

## Mildiu del girasol: análisis preliminar de la variabilidad de las fuentes de resistencia

Marcellán, Olga<sup>1, 5</sup>; Escande, A.<sup>1, 2</sup>; Quiroz, F.<sup>2</sup>; Alvarez, D.<sup>3</sup>; Pereyra, V.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias (UNMDP). Ruta 226 km 73,5. (7620) Balcarce, Buenos Aires, <sup>2</sup> EEA Balcarce (INTA). Ruta 226 km 73,5. (7620) Balcarce, Buenos Aires, <sup>3</sup> EEA Manfredi (INTA). Ruta 9 km 636 (5988) Manfredi, Córdoba, <sup>4</sup> Biosol Semillas S.R.L. Calle 12 N° 765 (7620) Balcarce, Buenos Aires, <sup>5</sup> E-mail: omarcellan@balcarce.inta.gov.ar

Marcellán, O., Escande, A.; Quiroz, F.; Alvarez, D.; Pereyra, V. (2008) Mildiu del girasol: análisis preliminar de la variabilidad de las fuentes de resistencia. Rev.Fac.Agron. Vol 107 (1): 11-14.

El mildiu es una enfermedad potencialmente destructiva del girasol (*Helianthus annuus* L.), causada por el hongo *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl.& de Toni. El control de la enfermedad en la República Argentina se basa en la utilización de fungicidas específicos y resistencia genética. Uno de los genes de resistencia considerados en los programas de mejoramiento genético es el *PI6*, efectivo contra todas las razas del patógeno identificadas en la República Argentina. Dado que la utilización de un solo gen de resistencia podría incrementar la vulnerabilidad genética a este patógeno, se analizó la variabilidad de las fuentes de resistencia utilizadas en los programas de mejoramiento genético. ADN genómico de 54 híbridos comerciales (13 empresas semilleras) se analizó usando marcadores de la subclase TIR-NBS-LRR. Siete híbridos, pertenecientes a cuatro empresas semilleras, poseen el gen *PI6*. Trece híbridos resistentes a las nuevas razas de mildiu llevan por lo menos otro gen de resistencia diferente. Estos resultados ponen de manifiesto la utilización de diferentes fuentes de resistencia a mildiu en el desarrollo de cultivares argentinos.

**PALABRAS CLAVE:** Resistencia genética, *Helianthus annuus*, *Plasmopara halstedii*, marcadores moleculares, gen *PI6*, híbridos comerciales.

Marcellán, O., Escande, A.; Quiroz, F.; Alvarez, D.; Pereyra, V. (2008) Downy mildew in sunflower: preliminary analysis of the variability in resistance sources. Rev.Fac.Agron. Vol 107 (1): 11- 14.

Downy mildew is a potentially destructive disease of sunflower (*Helianthus annuus* L.) caused by the fungus *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl.& de Toni. Disease control in Argentina is based on specific fungicide application and genetic resistance. One of the resistance genes considered in breeding programs is the *PI6*, effective against all pathogen races identified in Argentina. Since the use of only one resistance gene would increase the genetic vulnerability to this pathogen, the variability of the resistance sources used in breeding programs was analyzed. Genomic DNA of 54 commercial hybrids (13 seed companies) was analyzed using markers belonging to the TIR-NBS-LRR subclass. Seven hybrids, from four seed companies, have the *PI6* gene. Thirteen hybrids resistant to new races possess at least another resistance gene. These results show that different sources of resistance to mildew have been used in the development of Argentinian cultivars.

**KEYWORDS:** Genetic resistance, *Helianthus annuus*, *Plasmopara halstedii*, molecular markers, *PI6* gene, commercial hybrids.

---

Recibido: 08/11/2007

Aceptado: 01/12/2008

ISSN 0041-8676, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

## INTRODUCCIÓN

El mildiu es una enfermedad del girasol potencialmente destructiva causada por el hongo *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni. Los síntomas consisten en clorosis alrededor de las nervaduras principales de las hojas, comenzando desde la base hasta el ápice de las mismas. El signo está constituido por el micelio y las fructificaciones asexuales del hongo y puede observarse en el envés de las hojas como un moho blanquecino. Esta enfermedad se manifiesta en todas las fases del crecimiento vegetativo, pero los daños más severos ocurren cuando la infección del hongo se da en estadios tempranos del ciclo del cultivo. En algunos casos, las plantas presentan enanismo y si llegan a florecer, sus capítulos quedan en posición horizontal con el disco floral hacia arriba. Estas plantas se ven severamente afectadas en su producción de achenios.

Hasta 1998, la incidencia de mildiu del girasol en la Argentina fue baja. Ese año aparecieron nuevas razas (710, 730 y 770) para las cuales los híbridos, que hasta entonces eran resistentes, resultaron susceptibles y fueron severamente atacados. Algunos lotes de producción llegaron a tener más de 80% de plantas afectadas. Las nuevas variantes del patógeno pueden producir inóculo secundario con gran eficacia de manera que una sola planta enferma puede enfermar 100 plantas más (Escande & Pereyra, 2002).

En nuestro país se continúan sembrando híbridos susceptibles a las actuales razas del patógeno que son tratados con curasemillas específicos para mildiu, y además, se han incorporado híbridos que poseen resistencia genética. Se identificaron genes de resistencia vertical *PI6*, *PI7*, y *PI8* y *PIArg*, provenientes de *H. annuus* silvestre, *H. praecox* y *H. argophyllus* respectivamente (Miller & Gulya, 1991; Dušle et al., 2004) que resultan efectivos contra todas las razas presentes en la Argentina. El gen *PI6* se estudió extensivamente a nivel molecular. Su incorporación en los programas de mejoramiento ofrece ventajas al permitir realizar una selección eficaz tanto empleando la inoculación zoospórica (Miller & Gulya, 1991) como la selección asistida por marcadores moleculares (Bouzidi et al., 2002). La utilización de un único gen de resistencia no es aconsejable debido a que se genera una situación de vulnerabilidad genética que puede conducir a la aparición de nuevas razas del patógeno (Miller & Gulya, 1991). En este trabajo se plantea que el gen *PI6* es una de las fuentes de resistencia a mildiu más usadas en la obtención de los híbridos comerciales. Por ello, el objetivo del presente trabajo consiste en determinar la frecuencia del gen *PI6* en los híbridos más sembrados del sudeste bonaerense utilizando marcadores moleculares ligados a dicho gen.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó la presencia del gen *PI6* en 54 híbridos comerciales pertenecientes a 13 empresas semilleras. Los híbridos fueron seleccionados en base a dos criterios: (i) pertenecer al grupo de materiales más

sembrados en el sudeste bonaerense (González Montaner & Therisod, 2005), y/o (ii) estar inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares (INASE) como resistentes a las actuales razas de mildiu (tabla 1).

**Tabla 1.** Empresas semilleras e híbridos considerados en el análisis de la variabilidad de las fuentes de resistencia a mildiu

**Table 1.** Seed companies and hybrids considered in the analysis of the variability in resistance sources to downy mildew

Empresa semillera	Híbrido
ACA	ACA 861; ACA 863; ACA 872; ACA 876; ACA 885; ACA 886 DM <sup>(1)</sup> ; ACA 864 DM <sup>(1)</sup>
Advanta	VDH 487 <sup>(1)</sup> ; VDH 370; CF 27; CF 17 DMR <sup>(1)</sup> ; CF 23 CL; Olisun 2
Buck	Buck 255; Mirafior; Solflor
Don Mario	DM 226; GH 1000 CL
El Cencerro	Cacique CL; Pampero DM <sup>(1)</sup>
Monsanto	DK 3820; DK 3920; DK 4050 DM <sup>(1)</sup> ; DK 3915 DM <sup>(1)</sup>
Nidera	Paraíso 21; Paraíso 22 <sup>(1)</sup> ; Paraíso 24 <sup>(1)</sup> ; Paraíso 27 <sup>(1)</sup> ; Paraíso 33 <sup>(1)</sup> ; Paraíso 35 <sup>(1)</sup> ; Paraíso 101 CL <sup>(1)</sup> ; Paraíso 102 CL <sup>(1)</sup>
Pioneer	P64A53; P65A25; 64Z88
Seminium	Agrobel 967; Agrobel 975; Agrobel 962 DM <sup>(1)</sup> ; Agrobel 972 DM <sup>(1)</sup>
SPS	SPS 3102; SPS 3104 CL; SPS 3105; SPS 3140; SPS 3142; SPS 3150 RM <sup>(1)</sup>
Syngenta	NK 55 RM <sup>(1)</sup> ; NK 44 CL RM <sup>(1)</sup> ; Macon RM <sup>(1)</sup>
Dow-Morgan	MG40 CL; MG550; MG2
KWS	Tropel; Baqueano; Bagual

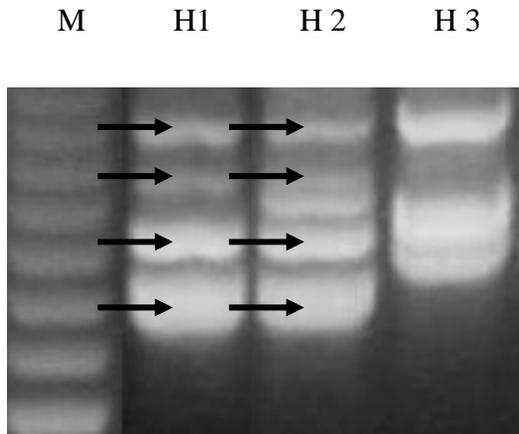
<sup>(1)</sup> inscriptos en INASE como resistentes a las nuevas razas de mildiu

Para cada híbrido se recolectaron dos muestras foliares, extraídas de plantas de diferentes surcos de la "Red de Ensayos de Evaluación de Cultivares Comerciales", durante la campaña 2005/06 en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce. Se aisló ADN genómico a partir de las muestras foliares de acuerdo a Saghai-Marooft et al. (1984). El ADN extraído se amplificó utilizando "primers" específicos de acuerdo a Bouzidi et al. (2002) y en las condiciones descritas por Marcellán & Pereyra (2004). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. Se analizaron dos series de marcadores de la subclase TIR-NBS-LRR (figuras 1 y 2) ligados al gen *PI6*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

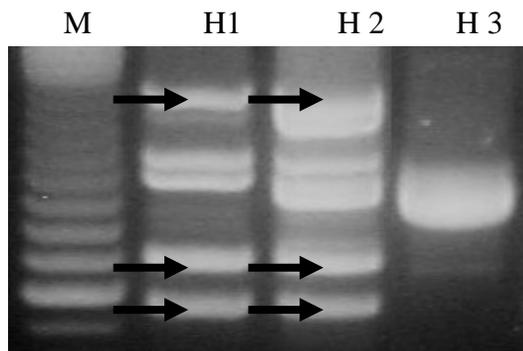
Se detectó la presencia del gen *PI6* en sólo siete híbridos pertenecientes a cuatro empresas semilleras.

De acuerdo a la información del INASE, 20 de los 54 híbridos analizados fueron inscriptos como resistentes a las nuevas razas de mildiu. Esto pone de manifiesto que i) más de la mitad de los híbridos sembrados en el sudeste bonaerense no posee genes de resistencia a las nuevas razas de mildiu y ii) sólo siete de los 20 híbridos (35%) poseen el gen *PI6*, por lo cual el 65% restante lleva otro/s gen/es de resistencia efectivos contra las nuevas variantes del hongo. De acuerdo a Bertero (2005), algunas empresas semilleras privadas están trabajando con el gen *PI8* proveniente de *H. argophyllum* y con genes de resistencia presentes en la variedad Charata INTA.



**Figura 1:** Marcadores *Ha-P2* en híbridos comerciales. (Nota: Cuatro marcadores, señalados con flechas, indican la presencia del gen *PI6* en los híbridos H1 y H2. El híbrido H3 no posee el gen *PI6*. M: marcador de Peso Molecular - 100 bp DNA step ladder)

**Figure 1:** *Ha-P2* markers in commercial hybrids. (Note: Four markers, marked with arrows, indicate the presence of the *PI6* gene in H1 and H2 hybrids. H3 hybrid does not possess the *PI6* gene. M: Molecular weight marker - 100 bp DNA step ladder)



**Figura 2:** Marcadores *Ha-P3* en híbridos comerciales. (Nota: Tres marcadores, señalados con flechas, indican la presencia del gen *PI6* en los híbridos H1 y H2. El híbrido H3 no posee el gen *PI6*. M: marcador de Peso Molecular - 100 bp DNA step ladder)

**Figure 2:** *Ha-P3* markers in commercial hybrids. (Note: Three markers, marked with arrows, indicate the presence of the *PI6* gene in H1 and H2 hybrids. H3 hybrid does not possess the *PI6* gene. M: Molecular weight marker - 100 bp DNA step ladder)

Siguiendo la línea de pensamiento de Miller & Gulya (1991) acerca de la vulnerabilidad genética que se genera al utilizar un único gen de resistencia, Johnson (1982) propone mantener la diversidad genética entre los cultivares para sus caracteres de resistencia y manejar adecuadamente los mismos para reducir las posibilidades de que se produzcan epifitias. Ese manejo puede consistir en (i) utilizar varios genes de resistencia vertical, incorporados en un solo cultivar (pirámide de genes) o en diferentes cultivares y (ii) utilizar resistencia horizontal (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Tourvieille De Labrouhe, 2003).

Además de considerar estas medidas tendientes a reducir la presión de selección sobre la población del patógeno, es importante estar alertas ante la aparición de ataques inexplicables en materiales identificados como resistentes, como lo sugieren Escande & Pereyra (2002). La probabilidad de aparición de una nueva raza no se puede predecir de manera fiable debido a los numerosos factores que afectan la tasa de evolución de los patógenos (Johnson, 1982). De todas maneras, el hecho de que se estén usando varios genes de resistencia en el desarrollo de los nuevos cultivares es un claro indicio de que se está tratando de disminuir la posibilidad de que eso ocurra. En este sentido, en los programas de mejoramiento genético de girasol sería conveniente seguir incorporando genes de resistencia vertical así como considerar también la posibilidad de recurrir a una resistencia de tipo horizontal.

## CONCLUSIÓN

En el desarrollo de los nuevos cultivares argentinos han intervenido diferentes fuentes de resistencia a las nuevas razas de mildiu. El *PI6* está presente en el 35% de los híbridos inscriptos como resistentes a las nuevas razas por lo que el 65% restante lleva genes de resistencia diferentes al *PI6*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por INTA a través del Proyecto Nacional 52-032080.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bertero, A. 2005. Conclusiones Taller ASAGIR sobre Fitopatología. III Congreso Argentino de Girasol. Buenos Aires, Argentina. 31/mayo-1/junio/2005. pp.26-36.
- Bouzi, M.F., S. Badaoui, F. Cambon, F. Vear, D. Tourvieille De Labrouhe, P. Nicolas & S. Mouzeyar. 2002. Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. Theoretical and Applied Genetics 104: 592-600.
- Duñle, C.M., V. Hahn, S.J. Knapp & E. Bauer. 2004. *PIArg* from *Helianthus argophyllum* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower. Theoretical and Applied Genetics 109: 1083-1086.

**Escande, A. & V. Pereyra. 2002.** Variantes de *Plasmopara halstedii* modifican al manejo del mildiu o enanismo del girasol en la Argentina. IDIA XXI: 144-146.

**González Montaner, J. & G. Therisod. 2005.** Evaluación zonal de cosecha gruesa (Maíz, Girasol y Soja) 2004/05 – Zona Mar Y Sierras. Informe regional AACREA. 27 p.

**Johnson, R. 1982.** Genetic Background of Durable Resistance. *En: Durable Resistance in Crops.* Lamberti F., J.M. Waller & N.A. Van Der Graaff (Eds.). Nato advanced science institutes series. Serie A. Plenum Press, New York, pp.5-26.

**Marcellán, O.N. & V. Pereyra. 2004.** Caracterización molecular de líneas diferenciales para resistencia a mildiu en girasol. *Journal of Basic & Applied Genetics* XVI: S118.

**Miller, J.F. & T.J. Gulya. 1991.** Inheritance of resistance to race 4 of Downy Mildew derived from interspecific crosses in sunflower. *Crop Science.* 31:40-43.

**Tourvieille De Labrouhe, D. 2003.** El Mildiu del Girasol, manejar el control en pos de una eficiencia durable. II Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires. pp.63-70.

**Rachid Al-Chaarani, G., A. Roustae, L. Gentzbittel, L. Mokrani, G. Barrault, G. Dechamp-Guillaume & A. Sarrafi. 2002.** A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics* 104:490-496.

**Saghai-Marooif, M.A., K. Solimar, R.A. Jorgensen & R.W. Allard. 1984.** Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:8014-8018.