado hasta 1957 (Peñalver y García, 1988). También fue detectada en Honduras y Corea (Nielsen, 1992); en Sudáfrica (Lacourt, 1992) y en Zimbabwe y Australia (Nielsen, 1995). Áreas tabacaleras con grandes afectaciones fueron informadas en Filipinas (Truong, 1996) y en China (Ho y Lu, 1997). En la actualidad, la pata prieta está presente en todos los suelos donde se cultiva tabaco (Sullivan, 2005), por lo que

se considera la enfermedad más destructiva y extendida en las áreas tabacaleras del mundo (Li y Bass, 2006).

5.3 Ubicación taxonómica del agente causal de la pata prieta.

Phytophthora nicotianae Breda de Haan, el organismo causal de la enfermedad pata prieta, se ubica taxonómicamente como sigue:

- ◆ Reino: *Chromista*
- ◆ Phylum: *Oomycota*
- ◆ Clase: *Oomycetes*
- ◆ Orden: *Pythiales*
- ◆ Familia: *Pythiaceae*
- ◆ Género: *Phytophthora*
- ◆ Especie: *P. nicotianae* Breda de Haan (Erwin y Ribeiro, 1996).

Según Martínez *et al.* (2007) el ciclo de este hongo es complejo, con la formación de esporas de varios tipos, algunas asexuales (esporangios y clamidosporas) y otras sexuales (oosporas). Las clamidosporas son esporas durables que se forman en los tejidos muertos y pueden sobrevivir en el suelo durante años, constituyendo el inóculo primario. Bajo condiciones favorables de temperatura, humedad y nutrientes estas clamidosporas germinan para dar lugar a hifas o esporangios que inician la fase asexual del patógeno. De los esporangios se liberan zoosporas que pueden nadar en agua en busca de las raíces de las plantas hospedantes. Una vez en contacto con éstas, forman quistes que luego germinan produciendo una hifa o liberando más zoosporas que difunden posteriormente el patógeno. Las zoosporas infectan las plantas por penetración a través de los pelos radicales o cuando son transportadas a las hojas por salpicaduras de agua, penetrando a través de los estomas, si hay presencia de agua libre. En el caso de que el ambiente sea demasiado seco, los esporangios pueden germinar directamente para producir un tubo germinativo que pueda

penetrar a través de la epidermis. Una vez dentro de los tejidos vegetales, el patógeno desarrolla su micelio, que al final, dará origen a otra generación de esporangios sobre las raíces o las hojas. Bajo condiciones favorables, el hongo tiene un gran potencial reproductivo y el inóculo inicial rápidamente se multiplica a través de repetidos ciclos de esporangios y zoosporas, cada uno de los cuales puede completarse en 48-72 horas.

5.4 Síntomas de la enfermedad pata prieta en el tabaco.

La pata prieta puede atacar a casi toda la planta de tabaco, provocando la obstrucción de los haces conductores, lo que limita el ascenso de las sustancias nutritivas hacia el resto de la planta, afecta el crecimiento de la misma, la calidad de sus hojas y el rendimiento de la cosecha (Lucas, 1965). Según Shew y Lucas (1991) la pata prieta sigue siendo uno de los problemas más serios de las enfermedades producidas por patógenos del suelo.

En plantación pueden identificarse diferentes tipos de síntomas (Fernández, 1998), como son:

1. Afectación en las raíces, que se tornan necróticas. Las plantas se marchitan ligeramente durante el período más caluroso del día, pero se recuperan por la noche. Se observa un desarrollo raquítrico, el sistema radical se destruye y provoca pérdidas considerables en el cultivo.
2. Ataque al tallo. Ocurre cuando hay resistencia en las raíces.
3. Afectación de raíces y tallos. Provoca el marchitamiento rápido de la planta o la caída de las hojas. El patógeno avanza hacia el tallo hasta una altura entre 15-20 cm., la médula se seca, se torna de color pardo y se separa formando discos. Las pérdidas en este caso pueden ser elevadas.
4. Tizón de la hoja. Es frecuente en períodos lluviosos, en los cuales el inóculo presente en el suelo se pone en contacto principalmente con las hojas inferiores de la planta, debido a las salpicaduras del suelo provocadas por la lluvia.

5.5 Condiciones que propician la aparición y diseminación del patógeno.

Smith (1947) informó la propagación del hongo por el viento cuando hay tiempo lluvioso. El hongo de la pata prieta puede invernar en el suelo y sobrevivir varios años sin el tabaco. Apple (1963) comprobó que *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan sobrevive hasta cinco años o más en los suelos sin tabaco. Las plantas infectadas constituyen uno de sus principales medios de propagación. Los propágulos del patógeno se trasladan generalmente por el agua de riego y por el agua de lluvia, desplazando las esporas del hongo por los surcos terrazas y zanjas y desde campos infestados hasta vegas libres de la enfermedad, lagunas de drenaje, arroyos o ríos. Cuando se utiliza agua de estas fuentes contaminadas por el patógeno para regar, ésta puede trasladar el hongo a otras áreas y causar nuevos brotes (Lucas, 1965) plantea además que, cuando la tierra está húmeda, se adhiere a los aperos de labranza, a las patas de animales de campo, a los zapatos de los trabajadores, a las ruedas de los tractores y camiones, etc. y éste puede ser el motivo del paso del hongo de un campo a otro e incluso, a grandes distancias. La siembra continua de tabaco en los campos tradicionales, motiva el incremento del inóculo en el suelo y provoca afectaciones de consideración en el cultivo (Fernández *et al.*, 2002).

El Ministerio de la Agricultura (MINAGRI, 2007) considera que las condiciones que favorecen la enfermedad pata prieta en Cuba son las siguientes:

- Condiciones climáticas (altas temperaturas y abundantes lluvias).
- Existencia de más de un propágulo por gramo de suelo.
- Contaminación de las aguas de riego.
- Empleo de variedades susceptibles.
- Ph del suelo por encima de 6.

Como la enfermedad es causada por un hongo de suelo semiacuático, que se transmite fundamentalmente por el agua de riego o de lluvia, cuando el potencial de inóculo en el suelo es elevado y se presentan temperaturas por encima de los

30° C con abundantes lluvias, ésta puede llegar a provocar pérdidas de un 80% o más en las plantaciones (Espino, 2009).

5.6 Sobrevivencia, detección y cuantificación de los propágulos en el suelo.

Las especies de *Phytophthora* pueden sobrevivir en el suelo en forma de micelio, zoosporas, zoosporangios, quistes, clamidosporas y oosporas. Los propágulos más resistentes son las clamidosporas, que están adaptadas para la sobrevivencia por sus gruesas paredes y por su tolerancia al potencial mínimo de agua y las oosporas, que son esencialmente latentes (Tsao, 1983). La sobrevivencia de las clamidosporas en el suelo es, al parecer, similar a la de las zoosporas enquistadas y a la de las oosporas de *Phytophthora* y su función es mantener la población del patógeno bajo factores ambientales adversos (Weste, 1983).

La detección y el aislamiento de las especies de *Phytophthora* a partir de plantas enfermas y de suelo es difícil, sobre todo de aquellas de crecimiento más lento, que son limitadas por la microflora secundaria, antagonista y de desarrollo rápido; por esta razón, se han desarrollado técnicas especiales como el empleo de trampas o cebos y medios selectivos, que posibilitan este propósito (Tsao, 1983, citado por Fernández, 1998).

5.6.1 Detección de los propágulos.

Los métodos de cebos se basan en la patogenicidad de las especies de *Phytophthora* sobre el tejido del hospedante susceptible que se utiliza como cebo para la pesquisa del patógeno y fueron desarrollados por Fernández (1998). Como cebos se han empleado semillas, plántulas, frutos, hojas y discos de hojas de un hospedante susceptible, que son fundamentalmente utilizados en tres métodos que comprenden: la inserción del suelo o del tejido enfermo dentro de frutos sanos; el establecimiento de semilleros en el suelo infestado con abundante humedad y la flotación o inmersión parcial del cebo en una suspensión de suelo infestado más agua. La selección y correcta utilización de los cebos, las

condiciones de incubación, la calidad del agua y la proporción agua- suelo son los parámetros esenciales para el éxito de esta técnica (Erwin y Ribeiro, 1996).

En nuestro país se han realizado algunos trabajos sobre la ecología de este patógeno. Al respecto, Peñalver, Padrón y García (1987) determinaron que el hongo sobrevive por 4 años en suelos arenosos. Así mismo, Herrera, Camara y Galantai (1989) informaron que la sobrevivencia del micelio disminuyó a las profundidades de 15 y 25 cm., con valores de 70 y 40% respectivamente y además, determinaron métodos para su detección en suelo con el empleo de tallos de pepino, tabaco, pimiento y tomate junto a la adición de antibióticos y fungicidas para eliminar la flora contaminante del suelo. También Pérez (1990) estudió el efecto de medios selectivos y trampas para el aislamiento y detección cualitativa del patógeno en suelos infestados, su sobrevivencia en tallos de tomate enterrados en suelo y su relación con la humedad para demostrar que la viabilidad del hongo disminuyó por la pérdida de la humedad.

En años más recientes, Fernández, Toledo y Rey (1998) determinaron los parámetros más adecuados para la detección de *P. nicotianae* en los suelos tabacaleros mediante la técnica de cebo, utilizando discos de variedades de tabaco susceptible al patógeno. La misma técnica fue capaz de detectar el patógeno a niveles de inóculo muy bajos (0,2 - 1 propágulos/gramo de suelo) y demostró su eficacia y la proporcionalidad que existe entre la enfermedad y la densidad de inóculo inicialmente detectada en los suelos, antes de la siembra del cultivo (Fernández *et al.*, 2002). Por los beneficios y ventajas que ofrece la técnica de cebo para la detección de los propágulos de *P. nicotianae*/gramo de suelo, ésta se ha convertido en una práctica habitual que la Empresa de Acopio y Beneficios del Tabaco “Lázaro Peña”, de La Habana, realiza anualmente para la selección racional de los suelos tabacaleros (Toledo, 2010).

5.7 Razas y variabilidad patogénica de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan.

A pesar del desarrollo de diferentes métodos de control, en la actualidad *P. nicotianae* se sigue considerando aún uno de los patógenos del suelo más dañinos del tabaco, debido a la aparición de nuevas razas fisiológicas del hongo (Blancard, 1995). Raza fisiológica es el término aceptado para describir patotipos especializados del patógeno en diferentes genotipos del hospedante y fue descrito por Stakman en 1914 para hongos biotróficos (Pérez, 2003).

Los especialistas del género *Phytophthora* han aceptado los términos de raza fisiológica, raza patogénica o simplemente raza, para definir aquellos aislamientos con patogenicidad diferencial en distintas variedades de una misma especie de hospedante (Csinos, 2005; Shew, Sullivan y Melton, 2005). Para *P. nicotianae* se han descrito desde hace algún tiempo cinco razas fisiológicas (0, 1, 2, 3 y 4) y éstas se definen por su habilidad para infectar cultivares con diferentes genes de resistencia (Sullivan, 2004).

5.8 Distribución de las razas del patógeno en el mundo.

La especialización fisiológica para *P. nicotianae* fue informada por primera vez por Apple (1962), quien denominó raza 0 a aquellos aislamientos no patogénicos para la especie *Nicotiana plumbaginifolia* Vir. y líneas derivadas de ésta, diferenciándolos de los aislamientos raza 1, que causan enfermedad a esta especie. La raza 1 es considerada como la más severa y nociva dentro de las informadas para este patógeno (Li y Bass, 2006). Desde hace muchos años, se conoce la forma en que interactúan ambas razas y se ha demostrado cómo emerge la raza 1 en una población identificada y previamente diagnosticada como raza 0, en respuesta a la presión de selección por la siembra de *N. plumbaginifolia* o de variedades que posean el gen de resistencia a la raza 0 (Apple, 1962; 1967; Hendrix y Flowers, 1967).

Recientemente, se han confirmado estos resultados en Carolina del Norte y en Georgia, donde la siembra de variedades de tabaco con alta resistencia a la raza 0 ha originado un aumento rápido en poblaciones de la raza 1 de *P. nicotianae* (Csinos, 2005; Shew, Sullivan y Melton, 2005; Sullivan, Melton y Shew, 2005).

Prinsloo y Pauer (1974) identificaron la raza 2 en el Sur de África, donde el cultivar *N. tabacum* var. A-23, con resistencia a las razas 0 y 1, es susceptible a esta raza, la cual continúa presente en estas zonas tabacaleras, sin estar informada en ningún otro país (Sullivan, 2004). De manera similar, la raza 3 está restringida a las zonas tabacaleras de Connecticut, Estados Unidos (McIntyre y Taylor, 1978), donde la especie *N. nesophila* Johnston tiene un comportamiento diferencial frente a las distintas razas. Esta especie de *Nicotiana* es susceptible a las razas 0 y 1 y resistente a la raza 3 (Erwin y Ribeiro, 1996; Gallup, Sullivan y Shew, 2010).

En áreas de Carolina del Norte y Kentucky, se ha informado una nueva raza para *P. nicotianae*, donde el gen de resistencia *Phl* de *N. longiflora* Cav. está ampliamente extendido. La nueva raza, denominada raza 4, fue identificada a partir de la habilidad de aislamientos del patógeno para superar el gen de resistencia de *Nicotiana longiflora*, pero no el gen *Php* de *N. plumbaginifolia*, a diferencia de la raza 1, que supera los genes de *N. plumbaginifolia* y *N. longiflora* y de la raza 0, que no es capaz de vencer estos genes (Gallup *et al.*, 2006).

5.9 Razas del patógeno en Cuba.

En Cuba, los estudios de identificación de razas y caracterización de la patogenicidad del hongo eran escasos. Peñalver (1983) informó la presencia de la raza 0 en aislamientos obtenidos en la década del 70, año en que no se contaba con las variedades comerciales que se encuentran en la actualidad en explotación. Aislamientos cubanos donados por Peñalver a la colección internacional de *P. nicotianae* de Bergerac, Francia, también han sido identificados como raza 0 (Lacourt, 1992; Lacourt, Panabieres y Marais, 1994; Bonnet *et al.*, 1994; Colas *et al.*, 1998). En estudios recientes, en las regiones occidental y central del país, se detectó e identificó por primera vez la raza 1 de *P. nicotianae*, la cual se caracteriza por presentar una alta agresividad. Además, se informó la alta distribución de la raza 0 en Cuba (Toledo, 2008). La misma autora informa sobre la alta variabilidad patogénica de esta raza y diferencia tres grupos patogénicamente estables (raza 0-grupo 1, raza 0-grupo 2, raza 0-grupo 3), con

una alta distribución en Cuba. Las razas 3 y 4 no se detectaron entre los aislamientos caracterizados.

5.10 Alternativas de manejo de la enfermedad pata prieta.

El Manejo Integral de Plagas (MIP) es una concepción muy amplia y flexible de lucha contra las plagas y por ello existen diferentes criterios para la definición de los componentes que integran los programas (Vázquez, 2006). Involucra el uso de múltiples tácticas para manipular efectivamente las poblaciones de plagas, a la vez que se reduce al mínimo el uso de plaguicidas y su impacto ambiental. Por ello, el MIP debe partir de una eficiente selección de las estrategias y de sus medidas correspondientes, válidas según las características del cultivo y su problemática, con la flexibilidad necesaria para adecuarlo a las condiciones del agroecosistema, a las características socioeconómicas imperantes y a su vez, que se puedan incorporar nuevas alternativas que surgen como resultado del desarrollo científico o durante el propio proceso de implantación. Según Murguido y Elizondo (2007), su validación se puede realizar mediante un sistema de medidas preventivas y curativas, elaborado a partir del análisis concreto de la problemática por resolver, y que a su vez servirá para medir el éxito de su implantación.

El Manejo Integrado de Plagas es un nuevo enfoque de trabajo para la toma de decisiones por el agricultor, de tal forma que asegure la prevención y/o reducción de plagas, mediante un seguimiento integral de un conjunto de alternativas tecnológicas, armónicamente estructuradas en dependencia de las características específicas del sitio de producción (Muiño, 2009). Para el cultivo del tabaco se establece una estrategia que contempla la utilización de medios químicos y biológicos, así como de medidas agrotécnicas que complementan la protección fitosanitaria. Al respecto, la pata prieta del tabaco tiene una estrategia de manejo muy bien definida. (Estación de Protección de Plantas [EPP], 2009).

5.10.1 Medidas agrotécnicas contra la enfermedad.

5.10.1.1 Selección del terreno.

En la lucha contra esta enfermedad, las medidas preventivas tienen una particular importancia y dentro de éstas, el conocimiento de los niveles de inóculo del patógeno en el suelo (Fernández *et al.*, 2002), por lo que se recomienda hacer análisis de suelo antes de la siembra, registrar todos los campos sembrados y detallar la incidencia de la enfermedad en éstos, agrupándolos en una escala de 4 grados (Espino,2006b) según la fórmula para el porcentaje de infestación ((MINAGRI, 2007). de la siguiente manera:

$$\% \text{ de infestación} = \text{Total de plantas enfermas} / \text{total de plantas sembradas} \times 100$$

GRADO	% DE INFESTACIÓN
1	< 10%
2	Entre 11-20%
3	Entre 21-30%
4	> del 30%

Atendiendo a estas recomendaciones, se debe tomar la decisión de no sembrar las áreas con porcentos de infestación mayores del 30% (MINAGRI, 2007).

5.10.1.2 Preparación de suelo, materia orgánica y nutrición.

Para Summer *et al.* (1986), la preparación de suelos tiene un efecto positivo sobre la regulación de los organismos que lo habitan, al invertirse el prisma y quedar éstos expuestos al sol. Pérez (2006) plantea que entre las prácticas culturales que más efecto tienen sobre la regulación de los organismos nocivos se encuentran las prácticas de labranza o de preparación de suelo. Las diferentes prácticas de labranza producen cambios en las propiedades físico-químicas de los suelos que influyen en su ambiente y tienen un marcado impacto sobre las poblaciones de plagas. Este efecto puede ser indirecto, al crearse condiciones desfavorables para

el desarrollo y reproducción de los organismos nocivos, o directo, por daños físicos producidos en el momento de la realización de las labores. Los principales problemas en los suelos tabacaleros en Colombia son la degradación y el desbalance químico que, conjuntamente con el alto pH y las saturaciones de Ca elevados limitan la disponibilidad de P, Mg, y nutrientes para el tabaco (Marín, Plaza y Rojas, 2008). Una de las metas del agricultor tabacalero debe ser desarrollar un programa de fertilización de los suelos que resuelva las necesidades del cultivo y que reduzca al mínimo el costo y el impacto ambiental. Para alcanzar esta meta se necesitan: la planificación de la fertilización a partir de la disponibilidad de elementos en el suelo (análisis de suelos), la selección de fuentes de fertilizantes basada en las necesidades de la planta, el valor del fertilizante y el uso adecuado del mismo. Fertilizaciones excesivas y desbalanceadas resultan costosas, desperdician recursos naturales y aumentan el potencial de contaminación en los suelos (Smith y Wood, 2005).

La nutrición del cultivo es también un elemento clave a manejar en la regulación de los organismos plaga. La teoría de la Trofobiosis (Chaboussou, 1987) explica la relación existente entre la nutrición de las plantas y el ataque de plagas. Se han realizado numerosos ensayos que corroboran esta teoría y las bases que la sustentan pueden resumirse como sigue:

- Las plantas sanas son capaces de resistir el ataque de diferentes organismos nocivos.
- La resistencia está relacionada con la síntesis de proteínas por las plantas.
- La síntesis de proteínas puede ser alterada por el efecto directo de los plaguicidas o por una nutrición desbalanceada del cultivo.
- La interrupción de la síntesis de proteínas provoca que se acumulen y circulen en el tejido de las plantas azúcares solubles, compuestos nitrogenados y aminoácidos libres, que a su vez, constituyen una fuente de nutrientes para las plagas, lo que favorece su reproducción y supervivencia.

Por su parte, la materia orgánica puede actuar por varias vías, tanto para mejorar la estructura del suelo y la nutrición de las plantas, como para afectar a los

patógenos. Se ha demostrado que la mayor influencia de la materia orgánica sobre los patógenos radicales es a través de modificaciones de su actividad microbiana. El control de estos patógenos se produce por inacción o lisis de las esporas, esclerocios o hifas, de forma directa o seguida de un corto período de estimulación del crecimiento. La producción de antibióticos, la competencia por los nutrientes y el parasitismo son los mecanismos de acción a través de los cuales se ejerce este control (Pérez, 2003).

En el caso del tabaco tapado, se recomienda hacer dos aplicaciones de materia orgánica; la primera en la preparación de suelos y la segunda en la resiembra (Empresa de Acopio y Beneficio de Tabaco Matanzas [ABT], 2006).

5.10.1.3 Estrategia varietal.

La creciente demanda de habanos en el mundo requiere del uso de variedades más convenientes para el incremento de su producción (García *et al.*, 2002). En Cuba, se inicia en 1959 el programa de mejoramiento genético dirigido a la obtención de nuevas variedades cubanas de tabaco negro y a la obtención de variedades resistentes a las principales enfermedades del cultivo. En la actualidad, todas las variedades que se cultivan en el país son en mayor o menor medida resistentes a *P. nicotianae* (Espino, 2006a).

En la provincia de Matanzas se siembran dos variedades fundamentales por sus buenos rendimientos para capa: Criollo 98 y Corojo 99 (Méndez, 2001). Según el Instituto de Investigaciones del Tabaco [IIT] (2001) ambas variedades son resistentes a la pata prieta, sin embargo, Pino *et al.* (2002) especifican que la variedad Criollo 98 es moderadamente resistente a la pata prieta, por lo que no es recomendable su uso en suelos con grado medio o alto de contaminación con *Phytophthora* y que, si por su buena calidad se entendiera necesario plantarla en suelos medianamente contaminados, esto se debe hacer en el mes de noviembre, acompañando la plantación de aplicaciones de *Trichoderma* y Previcur. Espino (2003) plantea que la incidencia de la enfermedad ha aumentado significativamente, con registros inusuales en variedades que habían sido

informadas como resistentes, por lo que se recomienda plantar la variedad de mayor resistencia al patógeno en aquellas áreas de mayor incidencia de la enfermedad (Espino, 2006a). La variedad Corojo 99 se parece mucho a la Criollo 98 y es muy difícil distinguirlas cuando no están una al lado de otra, pero la primera tiene mayor distancia de entrenudos, hojas más grandes y mucho más redondeadas, mientras que la variedad Criollo 98 tiene mejor rendimiento en capa para torcido, pero es menos resistente a *Phytophthora* que Corojo 99. Por tales razones, en nuestro territorio se recomienda sembrar Corojo 99 en áreas que hayan presentado mayores afectaciones en la campaña precedente (EPP, 2010).

5.10.1.4 Época de plantación.

Se deberá realizar la plantación de cada área en la época menos favorable para el desarrollo de la enfermedad, principalmente en noviembre, para que las bajas temperaturas que se presentan en diciembre y enero impidan el rápido desarrollo de este patógeno (IIT, 2007).

5.10.1.5 Rotación de cultivos.

La rotación de cultivos se puede definir como un sistema en el cual los cultivos se siembran en una sucesión reiterativa y en una secuencia determinada sobre un mismo terreno. La sucesión reiterativa se refiere a la forma en que las diferentes secuencias se repiten sobre el mismo terreno durante determinado período de tiempo y la secuencia determinada se refiere a la forma en que los cultivos alternan durante un año sobre el mismo terreno (Iglesias, 2003). La rotación de un año a otro disminuye considerablemente la cantidad de inóculo en el suelo. Al respecto, Espino (2008) recomienda la rotación de cultivos dondequiera que sea posible y si no, por lo menos, el cultivo de abonos verdes, o sea, el cultivo de una leguminosa durante la época en que no se planta tabaco. Posteriormente, Espino (2010) reitera la necesidad de sembrar abonos verdes en las vegas tabacaleras.

5.10.1.6 Selección negativa.

La selección negativa es una medida curativa que garantiza la no diseminación del patógeno en el área. Para aplicarla, se deben revisar las vegas de tabaco, con intervalos de 10 días, a partir de los 15 días del transplante y arrancar las plantas enfermas para incinerarlas fuera del campo (Centro Nacional de Sanidad Vegetal [CNSV], 2001). Cuando se detecten plantas afectadas por pata prieta, éstas se deben sacar del campo y regular la humedad, anotando el porcentaje de plantas enfermas, con vistas a futuras siembras y las implicaciones que puedan tener (MINAGRI, 2002). Durante varios años, para el control de la enfermedad se utilizó la eliminación de plantas y la demolición de áreas muy afectadas (Fernández *et al.*, 2002).

5.10.2 Medidas biológicas.

En la actualidad la aplicación de medios biológicos para el control de plagas en la agricultura reviste primordial importancia para Cuba y a escala mundial. Este método constituye un factor importante en los programas de manejo integrado de los cultivos, lo cual reduce la contaminación del medio ambiente y contribuye a lograr formas sostenibles de producción. En Cuba se ha demostrado la efectividad de *Trichoderma* spp. sobre el agente causal de la pata prieta en el cultivo del tabaco, por lo que este agente de biocontrol se aplica ampliamente en producción, en forma de preparado biológico con resultados alentadores. En estos momentos este agente tiene una gran aceptación por los productores individuales, campesinos y otras personas relacionadas con el cultivo. Existe una buena compatibilidad de *Trichoderma* spp. con los plaguicidas y fertilizantes inorgánicos de mayor empleo en hortalizas y tabaco y con los biofertilizantes y bioestimulantes aplicados a estos cultivos (Muiño *et al.*, 2001).

5.10.2.1 Criterios generales para la aplicación de Medios biológicos.

Según Carr (2003), los bioplaguicidas se dañan con la luz solar y las altas temperaturas, los que le hacen perder su efecto, por lo que se deben aplicar en horas de la tarde y con humedad en el suelo.

Trichoderma es compatible con productos químicos como: Oxicloruro de Cobre, Metalaxyl, Dimetomorph, Trifluralin, Napropamide, Dimethoato y Landacialotrina (Carr y Elosegui, 2005).

La desinfección de los suelos se realizaba con bromuro de metilo, fumigante de mayor empleo a nivel mundial, cuya alta toxicidad y efecto negativo sobre la capa de ozono demandó la búsqueda de alternativas efectivas, entre ellas el control biológico con microorganismos antagónicos para reducir su consumo (Miller, 1996; Stefanova *et al.*, 2004). La práctica permitió la sustitución del bromuro de metilo, lo cual resultó una contribución para la protección del ambiente (Wagner, 2006).

Los hongos de suelo constituyen una de las principales causas de mortalidad de las plantas cultivables, para lo cual se han empleado diferentes métodos de control, pero sin éxito en la mayoría de los casos. Por tal motivo se ha recurrido a diferentes alternativas de lucha, entre ellas el control biológico, uno de los métodos más promisorios para disminuir los daños en la agricultura en general (Fernández *et al.*, 2006).

En Cuba, el uso del control biológico en Cuba se inserta dentro de los programas de manejo integrado, donde se ha comprobado que resultan más eficaces estos métodos. Para ello, se encuentran implementados un grupo de programas MIP en los cuales el control biológico tiene una participación importante (Fernández-Larrea, 2007).

5.10.2.2 Desinfección de posturas.

Antes de ser plantadas, todas las posturas deben desinfectarse por inmersión en una solución de *Trichoderma* (cepa 34), a razón de 1 Kg/10L de agua y durante un tiempo de 5 minutos (MINAGRI, 2002).

5.10.2.3 Colonización con *Trichoderma*.

Las especies de *Trichoderma* muestran una elevada actividad antagónica e hiperparásita, por lo que son capaces de destruir las paredes celulares del interior del hongo patógeno. Además, *Trichoderma* es un competidor por el sustrato, por lo que coloniza rápidamente la semilla, la rizosfera de la planta y el suelo, predominando su población por encima del patógeno (Fernández-Larrea, 2006).

En el cultivo intercosecha se deben hacer tres aplicaciones de *Trichoderma* (cepa 34), para que este hongo antagónico de *Phytophthora* colonice bien el suelo, de forma tal que, cuando se plante el tabaco, ya sea prácticamente el dueño del área y no permita que se desarrolle la pata prieta (Madariaga y Betancourt, 2008).

Para combatir los hongos del suelo se harán dos aplicaciones de *Trichoderma* en plantación, una en el momento de la siembra y otra en el aporque, a razón de 8 Kg/ha (Empresa de Acopio y Beneficio de Tabaco Matanzas, 2010).

5.10.3 Medidas químicas.

En los casos de tabaco tapado, de existir antecedentes del ataque, se debe añadir Previcur a razón de 0,2 L por 100L de agua (MINAGRI, 2008) para la desinfección de las posturas y en plantación se debe aplicar el mismo producto en el aporque. Bayer (2009) explica que Previcur es un excelente fungicida para tratamiento en el suelo cuando el nivel de inóculo presente lo justifique.

5.10.4 Otras medidas.

1. Los arados, tractores y otros implementos deberán lavarse cuidadosamente después de usarse en los campos infestados.
2. En cada visita que se realice a la plantación, si la afectación es muy grande, se deben contar o calcular las plantas que presenten los síntomas de pata prieta y anotar en una libreta para poder adoptar medidas adicionales (Espino, 2006b).

3. Los campos que manifestaron la enfermedad deben ser demolidos lo antes posible, una vez terminado su ciclo (no más de 10 días), eliminando los restos de cosecha para interrumpir la multiplicación de patógenos del suelo (MINAGRI, 2007).
4. Analizar las aguas que se emplean para el riego.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Obtención e identificación de los aislamientos de *P. nicotianae* en las zonas tabacaleras del municipio Pedro Betancourt.

Las colectas del material vegetal se efectuaron durante la época óptima del cultivo, en los meses de noviembre a febrero y en el periodo comprendido entre los años 2006-2010. Todas las muestras se tomaron de los principales macizos tabacaleros del municipio de Pedro Betancourt, ubicados en áreas especializadas del cultivo en las Cooperativas de Créditos y Servicios Fortalecidas (CCSF): Giraldo Díaz, Juan de Mata Reyes y Victoria de Girón.

De cada uno de los campos visitados y descartando aproximadamente cuatro metros de plantación para disminuir el efecto de borde, se seleccionaron al azar 10 plantas con síntomas de la enfermedad pata prieta (Lucas, 1975). Las plantas se extrajeron del suelo con ayuda de implementos de labranza -para no dañar las raíces- y se cortaron transversalmente, para trasladar al laboratorio solamente las partes inferiores del tallo y las raíces. Las muestras de tallo y raíces se lavaron con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente, para ser desinfectadas con etanol al 70 %.

El aislamiento del patógeno se realizó a partir de pequeñas fracciones de la médula afectada, obtenidas de cortes longitudinales de las raíces y tallos, las cuales se colocaron en medio selectivo compuesto por: Pimaricina - 10 mg, Ampicillina - 250 mg, Rifampicina - 10 mg, Pentacloronitrobenzeno - 100mg. (P₁₀ARP) (Kannwischer y Mitchell, 1978), para facilitar la purificación de las colonias de *Phytophthora* spp. y su diferenciación de las colonias de otros microorganismos contaminantes. De las colonias crecidas en el medio selectivo, se seleccionaron aquellas con características propias del género *Phytophthora* para pasarlas a placas Petri de 9 cm de diámetro que contenían medio Papa-Dextrosa Agar (PDA). Posteriormente, las placas se incubaron a 27° C, en condiciones de oscuridad, durante 10 días. Una vez obtenidas las colonias purificadas (procedentes de tres placas por aislamiento), éstas se clasificaron según los

criterios establecidos por Kröber (1985), para lo cual se realizaron observaciones por triplicado de cada placa en un microscopio óptico Olympus (ZEISS), con aumento 100X. Todos los aislamientos se identificaron a partir de los parámetros establecidos para la clasificación de la especie, según Stamps *et al.*, (1990) y de observaciones de las estructuras asexuales (esporangios y clamidósporas), siguiendo la metodología descrita por Hall (1993).

Los parámetros evaluados para la identificación de la especie *P. nicotianae* fueron:

- ❖ **Para los Esporangios:** forma, persistencia (caedizos o no), mediciones de largo x ancho y características de la papila. Se evaluaron 50 estructuras por aislamiento.
- ❖ **Para las Clamidósporas:** mediciones del diámetro, ubicación y forma. Se evaluaron 15 estructuras por aislamiento.
- ❖ **Crecimiento a 37°C** (temperatura máxima de crecimiento).

Los aislamientos duplicados de *P. nicotianae* se mantuvieron en tubos con medio PDA en una incubadora refrigerada (Selecta Holcold) a temperatura de 10°C.

6.2 Determinación de la densidad de inóculo de *P. nicotianae* en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt.

Para la determinación de la densidad de inóculo de *P. nicotianae* se empleó el Método de Cebo descrito por Fernández, Toledo y Rey (1998). Las muestras de suelo de cada uno de los campos se homogeneizaron individualmente y se procesaron para eliminar los restos vegetales y las partículas groseras (piedras, terrones, etc.). 100 g de cada una de las muestras de suelo se depositaron en recipientes de aluminio, a los cuales se les adicionaron 60 mL de agua para su prehumectación. Posteriormente, los frascos se sellaron para evitar la evaporación.

Para la determinación de la densidad de inóculo se tomaron 10 g de suelo de cada muestra y se añadieron en un recipiente con 100 mL de agua destilada,

agitándose fuertemente hasta su homogenización. Esta solución se consideró como solución madre para realizar las diluciones seriadas hasta la concentración de 1/1000. Para cada muestra a analizar, se utilizó una placa de cultivo de 26 orificios. Cada una de las diluciones se replicó en cinco orificios (2 mL), colocando como cebo un disco de hojas de plántulas de tabaco de 1,5 cm de diámetro.

Las placas de cultivo se incubaron por un periodo de cinco a seis días en un cuarto climatizado a 27° C ± 1, con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Las evaluaciones se realizaron con el auxilio del microscopio óptico, empleando un lente 40X y consistieron en la observación de cada una de las cinco hojitas colocadas por cada dilución efectuada. En todos los casos, se precisó el número de hojas infectadas, para determinar el número de propágulos/g de suelo de *P. nicotianae*, según la metodología antes mencionada.

6.3 Identificación de las razas de *P. nicotianae* en el municipio Pedro Betancourt.

Para la identificación de las razas de *P. nicotianae*, los aislamientos obtenidos se inocularon en un grupo internacional de genotipos reconocidos como especies diferenciadoras de las razas 0, 1, 3 y 4 de *P. nicotianae* (Tabla 1) y proporcionados por el Instituto de Bergerac, Francia y por el Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones del Tabaco.

Tabla 1. Genotipos diferenciadores empleados en la determinación de razas de *P. nicotianae*.

Identificación	Genotipos	Tipo de reacción	Referencia
Raza 0	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Resistencia completa a la raza 0 y susceptibilidad a la raza 1	(Apple, 1962; 1967; Sullivan, 2004; Gallut et al., 2006)
	<i>Nicotiana longiflora</i>		
Raza 3	<i>Nicotiana nesophila</i>	Susceptible a las razas 0 y 1. Resistente a la raza 3	(McIntyre y Taylor, 1978)

Raza 4	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Resistente a la raza 4	(Gallup <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Nicotiana longiflora</i>	Susceptible a la raza 4	

En las casas de cultivo del Instituto de Investigaciones del Tabaco se desarrollaron los semilleros de las especies de *Nicotiana* sobre sustrato de cachaza (esterilizado a 1,5 atm por 1 h), a una temperatura ambiente promedio de 24,7° C y en 78,5 % de humedad relativa. Para el desarrollo y obtención de las plántulas se emplearon las medidas de riego y laboreo indicadas por el Instructivo Técnico del Tabaco (MINAGRI, 1998), pero sin aplicaciones de fungicidas.

A los 30 días de edad, las plántulas se trasladaron al aislador y se trasplantaron de forma individual en bolsas negras de polietileno, que contenían 1,1 Kg. de suelo ferralsol éutricos (Rivera *et al.*, 2003), previamente esterilizado a 1,5 atm por 1 hora. Se utilizaron cinco plantas para cada una de las interacciones (aislamiento x genotipo).

El inóculo fue previamente reproducido en sustrato de harina - arena (Peñalver, 1983), con un ajuste de las concentraciones de todos los aislamientos hasta obtener entre 7-9 x10⁴ unidades formadoras de colonias (UFC) en 15 g de sustrato. A los 15 días de efectuado el trasplante, se realizó la inoculación de las plantas, a razón de 15 g de inóculo/planta. Para ello, se separó la tierra alrededor del tallo hasta lograr ver las primeras raíces, sobre las cuales se añadió el inóculo. Después de la inoculación, las raíces se cubrieron nuevamente con la tierra removida. Las plantas se regaron diariamente con 150 mL de agua por bolsa para preservar la humedad. Transcurridos 21 días, se realizaron las evaluaciones para la identificación de las razas, para lo cual se extrajeron cuidadosamente las plantas de cada una de las bolsas, con la finalidad de no dañar las raíces. Para observar los síntomas de la enfermedad, se realizaron cortes longitudinales en los tallos y las raíces de todo el material vegetal. La patogenicidad de los aislamientos se determinó según la escala de Zhang *et al.* (2003) que emplea las siguientes categorías:

- Presencia de síntomas, planta enferma = 1
- Ausencia de síntomas, planta sana = 0.

Para la clasificación de las razas en 0, 1, 3 y 4, se tuvieron en cuenta los criterios de Su y Zhang (2001) y Zhang *et al.* (2003). Estos autores reconocen la presencia de las razas en los cultivares diferenciales cuando el aislamiento provoca síntomas de enfermedad en al menos tres de las cinco plantas inoculadas.

6.4 Identificación de los grupos patogénicos de la raza 0 de *P. nicotianae* en el municipio Pedro Betancourt.

Teniendo en cuenta el resultado de la identificación de razas (Epígrafe 6.3) se identificaron los grupos patogénicos de los aislamientos que resultaron clasificados como raza 0, según la metodología de Toledo (2009). La obtención de las plántulas de las variedades de *Nicotiana tabacum* var. *Habana 2000* y *Nicotiana tabacum* var. *Corojo Especial*, así como el procedimiento experimental y las inoculaciones en estos ensayos se ejecutaron siguiendo los procedimientos ya descritos en el Epígrafe 6.3.

En cada uno de los ensayos efectuados se incluyó un aislamiento control de cada uno de los grupos patogénicos de la raza 0, los que se encuentran conservados en la Micoteca del Instituto de Investigaciones del Tabaco (Tabla 2).

Tabla 2. Aislamientos controles para la identificación de los grupos 1, 2 y 3 de la raza 0 de *P. nicotianae*.

Grupos patogénicos	Aislamientos
Raza 0 Grupo 1	3
Raza 0 Grupo 2	125
Raza 0 Grupo 3	51

Las evaluaciones se efectuaron mediante la escala de 4 grados (0 a 4) de Peñalver (1983), en la cual:

- **Grado 0** = planta sana
- **Grado 1** = presencia de la enfermedad con afectación en raíz
- **Grado 2** = afectación en raíz y tallo
- **Grado 3** = afectación en raíz, tallo y hojas
- **Grado 4** = planta muerta

Los cálculos para la intensidad de ataque del patógeno se efectuaron mediante la fórmula de Townsend y Heuberger, citado por Pérez (2003):

$$I = \left[\frac{\sum_{v=0}^j n_v \cdot v}{j \cdot N} \right] \cdot 100$$

donde:

I: Intensidad del ataque del patógeno (en %)

n_v: Total de plantas con grado **v** de la escala

v: grado respectivo de la escala

N: total de plantas evaluadas

j: grado máximo de la escala

Para la clasificación de los grupos patogénicos, se utilizaron el Programa Estadístico Statistica plus for Windows (1998) y el análisis estadístico de conglomerado (K means), para agrupar a los aislamientos, incluyendo también los resultados en los aislamientos controles de los grupos 1, 2, y 3 de la raza 0 (Tabla 2).

El número de aislamientos que integró cada grupo patogénico fue comparado con el número total de aislamientos mediante un análisis de comparación múltiple de proporciones (SCP, 1998).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Obtención e identificación de los aislamientos de *P. nicotianae* en las zonas tabacaleras del municipio Pedro Betancourt.

De los muestreos realizados en las zonas tabacaleras de Pedro Betancourt se obtuvieron 27 aislamientos de *Phytophthora nicotianae*, que se presentan en la Tabla 3. Esta colección está depositada actualmente en la Micoteca del Departamento de Fitopatología del Instituto de Investigaciones del Tabaco (San Antonio de los Baños, Habana, Cuba).

Tabla 3. Identificación y procedencia de los aislamientos de *P. nicotianae*

Aislamientos	Identificación	Productor	CCSF
1	PB 1	Luís Romillo	Juan de M. Reyes
2	PB 3	Kenia Zamora	Giraldo Díaz
3	PB 4	Rober Remis	Giraldo Díaz
4	PB 5	Yusdel Sarmiento	Giraldo Díaz
5	PB 6	Ariel Hernández	Giraldo Díaz
6	PB 7	Antonio Pauza	Victoria de Girón
7	PB 8	Pablo Navarro	Giraldo Díaz
8	PB 9	Manuela Castellón	Giraldo Díaz
9	PB 10	Vladimir Pedroso	Giraldo Díaz
10	PB 15	Nicomedes Herrera	Victoria de Girón
11	PB 16	Alejandro Cruz	Victoria de Girón
12	PB 23	Ricardo Benítez	Juan de M. Reyes
13	PB 24	Camilo Martínez	Giraldo Díaz
14	PB 25	Alain Prado	Giraldo Díaz
15	PB 27	Juan A. Noriega Silva	Giraldo Díaz
16	PB 28	Maikel Herrera	Giraldo Díaz
17	PB 29	Antonio Robaina	Giraldo Díaz

18	PB 31	María C. Sardinas	Giraldo Díaz
19	PB 32	Carlos Pereira	Giraldo Díaz
20	PB 33	Jorge Guerra	Victoria de Girón
21	PB 34	Roberto Yáñez	Giraldo Díaz
22	PB 35	Juan Luís Perdomo	Giraldo Díaz
23	PB 36	Idelkis Boi Casaña	Giraldo Díaz
24	PB 37	Orlando Ramos	Giraldo Díaz
25	PB 38	Roberto González	Giraldo Díaz
26	PB 39	Yoel González	Giraldo Díaz
27	PB 40	Sergio Triana	Victoria de Girón

Los 27 aislamientos presentaron esporangios persistentes (no caedizos), de forma elipsoidal, ovoide, piriforme o esféricos, con papilas prominentes -como se observa en la Figura 1- y ocasionalmente con dos papilas en el mismo esporangio.

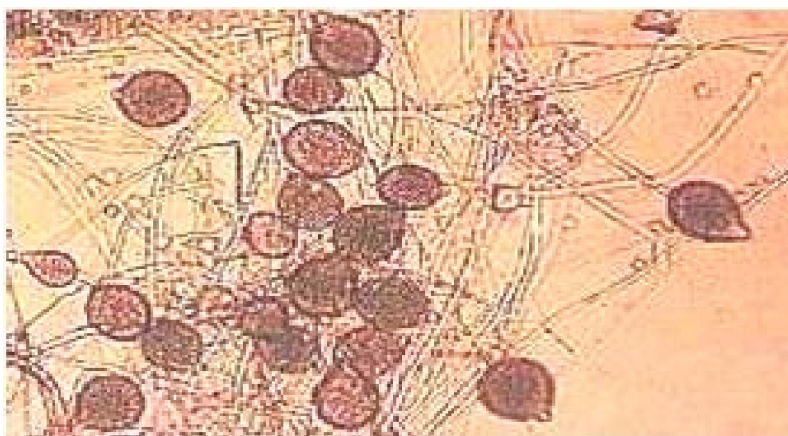


Figura 1. Esporangios persistentes y papilados observados en los aislamientos de *P. nicotianae* (400X).

Las dimensiones obtenidas a partir de las mediciones efectuadas a los esporangios variaron extensamente y oscilaron entre 16 y 69 μm de largo por 16 a 50 μm de ancho, con una media de 41,5 x 31,5 μm . Se observaron abundantes clamidósporas terminales o intercalares, cuyos diámetros oscilaron entre 14 y 37

µm, con un promedio de 28,6 µm. Estos valores se encuentran dentro de los intervalos informados por Stamps *et al.* (1990) y Hall (1993) para la especie *P. nicotianae*.

La gran variabilidad en el tamaño de las estructuras asexuales para *P. nicotianae* y otras especies del género, informada por Hall (1993), dificulta la clasificación. Por ello, para la clasificación taxonómica de las especies del género se considera además la temperatura máxima de crecimiento del aislamiento.

En la experiencia desarrollada por la autora del presente trabajo, todos los aislamientos crecieron hasta la temperatura de 37° C, lo cual coincide con la temperatura máxima de crecimiento de *P. nicotianae* referida por Erwin y Ribeiro (1996). En Cuba, Peñalver y García (1988) determinaron que el intervalo de temperaturas mínima y máxima para el crecimiento de *P. nicotianae* oscilaba entre 10° y 35° C. Posteriormente, Fernández (1998) informó temperaturas mínimas de crecimiento de 5° C y máximas de 37° C, con un óptimo de 30 °C para esta especie.

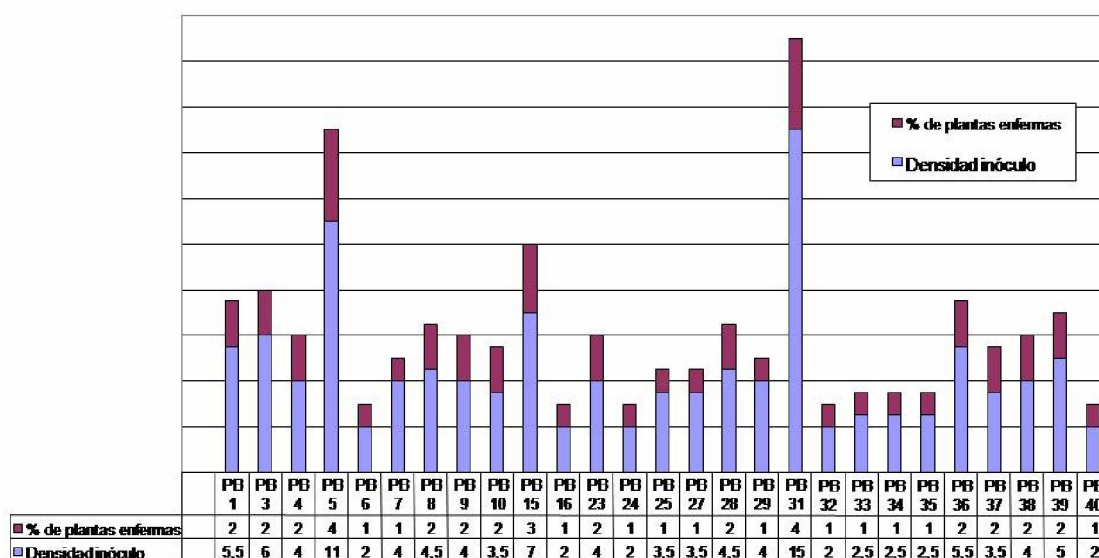
El intervalo de temperatura, la temperatura máxima de crecimiento y las características de los esporangios, son considerados los indicadores esenciales para la clasificación de las especies de *Phytophthora* (Hall, 1993; Erwin y Ribeiro, 1996). Las características evaluadas en los aislamientos identificados en el presente trabajo coinciden con los criterios establecidos para el género *Phytophthora* por Erwin y Ribeiro (1996), así como con las características determinadas por Waterhouse (1963), Hall (1993) y Erwin y Ribeiro (1996) para definir la especie *P. nicotianae*.

7.2 Determinación de la densidad de inóculo de *P. nicotianae* en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt.

Como se aprecia en la Tabla 4 (Anexo 1), en los 27 suelos utilizados para la determinación de la densidad de inóculo se observó la presencia del patógeno *P. nicotianae*, lo que demuestra su alta distribución de *P. nicotianae* en los suelos tabacaleros del municipio Pedro Betancourt.

En todos los casos, las densidades de inóculo detectadas oscilaron entre 2 y 15 propágulos/gramo de suelo, lo que corrobora la incidencia de la enfermedad pata prieta, históricamente es informada en las áreas tabacaleras del municipio. La estandarización de la técnica de cebo, desarrollada en Cuba por Fernández *et al.* (1998) y utilizada por la autora demuestra nuevamente su efectividad para el recobrado y cuantificación del hongo en los suelos destinados al cultivo del tabaco (Toledo, Infante y González, 1998).

Los resultados obtenidos en las determinaciones de la densidad de inóculo y la intensidad de ataque del patógeno demuestran una relación directa entre ambos parámetros. En la Figura 2, donde se muestran los resultados sobre la relación entre densidad de inóculo y porcentaje de plantas enfermas en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt, se aprecia que han existido mayores afectaciones de la enfermedad pata prieta en aquellos suelos donde las densidades de inóculo resultaron más altas. Un ejemplo claro de este fenómeno se observa en los suelos identificados como PB 5 y PB 31. Por otra parte, en los suelos con densidades de inóculo bajas (1 a 3 propágulos/g de suelo), el % de plantas enfermas resultó menor, como se observa en los suelos identificados como PB 6, PB 16, PB 24, PB 32 y PB 40.



Leyenda: % de plantas enfermas expresado en grados: **Grado 1** = menos del 10% de plantas enfermas; **Grado 2** = 11 - 20% de plantas enfermas; **Grado 3** = 21 - 30% de plantas enfermas; **Grado 4** = más del 30% de plantas enfermas.

Figura 2. Densidad de inóculo y porcentaje de plantas enfermas en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt.

En investigaciones concernientes a diversos patógenos, diferentes autores han determinado la gran importancia que tiene la detección y cuantificación de éstos en los suelos antes de la siembra del cultivo, para permitir realizar una mejor selección de los campos, con menor riesgo de incidencia de las enfermedades provocadas por dichos patógenos, aspecto este corroborado por Camperota (1980) con las especies de *Pythium* y *Rhizoctonia solanii* respectivamente.

En inoculaciones artificiales de suelo con *P. nicotianae* se determinó que con 5, 42 y 158 zoosporas del hongo/planta se produjeron 10, 50 y 90% de infección respectivamente en variedades susceptibles de tabaco. Sin embargo, la inoculación de sólo 9 clamidosporas produjo un 50 % de infección de las plantas (Kannwischer y Mitchell, 1981). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los informados por Fernández *et al.* (2002), quienes determinaron que existe una proporcionalidad directa entre las densidades de inóculo que se recobran en los suelos y el inicio de las epifitias provocadas por *P. nicotianae* en tabaco. Y coinciden además con Sullivan (2005), quien informó que para que se inicien las epidemias de pata prieta sólo bastan densidades de inóculo menores de 1 propágulo/g de suelo.

7.3 Identificación de las razas de *P. nicotianae* en el municipio Pedro Betancourt

El estudio efectuado para la identificación de razas de *P. nicotianae* evidenció solamente la presencia de la raza 0 dentro de los aislamientos caracterizados. No se detectaron aislamientos que correspondieran con la respuesta de patogenicidad reconocida internacionalmente para las razas 1, 3 y 4. La identificación de razas de cada uno de los aislamientos se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Identificación de razas de los aislamientos de *P. nicotianae* frente a los genotipos de *Nicotiana* diferenciadores de razas.

Identificación de los aislamientos	Especies de <i>Nicotiana</i> diferenciadoras de razas			Identificación de raza
	<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>N. longiflora</i>	<i>N. nesophyla</i>	
PB 1	-	-	+	Raza 0
PB 3	-	-	+	Raza 0
PB 4	-	-	+	Raza 0
PB 5	-	-	+	Raza 0
PB 6	-	-	+	Raza 0
PB 7	-	-	+	Raza 0
PB 8	-	-	+	Raza 0
PB 9	-	-	+	Raza 0
PB 10	-	-	+	Raza 0
PB 15	-	-	+	Raza 0
PB 16	-	-	+	Raza 0
PB 23	-	-	+	Raza 0
PB 24	-	-	+	Raza 0
PB 25	-	-	+	Raza 0
PB 27	-	-	+	Raza 0
PB 28	-	-	+	Raza 0
PB 29	-	-	+	Raza 0
PB 31	-	-	+	Raza 0
PB 32	-	-	+	Raza 0
PB 33	-	-	+	Raza 0
PB 34	-	-	+	Raza 0
PB 35	-	-	+	Raza 0
PB 36	-	-	+	Raza 0
PB 37	-	-	+	Raza 0
PB 38	-	-	+	Raza 0
PB 39	-	-	+	Raza 0
PB 40	-	-	+	Raza 0

La identificación de las razas se basa en la patogenicidad de los aislamientos en los genotipos diferenciadores (Gallup y Shew, 2006). Se reconocen como aislamientos raza 1 aquellos que resulten patogénicos a las especies *N. plumbaginifolia* y *N. longiflora* (Apple, 1967). Apple (1962) denominó raza 0 a aquellos aislamientos no patogénicos a la especie *Nicotiana plumbaginifolia* Vir., ni a líneas derivadas de ésta, diferenciándolos así de los aislamientos raza 1, que

causaban enfermedad a estas especies (Hendrix y Flowers, 1967). Desde hace muchos años, se conoce cómo interactúan ambas razas, y cómo emerge la raza 1 en una población identificada y previamente diagnosticada como raza 0, en respuesta a la presión de selección por la siembra de *N. plumbaginifolia* o de variedades que poseían el gen de resistencia completa a la raza 0 (Apple, 1967; Hendrix y Flowers, 1967).

Todos los aislamientos obtenidos del municipio Pedro Betancourt provocaron graves síntomas en la especie *N. nesophyla*, por lo que en esta zona se descarta la presencia de la raza 3 de *P. nicotianae*. La raza 3 se caracteriza por no ser patogénica a *N. nesophyla*, mientras que esta especie es afectada por los aislamientos de las razas 0 y 1 (McIntyre y Taylor, 1978). En los experimentos efectuados no se observaron respuestas diferenciales de resistencia entre las especies *N. longiflora* y *N. plumbaginifolia*, por lo que se descarta la presencia de la raza 4 dentro de los aislamientos evaluados. Esta raza puede ser determinada por su patogenicidad para *N. longiflora* y su no patogenicidad para *N. plumbaginifolia* (Gallup *et al.* 2006). La raza 1 es considerada como la más severa y nociva dentro de las informadas para este patógeno (Li y Bass, 2006).

Los estudios efectuados en Cuba notificaron la presencia de la raza 0 con un 80% de frecuencia de aparición con respecto a la raza 1. La región central del país se destacó por reunir el mayor porcentaje de aislamientos de la raza 1. Toledo (2008) plantea además que, la presencia en áreas tabacaleras del país de la raza 1 de *P. nicotianae* se caracteriza por ser muy patogénica en variedades comerciales cubanas resistentes a la raza 0, lo que ha originado medidas fitosanitarias estrictas como la prohibición de la siembra del cultivo en las áreas donde se detecte dicha raza.

Los programas para el manejo de pata prieta a través del uso de la resistencia varietal del cultivo han demostrado que la rotación de variedades que poseen resistencia completa (derivadas de *N. plumbaginifolia*) con variedades que presentan altos niveles de resistencia parcial (para ambas razas del patógeno), proporcionan un mejor control de la enfermedad y disminuyen los cambios y el surgimiento de nuevas razas del patógeno (Sullivan, 2005). Todas las variedades

de tabaco que se cultivan en el país son resistentes en mayor o menor medida a la raza 0 de *P. nicotianae*, sin embargo, hasta el momento no se poseen variedades resistentes a la raza 1 (Toledo, 2006).

7.4 Identificación de los grupos patogénicos de la raza 0 de *P. nicotianae* en el municipio Pedro Betancourt.

En la Tabla 5 (Anexo 2) se presentan los valores promedio de Intensidad de ataque del patógeno en los grupos patogénicos de *P. nicotianae*. El análisis de conglomerado (K means) para agrupar a los aislamientos de acuerdo con la intensidad de ataque del patógeno arrojó la presencia de tres grupos patogénicos de la raza 0, lo que ratifica la variabilidad patogénica de esta raza de *P. nicotianae*. Ninguno de los tres grupos patogénicos obtenidos en los suelos tabacaleros del municipio Pedro Betancourt provocaron síntomas en la especie *N. plumbaginifolia*, lo cual confirma la presencia en dichos suelos solamente de la raza 0 y ratifica los resultados obtenidos en la identificación de razas. Al respecto, estos resultados pueden observarse en la Figura 3.

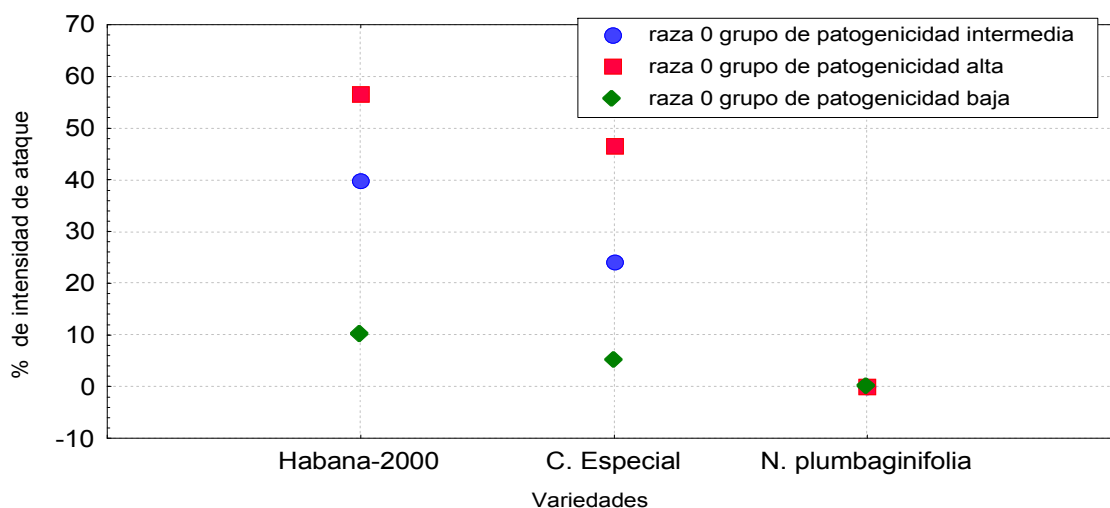


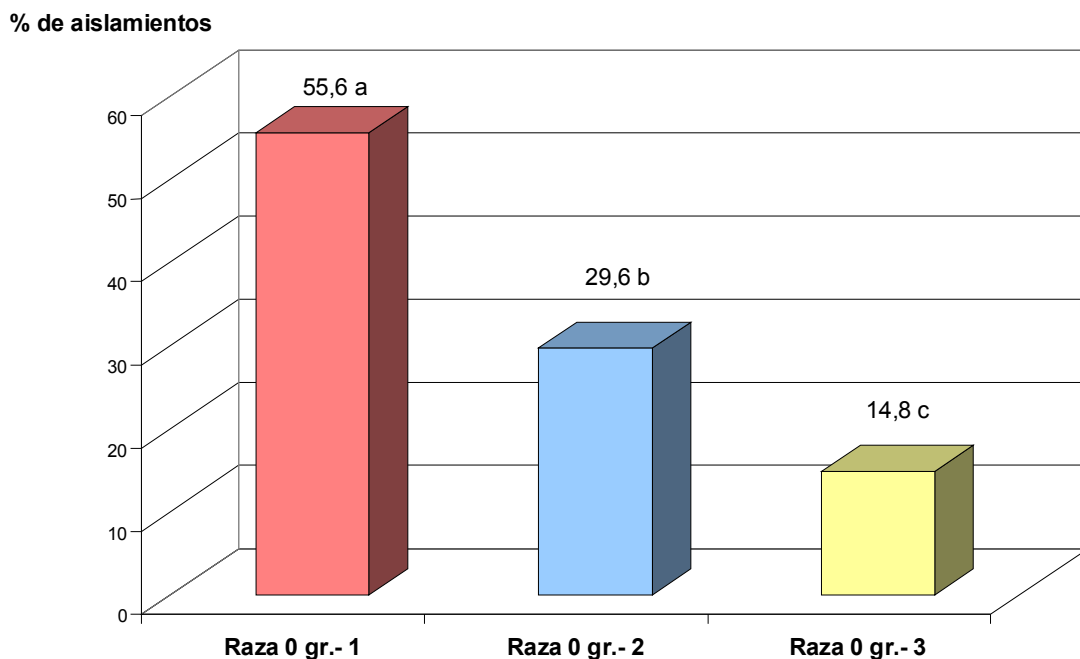
Figura 3. Clasificación de la patogenicidad según la intensidad de ataque de los aislamientos de *P. nicotianae*.

Los tres grupos patogénicos de la raza 0 se diferenciaron entre sí por provocar comportamientos diferenciales de patogenicidad en las variedades Habana 2000 y Corojo Especial. La raza 0 grupo de patogenicidad alta (raza 0 gr.- 1) provocó los mayores valores de intensidad de ataque del patógeno en ambas variedades y se diferenció de la raza 0 de patogenicidad baja (raza 0 gr. -3), la cual provocó los valores promedio de intensidad de ataque más bajos en dichas variedades. El grupo de la raza 0 de patogenicidad intermedia (raza 0 gr.- 2) se ubicó con valores intermedios de patogenicidad entre los dos grupos anteriores.

La identificación de los grupos patogénicos de la raza 0 en los aislamientos de *P. nicotianae* aparece en la Tabla 6, Anexo 3.

Los valores promedio de intensidad de ataque del patógeno de los grupos patogénicos de *P. nicotianae* identificados en las áreas tabacaleras del municipio de Pedro Betancourt coinciden con los valores de intensidad de ataque informados por Toledo (2008), quien sólo incluyó un aislamiento de la provincia de Matanzas identificado como MTZ y clasificado como raza 0 grupo de patogenicidad intermedia (raza 0 gr.- 2).

Como resultado de la caracterización patogénica de los 27 aislamientos obtenidos y del análisis estadístico realizado, se pudo apreciar que el 55,6% de estos aislamientos perteneció a la raza 0 de patogenicidad alta, el 29,6% correspondió a la raza 0 de patogenicidad intermedia y sólo el 14,8% se ubicó en el grupo de la raza 0 de baja patogenicidad (Figura 4). Estos resultados coinciden con los planteamientos de Toledo (2006), quien informa que la raza 0 de los grupos de patogenicidad alta e intermedia se caracteriza por provocar los valores de intensidad de ataque más severos en las variedades cubanas que se cultivan en la actualidad, lo cual puede constituir una de las posibles causas de la alta incidencia de la enfermedad pata prieta en el municipio de Pedro Betancourt.



Leyenda: Letras diferentes difieren significativamente ($p < 0,05$)

Figura 4. Representatividad de los diferentes grupos patogénicos de *P. nicotianae*.

Resultados internacionales obtenidos por Lacourt, Panabieres y Marais (1994), Colas *et al.* (1998) indican variabilidad patogénica en aislamientos de tabaco. Más recientemente, Zhang *et al.* (2003) determinaron la presencia de dos razas para *P. nicotianae* y de grupos patogénicos pertenecientes a la raza 0 en áreas tabacaleras de China.

En Cuba, la caracterización de las variedades comerciales de tabaco frente a los grupos patogénicos de la raza 0 demostró que la variedad Criollo-98 es la menos tolerante frente a los tres grupos patogénicos de la raza 0 de *P. nicotianae* (Toledo, 2006; Espino, 2008, 2009).

A su vez, la gran variabilidad patogénica de *P. nicotianae* en el país promovió la necesidad de efectuar los trabajos de selección varietal en condiciones controladas, en los cuales se inoculan artificialmente en las líneas promisorias los aislamientos pertenecientes a los grupos patogénicos más agresivos (Toledo, 2009).

7.5 Posibles causas de la alta incidencia de la enfermedad pata prieta en las áreas tabacaleras del municipio de Pedro Betancourt, provincia de Matanzas.

En todos los suelos tabacaleros monitoreados de Pedro Betancourt (27) fue detectado el patógeno, lo que demuestra la alta distribución de *P. nicotianae* en estas áreas de cultivo. Este aspecto, conjuntamente con el gran número de propágulos recobrados en cada uno de los suelos, fundamenta la alta incidencia y las pérdidas que se producen en el tabaco por la enfermedad pata prieta. Los resultados obtenidos demuestran que sólo en el 28 % de los suelos se encuentran densidades de inóculo iguales o inferiores a 2,5 propágulos de *P. nicotianae*/g. de suelo, valor límite de densidad de inóculo que recomiendan el Instructivo Técnico del Tabaco y la Dirección de Sanidad Vegetal del cultivo para que un suelo sea seleccionado en próximas campañas (Espino *et al.* 1997). Densidades de inóculo superiores a 2,5 propágulos/g. de suelo bastan para desencadenar significativas epifitias en los suelos tabacaleros (Toledo, 2006). Un ejemplo significativo de esta situación lo constituyó el suelo cuyo aislamiento fue identificado como PB 5, que tuvo que ser demolido a los 25 días de sembrado (Empresa de Acopio y Beneficio de Tabaco Matanzas, 2011) por presentar densidades de inóculo de 11 propágulos/g. de suelo.

Otro de los factores que inciden en la alta incidencia de pata prieta en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt es la escasa o nula rotación de cultivos, causa fundamental de las contaminaciones y densidades de inóculo que se informan. La siembra reiterada de tabaco por más de 10 años ha traído como consecuencia las elevadas densidades de inóculo, por lo que el 72% de los suelos monitoreados muestran valores superiores a 2,5 propágulos/g de suelo.

Las encuestas realizadas a los productores en las campañas 2006-07 y 2009-10, conjuntamente con los Historiales y Registros Fitosanitarios consultados demuestran cómo los suelos son explotados por periodos extremadamente largos. En la campaña 2006-07, el 44,4% de los suelos se habían sembrado por 9 años consecutivos (Figura 5a). Este aspecto se enfatiza en la campaña 2009-10, en la

cual, los valores ascendían a 55,6% para los suelos con siembra consecutiva entre 10 a 12 años (Figura 5b).

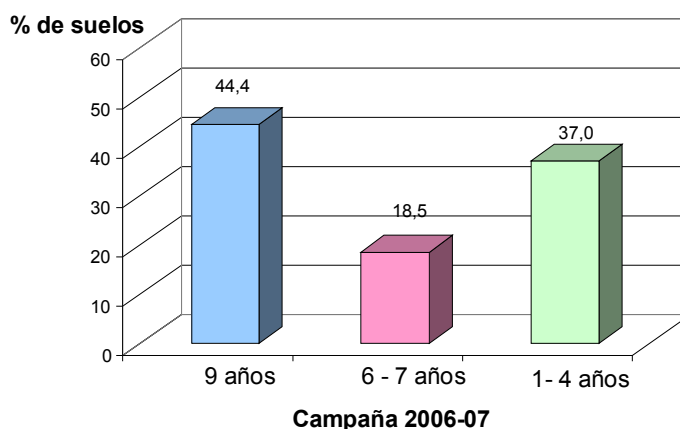


Figura 5a. Años de explotación de los suelos con tabaco en la Campaña 2006-07.

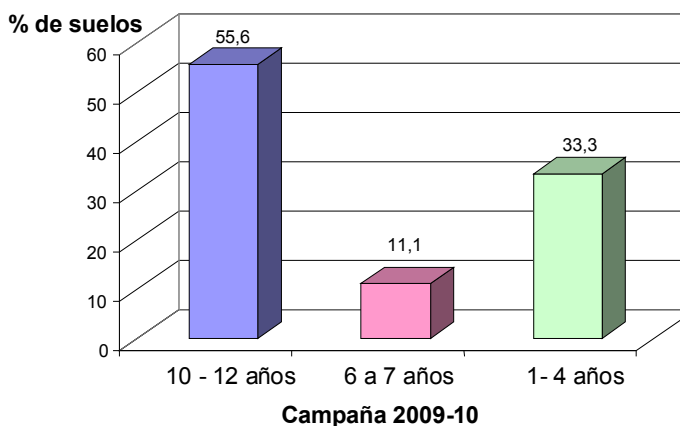


Figura 5b. Años de explotación de los suelos con tabaco en la Campaña 2009-10.

Internacionalmente, se reconoce la sobrevivencia en suelo de las especies del género *Phytophthora*. *P. nicotianae* sobrevive en forma de micelio, zoósporas, zoosporangios, quistes, clamidósporas y oósporas y sus propágulos pueden recuperarse hasta después de cinco años sin la siembra del cultivo (Csinos, 2005; Sullivan, 2005).

En Cuba, Peñalver *et al.* (1987), determinaron el efecto de la rotación de cultivos en la disminución de la incidencia de la pata prieta del tabaco y concluyeron que una rotación larga, de 3 a 4 años, fue más efectiva que las rotaciones de 1 o 2 años. Se considera que las clamidósporas del hongo constituyen la fase de hibernación en el suelo, debido a su estructura y capacidad para germinar tras largos meses de latencia, pero este aspecto no se ha verificado en la actualidad (Fernández, 1998). Durante mucho tiempo, la rotación de cultivos ha sido la principal práctica cultural que ha permitido obtener un óptimo uso de los nutrientes, además de lograr un adecuado control de malezas y de enfermedades (Gallup, Sullivan y Shew, 2010).

Los resultados en la caracterización de la patogenicidad de *P. nicotianae* en los suelos de Pedro Betancourt demostraron la no presencia de la raza 1, sin embargo, el alto porcentaje de los grupos de aislamientos identificados como raza 0 de alta e intermedia patogenicidad, son resultados importantes que influyen en las afectaciones que se producen por pata prieta en estos suelos. Esta situación, conjuntamente con la siembra reiterada de la variedad Criollo 98 durante periodos prolongados, ha provocando un aumento del potencial de inóculo en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt. Ejemplos que se exponen en la Tabla 7 resumen la influencia que aquí ejercen la variedad de tabaco y la secuencia varietal en las diferentes campañas sobre la expresión de la enfermedad pata prieta.

Tabla 7. Influencia de la variedad y secuencia varietal en las campañas tabacaleras sobre la distribución e intensidad del ataque de pata prieta.

Aislados	Campaña 2006-07			Campaña 2007-08			Campaña 2008-09			Campaña 2009-10		
	Var.	Enf. (%)	Inten. Enf.	Var.	Enf. (%)	Inten. Enf.	Var.	Enf. (%)	Inten. Enf.	Var.	Enf. (%)	Inten. Enf.
PB 4	C-98	43,5	4	C-98	31,0	4	Co-99	28,0	3	C-98	Demolido	4
PB 31	C-98	2,9	1	H-2000	0,0	0	Co-99	9	1	C-98	Demolido	3
PB 10	C-98	2	1	C-98	88,4	4	Co-99	28,1	3	C-98	Demolido	4

Leyenda: **Var.** = Variedad; **Enf:** = Enfermedad; **Inten:** = Intensidad; **C-98:** Criollo-98; **H-2000:** Habana-2000; **Co-99:** Corojo-99.

El campo identificado como PB 4 fue sembrado con la variedad Criollo 98 durante dos campañas consecutivas, provocando una afectación mayor que un 30%. En la campaña 2008-09, se cambió la variedad por Corojo 99, de mayor tolerancia a la pata prieta (Toledo, 2006) y se redujo el porcentaje de plantas enfermas a 28%. Sin embargo, al volver a utilizar la variedad Criollo 98 en la campaña 2009-10 se produjeron brotes epifitóticos severos que trajeron consigo la demolición del campo.

Para el campo PB 31, donde existían todavía bajas afectaciones (2,9%) en la campaña 2006-07, la variedad Habana 2000, sembrada en la campaña 2007-08, redujo la incidencia de la enfermedad a 0. Sin embargo, al cambiar la variedad por Corojo 99 en la campaña 2008-09, el porcentaje de plantas enfermas subió a 9% y cuando más tarde, en la campaña 2009-10, se retomó la variedad Criollo 98, el campo tuvo que ser demolido. En campos con altos niveles de inóculo se recomienda emplear la variedad Habana 2000, pues ésta es, dentro de las variedades comerciales, la de mayor resistencia a los grupos más virulentos de la raza 0 (Espino, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que, aunque fue muy efectiva para la campaña 2007-2008, no basta sembrarla sólo por un año para disminuir el potencial de inóculo del patógeno en los suelos. Similar comportamiento fue observado en el campo identificado como PB10, donde luego de haber obtenido afectaciones de 88,4% por la enfermedad en la campaña 2007-2008 con la variedad Criollo-98, se sembró la variedad Corojo 99 en la campaña 2008-09, que redujo la misma a un 28% de afectaciones, para posteriormente ser demolido en la campaña 2009-10 por sembrar nuevamente la variedad Criollo 98. Según Espino (2009, 2010) esta variedad de excelente rendimiento y alta productividad está recomendada en suelos con bajos niveles de propágulos/g de suelo de *P. nicotianae*.

En la actualidad, los programas de manejo para la enfermedad pata prieta en el Sur de África consisten en una buena rotación de cultivos, manejo de los niveles de nitrógeno en los suelos y rotación de variedades, además de alternativas de

productos químicos. Todas estas alternativas, disminuyen la presión de selección y la alta agresividad de los aislamientos y evitan la aparición de nuevas razas del patógeno (Van, Wingfield y Drenth, 2002).

Para América del Norte, las densidades de inóculo son manejadas mediante secuencia de variedades y resistencia del hospedante a *P. nicotianae*. En la Florida también existen alternativas para el manejo de la enfermedad pata prieta, que consisten en alternar, para el manejo de las razas del patógeno, las variedades de tabaco con resistencia parcial y total, además de emplear cultivares medianamente resistentes con aplicaciones de productos químicos (Kucharek, 2004; Sullivan *et al.*, 2010; Parkunan, Johnson and Hong, 2010).

Otras alternativas internacionales han demostrado muy buenos resultados con el uso de *Trichoderma*. Argentina, al igual que Cuba, realiza aplicaciones de este control biológico para el manejo de enfermedades fúngicas del suelo en tabaco (Gasoni *et al.*, 2004).

En Cuba, Fernández *et al.* (2002) establecieron estrategias efectivas para evitar epifitias por pata prieta en tabaco, las cuales consistieron en la selección de campos con bajos niveles de inóculo, la solarización y la rotación de cultivos, como medidas agrícolas y en el uso de *Trichoderma harzianum* en función del nivel de infestación del suelo como control biológico. La misma autora demostró y recomendó la determinación de la densidad de inóculo para cuantificar el nivel de infestación de los suelos antes de la siembra del cultivo, conjuntamente con el empleo de aplicaciones de fungicidas. Todas estas acciones permitieron establecer el manejo de la enfermedad, disminuir los riesgos de epifitias y reducir las pérdidas en el cultivo del tabaco por la enfermedad pata prieta.

Otras medidas incorporadas para mitigar las pérdidas por pata prieta consisten en seleccionar la variedad en dependencia de la intensidad y el grado de afectación en el campo (Espino, 2008). En los campos con altas afectaciones se orienta sembrar la variedad más resistente y aplicar *Trichoderma* y Previcur, con recomendaciones de plantar el cultivo en el mes de noviembre (Espino, 2009).

Existe en Cuba un programa bien estructurado para el manejo de la enfermedad pata prieta, sin embargo, su alta incidencia sigue provocando daños económicos

en diferentes zonas del país, y el municipio de Pedro Betancourt, en la provincia de Matanzas, no está libre de esta problemática. Tanto la selección y descanso de los suelos, como la rotación de cultivos y el empleo de estrategias varietales más resistentes al patógeno y a los grupos patogénicos de la raza 0 identificados, conjuntamente con la implementación de las determinaciones de la densidad de inóculo de *P. nicotianae*, serán acciones que deberán acometerse para un manejo racional de los suelos y el control eficiente de la enfermedad pata prieta.

8. CONCLUSIONES

1. Se estableció una colección de 27 aislamientos de *P. nicotianae* procedentes de los suelos tabacaleros del municipio de Pedro Betancourt, provincia de Matanzas.
2. Se identificó *P. nicotianae* en todos los suelos monitoreados, de los cuales, el 72% mostró niveles de inóculo del patógeno entre medio y alto.
3. Las razas 1, 3 y 4 no fueron identificadas entre los aislamientos de *P. nicotianae*.
4. Los mayores porcentajes de aislamientos de la raza 0 (55,6 y 29,6%) coincidieron con los grupos de alta e intermedia patogenicidad.
5. La no rotación de cultivos, la alta densidad de inóculo y el número de aislamientos de alta patogenicidad de la raza 0 de *P. nicotianae* son las causas que favorecen la alta incidencia de la enfermedad pata prieta en el municipio Pedro Betancourt de la provincia de Matanzas.

9. RECOMENDACIONES

- ✚ Iniciar un programa de manejo de la enfermedad pata prieta en los suelos tabacaleros del municipio de Pedro Betancourt, que tenga en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apple, J. L. 1962. Physiological specialization with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 52: 351-392.
2. Apple, J. L. 1963. Plant Dis. Rep. 47: 632-634.
3. Apple, J. L. 1967. Occurrence of race 1 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in North Carolina and its implications in breeding for disease resistance. *Tobacco Science* 11: 79-83.
4. Bayer. 2009. Portafolio de Productos, Cuba 2009. Bayer Cropscience. p.10.
5. Blancard, D. 1995. Integrated Control and Tobacco cultivation. *Coresta* 2: 15-16.
6. Bonnet, P.; Lacourt, I.; Venard, P. and Ricci, P. 1994. Diversity in pathogenicity to tobacco and in elicitor production among isolates of *Phytophthora parasitica*. *J. of Phytopathology* 141: 25-37.
7. Camporota, P. 1980. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol xv. Choix d'une plante piège et caractérisation des souches de *Rhizoctonia solani* pour la mesure du potentiel infectieux des sols et substrats. *Ann. Phytopathol* 12 : 31-44.
8. Carr, Aidanet y Elosegui, O. 2005. Guía de las buenas prácticas en la utilización de bioplaguicidas. III Curso-Taller Nacional para la Formación de Facilitadores en Lucha Biológica. Loma Blanca, II Frente, Santiago de Cuba, Cuba. 24 - 29 de enero.
9. Carr, Aidanet. 2003. Resultados del ejercicio para compilar los bioplaguicidas que tienen tecnologías y su utilización. Curso-Taller para la formación de facilitadores provinciales en control biológico (Primer Ciclo) Santa Clara, Villa Clara, Cuba. 15 - 19 de septiembre.
10. Centro Nacional de Sanidad Vegetal. 2001. Programa de defensa del cultivo del tabaco. Ministerio de la Agricultura. La Habana. p. 28.
11. Chaboussou, F. 1987. Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos (A teoria da trofobiose). Ed. L. y PM. Porto Alegre, Brasil. p. 256.

12. Colas, V. ; Lacourt, I. ; Ricci, P. y Vanlerberghe-Masutti, F. 1998. Diversity of virulence in *Phytophthora parasitica* on tobacco, as reflected by nuclear RFLPs. *Phytopathology* 88: 205-212.
13. Csinos, A. S. 2005. Relationship of isolate origin to pathogenicity of race 0 and 1 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* on tobacco cultivars. *Plant Diseases* 89: 332-337.
14. Empresa de Acopio y Beneficio de Tabaco Matanzas. 2011. Informe Decenal de Tabaco (1 al 10 de enero). Material mecanografiado.
15. Empresa de Acopio y Beneficio Matanzas. 2006. Carta Tecnológica para el cultivo de tabaco tapado (Material mecanografiado). pp. 2-4
16. Erwin, D. C. y Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide, St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society. p. 568.
17. Espino, E. 1996. Cuban's Cigar Tobacco. T. F. H. Publication, Inc. p. 79.
18. Espino, E. 2003. Informe de las incidencias negativas en la fase agrícola del tabaco durante la temporada 2002-2003. Instituto de Investigaciones del Tabaco, Tabacuba (Informe interno, IIT). p.7.
19. Espino, E. 2006a. Estrategia varietal para la campaña 2006-07. Informe a Tabacuba (Informe interno, IIT). p. 3.
20. Espino, E. 2006b. Manual Práctico del supervisor agrícola del tabaco. La Habana. Cuba. Agrinfor. pp.7-9.
21. Espino, E. 2008. La biodiversidad, su importancia y cuidado. Guía para el cultivo del tabaco 2008-2009. La Habana. Agrinfor. p. 8.
22. Espino, E. 2009. Guía para el cultivo del tabaco 2009-2010. La Habana. Agrinfor. p.7.
23. Espino, E. 2010. Guía para el cultivo del tabaco 2010-2011. La Habana. Agrinfor. p.6.
24. Espino, E.; Rey, X.; García, V. y Peñalver, N.1997. 'Habana-92' y 'Habana-2000', dos nuevas variedades de tabaco negro cubanas resistentes al moho azul (*Peronospora tabacina*). *Rev. Cubana de Agricultura* 1 (1): 15-24.
25. Estación de Protección de Plantas Jovellanos. 2009. Informe campaña tabacalera 2008-2009. Matanzas. p. 6.

26. Estación de Protección de Plantas Jovellanos. 2010. Informe campaña tabacalera 2009-2010. Matanzas. p. 8.
27. Fairholt, F. W. 1859. Tobacco: Its history and associations. London, Chapman Hall. p.332.
28. Fernández, Ana. 1998. Biología, epidemiología, nocividad y control de *Phytophthora nicotianae* (*Phytophthora parasitica*) en tabaco. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba. pp. 100.
29. Fernández, Ana; Marín, Daniesyi; Sáenz, Mercedes; Ramírez, Rebeca; González, Marleny y Ramos, Elda. 2006. Elementos básicos para lograr un control efectivo de los hongos del suelo. Fitosanidad 10 (2): 157.
30. Fernández, Ana; Muiño, Berta Lina; Toledo, Verónica; Martínez, María L.; Wong, Wendy; Arévalo, Raquel; Ariosa, María D. y Hernández, Adriana. 2002. Estrategias de lucha para evitar epidemias provocadas por la enfermedad pata prieta del tabaco en Cuba. Fitosanidad 6 (1): 36-37.
31. Fernández, Ana; Toledo, Verónica y Rey, X. 1998. Determinación de parámetros óptimos para la detección de *Phytophthora nicotianae* en suelo mediante un método de cebo. Fitosanidad 2 (1-2): 7-10.
32. Fernández-Larrea, Orietta. 2006. Producción y uso de microorganismos para el control de plagas agrícolas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba. pp. 4-9.
33. Fernández-Larrea, Orietta. 2007. Pasado, presente y futuro del control Biológico en Cuba. Fitosanidad 11 (3): 61.
34. Gallup, A.; Sullivan, M.; Nesmith, C. y Shew, H. D. 2006. Occurrence of race 4 of *Phytophthora nicotianae* in tobacco. Southern Division Meeting Abstracts February 5-7, Orlando, Florida.
35. Gallup, C. A. y Shew, H. D. 2006. Race stability in *Phytophthora nicotianae*, the causal agent of black shank of tobacco. Phytopathology 96 S: 37.
36. Gallup, C. A.; Sullivan, M. J. and Shew, H. D. 2010. Black shank of tobacco. Search APSnet. [Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/oomyces/>] [Consulta: Marzo 14/2010].

37. García, V.; Mena, E.; Santana, N.; Hernández, B. y Mestre, R. 2002. Rendimiento total y en capa de nuevas variedades comerciales. *CubaTabaco* 1 (11): 25-32.
38. Gasoni, L.; Kahn, N.; Yokohama, K.; Chiessa, G. and Kobayashi, K. 2008. Impact of *Trichoderma harzianum* biocontrol agent on functional diversity of soil microbial community in tobacco monoculture in Argentina. *World J. Agric. Sci.*, 4 (5): 527-532.
39. Gómez, Liliana. 2002. Tabaco. En: Pequeña enciclopedia del medio ambiente. Editorial Oriente. Santiago de Cuba. p.158.
40. Hall, G. 1993. An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora nicotianae* and a redescription of the species. *Mycol. Res.* 97: 559-574.
41. Hendrix, J. W. y Flowers, R. A. 1967. Development races of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in Tennessee in 1966. *Tobacco* 167: 24-25.
42. Herrera, L.; Camara, M. y Galantai, E. 1989. Bioecología y métodos de lucha contra hongos fitopatógenos del suelo en Cuba. Monografía. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
43. Ho, H. H. y Lu, J. Y. 1997. A synopsis of the occurrence and pathogenicity of *Phytophthora* species in mainland China. *Mycopathologia* 138:143-61.
44. Iglesias, A. 2003. Biodiversidad y sistemas de cultivo. En: Caminando hacia una agricultura sostenible. Centro Nacional de Capacitación de la ANAP "Niceto Pérez". p.67.
45. Instituto de Investigaciones del Tabaco. 2001. Manual técnico para el cultivo del tabaco negro tapado. Ministerio de la Agricultura. La Habana. p.6.
46. Instituto de Investigaciones del Tabaco. 2007. Guía para el cultivo del tabaco. La Habana. Agroinform. p. 4.
47. Kannwischer, E. y Mitchell, I. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. (Abstr.). *Pro. Ann. Phytopathol. Soc.* 3: 338.
48. Kannwischer, M. E. and Mitchell, D. I. 1981. Relationships of number of spores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. *Phytopathology (USA)* 71: 69-73.

49. Kröber, H. 1985. Erfahrungen mit *Phytophthora* de Bary and *Pythium* Pringsheim. En: Mitt. Biol. Berlín: (s.n.): 175.
50. Kucharek, T. 2004. University of Florida Plant Protection Pointers Extension. Plant Pathology Report 23. Gainesville, Florida, Disease Control Program For Flue-Cured Tobacco.
51. Lacourt, I. 1992. Report of the Task force on the typology of black shank strains. *CORESTA* (3/4): 81-87.
52. Lacourt, I.; Panabieres, A. y Marais, P. 1994. Intraespecific polymorphism of *Phytophthora parasitica* revealed by analysis of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *Mycol. Res.* 98: 562-568.
53. Li, B. C. y Bass, W. T. 2006. Resistance to tobacco Black Shank in *Nicotiana* species. *Crop. Sci.* 46: 554-560.
54. Lucas, G. B. 1965. Enfermedades del tabaco. Instituto del Libro. La Habana. Cuba. p.174.
55. Lucas, G. B. 1975. Black shank. En: Diseases of tobacco. Biological Consulting Associates. Raleigh. p. 115-141.
56. Madariaga, C. y Betancourt, E. 2008. Estrategia fitosanitaria para la campaña agrícola 2008-2009. Guía para el cultivo del tabaco 2008-2009. La Habana. Cuba. Agroinform. p.36.
57. Marín, N. Plaza, G. y Rojas, J. 2008. Evaluación técnica y económica de alternativas de fertilización y enmiendas en tabaco Virginia (*Nicotiana tabacum*) en la región García Rovira, Santander (Colombia) *Agro. Colombiana* 26 (3): 22-35.
58. Martínez, E.; Barrios, G.; Rovesti, L. y Santos, R. 2007. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal. La Habana. Cuba. pp. 326-328.
59. McIntyre, J. L. y Taylor, G. S. 1978. Race 3 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 68: 35-38.
60. Méndez, C. 2001. Estrategia Varietal de la campaña 2001-2002 en la provincia Matanzas. (Material mecanografiado). p. 5.

61. Miller, M. 1996. Methyl Bromide: Technical and Economic Feasibility of Replacing in Developing Countries. Canada, E.U. Trends of the couth, (Case studies in Zimbabwe, Thailand and Chile).
62. Ministerio de la Agricultura (MINAGRI). 1998. Instructivo técnico para el cultivo del tabaco. Agrinfor. La Habana. p. 128.
63. Ministerio de la Agricultura (MINAGRI). 2002. Manual Práctico para el manejo de plagas en el cultivo del tabaco. Centro Nacional de Sanidad Vegetal. La Habana. Cuba. p.13.
64. Ministerio de la Agricultura (MINAGRI). 2007. Programa para reducir las afectaciones causadas por patógenos del suelo en el cultivo del tabaco. Centro Nacional de Sanidad Vegetal. La Habana. Cuba. p 2.
65. Ministerio de la Agricultura (MINAGRI). 2008. Manual Práctico para el manejo de plagas en el cultivo del tabaco. Centro Nacional de Sanidad Vegetal. La Habana. Cuba. p. 7.
66. Muiño, Berta Lina. 2009. El Manejo Integrado de Plagas en el cultivo del tabaco. La Habana. INISAV. 54 diapositivas.
67. Muiño, Berta Lina; Sáenz, Mercedes; Stefanova, Marusia; Porros, Angela y Díaz, Isabel. 2001. Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo del tabaco. Fitosanidad 5 (2): 3.
68. Murguido, C. y Elizondo, Ana. 2007. El manejo integrado de plagas de insectos en Cuba. Fitosanidad 11 (3): 23.
69. Nielsen, M. T. 1992. Collaborative Experiment on black shank. CORESTA ¾: 74-78.
70. Nielsen. M. T. 1995. Black skank collaborative study. CORESTA (1): 36-41.
71. Parkunan, V.; Johnson, C. and Hong, C. 2010. Diversity of the tobacco black shank pathogen, *Phytophthora nicotianae*, in Virginia. Phytopathology 100S: 97.
72. Peñalver, N. 1983. Razas fisiológicas de *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*. Ciencia y Técnica en la Agricultura, Tabaco 6: 47-64.
73. Peñalver, N. J.; Padrón, J. y García, M. 1987. Utilización de un esquema de rotación para estudiar la longevidad de *Phytophthora parasitica* var.

- nicotianae* en los suelos Ferralítico Cuarcíticos Amarillos Lixiviados. Ciencia y Técnica en la Agricultura, Tabaco 10: 15.
74. Peñalver, N. y García, M. 1988. Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, *Rhizoctonia* y *Pythium*. Ciencia y Técnica en la Agricultura, Tabaco 11: 41-51.
75. Pérez, Cristina. 1990. Biología, ecología y métodos de lucha contra *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Waterhouse. Ciego de Ávila: Tesis (en opción al grado científico de Candidato a Doctor en Ciencias Agrícolas). Instituto Superior Agrícola. Ciego de Ávila, Cuba. p.100.
76. Pérez, M. S. 2003. Variabilidad cultural, patogénica y genética del agente causal del tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de La Habana. Cuba. p. 94.
77. Pérez, Nilda. 2003. Manejo Agroecológico de Plagas. En: Caminando hacia una agricultura sostenible. Centro Nacional de Capacitación de la ANAP "Niceto Pérez". p.153.
78. Pérez, Nilda. 2006. Manejo Ecológico de plagas. Editorial Félix Varela. La Habana. Cuba. p. 75.
79. Pino, Luisa; García, G.; Quintana, G.; Torrecilla, G. y Espino, E. 2002. Nuevas variedades de tabaco negro resistente a las principales enfermedades productoras de capas y capotes. Cubatabaco 1(4): 23-31.
80. Prinsloo, C. y Pauer, C. 1974. Die identifikasie van rasse van *Phytophthora nicotianae* B de Haan var. *nicotianae* wat in Suid-Afrika voorkom. *Phytophylactica* 6: 217- 220.
81. Rivera, R.; Fernández, F.; Hernández, A.; Martín, R. y Fernández, Kalyanne. 2003. El manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia una agricultura sostenible. Estudio caso: El Caribe. Ediciones INCA, La Habana, Cuba. p. 166.
82. S.C.P. 1998. Sistema para Comparación de Proporciones, ver. 2.1, CENSA.
83. Shew, D.; Sullivan, J. y Melton, A. 2005. Managing the population structure of *Phytophthora nicotianae*. CORESTA, Agro-Phyto Groups Meeting, Santa Cruz do Sul, 23-28 de Octubre. p. 78.

84. Shew, H. P. and Lucas, G. B. 1991. Compendium of tobacco diseases. American Physiological Society/eds H. D. Shrew and G. B Lucas St Paul Nem. p. 90.
85. Smith, T. E. 1947. Plant Dis. Rep. 31: 120.
86. Smith, W. D. and Wood, S. 2005. Nutrient management. En: 2005 Flue-cured tobacco information. pp. 65-91 [Disponible en :<http://ipm.ncsu/Productionguides/Flue-cured/2005/contents.html>]. [Consulta: Noviembre 5/2010].
87. Stamps, J.; Waterhouse, M.; Newhook, J. y Hall, S. 1990. Revised tubular key to the species of *Phytophthora*. 2nd ed. Mycological Paper 162. Commonwealth Agricultural Bureaux International Mycological Institute, Wallingford, Oxfordshire, England.
88. Statistica plus for Windows. 1998. [Disponible en: <http://www.statsoft.com>.] [Consulta: 12 de Marzo 12/2005].
89. Stefanova, Marusia; Sandoval, Ileana; Martínez, María L.; Heredia, Irma; Ariosa, María D. y Arévalo, Raquel. 2004. Control de hongos fitopatógenos del suelo en semilleros de tabaco con *Trichoderma harzianum*. Fitosanidad 8 (2): 34.
90. Su, Ning y Zhang, X. G. 2001. Random amplified polymorphic DNA analysis of China isolates of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from different districts. *Journal of Agricultural University of Hebei*: 32-36.
91. Sullivan, J.; Melton, A. y Shew, D. 2005. Managing the race structure of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* with cultivar rotation, *Plant Diseases* 89: 1285-1294.
92. Sullivan, L.; Parks, J.; Cubeta, A.; Gallap, A.; Melton, A.; Moyer, W. and Shew, D. 2010. An Assessment of the Genetic Diversity in a Field Population of *Phytophthora nicotianae* with a Changing Race Structure *Plant Diseases* 94 (4): 455-460.
93. Sullivan, M. J. 2004. Characterization and management of the race structure of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Theses Ph. D. Phytopathology Department Plant Pathology, North Carolina State University. p.95.

94. Sullivan, M. J. 2005. Black Shank [Disponible en: <http://www.ces.ncsu.edu/depts/course/pp>] [Consulta: Marzo 10/2011].
95. Summer, D. R.; Threadgell, E. D.; Smittle, D. A.; Phatak, S. C. y Johnson, A. W. 1986. Conservation tillage and vegetable diseases. *Plant Disease* 70: 906-911.
96. Toledo, Verónica. 2006. Comportamiento de variedades de tabaco negro cubanas frente a las razas 0 y 1 de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan CUBATABACO 7 (1): 27-31.
97. Toledo, Verónica. 2008. Variabilidad cultural, patogénica y molecular de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, agente causal de la enfermedad pata prieta del tabaco en Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), La Habana, Cuba. pp.45- 99.
98. Toledo, Verónica. 2009. Informe del comportamiento actual de las variedades comerciales de tabaco negro frente a la enfermedad pata prieta. Propuestas para la mejora de su resistencia. Informe Interno IIT p. 10.
99. Toledo, Verónica. 2010. Determinación de densidad de inóculo de *P. nicotianae* en los suelos tabacaleros, herramienta alternativa para el manejo y selección de los mismos. Informe Interno Instituto de Investigaciones del Tabaco. p. 6.
100. Toledo, Verónica; Infante, C. y González, M. 1998. Densidad de inóculo de *Phytophthora nicotianae* en áreas tabacaleras de Provincia La Habana, MINAGRI. La Habana, Cuba. p. 6.
101. Truong, R. 1996. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* sp. from tobacco and its distribution in tobacco areas. 27 Anniversaries and Annual Scientific Meeting of the Philippine Phytopathological Society. Davao City (Philippines). 7-10 Mayo.
102. Tsao, H. 1983. Factors affecting isolation and quantification of *Phytophthora* from soil. En: *Phytophthora : Its biology, taxonomy, ecology and pathology*/eds. P. H. Tsao; D. C. Erwin; S. Bartnick-García. St. Paul Minnesota: The American Phytopathological Society: 392.

103. Van, E. Wingfield, J. y Drenth, A. 2002. *Evaluation of tobacco cultivars for resistance to races of Phytophthora nicotianae in South Africa.* *J of Phytopathology* 150:456-462.
104. Vázquez, L. 2006. La lucha contra las plagas agrícolas en Cuba. De las aplicaciones de plaguicidas químicos por calendario al manejo agroecológico de plagas. *Fitosanidad* 10 (3): 221.
105. Wagner, B. 2006. Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. *Fitosanidad* 10 (2): 87.
106. Waterhouse, M. 1963. Key to species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. Pap.* (UK) 92: 22.
107. Weste, G. 1983. Populations dynamics and survival of *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*/eds. G. Weste; D. C. Erwin; S. Bartnick- García; P. H. Tsao. St. Paul Minnesota: The American Phytopathological Society: 237-257.
108. Zhang, G.; Luo, F.; Li, Y. y Zhang, Y. 2003. Genotypic and pathogenic variation among black shank of tobacco isolates of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from main tobacco regions of Yunnan province and tobacco regions of Shadong in China. *J. of Phytopathology* 5: 259-266.

11. ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 4. Densidades de inóculo de *P. nicotianae* en los suelos tabacaleros de Pedro Betancourt.

Identificación	Productor	Densidad inóculo Propágulos/g de suelo
PB 1	Luís Romillo	5,5
PB 3	Kenia Zamora	6
PB 4	Rober Remis	4
PB 5	Yusdel Sarmiento	11
PB 6	Ariel Hernández	2
PB 7	Antonio Pauza	4
PB 8	Pablo Navarro	4,5
PB 9	Manuela Castellon	4
PB 10	Vladimir Pedroso	3,5
PB 15	Nicomedes Herrera	7
PB 16	Alejandro Cruz	2
PB 23	Ricardo Benítez	4
PB 24	Camilo Martínez	2
PB 25	Alain Prado	3,5
PB 27	Juan A. Noriega	3,5
PB 28	Maikel Herrera	4,5
PB 29	Antonio Robaina	4
PB 31	María C. Sardinás	15
PB 32	Carlos Pereira	2
PB 33	Jorge Guerra	2,5
PB 34	Roberto Yáñez	2,5
PB 35	Juan Luís Perdomo	2,5

PB 36	Idelkis Boi Casaña	5,5
PB 37	Orlando Ramos	3,5
PB 38	Roberto González	4
PB 39	Yoel González	5
PB 40	Sergio Triana	2

Anexo 2.

Tabla 5. Valores promedio de Intensidad de ataque del patógeno en los grupos patogénicos de *P. nicotianae*.

Genotipos	Raza 0 gr.- 1	Raza 0 gr.- 2	Raza 0 gr.- 3
Habana 2000	56,7	40,0	10
Corojo Especial	46,7	24,6	5
<i>N. plumbaginifolia</i>	0	0	0

Anexo 3.

Tabla 6. Identificación de los grupos patogénicos de la raza 0 en los aislamientos de *P. nicotianae*.

Identificación	Productor	Grupos Patogénicos
PB 1	Luis Romillo	Raza 0 Grupo 2
PB 3	Kenia Zamora	Raza 0 Grupo 1
PB 4	Rober Remis	Raza 0 Grupo 3
PB 5	Yusdel Sarmiento	Raza 0 Grupo 3
PB 6	Ariel Hernández	Raza 0 Grupo 1
PB 7	Antonio Pauza	Raza 0 Grupo 1
PB 8	Pablo Navarro	Raza 0 Grupo 3
PB 9	Vega 4 Manuela	Raza 0 Grupo 1
PB 10	Vega 5 Vladimir	Raza 0 Grupo 1
PB 15	Nicomedes Herrera	Raza 0 Grupo 2
PB 16	Alejandro Galindo	Raza 0 Grupo 3
PB 23	Ricardo Benítez	Raza 0 Grupo 2
PB 24	Camilo Martínez	Raza 0 Grupo 1
PB 25	Vega 2 Neno	Raza 0 Grupo 1
PB 27	Vega 3 J. Carlos Catalla	Raza 0 Grupo 2
PB 28	Maikel Herrera	Raza 0 Grupo 1
PB 29	Antonio Robaina	Raza 0 Grupo 2
PB 31	Carmen Sardiñas	Raza 0 Grupo 2
PB 32	Carlos Peteira	Raza 0 Grupo 2
PB 33	Jorge Guerra	Raza 0 Grupo 1
PB 34	Roberto Yanes	Raza 0 Grupo 1
PB 35	Juan Luis Perdomo	Raza 0 Grupo 2
PB 36	Vega 1 Idenkis	Raza 0 Grupo 2
PB 37	Orlando Ramos	Raza 0 Grupo 1
PB 38	Roberto González	Raza 0 Grupo 2
PB 39	Yoel González	Raza 0 Grupo 1
PB 40	Sergio Triana	Raza 0 Grupo 1