

## Razas de *Plasmopara halstedii* presentes en España y evaluación de susceptibilidad en híbridos comerciales

J. M. MELERO-VARA<sup>1</sup>, L. MOLINERO RUIZ<sup>2</sup>, A. MERINO<sup>2</sup>, y J. DOMINGUEZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dep. Protección Cultivos. Inst. Agric. Sostenible, CSIC, Apdo. 4084, 14080 Córdoba, Spain

<sup>2</sup> Dep. Mejora y Agronomía CIDA, Córdoba. DGIA, Apdo. 4240, 14070 Córdoba, Spain

### Abstract

Until 1980, the two prevalent races of *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni were races 1 (or European race) and race 2 (Red River race) which had been reported in sunflower (*Helianthus annuus* L.) crops of Europe and North America, respectively. Races similar to race 2 were reported from some restricted areas in Europe, followed by the identification of races 3, 4 and 6 in several countries of Central Europe. However, a higher degree of complexity was shown in North America, with a total of eight races (with race 1 identified in Canada but not in the U.S.A.). Since the first report of the pathogen in Spain in 1972, race 1 has been the only race of *P. halstedii* identified there until 1994.

Simultaneously to the appearance of new, more virulent races of the pathogen, the search for new sources of resistance has been fruitful in finding and, in some cases, studying the allelism and inheritance of resistance genes named  $Pl_1$ - $Pl_1$ , when confirmed as different from the previous ones and  $Pl_1$ - $Pl_1$ , when merely hypothesised as new genes.

The widespread use of resistant cultivars of sunflower that incorporate gene  $Pl_2$ , conferring resistance to both races 1 and 2 during 10-15 years in Spain has not brought about the appearance of new, more virulent races, as elsewhere, until 1994 when races 3 and 7 were found in restricted areas of Cataluña and Andalucía, respectively. Consequently, the evaluation of 74 commercial sunflower hybrids of the Spanish Catalog for their susceptibility to our isolate of race 3 of *P. halstedii* showed that none of them was resistant.

A re-appraisal of the racial situation of downy mildew in Spain has been conducted in 1995 using 20 field isolates of *P. halstedii* collected from several different areas and sunflower hybrids in Spain. Pregerminated seeds of differentials RHA266, HA61, DM2, RHA325 and DM4, and the universal suscept Peredovick, were inoculated with a sporangial suspension by the WSI method, then planted in a sand:perlite substrate and incubated following international procedures. Six of those isolates (five from Andalucía and one from the Central Region) belonged to race 1, while only one isolate, from Andalucía, overcame gene  $Pl_1$  (in RHA266) being therefore ascribed to race 2. Two isolates, both from Cataluña, belonged to race 3. Race 4 was only present in Andalucía (two isolates). Two other isolates from the same area belonged to race 6 whereas seven from Andalucía were of race 7.

These results suggest a possibility for downy mildew to outbreak in the Spanish sunflower crops in years with suitable environmental conditions, since Spanish hybrids only carry the resistance gene  $Pl_2$  and a diversity of races of *P. halstedii* overcoming that gene occur in different areas.

**Key words:** sunflower, downy mildew, resistance genes, physiological races.

## Introducción

*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni, un hongo oomiceto parásito obligado, es el agente causal del mildiu del girasol (*Helianthus annuus* L.). Esta enfermedad afecta primordialmente a las plantas en los primeros estadios de desarrollo, originando infecciones sistémicas que inducen la aparición del característico mosaico verde pálido alrededor de las nerviaciones foliares, enanismo y desarrollo débil de raíces y brotes vegetativos.

Al igual que el cultivo, este hongo es nativo del norte de América, desde donde se ha ido extendiendo a todas las zonas en las que se cultiva girasol de forma extensiva, excepto Sudáfrica, Australia y posiblemente el norte de África (SACKSTON, 1992a).

Hasta principios de los 80, sólo se habían identificado la raza 1 (o raza Europea) (en Europa y Canadá), la raza 2 (o raza Red River) (en Dakota del Norte y Minnesota) y otras tres razas en Italia, Odessa (Rusia) y Fundulea (Rumanía) respectivamente (ZIMMER, 1974; SACKSTON, 1981). En 1981 se identificaron otras dos razas de *P. halstedii*, también en Norteamérica, que se denominaron razas 3 y 4 (CARSON, 1981; GULYA y URS, 1985). La situación racial del patógeno se ha ido volviendo gradualmente más compleja. En 1990 se han identificado en EE.UU. las razas 5, 7 y 8 (GARCIA y GULYA, 1991), mientras que en Europa se han identificado las razas 4, 6 y 7 en 1991 (GULYA *et al.*, 1991; GULYA y VIRANYI, 1991). Además, existen evidencias recientes de la presencia de nuevas razas en Canadá diferentes a las descritas hasta ahora en Norteamérica (RASHID, 1993).

Paralelamente a la identificación de las diferentes razas de *P. halstedii* se han ido encontrando genes de resistencia a ellas. Los genes  $Pl_1$  y  $Pl_3$ , supuestamente idénticos (ZIMMER y KINMAN, 1972), confieren resistencia a la raza 1, mientras que el gen  $Pl_2$  (presente en HA 61) y el  $Pl_4$  (en HIR34), que parece indistinguible del  $Pl_2$  (ZIMMER, 1974), son responsables de la resistencia tanto a la raza 2 como a la 1 (SACKSTON *et al.*, 1990). El gen  $Pl_5$  regula la resistencia únicamente a la raza 3 (MILLER y GULYA, 1987). También se han encontrado los genes de resistencia  $Pl_6$ ,  $Pl_7$  y  $Pl_8$ , todos los cuales confieren resistencia a la raza 6 de *P. halstedii* (SACKSTON *et al.*, 1990).

En España, la enfermedad fue descrita por primera vez en 1972. Desde entonces, la única raza de mildiu identificada ha sido la raza 1 (JIMENEZ DIAZ *et al.*, 1980). Durante la pasada década, los híbridos más extensamente cultivados en España han sido híbridos comerciales inscritos en el Registro Nacional que, supuestamente, tienen incorporado el gen  $Pl_2$ , el cual les confiere resistencia a las razas 1 y 2 del patógeno.

Con la complejidad actual de la situación racial de *P. halstedii* tanto en Norteamérica (GARCIA y GULYA, 1991), como en Europa (GULYA y VIRANYI, 1991), asociada a la presión de selección ejercida sobre el patógeno por el uso continuado de cultivares resistentes, nos pareció necesario reevaluar la composición racial de *P. halstedii* en España. Por ello, se han realizado trabajos de caracterización fenotípica de diferentes aislados procedentes de cultivos españoles de girasol de distintas zonas geográficas, así como la evaluación por su susceptibilidad a la raza 3 de una colección de híbridos de girasol registrados en España.

## Materiales y métodos

En prospecciones realizadas en 1994 y 1995 en tres áreas geográficas diferentes de España, se obtuvieron 22 aislados de *P. halstedii* que afectaban distintos híbridos de girasol. La multiplicación del inóculo de dichas muestras se llevó a cabo mediante la inoculación artificial

de plántulas de girasol cv. Peredovick recién germinadas con una suspensión de zoosporangios obtenidos del material de campo infectado, siguiendo el método WSI de acuerdo con la propuesta de estandarización internacional (GULYA *et al.*, 1991a). Tras la esporulación del hongo en los cotiledones de dichas plántulas, se realizó la caracterización fenotípica de los aislados de *P. halstedii*. Para ello, se pregerminaron durante 24-48 h a 20°C, semillas de las líneas diferenciadoras de girasol que se indican en la Tabla 1, proporcionadas por la "Research Unit on Sunflower Seeds", USDA-ARS, Fargo ND, U.S.A., utilizando como testigo susceptible el cv. Peredovick. A continuación se inocularon según la propuesta para estandarización metodológica internacional (GULYA *et al.*, 1991a), se mantuvieron durante 10-12 días en sustrato de arena:perlita (2:3, v/v) a temperatura de 16-20°C y bajo fotoperiodo de 12h con intensidad luminosa de 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , y se indujo seguidamente la esporulación manteniéndolas durante 48 h más en una atmósfera saturada de humedad. En el caso de muestras que daban reacción heterogénea en las líneas diferenciadoras, se purificó el inóculo previamente a su caracterización fenotípica definitiva. Las asignaciones de reacción susceptible se hicieron cuando los cotiledones y/u hojas resultaron ostensiblemente esporulados, mientras que la ausencia de esporulación o trazas de ella se consideraron una reacción resistente (SACKSTON, 1992b).

El mismo proceso de inoculación, incubación de las plántulas, y observación de esporulación en ellas, se utilizó en la evaluación de resistencia o susceptibilidad a un aislado de raza 3 en 74 híbridos comerciales, excepto por el sustrato de incubación, que fue perlita.

## Resultados

La caracterización fenotípica de los 22 aislados de *P. halstedii* obtenidos en 1994 y 1995 indicó que seis de ellos (cinco de Andalucía y uno de la zona centro de España) pertenecían a la raza 1. De la raza 2 únicamente se encontró un aislado, en Andalucía, que superaba sólo el gen  $PI_1$  presente en RHA266. Tres aislados, provenientes de Cataluña, fueron los que superaron los genes de resistencia  $PI_1$  (en RHA266) y  $PI_2$  (en HA61) pero no mostraron esporulación en DM2 ni en RHA325, por lo que se asignaron a la raza 3 de *P. halstedii*. Cuando la reacción fue de susceptibilidad en las cuatro líneas diferenciadoras antes mencionadas, los aislados (dos, procedentes de Andalucía) fueron de la raza 4, lo cual habría de confirmarse al inducir reacciones de resistencia en la diferenciadora DM4 y de susceptibilidad en DM6. Otros dos aislados, también de Andalucía, que al ser inoculados en HA61 no ocasionaron síntomas pero sí lo hicieron al inocular las variedades RHA266, DM2 y RHA325, se identificaron como raza 6. Los ocho aislados restantes (todos ellos de Andalucía) han resultado ser patogénicos en RHA266, DM2, RHA325 y HA61, y se han considerado por tanto pertenecientes a la raza 7 de *P. halstedii* (Tabla 1).

Ninguno de los 72 híbridos comerciales de girasol resultó resistente a la inoculación artificial con nuestros aislados de la raza 3 de *P. halstedii*, mientras que los testigos de susceptibilidad (Peredovick y HA61) y de resistencia (el híbrido francés Novasol) mostraron reacciones de susceptibilidad y resistencia respectivamente.

## Discusión

Con los resultados obtenidos se pone de manifiesto por primera vez en España la presencia de razas de *P. halstedii* distintas a la raza 1, que era la única descrita hasta la fecha (JIMENEZ DIAZ *et al.*, 1980). A partir de las muestras del patógeno obtenidas en 1994 y 1995 se han

obtenido aislados pertenecientes a las razas 2 (en Andalucía), 3 (en Cataluña), 4, 6 y 7 (todas ellas en Andalucía). La raza 2 de *P. halstedii* no había sido descrita hasta ahora en Europa Occidental (GULYA y VIRANYI, 1991; MOUZEYAR *et al.*, 1994) aunque sí hay referencias de las razas 3, 4, 6 y 7 en diversos países europeos (GULYA y VIRANYI, 1991).

La presencia de la raza 3 de *P. halstedii* en Cataluña fue detectada por vez primera en 1994 (MELERO VARA y DOMINGUEZ GIMENEZ, datos no publicados). Los resultados que aquí se han presentado confirman su presencia en aquella región, probablemente restringida a una comarca muy próxima a Francia.

Las condiciones poco favorables para el desarrollo de infecciones y la expresión de la enfermedad durante la primavera de 1995, debido a la sequía, sugieren que bajo condiciones favorables podrían ocurrir epidemias importantes de mildiu, puesto que las variedades comerciales de girasol en España no tienen resistencia a las razas 3 y 4, de *P. halstedii*. En la próxima estación de cultivo se realizarán nuevas prospecciones para ampliar los conocimientos sobre la distribución racial del patógeno; de confirmarse una mayor importancia de la enfermedad se sugiere, ante la diversidad racial, el empleo de fungicidas en tratamientos de semillas a la vez de estudiar las posibilidades de erradicación de estas nuevas razas de mildiu en las parcelas infestadas.

#### Bibliografía

- Carson, M.L. 1981. New race of *Plasmopara halstedii* virulent on resistant sunflowers in South Dakota. *Plant Disease* 65: 842-843.
- García, G. y T.J. Gulya. 1991. Sunflower downy mildew race distribution in North Dakota and Minnesota. Pp. 3-5 in: *Proceedings Sunflower Research Workshop*, 1991, Fargo, ND, U.S.A.
- Gulya, T.J., Miller, J.F., Viranyi, F. y W.E. Sackston. 1991a. Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia* 14(15): 11-20.
- Gulya, T.J., Sackston, W.E. Viranyi, F., Masirevic, S. y K.Y. Rashid. 1991b. New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *Phytopathology* 132: 303-311.
- Gulya, T.J. y R.R. Urs. 1985. A new race of sunflower downy mildew. *Phytopathology* 75: 1339.
- Gulya, T.J. y F. Viranyi. 1991. Races of sunflower downy mildew in Hungary and comparison of apron tolerance between U.S. and hungarian isolates. Pp 6-7 in: *Proceedings Sunflower Research Workshop*, 1991, Fargo, ND, U.S.A.
- Jiménez Diaz, R.M., Melero Vara, J.M., Blanco López, M.A. y A.P. Trapero Casas. 1980. El mildiu del girasol en España: situación actual. *Comunicaciones I.N.I.A. Ser. Prot. Veg.* 11: 26 págs.
- Miller, J.F. y T.J. Gulya. 1987. Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew in sunflower. *Crop Science* 27: 210-212.
- Rashid, K.Y. 1993. Incidence and virulence of *Plasmopara halstedii* on sunflower in western Canada during 1988-1991. *Canadian Journal of Plant Pathology* 15: 206-210.

- Sackston, W.E. 1981. Downy mildew of sunflower. Pp. 546-575 in: The downy mildews. Edited by D.M. Spencer. Academic Press, London.
- Sackston, W.E., Gulya, T.J., y J.F. Miller. 1990. A proposed international system for designating races of *Plasmopara halstedii*. Plant Disease 74: 721-723.
- Sackston, W.E. 1992a. Managing the major sunflower diseases: from cultural practices to breeding for resistance. Pp. 667-699 in: Proceedings of the 13th International Sunflower Conference vol. 1, 1992, Pisa, Italy.
- Sackston, W.E. 1992b. Cotyledon limited infection (CLI) and leaf disk immersion (LDI) inoculation of sunflower by downy mildew (*Plasmopara halstedii*). Pp. 840-848 in: Proceedings of the 13th International Sunflower Conference vol. 1, Italy.
- Zimmer, D.E. 1974. Physiological specialization between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. Phytopathology 64: 1465-1467.
- Zimmer, D.E. y L. Kinman. 1972. Downy mildew resistance in cultivated sunflower and its inheritance. Crop Science 12: 749-751.

Tabla 1. Identificación racial de aislados de *P. halsztrai* procedentes de diferentes áreas de España (1994-95)  
 Table 1. Racial identification of isolates of *P. halsztrai* from different areas of Spain (1994-95)

Aislado/Año Isolate/Year	Procedencia geográfica Location	Reacción con diferenciadoras <sup>a</sup> Differential reactions										Raza		
		Petedovick	RHA266	HA61	DM2	RHA325	DM4	DM6	DM6	DM6	DM6			
AZ/95	Guadalajara	S <sup>b</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1
BA/95	Gerona	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	3
CA/95	Gerona	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	3
GE/94	Gerona	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	3
CO/95	Córdoba	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	7
FAI/95	Sevilla	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1
FAII/95	Sevilla	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1
FAIII/95	Sevilla	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1
FAIV/95	Sevilla	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1
FAV/95	Sevilla	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	6
LCI/95	Córdoba	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	7
LCII/95	Córdoba	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	7