

Trabajo de intensificación

**Exploración de poblaciones silvestres de girasol para resistencia a mildiu**

ESTUDIANTE

Sabatini, Pía.

DOCENTE TUTOR

Carrera, Alicia.

DOCENTES CONSEJEROS

Presotto, Alejandro.

Zappacosta, Diego.

CONSEJEROS EXTERNOS

Martínez, Laura.

Garayalde, Antonio.



Bahía Blanca – Agosto 2023

## ÍNDICE

Agradecimientos .....	2
Resumen .....	3
Introducción	
El cultivo de girasol en Argentina .....	4
Mildiu en girasol.....	8
Manejo, razas y formas de resistencia .....	12
Herramientas moleculares.....	15
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
Materiales y métodos	
Material vegetal .....	17
Inoculación.....	18
Evaluación de la enfermedad en la parte aérea .....	20
Análisis estadístico .....	21
Resultados	
Evaluación de la enfermedad de la parte aérea a partir de Índices de daño	
Incidencia .....	22
Índice de Lebeda.....	23
Índice Ampliado.....	24
Marcadores moleculares .....	29
Discusión .....	31
Conclusiones .....	33
Bibliografía.....	34

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dr. Alicia Carrera, mi tutora en este proyecto final, por toda su ayuda y enseñanza.

A Laura Martínez por su generosidad y acompañamiento en esta última etapa.

A mis papas Víctor y Adriana por siempre apoyarme y alentarme a hacer lo que me gusta.

A mi hermana Lula por siempre ser mi gran compañera y amiga en todo.

A mi novio Franco por empujarme a seguir y acompañarme estos últimos años en el camino.

A todas mis amigas, mi gran sostén siempre. En especial a Fabrina y Aldana, que aparecieron en el momento justo para impulsarme a seguir y no bajar los brazos.

A todas las personas de La Collera, mi segunda familia en Bahía Blanca.

## RESUMEN

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*) es la cuarta oleaginosa más importante a nivel mundial. En nuestro país, es el segundo cultivo oleaginoso (3,1 Mt en la campaña 21/22) con rendimientos promedios de 2,0 t ha<sup>-1</sup>. Además, ocupamos el tercer puesto como exportadores de aceite y harina. Una de las enfermedades más importantes del cultivo es el mildiu o enanismo del girasol, cuyo agente causal es *Plasmopara halstedii*. Los síntomas característicos de la enfermedad van desde muerte de plántulas, enanismo, esporulación en hojas y producción de flores infértiles. El empleo de resistencia genética en las variedades de girasol es el método más eficaz para controlar la enfermedad. Se han identificado dos clases de resistencia según su control genético: i) resistencia vertical, raza específica conferida por genes mayores, denominados *PI*, y ii) resistencia horizontal, raza no-específica y poligénica. El girasol silvestre, *H. annuus*, es el antecesor del girasol cultivado. En Argentina, se ha naturalizado en la región central ocupando hábitats heterogéneos en sus características climáticas y en su cercanía al cultivo. Poblaciones silvestres de *H. annuus* han sido frecuentemente fuente valiosa de genes de resistencia a mildiu.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta de poblaciones locales de *H. annuus* frente al patógeno *P. halstedii* a través de la inoculación con la raza 710. Las plántulas se inocularon siguiendo el método de inmersión completa. El ensayo comprendió seis poblaciones silvestres inoculadas, dos controles cultivados resistentes y susceptibles inoculados y un control susceptible sin inocular. Luego de la inducción los individuos de cada población se caracterizaron en base a la presencia/ausencia de signos de infección y el grado de esporulación, obteniéndose tres índices de enfermedad: Incidencia, Índice de Lebeda (cuatro clases) e Índice Ampliado (seis clases), este último que tiene en cuenta la proporción de plántulas muertas. Se observaron diferencias en los promedios de daño entre poblaciones y entre índices. En todas las poblaciones se encontraron individuos sin signos de enfermedad (grado 0) que se interpretan como resistentes. Las proporciones de resistentes y susceptibles en cada población sugieren que la resistencia presente en los materiales silvestres sería de tipo horizontal o poligénica. Esto debería ser confirmado en cruzamientos con genotipos cultivados. Además se analizó material bibliográfico de dos fuentes diferentes que utilizan herramientas moleculares para localizar genes de resistencia *PI* en el mapa de girasol. Se refleja la importancia de los marcadores como técnicas para asistir en la selección durante el mejoramiento.

## INTRODUCCIÓN

### *El cultivo de girasol en Argentina*

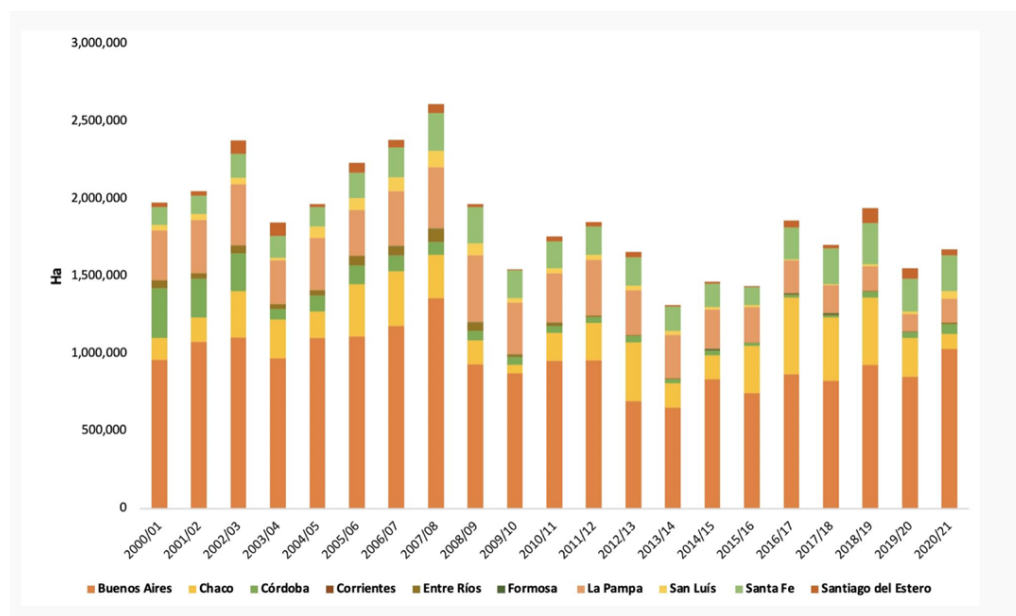
*Helianthus annuus* var. *macrocarpus*, conocido como girasol domesticado, es una planta anual, de ciclo primavero-estival, perteneciente a la Clase *Dicotiledonea*, Familia *Asteraceae*. Está formada por un tallo erecto, herbáceo que alcanza hasta 1,5 – 2 metros de altura, y por un sistema radicular pivotante y profundo, el cual le permite explorar grandes profundidades de suelo en busca de agua, hasta 3 metros, otorgándole mayor ventaja competitiva frente a otros cultivos en condiciones de sequía. Sus hojas son acorazonadas y la inflorescencia consta de un receptáculo en el cual se insertan dos tipos de flores; en la periferia flores liguladas de color amarillo y estériles, y en el centro, flores tubulares y fértiles. La fecundación es alógama y de polinización entomófila, principalmente por abejas. El fruto es un aquenio del cual se obtendrá aceite (ASAGIR, 2022).

La producción mundial de girasol en la campaña 2021/2022 fue de 57,3 millones de toneladas. Los principales países productores son Ucrania (17,5 millones de toneladas), Rusia (15,5 millones de toneladas) y la Unión Europea (10,3 millones de toneladas). Argentina ocupa el cuarto lugar como productor a nivel mundial, con una producción de 4,05 millones de toneladas (Figura 1) (USDA, 2023). A comienzos de la década del 2000, la participación de Argentina en las exportaciones en el mercado mundial alcanzaba el orden del 40%, a partir del cual comenzó a decrecer. Actualmente, se mantiene en el orden del 7,4% (ASAGIR, 2023). La mayor parte de la exportación del cultivo de girasol en nuestro país es como subproducto, a través de aceite o harina, colocándonos en el tercer lugar a nivel mundial como exportadores, luego de Ucrania y Rusia (USDA, 2023). En el mercado de este cultivo a nivel mundial, el aceite es el que contribuye a la formación del precio, ya que es el principal producto de la molienda del girasol. Los demás subproductos, como la harina, se comercializan como insumos forrajeros para la producción de carne y leche, principalmente. La evolución de la superficie sembrada a nivel nacional, no ha sido regular a través de las campañas, mostrando una tendencia negativa en las últimas décadas. En los últimos 20 años el área total disminuyó un 15% (Figura 2). Para la campaña 2021/22 el área ascendió a 1,8 millones de hectáreas. En cuanto a la participación de las distintas provincias en el área sembrada, el mayor porcentaje se concentra en la provincia de Buenos Aires (61%), seguida por Santa Fe (14%) y La Pampa (9%) (ASAGIR, 2022).

**Figura 1.** Semillas de girasol y productos: suministro y distribución mundial. Miles de toneladas (USDA, 2023).

		Oilseed, Sunflowerseed		
Marketing Year		2020/21	2021/22	2022/23
<b>Production</b>				
Argentina	(Mar-Feb)	3,430	4,050	4,200
Russia	(Sep-Aug)	13,269	15,572	17,000
Turkey	(Sep-Aug)	1,560	1,750	1,900
Ukraine	(Sep-Aug)	14,100	17,500	10,100
European Union	(Oct-Sep)	8,898	10,249	9,475
Other		7,943	8,202	8,625
<b>World Total</b>		49,200	57,323	51,300
<b>Imports</b>				
Argentina	(Mar-Feb)	0	0	0
Russia	(Sep-Aug)	70	75	45
Turkey	(Sep-Aug)	907	669	1,250
Ukraine	(Sep-Aug)	24	21	10
European Union	(Oct-Sep)	779	1,850	2,350
Other		955	1,208	1,177
<b>World Total</b>		2,735	3,823	4,832
<b>Exports</b>				
Argentina	(Mar-Feb)	176	156	200
Russia	(Sep-Aug)	554	235	800
Turkey	(Sep-Aug)	123	118	125
Ukraine	(Sep-Aug)	191	1,622	1,950
European Union	(Oct-Sep)	624	360	600
Other		1,232	1,397	1,170
<b>World Total</b>		2,900	3,888	4,845

**Figura 2.** Evolución de área sembrada de girasol en Argentina, participación por provincia. 2000/01 – 2020/21 (ASAGIR, 2022).



En Argentina se han naturalizado en los últimos 50 años dos especies silvestres de *Helianthus* nativas de Norteamérica, *H. annuus ssp. annuus* (Figura 3) y *H. petiolaris*, ambas anuales, diploides y sexualmente compatibles con el girasol domesticado (Poverene et al., 2004). El ingreso de estas especies ha sido explicado a través de diferentes procesos, que incluyen mezclas de semillas con objetivo de forraje y la introducción voluntaria con objetivos de mejoramiento (Hernández et al., 2019). Poblaciones de *H. annuus* silvestre se han dispersado por la región central de Argentina y se han solapado significativamente con la zona de cultivo y algunas áreas dedicadas a la multiplicación de semillas.

Estudios realizados sobre poblaciones locales de *Helianthus* silvestre, donde se ha analizado su variabilidad por estudios isoenzimáticos y morfológicos, confirman la existencia de flujo genético entre cultivo y especies, que puede generar nuevas formas asilvestradas o malezas y originar enjambres híbridos (Ureta et al., 2008). El flujo génico conlleva un aspecto ambiental relacionado con la potencial liberación de cultivares de girasol transgénicos en Argentina, ya que representan una probable vía de escape de transgenes. Estos cruces naturales entre el girasol cultivado y ambas especies silvestres de *Helianthus* ocurren frecuentemente mediante flujo de polen del cultivo a las especies silvestres, y en menor medida, al cruzamiento recíproco o entre especies silvestres. La

hibridación entre *H. annuus* silvestre y el girasol cultivado ocurre fácilmente ya que constituyen la misma especie. A su vez, *H. petiolaris* también se hibrida e introgressa con el cultivo, aunque existen ciertas barreras reproductivas que generan pocos híbridos estériles debido a irregularidades meióticas. Sin embargo, mediante retrocruzamientos se reestablece rápidamente la fertilidad en las siguientes generaciones (Poverene et al., 2004). En varias localidades se han encontrado formas intermedias entre plantas silvestres típicas. El flujo genético representa un problema ya que puede originar malezas de difícil control.

Las especies silvestres fueron propagándose y adaptándose a diferentes hábitats incluyendo ambientes semiáridos y suelos arenosos y continúan expandiéndose en el país. Esta capacidad de invadir nuevas áreas podría deberse en parte a su diversidad genética incluyendo resistencia a factores bióticos y abióticos (Poverene et al., 2004).

Por otro lado, el germoplasma silvestre ha sido fuente de rasgos de interés agronómico que pudieron ser transferidos al girasol mediante cruzamientos convencionales tales como androesterilidad, resistencia a patógenos y a herbicidas. Un ejemplo de esto último es la tecnología Clearfield, un rasgo no transgénico en girasol que permite un mayor control de malezas tanto gramíneas como latifoliadas en el cultivo a través de la utilización de herbicidas del grupo de las imidazolinonas (IMI). Estos inhiben la actividad enzimática de la acetohidroxiácido sintasa (AHAS) o conocida también como acetolactato sintasa (ALS), la cual interviene en la síntesis de tres aminoácidos esenciales. El descubrimiento de individuos con alelos mutantes naturales o inducidos del locus ALS ha permitido el desarrollo y la comercialización de girasoles con esta tecnología, permitiendo un excelente control de malezas en el cultivo de girasol (Sala et al., 2012).



**Figura 3.** *H. annuus* ssp. *annuus* – Río Cuarto, Córdoba, Argentina (Catedra de Producción Vegetal Extensiva, A. Presotto).



#### *Mildiu en girasol*

Una de las enfermedades más importantes y perjudiciales del cultivo de girasol es el mildiu o enanismo, cuyo agente causal es *Plasmopara halstedii* (Delmotte et al., 2008). Este patógeno es originario de América del Norte, donde el girasol silvestre, *H. annuus*, es nativo. Se registró por primera vez sobre girasoles cultivados en Indiana, Iowa y Minnesota a principios de la década de 1920 (Young y Morris, 1927) y se propagó rápidamente en cultivos de variedades de girasol de polinización abierta, provocando brotes graves y declarándolo patógeno de cuarentena en la Unión Europea (Delmotte et al., 2008).

Los síntomas dependen de la etapa de desarrollo en la que la planta se infecte, y se clasifican en dos categorías. En la infección sistémica o primaria, el patógeno ingresa por el sistema radicular de las plantas a través de zoosporas liberadas a principios de primavera, a partir de zoosporangios derivados de oosporas (Gascuel et al., 2015), provocando generalmente *damping-off* o muerte de las plántulas (Gulya et al., 2019). Si las plántulas sobreviven, se puede observar enanismo (Figura 4), clorosis asociada a las venas de las hojas (Figura 5) y esporulación (Figura 6). Esto resulta en importantes pérdidas de rendimiento como consecuencia de la producción de flores infértiles y reducción del tamaño de capítulo. Una característica típica de esta enfermedad, es que cuando las plantas alcanzan la madurez, los capítulos quedan orientados hacia arriba (Figura 7). El enanismo

de las plantas ha sido explicado como una alteración hormonal o de la absorción de nutrientes, aunque el mecanismo no se conoce con certeza (Gascuel et al., 2015).

**Figura 4.** Enanismo en plantas afectadas por mildiu (Gulya et al., 2019).



**Figura 5.** Clorosis alrededor de nervaduras principales (Gulya et al., 2019).



**Figura 6.** Esporulaci3n en env3s de hoja (INTA Balcarce, 2017).



**Figura 7.** Planta madura con cap3tulo orientado hacia arriba (Bulletin OEPP, 2014).



Periodos prolongados de alta humedad y temperaturas frescas ( $<18^{\circ}\text{C}$ ) favorecen el desarrollo de zoosporangios, el cual se manifestar3a como un denso crecimiento algodonoso blanco en el env3s de las hojas (esporulaci3n) (Gulya et al., 2019). Los mayores da1os de esta enfermedad ocurren en infecciones tempranas, entre pre-emergencia y seis hojas verdaderas, observ3ndose mayormente en forma de parches, con p3rdidas de hasta el 100%.

Por otro lado, pueden producirse infecciones secundarias cuando zoosporangios de hojas infectadas son transportadas por el viento a otras hojas u otras plantas, pero estas lesiones no causan p3rdidas muy importantes en el rendimiento (Gulya et al., 2019), aunque

favorecen la dispersión de la enfermedad entre plantas, lo que se convierte en un grave problema en lotes de producción de semilla.

*Plasmopara halstedii* es de naturaleza homotática, y puede reproducirse en forma sexual y asexual. La fase sexual es a través de la formación de oosporas, solo hay una generación de esta fase en el ciclo del cultivo y es necesaria para producir propágulos invernantes. Las generaciones asexuales dan lugar a la formación de zoosporas, las cuales se producen durante la temporada de crecimiento, de primavera a otoño (Gascuel et al., 2015). El papel de las oosporas se subestimó durante mucho tiempo debido a su naturaleza confusa y su bajo número en comparación con la alta producción de zoosporangios en las hojas, pero hoy se sabe que son el elemento clave para la persistencia en el suelo y para la dispersión a larga distancia a través de semillas contaminadas. La falta de control en relación a la contaminación con oosporas es una de las principales causas de la distribución mundial del patógeno en el siglo XX (Spring et al., 2019).

Las fuentes de inóculo comprenden: el suelo infectado con oosporas, restos de cultivos afectados de años anteriores y semillas portadoras de oosporas. Estas oosporas pueden sobrevivir en el suelo entre 8 a 10 años y sirven como inóculo primario para plántulas jóvenes. Con suelos fríos y húmedos, o cuando se producen lluvias intensas o encharcamientos, las oosporas germinan y forman zoosporangios, liberando zoosporas móviles asexuadas que se desplazan a distancias cortas hasta alcanzar las raíces o el hipocótilo de las plantas. En híbridos muy susceptibles, una vez que penetran e invaden la plántula, pueden causar muerte en pre-emergencia (FAUBA, 2023). Por lo tanto, la humedad y la temperatura son los factores ambientales más importantes que afectan la infección y la diseminación. Temperaturas por debajo de los 16°C, humedad relativa (70%) y lluvias acumuladas en estadios tempranos son factores ambientales predisponentes.

Las pérdidas de rendimiento por mildiu de girasol dependen de numerosos factores, entre los cuales podemos incluir incidencia (porcentaje de plantas infectadas en el campo) y distribución del patógeno, factores climáticos, momento de infección según el estadio fenológico del cultivo, susceptibilidad del híbrido sembrado, las razas predominantes en la región de producción, la cantidad (densidad) de inóculo presente, nivel de agua en el suelo, edad de la planta en el momento de la infección y condiciones ambientales.

### *Manejo, razas y formas de resistencia*

Un manejo integrado de la enfermedad requiere el uso de híbridos resistentes y semillas sanas. Al momento de realizar intercambio de semillas, es importante llevar adelante una cuarentena estricta para impedir la propagación a larga distancia de *P. halstedii*, aunque la detección fiable a escala de lote es muy difícil. Realizar pruebas tradicionales de germinación de semillas y observar si las plantas presentan síntomas de infección luego de 3-4 semanas hoy en día no es viable por la frecuencia y el volumen de semilla comercializada internacionalmente, por esta razón es muy importante realizar tratamiento a las semillas con fungicidas, previo a la siembra, para prevenir la infección primaria durante los primeros estadios vegetativos ya que es el período de mayor susceptibilidad (Spring et al., 2019). Además, se debe evitar siembras con temperaturas frías, controlar girasoles silvestres y hospedantes del patógeno y evitar lotes con historia de la enfermedad. Se debe tener en cuenta que las rotaciones tienen un efecto mínimo en el manejo del mildiu, ya que como se mencionó las oosporas pueden sobrevivir en el suelo hasta 10 años, haciendo que esta práctica no sea viable. La enfermedad es extremadamente difícil de erradicar una vez que se establece en un área.

Aunque existen híbridos de girasol resistentes al mildiu, periódicamente surgen nuevos patotipos o razas de *P. halstedii* (FAUBA, 2023) con diferentes grados de virulencia. Hasta el 2018, a nivel mundial se ha confirmado la existencia de al menos 45 razas.

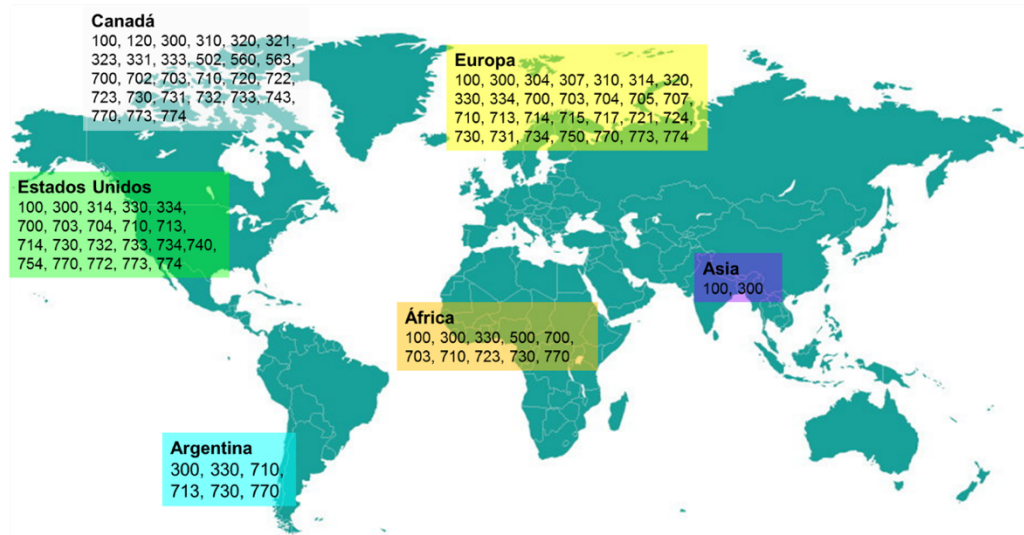
El método más eficaz para controlar la enfermedad es la introgresión de genes mayores dominantes de resistencia, denominados genes *PI*, en los híbridos de girasol (Martínez, 2022). Estos genes proporcionan una amplia variación de resistencia raza-específica al mildiu (Tourvieille de Labrouhe et al., 2008). Sin embargo, el uso de estos genes generalmente resulta en la pérdida de resistencia en un período de tiempo relativamente corto debido a la coevolución del huésped y el patógeno, resultando en la aparición de nuevas razas que poseen los genes de virulencia correspondientes. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevas fuentes de resistencia y la combinación de diferentes genes *PI* representan estrategias de manejo más sostenibles en el tiempo (Qi et al., 2015).

Para conocer la raza de un aislamiento de mildiu, es necesario inocular con el patógeno un conjunto de líneas endocriadas de girasol que poseen diferentes genes de resistencia (genes *PI<sub>n</sub>*), y evaluar la respuesta de resistencia o susceptibilidad de esas líneas frente a la cepa. Al principio (~1980), identificar con nomenclatura las razas que causaban el mildiu en girasol era sencillo, ya que solo se conocían pocas razas. Pero luego de 20 años, había un alto número de razas identificadas, pero se carecía de una

nomenclatura universalmente aceptada (Gulya et al., 1991). Actualmente, el sistema más utilizado es el que surge en el año 2000, basado en la utilización de nueve líneas diferenciales agrupadas en tres grupos; cada uno de los grupos define un dígito de un código final de tres números que designa cada raza. Ante la rápida aparición de nuevas razas a nivel global, se propuso ampliar el set de líneas diferenciales de nueve a quince, que generan un código de cinco dígitos, aunque la nomenclatura más difundida continúa siendo de tres dígitos (Martínez, 2022).

El primer registro de *P. halstedii* en Argentina fue en el año 1959. Hasta 1998, las razas predominantes en nuestro país eran 300 y 330, y la mayoría de los híbridos de girasol sembrados eran resistentes portadores del gen  $PI_2$ . La incidencia del mildiu del girasol se mantenía baja, pero ese año aparecieron nuevas razas (710, 730 y 770) que superaron la resistencia. Los daños en los lotes de producción llegaron a ser superiores al 80%, con girasoles severamente afectados. Estas nuevas variantes, además, producían inoculo secundario con gran eficiencia, de manera que una sola planta podía enfermar a 100 plantas más. Para esto, se incorporaron una amplia variedad de genes de líneas públicas de Argentina y Estados Unidos ( $PI_5$ ,  $PI_6$ ,  $PI_7$ ,  $PI_8$ ,  $PI_{15}$ ,  $PI_{17}$ ,  $PI_{18}$  y  $PI_{Arg}$ ). Los genes de resistencia vertical  $PI_6$ ,  $PI_7$ , y  $PI_8$  y  $PI_{Arg}$  se identificaron en el año 2008, los cuales provenían de *H. annuus* silvestre, *H. praecox* y *H. argophyllus*, y resultaban efectivos contra todas las razas del patógeno presentes en Argentina. Por otro lado, las razas 710, 730 y 770 mostraron cepas tolerantes al tratamiento de semillas con Metalaxyl en diferentes zonas de producción de girasol. En 2013, se observó mildiu en híbridos que contenían el gen  $PI_{15}$ , lo que indicó la presencia de una nueva raza de *P. halstedii* (Martínez, 2022). Hasta el momento en Argentina se han confirmado las razas 300, 330, 710, 713, 730 y 770 (Viranyi et al., 2015, Spring 2019, Bazzalo et al., 2016) (Figura 8).

**Figura 8.** Distribución de las razas de *P. halstedii* en el mundo (Spring 2019; Martínez, 2022).



En cuanto a la distribución, se ha identificado la presencia de mildiu en tres regiones productoras de girasol de Argentina. Las razas 710, 730 y 770 fueron identificadas en el norte de Santa Fe y Sur de la provincia de Buenos Aires, con la mayor cantidad de casos para las campañas 2012 y 2015. Además, se detectó la presencia de la raza 713 en cercanías a la ciudad de Santa Fe, quebrando la resistencia a los genes  $Pl_{13}$  y  $Pl_{14}$ . Argentina muestra un mayor crecimiento de variantes patógenas de *P. halstedii* que la históricamente observada. La ruptura del gen  $Pl_{15}$  (Rojas et al. 2019) aumenta los riesgos de que la enfermedad continúe expandiéndose por el Sur de la provincia de Buenos Aires. Los genes  $Pl_6$  y  $Pl_8$  introgresados en híbridos argentinos parecían ser eficaces para controlar mildiu, aunque en Francia (Delmotte et al., 2012), Estados Unidos (Gilley et al., 2016) y República Checa (Trojanová et al., 2017) fueron superados. En nuestro país, la caracterización de inóculos de Avellaneda y Colonia Durán de Santa Fe puso en evidencia un quiebre del  $Pl_6$  que hasta 2020 confería resistencia. De esta manera, se confirma la existencia de una nueva raza 777730 en el país que podría tratarse de una única raza o bien una mezcla de dos o más razas (Martínez, 2022).

Además de la resistencia conferida por los genes  $Pl$ , se han identificado otras formas de resistencia. La resistencia cuantitativa surge a partir de la búsqueda de una resistencia más durable. También es conocida como resistencia horizontal o poligénica, ya que está gobernada por varios genes, en donde cada gen aporta una porción a la resistencia total. Por ejemplo, el girasol presenta resistencia poligénica a *Sclerotinia sclerotiorum*, *Diaporthe*

*helianthi* y *Phoma macdonadlii* (Vear et al., 2008). En especies cultivadas, la resistencia se considera duradera cuando es cuantitativa y no específica de la raza, y transitoria o efímera cuando es completa y específica. La utilización de genes mayores ha mostrado éxito a la resistencia al mildiu, pero conducen a la aparición de razas más agresivas a corto plazo. Los cambios en la virulencia en aislados de *P. halstedii* en Francia fueron atribuidos al uso de los mismos genes en la mayoría de los híbridos de girasol. Se demostró que la resistencia cuantitativa, de manera aislada, no garantiza la protección suficiente al cultivo de girasol, pero una combinación de resistencias podrá aumentar la duración del control de *P. halstedii*. La utilización de estas dos resistencias juntas se basa en que la resistencia cuantitativa reduce la propagación y la aparición de nuevas razas. La resistencia no específica proporciona una nueva herramienta para el control duradero del mildiu (Tourvieille de Labrouhe, 2008). Para hacer posible la mejora genética con un alto nivel de resistencia cuantitativa en genotipos que también portan genes *PI*, es importante disponer de marcadores genéticos estrechamente ligados a loci de rasgos cuantitativos (QTL) implicados en la resistencia cuantitativa (Vear et al., 2008).

#### *Herramientas moleculares*

Uno de los principales objetivos de la biotecnología agrícola es obtener genotipos resistentes a enfermedades, para los cuales la selección asistida por marcadores es de gran utilidad. Un marcador molecular es una secuencia de ADN que permite evidenciar la constitución física del genoma bajo estudio, en este caso el girasol, funcionando como señalador de diferentes regiones del mismo, pudiendo o no corresponder a un gen. Mediante el uso de un marcador molecular se puede seguir una característica agronómica (fenotípica) sin que esta se manifieste (Lombardo et al., 2014) El uso de marcadores moleculares permite la evaluación del material de selección en las primeras etapas del desarrollo de la planta. Esto puede disminuir la cantidad de trabajos de campo (Usatov et al., 2014).



## **HIPOTESIS**

Considerando que las poblaciones de *Helianthus annuus* presentes en Argentina tienen alta diversidad genética, estas podrían contener genes determinantes de resistencia a mildiu.

## **OBJETIVOS**

- Evaluar seis poblaciones de *Helianthus annuus* colectadas en Argentina, en su comportamiento frente a mildiu, inoculadas con la raza 710.
- Caracterizar los individuos silvestres en base a índices de enfermedad.
- Analizar el uso de herramientas moleculares para localizar genes de resistencia *PI* en dos citas bibliográficas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

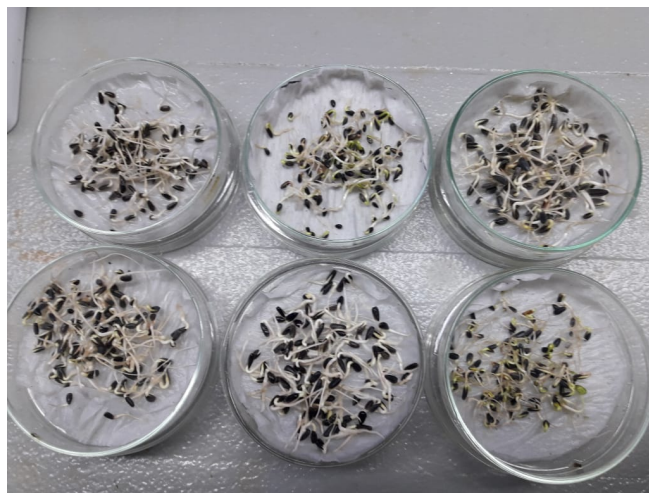
### Material vegetal

El germoplasma silvestre de girasol estuvo representado por 6 poblaciones de *Helianthus annuus* naturalizadas en diferentes hábitats de Argentina (Figura 9) (Cantamutto et al., 2010). Se partió de 200 semillas de cada población, las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 20% durante 10 minutos. Luego, para favorecer la ruptura de la dormición primaria, las semillas se colocaron dentro de cajas de Petri con papel húmedo (Figura 10), a una temperatura de 4°C durante 7 días.

**Figura 9.** Localización de las seis poblaciones de *H. annuus* naturalizadas en Argentina.

Población	Localidad	Provincia	Latitud (°)	Longitud (°)
AAL	Adolfo Alsina	Buenos Aires	-37,2	-62,6
BAR	Colonia Baron	La Pampa	-36,2	-63,9
BRW	Barrow	Buenos Aires	-38,2	-60,1
DIA	Diamante	Entre Ríos	-32,0	-60,4
LMA	Las Malvinas	Mendoza	-34,5	-68,2
RCU	Río Cuarto	Córdoba	-33,1	-64,2

**Figura 10.** Semillas colocadas en cajas de Petri para favorecer la ruptura de la dormición.



### *Inoculación*

Una vez emergida la radícula, con un largo de 1,5-2 cm y la presencia de pelos radicales, se llevó a cabo la inoculación de las semillas con una solución de esporangios frescos de *P. halstedii*. Para determinar la concentración de inóculo se utilizó una cámara Neubauer y microscopio óptico 10X; la concentración seleccionada fue 45.000 esporangios ml<sup>-1</sup>. El método utilizado fue el de inmersión de plántula completa (*WSI*) descrito por Gulya et al., 1991 (Figura 11). El aislamiento correspondió a la raza 710, colectada en Balcarce, Buenos Aires, en un lote de girasol cultivado.

Como control de inoculación se incluyeron 2 líneas; una susceptible a la raza 710 (HA89) y una resistente (RHA419) (Miller et al., 2002). Además, se incluyó un control negativo (sin inocular). Para este último se tomaron semillas de la línea susceptible utilizando los mismos procedimientos que el resto de los controles, pero reemplazando la solución de inóculo por agua. Para realizar una única inoculación con todas las plantas en un mismo estadio fenológico, se suspendió el crecimiento de aquellas plántulas que presentaban pelos radicales en la radícula conservándolas a una temperatura de 4°C, hasta obtener el número requerido de plántulas.

Se utilizó un diseño de 4 bloques, cada uno representado por una bandeja plantinera con pocillos individuales. Los controles sin inocular se sembraron en una bandeja por separado. En cada bloque, se sembraron 20 semillas por población y controles inoculados, distribuidas en dos líneas en forma aleatoria, cada línea representada por 10 semillas sembradas consecutivamente (Figura 12 y 13). El número de semillas evaluado, tanto en el genotipo control como en cada población, fue 80 unidades. Las plántulas crecieron a 22°C hasta que las primeras hojas verdaderas estuvieran expandidas. El sustrato empleado fue mezcla 50:50 de perlita y turba, el cual fue autoclavado (1 atmósfera, 40 minutos) previo a su utilización.

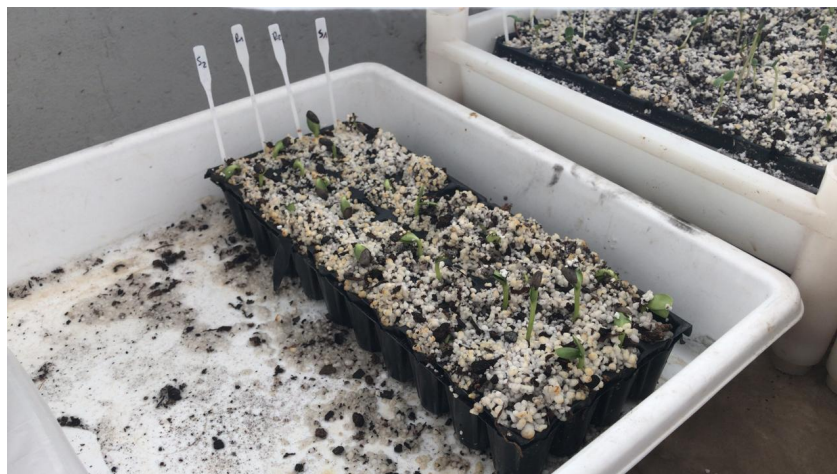
**Figura 11.** Método de inmersión de plántula completa para llevar a cabo la inoculación.



**Figura 12.** Bandeja de siembra con poblaciones de *H. annuus*, inoculadas e identificadas cada una con su respectiva nomenclatura.



**Figura 13.** Bandeja de siembra inoculada con línea susceptible (S) y línea resistente (R).



*Evaluación de la enfermedad en la parte aérea*

Transcurridos 12 días luego de la inoculación, con el objetivo de inducir la aparición de fructificaciones o esporulación de *P. halstedii*, se rociaron las plántulas con agua destilada y luego se cubrieron las bandejas con bolsas plásticas para alcanzar 100% de humedad relativa. Las bandejas cubiertas se mantuvieron en cámara de cultivo 17°C durante 48 horas y oscuridad. Luego se retiraron las bolsas y se realizó una evaluación de la Incidencia de la enfermedad. Para calcular ésta, se contabilizaron el número de plantas enfermas, es decir, que presentaban esporulación en las hojas; y se dividió dicho número por la cantidad de plántulas emergidas. Dicho valor se expresó como porcentaje (%).

Además, se cuantificó la enfermedad con el Índice de Lebeda (Lebeda 1986), el cual toma en cuenta las plántulas que presentan esporulación en la parte aérea. Este índice comprende cuatro grados, definidos de la siguiente manera:

**Figura 14.** Índice de Lebeda.

Grado	Descripción
0	Sin signos
1	Esporulación dispersa en uno o ambos cotiledones
2	<50% de cotiledones cubiertos por esporangios
3	>50% de cotiledones cubiertos por esporangios

Al momento de analizar los daños en las plántulas, se observaron síntomas que no eran considerados en el Índice de Lebeda, por lo que se utilizó un segundo índice, denominado Índice Ampliado, que tenía en cuenta dos síntomas adicionales: 0,5 (lesiones necróticas y/o amarillamiento en cotiledones) y 4 (individuos muertos). Ambos índices tomaron valores de 1 al 100 y se calcularon a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Indices (Lebeda y Ampliado)} = \frac{\sum_i^k x_i * w_i}{\sum_i^k x_i * \max(w)} * 100$$

$x_i$ : número de plantas en la  $i$  categoría.

$w_i$ : grado de la  $i$  categoría.

$i$ : va de 1 a  $k$ , donde  $k$  es el número de categorías de infección.

Además, se estudió la composición de proporciones de estas categorías en las poblaciones silvestres y en los controles.

#### *Análisis estadístico*

Para cada una de las tres variables (Incidencia, Índice de Lebeda e Índice Ampliado) las comparaciones entre las medias de las poblaciones silvestres y controles cultivados se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANAVA) y un test de comparaciones de medias de a pares de Fisher ( $P=0,05$ ). El diseño fue de bloques completos, es decir, que todas las poblaciones estaban representadas en cada bloque, con dos replicas por bloque. Cada replica consiste en el valor obtenido a partir de 10 plántulas de cada población. Se incluyeron un total de 4 bloques (bandejas) y 8 genotipos (6 poblaciones silvestres, un control resistente y uno susceptible).

## RESULTADOS

### *Evaluación de la enfermedad en parte aérea a partir de Índices de daño*

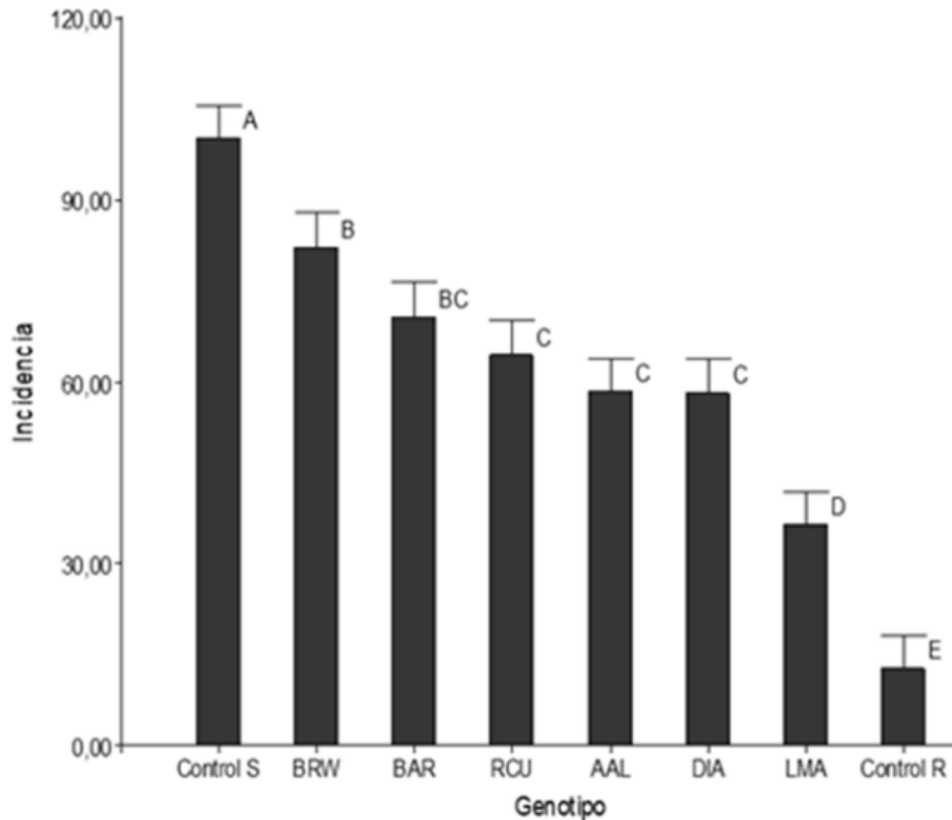
#### a) Incidencia

Con respecto a las poblaciones silvestres, los valores más bajos de Incidencia se encontraron en la población LMA, con un porcentaje del 36,3%, la cual se diferenció estadísticamente del resto de las poblaciones. Por el contrario, BRW manifestó el valor más alto, con 82,2%. Seguidamente, la población BAR mostró el valor de 70,8%, que si bien fueron menores a BRW, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Las restantes poblaciones (AAL, DIA y RCU) mostraron valores intermedios entre LMA y BRW, sin diferencias estadísticas entre ellas.

Con respecto a los controles, el control susceptible (Control S) mostró una Incidencia del 100,0%, y el control resistente (Control R) del 12,5%, ambos diferenciándose estadísticamente del resto de los materiales silvestres.

La población BRW fue la que manifestó mayor susceptibilidad a la enfermedad, y LMA mostró mayor resistencia (Figura 15).

**Figura 15.** Valores promedio de Incidencia de los materiales silvestres (AAL, BAR, BRW, DIA, LMA, RCU), genotipo susceptible (control R) y genotipo resistente (control S). Las diferentes letras ordenan a los materiales según diferencias estadísticas significativas (Fisher 5%).



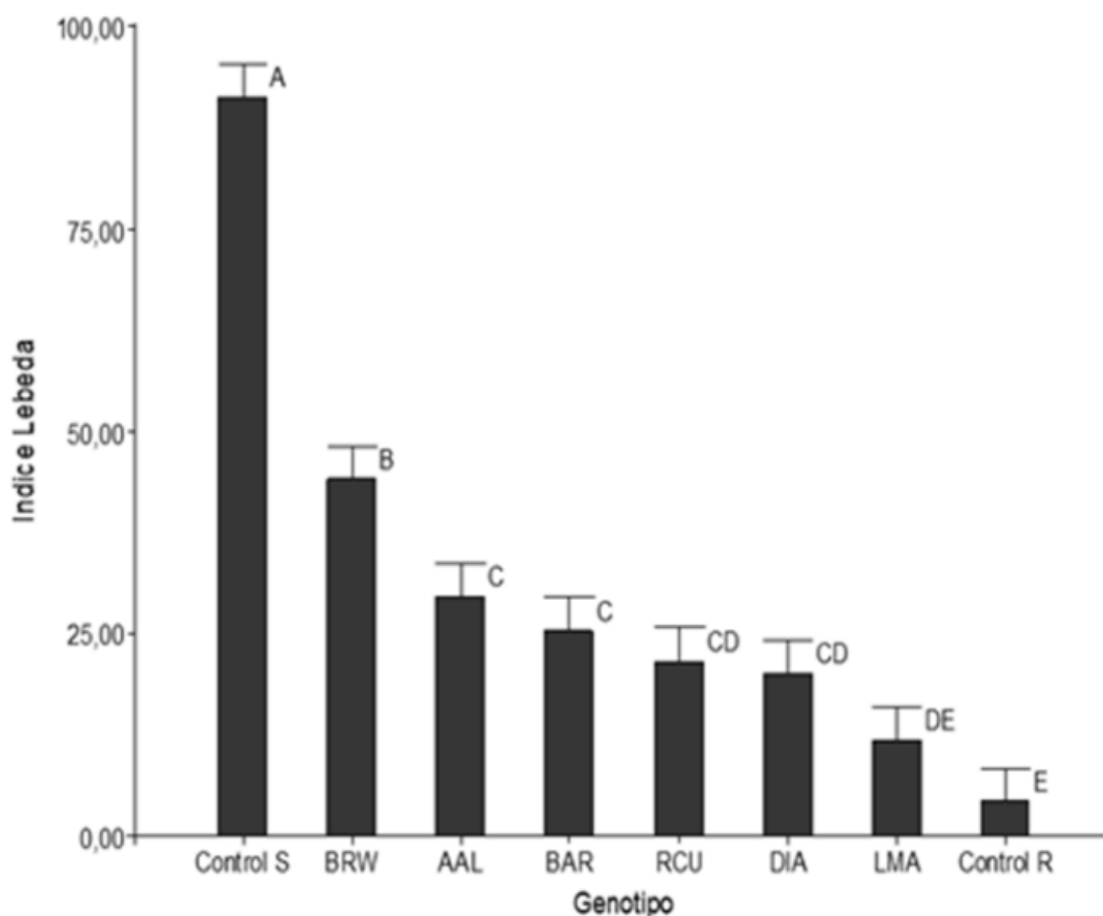
b) Índice de Lebeda

En referencia a las poblaciones silvestres, BRW se diferenció del resto de los materiales con el mayor valor de Índice (44,2). Los genotipos AAL y BAR no se diferenciaron estadísticamente, y no mostraron diferencias significativas con DIA y RCU. Estas cuatro últimos genotipos presentaron valores intermedios entre BRW y LMA, este último con los valores más bajos entre las poblaciones. En los valores extremos, se ubicaron los controles con diferencias estadísticamente significativas.

La población BRW fue la que manifestó mayor susceptibilidad a la enfermedad, y LMA mostró mayor resistencia (Gráfico 16).



**Figura 16.** Valores promedio de Índice de Lebeda de los materiales silvestres (AAL, BAR, BRW, DIA, LMA, RCU), genotipo susceptible (control R) y genotipo resistente (control S). Las diferentes letras ordenan a los materiales según diferencias estadísticas significativas (Fisher 5%).

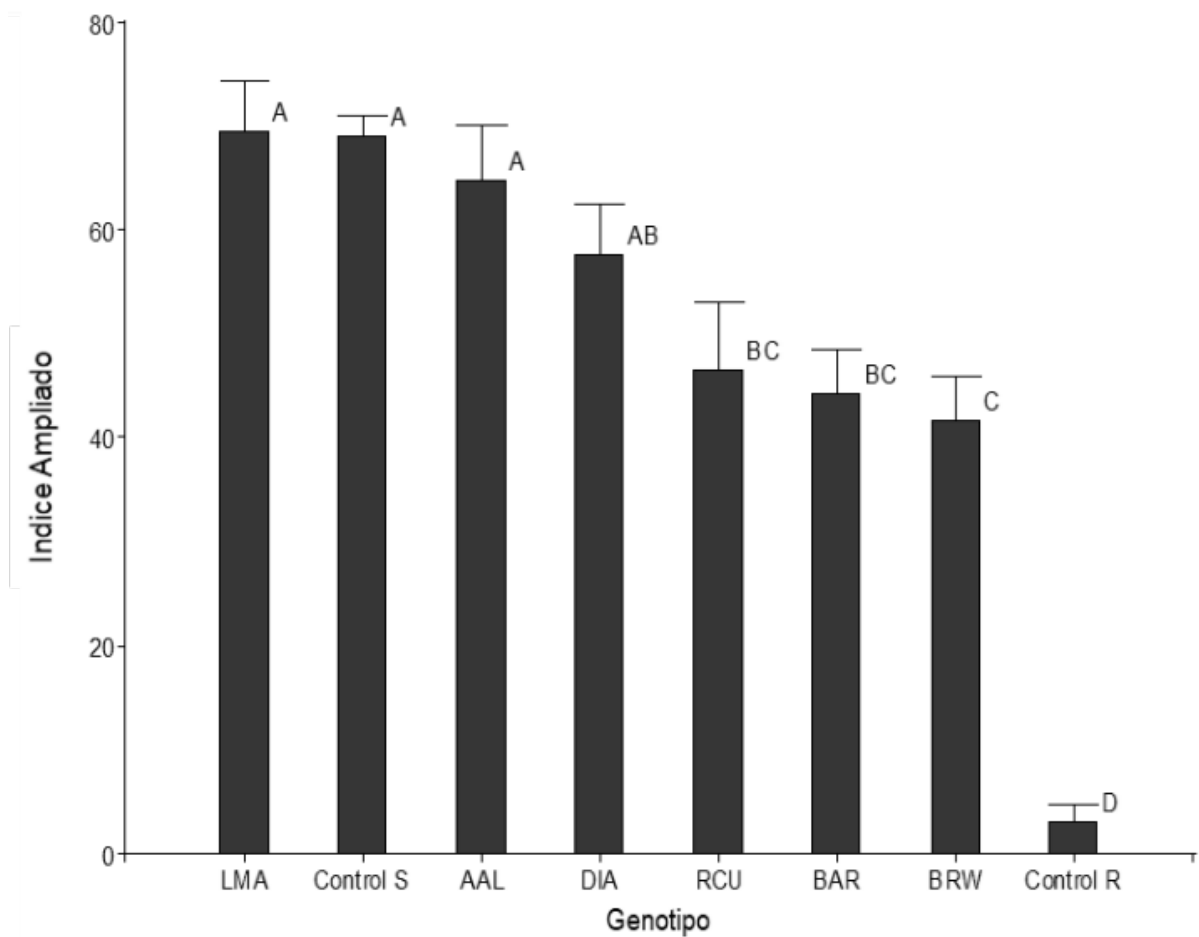


c) Índice Ampliado

Para dicho índice, el valor más alto de enfermedad se observó en el material LMA, el cual superó al control susceptible. Sin embargo, este último no tuvo diferencias estadísticas con LMA y tampoco con AAL. A su vez, la población DIA no mostró diferencias estadísticas significativas con Control S, LMA y AAL. Los genotipos BAR y RCU presentaron valores intermedios sin diferencias estadísticas entre ellos, y la población BRW obtuvo el valor más bajo de todas las poblaciones (41,7), aunque no presentó diferencias significativas con RCU y BAR.

El control resistente obtuvo el valor más bajo del Índice Ampliado, diferenciándose del resto de las poblaciones y del control susceptible. A diferencia de los valores de Incidencia e Índice Ampliado, la población BRW fue la que manifestó mayor resistencia a la enfermedad, y LMA mostró mayor susceptibilidad (Figura 17).

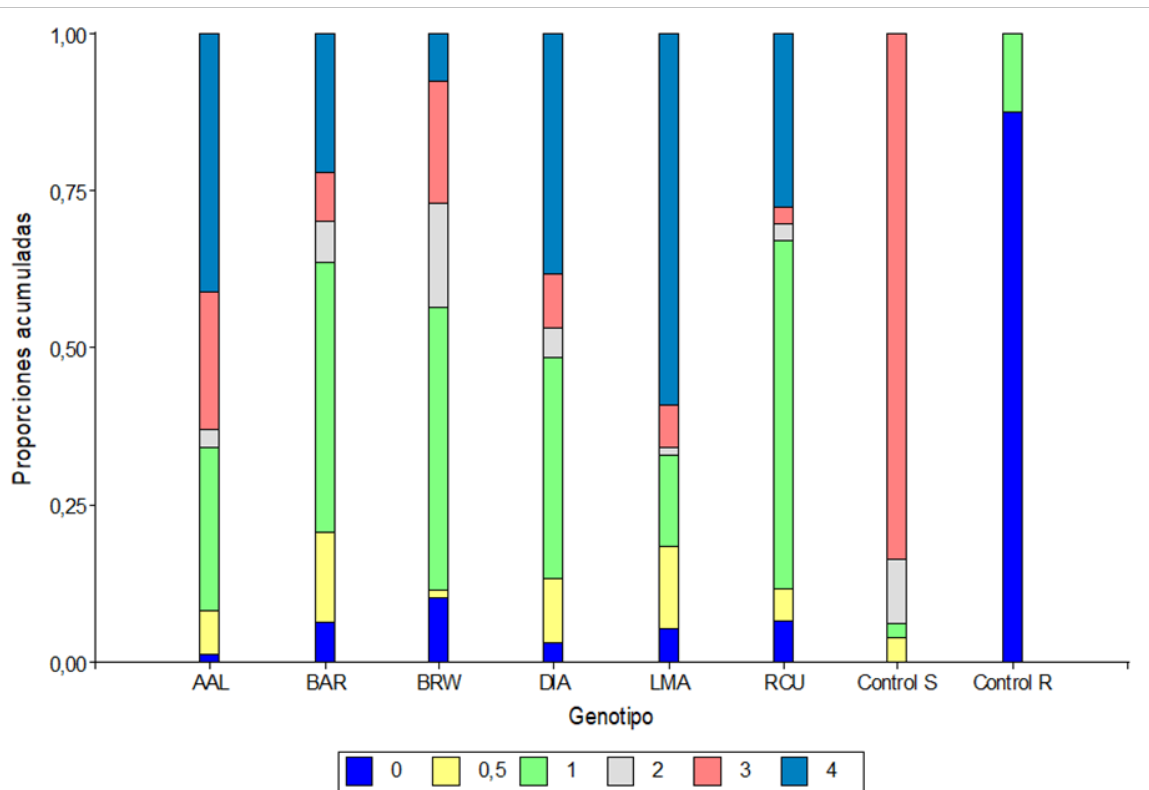
**Figura 17.** Valores promedio de Índice Ampliado de los materiales silvestres (AAL, BAR, BRW, DIA, LMA, RCU), genotipo susceptible (control R) y genotipo resistente (control S). Las diferentes letras ordenan a los materiales según diferencias estadísticas significativas (Fisher 5%).



La figura 18 muestra la proporción de plántulas en los distintos grados (0, 0.5, 1, 2, 3 y 4) para cada población. En el control susceptible más del 75% de las plántulas mostraron signos tipo 3 (Figura 19), es decir, con más del 50% de los cotiledones cubiertos por esporangios. Las plántulas restantes fueron la mayoría clasificadas como grado 2 (Figura 20). Además, no hubo ninguna plántula muerta (grado 4). Por otro lado, el Control resistente mostró más del 75% de plántulas sin ningún signo (Figura 21), y la restante proporción con grado 1 (Figura 22).

Por otro lado, en todas las poblaciones se observaron las 6 escalas de daño descritas anteriormente. El genotipo LMA presentó más del 50% de plántulas muertas (grado 4) (Figura 23), siendo el material más afectado con este síntoma. Por debajo se ubicó AAL y DIA. Contrariamente, BRW fue la población con menor cantidad de plántulas muertas, y con mayor cantidad de plántulas sin signos. Todas las poblaciones mostraron más del 30% de plántulas con grado 0,5, 1 y 2 (Figura 24, 22 y 20).

**Figura 18.** Proporciones acumuladas de plántulas para cada grado de infección (0 a 4) para los controles susceptible (Control S), resistente (Control R) y las poblaciones de girasol silvestre (BRW, BAR, RCU, AAL, DIA, LMA).



**Figura 19.** Plántula grado 3 (más del 50% del cotiledón cubierto por zoosporangios).



**Figura 20.** Plántula grado 2 (menos del 50% del cotiledón cubierto por esporulación localizada).



**Figura 21.** Plántula grado 0 (sin signo).



**Figura 22.** Plántula grado 1 (presencia de zoosporangios dispersos en uno o ambos cotiledones).



**Figura 23.** Plántulas grado 4 (muerte de plántula, con o sin esporulación aérea).



**Figura 24.** Plántula grado 0,5 (lesión necrótica en uno o ambos cotiledones).

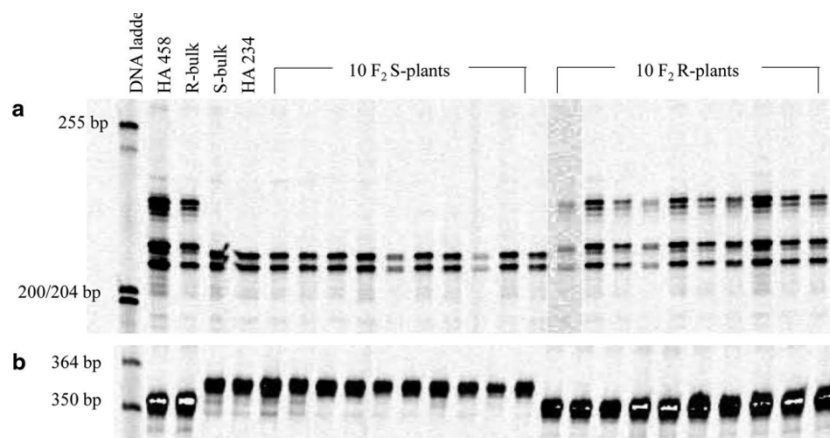


### Marcadores moleculares

En base a dos publicaciones en revistas internacionales se interpretó la utilidad de los marcadores moleculares asociados a genes de resistencia.

Un ejemplo es el gen *PI<sub>17</sub>*, el cual fue mapeado genéticamente en el grupo de ligamiento (LG) 4 del genoma del girasol (Qi et al., 2015). Este demostró ser eficaz contra todas las razas virulentas de *P. halstedii* identificadas en ese momento en Estados Unidos. Su localización en el LG 4 indica que se trata de un *PI* nuevo, diferente de los 12 previamente mapeados en LG 1, LG 8 y LG 13. Para identificar marcadores moleculares vinculados a *PI<sub>17</sub>* se utilizaron iniciadores para secuencias simples repetidas (SSR) y de polimorfismo de nucleótido único (SNP). Dos de los marcadores SSR utilizados tanto en líneas parentales como en F<sub>2</sub> mostraron un patrón polimórfico entre individuos S (susceptibles) e individuos R (resistentes) considerándose potencialmente ligados al gen de resistencia (Figura 25). Además se localizaron dos marcadores SNP flanqueando a *PI<sub>17</sub>*. Los marcadores SNP se validaron en 231 progenies de retro-cruza donde se observaron dos individuos recombinantes. Los marcadores SSR y SNP más cercanos al *PI<sub>17</sub>* delimitaron una región de aproximadamente 3 centiMorgan.

**Figura 25.** Análisis de segregantes de los marcadores SSR ORS1197 (a) y ORS963 (b). Las diez plantas F<sub>2</sub> homocigóticas susceptibles procedían del grupo (bulk) S, y las diez plantas F<sub>2</sub> homocigóticas resistentes procedían del grupo (bulk) R (Qi et al., 2015).



La utilización de marcadores moleculares también permitió hallar el gen de resistencia *PI<sub>19</sub>*, en el año 2016, cuando se encontró que la accesión silvestre *PI 435414* de *H. annuus* mostraba resistencia al mildiu, particularmente a la raza 734 (Zhang, 2016). El gen *PI<sub>19</sub>* fue mapeado en el LG 4 del genoma del girasol y se identificaron marcadores SSR y SNP asociados. Los resultados indicaron que *PI<sub>19</sub>* es diferente de *PI<sub>17</sub>*, mapeado previamente en LG 4, pero que estaban estrechamente vinculados. Este gen resulto muy eficaz contra las razas más predominantes y agresivas de *P. halstedii* identificadas en Norteamérica y fue el primer gen de resistencia a mildiu que se transfirió al girasol confitero.

## DISCUSIÓN

Comparando los tres índices utilizados, se observó que los resultados para Incidencia e Índice de Lebeda coincidieron en que BRW fue la población que mostró mayor susceptibilidad a la raza 710, y por otro lado, LMA fue la población más resistente. Pero, al comparar los resultados con el Índice Ampliado, se observó lo opuesto, donde el genotipo BRW manifestó la resistencia más alta de todas los materiales y LMA la mayor susceptibilidad. Esto se puede explicar porque en el Índice Ampliado se tuvieron en cuenta mayor cantidad de grados fenotípicos, en el cual se incluían plántulas muertas, marcando la diferencia principalmente en las poblaciones nombradas (LMA y BRW). Como en el control negativo (sin inocular) no hubo muerte de plántulas, se concluyó que la infección del patógeno fue la causa de la muerte de las mismas. Por otro lado no se observó muerte de plantas en los controles cultivados inoculados, indicando que ese efecto es particular de las poblaciones silvestres.

También se observaron respuestas variadas dentro de una misma población, así como entre las poblaciones, la cual puede sugerir variaciones en el material genético. Todas las poblaciones mostraron, en diferentes proporciones, todos los grados de infección. Las poblaciones RCU, BRW y BAR fueron las que manifestaron mayor cantidad de plántulas con grado de daños 0, 0,5 y 1 y bajas proporciones de plántulas muertas. Los individuos grado 0 de estas poblaciones podrían ser seleccionados en planes de mejoramiento genético, basándose en que portarían genes que otorgan resistencia a la raza 710 de *P. halstedii*. Cabe aclarar que individuos con esporulación dispersa (grado 1) pueden ser considerados como resistentes, ya que es un signo común en líneas endocriadas con resistencia a mildiu (Martínez, 2022). Además, en el control susceptible las proporciones acumuladas fueron mayormente plántulas con grado de daño 3, donde sí se las compara con las poblaciones silvestres, estas últimas presentan, la mayoría, menores índices de enfermedad. Esto podría indicar que las poblaciones silvestres presentan algún grado de resistencia genética.

La resistencia controlada por genes mayores proporciona una protección completa y específica de raza (Tourvieille de Labrouhe, 2008). Para que una población se considere una fuente potencial de genes *PI*, el valor umbral de inmunidad debe ser menor al 10% de plantas susceptibles. Por lo tanto, en este estudio, la presencia de genes mayores *PI* no parece una explicación probable para las diferentes proporciones de plántulas en cada población. Una explicación posible sería a través de la resistencia cuantitativa, la cual suele ser el resultado de la segregación de alelos en varios loci, originando distintos efectos en



las respuestas de la resistencia al patógeno lo que explicaría los diferentes niveles de la enfermedad en cada población (Pilet-Nayel et al., 2017).

El manejo sostenible de la enfermedad debe basarse en la reducción de la presión de selección sobre el patógeno mediante la combinación de prácticas como la introgresión simultánea de varios tipos o clases de resistencia, el uso de principios activos alternativos para el tratamiento de semillas, rotaciones de al menos 4 años y evitar la siembra temprana y el intercambio de semillas contaminadas.

## CONCLUSIONES

- Todas las poblaciones de *Helianthus annuus* mostraron una proporción de individuos con resistencia a la raza 710 de *P. halstedii*.
- Se encontraron diferencias entre las respuestas de las diferentes poblaciones.
- La distribución de niveles de enfermedad en cada población sugiere la presencia de resistencia de tipo cuantitativa o poligénica.
- Los individuos que no presentaron ningún síntoma (grado 0) se podrían utilizar en cruzamientos para obtener genotipos resistentes a *P. halstedii*.
- Se encuentran disponibles marcadores moleculares útiles para selección aunque la búsqueda y el mapeo de nuevos genes es permanente.

## BIBLIOGRAFIA

ASAGIR (2022). <http://www.asagir.org.ar>.

Cantamutto M, Presotto A, Moroni Fernández I, Alvarez D, Poverene M, Seiler G. 2010. High infraspecific diversity of wild sunflowers (*Helianthus annuus* L.) naturally developed in central Argentina. *Flora* 205: 306-312.

Delmotte F, Giresse Z, Richard-Cervera S, Vear F, Tourvieille J, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D. 2008. EST-derived markers highlight genetic relationships among *Plasmopara halstedii* French races. 17<sup>TH</sup> Internacional sunflower conference, Vol. 1.

Delmotte F, Tourvieille de Labrouhe D, Ahmed S. 2012. Emerging virulence arising from hybridization facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genetics and Biology*, Vol. 49 (10): 847-855.

European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM 7/85 (2) *Plasmopara halstedii*. 2014. *Bulletin OEPP/EPPO* 44 (3): 350-359.

FAUBA, 2023. <https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/>

Gascuel Q, Martínez Y, Boniface M.C, Vear F, Pichon M, Godiard L. 2015. The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular plant pathology* 16 (2): 109-122.

Gilley A.M, Markell S.G, Gulya T.J, Misar C.G. Prevalence and Virulence of *Plasmopara halstedii* (downy mildew) in sunflowers in 2014. 2015. Sunflower Research Forum, National Sunflower Association.

Gulya T.J, Harveson R, Mathew F, Block C, Thompson S, Kandel H, Berglund D, Sandbakken J, Kleingartner L, Markell S. 2019. Comprehensive disease survey of U.S sunflower: disease trends, research priorities and unanticipated impacts. *Plant Disease* 103: 601-618.

Gulya T.J, Miller J.F, Viranyi F, Sackston W.E. 1991. Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia* 14 (15): 11-20.

Hernández F, Presotto A, Poverene M, Mandel J. 2019. Genetic diversity and population structure of wild sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Argentina: reconstructing its invasion history. *Journal of Heredity* 110: 746-759.

INTA Balcarce. 2019. <https://inta.gov.ar/noticias/mildiu-del-girasol-aspectos-a-tener-en-cuenta-para-evitar-epidemias>.

Lombardo L, Nisi M, Vanzetti L, Helguera M. 2014. Uso de marcadores moleculares en el programa de mejoramiento de trigo del INTA. Informe E.E.A. Marcos Juárez.

Martínez, A. L. 2022. Aportes al conocimiento y manejo de mildiu del girasol en Argentina: variabilidad genética del patógeno, detección y resistencia [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad Nacional del Sur.

Miller J.F, Gulya T, Seiler G.J. 2002. Registration of five fertility restorer sunflower germplasms. *Crop Science* 42 (3): 989-991.

Molinero-Ruiz M.L, Domínguez J, Melero-Vara, J.M. 2002. Races of isolates of *Plasmopara halstedii* from Spain and studies on their virulence. *Plant Disease* 86: 736-740.

Pilet-Nayel M.L, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan M.C, Fournet S, Durel C.E, Delourme R. 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science* (8): 1838.

Poverene M, Carrera A, Ureta S, Cantamutto M. 2004. Wild *Helianthus* species and wild-sunflower hybridization in Argentina. *Helia* 27 (40): 133-142.

Qi L.L, Long M.Y, Jan C.C, Ma J.G, Gulya J.T. 2015. *PI17* is a novel gene independent of known downy mildew resistance genes in the cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 128: 757-767.

Sala C.A, Bulos M, Altieri E, Ramos M.L. 2012. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia* 35 (57): 57-70.

Spring O, Gomez-Zeledon J, Hadziabdic D, Trigiano M.C, Lebeda A. 2019. Biological characteristics and assessment of virulence diversity in pathosystems of economically important biotrophic oomycetes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 37 (6): 439-495.

Spring, O. 2019. Spreading and global pathogenic diversity of sunflower downy mildew - Review. *Plant Protection Science* Vol. 55: 149-158.

Tourvieille de Labrouhe D, Serre F, Walser P, Roche S, Vear F. 2008. Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica* 164: 433-444.

Ureta S, Cantamutto M, Carrera A, Delucchi C, Poverene M. 2008. Natural hybrids cultivated and wild sunflowers (*Helianthus* spp.) in Argentina. *Genet Resour Crop Evol* 55: 1267-1277.

Usatov A.V, Klimenko A.I, Azarin K.V, Gorbachenko O.F, Markin N.V, Tikhobaeva V.E, Kolosov Yu.A, Usatova O.A, Bakoev S.Yu, Bibov M.Yu, Getmantseva L.V. 2014. DNA-Markers of sunflower resistance to the downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 10 (2): 125-129.

USDA (2023). [https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tx31qh68h/mp48ts41n/9k420s80v/oilseeds\\_1.pdf](https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tx31qh68h/mp48ts41n/9k420s80v/oilseeds_1.pdf).

Trojanová Z, Sedlářová M, Gulya T.J, Lebeda A. 2017. Methodology of virulence screening and race characterization of *Plasmopara halstedii*, and resistance evaluation in sunflower – a review. *Plant Pathology* 66: 171-185.

Vear F, Serre F, Jouan-Dufournel I, Bert P.F, Roche S, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D, Vincourt P. 2008. Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 164: 561-570.

Young P. A, Morris H. E. 1927. *Plasmopara* downy mildew of cultivated sunflowers. *American Journal of Botany*, 14 (9): 551-552.

Zhang Z.W, Ma G.J, Zhao J, Markell S.G, Qi L.L. 2017. Discovery and introgression of the wild sunflower-derived novel downy mildew resistance gene *PI19* in confection sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 130: 29-39.