

**Plasmopara halstedii EN LAS PROVINCIAS DE BUENOS AIRES Y SANTA FE:  
DETERMINACION RACIAL E IDENTIFICACION DE FUENTES DE RESISTENCIA.**

Trabajo Final de Grado  
del alumno



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Junín, 22 de mayo de 2019

***Plasmopara halstedii* EN LAS PROVINCIAS DE BUENOS AIRES Y SANTA FE:  
DETERMINACION RACIAL E IDENTIFICACION DE FUENTES DE RESISTENCIA.**

Trabajo Final de Grado

del alumno

**JONATHAN EMILIO ROJAS SANCHEZ**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

**Evaluador**

**Evaluador**

**Evaluador**

Ing. Agr.  
Antonio Ivancovich  
**Co-Director**

Ing. Agr.  
Amelia Bertero de  
Romano

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Junín, 22 de mayo de 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires por formarme académicamente, y permitirme cumplir objetivos personales y profesionales.

A mi directora de tesis, Ing. Agr. Amelia Bertero de Romano, y codirector, Ing. Agr. Antonio Ivancovich, por la buena predisposición, por la paciencia y por guiarme durante la realización de este trabajo.

A la empresa Nidera S.A. e integrantes del programa de mejoramiento genético de girasol, por brindarme el espacio y la infraestructura donde desarrollar este trabajo.

A mis compañeros de carrera y de largas horas de estudio durante estos años, a mis compañeros de intercambios académicos, que se convirtieron en amigos gracias a la universidad, por compartir gran parte de esta etapa.

A mis amigos de toda la vida, por siempre estar presentes en cada paso.

A mis hermanos, Paula, Virginia, Enrique y Patricio por su apoyo en todo momento, y a mis sobrinos: Lourdes, Bruno, Valentina y Darío.

A Sofía, por su contención, acompañamiento incondicional y por siempre incentivarme a plantearme y lograr nuevas metas. A su familia, Adrián, Patricia y Julieta, por su estímulo constante para progresar.

A mis tíos y primas; Silvia, Horacio, Regina y Sofía, por animarme siempre a seguir superándome y por disfrutar mis logros como si fueran suyos. Por confiar y creer en mí, muchas veces, más que yo mismo.

A mi familia: Hector, Susana y Enzo, porque con su sacrificio me dieron la posibilidad de llegar a esta instancia, por apoyarme en todos los sentidos, por guiarme cada paso de la vida. Por ser el pilar fundamental, y mi ejemplo a seguir. Este título es más suyo que mío.

## ÍNDICE

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	5-6
Introducción.....	6
<i>Plasmopara halstedii</i> : Taxonomía.....	6-7
<i>Plasmopara halstedii</i> : Condiciones predisponentes.....	7
<i>Plasmopara halstedii</i> : Ciclo de vida.....	7-9
<i>Plasmopara halstedii</i> : Síntomas y signos.....	9
<i>Plasmopara halstedii</i> : Manejo de la enfermedad.....	9-13
Objetivos e hipótesis.....	13
Materiales y métodos.....	13-19
Resultados.....	19-27
Discusión.....	28
Conclusión.....	30
Bibliografía.....	31-32
Anexo.....	33

## ***Plasmopara halstedii* EN LAS PROVINCIAS DE BUENOS AIRES Y SANTA FE: DETERMINACION RACIAL E IDENTIFICACION DE FUENTES DE RESISTENCIA.**

**PALABRAS CLAVE:** Mildiu, girasol, líneas diferenciales, *Plasmopara halstedii*, razas.

### **RESUMEN**

Una de las principales enfermedades que afectan al cultivo del girasol (*Helianthus annuus* L.) es el mildiu ocasionado por *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni (*Oomycete*). En ambientes favorables para el desarrollo de la enfermedad, temperaturas frescas y condiciones de agua libre; y en coincidencia, con la presencia de cultivares susceptibles, se pueden alcanzar niveles muy altos de incidencia, registrándose lotes con valores de hasta un 98% de plantas enfermas. Entre los síntomas característicos del mildiu se destacan una marcada reducción en el tamaño de la planta y clorosis alrededor de las nervaduras principales en el haz foliar, acompañada en el envés foliar, por una eflorescencia blanquecina constituida por las fructificaciones asexuales del patógeno. La infección primaria frecuentemente ocasiona la muerte de la plántula. Sin embargo, si logra alcanzar la madurez, la producción de semilla es nula. La infección secundaria determina la reducción del tamaño de la planta, con producción o no de simiente, aunque en caso de producir semilla, las mismas son portadoras del micelio del hongo. El agente causal tiene la capacidad de presentar razas fisiológicas. Una de las estrategias de manejo más efectiva para controlar el mildiu, es el uso de materiales resistentes portadores de genes denominados *PI*, que proveen resistencia frente a esta enfermedad, entre los cuales pueden mencionarse los genes *PI<sub>13</sub>*, *PI<sub>14</sub>*, *PI<sub>16</sub>*, *PI<sub>ARG</sub>*, *PI<sub>18</sub>*, *PI<sub>17</sub>*, *PI<sub>19</sub>*, *PI<sub>1</sub>*, *PI<sub>2</sub>*, *PI<sub>6</sub>*, *PI<sub>7</sub>*, *PI<sub>15</sub>*, *PI<sub>20</sub>*, *PI<sub>5</sub>*, *PI<sub>8</sub>* y *PI<sub>21</sub>*. Los genes *PI<sub>6</sub>* y *PI<sub>15</sub>*, proveían resistencia a las razas 730, 770 y 710, las únicas presentes en Argentina hasta el año 2013. Durante dicho año, se detectaron lotes de cultivares portadores del gen *PI<sub>15</sub>* afectados por mildiu, evidenciando la aparición de nuevas razas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la posible virulencia de *P.halstedii*, agente causal del mildiu en girasol en Argentina e identificar fuentes de resistencia a la nueva raza. Se realizó la recolección de muestras de plantas con síntomas en lotes ubicados en diferentes localidades de la provincia de Buenos Aires y Santa Fe, durante el año 2014/2015. Dichas muestras fueron incrementadas y posteriormente inoculadas en laboratorio, en un set de líneas

diferenciales internacionales e logró determinar la presencia en Argentina de una nueva raza del patógeno, la cual se identificó como 710601, según la designación de razas internacionalmente aceptada. Del mismo modo, se evaluó la resistencia provista por diferentes genes frente a todas las razas presentes en Argentina, incluida la 710601, verificándose la eficiencia de  $Pl_6$ ,  $Pl_8$ ,  $Pl_{17}$  y  $Pl_{ARG}$ .

El conocimiento de la presencia de esta raza, como así también de los genes posibles de ser utilizados para su control, permitirá a los mejoradores introducirlos en los nuevos cultivares.

## **INTRODUCCION**

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los principales cultivos en Argentina. La producción nacional de girasol para el año 2017/2018 fue de 3.500.000 toneladas, lo que representa un incremento del 6% en la producción con respecto al año anterior, mientras que la superficie ocupada por este cultivo es de 1.750.000 hectáreas, un 3 % mayor al área sembrada el año anterior. (MinAgro, 2018)

Entre las enfermedades bióticas prevalentes en las zonas productoras de girasol en la Argentina se destacan, por su difusión e importancia, el “Marchitamiento” causado por *Verticillium dahliae* Kleb., “Podredumbre blanda del capítulo”, cuyo agente causal es *Sclerotinia sclerotiorum* De Bary y “Mildiu”, producido por *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni (Bertero de Romano, 1986)

*Plasmopara halstedii* es un *Stramenopila*, perteneciente a la clase de los *Oomycetes* y es un parásito obligado del girasol. Por su amplia difusión y los daños que ocasiona es capaz de producir una de las enfermedades de mayor impacto en las zonas girasoleras del mundo (Perez Fernandez, 2002). Las pérdidas en el rendimiento que puede producir están estimadas en un 3.5% de la producción comercial de semillas, en presencia de métodos de control, y en campos contaminado con el patógeno puede aumentar hasta un 100% (Gascuel et al. 2014)

### **Clasificación taxonómica de *Plasmopara halstedii***

- Dominio: *Eukarya*
- Reino: *Stramenopila*
- Phylum: *Oomycota*

- Orden: *Peronosporales*
- Género *Plasmopara*
- Especie: *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni, (1888)

### **Condiciones predisponentes**

Las condiciones que predisponen el ataque del patógeno -bajas temperaturas (12-20 °C) y presencia de agua libre (lluvias intensas y encharcamientos)- favorecen la liberación y el desplazamiento de las zoosporas biflageladas del pseudo-hongo hasta las plantas, infectándolas (Tourvieille *et al.*, 2000).

Si bien los síntomas de la enfermedad pueden manifestarse en todas las etapas de desarrollo del cultivo, los daños más graves se registran cuando el ataque se produce en estadios más tempranos (Pereyra & Escande , 1994).

### **Ciclo de vida del *Plasmopara halstedii***

Los pseudo-hongos de la clase *Oomycetes*, pueden presentar dos tipos de reproducción: I) Homotática: en la cual las células de reproducción sexual (oogonia y anteridia) son producidas por el mismo organismo, lo que puede dirigir a la reproducción cruzada, o en caso de ausencia de mecanismos de autoincompatibilidad puede conducir al autocruzamiento; y II) heterotática: en la cual las células reproductivas sexuales son producidas por dos organismo diferentes, conduciendo solamente a la posibilidad de reproducción cruzada.

*Plasmopara halstedii* es un organismo diploide, homotático y ha demostrado reproducción de tipo sexual y asexual en condiciones de laboratorio.

La reproducción sexual homotática se ha demostrado que ocurre luego de la inoculación de plántulas de girasol con zoosporas simples. Esto es importante en epidemiología, debido a que una única zoospora a campo puede conducir a la contaminación del suelo con oosporas.

Las poblaciones silvestres de *Plasmopara halstedii* son homotáticas y carecen de mecanismos de autoincompatibilidad, lo que permite el autocruzamiento o la reproducción cruzada. (Gascuel *et al.* 2014).

Esta característica permite al patógeno evolucionar rápidamente, generando nuevas razas fisiológicas que muestran considerable variación en la virulencia cuando son expuestas a líneas de girasol portadoras de diferentes genes de resistencia. (Tourvieille *et al.* 2012).

*Plasmopara halstedii* ocasiona dos tipos de infecciones (figura 1):

- primaria
- secundaria

La **infección primaria** se produce a través de la radícula, siendo originada por la germinación de las oosporas -esporas sexuales del patógeno- presentes en el rastrojo o en el suelo. Éstas al germinar, producen zoosporangióforos con zoosporangios que liberan zoosporas biflageladas móviles. Estas últimas son las responsables de infectar la radícula e inclusive, el hipocótilo, invadiendo, en pocos días, todos los tejidos. Asimismo, la infección primaria también puede producirse por contaminación directa de la plántula por el micelio contenido en el endosperma de la semilla.

La **infección secundaria**, en cambio, es ocasionada por las zoosporas provenientes de plantas vecinas o voluntarias que sufrieron infección primaria. Estas zoosporas son transportadas por el viento o el agua, infectando los órganos aéreos de la planta. El ataque puede ser temprano, afectando el tejido apical de plantas con 4-8 hojas o bien cumplirse más tardíamente, en el tejido apical de plantas con más de 8 hojas, hasta formación del botón floral. También puede producirse la infección en hojas adultas, pero, en este caso, la invasión se halla limitada a una pequeña parte del limbo foliar, sin consecuencias sobre el rendimiento (Tourvieille *et al.*, 2000).



Figura 1: Ciclo de vida de *Plasmopara halstedii*

### Síntomas y signos del Mildiu en girasol

Los síntomas de la infección primaria son: marcado enanismo de la planta por acortamiento de los entrenudos, clorosis alrededor de las nervaduras en el haz foliar y en correspondencia con la misma, en el envés, desarrollo del signo de la enfermedad, representado por una eflorescencia blanquecina constituida por las fructificaciones asexuales del pseudo-hongo (Ver Anexo: Figuras 1 y 2). Frecuentemente produce la muerte de la plántula. Si, por el contrario, la planta llega a madurez, el capítulo queda erecto en forma de copa (pedúnculo floral poco desarrollado) y la producción de semillas es nula. (Ver Anexo: Figura 3)

La infección secundaria temprana, al igual que la primaria, produce un marcado enanismo y clorosis con desarrollo de las estructuras fúngicas asexuales, aunque en este caso, las hojas inferiores son normales y la producción de semilla es escasa o nula (Ver Anexo: Figura 4).

En el caso de la infección secundaria tardía, el síntoma característico es una reducción de la altura más o menos severa, según el momento de infección, clorosis en los bordes de las nervaduras principales en el haz de las hojas superiores y fructificaciones del pseudo-hongo en el envés de las mismas. Generalmente hay producción de semillas, siendo la misma portadora del micelio del patógeno (hasta el 100% de los granos cosechados de plantas enfermas pueden estar contaminados). La semilla contaminada cumple un rol importante en la diseminación de la enfermedad y en su introducción en campos, regiones o países libres de la misma (Tourvieille *et al.*, 2000).

### **Manejo de la enfermedad**

La estrategia de manejo más efectiva para controlar esta enfermedad es el uso de materiales resistentes. Se localizaron fuentes de resistencia en líneas públicas, provenientes de Estados Unidos, y en viejas poblaciones de INTA Pergamino y Manfredi (Formento, 2003). La herencia de la misma se debe a genes dominantes de fácil incorporación en los programas de mejoramiento genético.

Los materiales resistentes a Mildiu pueden portar uno o más genes de resistencia denominados genes *Pl*. Dichos genes, proporcionan resistencia a una o más razas de *Plasmopara halstedii* y tienen origen principalmente en especies silvestres de *Helianthus annuus*, aunque también algunos son provenientes de otras especies del género *Helianthus*, como *H. argophyllus*, *H. praecox* y *H. tuberosus*. (Tabla 1). Muchos de ellos fueron mapeados en el genoma de *H. annuus*.

Los genes *Pl<sub>1</sub>* y *Pl<sub>2</sub>*, (Tabla 1) proporcionan resistencia a las razas 100 y 300, respectivamente.

Durante décadas, muchos de los híbridos comerciales eran resistentes a la raza 300, que era la raza predominante en Argentina hasta el año 1998, junto a la raza 330. Una vez evidenciada la pérdida de eficiencia del gen *Pl<sub>2</sub>*, nuevos genes de resistencia fueron incorporados en cultivares de girasol. El gen *Pl<sub>5</sub>* (Tabla 1), derivado de *H. tuberosus*, confiere protección a la raza 700. La resistencia a las razas 100, 300, 700 y 730 fue introgresada a partir de tres especies: *H. annuus* spp. *annuus* (*Pl<sub>6</sub>*), *H. praecox* ssp. *runyonii* (*Pl<sub>7</sub>*) y *H. argophyllus* (*Pl<sub>8</sub>*). También proveniente de *H. argophyllus*, fue incorporado el gen *Pl<sub>ARG</sub>*, quien provee resistencia a, al menos, cuatro razas que fueron testeadas: 300,700, 730 y 770. El gen *Pl<sub>13</sub>*, confiere resistencia a nueve razas del patógeno., entre las cuales se encuentran las mencionadas.

La resistencia provista por los genes  $Pl_6$  y  $Pl_7$  (Tabla 1) fue quebrada por razas aparecidas en Francia y Estados Unidos, mientras que, en Argentina, el gen  $Pl_6$  continúa siendo resistente a las razas presentes. Por otro lado, no se registraron razas que hayan quebrado la resistencia generada por los genes  $Pl_8$  y  $Pl_{ARG}$ . (Tabla 1) (*Bertero et al.*, 2010)

Los genes  $Pl$ , están localizados en diferentes grupos de ligamiento (GL) en el mapa genético de referencia de *H. annuus*:

- Grupo de ligamiento 1 (GL1): Genes  $Pl_{ARG}$ ,  $Pl_{13}$ ,  $Pl_{14}$  y  $Pl_{16}$ .
- Grupo de ligamiento 8 (GL8): Genes  $Pl_1$ ,  $Pl_2$ ,  $Pl_6$ ,  $Pl_7$ ,  $Pl_{15}$  y  $Pl_{20}$ .
- Grupo de ligamiento 13 (GL13): Genes  $Pl_8$ ,  $Pl_{21}$  y  $Pl_5$ .
- Grupo de ligamiento 4 (GL4): Genes  $Pl_{17}$ ,  $Pl_{19}$
- Grupo de ligamiento 2 (GL2): Gen  $Pl_{18}$

(*Gascuel et al.*, 2014)

Tabla 1: Genes de resistencia a Mildiu, fuentes, origen y autores. (Guojia Ma et al.2015)

Gen	Grupo de ligamiento	Fuente de resistencia	Origen del gen	Referencia
<i>PI</i> <sub>13</sub>	1	HA-R5		Mulpuri et al. 2009
<i>PI</i> <sub>14</sub>	1	HA-R4		Bachiava et al. 2011
<i>PI</i> <sub>16</sub>	1	HA-R4		Liu et al. 2012
<i>PI</i> <sub>ARG</sub>	1	RHA419	<i>H. argophyllus</i>	Duβle et al. 2004
<i>PI</i> <sub>18</sub>	2	-	<i>H. argophyllus</i>	Qi et al. 2013
<i>PI</i> <sub>17</sub>	4	HA 458, PI468435	Wild <i>H. annuus</i>	Qi et al. 2013
<i>PI</i> <sub>19</sub>	4	PI435414	Wild <i>H. annuus</i>	Zhang, Z. W. et al. 2016
<i>PI</i> <sub>1</sub>	8	RHA 266, RHA 274	Wild <i>H. annuus</i>	Mouzeyar et al. 1995
<i>PI</i> <sub>2</sub>	8	AMES 3235, PI497250, RHA 274	Wild <i>H. annuus</i>	Vear et al. 1997
<i>PI</i> <sub>6</sub>	8	HA 335, HA 336	Wild <i>H. annuus</i>	Roeckel-Drevet et al. 1996
<i>PI</i> <sub>7</sub>	8	HA 337, HA 338, HA 339	<i>H. praecox</i>	Bert et al. 2001
<i>PI</i> <sub>15</sub>	8	RNID		De Romano et al. 2010
<i>PI</i> <sub>20</sub>	8	PI494578	Wild <i>H. argophyllus</i>	Ma G.J. et al. 2017
<i>PI</i> <sub>5</sub>	13	INRA inbred line XRQ, Progress	<i>H. tuberosus</i>	Bert et al. 2001
<i>PI</i> <sub>8</sub>	13	RHA 340	<i>H. argophyllus</i>	Radwan et al. 2003, 2004
<i>PI</i> <sub>21</sub>	13	HA 61		Vicourt et al. 2012

Sin embargo, la presión de selección asociada a la utilización de híbridos comerciales resistentes o variedades determina la aparición de nuevas y más virulentas razas (*Molinero-Ruiz et al.*, 1998). Hasta el año 1998, casi todos los híbridos que se cultivaban en Argentina eran resistentes a las razas determinadas hasta ese momento -las razas 300 y 330-.por la incorporación del gen de resistencia  $Pl_2$ , proveniente de la línea HA61. A partir de ese año, los híbridos comenzaron a comportarse como susceptibles a la enfermedad. Las primeras plantas con síntomas de Mildiu en materiales previamente resistentes se observaron en forma simultánea en Paraná (Entre Ríos), Venado Tuerto (Santa Fe), Ameghino, América, Cristiano Muerto, Balcarce, Pergamino, Baigorrita, La Elvira (Buenos Aires) y Trenel (La Pampa) (Formento, 2003).

Los cambios observados señalan la necesidad de monitorear permanentemente las razas presentes en nuestro país (Perez Fernandez, 2002). En tal sentido, Bertero de Romano (2002) en un relevamiento que incluyó diferentes localidades de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y Santa Fe -Ameghino, América, Baigorrita, Cristiano Muerto, Elvira, Paraná, Pergamino y Venado Tuerto-, determinó, para las campañas 1998 y 1999, la presencia de tres nuevas razas: 730, 770 y 710, no encontrando indicios de las razas 300 y 330, que predominaban anteriormente.

Estas razas, se diferencian de las anteriores por atacar no sólo en las siembras tempranas, sino también en las tardías (noviembre y diciembre) y por presentar gran capacidad para producir inóculo secundario. Esto último implica que una baja fuente de inóculo primario en el campo puede ser determinante de una alta incidencia de plantas enfermas con infección secundaria, lo cual a su vez incrementa la posibilidad de transmisión por semilla (Formento, 2003)

Estas tres razas lograron controlarse por la incorporación de genes de resistencia al genoma de *H. annuus*:  $Pl_6$  y  $Pl_{15}$ . Sin embargo, luego de la susceptibilidad encontrada en cultivos de girasol del sudeste de Buenos Aires, durante las campañas 2013-2014 y 2014-2015, se evidenció la pérdida de la resistencia otorgada por el  $Pl_{15}$ . (Bertero de Romano, 2015)

Un paliativo para disminuir la incidencia de Mildiu en el gran cultivo, ante la ausencia de resistencia en los cultivares, es el tratamiento de la semilla con fungicidas específicos, como el Metalaxil. Con este tratamiento se logra controlar la infección primaria y secundaria temprana, mientras que el efecto sobre la infección secundaria tardía es prácticamente nulo

(Penaud *et al.*, 1998) . Sin embargo, existen antecedentes que indican que estas nuevas razas tienen niveles de resistencia a esta droga. Otra alternativa para el tratamiento de semillas es la utilización de mezclas de fungicidas a base de azoxistrobina, fludioxonil y metalaxil, los cuales al combinarlos con la utilización de híbridos con resistencia genética han alcanzado valores de incidencia nulos. Como así también la implementación de métodos culturales, entre los cuales se destacan la rotación de cultivos, la utilización de semillas sanas, el manejo de la fecha de siembra. La aplicación de estos métodos preventivos permite realizar un manejo adecuado de la enfermedad y un aporte frente a la variabilidad del patógeno. (Bazzalo & Piubello, 2015)

### **Objetivo General.**

Caracterizar la posible virulencia de *P.halstedii*, agente causal del mildiu en girasol en Argentina

### **Objetivo específico.**

Evaluar la virulencia de *P.halstedii* en Argentina, mediante el uso de líneas diferenciales estandarizadas para la detección de posible variabilidad genética y verificar la efectividad de genes de resistencia actualmente disponibles frente a nuevas razas del patógeno.

### **Hipótesis.**

Aislamientos de *P.halstedii* provenientes de diferentes regiones de Argentina presentan variabilidad genética.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la identificación de razas de *Plasmopara halstedii* se aplicó la metodología propuesta por Viranyi (Viranyi, 1999)

### **Sitios de muestreo**

Las muestras se obtuvieron a partir de plantas con síntomas, de híbridos experimentales y comerciales, portadores del gen *PI<sub>15</sub>*.

La recolección de muestras se realizó en lotes de cultivos e híbridos comerciales, situados en Balcarce, Buenos Aires y; en las localidades de Margarita y San Justo, provincia de Santa Fe, durante el año 2014/2015, cuando se presentaron las primeras evidencias de la ruptura de la resistencia provista por el gen *PI<sub>15</sub>*.

## Recolección de muestras

Los aislamientos de *Plasmopara halstedii* fueron obtenidos a partir de hojas de plantas con presencia de síntomas y la esporulación típica del pseudo-hongo. Las muestras fueron colocadas individualmente en bolsas de polietileno con un rótulo indicando el lote y la localidad de donde fueron recolectadas, y se conservaron en una conservadora con hielo hasta el momento de la inoculación.

Cada una de las muestras recolectadas fueron transportadas desde su lugar de origen hasta el laboratorio de fitopatología de Nidera Semillas, que se sitúa en la localidad de Baigorrita, provincia de Buenos Aires.

## Líneas diferenciales

Se utilizaron 18 líneas diferenciales (tabla 2) provistas por USDA, INRA y Nidera S. A.

Tabla 2: Líneas diferenciales utilizadas para la identificación de la virulencia de distintos aislamientos de *Plasmopara halstedii*. Sistema de nomenclatura de razas

Nomenclatura		Líneas diferenciales			
Dígito	Valor de virulencia	Designación	Nombre original	Gen	Origen
1°	1	<b>HD-1</b>	HA-89	No	USDA
	2	<b>HD-2</b>	RHA-265	<i>Pl<sub>1</sub></i>	USDA
	4	<b>HD-3</b>	RHA-274	<i>Pl<sub>2</sub>/Pl<sub>21</sub></i>	USDA
2°	1	<b>HD-4</b>	PMI3	<i>Pl<sub>PM13</sub></i>	INRA
	2	<b>HD-5</b>	PM-17	<i>Pl<sub>5</sub></i>	USDA
	4	<b>HD-6</b>	803-1	<i>Pl<sub>803</sub></i>	IFVC
3°	1	<b>HD-7</b>	HAR-4	<i>Pl<sub>16</sub></i>	USDA
	2	<b>HD-8</b>	HAR-5	<i>Pl<sub>13</sub></i>	USDA
	4	<b>HD-9</b>	HA-335	<i>Pl<sub>6</sub></i>	USDA
4°	1	<b>HD-10</b>	Y7Q	<i>Pl<sub>6</sub></i>	INRA
	2	<b>HD-11</b>	PSC8	<i>Pl<sub>2</sub></i>	INRA
	4	<b>HD-12</b>	XA	<i>Pl<sub>4</sub></i>	INRA
5°	1	<b>HD-13</b>	PSS2 RM	<i>Pl<sub>6</sub> + Pl<sub>21</sub></i>	INRA
	2	<b>HD-14</b>	VAQ	<i>Pl<sub>5</sub></i>	INRA
	4	<b>HD-15</b>	RHA-419	<i>Pl<sub>ARG</sub></i>	USDA
6°	1	<b>D-16</b>	IR101DMR	<i>Pl<sub>15</sub></i>	NIDERA S.A.
	2	<b>D-17</b>	RHA-340	<i>Pl<sub>8</sub></i>	USDA
	4	<b>D-18</b>	HA-458	<i>Pl<sub>17</sub></i>	USDA

(USDA: United States Department of Agriculture, U.S.A ; INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, Francia ; IFVC: Institute of Field and Vegetable Crops of Novi Sad, Serbia)

Las líneas diferenciales entre HD-1 y HD-9 han sido testeadas en numerosos laboratorios nacionales y extranjeros, reaccionando consistente y uniformemente con todas las razas

determinadas en el mundo, hasta la fecha. Se trata de líneas públicas endocriadas que pueden ser utilizadas por instituciones gubernamentales o compañías privadas.

Las nuevas líneas implementadas, entre HD-10 y D-18, son líneas propuestas para este trabajo, y actualmente son líneas públicas, que pueden ser usadas internacionalmente con este fin.

Las líneas diferenciales utilizadas fueron provistas a Nidera S.A. desde Francia y Estados Unidos para la realización del presente trabajo.

### **Preparación de las semillas para la evaluación**

Las semillas se hicieron germinar dentro de pequeñas cámaras húmedas. Fueron incubadas a 22-24 °C, en oscuridad, durante 2 días hasta que la radícula alcanzó una longitud de 0,5 cm., momento de mayor sensibilidad para obtener la máxima infección.

### **Preparación del inóculo**

Para cosechar el inóculo, se barrieron las fructificaciones existentes en el envés de las hojas de plantas muestreadas.

Con el objetivo de incrementar el inóculo de *Plasmopara halstedii*, recolectado en el campo, se realizó la inducción en el laboratorio dentro de pequeñas cámaras húmedas. Luego se procedió a la preparación de una suspensión en agua destilada, ajustando la concentración a 30000 esporangios/ml.

La multiplicación del inóculo, se hizo inoculando sobre una línea susceptible a todas las razas determinadas hasta el momento. Éste paso sirvió para tener suficiente cantidad de inóculo viable.

### **Inoculación**

Las semillas pregerminadas de las líneas diferenciales y de las líneas propuestas se colocaron en bolsitas de tul, 15 semillas de cada línea por bolsita. (Figura 1) Éstas luego se sumergieron en la suspensión del inóculo de una determinada localidad, donde se mantuvieron durante 5-6 horas a 15 °C, en oscuridad.

### **Trasplante**

Las semillas inoculadas fueron transferidas a bandejas conteniendo un sustrato estéril formado por 70% de tierra fértil y 30% de lava volcánica, regado con abundante agua. Se

trasplantaron de tal forma que quede una hilera de 10 plántulas por cada línea (Figura 2). Seguidamente, las bandejas se colocaron en gabinetes en los que se mantuvo la temperatura entre 18 y 20 °C, con 12 horas de fotoperíodo (Figura 3). Las condiciones de crecimiento descritas favorecen el desarrollo de la enfermedad y de las plántulas de girasol.



*Figura 1: Bolsa de tul conteniendo semillas germinadas de una línea diferencial*



*Figura 2: Bandeja conteniendo semillas de líneas diferenciales*



*Figura 3: Bandejas en gabinetes en condiciones controladas de temperatura y presión.*

### **Lectura de las líneas diferenciales**

Luego de transcurridos 14 días, a partir de la fecha de inoculación, se colocaron las bandejas en una cámara húmeda a 20 °C y en oscuridad durante 24 horas, para permitir la esporulación.

La lectura se hizo contando el número de plantas sanas y enfermas (Figura 4). Considerando susceptibles a las plantas que presentaron esporulación del pseudo-hongo sobre los cotiledones y/o sobre las primeras hojas verdaderas (Figura 5).



*Figura 4: Bandeja con plántulas al momento de la lectura de resultados*



Figura 5: Plántula susceptible con esporulación típica sobre los cotiledones.

Los resultados se interpretaron según la designación de razas de *Plasmopara halstedii*, internacionalmente aceptada, que consta de un código de virulencia formado por 6 dígitos (Tourvieille et al., 2012). Este sistema asigna un valor numérico si una diferencial es susceptible y de esta forma provee información sobre la característica de virulencia de un aislamiento (Tabla 2). Si la primera línea de un set de tres es susceptible, se le asigna un valor de 1; si la segunda línea es susceptible, se le asigna un valor de 2; y si la tercera línea es susceptible, recibe un valor de 4. El código de virulencia es aditivo dentro de cada grupo, con lo cual, si la primera y la segunda línea son susceptibles, se le asigna un valor de 1+2, o 3, y si las tres líneas de un grupo son susceptibles, reciben un valor de 1+2+4, o 7, etc. En este sistema, cuanto más alto sea el código, mayor es la virulencia de la raza.

Como resultado de la utilización de un total de dieciocho líneas diferenciales, el código final de un aislamiento o raza está integrado por seis dígitos, uno por cada grupo de líneas.



*Protocolo de inoculación (Tourvieille et al., 2000)*

## **RESULTADOS**

Las variedades diferenciales (V.D.) HA89, RHA265, RHA274, PMI-3, PSC8, XA fueron susceptibles en todos los aislamientos analizados, lo que indica que la resistencia de estos genes se quebró en Argentina.

Las V.D. PM-17, 803-1 y VAQ tuvieron una reacción de resistencia para los aislamientos de Balcarce (Buenos Aires) y Margarita (Santa Fe), mientras que presentaron susceptibilidad en el aislamiento correspondiente a San Justo (Santa Fe).

Las V.D. HAR-4 y HAR-5, presentaron resistencia a los aislamientos de Balcarce (Buenos Aires) y de San Justo (Santa Fe), mientras que frente al aislamiento de la localidad de Margarita (Santa Fe) la reacción fue de susceptibilidad.

Para el caso de las V.D. HA-335, Y7Q, PSS2 RM, RHA419, RHA340 y HA458 presentaron reacción de resistencia frente a todos los aislamientos evaluados.

La V.D. IR101DMR presentó reacción de resistencia frente a aislamientos de Margarita y San Justo (Santa Fe), mientras que para el aislamiento de Balcarce (Buenos Aires) la reacción fue de susceptibilidad.

Tabla 3. Comparación entre las reacciones de las variedades diferenciales y los aislamientos de las localidades de Balcarce (Buenos Aires), Margarita (Santa Fe) y San Justo (Santa Fe), para detectar virulencia patógena de *Plasmopara halstedii*.

Nuevos Grupos de Diferenciales			Balcarce (Bs. As.)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
Diferencial	Línea	Gen	710601	713600	770630
HD1	HA89	No	S	S	S
HD2	RHA265	PI1	S	S	S
HD3	RHA274	PI2/PI21	S	S	S
HD4	PMI-3	PIPM13	S	S	S
HD5	PM-17	PI5	R	R	S
HD6	803-1	PI803	R	R	S
HD7	HAR-4	PI16	R	S	R
HD8	HAR-5	PI13	R	S	R
HD9	HA-335	PI6	R	R	R
HD10	Y7Q	PI6-	R	R	R
HD11	PSC8	PI2	S	S	S
HD12	XA	PI4	S	S	S
HD13	PSS2 RM	PI6+PI21	R	R	R
HD14	VAQ	PI5	R	R	S
HD15	RHA419	PIArg	R	R	R
D16	IR101DMR	PI15	S	R	R
D17	RHA340	PI8	R	R	R
D18	HA458	PI17	R	R	R

En la tabla anterior se enumeran las líneas diferenciales utilizadas y se detallan los genes de interés. Se puede observar la reacción diferencial de cada LD a los aislamientos provenientes de las diferentes localidades estudiadas. Se identificó una nueva raza del patógeno en las muestras estudiadas, la cual fue codificada como 710601 según el sistema de nomenclatura utilizada. Dicha raza, al ser inoculada en las líneas diferenciales presenta patrones de reacción diferentes.

Del mismo modo, se puede visualizar que la línea diferencial D16, correspondiente a IR101DMR, portadora del gen PI15, de interés para este trabajo, evidencia la susceptibilidad de la misma frente a la raza 710601.

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
HA89		S 	S 	S 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
RHA265	PI <sub>1</sub>	S 	S 	S 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
RHA274	PI <sub>2</sub> /PI <sub>21</sub>	S 	S 	S 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
PMI-3	PI <sub>PM13</sub>	S 	S 	S 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
PM-17	PI <sub>5</sub>	R 	R 	S 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
803-1	PI <sub>803</sub>	R 	R 	S 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
HAR-4	PI <sub>16</sub>	R 	S 	R 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
HAR-5	PI <sub>13</sub>	R 	S 	R 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
HA-335	PI <sub>6</sub>	R 	R 	R 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
Y7Q	PI <sub>6-</sub>	R 	R 	R 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
PSC8	PI <sub>2</sub>	S 	S 	S 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
XA	PI <sub>4</sub>	S 	S 	S 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
PSS2 RM	PI <sub>6</sub> /PI <sub>21</sub>	R 	R 	R 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
VAQ	PI <sub>5</sub>	R	R	S
				

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
RHA419	PI <sub>ARG</sub>	R	R	R
				

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
IR101DMR	PI <sub>15</sub>	S	R	R
				

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
RHA340	PI <sub>8</sub>	R 	R 	R 

L.D.	Gen	Reacción		
		Balcarce (Buenos Aires)	Margarita (Santa Fe)	San Justo (Santa Fe)
HA458	PI <sub>17</sub>	R 	R 	R 

## DISCUSIÓN

Como demuestran los resultados detallados en la Tabla 3, los genes *PI*<sub>1</sub>, *PI*<sub>2</sub>, *PIPM*<sub>13</sub>, *PI*<sub>4</sub> y *PI*<sub>15</sub>, presentan susceptibilidad a la raza 710601, mientras que los genes *PI*<sub>5</sub>, *PI*<sub>803</sub>, *PI*<sub>16</sub>, *PI*<sub>13</sub>, *PI*<sub>6</sub>, *PI*<sub>6-</sub>, *PI*<sub>6</sub>, *PI*<sub>ARG</sub>, *PI*<sub>8</sub> y *PI*<sub>17</sub> presentan resistencia completa a dicha raza. Asimismo, se puede destacar que las líneas diferenciales RHA 274 y PSSR2 RM, que contienen en su genoma el gen *PI*<sub>21</sub>, expresan diferentes respuestas frente a la nueva raza, ya que también contienen los genes *PI*<sub>2</sub> y *PI*<sub>6</sub>. En el caso de RHA274, genotipo *PI*<sub>2</sub>+*PI*<sub>21</sub>, demostró

susceptibilidad frente a la raza; mientras que la línea PSSR2 RM, genotipo  $PI_6+PI_{21}$ , resultó resistente.

A su vez, teniendo en cuenta todas las razas del patógeno presentes en Argentina, incluida la nueva raza identificada en este trabajo, se detallan en la siguiente tabla (Tabla 4), las fuentes de resistencia y los genes correspondientes a cada una de ellas.

**Tabla 4: Fuentes y genes de resistencia eficientes frente a razas presentes en Argentina**

<b>Línea</b>	<b>Gen</b>
<b>HA335</b>	<i>PI6</i>
<b>HA336</b>	<i>PI6</i>
<b>RHA419</b>	<i>PIArg</i>
<b>RHA340</b>	<i>PI8</i>
<b>HA458</b>	<i>PI17</i>

Se puede visualizar, la resistencia por parte de las líneas HA 335, HA 336 (ambas portadoras del gen  $PI_6$ ), RHA419 (gen  $PI_{ARG}$ ), RHA340 (gen  $PI_8$ ) y HA 458 (gen  $PI_{17}$ ), frente a las razas presentes en Argentina, entre ellas, la identificada en este trabajo: 710601.

## **CONCLUSIÓN**

- Como conclusión, se ha identificado una nueva raza del patógeno en Argentina que es la responsable de la pérdida de resistencia otorgada por el gen  $Pl_{15}$ : dicha raza es la 710601.
- La resistencia provista por el gen  $Pl_{15}$  a las razas presentes en Argentina, actualmente es incompleta debido a la aparición de esta nueva raza.

Se ha verificado la eficiencia de los genes  $Pl_6$ ,  $Pl_8$ ,  $Pl_{17}$  y  $Pl_{ARG}$  frente a las razas presentes en Argentina, incluida la raza identificada en este trabajo: 710601.

## Bibliografía

- Bazzalo , M., & Piubello, S. (2015). Variantes de *Plasmopara halstedii* resistentes a metalaxyl. *Taller sobre downy mildew (Plasmopara halstedii) en girasol* (pág. 10). Buenos Aires, Argentina: Asociacion Argentina de Girasol.
- Bazzalo, M.; Dimarco, P.; Leon, A.; Gulya, T; Vear, F. (1998) Review of *Plasmopara halstedii* Races present in Argentina. Symposium III- Sunflower Downy Mildew. Pág. 34-35 ISA. Fargo (ND, USA)
- Bertero de Romano, A. (1986). Enfermedades de Girasol en Argentina. *5° Simposio regional de girasol*. Bolivar, Buenos Aires, Argentina.
- Bertero de Romano, A. (2015). Variacion en la poblacion racial de *Plasmopara halstedii*. *Taller sobre Downy Mildew (Plasmopara halstedii) en girasol* (pág. 13). Buenos Aires, Argentina: Asociacion Argentina de Girasol.
- Bertero de Romano, A., Romano, C., Bulos, M., Altieri, E., & Sala, C. (2010). A new gene for resistance to downy mildew in sunflower. . *International Symposium "Sunflower breeding on resistance to diseases"*. Krasnodar, Rusia.
- Formento, N. (2003). Sanidad del cultivo y plagas. *Segundo taller de enfermedades de girasol*. Buenos Aires.
- Gascuel, C.; Martinez, Y.; Boniface, M.; Vear, F.; Pichon, M.; Godiard, L. (2014). Pathogen profile: The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology*, 16. Pag. 109-122
- Guojia , M., Markell , S., & Qi, L. (2015). Developement of Super Confection Sunflower Effectively Resistant to Downy Mildew and Rust.
- MinAgro. (2018). *Datos abiertos agroindustria. Ministerio de agricultura, ganaderia y pesca de la Nacion*. Obtenido de <https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>
- Molinero-Ruiz, L., Melero-Vara, J., Gulya , T., & Vear, F. (1998). Pathogenic carachterisation of *Plasmopara halstedii* from Spain. *Symposium III - Sunflower Downy Mildew. International Sunflower Asociation*, (págs. 26-29). Fargo, ND, USA.
- Penaud , A., Gulya , T., & Vear , F. (1998). Survey of Downy Mildew on Sunflower in France. *Symposium III-Sunflower Downy Mildew* (págs. 8-11). Fargo, ND, USA: International Sunflower Asociation.
- Pereyra, V., & Escande , A. (1994). *Enfermedades de girasol en Argentina. Manual de reconocimiento*. Buenos Aires, Argentina: Cerbas-Inta.
- Perez Fernandez, J. (2002). Enfermedades: Mildiu de girasol. Identificacion y manejo. En J. Perez Fernandez, *Manual practico para el cultivo de girasol*. (págs. 148-149). Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Tourvieille, D., Gulya , T., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K., & Viranyi, F. (2000). New nomenclature of Races of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew). *15° International Sunflower Conference*. Toulouse, France.

- Tourvieille, D. Segundo Taller de enfermedades del Girasol. ASAGIR, Asociacion Argentina de Girasol (2003). Pergamino. Pcia. de Buenos Aires. Argentina Disponible en: <http://www.asagir.org.ar>
- Tourvieille, D., Walser, P., Jolivot, D., Roche, S., Serre, F., Leguillon, M., . . . Vear, F. (2012). Proposal for improvement of sunflower downy mildew nomenclature. *International Sunflower Association*. Obtenido de International Sunflower Association.
- Viranyi, F. (1999). Protocol to identify pathotypes (races) of *Plasmopara halstedii*, to be used by contributors to the FAO Sunflower Network. *WG Sunflower Diseases- FAO Working Group: Sunflower Diseases- Subgroup Plasmopara halstedii*. Bucarest, Rumania.

## ANEXO



*Figura 1. Síntomas de Plasmopara halstedii: clorosis en el haz foliar. (Gentileza Nidera S.A.)*



*Figura 2. Signo del patógeno: fructificaciones en el envés de la hoja. (Gentileza Nidera S.A.)*



*Figura 3: Síntoma de Plasmopara halstedii.: enanismo. (Gentileza: Nidera S.A.)*



*Figura 4: Síntoma de infección secundaria provocada por *Plasmopara halstedii*. (Gentileza Nidera S.A.)*